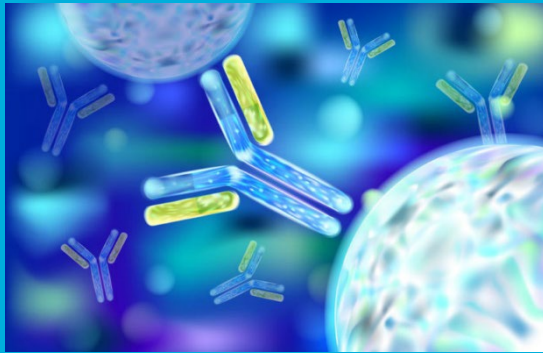


Autoimmuun serologie

ANA, ENA en anti-dsDNA diagnostiek



*Renate van der Molen, Medisch Immunoloog
Laboratorium Medische Immunologie*

Renate.vanderMolen@radboudumc.nl

Disclosures

(potentiële) belangenverstrengeling	Geen
Voor bijeenkomst mogelijk relevante relaties met bedrijven	Bedrijven: nvt
• Sponsoring of onderzoeksgeld • Honorarium of andere (financiële) vergoeding • Aandeelhouder • Andere relatie, namelijk ...	• • • •

Autoimmuunziekten

Immunologische reacties op lichaamseigen bestanddelen (*auto-antistoffen, auto-reactieve T-lymfocyten*)

Leidend tot

Structurele of functionele schade aan weefsels of organen

- Orgaanspecifiek: auto-reactiviteit tegen weefseldeterminanten van 1 orgaan
- Niet-orgaanspecifiek: (gegeneraliseerd, systemisch) meerdere weefsels/organen betrokken

Waarom?

- Omgevingsfactoren (industrie (zware metalen), roken, trauma, dieet etc)
- Rol voor Infecties/microbiome
- Hormonale factoren (meer vrouwen dan mannen)
- Erfelijke aanleg (HLA)

Bepaling van auto-antistoffen

welke soms:

*direct betrokken zijn bij een schadelijk auto-immuunproces
(pathogeen bv anti-GBM)*

maar meestal:

***een indirecte** afspiegeling zijn van weefselschade waarbij auto-antigenen zijn vrijgekomen waartegen vervolgens auto-antistoffen zijn opgewekt*

Anti-nucleaire antistoffen (ANA)

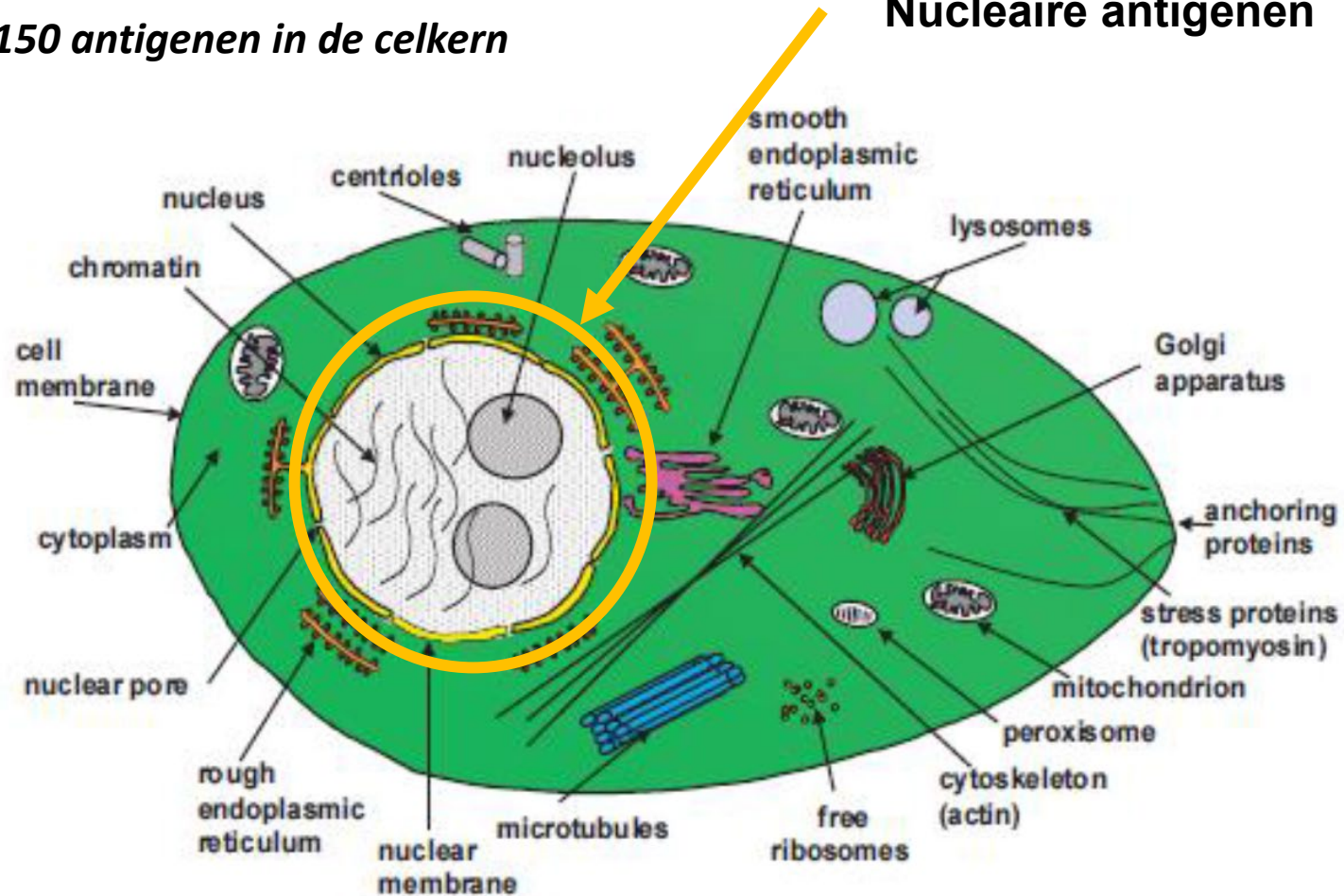
Toepassing

- Systemische autoimmuun ziekten (o.a. SLE, Sjögren, MCTD, sclerodermie, myositis, RA)
- Orgaan specifieke autoimmuun ziekten (AIH, PBC)
- Diagnostisch criterium voor SLE, drug induced lupus, MCTD, AIH
- Kan prognostisch zijn bij JIA

Gericht tegen welk antigeen?

100-150 antigenen in de celkern

Nucleaire antigenen



Indirecte immunofluorescentie test (IIF) op HEp-2 cellen is de gouden standaard

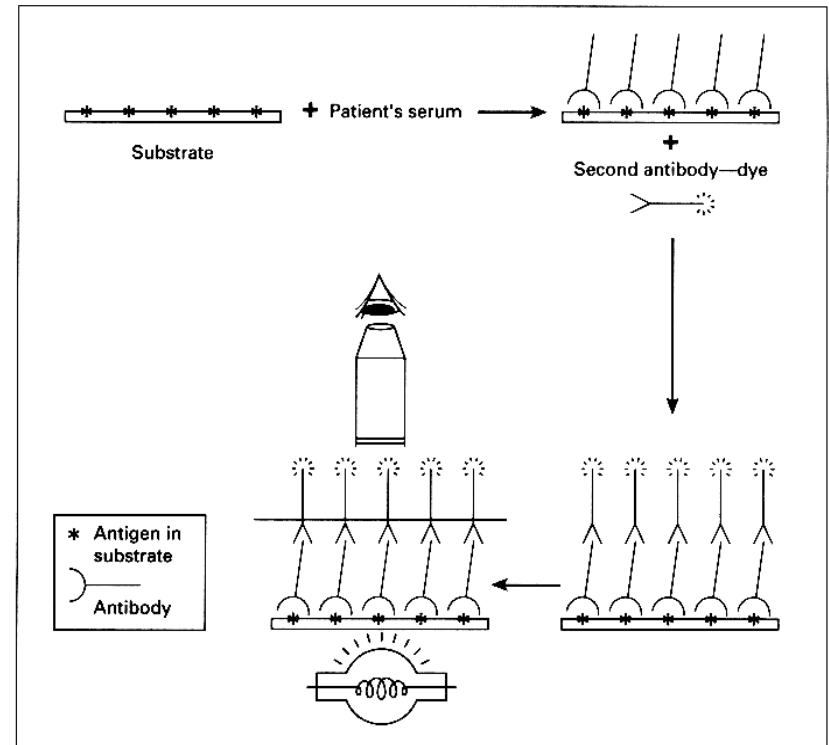
AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY	
POSITION STATEMENT	
SUBJECT:	Methodology of Testing for Antinuclear Antibodies
PRESENTED BY:	American College of Rheumatology
FOR DISTRIBUTION TO:	Members of the American College of Rheumatology Medical Societies Managed Care Organizations/Third Party Carriers Laboratories
SUMMARY:	• The immunofluorescence antinuclear antibody (ANA) assay is the gold standard for ANA testing with greater sensitivity than solid phase assays. • HEp-2 cells have approximately 100 to 150 possible autoantigens. These cells are used to detect ANAs by the immunofluorescence (IF) method, in which both pattern and titer can be described, and to display a variety of autoantigens not present in multiplex ANA tests. • Many commercial laboratories and some hospital laboratories have switched their ANA screening test to solid phase immunoassays, such as a multiplex platform. The latter technique can screen and process large volumes of clinical specimens more quickly and at less cost than the traditional immunofluorescence ANA test using fixed HEp-2 cells as substrate. • These multiplex assays can detect only the specific autoantibodies directed against the limited number (typically 8-10) autoantigens that are displayed. • Laboratories should indicate the method used when reporting ANA results.

Belangrijk om te weten welke test is gedaan

Anti-nucleaire antistoffen; de test

Immuunfluorescentietest met als substraat Hep2 (cellijn afgeleid van een larynxcarcinoom)

➤NB vroeger gebruikten we nog Hep2000 (getransfecteerd met SSA)



Anti-nucleaire antistoffen; de test



Medscape®

www.medscape.com

Peripheral
(rim)



anti-DNA (not
seen on HEp-2)

SLE

Homogeneous
(diffuse)



anti-DNA
anti-histone
anti-DNP
(nucleosomes)

RA & SLE
Misc. Disorders
(anti-ssDNA)

Speckled



anti-Sm & RNP
anti-Ro & La
anti-Jo-1 & Mi-2
anti-Scl-70

SLE & SS
PM/DM
PSS (Systemic)

Centromere



anti-centromere

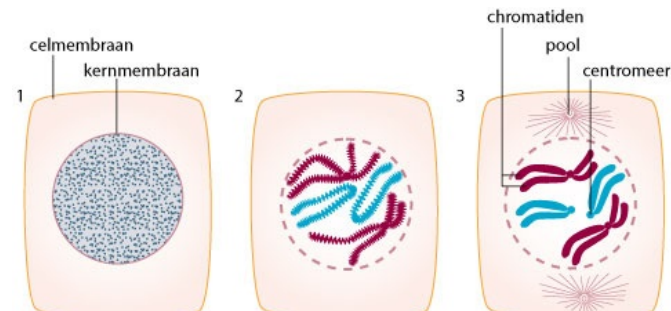
PSS (CREST)

Nucleolar



anti-nucleolar

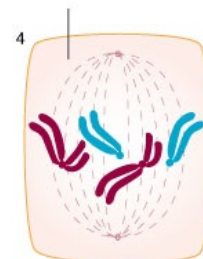
SLE & PSS



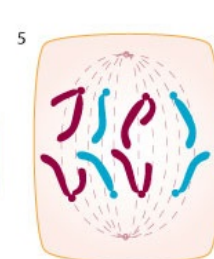
de kerninhoud is korrelig,
draderig of optisch leeg
trekdraad

chromosomen worden
zichtbaar door spiralisatie

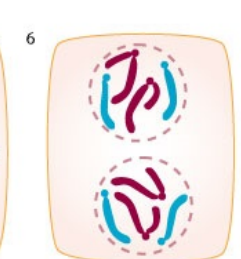
de chromosomen zijn
duidelijk zichtbaar



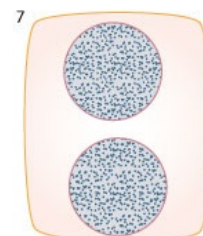
trekdraden van pool tot
centromeer



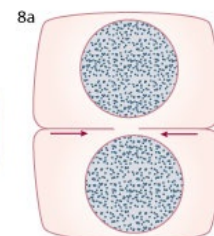
de chromatiden worden
naar de polen getrokken



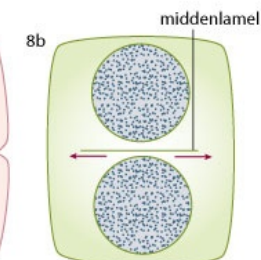
de kernmembraan wordt
zichtbaar



de chromatiden
despiraliseren

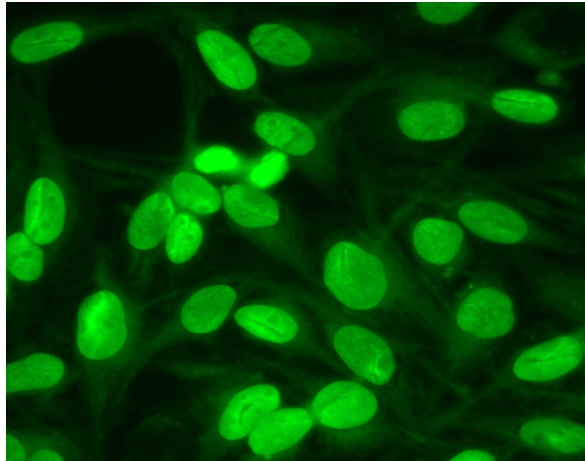


de dierlijke cel deelt zich
door insnoering

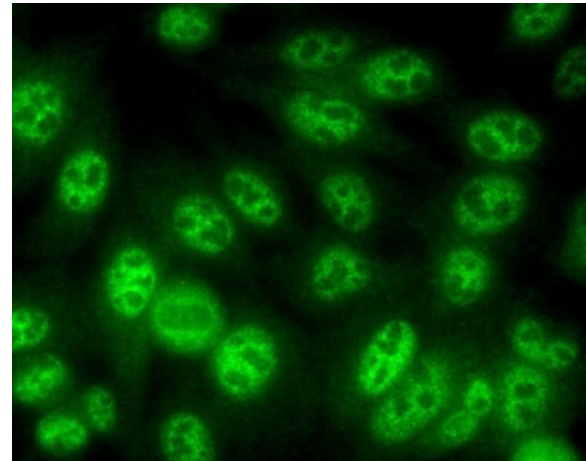


de plantaardige cel deelt zich
door de vorming van een
middenlamel

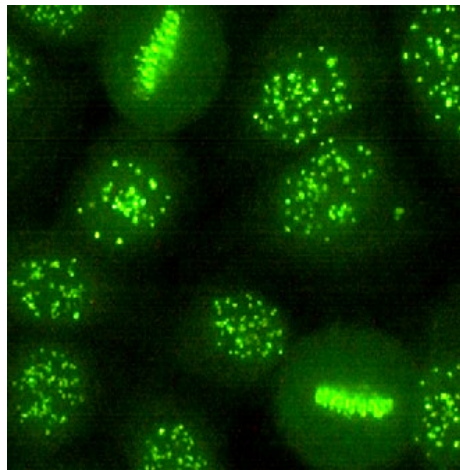
ANA beelden op Hep2



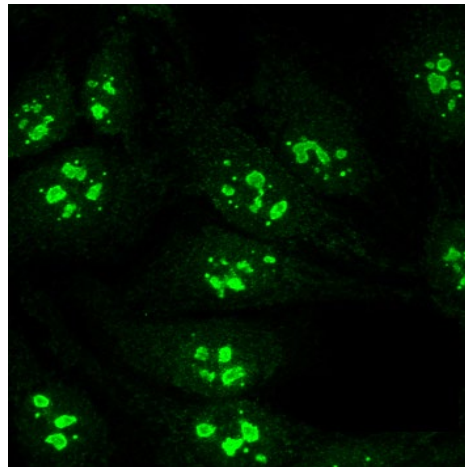
Homogeen
DNA,
histones,



Stip
RNP,
SCL70,
SSB
SSA
SM
Mi-2
RNA-PiII



Centromeren



Nucleoli
RNP
PM-Scl
fibrillarine



Geen ANA!!!

Cytoplasmatisch
Jo-1
Ribosomaal P
Mitochondriën (M2)

ANA patronen

[Home](#) [Nomenclature and classification tree](#) ANA Patterns ▾ Choose AC-# ▾ or

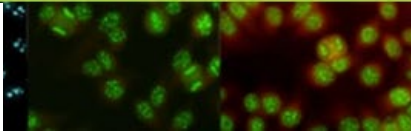


INTERNATIONAL CONSENSUS ON

www.ANApatterns.org



HEp-2 cell patterns



Negative
AC-0

Nuclear
AC-1 to AC-14, AC-29

Cytoplasmic
AC-15 to AC-23

Mitotic
AC-24 to AC-28

Homogeneous
AC-1

Speckled
AC-2,4,5,29

Centromere
AC-3

Discrete nuclear dots
AC-6,7

Nucleolar
AC-8,9,10

Nuclear envelope
AC-11,12

Pleomorphic
AC-13,14

Dense fine speckled
AC-2

Fine speckled
AC-4

Large/coarse speckled
AC-5

Topo I
AC-29

Multiple
AC-6

Few
AC-7

Homogeneous
AC-8

Clumpy
AC-9

Punctate
AC-10

Smooth
AC-11

Punctate
AC-12

PCNA
AC-13

CENP-F
AC-14

Fibrillar
AC-15,16,17

Speckled
AC-18,19,20

AMA
AC-21

Golgi
AC-22

Rods and rings
AC-23

Linear
AC-15

Filamentous
AC-16

Segmental
AC-17

Discrete dots
AC-18

Dense fine speckled
AC-19

Fine speckled
AC-20

NuMA
AC-26

Centrosome
AC-24

Spindle fibers
AC-25

Intercellular bridge
AC-27

Mitotic chromosomal
AC-28

Competent-Level

Expert-level report

Metaphase plate is stained

Radboudumc

ANA: wanneer positief?

Auto-immuunziekten	Positiviteit %
• SLE	>99
• RA	25
• Systemische Sclerodermie	90
• Polymyositis/dermatomyositis	20
• Mixed connective tissue disease	100
• Primair syndroom van Sjögren	40-75
Geneesmiddelen geïnduceerde LE	100
Maligniteiten	20
Infectieziekten	
• Bacterieel (lepra)	5-30
• Viraal (mononucleosis, hepatitis)	
• Parasitair (malaria, Leishmania, trypanosomiasis)	
Oudere personen	10-35
Gezonden	5

Geen gouden wet: maar hoge titer (>1:320) is vaak klinisch relevanter dan lage titer van 1:80

ANA welke specificiteit?

Uitzoeken door antistoffen tegen extraheerbare nucleaire antigenen (ENA) te bepalen

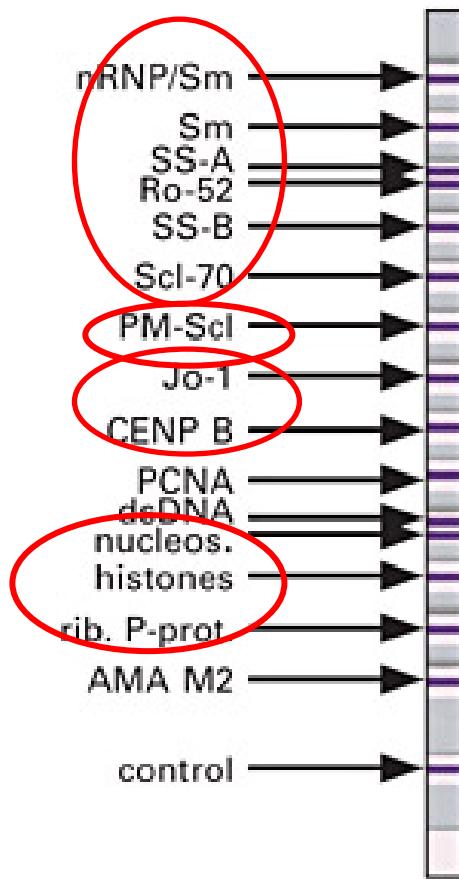
Van oudsher bevatten de meeste ENA screeningstesten

1. 7 antigenen (*RNP, Sm, SS-A, SS-B, Scl-70 (topo), Jo-1, en centromeer B*)
2. Soms aangevuld met een ENA typering lijnblot
EXTRA *ribosomaal P, nucleosomen, histonen, PM-Scl*
3. Er bestaat ook een multiplex screen die bevat 16 antigenen voor *anti-dsDNA, SSA (Ro52 en Ro60), SSB, Sm, U1RNP, Scl-70 (topoisomerase), centromeer, Jo-1, Rib-P test, Fibrillarin test, PCNA, RNA Pol III, PM-Scl, Mi-2 en DFS-70*

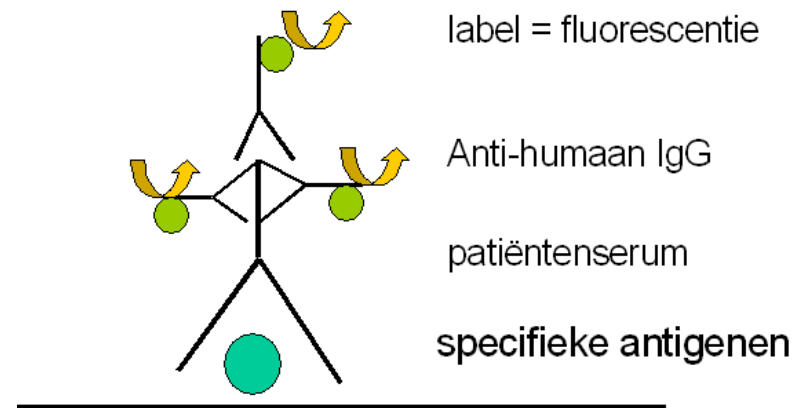
Officieel dient het laboratorium een specificiteit te bevestigen met een andere test

Extraheerbare nucleaire antigenen (ENA)

Lijnblot



ELISA based



SLE and ENA

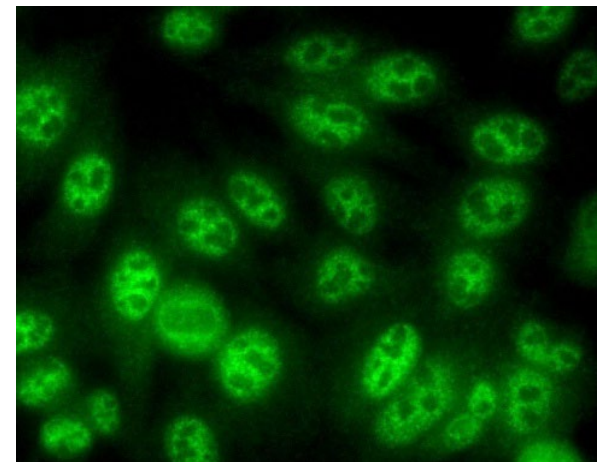
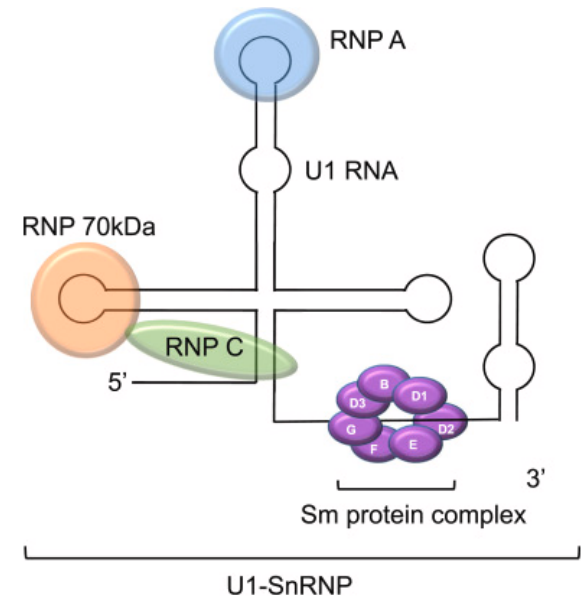
Anti-U1 RNP (25-47% SLE en 100% MCTD)

Anti-Sm (5-30% SLE)

m.n. gericht tegen RNP70, SmD

Vaker aanwezig bij lupus nefritis en
neuropsychiatrische SLE in jSLE
(*Bao, Childhood lupus 2023*)

Ook vaker in Aziatische en
Creoolse patiënten



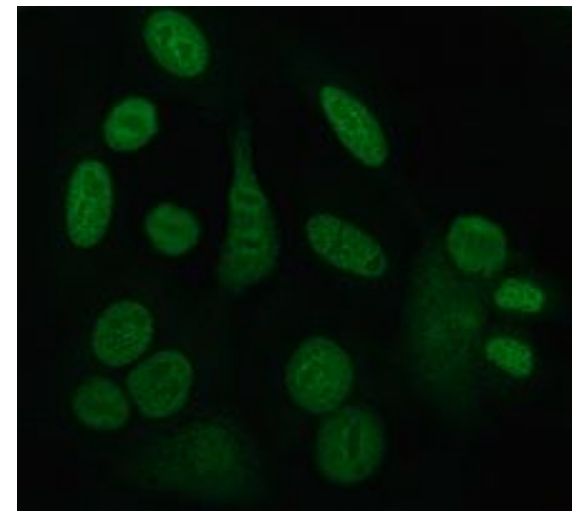
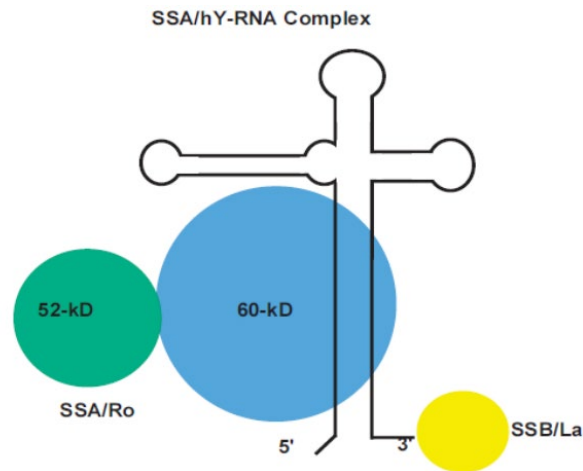
SLE and ENA

Anti-SSA (Ro52 en Ro60) en **anti-SSB** (15-35% SLE patiënten)

In de classificatiecriteria van Sjögren

Geassocieerd met:

- Neonatale lupus
- SLE/Sjögren overlap
- Subacute cutane LE



Anti-SSA hele fijne stip =
gemakkelijk te missen

THE JOURNAL OF AABB

transfusion.org

TRANSFUSION

BLOOD COMPONENTS |  Full Access

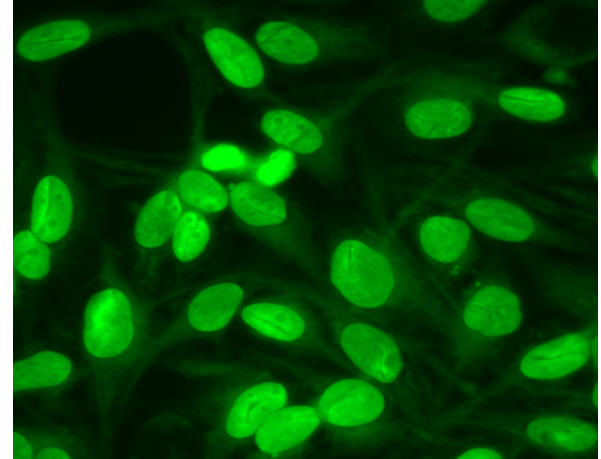
Anti-SSA antibodies are present in immunoglobulin preparations

Renate G. van der Molen , Dörte Hamann, Joannes F.M. Jacobs, Arnold van der Meer, Jan de Jong, Christine Kramer, Paul F.W. Strengers, Jos W.M. van der Meer

First published: 13 November 2014 | <https://doi.org/10.1111/trf.12922> | Citations: 11

Anti-dsDNA

- Alleen zinvol om uit te voeren als de ANA positief is (geeft m.n. een homogeen patroon)

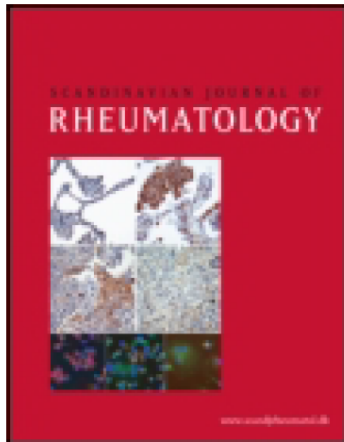


- Meeste laboratoria in NL voeren de test uit middels een FEIA (specificiteit 84-94%, sensitiviteit 40-73%)
- Soms is de anti-dsDNA dubieus/zwak positief dan kan er sprake zijn van laag-afide antistoffen. Het is goed om dan nog een tweede test te doen om de antistoffen te bevestigen.

Antistoffen tegen extraheerbare nucleaire antigenen (ENA) en de associatie met verschillende ziekten

	RA	SLE	SjS	SSc	MCTD	PM/DM	Gezond
ANA	25	>99	65	30	100	20	-
ds-DNA	-	65	-	-	0	-	-
SS-A/Ro	-	35	70	25 ^a	0	30 ^a	-
SS-B/La	-	15	50	-	0	-	-
nRNP	-	35	15	20	100	-	-
Sm	-	20	-	-	0	-	-
Scl70 → Topoisomerase I	-	-	-	25	0	-	-
ACA	-	-	-	30 ^b	0	-	-
Jo-1	-	-	-	-	0	25	-

Cytoplasmatische ANA is in principe een negatieve ANA...echter deze wordt niet in alle laboratoria gerapporteerd



Scandinavian Journal of Rheumatology

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/irhe20>

Anti-ribosomal P antibodies as a single serological marker in SLE: lupus in disguise

J Kleinnijenhuis^a, RG van der Molen^b, PML Franssen^c, JH Berden^c, JW van der Meer^a & JFM Jacobs^b

^a Departments of ¹Medicine, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

^b Departments of Laboratory of Medicine, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

^c Departments of Nephrology, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

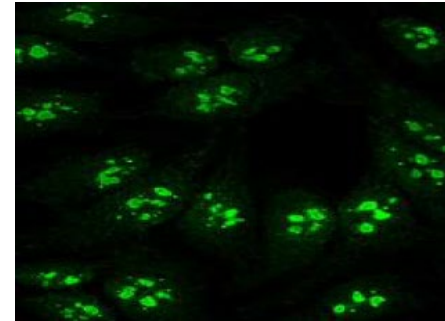
Published online: 05 Feb 2013.

Kunnen ook gericht zijn tegen andere antigenen die niet in de ENA zitten zoals:

- specifieke antistoffen gevonden bij sclerodermie (zoals anti-fibrillarine, anti-RNA polymerase III)
- Specifieke antistoffen gevonden bij myositis (zoals SRP, TIF1g)

Serologie voor sclerodermie en/of myositis is apart aan te vragen

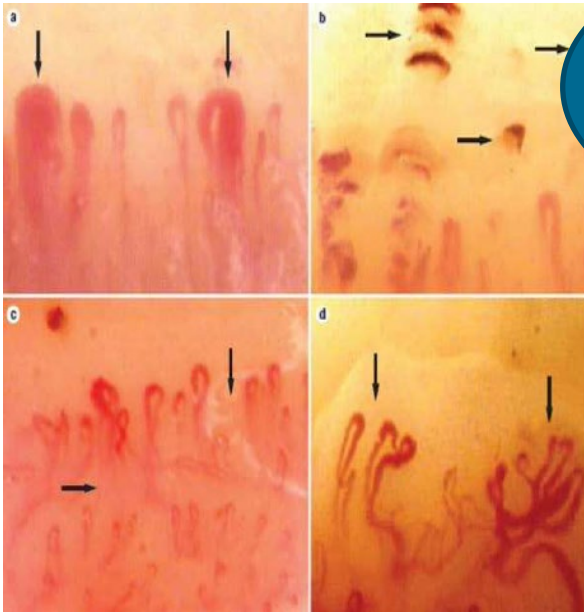
Scleroderme



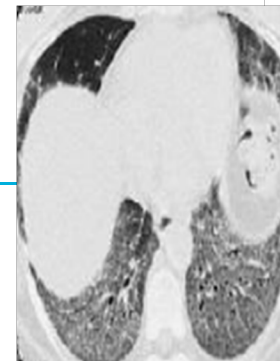
vaatschade

Immuun-
activatie

fibrose



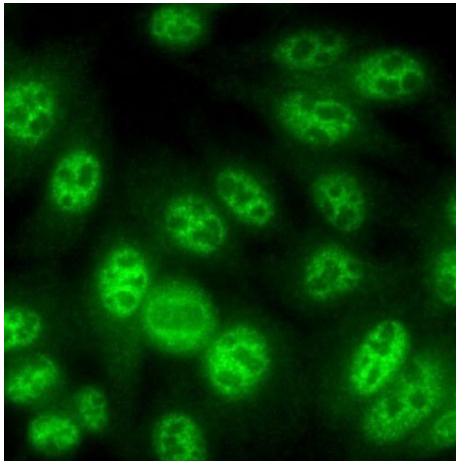
Klinische presentatie
variabel en afhankelijk van
de mate van orgaan
betrokkenheid



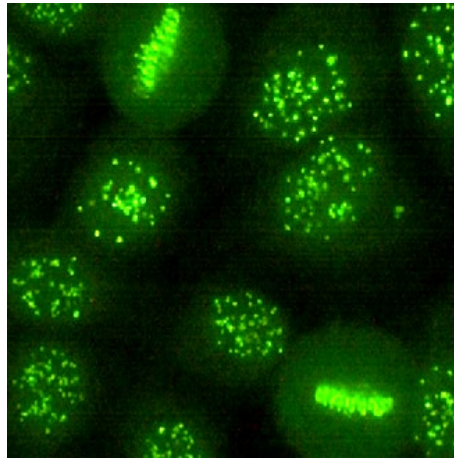
Radboudumc

Auto-antistoffen in Systemische Sclerose

- Meest voorkomend: **anti-Scl-70** (in ENA), 25%: geassocieerd met diffuse SSc
- En **anti-centromeer** (in ENA): geassocieerd met limited cutane SSc, 30%
- Overige specifieke en geassocieerde antistoffen (niet in ENA screen). Totaal 85%
- Belangrijkste **Anti-RNA polymerase III**: geassocieerd met diffuse SSc, 12%



Stip patroon
Bij Scl70, RNP



Centromeer
patroon

2013 ACR diagnostische criteria

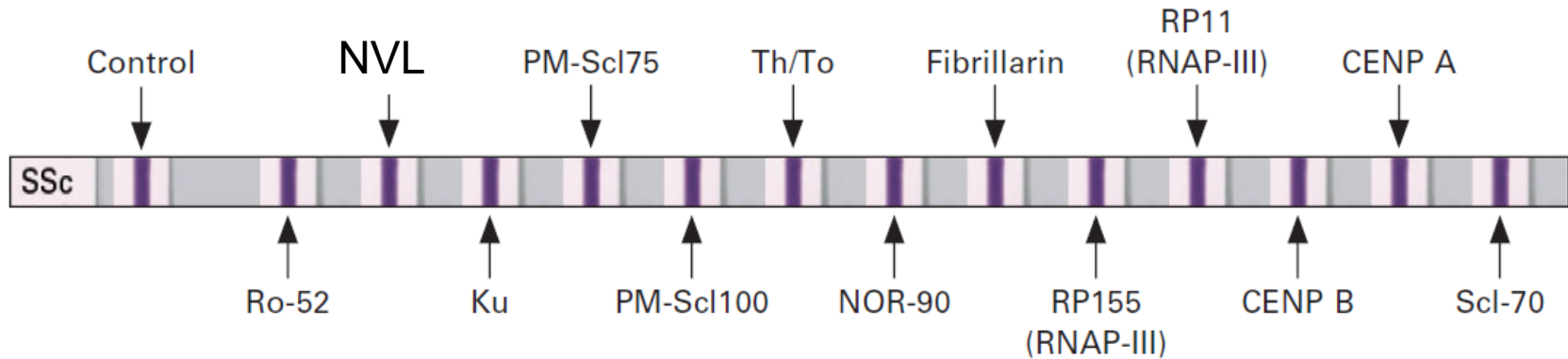
Table 1. The American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria for the classification of systemic sclerosis (SSc)*

Item	Sub-item(s)	Weight/score†
Skin thickening of the fingers of both hands extending proximal to the metacarpophalangeal joints (<i>sufficient criterion</i>)	–	9
Skin thickening of the fingers (<i>only count the higher score</i>)	Puffy fingers	2
	Sclerodactyly of the fingers (distal to the metacarpophalangeal joints but proximal to the proximal interphalangeal joints)	4
Fingertip lesions (<i>only count the higher score</i>)	Digital tip ulcers	2
	Fingertip pitting scars	3
Telangiectasia	–	2
Abnormal nailfold capillaries	–	2
Pulmonary arterial hypertension and/or interstitial lung disease (<i>maximum score is 2</i>)	Pulmonary arterial hypertension	2
	Interstitial lung disease	2
Raynaud's phenomenon	–	3
SSc-related autoantibodies (anticentromere, anti-topoisomerase I [anti-Scl-70], anti-RNA polymerase III) (<i>maximum score is 3</i>)	Anticentromere Anti-topoisomerase I Anti-RNA polymerase III	3

* These criteria are applicable to any patient considered for inclusion in an SSc study. The criteria are not applicable to patients with skin thickening sparing the fingers or to patients who have a scleroderma-like disorder that better explains their manifestations (e.g., nephrogenic sclerosing fibrosis, generalized morphea, eosinophilic fasciitis, scleredema diabeticorum, scleromyxedema, erythromyalgia, porphyria, lichen sclerosis, graft-versus-host disease, diabetic cheiroarthropathy).

† The total score is determined by adding the maximum weight (score) in each category. Patients with a total score of ≥ 9 are classified as having definite SSc.

Scleroderme serologie

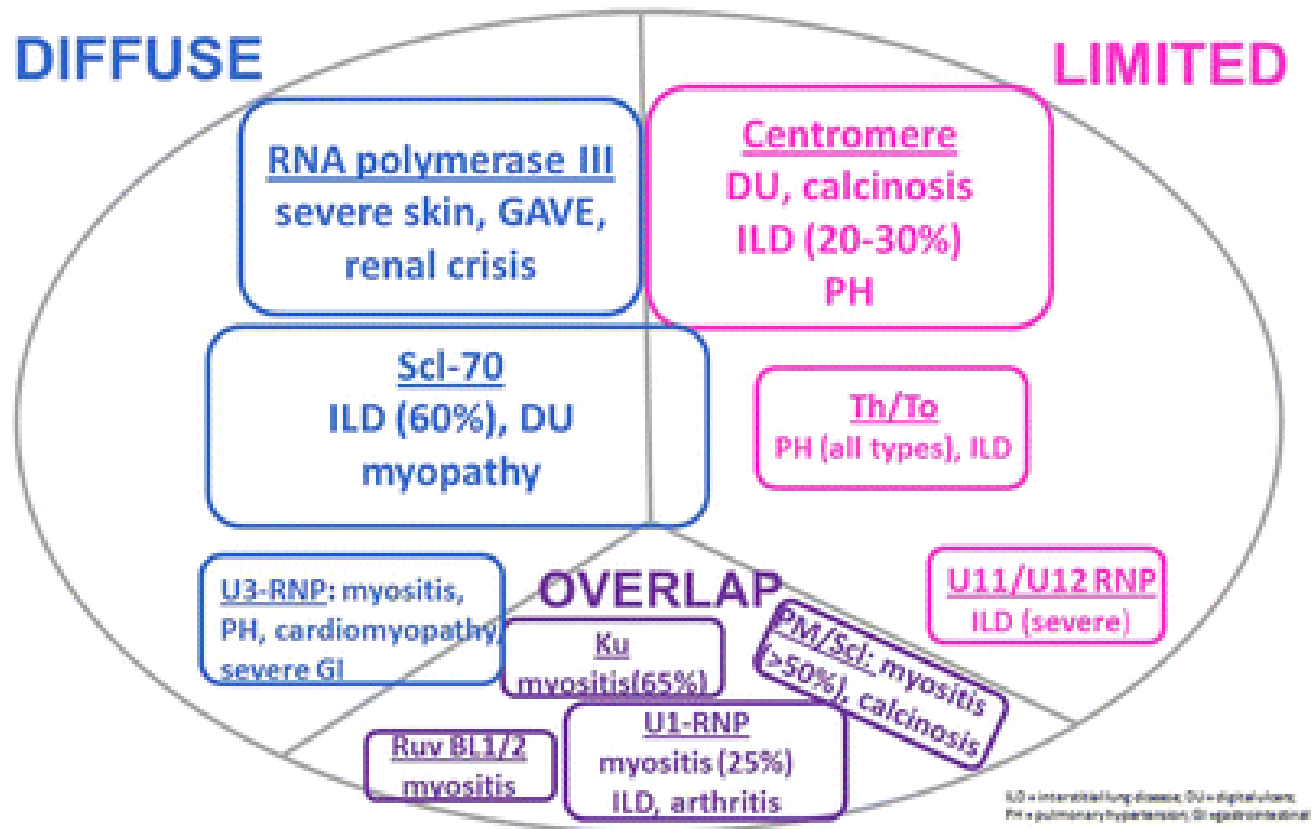


Auto-antistoffen in Systemische Sklerose

Table 1 | Frequency and clinical correlations of systemic sclerosis (SSc) autoantibodies.

	% Frequency in SSc	Disease subtype	Clinical associations	Prognosis
Anti-centromere	20–38	lcSSc	Pulmonary arterial hypertension	Better prognosis
Anti-topoisomerase I	15–42	dcSSc	Pulmonary fibrosis Heart involvement	Worse prognosis
Anti-RNA polymerase III	5–31	dcSSc	Renal crisis Tendon friction rubs, synovitis, myositis, joint contractures	Increased mortality
Anti-U3RNP (fibrillarin)	4–10	dcSSc	Renal crisis and cardiac involvement	Poor prognosis especially in African-Americans
Anti-Th/To	1–13	lcSSc	Pulmonary fibrosis and renal crisis	Poor prognosis
Anti-U11/U12 RNP	3.2	–	Raynaud's phenomenon Gastrointestinal involvement Lung fibrosis	Increased mortality
Anti-U1-RNP	2–14	lcSSc	Raynaud's phenomenon, puffy fingers, arthritis, myositis, overlap syndrome (i.e., MCTD)	Better prognosis
Anti-PM-Scl	4–11	Overlap with polymyositis lcSSc	Raynaud's phenomenon, arthritis, myositis, pulmonary involvement, calcinosis, and sicca symptoms	Better prognosis
Anti-Ku	2–4	–	Myositis, arthritis, and joint contractures	–
Anti-hUBF (NOR 90)	<5	lcSSc	Mild internal organ involvement	Better prognosis
Anti-Ro52/TRIM21	15–20	Association with other autoimmune diseases	Older age onset, pulmonary fibrosis	–

dcSSc, diffuse cutaneous SSc; lcSSc, limited cutaneous SSc; MCTD, mixed connective tissue disease; RNP, ribonucleoprotein; TRIM, tripartite motif.



Inflammatoire myopathiën

Heterogene groep van (zeldzame) immuun-gemedieerde ziekten

- **Dermatomyositis**
Symmetrische proximale spierzwakte en typische huiduitslag, 15% vd patiënten ontwikkelt een maligniteit. N.B. soms geen huiduitslag (eerder geclassificeerd als PM).
- **Anti-synthetase syndroom**
Typische proximale spierzwakte, maar ook artritis, Raynaud fenomeen, koorts en zogenaamde bouwvakkers handen, 70% vd patiënten ontwikkeld ILD. Soms alleen ILD, en mortaliteit hoger bij PL-7, PL-12 dan Jo-1.
- **Immuun-gemedieerde necrotiserende myopathie**
Acute of subacute presentatie met significante proximale symmetrische spierzwakte (vaak zeer hoge CKs).
- **Inclusion body myositis**
Presentatie kan vergelijkbaar zijn aan PM wat betreft spier biopsie pathologie, verder asymmetrische spierzwakte van de vingerflexoren en quadriceps, vaak bij >50 jaar.
- **Overlap myositis**

Inflammatoire myopathiën

Dermatomyositis; Typische huiduitslag



Papels van Gottron



Tekenen van Gottron

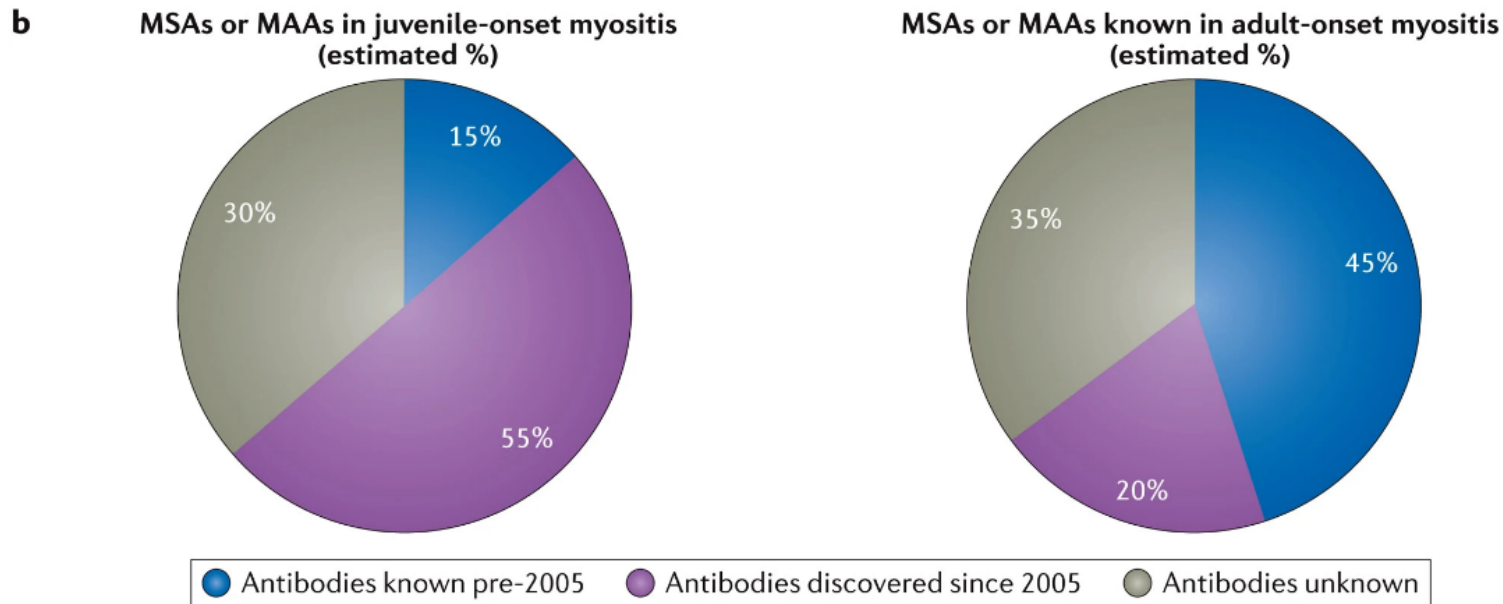
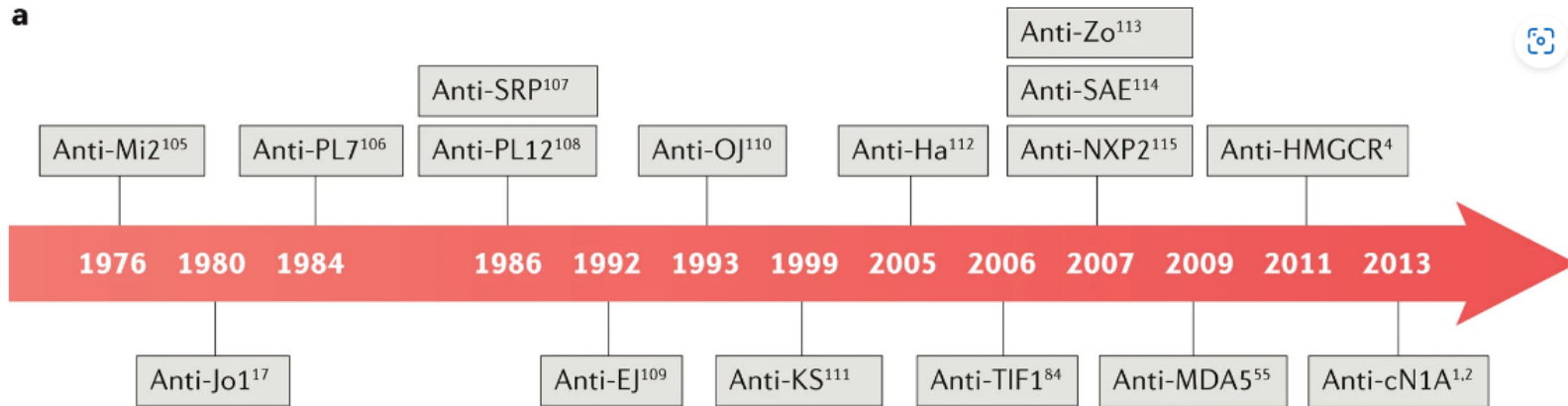


Heliotroop erytheem van het gelaat



Sjaal tekenen

60-70% van de patiënten hebben autoantistoffen

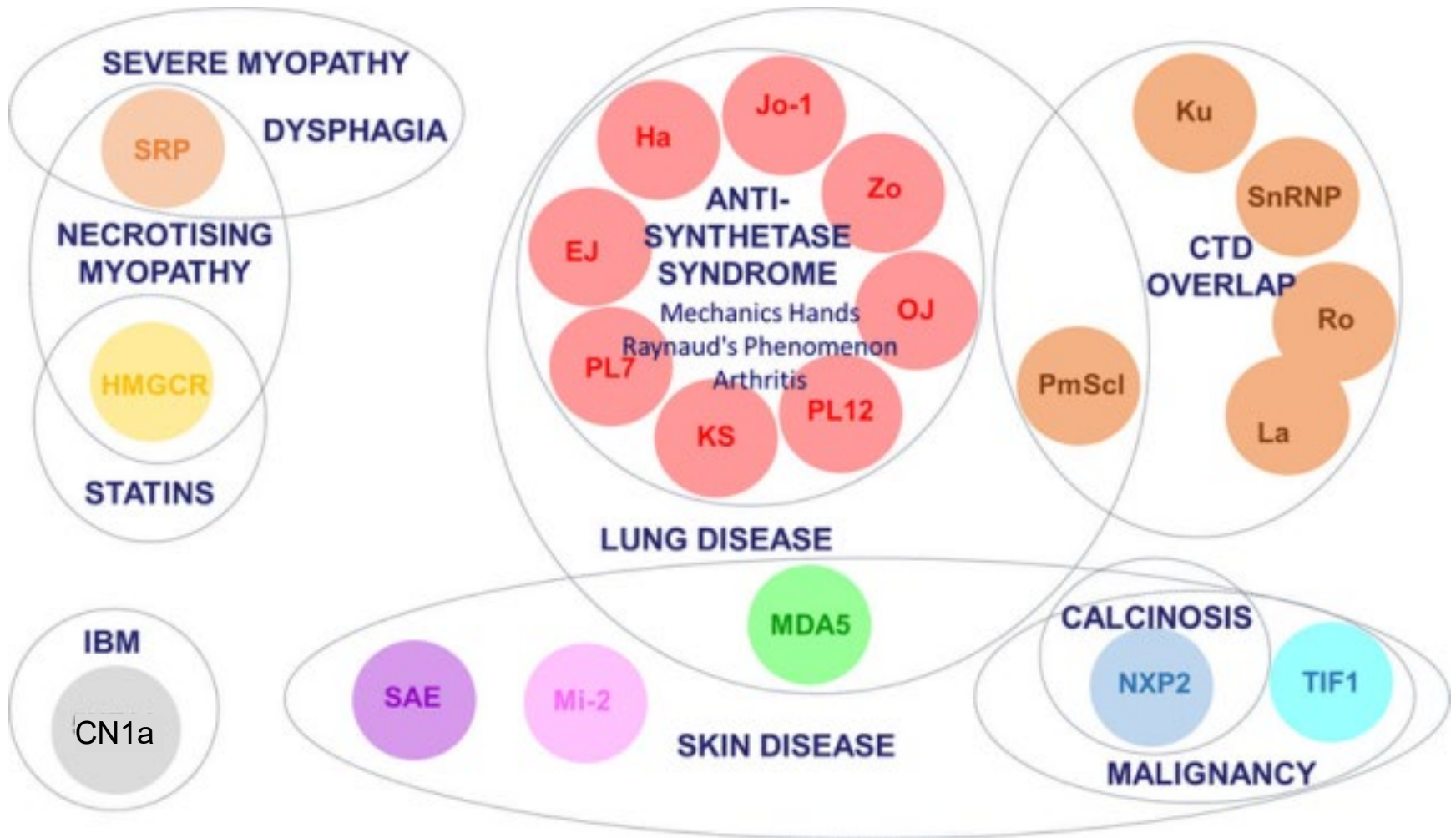


Auto-antistoffen belangrijke rol inflammatoire myopathiën

- Groeperen in:
 - **Myositis-specifieke antistoffen**
 - O.a. de aminoacyl tRNA synthetases
 - zijn zeer specifiek voor myositis en zie je (bijna) niet bij gezonden
 - Vaak maar 1 MSA antistof tegelijk aanwezig (soms meer dan 1 positief mogelijk gaat het hier dan om vals positiviteit van met name de zwakkere antistof)
 - **Myositis-geassocieerde antistoffen**
 - Bv PM-Scl, Ku, U1RNP, U3RNP
 - Komen soms voor bij gezonden (0,1%)
 - **Andere autoantistoffen vaak gevonden bij myositis**
 - Bv SSA Ro52 en Ro60
 - Komen ook voor bij gezonden (0,5-1%)

Klinische associatie autoantistoffen

60-70% van de patiënten hebben antistoffen



Radboudumc

Myositis specifieke auto-antistoffen

	Auto-antibody	Frequency	Typical clinical features
ASS	Anti-tRNA: Jo-1, PL-7, PL-12, HA (YRS/Tyr), OJ, KS, ZO, EJ	anti-tRNA: 30% in myositis Jo-1: 15-20% in myositis PL-7 and PL-12: each 3-4% All others <2%.	Higher rate of ILD and mortality in PL-7/PL-12 than Jo-1
OM	Anti-SS-A/Ro52/Ro60 SS-B/La	SS-A: up to 19% in myositis, 25% in OM, SS-B: 7% in myositis, 12% in OM Ro52 often together with anti-synthetase, e.g. 56-72% of Jo-1.	Association with Sjögren's syndr., SLE and systemic sclerosis. Ro52 more common in myositis than Ro60; both occur in CTD. Ro52 and Jo-1-double positive: high rate of malignancies, poorer prognosis.
	U-snRNP	up to 10% of myositis	Associated with CTD, SLE and systemic sclerosis. Often good prognosis.
	PM/Sci	~8-10% of myositis	Associated with systemic sclerosis. Often severe disease course and insufficient treatment response.
	Ku	up to 20-30% in OM	Associated with systemic sclerosis, SLE and CTD. High rate of ILD, which does not respond well to glucocorticosteroids.
	Mi-2	5-10% in DM	Classical DM
	MDA5	15-30% in DM	Often amyopathic DM, often ILD.
DM	TIF-1 $\alpha/\beta/\gamma$	~20% in DM	Malignancy common (75%). Most common in JDM—without tumor.
	NXP-2	10-15% in DM	Malignancy frequent (37.5%). Second most common antibody in JDM—without malignancy, but often calcinosis.
	SAE	2-8% in DM	Often amyopathic and with ILD.
NM	SRP	5% in myositis	Often severe with muscle atrophy, ILD and dysphagia. Often basic immunosuppressive treatment regimen not sufficient.
	HMGCR	5-8% in myositis	High frequency of malignancy.
IBM	cN1A	~30% in IBM	Sjögren or SLE positive by 20-30%, even without muscle symptoms. In IBM: more severe disease course, dysphagia and higher mortality.

Myositis serologie

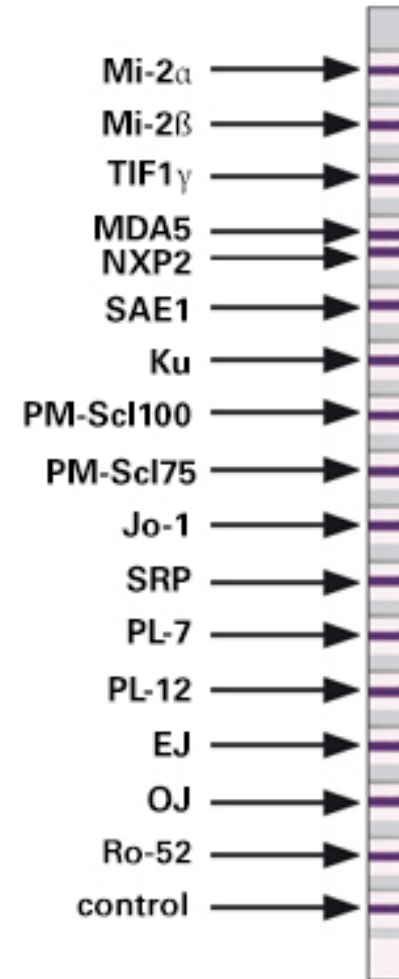
Myositisblot antistoffen tegen:

ARS (Jo-1, PL-7, PL-12, EJ, OJ)

SRP, PM-Scl, Mi-2, Ku, TIF1gamma, MDA5, NXP2, SAE1

Inmiddels is ook HMGCR (necrotiserende myositis/statine geassocieerd) toegevoegd en binnenkort worden ook Ha, Zo en Ks toegevoegd (geassocieerd met ILD)

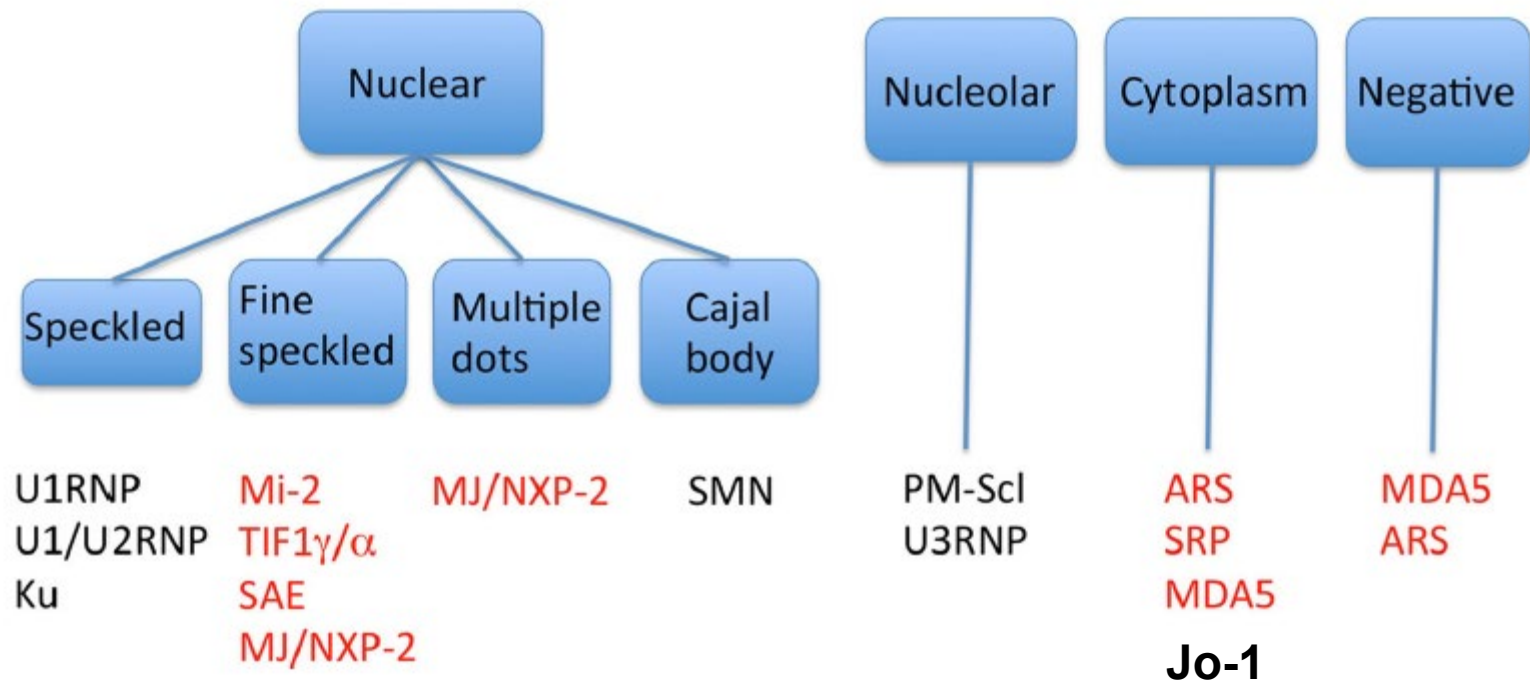
Voor anti-cN1A beter om de losse ELISA te doen vanwege verlaagde gevoeligheid van de blot



**Meeste myositis antistoffen zijn gericht tegen
nucleaire of cytoplasmatische antigenen**

→ Dus niet altijd een positieve ANA

Immuunfluorescentiebeelden bij myositis auto-antistoffen



LET OP!!! Cytoplasmatische ANA is in de regel een negatieve ANA dus direct ENA of myositis serologie aanvragen bij verdenking myositis

Toegevoegde waarde extra Ab testen

- Diagnose stellen
- Voorspellen ernst
- Evt ontwikkelen van definitieve sclerodermie/myositis voor te zijn
- Behulpzaam zijn bij meer personalised treatment
- Voorspellen maligniteit (bv TIF-1 gamma)



**"The lab test results are back — now
it's time to roll the dice."**

Wanneer ANA aanvragen?

- Als er klinische aanwijzingen voor een systeemziekte (goede anamnese + lichamelijk onderzoek!!!!)
- Als je iets met de uitslag kan doen *(niet aanvragen als je al weet dat je de uitslag niet gaat gebruiken)*

Wanneer ENA aanvragen?

- Bij positieve ANA (ANA is screeningstest voor ENA)
- Bij negatieve ANA, maar met duidelijke kliniek voor systeemziekte zoals myositis/sjögren (bv Jo-1 en SSA kunnen worden gemist in ANA)

Bedankt voor jullie aandacht!