

# laboratoriumdiagnostiek bij verdenking auto-immuunziekten

Bart-Jan Kroesen, Medisch Immunoloog

Bart-Jan Kroesen: [bj.kroesen@umcg.nl](mailto:bj.kroesen@umcg.nl)

*afd. Laboratoriumgeneeskunde, UMCG, Nederland* **UMCG:**



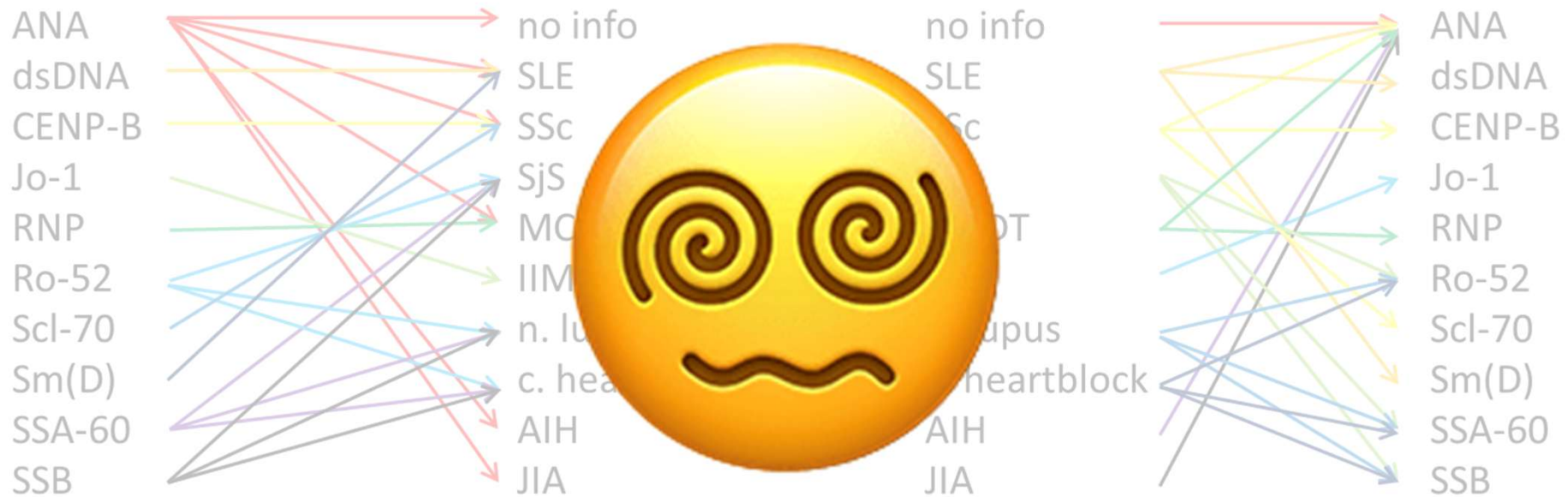
# autoimmuunziekten en autoantistoffen

Vaak van belang voor het stellen van een diagnose!



- Sensitiviteit? → bij een negatief resultaat: extra testen?
- Specificiteit? → bij een positief resultaat: extra testen?
- Is een kwantitatieve uitslag relevant?

# het autoimmuun diagnostische dilemma



medisch specialist: gericht aanvragen → pre-test probability  
 labspecialist: zinvol rapporteren → sensitiviteit / specificiteit  
 → kwalitatief / (semi) kwantitatief

# diagnostische betekenis van ANCA:

ANCA specificiteit correleert met type vasculitis

diagnose ↓	ANCA specificiteit →	cANCA (IIF) PR3-ANCA	pANCA (IIF) MPO-ANCA
<b>granulomatosis with polyangiitis – GPA</b>		<b>85%</b>	<b>10%</b>
<b>microscopic polyangiitis</b>		<b>45%</b>	<b>45%</b>
<b>idiopathic crescentic glomerulonephritis</b>		<b>25%</b>	<b>65%</b>
<b>eosinophilic granulomatosis with polyangiitis – EGPA</b>		<b>10%</b>	<b>60%</b>

# zinnige (autoimmuun) diagnostiek: rol van de medisch specialist

relevant klinisch verhaal → relevante aanvraag

**Tabel 12.2. Klinische indicatie voor aanvragen ANCA test (naar Savige, 1999)**

Glomerulonefritis, vooral snel-progressieve glomerulonefritis
Pulmonale hemorragie, vooral pulmonaal-renaal syndroom
Cutane vasculitis met systemische kenmerken zoals koorts, gewichtsverlies, myalgia, artralgieën of artritis
Multipele longnoduli
Chronische, destructieve ziekte van de bovenste luchtwegen gekenmerkt door neusbloedingen of erosieve veranderingen van de nasale mucosa
Subglottis tracheale stenose
Multipele mononeuropathie of andere perifere neuropathie
Retro-orbitale massa, perifere ulceratieve keratitis of necrotiserende scleritis

# zinnige (autoimmuun) diagnostiek: rol van de medisch specialist

## The diagnostic value of anti-neutrophil cytoplasmic antibody testing in a routine clinical setting

J.S. McLAREN, R.H. STIMSON, E.R. McRORIE, J.E. COIA<sup>1</sup> and R.A. LUQMANI

*Q J Med* 2001; **94**:615–621

ANCA testing is niet effectief zonder beredeneerde verdenking AAV

88 – 100% vd aanvragen buiten een reumatologisch / nefrologisch kader: geen vasculitis

## Does a gating policy for ANCA overlook patients with ANCA associated vasculitis? An audit of 263 patients

D F Arnold,<sup>1</sup> A Timms,<sup>1</sup> R Luqmani,<sup>2</sup> S A Misbah<sup>1</sup>

*J Clin Pathol* 2010;**63**:678–680.

Na introductie klinische richtlijn: ANCA aanvragen van 287 naar 143 per maand

1248 gehonoreerde aanvragen: aantal ANCA-positieven steeg van 19% naar 30%

263 niet-gehonoreerde aanvragen:

➤ 26 aanvragen na discussie alsnog gehonoreerd

➤ 5 daarvan ANCA-positief in ANCA-IIF, 1 MPO-ANCA (Guillain-Barré wv IVIG)  
na 8 maanden follow-up geen enkele kleine vaten vasculitis

# zinnige (autoimmuun) diagnostiek: rol van de laboratoriumspecialist

## “richtlijn” voor autoimmuun diagnostiek

**Table 1** The recommendations for detection of autoantibodies to cellular components commonly referred to as ANA

Recommendation	Delphi score (mean±SD)
1 The diagnosis of SARD requires a panel of specific laboratory tests (ie, ANA, anti-dsDNA and anti-ENA antibodies)	9.6±0.9
2 ANA, anti-dsDNA and anti-ENA testing should be included in the autoantibodies detection as part of the diagnostic work-up of SARD as well as some other autoimmune diseases (table 2)	9.9±0.2
3 The detection of ANA is the first level test for laboratory diagnosis of SARD	9.8±0.4
4 ANA testing is primarily intended for diagnostic purposes, and not for monitoring disease progression	9.6±0.6
5 The IIFA* is the reference method for ANA screening. Alternative assays can be used while keeping in mind that false negative and false positive ratio of these methods may be different. Thus, if the clinical suspicion is strong and the alternative method is negative, it is mandatory to perform IIFA	9.7±0.6
6 Diagnostic laboratories should specify the methods used for detecting ANA when reporting their results	9.4±0.9
7 Tests based on a (restricted) mixture of defined nuclear antigens should not be referred to as ANA test or ANA screen	9.7±0.5

zeker weten dat resultaat terecht positief is: bevestigingstest waar mogelijk

zinvol doortesten waar nodig:

ANA → dsDNA + ENA

ANCA → PR3 / MPO

rational based rapportage:

rapportage van methode, specificiteit en (semi)kwantiteit

consulteren waar nodig:

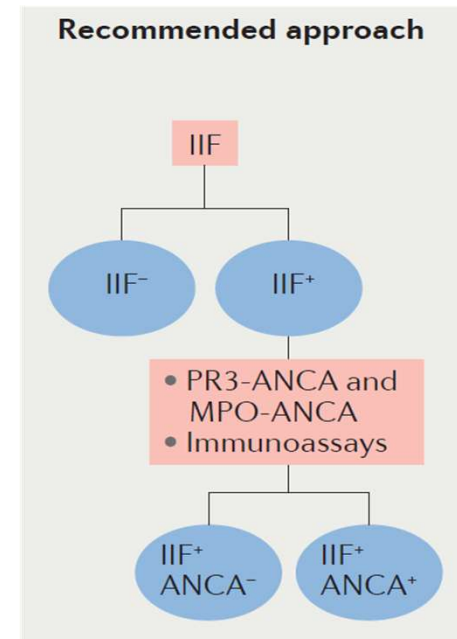
ook ongevraagd

# International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA)

Judy Savige, MB, PhD, David Gillis, MB, FRCPA, Elizabeth Benson, MB, FRCPA, David Davies, MB, FRCPA, Vincent Esnault, MD, Ronald J. Falk, MD, E. Chris Hagen, MD, David Jayne, MD, J. Charles Jennette, MD, Bill Paspaliaris, MSc, Wendy Pollock, BSc, Charles Pusey, MD, Caroline O. S. Savage, MB, PhD, Roger Silvestrini, BSc, Fokko van der Woude, MD, Jorgen Wieslander, PhD, and Allan Wiik, MD, for the International Group for Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA) *Am J Clin Pathol* 1999;111:507–513

## Abstract

Antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) tests are used to diagnose and monitor inflammatory activity in the primary systemic small vessel vasculitides. ANCA is best demonstrated in these diseases by using a combination of indirect immunofluorescence (IIF) of normal peripheral blood neutrophils and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) that detect ANCA specific for proteinase 3 (PR3) or myeloperoxidase (MPO).



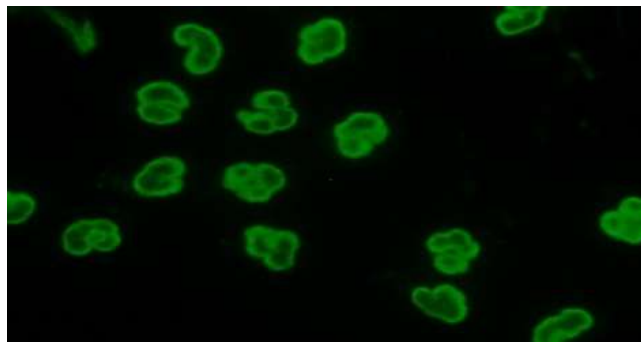


# het Lab: ANCA diagnostiek ihkv vraagstelling vasculitis

***volgens richtlijn 1999:***

***sensitiviteit van IIF combineren met de specificiteit van solid phase testen***

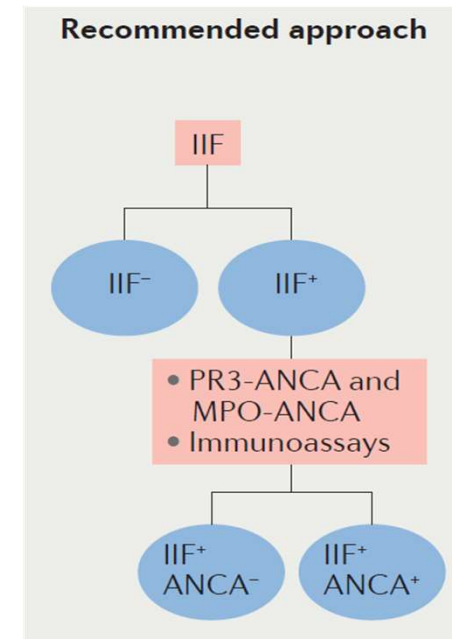
- Screening: indirecte immunofluorescentie op donor granulocyten
  - IIF-patroon + titer (= seriële verdunningsstap waarbij het serum nog positief test)
- Bevestigen en bepalen ANCA specificiteit (PR3, MPO, ...)
  - solid-phase test (ELIA; ELISA; blot; ...)



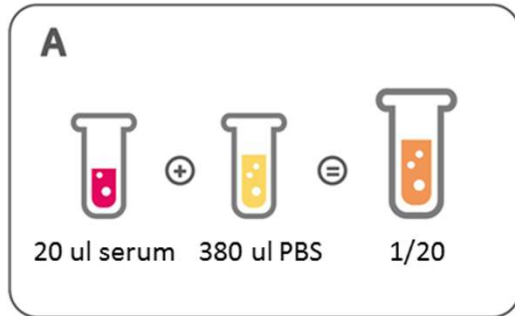
pANCA / MPO-ANCA



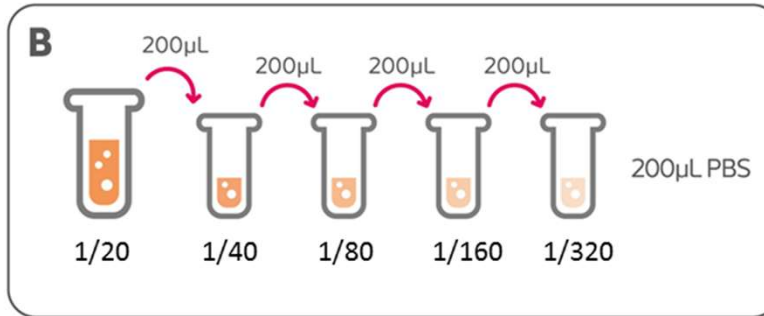
cANCA / PR3-ANCA



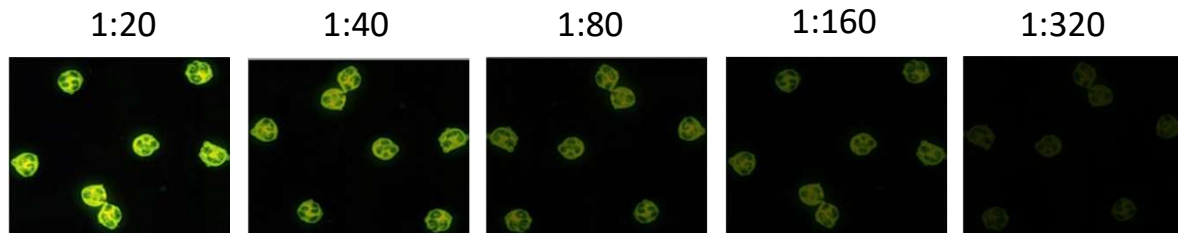
# Indirecte Immuun Fluorescentie: het principe



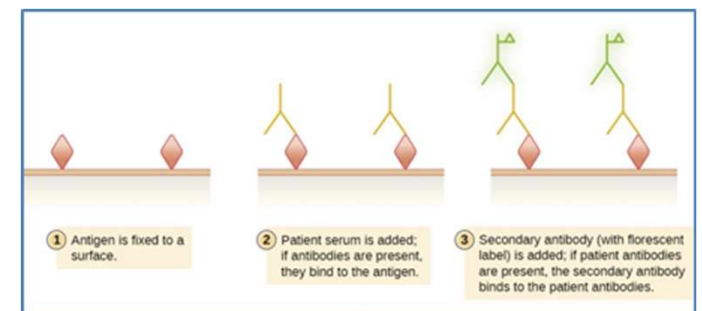
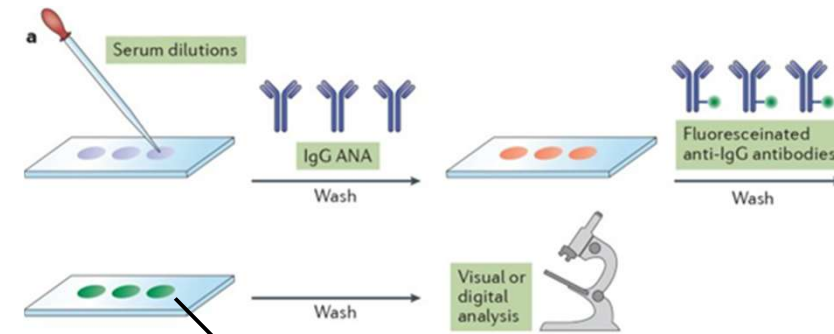
Preparation of the initial 1/20 dilution



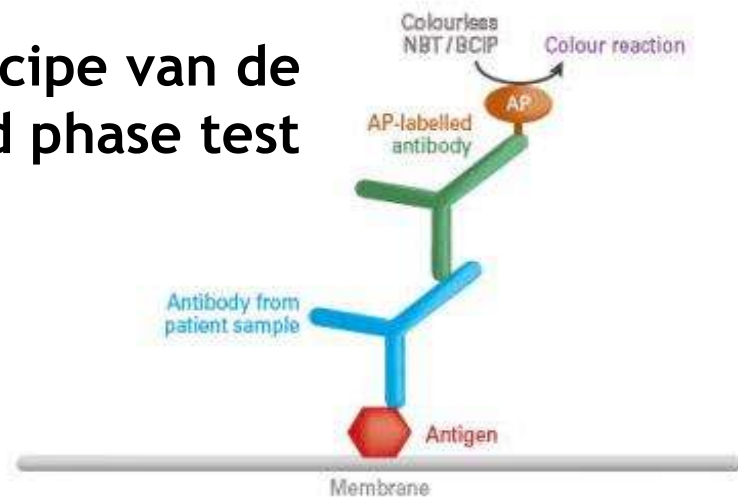
Serial dilution is obtained by mixing equal volumes of each sample dilution with PBS



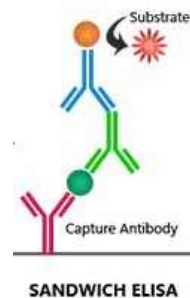
patroon (pANCA/cANCA) + titer  
(serum verdunning)



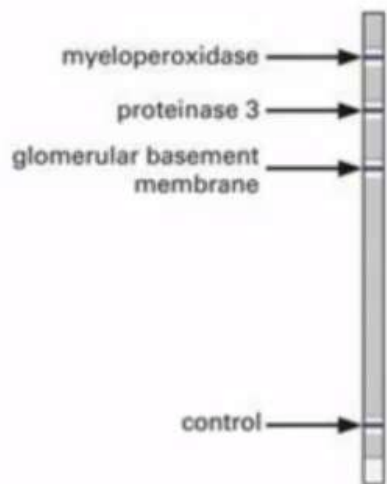
## principe van de solid phase test



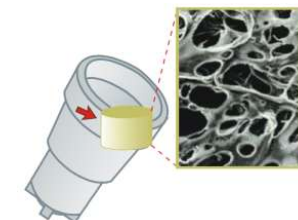
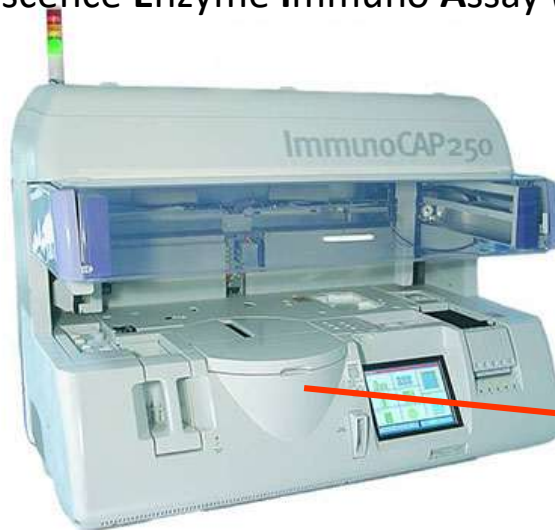
## Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)



## Immuno Line Blot



## Fluorescence Enzyme Immuno Assay (FEIA / Phadia)



## International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA)

Judy Savige, MB, PhD, David Gillis, MB, FRCPA, Elizabeth Benson, MB, FRCPA, David Davies, MB, FRCPA, Vincent Esnault, MD, Ronald J. Falk, MD, E. Chris Hagen, MD, David Jayne, MD, J. Charles Jennette, MD, Bill Paspaliaris, MSc, Wendy Pollock, BSc, Charles Pusey, MD, Caroline O. S. Savage, MB, PhD, Roger Silvestrini, BSc, Folkko van der Woude, MD, Jorgen Wieslander, PhD, and Allan Wiik, MD, for the International Group for Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA)

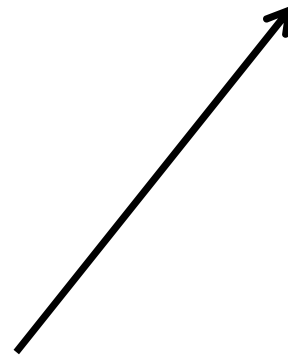
1999



POSITION PAPER

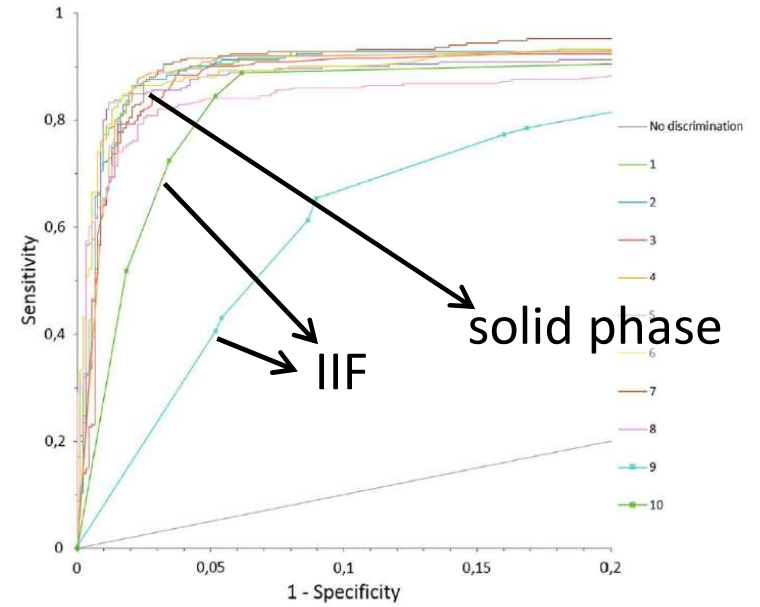
## Revised 2017 international consensus on testing of ANCAs in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis

Xavier Bossuyt<sup>1</sup>, Jan-Willem Cohen Tervaert<sup>2</sup>, Yoshihiro Arimura<sup>3</sup>, Daniel Blockmans<sup>4</sup>, Luis Felipe Flores-Suárez<sup>5</sup>, Loïc Guillevin<sup>6</sup>, Bernhard Hellmich<sup>7</sup>, David Jayne<sup>8</sup>, J. Charles Jennette<sup>9</sup>, Cees G. M. Kallenberg<sup>10</sup>, Sergey Moiseev<sup>11</sup>, Pavel Novikov<sup>11</sup>, Antonella Radice<sup>12</sup>, Judith Anne Savige<sup>13</sup>, Renato Alberto Sinico<sup>14</sup>, Ulrich Specks<sup>15</sup>, Pieter van Paassen<sup>16</sup>, Ming-hui Zhao<sup>17</sup>, Niels Rasmussen<sup>18</sup>, Jan Damoiseaux<sup>19</sup> and Elena Csernok<sup>7</sup>

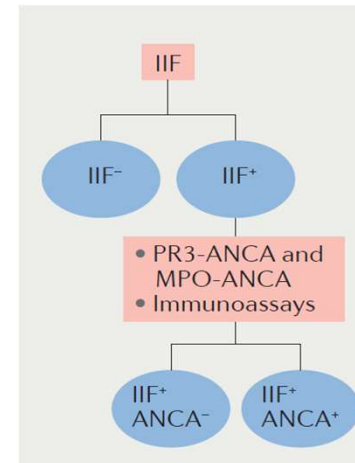


screen

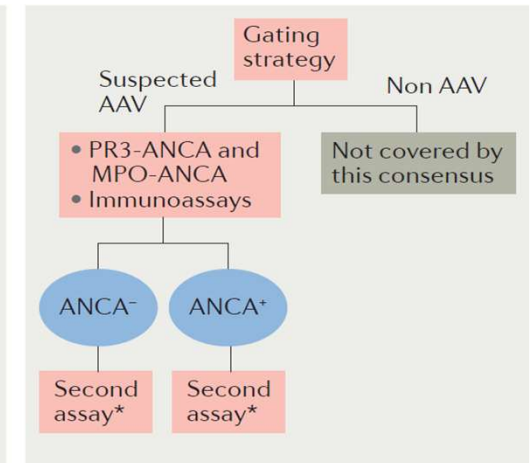
confirm  
+  
specify



until 2017



after 2017



likelihood ratios voor kwalitatieve (“positief” / “negatief”) ANCA testresultaat

**Table 1** Likelihood ratios for the cut-off point proposed by the manufacturer and for a combination of tests are given

	AAV (n)	Control (n)	Likelihood ratio
QuantaFlash (–)	29	893	0.12
QuantaFlash (+)	222	31	26
Euroimmun (–)	27	894	0.11
Euroimmun (+)	224	30	27
QuantaFlash (–) IIF (–)	23	854	0.10
QuantaFlash (–) IIF (+)	6	39	0.57
QuantaFlash (+) IIF (–)	5	13	1.42
QuantaFlash (+) IIF (+)	217	18	44
QuantaFlash (–) Euroimmun (–)	23	880	0.09
QuantaFlash (–) Euroimmun (+)	6	13	1.70
QuantaFlash (+) Euroimmun (–)	4	14	1.05
QuantaFlash (+) Euroimmun (+)	218	17	47
Total	251	924	

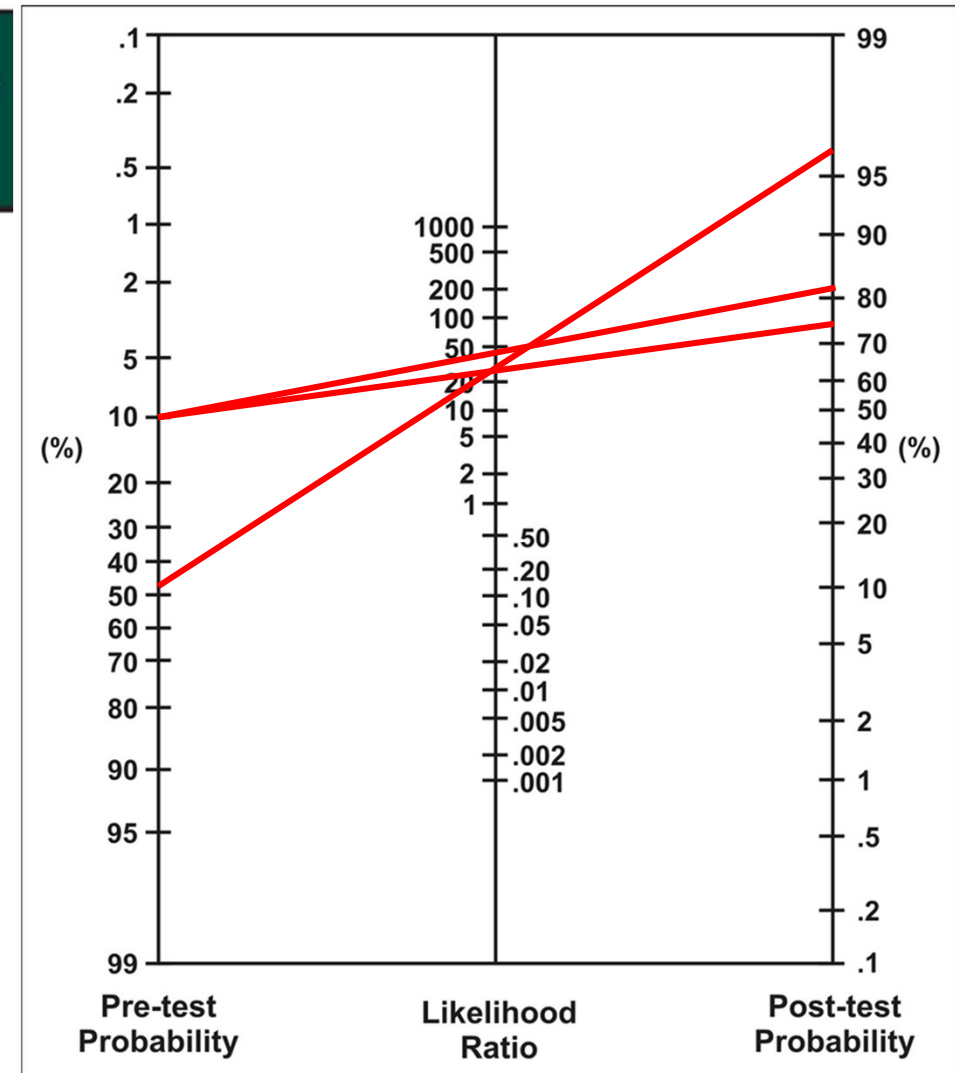
post-test probability voor een diagnose is gebaseerd op de pre-test probability en LR

Clinical condition	Pre-test probability
None <sup>a</sup>	0.00003
Sinus <sup>a</sup>	0.01
Sinus and pulmonary <sup>a</sup>	0.10
Sinus and glomerulonephritis <sup>a</sup>	0.30
Sinus, pulmonary and glomerulonephritis <sup>a</sup>	0.85
Rapidly progressive glomerulonephritis <sup>b</sup>	0.47

likelihood ratio (LHR) positive testresult Quantaflash: 26

LHR combined positive testresult Quantaflas/Euroimmune: 47

pre-test prob.	test method	post-test prob.
sinus + pulmonary	Quantaflash	74%
sinus + pulmonary	Quantaflash + Euroimmune	82%
RPGN	Quantaflash	96%



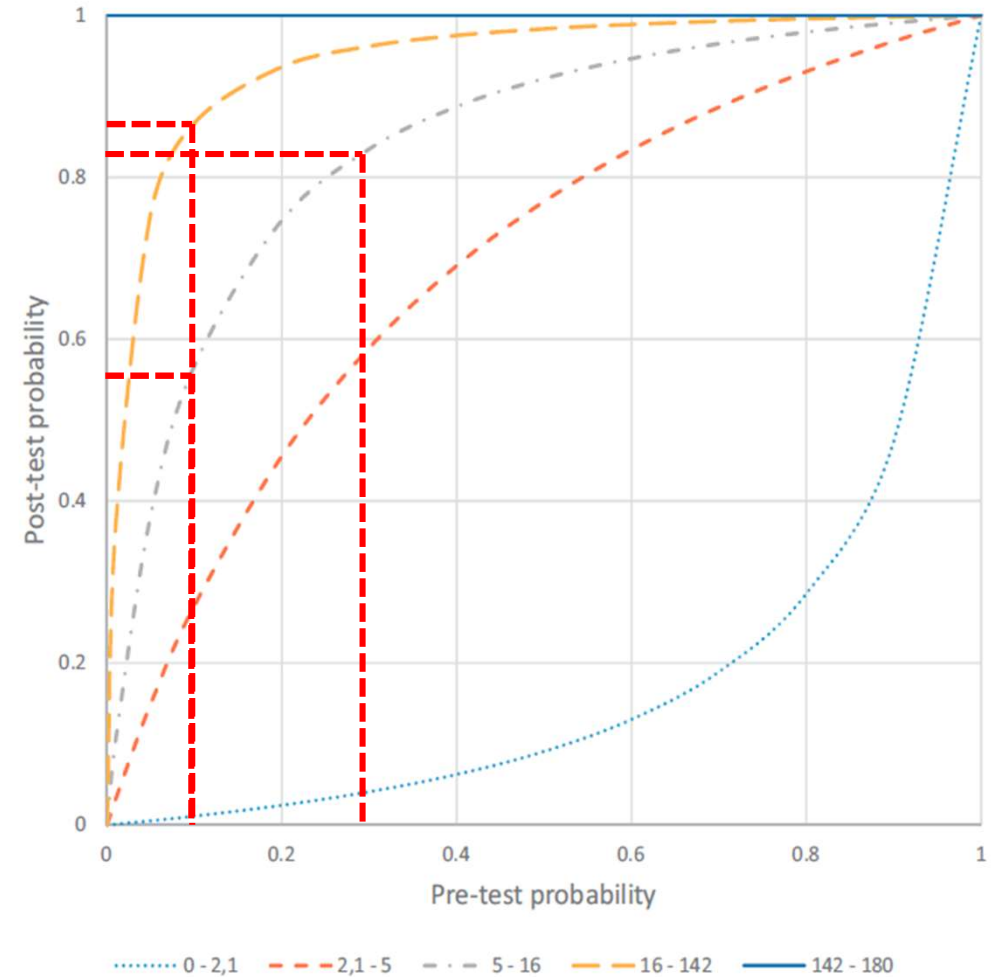
# post-test probability bij een kwantitatief ANCA test resultaat

test-result intervals		Interval
		0.0, 2.1
		2.1, 5.0
		5.0, 16.0
		16.0, 142.0
		142.0, 180.0

Clinical condition	Pre-test probability
None <sup>a</sup>	0.00003
Sinus <sup>a</sup>	0.01
Sinus and pulmonary <sup>a</sup>	0.10
Sinus and glomerulonephritis <sup>a</sup>	0.30
Sinus, pulmonary and glomerulonephritis <sup>a</sup>	0.85

pre-test prob.	test result	post-test prob.
sinus + pulmonary	7 IU/ml	55%
sinus + pulmonary	138 IU/ml	86%
sinus + glomerulonephritis	7 IU/ml	83%

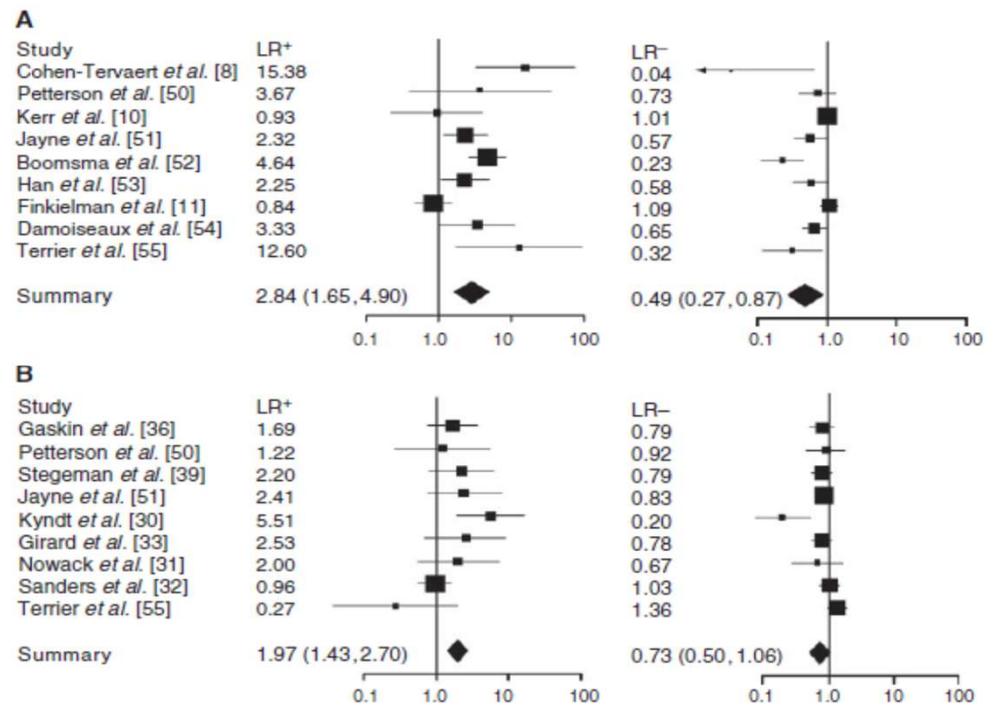


## en hoe zit het dan met follow up...?

waarom: - bepalen van het succes van behandeling  
 - bepalen van mogelijke relapse

hoe: - welke test is geschikt  
 - definitie van een klinisch relevante verhoging

- welke test?
- relevante stijging?
- frequentie?



ANCA stijging als  
voorspeller van relapse

ANCA blijvend positief als  
voorspeller van relapse



# follow up in de praktijk van diagnose, via remissie, naar relapse

IIF      Phadia

	Date	IIFT pattern	titre	PR3-ANCA
<b>Diagnosis</b> →	22-dec-06	C-ANCA	1/1024	163
	19-jan-07	C-ANCA	1/256	31
	23-jan-07	C-ANCA	1/256	25
	21-feb-07	C-ANCA	1/128	10
	12-mrt-07	C-ANCA	1/32	7
	19-apr-07	C-ANCA	1/16	4
<b>Remission</b> →	23-mei-07	neg		0
	27-jun-07	neg		0

17-aug-07	neg		7
26-okt-07	neg		8
18-feb-08	neg		17
17-apr-08	C-ANCA	1/64	41
19-jun-08	C-ANCA	1/64	62
02-okt-08	C-ANCA	1/128	59
15-jan-09	C-ANCA	>1/1024	106
05-feb-09	C-ANCA	>1/1024	224

**Relapse** →

How to define a relevant increase?

## follow up in de praktijk

### ANCA als voorspeller van een relapse

is er 6 en/of 3 maanden voor de relapse een stijging van de ANCA t.o.v. 9 maanden voor relapse?

definitie van een stijging van de ANCA:

- IIF: stijging van 2 titer-stappen (bv van 1:20 naar 1:80 of 1:40 naar 1:160, etc)
- ELIA: 1) Stijging van 20% en minimaal 10 U/ml  
2) Stijging van 25% en minimaal 15 U/ml

ANCA stijging op -6 mnd en/of -3 mnd t.o.v. -9 mnd als voorspeller voor relapse			
	stijging	sensitiviteit	specificiteit
IIF	2 titer-stappen	17	98
ELIA (1)	20% + $\geq 10$ U/ml	48	79
ELIA (2)	25% + $\geq 15$ U/ml	28	81

## Take home:

Bij het aanvragen van autoimmuun diagnostische testen: “bezint eer gij begint”

- goede klinische uitvraag verhoogt de relevantie van het lab resultaat

Goede rapportage: gebruikte testmethode / antistof specificiteit / (+ kwantiteit)

Bij het interpreteren van autoimmuun diagnostische testresultaten:

- wees kritisch mbt de gebruikte testmethode
- interpreteer specificiteit + titer / concentratie van de antistof in relatie tot kliniek

Solid phase testen vervangen langzamerhand steeds vaker IIF-screening

- NB: hierbij mis je dus de niet gedefinieerde antigenen!
- ANA  $\neq$  dsDNA+ENA / ANCA  $\neq$  PR3 + MPO

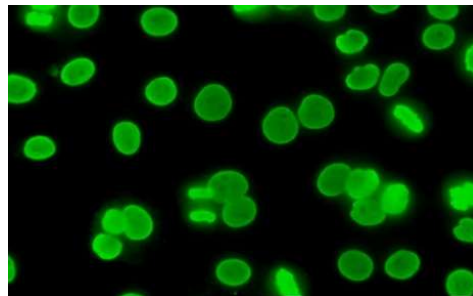
Bij vragen: zoek laagdrempelig contact met de labspecialist



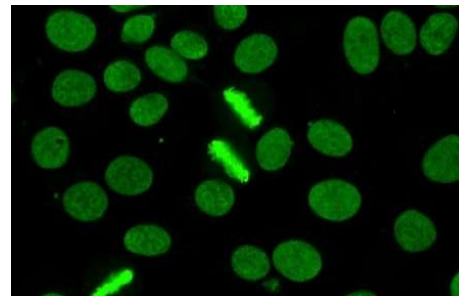
# En hoe zit het dan met de ANA?

- ANA: antistoffen tegen kern-antigenen
- antigenen: o.a. dsDNA, extraheerbare nucleaire antigenen (ENA), ... (> 400)
- detectie met indirecte immunofluorescentie (IIF) op Hep-2 cellen (gekweekte cellijn)
- rapportage: pos/neg of titer + fluorescentiepatroon

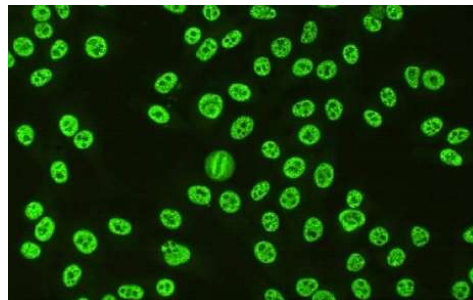
homogeen (AC-1):  
bv anti-dsDNA (SLE)



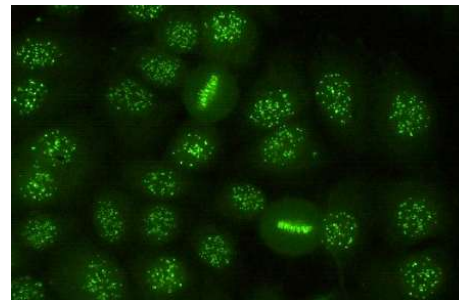
homogeen (AC-29):  
bv anti-Scl-70 (dSSc)



grofgespikkeld (AC-5):  
bv anti-Sm (SLE)

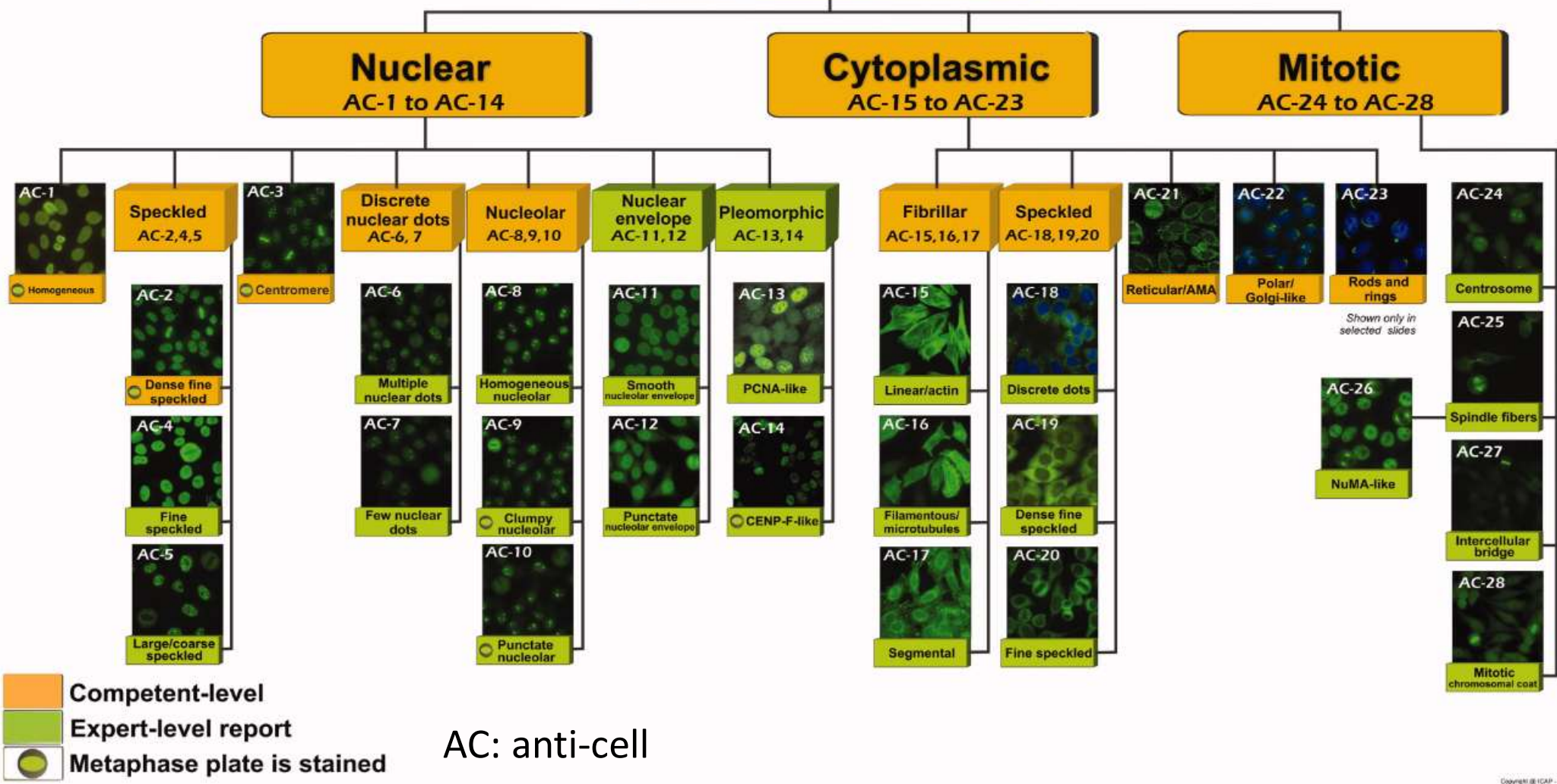


anti-centromeer (AC-3):  
anti-CenpB (ISS)



# ICAP: International Consensus on ANA Patterns

## ANA patterns INTERNATIONAL CONSENSUS



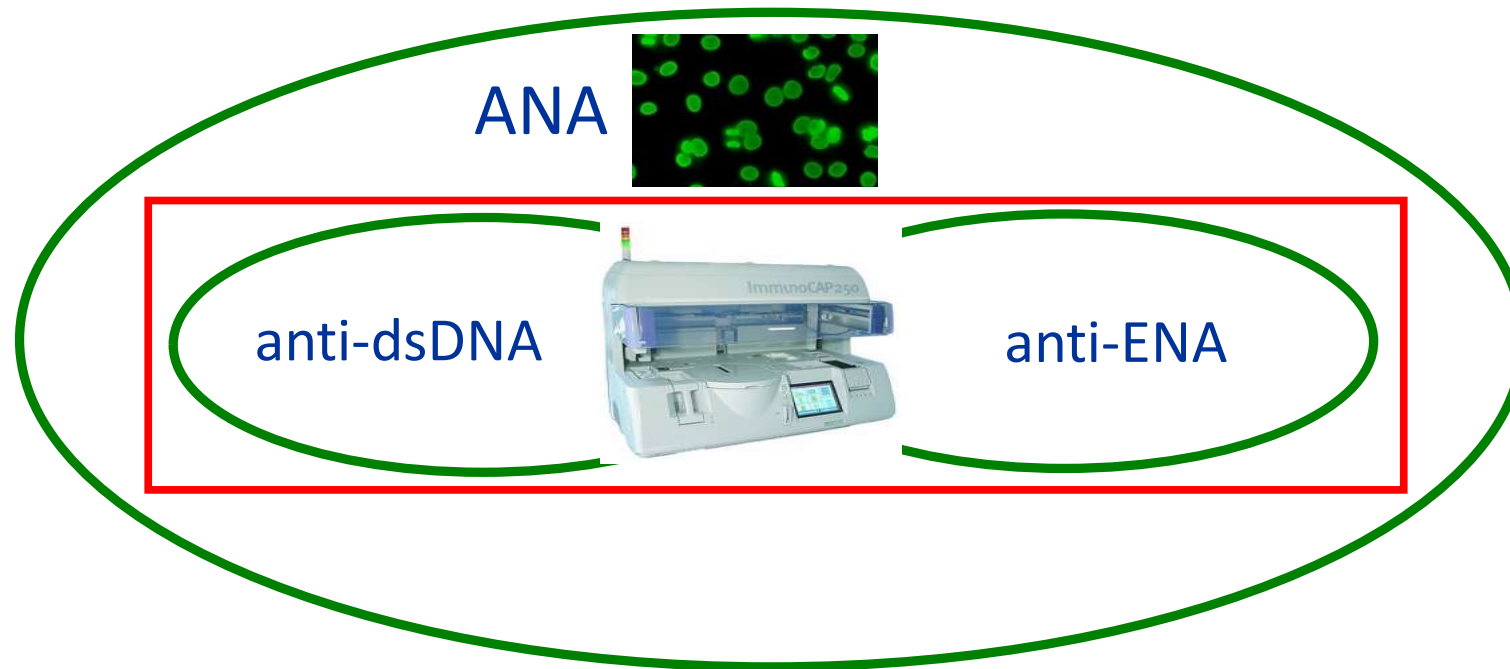
# ANA, anti-dsDNA en anti-ENA autoantistoffen: ondersteunen diagnose

	SLE	Sjögren	Systemische Sclerose	MCTD	PD Polymyositis Dermatomyositis	Gezond
ANA	>99%	65%	90%	100%	20%	5-10%
dsDNA	65%	-	-	-	-	-
SS-A (Ro60)#	35%	70%	-	-	-	-
Ro-52#	nb	nb	25%	nb	30%	-
SS-B	15%	50%	-	-	-	-
RNP	35%	15%	20%	100%	-	-
Sm (= smith)	20%	-	-	-	-	-
Scl-70	-	-	25%	-	-	-
Centromeer	-	-	30% **	-	-	-
Jo-1	-	-	-	-	25%	-

**nb: niet bekend**

**- minder dan 5%**

**\*\* bij limited systemische sclerose: 90%**



- antistoffen tegen dubbelstrengs DNA
- antistoffen tegen extraheerbare kernantigenen (“extractable nuclear antigens”, ENA)
- antistoffen tegen allerlei andere, deels onbekende, antigenen

} systeemziekten

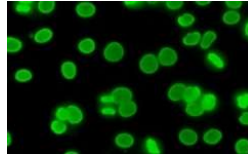
JIA → associatie met uveïtis!

AIH

RA



ANA



anti-dsDNA



anti-ENA

anti-cytoplasma antistoffen  
(myositis, ...)

