

Autoantistofbepalingen in de diagnostiek van ANA-geassocieerde auto-immuunziekten

Uitgangsvragen en aanbevelingen

Uitgangsvragen

Wat is de rol van antinucleaire antistoffen (ANA) HEp-2 IIF test binnen de diagnostiek van ANA-geassocieerde auto-immuunziekten?

Hoe passen alternatieve testen voor de HEp-2 IIF test binnen de diagnostiek van ANA-geassocieerde auto-immuunziekten?

Aanbevelingen

Minimumnorm

1. Voor de diagnostiek voor ANA-geassocieerde auto-immuunziekten – systemische auto-immuunziekten, auto-immuun hepatitis (AIH) en juveniele idiopathische artritis (JIA) – moet het laboratorium beschikken over een compleet repertoire aan autoantistofbepalingen:
 - a. de HEp-2 IIF test;
 - b. solid-phase immunoassays waarbij anti-ENA-antistoffen worden aangetoond specifiek voor CENP-B, Sm (overwegend SmD), SS-A/Ro52, SS-A/Ro60, SS-B/La, topoisomerase I (Scl-70), U1RNP en Jo-1;
 - c. anti-dsDNA-antistof test;
 - d. testen voor een uitgebreider panel aan idiopathische inflammatoire myopathie (IIM)-gerelateerde antistoffen ter ondersteuning van het spectrum van IIM (anti-synthetase syndroom/overlap myositis, dermatomyositis, necrotiserende myositis); en
 - e. testen voor antistoffen specifiek voor systemische sclerose (minimaal RNA polymerase III).
2. Bovenstaand repertoire aan autoantistofbepalingen dient onafhankelijk van elkaar aangevraagd te kunnen worden, maar kan daarnaast in een testalgoritme ondervangen worden. Het testalgoritme dient kenbaar gemaakt te worden aan de aanvrager.
3. Uitsluitend wanneer gebruik gemaakt wordt van de HEp-2 IIF test mag deze als ANA-test aangeboden worden. Alleen in geval van een nucleair patroon mag de uitslag als ANA-positief gerapporteerd worden.
4. Indien in plaats van de HEp-2 IIF test gebruik gemaakt wordt van een screentest voor anti-ENA-antistoffen gebaseerd op een mengsel van gedefinieerde antigenen, moet de test als

ENA screen aangeboden worden en moet het resultaat als ENA screen gerapporteerd worden.

5. Indien de HEp-2 IIF test positief is, moet het patroon vastgelegd worden volgens ICAP nomenclatuur en definities (minimaal competent-level, m.u.v. het dicht fijn gespikkeld patroon [AC-2] dat onder de streefnorm valt); hierbij dient een onderscheid gemaakt te worden tussen nucleaire, cytoplasmatische en mitotische patronen. Minimaal het centromeerpatroon (AC-3) dient gerapporteerd te worden.
6. Een positieve HEp-2 IIF test wordt semi-kwantitatief gerapporteerd (titer of kleuringsintensiteit).
7. Een positieve HEp-2 IIF test met een nucleair patroon (dat wil zeggen ANA-positief) moet gevolgd worden door een ENA screen dan wel directe uittypering van anti-ENA-antistoffen minimaal gericht tegen Sm(D), SS-A/Ro52, SS-A/Ro60, SS-B/La, topoisomerase I (Scl-70) en U1RNP (met uitzondering van een aanvraag in het kader van AIH of JIA).
8. Minimaal een homogeen en gespikkeld ANA patroon (AC-1 en AC-4 of AC-5) moet gevolgd worden door een anti-dsDNA-antistofbepaling (met uitzondering van een aanvraag in het kader van AIH of JIA).
9. Een positieve ENA screen moet gevolgd worden door uittypering van minimaal de acht standaard-ENA (CENP-B, Sm(D), SS-A/Ro52, SS-A/Ro60, SS-B/La, topoisomerase I (Scl-70), U1RNP en Jo-1). Indien de ENA screen dsDNA bevat, dient ook voor anti-dsDNA-antistoffen getest te worden bij een positieve ENA screen.
10. Uitslagen van anti-ENA-antistoffen moeten voor alle acht standaard-ENA (CENP-B, Sm(D), SS-A/Ro52, SS-A/Ro60, SS-B/La, topoisomerase I (Scl-70), U1RNP en Jo-1) afzonderlijk kwalitatief gerapporteerd worden (dus ook de negatieve resultaten); indien het resultaat van een ENA screen als negatief wordt gerapporteerd, kan worden volstaan met het aangeven welke ENA in die test aanwezig zijn.
11. De gebruikte techniek voor het aantonen van anti-dsDNA-antistoffen dient kenbaar gemaakt te worden aan de kliniek. Resultaten van anti-dsDNA-antistoffen dienen (semi)kwantitatief gerapporteerd te worden.
12. In het kader van JIA en AIH biedt de ENA screen geen alternatief en is de HEp-2 IIF test de aangewezen methode.

Streefnorm

- I. Alle nucleaire en cytoplasmatische patronen in de HEp-2 IIF test dienen gerapporteerd te worden volgens ICAP nomenclatuur en definities (minimaal competent-level).
- II. Indien een persisterende klinische verdenking bestaat op een ANA-geassocieerde (reumatische) auto-immuunziekte bij een negatieve HEp-2 IIF test, dan dient het inzetten van een ENA-screen overwogen te worden. Indien een persisterende klinische verdenking

bestaat op een ANA-geassocieerde auto-immuunziekte bij een negatieve ENA screen, dan dient het inzetten van een HEp-2 IIF test overwogen te worden.

- III. Een positieve bevinding voor anti-dsDNA-antistoffen in het diagnostisch traject dient bevestigd te worden met testen (Farr of Crithidia lucilae IIF test) die met hoge specificiteit anti-dsDNA-antistoffen aantonen.
- IV. Indien er een klinische verdenking is aangeduid voor IIM en geen anti-Jo-1-antistoffen gevonden zijn, is het raadzaam om voor overige IIM-gerelateerde autoantistoffen te testen.
- V. Indien er een klinische verdenking is aangeduid voor systemische sclerose is het effectief om eerst te screenen met een ANA-test of een alternatieve screentest (HEp-2 IIF test of ENA screen). Een positief resultaat in de screentest dient opgevolgd te worden door het uittyperen voor anti-CENP-B en anti-Topoisomerase I (Sci-70) antistoffen; indien deze autoantistoffen niet aangetoond worden, is het raadzaam om te testen voor overige SSc-specifieke autoantistoffen (minimaal RNA polymerase III).

Onderbouwing

De test voor antinucleaire antistoffen (ANA) wordt traditioneel uitgevoerd met behulp van een indirecte immunofluorescentie (IIF) techniek met HEp-2 cellen (of een variant hiervan, zoals HEp-2000 of HEp-2010 cellen) als substraat. Het American College of Rheumatology (ACR) heeft vastgesteld voor welke ziektebeelden een ANA test van toegevoegde waarde is [1]: de test is zeer bruikbaar voor het stellen van een diagnose systemische lupus erythematosus (SLE) en systemische sclerose (SSc), bruikbaar voor het stellen van een diagnose idiopathische inflammatoire myopathie (IIM) en het Sjögren's syndroom (SjS), zeer bruikbaar voor het monitoren en prognose van juvenile idiopathische arthritis (JIA) en het Raynaud fenomeen, en als onderdeel van de diagnostische criteria onmisbaar bij het stellen van een diagnose mixed connective tissue disease (MCTD), medicijn-geïnduceerde lupus en auto-immun hepatitis (AIH). Hierbij is het uitgangspunt dat enkel autoantistoffen gericht tegen kernbestanddelen als ANA-positief gerapporteerd worden.

Na introductie van alternatieve testmethodes en de constatering dat met name SLE patiënten een negatief testresultaat hadden met deze nieuwe methodes (niet HEp-2 IIF), is door het ACR de HEp-2 IIF test uitgeroepen als de gouden standaard voor het bepalen van ANA [2]. Er is echter ruimte voor alternatieve testen, mits deze even goed zijn als de HEp-2 IIF test en de gebruikte testmethode gecommuniceerd wordt naar de aanvrager. In welke mate en voor welk ziektebeeld de alternatieve testmethode "even goed" moet zijn, wordt echter niet gespecificeerd. De aanbevelingen van de European Autoimmunity Standardization Initiative (EASI)/International Union of Immunological Societies (IUIS) geven iets meer ruimte voor alternatieve methodes, mits dit kenbaar gemaakt wordt naar de aanvrager en de mogelijkheid

geboden wordt alsnog een HEp-2 IIF resultaat te verkrijgen, eventueel via een verwijzingslaboratorium [3].

De vraag of de HEp-2 IIF test de meest geschikte screeningstest is voor het brede scala aan ANA-geassocieerde aandoeningen is eigenlijk door de ACR al beantwoord [1]. Wel is bekend dat de sensitiviteit van IIF voor antistofdetectie tegen SS-A/Ro60 en Jo-1 antigenen lager is in vergelijking met antigeen-specifieke immunoassays [4, 5]. IIM-specifieke autoantistoffen kunnen, met een beperkte sensitiviteit, wel aangetoond worden in de HEp-2 IIF test, maar met name de anti-synthetase antistoffen laten een cytoplasmatisch patroon zien en zijn in strikte zin geen ANA.

Deze richtlijn beperkt zich tot ANA-geassocieerde auto-immuunziekten, te weten systemische auto-immuunziekten (IIM, MCTD, SjS, SLE en SSc), JIA en AIH, en doet uitspraken over de laboratoriumbepalingen van ANA en gerelateerde autoantistoffen.

Interpretatie minimumnorm

1. De respectievelijke testen kunnen ook beschikbaar worden gesteld via een verwijzingslaboratorium. Daar waar gesproken wordt over de HEp-2 IIF test, worden ook alle andere HEp-2 varianten hiervan bedoeld (bijvoorbeeld HEp-2000 en HEp-2010).
2. Het te gebruiken testalgoritme is deels vastgelegd in de minimumnormen 6-8. Daarnaast geven de streefnormen II-V verder richting aan het te gebruiken testalgoritme.
3. Het rapporteren van cytoplasmatische (en eventueel mitotische) patronen mag niet als ANA-positief resultaat gerapporteerd worden. Rapportage van dergelijke patronen dient voor de aanvrager onderscheidend van een ANA-positief testresultaat plaats te vinden. Bij het vinden van dubbelpatronen worden alle patronen vastgelegd conform ICAP. Vastleggen van patronen kan dienen om te bepalen welke vervolgtest het meest passend is (testalgoritme), om de uitslag van solid-phase testen te verifiëren (kwaliteitscontrole) en om een veranderd patroon in kaart te brengen.
4. De screentest voor anti-ENA-antistoffen wordt gedefinieerd als ENA screen, en moet als zodanig kenbaar gemaakt worden aan de kliniek, zodat helder is dat dit geen ANA-test betreft.
5. Vastlegging van de ICAP patronen kan beperkt blijven tot de zogeheten “competente” patronen (zie [6]; www.anapatterns.org); alleen een nucleair patroon wordt als ANA-positief geïnterpreteerd, conform ICAP. Het centromeer HEp-2 IIF patroon moet gerapporteerd worden, omdat dit patroon als item telt in de ACR/EULAR criteria voor de classificatie van SSc [7]. Bij een lage titer centromeer patroon is het raadzaam om een bevestigingstest voor anti-CENP-B-antistoffen uit te voeren.

6. Indien gebruik gemaakt wordt van software-ondersteunde IIF microscopie kan gebruik gemaakt worden van een titervoorspelling op basis van de verkregen resultaten in de screenings-verdunning. Een screeningstiter van 1:80 is gebruikelijk voor de HEp-2 IIF test, maar ieder laboratorium zal dit in zijn eigen populatie en setting moeten testen (met als doel 95% specificiteit). Zowel voor titer als voor kleuringsintensiteit is er bewijs dat hoe hoger de titer/intensiteit, hoe waarschijnlijker sprake is van een systemische auto-immuunziekte [8, 9]. In het geval van dubbelpatronen of verdenking op pro-zone effect, is titratie raadzaam.
7. Bij een bevinding van een nucleair patroon in de HEp-2 IIF test, is uittypering voor Jo-1 niet noodzakelijk omdat reactiviteit tegen Jo-1 een cytoplasmatisch beeld oplevert. Voor de verdenking IIM is een rechtstreekse analyse van anti-Jo-1-antistoffen wenselijk. Uittypering voor CENP-B is niet noodzakelijk, omdat het vinden van het centromeer HEp-2 IIF patroon in principe afdoende is [7]. Indien uittypering niet automatisch kan plaatsvinden, dient het advies gegeven te worden een uittypering aan te vragen.
8. Anti-dsDNA-antistoffen resulteren in een nucleair homogeen HEp-2 IIF patroon, al dan niet gemaskeerd door nucleair gespikkelde HEp-2 IIF patronen. Afhankelijk van het testalgoritme, kan een anti-dsDNA-antistofbepaling volgen op iedere ANA (met uitzondering van een aanvraag in het kader van AIH en JIA). Indien toevoeging van anti-dsDNA antistoffen niet automatisch kan plaatsvinden, dient het advies gegeven te worden deze test aan te vragen.
9. Indien de ENA screen niet alle acht standaard-ENA bevat, dient de ontbrekende specificiteit in het testalgoritme ondervangen te worden. Indien uittypering niet automatisch kan plaatsvinden, dient het advies gegeven te worden deze uittypering aan te vragen.
10. Het is afdoende om de uitslagen kwalitatief te rapporteren; indien een klinische verdenking voor MCTD is uitgesproken is kwantitatieve rapportage van anti-RNP antistoffen te overwegen, maar een afkapwaarde voor klinische relevantie is niet vastgesteld.
11. Kwantitatieve rapportage van anti-dsDNA-antistoffen is van klinisch belang voor monitoring van ziekteactiviteit. Daarbij is het van belang dat altijd dezelfde techniek gebruikt wordt om anti-dsDNA-antistoffen te monitoren.
12. De ANA die gevonden worden in patiënten met AIH zijn doorgaans niet gericht tegen de standaard-ENA of dsDNA [10] terwijl dit voor JIA nog onduidelijk is. In het kader van JIA is het vinden van ANA voorspellend voor het ontwikkelen van uveitis, en heeft daarmee directe behandelconsequenties [11]. In het kader van AIH is het vermeldenswaardig dat de gevonden ANA titer in de HEp-2 IIF test door een factor 2 gedeeld moet worden voor de diagnostische criteria voor AIH (die gebaseerd zijn op het aantonen van ANA in levercoupes) [10]. In de praktijk betekent dit, dat voor de diagnose AIH bij het item ANA 1 dan wel 2 punten behaald worden bij een HEp-2 IIF titer ≥ 80 dan wel ≥ 160 , respectievelijk. Het

laboratorium moet alert zijn dat de titer mede wordt bepaald door zaken als de gebruikte HEp-2 cellijnvariant, apparatuur en conjugaat.

Interpretatie streefnorm

- I. De klinische relevantie van mitotische patronen is niet duidelijk en rapportage ervan wordt daarom niet aanbevolen [6]. In tegenstelling tot de minimumnorm impliceert deze streefnorm wel het vastleggen en rapporteren van het nucleaire dicht fijn gespikkeld patroon (AC-2).
- II. De HEp-2 IIF test kan beperkter sensitief voor anti-SS-A/Ro60-, anti-SS-A/Ro52- en anti-Jo-1-antistoffen zijn. De ENA screen kan beperkter sensitief zijn voor nog onbekende of niet beschikbare antigenen. Daarom wordt aanbevolen bij een persisterende klinische verdenking van een ANA-geassocieerde (reumatische) auto-immuunziekte alsnog een ENA screen (bij een negatieve HEp-2 IIF test) of een HEp-2 IIF test (bij een negatieve ENA screen) in te zetten.
- III. Door EASI/IUIS worden de Farr-assay en de Crithidia lucilae IIF test (CLIFT) als meest geschikt beoordeeld, omdat andere immunoassays minder specifiek zijn voor SLE. Daarom wordt aanbevolen om in het diagnostisch traject een positieve bevinding in een alternatieve immunoassay te bevestigen met de Farr-assay of de CLIFT. Dit is met name van belang bij laag-positieve bevindingen, maar het is niet mogelijk hiervoor een afkapwaarde te definiëren. De huidige beschikbare solid-phase testen zijn beperkt specifiek.
- IV. Negatieve uitslagen van de HEp-2 IIF test en van anti-Jo-1-antistoffen zijn niet sensitief genoeg om (het spectrum van) IIM betrouwbaar uit te sluiten.
- V. In plaats van een multiplex immunoassay voor SSc-specifieke autoantistoffen kan eventueel volstaan worden met een test voor anti-RNA polymerase III antistoffen.

Conclusies

Met hoog vertrouwen wordt geconcludeerd dat:

1. de bepaling van ANA een grote toegevoegde waarde heeft in de diagnostiek van ANA-geassocieerde aandoeningen, mits uitgevoerd in de juiste klinische context [1, 2];
2. alternatieven voor de HEp-2 IIF test een volwaardige mogelijkheid kunnen bieden om ANA-geassocieerde aandoeningen te diagnosticeren [3].
3. voor optimale diagnostiek zowel de HEp-2 IIF test als solid-phase testen noodzakelijk zijn.

Referenties

1. Solomon, D.H., et al., *Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing*. Arthritis Care & Research, 2002. **47**(4): p. 434-444.
2. Meroni, P.L. and P.H. Schur, *ANA screening: an old test with new recommendations*. Annals of the rheumatic diseases, 2010. **69**(8): p. 1420-1422.
3. Agmon-Levin, N., et al., *International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies*. Annals of the rheumatic diseases, 2014. **73**(1): p. 17-23.
4. Bossuyt, X. and A. Luyckx, *Antibodies to extractable nuclear antigens in antinuclear antibody-negative samples*. Clinical Chemistry, 2005. **51**(12): p. 2426-2427.
5. Yazdany, J., et al., *Choosing wisely: the American College of Rheumatology's Top 5 list of things physicians and patients should question*. Arthritis care & research, 2013. **65**(3): p. 329-339.
6. Damoiseaux, J., et al., *Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: the International consensus on ANA patterns (ICAP) perspective*. Annals of the rheumatic diseases, 2019. **78**(7): p. 879-889.
7. Van Den Hoogen, F., et al., *2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative*. Arthritis & Rheumatism, 2013. **65**(11): p. 2737-2747.
8. De Beeck, K.O., et al., *Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay*. Autoimmunity reviews, 2011. **10**(12): p. 801-808.
9. Oyaert, M., et al., *Added value of indirect immunofluorescence intensity of automated antinuclear antibody testing in a secondary hospital setting*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2016. **54**(2): p. e63-e66.
10. Hennes, E.M., et al., *Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis*. Hepatology, 2008. **48**(1): p. 169-176.
11. Giancane, G., et al., *Juvenile idiopathic arthritis: diagnosis and treatment*. Rheumatology and therapy, 2016. **3**(2): p. 187-207.

Verantwoording

Deze richtlijn is opgesteld op initiatief van het College van Medisch Immunologen (CMI) i.s.m. de Nederlandse Vereniging van Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde (NVKC).

Samenstelling werkgroep

De werkgroep bestaat uit Adriaan van Beek, Marco Schreurs, Henny Otten en Jan Damoiseaux namens het CMI en Ferry Bergkamp namens de NVKC.

Autorisatiedatum en geldigheid

Uiterlijk in 2025 bepaalt het bestuur van het CMI of deze module nog actueel is. Zo nodig wordt een nieuwe werkgroep geïnstalleerd om de richtlijn te herzien.

De commissie Richtlijnen van het CMI is als houder van deze richtlijn(module) de eerstverantwoordelijke voor het actueel houden van deze richtlijn. De andere aan deze richtlijn deelnemende wetenschappelijke verenigingen of gebruikers van de richtlijn delen de verantwoordelijkheid en informeren de eerstverantwoordelijke over relevante ontwikkelingen binnen hun vakgebied.

Doel en doelgroep

Deze richtlijn heeft als doel vast te stellen hoe ANA en ENA testen in het kader van de diagnostiek van ANA-geassocieerde (reumatische) aandoeningen optimaal uitgevoerd, geïnterpreteerd en gerapporteerd moeten worden. Doelgroep van deze richtlijn zijn laboratoriumspecialisten verantwoordelijk voor de ANA- en ENA-diagnostiek en medisch specialisten verantwoordelijk voor de diagnostiek van ANA-geassocieerde reumatische aandoeningen. De commissie Richtlijnen van het CMI heeft het initiatief genomen om deze richtlijn te laten ontwikkelen en zal deze autoriseren.

Belangenverklaring

De werkgroepleden hebben schriftelijk verklaard of ze in de laatste vijf jaar een (financieel ondersteunde) betrekking onderhouden met commerciële bedrijven, organisaties of instellingen die in verband staan met het onderwerp van de richtlijn. Ook is navraag gedaan naar persoonlijke financiële belangen, belangen door persoonlijke relaties, belangen d.m.v. reputatiemanagement, belangen vanwege extern gefinancierd onderzoek en belangen door kennisvalorisatie. De belangenverklaringen zijn op te vragen bij het secretariaat van het Kennisinstituut van Medisch Specialisten (KiMS). Een overzicht is hieronder gepresenteerd.

Naam	Belangen	Toelichting
Adriaan van Beek	Nee	
Marco Schreurs	Ja (sprekersvergoeding van Thermo-Fisher en Biogen)	
Henny Otten	Nee	
Ferry Bergkamp	Nee	
Jan Damoiseaux	Ja (sprekersvergoeding van Euroimmun, Thermo-Fisher en Werfen/Inova)	

Werkwijze - methode ontwikkeling

Voor deze richtlijn is geen systematische literatuursearch verricht maar wel gebruik gemaakt van internationale ANA consensus rapporten, relevante publicaties en de praktische implementeerbaarheid van deze richtlijn. De richtlijn is opgesteld conform het document Richtlijn Commissie Richtlijnen CMI. Bij het opstellen van de definitieve format van deze richtlijn is een commentaarronde van de leden van de CMI als NVKC meegenomen.

Zoekverantwoording

N.v.t.

Kennislacune

In hoeverre zijn kwantitatieve uitslagen voor ENA relevant voor diagnose of monitoring van ziekteactiviteit?