

Laboratoriumdiagnostiek van ANA, anti-ds-DNA- en anti-ENA-antistoffen: aanbevelingen naar aanleiding van een enquête

J. DAMOISEAUX¹, L. BAKKER-JONGES², J.W. COHEN TERVAERT¹, R. DERKSEN³, H. HOOIJKAAS⁴, C. KALLENBERG⁵, I. KLASSEN⁶, P. LIMBURG⁷, R. SMEENK⁸ en D. HAMANN⁸

Om inzicht te verkrijgen in de wijze waarop autoantistoffen tegen antigenen van de celkern (ANA, anti-dsDNA- en anti-ENA-antistoffen) worden bepaald, heeft het Nederlandse EASI-team samen met de SKML een vragenlijst opgesteld. Deze vragenlijst is rondgestuurd naar de deelnemers van de SKML-rondzending 'Collageen'. Dankzij een hoge respons (87%) is het beleid ten aanzien van deze testen binnen Nederland goed in kaart gebracht. De resultaten worden in dit artikel samengevat en voorzien van aanbevelingen vanuit het EASI-team. Gegeven de wijze waarop de aanbevelingen tot stand gekomen zijn, hebben zij niet de status van 'richtlijn', maar helpen zij de bepaling van autoantistoffen tegen celkern-antigenen te stroomlijnen en te verbeteren.

Enkele jaren geleden is het 'European Autoantibody Standardization Initiative' (EASI) opgericht (www.easi-network.com). Deze organisatie richt zich op autoantistoffen die geassocieerd zijn met chronische reumatische aandoeningen. De EASI-doelstellingen zijn: 1) verbetering van de communicatie tussen klinici en laboratoriumspecialisten, 2) standaardisatie van methodologie, testen en interpretatie van resultaten, en 3) harmonisatie van testalgoritmen (1). Hiertoe zijn er, naast de internationale EASI-groep, nationale EASI-teams geformeerd. De coördinatoren van de nationale teams bespreken jaarlijks de verschillende activiteiten. De resultaten worden tweejaarlijks gerapporteerd tijdens het 'International Congress on Autoimmunity'. Het Nederlandse EASI-team, bestaande uit drie klinisch immunologen (internisten) en zes medisch immunologen (laboratoriumspecialisten),

Maastricht Universitair Medisch Centrum, Laboratorium Klinische Immunologie, Maastricht¹, Reinier de Graaf Gasthuis, Medische Laboratoria, Delft², Universitair Medisch Centrum Utrecht, Reumatologie en Klinische Immunologie, Utrecht³, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum, Immunologie, Rotterdam⁴, Universitair Medisch Centrum Groningen, Reumatologie en Klinische Immunologie, Groningen⁵, Universitair Medisch Centrum St Radboud, Afdeling Laboratoriumgeneeskunde, Laboratorium Klinische Immunologie, Nijmegen⁶, Universitair Medisch Centrum Groningen, Afdeling Laboratoriumgeneeskunde, Groningen⁷ en Sanquin, Amsterdam⁸

Correspondentie: dr. J. Damoiseaux, Laboratorium Klinische Immunologie, Maastricht Universitair Medisch Centrum, Postbus 5800, 6200 AZ Maastricht, Nederland
E-mail: jan.damoiseaux@mumc.nl

heeft geïnventariseerd wat er al gebeurt ten aanzien van standaardisatie van autoantistofbepalingen (2). Dit betreft documentatie in de vorm van het 'Handboek medische laboratoriumdiagnostiek' (3) (voormalig Diagnostisch Kompas) en CBO-richtlijnen voor de diagnostiek van auto-immuunziekten (4-6). De Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoriumdiagnostiek (SKML) zorgt voor rondzendingen voor autoantistoffen en de voormalige werkzaamheden van de Stichting Referentielaboratorium Reumaserologie (RELARES) zijn opgenomen in de SKML-werkgroep 'Harmonisatie Auto-immuun Serologie'. De eerste 2 EASI-doelstellingen worden daarmee ruimschoots ingevuld binnen Nederland, maar de harmonisatie van testalgoritmen verdient de aandacht. Gelijktijdig is er vanuit Europees EASI-verband aan de nationale EASI-teams gevraagd een consensusalgoritme te formuleren voor het bepalen van antistoffen tegen nucleaire antigenen (ANA; inclusief antistoffen tegen dsDNA en extraheerbare nucleaire antigenen (ENA)). Het Nederlandse EASI-team heeft in samenwerking met de SKML, sectie Humorale Immunologie (HIM), door middel van een vragenlijst geïnventariseerd hoe deze testen in Nederland worden uitgevoerd en of er gebruik wordt gemaakt van een testalgoritme. Met betrekking tot de anti-ENA-antistoffen is de vragenlijst beperkt tot de zeven standaardantigenen SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, RNP, CENP-B, Scl-70 (topoisomerase I) en Jo-1 (histidyl-tRNA-synthetase). De vragenlijst is rondgestuurd naar alle deelnemers van de rondzending 'Collageen'. De resultaten zijn teruggekoppeld tijdens een SKML-nabespreking en zijn in dit artikel samengevat en voorzien van aanbevelingen vanuit het EASI-team.

De vragenlijst

De vragenlijst (zie www.nvkc.nl/publicaties) bestond uit 56 vragen in 5 categorieën: laboratoriumorganisatie (n=5), ANA-testen (n=14), anti-dsDNA-antistofstesten (n=8), anti-ENA-antistofstesten (n=5), en het gebruikte algoritme (n=16). De vragenlijst is verstuurd naar de 81 deelnemers van de SKML-rondzending 'Collageen'. Buitenlandse laboratoria (n=2) en diagnostica-bedrijven (n=3) zijn niet geïnccludeerd in de analyse. Van de 76 Nederlandse diagnostische laboratoria, inclusief de laboratoria van Aruba en Curaçao, zijn 66 ingevulde vragenlijsten ontvangen (87%). De type organisaties (bv. UMC's, niet-academische ziekenhuizen, huisartsenlaboratoria, etc.) blijken evenredig vertegenwoordigd te zijn.

Resultaten en aanbevelingen

Het wel of niet testen voor ANA

Acht laboratoria (12%) geven aan geen ANA-testen te verrichten terwijl ze wel testen voor anti-dsDNA- en -ENA-antistoffen. De ANA-test is een screeningstest voor anti-dsDNA- en anti-ENA-antistoffen (7), maar is ook van belang, onafhankelijk van andere testen, voor de diagnostiek van systemische lupus erythematosus (SLE) (8). De aanbeveling is derhalve om de ANA-test wel uit te voeren in het kader van de diagnose systemische auto-immuunziekten.

ANA-testen met behulp van indirecte immunofluorescentie

De 58 laboratoria die voor ANA testen, gebruiken medeels (n=43; 74%) indirecte immunofluorescentie (IIF) op HEp2- of HEp2000-preparaten (tabel 1). De andere laboratoria gebruiken fluorescent-enzyme immuno-assays (FEIA, cq ImmunoCAP; n=6; 10%), ANA-ELISA's (n=5; 9%), of andere technieken (n=4; 7%). Twee laboratoria in de restgroep gebruiken HEp2(000)-cellen in combinatie met een enzymatisch aankleuring (immunocytochemie) in plaats van IIF. Eén laboratorium gebruikt nog leverweefsel voor ANA-detectie. Recent heeft het 'American College of Rheumatology' (ACR), naar aanleiding van veranderingen in de ANA-diagnostiek in de Verenigde Staten (9), de IIF-test als gouden standaard benoemd voor ANA-detectie (10). Indien andere testen worden gebruikt, dienen die testen aantoonbaar tenminste even goed te zijn en dient het gebruik van een alternatieve test bij de uitslag gecommuniceerd te worden. Aanbevolen wordt om testen, bestaande uit een mengsel van een beperkt aantal gedefinieerde antigenen, geen ANA-test te noemen.

Serumverdunding en titratie van ANA

Het overgrote merendeel van de ANA-IIF-gebruikers (n=43) start met een serumverdunding van 1:40 (n=17) of 1:80 (n=23). Respectievelijk 3 (18%) en 10 (43%) van deze laboratoria voeren een titratie uit; 12 laboratoria rapporteren de titer aan de kliniek. Van de laboratoria die niet titreren, rapporteert een kleine meerderheid wel de fluorescentie-intensiteit. Veel laboratoria (n=14) maken blijkbaar gebruik van een lage serumverdunding zonder titratie. In een oudere

studie bleken bij een 1:40-verdunding maar liefst 31,7% van gezonde controles ANA-positief; voor een 1:80- en 1:160-verdunding was dit nog steeds 13,3% en 5,0%, respectievelijk (11). Aangezien de ANA-test vooral een screeningstest is, is het legitiem te kiezen voor hoge sensitiviteit ten koste van specificiteit. Echter, als bijna 1/3 van de gezonde controles positief is, kan dit resulteren in onacceptabel hoge kosten voor vervolgtesten. Omdat de detectie van ANA niet alleen afhankelijk is van de serumverdunding, maar ook van het preparaat HEp2(000)-cellen, het gebruikte conjugaat en de kwaliteit van de fluorescentiemicroscopie, is er geen eenduidige aanbeveling te geven ten aanzien van de startverdunding van de ANA-IIF (12). Elk laboratorium dient daarom inzicht te hebben in het percentage positieve ANA-testen in een gezonde controlepopulatie en in het percentage positieve vervolgtesten bij een positieve ANA. Titratie van ANA is raadzaam, mede voor het onderkennen van mengpatronen, evenals het (semi)kwantitatief rapporteren aan de kliniek.

Beoordeling en rapportage van het ANA-patroon

Laboratoria die HEp2(000)-cellen (n=45) of levercoupes (n=1) gebruiken, kunnen het aankleuringspatroon beoordelen. Slechts 1 laboratorium beoordeelt het patroon niet. De belangrijkste patronen die door vrijwel alle laboratoria worden onderscheiden zijn: homogeen (n=44), gespikkeld (n=44), SS-A/Ro-beeld of atypisch gespikkeld (n=40), centromeer (n=45) en nucleolair (n=44). Daarnaast worden deels ook andere patronen onderscheiden, bijvoorbeeld cytoplasmatisch (n=27), nucleaire dots (n=13), nucleaire membraan (n=10), nucleaire matrix (n=4) en PCNA (n=4). Vierentwintig laboratoria (53%) rapporteren de belangrijkste patronen aan de kliniek; 10 laboratoria (29%) rapporteren uitsluitend het centromeerpatroon; 8 laboratoria (18%) geven geen patrooninformatie. Het aflezen van het ANA-patroon wordt aanbevolen omdat het informatie geeft over de mogelijke onderliggende antigene specificiteit (13). Het al dan niet rapporteren van het patroon kan in overleg met de kliniek worden bepaald. Indien echter de aanwezigheid van anti-centromeerantistoffen wordt aangetoond in de ANA-test zonder bevestiging met een anti-CENP-B-ENA-test, is rapportage van dit patroon zonder meer aangewezen.

Tabel 1. Gebruikte technieken voor het aantonen van ANA, anti-dsDNA- en anti-ENA-antistoffen.

	IIF	ELISA	FEIA	Farr	Line-blot	Dot-blot	Combinatie	Anders
ANA* (n=58)	43	5	6	nvt	–	–	–	4
Anti-dsDNA as (n=63)**	10	5	34	2	–	–	9	2
Anti-ENA as (n=62)***	–	6	32	nvt	10	6	7	–

* Afkortingen: ANA, anti-nucleaire antistoffen; as, antistoffen; dsDNA, dubbelstrengs DNA; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ENA, extranucleaire antigenen; FEIA, fluorescent-enzyme immuno-assay; IIF, indirecte immunofluorescentie; nvt, niet van toepassing.

** Eén laboratorium heeft niet aangegeven welke test wordt gebruikt.

*** De gebruikte testen voor anti-ENA-antistoffen betreffen de testen voor uittypering van deze antistoffen; één laboratorium heeft aangegeven alleen te screenen voor deze antistoffen.

Detectietechniek voor anti-ds-DNA-antistoffen

Drieëntwintig laboratoria (95%) testen voor anti-dsDNA-antistoffen met een verscheidenheid aan technieken: Crithidia IIF (n=10), Farr-assay (n=2), FEIA (n=34), ELISA (n=5), een combinatie van testen (n=9), of anders (n=2); 1 laboratorium heeft dit item niet ingevuld (zie tabel 1). Combinatie van technieken betreft veelal Crithidia IIF (n=7), Farr-assay (n=6) en/of FEIA (n=4). Hoewel de (klassieke) Farr-assay als gouden standaard gezien wordt voor de detectie van anti-dsDNA-antistoffen (14), en het uitsluitend gebruiken van IIF met Crithidia in SKML-nabesprekingen vaker ontraden is, is er onvoldoende consensus over welke techniek dient te worden aanbevolen. Het is wel belangrijk om de kliniek te informeren over de gebruikte techniek.

Rapportage van anti-ds-DNA-antistoffen

De meeste laboratoria rapporteren anti-ds-DNA-antistoffen kwantitatief (n=41) of semi-kwantitatief (n=6). Zestien laboratoria rapporteren echter uitsluitend kwalitatief. Aangezien anti-ds-DNA-antistoffen potentieel pathogeen zijn en de uitslag wordt gebruikt voor het vervolgen van een patiënt (remissie versus recidief) (14), is een kwantitatieve rapportage zonder meer aangewezen. Opmerkelijk is dat de 28 FEIA-gebruikers die uitslagen kwantitatief rapporteren, 5 verschillende eenheden gebruiken. De helft (n=14) gebruikt de door de leverancier voorgeschreven eenheid (IU/ml).

Detectie van anti-ENA-antistoffen

Anti-ENA-antistoffen worden gedetecteerd in 62 laboratoria (94%). Vierenvijftig laboratoria (87%) voeren een screeningstest uit, voornamelijk door middel van FEIA (n=40). Er is nog één gebruiker van immunodiffusietechnieken (Ouchterlony). De uitypering van anti-ENA-antistoffen geschiedt met verschillende technieken: ELISA (n=6), lijn-blot (n=10), dot-blot (6), FEIA (n=32), of combinaties hiervan (n=7) (zie tabel 1). Eén laboratorium verstuurt het monster met een positieve ENA-screen voor uitypering naar elders. De laboratoria die combinaties van testen toepassen, gebruiken veelal een lijn-blot met FEIA (n=5). Ondanks het bestaan van een (oude) internationale consensus, waarbij anti-ENA-antistoffen met tenminste twee verschillende technieken gedetecteerd dienen te worden (15), wordt deze consensus slechts door een kleine minderheid gevolgd. Opvallend is dat dit niet de UMC's betreft, want slechts 2 van de 7 deelnemende UMC's rapporteren het structureel gebruik van meerdere technieken. Of bovengenoemde consensus nog van toepassing is sinds het beschikbaar komen van nieuwe antigeenpreparaten en detectietechnieken is echter discutabel. Een aanbeveling is hier dan ook niet op zijn plaats.

Alle laboratoria die anti-ENA-antistoffen uityperen (n=61) testen voor de antigenen SS-A/Ro, SS-B/La, Sm en RNP. Anti-CENP-B-antistoffen worden door 52 laboratoria bepaald; dit hangt samen met het feit dat een aantal laboratoria uitdrukkelijk het anticeentremerpatroon als enige ANA-patroon rapporteert (vide supra). Echter, enkele laboratoria bepalen geen antistoffen tegen Scl-70 (topoisomerase I) en Jo-1 (n=4 en n=6, respectievelijk). De aanbeveling is om dit wel te doen.

Rapportage van anti-ENA-antistoffen

Resultaten van anti-ENA-antistofbepalingen worden merendeels kwalitatief gerapporteerd (n=46; 74%). Veertien laboratoria (23%) rapporteren (semi-)kwantitatief. Hiervoor is echter weinig tot geen klinische relevantie. Aangezien niet alle laboratoria voor de 7 standaardantigenen testen (SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, RNP, CENP-B, Scl-70 en Jo-1) is het wel belangrijk dat uitslagen voor de afzonderlijke antigenen gerapporteerd worden. Dit gebeurt in 51 laboratoria (82%), maar 8 laboratoria (13%) rapporteren negatieve resultaten niet afzonderlijk. Dit kan verwarrend zijn als een patiënt naar elders wordt doorverwezen met een uitslag 'ENA-negatief'. Immers, als er niet getest is voor bijvoorbeeld anti-Scl-70 antistoffen, kan de arts onterecht veronderstellen dat deze antistoffen afwezig zijn. De aanbeveling is om in de rapportage van anti-ENA antistoffen uitslagen, bij voorkeur kwalitatief, voor alle 7 standaard-ENA te geven (dus ook de negatieve resultaten); indien een screeningstest als negatief wordt gerapporteerd, dient te worden aangegeven welke ENA in die test voorhanden waren.

Onderscheid tussen SS-A/Ro60 en SS-A/Ro52

Het SS-A/Ro-eiwit is, samen met het SS-B/La-eiwit, onderdeel van een ribonucleoproteïne (RNP). Het SS-A/Ro-eiwit is aanvankelijk beschreven als bestaande uit een 60 kDa-eenheid (SS-A/Ro60) en een 52 kDa-eenheid (SS-A/Ro52). Later is er discussie ontstaan of het 52 kDa-eiwit daadwerkelijk een onderdeel vormt van het betreffende RNP-complex (16). Daarom wordt dit 52 kDa-eiwit vaker Ro52 genoemd in plaats van SS-A/Ro52. Antistoffen tegen SS-A/Ro60 en Ro52 kunnen beide neonatale lupus en, in de ongeboren vrucht, een congenitaal hartblok veroorzaken (17). De SS-A/Ro60- en Ro52-antistoffen hebben echter diagnostisch een andere waarde. Anti-Ro52-antistoffen zijn geassocieerd met Sjögren's syndroom, myositis en systemische sclerose (18). De prevalentie van anti-Ro52-antistoffen in myositis en systemische sclerose is significant hoger dan die van anti-SS-A/Ro60-antistoffen. Circa 30% van de myositispatiënten heeft enkel anti-Ro52-antistoffen (zonder anti-SS-A/Ro60), vaak samen met anti-Jo-1-antistoffen. Vooral de lijn-blots onderscheiden anti-SS-A/Ro60- en anti-Ro52-antistoffen. Zeventien laboratoria (28%) onderscheiden beide antistoffen. Acht van deze laboratoria rapporteren beide entiteiten ook afzonderlijk; echter, 5 laboratoria rapporteren beide entiteiten als SS-A; 2 laboratoria rapporteren Ro52-antistoffen alleen indien anti-SS-A/Ro60-antistoffen negatief zijn. De aanbeveling is om, indien anti-SS-A/Ro60- en Ro52-antistoffen apart worden gemeten, deze ook als zodanig te rapporteren. Bovendien, bij klinische verdenking op congenitaal hartblok/neonatale lupus/Sjögren's syndroom en een negatieve testuitslag voor anti-SS-A/Ro60-antistoffen, dient alsnog te worden getest voor de aanwezigheid van Ro52-antistoffen.

Onderscheid tussen SmB- en SmD-antistoffen

De Sm-eiwitten zijn, samen met de RNP-eiwitten, door middel van een RNA-molecuul met elkaar verbonden. Antistoffen tegen Sm zijn zeer specifiek voor SLE mits

het de SmD-component betreft (15). Slechts 10 laboratoria rapporteren dat ze SmB en SmD onderscheiden. Dit is opmerkelijk omdat 39 laboratoria FEIA gebruiken en deze test berust op een gezuiverd, natief SmD-preparaat. Blijkbaar zijn veel laboratoriumspecialisten niet goed op de hoogte van de antigeensamenstelling in hun testen voor anti-ENA-antistoffen. De gebruikers van lijn-blots detecteren veelal ook antistoffen tegen het SmB-eiwit. Twee van deze laboratoria rapporteren anti-SmB-antistoffen, ondanks de discutabele specificiteit voor SLE, als anti-Sm-antistoffen. De aanbeveling is om, bij voorkeur, alleen anti-SmD-antistoffen te meten en deze als anti-Sm(D)-antistoffen te rapporteren; rapportage van anti-SmB-antistoffen moet vermeden worden.

Het gebruik van sneltesten

Soms is een snel (binnen 24 uur) testresultaat klinisch gewenst (cito-aanvraag). Ruim 1/3 van de laboratoria is bereid om sneltesten in te zetten voor ANA (n=23; 39%), anti-dsDNA-antistoffen (n=27; 43%) en anti-ENA-antistoffen (n=23; 38%). Deze laboratoria maken in de regel geen verschil voor de drie soorten antistoffen: de concordantie voor het geheel niet accepteren van sneltesten of accepteren van alle drie de aanvragen als sneltest is maar liefst 92%. Een belangrijk criterium voor het accepteren van een sneltest is dat het testresultaat het klinisch handelen beïnvloedt. Voorwaarde hiervoor is dat de test een hoge specificiteit heeft voor het ondersteunen van een diagnose en/of een hoge sensitiviteit voor het uitsluiten van een diagnose. Dit is voor de ANA deels het geval (hoge sensitiviteit voor SLE); voor de anti-ENA-antistoffen is dit op zijn minst twijfelachtig. Anti-dsDNA-antistoffen zijn zeer specifiek voor SLE en hebben een sensitiviteit van ~70%. Vooral de bepaling van anti-dsDNA-antistoffen zou als cito-aanvraag moeten worden gehonoreerd.

Relatie tussen ANA en anti-dsDNA-antistoffen

Aangezien anti-dsDNA-antistoffen meestal een homogeen aankleuringspatroon geven in een ANA-IIF-test, bestaat er een sterke relatie tussen beide testen (19). Dit is bij een aantal laboratoria terug te vinden in het diagnostisch algoritme voor het testen van nieuwe patiënten op ANA en anti-dsDNA-antistoffen. Zeven laboratoria beschouwen de ANA-test als een screeningstest voor anti-dsDNA-antistoffen. Elf laboratoria voegen de ANA-test toe als anti-dsDNA-antistoffen zijn aangevraagd. Eveneens 11 laboratoria schrappen de anti-dsDNA-antistofaanvraag indien ANA afwezig zijn. Zesentwintig laboratoria (55%) voegen de anti-dsDNA-antistoftest toe als de ANA-test positief is; 14 van deze laboratoria doen dit alleen bij een homogeen ANA-patroon. In 19 laboratoria (29%) is er geen enkel verband, uitgedrukt in een testalgoritme, tussen de ANA-test en de anti-dsDNA-antistoftest. Aangezien de ANA-test een screeningstest is voor anti-dsDNA-antistoffen (en anti-ENA-antistoffen), is het aangewezen om, tenminste bij een homogeen ANA-patroon, de anti-dsDNA-antistofbepaling toe te voegen, dan wel te adviseren deze antistoffen alsnog aan te vragen. Dit hoeft niet bij cytoplasmatische aankleuring, het cen-

tromeerpatroon en/of de meer exotische patronen (bijvoorbeeld nucleaire dots, nucleaire membraan of nucleaire matrix).

Relatie tussen ANA en anti-ENA-antistoffen

De relatie tussen ANA en anti-ENA-antistoffen is minder eenduidig dan die tussen ANA en anti-dsDNA-antistoffen. Toch hebben de meeste laboratoria in dit kader een diagnostisch algoritme voor nieuwe patiënten. Zeventien laboratoria voegen een ANA-test toe als de anti-ENA-antistoffen aangevraagd zijn. Maar liefst 21 laboratoria schrappen de anti-ENA-aanvraag indien de ANA-test negatief is. Veertig laboratoria (61%) voegen de anti-ENA-antistoftest toe indien ANA aantoonbaar zijn; 7 laboratoria doen dit afhankelijk van patroon en/of titer. In 14 laboratoria (21%) is er geen enkel verband, uitgedrukt in een testalgoritme, tussen de ANA-test en de anti-ENA-antistoftest. Ook hier geldt dat de ANA-test een screeningstest is voor anti-ENA-antistoffen. Daarom is het aangewezen om anti-ENA-antistoffen te bepalen, dan wel te adviseren deze antistoffen alsnog aan te vragen, bij een nieuwe patiënt met een positieve ANA-test. Het ANA-patroon kan hierin een rol spelen. Vooral het centromeerpatroon en het SS-A/Ro (atypisch gespikkeld) patroon gaan vrijwel altijd gepaard met de aanwezigheid van anti-CENP-B-antistoffen en anti-SS-A/Ro-antistoffen, al dan niet met anti-SS-B/La-antistoffen, respectievelijk (13). Een nucleolair patroon resulteert vrijwel nooit in de detectie van één van de standaard ENA, maar is wel relevant voor systemische sclerose. Het schrappen van een anti-ENA-antistoffenaanvraag bij een negatieve ANA-test wordt met kracht ontraden. Met name anti-Jo-1- en anti-SS-A/Ro-antistoffen kunnen worden gemist in een ANA-IIF-test. Vooral bij een klinische verdenking op myositis (anti-Jo-1-antistoffen) of congenitaal hartblok/neonatale lupus/Sjögren's syndroom (anti-SS-A/Ro-antistoffen) is het aangewezen anti-ENA-antistoffen te bepalen onafhankelijk van de uitslag van de ANA-test. Dit onderstreept het belang van klinische informatie bij de aanvraag.

Discussie

De ANA/ENA-enquête geeft door de hoge participatie (87%) een goed overzicht van de wijze waarop ANA, anti-dsDNA- en anti-ENA-antistoffen in Nederland worden bepaald. Op basis van deze bevindingen en bestaande inzichten heeft het EASI-team een aantal aanbevelingen gedaan (zie aanbevelingen). Gegeven de wijze waarop deze aanbevelingen tot stand zijn gekomen, hebben ze niet de status 'richtlijn', maar helpen ze de laboratoriumdiagnostiek van deze antistoffen te stroomlijnen en te verbeteren.

Opmerkelijk is dat relatief veel deelnemers niet goed op de hoogte zijn van de details van de testen die in hun laboratorium worden uitgevoerd. Door het veelvuldig gebruik van FEIA is deze tekortkoming het meest opvallend bij deze categorie. Voorbeelden hiervan zijn: het niet weten dat de ImmunoCAP op het principe van FEIA berust, het onterecht inzetten van de ENA Symphony als ANA-test, het willekeurige gebruik van eenheden voor anti-dsDNA-antistoffen, en het niet kennen van de samenstelling van het Sm-preparaat.

De enquête heeft enkele openstaande vragen opgeleverd voor verder onderzoek. Allereerst betreft dit de startverdunding, en daarmee de afkapwaarde, van de ANA-test bij kinderen. Er is slechts één laboratorium dat een lagere startverdunding (1:10) gebruikt voor kinderen. Waar dit op is gebaseerd, is vooralsnog onduidelijk. Daarnaast is de vraag of een bepaalde tijdspanne is te definiëren waarbinnen het hertesten van auto-antistoffen bij een bepaalde patiënt wordt geweigerd. Deze tijdspanne zou kunnen verschillen voor de verschillende antistoffen en of de aanvraag het diagnostisch traject betreft of opvolging van de al gediagnosticeerde patiënt. Slechts 13 laboratoria bleken een dergelijke tijdspanne te hebben gedefinieerd variërend van 2 weken tot 12 maanden.

Tenslotte is het vermeldenswaardig dat de aanpak van het Nederlandse EASI-team, in samenwerking met SKML, zeer positief is ontvangen in de internationale EASI-groep. De enquête is vertaald en zal in meerdere Europese landen rondgestuurd worden. Dit biedt de mogelijkheid om de Nederlandse laboratoriumdiagnostiek te vergelijken met die van de andere Europese landen.

Referenties

1. Shoenfeld Y, Cervera R, Haass M, Kallenberg C, Khamashta M, Meroni L, Piette J-C, Schmidt R, Wiik A. EASI - The European Autoimmunity Standardisation Initiative. A new initiative that can contribute to agreed diagnostic models of diagnosing autoimmune disorders throughout Europe. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1109: 138-144.
2. Damoiseaux J, Cohen Tervaert JW, Derksen R, Hamann D, Hooijkaas H, Klasen I, Kallenberg C, Limburg P, Smeenk R. Autoantibody standardization in the Netherlands. The past, the present, and the future. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1173: 10-14.
3. Pekelharing JM, Hooijkaas H, Punt JM, Smeets LC, Souverein JHM. Handboek medische laboratoriumdiagnostiek. *Compendium Klinische Diagnostiek - Deel 2*. Houten, The Netherlands: Prelum uitgevers; 2009.
4. CBO-richtlijn: Dermatomyositis, polymyositis en sporadische 'inclusion body'-myositis. Alphen aan den Rijn, The Netherlands: Van Zuiden Communications; 2005.
5. CBO-richtlijn: Diagnostiek en behandeling van reumatoïde artritis. Alphen aan den Rijn, The Netherlands: Van Zuiden Communications; 2009.
6. CBO-richtlijn: Diagnostiek kleine vaten vasculitis. Alphen aan den Rijn, The Netherlands: Van Zuiden Communications; in druk.

Aanbevelingen van het Nederlandse EASI-team voor de laboratoriumdiagnostiek van ANA, anti-dsDNA- en anti-ENA-antistoffen.

1. De ANA-test dient een vast onderdeel te zijn van de auto-antistofbepalingen in het kader van de diagnostiek van systemische auto-immuunziekten.
2. Testen die gebaseerd zijn op een mengsel van gedefinieerde antigenen dienen niet als ANA-test te worden benoemd.
3. Het is raadzaam om, in geval van een positieve ANA-test, een titratie uit te voeren en het resultaat hiervan semi-kwantitatief (kleuringsintensiteit dan wel titer) te rapporteren aan de kliniek.
4. Het aflezen van het ANA-patroon wordt aanbevolen; rapportage van het patroon kan in overleg met de kliniek wel of niet plaatsvinden.
5. Het is belangrijk om aan de kliniek kenbaar te maken welke techniek wordt gebruikt voor het aantonen van anti-dsDNA-antistoffen.
6. Resultaten van anti-dsDNA-antistoftesten dienen kwantitatief gerapporteerd te worden.
7. Aanbevolen wordt anti-ENA-antistoffen, eventueel stapsgewijs, te typeren voor alle 7 standaard-ENA (SS-A/Ro60, SS-B, Sm, RNP, CENP-B, Scl-70 en Jo-1).
8. Uitslagen van anti-ENA-antistoffen dienen, bij voorkeur kwalitatief, voor alle 7 standaard-ENA afzonderlijk te worden gerapporteerd (dus ook de negatieve resultaten); indien het resultaat van een screeningstest als negatief wordt gerapporteerd, kan worden volstaan met het aangeven welke ENA in die test voorhanden zijn.
9. Het verdient aanbeveling om anti-SS-A/Ro60- en anti-Ro52-antistoffen apart te detecteren en te rapporteren.
10. Bij klinische verdenking op congenitaal hartblok/neonatale lupus/Sjögren's syndroom en een negatieve testuitslag voor anti-SS-A/Ro60-antistoffen, dient alsnog te worden getest voor de aanwezigheid van anti-Ro52-antistoffen.
11. Anti-Sm-antistoffen moeten bij voorkeur SmD-specifiek worden bepaald. Deze antistoffen kunnen als anti-Sm(D)-antistoffen worden gerapporteerd; rapportage van anti-SmB-antistoffen moet worden vermeden.
12. De bepaling van anti-dsDNA-antistoffen moet als cito-bepaling beschikbaar zijn.
13. In het diagnostisch traject is het aangewezen om, in ieder geval bij een homogeen ANA-patroon, de anti-dsDNA-antistofbepaling toe te voegen, dan wel het advies te geven deze bepaling aan te vragen.
14. In het diagnostisch traject is het aangewezen om, bij een positieve ANA-test, de anti-ENA-antistofbepaling toe te voegen, dan wel het advies te geven deze bepaling aan te vragen.
15. Bij klinische verdenking op myositis (anti-Jo-1-antistoffen) of congenitaal hartblok/neonatale lupus/Sjögren's syndroom (anti-SS-A/Ro60-antistoffen), of als de aanvragend arts daar uitdrukkelijk om verzoekt, is het aangewezen anti-ENA-antistoffen te bepalen onafhankelijk van de uitslag van de ANA-test.

7. Hooijkaas H, Smeenk R, Gmelig Meyling F. Systemische auto-immuunziekten: passende serologische diagnostiek. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneeskunde* 2006; 31: 257-268.
8. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-1277.
9. Kroshinsky D, Stone JH, Bloch DB, Sepehr A. Case 5-2009: a 47-year-old woman with a rash and numbness and pain in the legs. *N Engl J Med* 2009; 360: 711-720.
10. American College of Rheumatology. Position statement: methodology of testing for antinuclear antibodies. 2009; www.rheumatology.org/practice/clinical/position/ana_position_stmt.pdf.
11. Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, Gordon T, Hardin JA, Kalden JR, Lahita RG, Maini RN, McDougal JS, Rothfield NF, Smeenk RJ, Takasaki Y, Wiik A, Wilson MR, Koziol JA. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1601-1611.
12. Van Blerk M, Van Campenhout C, Bossuyt X, Duchateau J, Humbel R, Servais G, Tomasi J-P, Albert A, Coucke W, Libeer J-C. Current practices in antinuclear testing: results from the Belgian External Quality Assessment Scheme. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 102-108.
13. Damoiseaux JGMC, Cohen Tervaert JW. From ANA to ENA: how to proceed? *Autoimmunity Rev* 2006; 5: 10-17.
14. Hahn BH. Antibodies to DNA. *N Engl J Med* 1998; 338: 1359-1368.
15. Venrooij WJ van, Charles P, Maini RN. The consensus workshops for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases. *J Immunol Meth* 1991; 140: 181-189.
16. Boire G, Gendron M, Monast N, Bastin B, Menard HA. Purification of antigenically intact Ro ribonucleoproteins; biochemical and immunological evidence that the 52-kD protein is not a Ro protein. *Clin Exp Immunol* 1997; 100: 489-498.
17. Friedman DM, Rupel A, Buyon JP. Epidemiology, etiology, detection, and treatment of autoantibody-associated congenital heart block in neonatal lupus. *Curr Rheumatol Rep* 2007; 9: 101-108.
18. Schulte-Pelkum J, Fritzler M, Mahler M. Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system. *Autoimmun Rev* 2009; 8: 632-637.
19. Kang I, Spierstein R, Quan T, Breitenstein ML. Utility of age, gender, ANA titer and pattern as predictors of anti-ENA and dsDNA antibodies. *Clin Rheumatol* 2004; 23: 50-51.

Abstract

Damoiseaux J, Bakker-Jonges L, Cohen Tervaert JW, Derksen R, Hooijkaas H, Kallenberg C, Klasen I, Limburg P, Smeenk R, Hamann D. Laboratory diagnosis of ANA, anti-dsDNA- and anti-ENA- antibodies; recommendations following the outcomes of a questionnaire. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2010; 35: 234-239.

To gain insight in the laboratory diagnostics of auto-antibodies to nuclear antigens (ANA, anti-dsDNA- and anti-ENA-antibodies), the Dutch EASI-team has prepared a questionnaire in collaboration with SKML. This questionnaire has been distributed to all participants of the external quality assessment program for these auto-antibodies, as organized by SKML. Due to the high response (87%), the Dutch situation has been very well documented. The results are summarized in this paper and, in addition, recommendations of the Dutch EASI-team are given. Although these recommendations are not to be used as official guide-lines, they may harmonize and improve the detection of auto-antibodies to nuclear antigens.