

Detectie van ANCA in Nederlandse laboratoria: de klinische praktijk in relatie tot de internationale consensus en nationale richtlijn

R.G. van der MOLEN¹, C. ROOZENDAAL² en J.G.M.C. DAMOISEAUX³

Om inzicht te verkrijgen in de wijze waarop in Nederland anti-neutrofiële cytoplasmatische antistoffen (ANCA) bepaald worden, is een vragenlijst opgesteld. Deze vragenlijst is, met medewerking van SKML, rondgestuurd naar de deelnemers van de SKML-rondzending 'ANCA-GBM'. Dankzij een hoge respons (86%) is het beleid ten aanzien van ANCA diagnostiek binnen Nederland goed in kaart gebracht. De resultaten worden in dit artikel samengevat en zijn vergeleken met de internationale consensus voor het testen en rapporteren van ANCA (1999) en de CBO richtlijn Diagnostiek kleine vaten vasculitis (2010). De belangrijkste conclusies naar aanleiding van de resultaten zijn dat de internationale consensus en nationale richtlijnen niet consequent worden toegepast. Echter, tevens kan worden opgemerkt dat door de beschikbaarheid van nieuwe testsystemen de huidige consensus aan vernieuwing toe is.

Trefwoorden: Anti-neutrofiële cytoplasmatische antistoffen, ANCA, immunofluorescentie testen, vasculitis, consensus, richtlijn

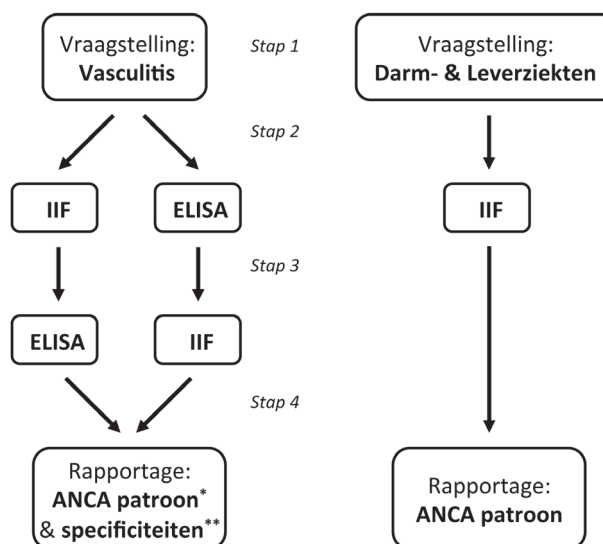
Enkele jaren geleden is de laboratoriumdiagnostiek van anti-nucleaire antistoffen (ANA) en bijbehorende vervolgtesten in Nederland in kaart gebracht met behulp van een vragenlijst. Deze vragenlijst was een initiatief van de Nederlandse afvaardiging van het European Autoimmunity Standardization Initiative (EASI) met medewerking van de Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoria (SKML). Deze studie heeft geleid tot een 15-tal aanbevelingen en heeft daarmee hopelijk bijgedragen aan de nationale harmonisatie van betreffende autoimmundiagnostiek (1). Gegeven de positieve reacties op dit initiatief is er voor gekozen om voor de laboratoriumdiagnostiek van de anti-neutrofiële cytoplasmatische antistoffen (ANCA) een

Afdeling Laboratoriumgeneeskunde, Laboratorium Medische Immunologie, Radboud UMC, Nijmegen¹, Afdeling Laboratoriumgeneeskunde, Universitair Medisch Centrum Groningen, Groningen² en Centraal Diagnostisch Laboratorium, Maastricht Universitair Medisch Centrum, Maastricht³

Correspondentie: Dr. R.G. van der Molen, Afdeling Laboratoriumgeneeskunde, Laboratorium Medische Immunologie, Radboud UMC, Postbus 9105, huispost 469, 6500 HB Nijmegen

E-mail: rene.vandermolen@radboudumc.nl

vergelijkbare aanpak te kiezen. Er is een vragenlijst ontwikkeld over de wijze waarop de ANCA-testen in Nederland worden uitgevoerd. De vragenlijst is, met medewerking van SKML, rondgestuurd naar alle deelnemers van de SKML rondzending 'ANCA-GBM'. De resultaten zijn afgezet tegen de internationale consensus (IC) voor ANCA en de nationale CBO richtlijn (NR) Diagnostiek kleine vaten vasculitis. De internationale consensus is 'eminence-based' tot stand gekomen en betreft de ANCA bepaling zowel tijdens de diagnose als tijdens het vervolgen van patiënten met ANCA-geassocieerde vasculitis (2). In tweede instantie is hieraan een addendum toegevoegd dat de ANCA diagnostiek in andere ziektebeelden behandelt (3). De nationale CBO richtlijn is 'evidence-based', en beperkt zich tot het diagnostische traject van



Figuur 1. Algoritme voor ANCA diagnostiek.

Het algoritme is gebaseerd op een onderscheid in aanvragen in het kader van kleine vaten vasculitis en darm- en leverziekten (stap 1). Voor vasculitis kan de screening uitgevoerd worden met ofwel IIF of antigeen-specifieke testen (ELISA en varianten daarvan) voor MPO- en PR3-ANCA; voor darm- en leverziekten is screening met IIF aangewezen en afdoende (stap 2). Alleen in geval van vasculitis dienen positieve bevindingen opgevolgd te worden met de reciproke test (stap 3). Tenslotte worden de uitslagen gerapporteerd als een IIF patroon (*eventueel titer) en/of ANCA specificiteit (**kwantitatief) (stap 4). IIF testen worden uitgevoerd op EtOH-gefixeerde neutrofiële granulocyten (additionele analyse op formaline-gefixeerde neutrofiële granulocyten en/of op ANA-substraat is optioneel); patronen worden gedefinieerd op basis van de resultaten op EtOH-gefixeerde neutrofiële granulocyten.

Tabel 1. Omschrijvingen van de ANCA patronen volgens de internationale consensus (2)

Patroon	Omschrijving beeld (2)	Interfererende ANA aanwezig*
C-ANCA	Klassiek granulaair cytoplasmatisch beeld met centraal of interlobulair accent	
Atypische c-ANCA	Diffuus vlak cytoplasmatisch beeld zonder interlobulair accent	
P-ANCA	Perinucleaire fluorescentie met of zonder nucleaire uitbreiding; inclusief granulocyt-specifieke ANA	Beeld niet te beoordelen
Atypische ANCA	Alle overige neutrofiel- specifieke of monocyt- specifieke reactiviteit, meestal een combinatie van cytoplasmatische en perinucleaire fluorescentie	Beeld niet te beoordelen

*De IC stelt hierbij: "Alle monsters met P-ANCA of atypische ANCA, samen met een ANA die resulteert in homogene of perifere nucleaire fluorescentie en die dus interfereert met het aflezen van de neutrofiel-IIF, moeten getest worden voor zowel PR3-ANCA als MPO-ANCA, wanneer het gaat om de vraagstelling vasculitis. Monsters met niet-interfererende ANA (bijvoorbeeld nucleolair) kunnen behandeld worden alsof er geen ANA aanwezig is.

kleine vaten vasculitis (4). De resultaten van de enquête zijn teruggekoppeld tijdens een SKML-nabespreking en (inter)nationale symposia en worden in dit artikel samengevat.

De vragenlijst

De vragenlijst (zie bijlage) bestond uit 49 vragen in 5 categorieën: laboratoriumorganisatie (n=5), ANCA immuunfluorescentie (n=16), ANCA specificiteitstesten (n=6), ANCA aanvraag/algorithm (n=16) en het beleid bij cito ANCA aanvragen (n=6). De vragenlijst is in het voorjaar van 2010 verstuurd naar de 53 deelnemers van de SKML-rondzending 'ANCA-GBM'. Deelnemende buitenlandse laboratoria (n=1) en diagnostica bedrijven (n=2) zijn niet geïnccludeerd in de analyse. Van de 50 Nederlandse diagnostische laboratoria zijn 43 ingevulde vragenlijsten ontvangen (respons 86%).

Resultaten

Laboratoriumorganisatie

Acht laboratoria (19%) zijn verbonden aan de Universitair Medische Centra, 31 laboratoria (72%) aan niet-academische ziekenhuizen; 4 laboratoria (9%) behoren tot de categorie overig. ANCA diagnostiek wordt uitgevoerd in 21 klinisch chemische laboratoria (49%), 11 medisch immunologische laboratoria (25%), 4 microbiologische laboratoria (9%) en 7 gecombineerde laboratoria (16%). De eindverantwoordelijke laboratoriumspecialist is veelal een klinisch chemicus (n=20; 46%) of medisch immunoloog (n=18; 42%). Het aantal ANCA aanvragen per week varieert van <5 (n=2; 5%), 5-15 (n=15; 35%), 15-30 (n=16; 37%), 30-50 (n=9; 21%), tot >50 (n=1; 3%).

Indirecte immuunfluorescentie

Zowel de IC als de NR schrijven het gebruik van indirecte immuunfluorescentie (IIF) voor in de ANCA diagnostiek voor kleine vaten vasculitis. Als substraat dient primair gebruik gemaakt te worden van ethanol (EtOH)-gefixeerde neutrofiële granulocyten. Negen laboratoria (21%) volgen deze richtlijn niet: zij voeren geen IIF uit, maar alleen antigeenspecifieke ANCA-testen. Deze 9 laboratoria bevinden zich alle in een

niet-academische setting, waaronder 6 in een klinisch chemisch laboratorium met een klinisch chemicus als eindverantwoordelijke en 3 in een microbiologisch laboratorium (1 in combinatie met een medisch immunologisch laboratorium) met een medisch microbioloog (1) of medisch immunoloog (2) als eindverantwoordelijke. Van alle deelnemers die IIF testen uitvoeren, gebruiken 31 laboratoria (91%) commerciële preparaten; 3 laboratoria (9%) bereiden zelf hun preparaten van neutrofiële granulocyten. Het aflezen van de glaasjes gebeurt in alle laboratoria door tenminste 2 personen en er vindt discussie plaats indien er discrepanties zijn. De gebruikte serumverduunning voor het screenen van ANCA met behulp van IIF varieert van 1/10 (n=5; 15%), 1/16 (n=7; 20%), 1/20 (n=18; 53%) tot 1/40 (n=4; 12%). In de IC en NR worden geen duidelijke uitspraken gedaan over de juiste startverduunning. Uiteraard hangt de optimale verduunning af van het gebruikte antigeensubstraat, het conjugaat en de kwaliteit van de afleesapparatuur. Twintig van de 34 laboratoria (59%) titreren een positieve ANCA. Van de laboratoria die niet titreren, rapporteren 4 laboratoria de fluorescentie-intensiteit. Volgens de IC is titratie overbodig als de fluorescentie specifiek is voor neutrofiële granulocyten. Titratie zou met name nuttig zijn indien er sprake is van mengbeelden, dat wil zeggen atypische ANCA of ANA interferentie, en indien de antigeen-specifieke testen voor myeloperoxidase (MPO)- en proteïnase 3 (PR3)-ANCA negatief zijn (2). In dat laatste geval laat de specificiteit van de IIF test voor ANCA-geassocieerde vasculitis echter te wensen over.

ANCA patronen

De IC onderscheidt 4 ANCA patronen op basis van duidelijke definities: C-ANCA, atypische C-ANCA, P-ANCA en atypische ANCA (zie tabel 1). In de praktijk blijken zelfs ANCA-expertise laboratoria wereldwijd geen gebruik te maken van de term atypische C-ANCA. Dit patroon is derhalve ook niet benoemd in de NR. Gezien de positieve likelihood ratio van het juiste ANCA patroon tezamen met de ANCA specificiteit (5), is het voor de diagnostiek van ANCA-geassocieerde vasculitis belangrijk om te weten of er sprake is van de

Tabel 2. Gebruikte technieken voor het aantonen van MPO- en PR3-ANCA*

	MPO-ANCA	PR3-ANCA
d-ELISA**	8	7
c-ELISA	4	5
a-ELISA	0	1
FEIA	24	23
Blot	3	2
Biochip	1	1
Combinatie	2	3

* Eén laboratorium stuurt bij positieve ANCA IIF de ANCA specificiteitstesten op naar een ander laboratorium.

** Afkortingen: d-ELISA, directe-ELISA; c-ELISA, capture-ELISA; a-ELISA, anchor-ELISA; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FEIA, fluorescent-enzyme immuno-assay; MPO, myeloperoxidase; PR3, proteinase 3.

combinatie C-ANCA/PR3-ANCA, dan wel P-ANCA/MPO-ANCA. Rapportage van de patronen C-ANCA en P-ANCA is daarom aangewezen. Twee van de 34 laboratoria (6%) rapporteren echter geen patronen; de overige laboratoria rapporteren zowel het C-ANCA als het P-ANCA patroon. Een aantal laboratoria definieert echter het P-ANCA patroon als een perinucleaire aankleuring in EtOH-gefixeerde neutrofiële granulocyten in combinatie met een cytoplasmatische, granulaire aankleuring in formaline-gefixeerde granulocyten. Dit is incorrect en niet conform de IC en de NR: beide definiëren een P-ANCA patroon alleen op basis van bevindingen in het EtOH gefixeerde preparaat. Eén-en-twintig van de 34 laboratoria (62%) rapporteren additioneel een atypisch ANCA patroon. De gebruikte definitie voor een atypische ANCA is echter zeer divers, variërend van niet C- of P-ANCA, ANCA negatief op formaline-gefixeerde preparaten, niet MPO- of PR3-ANCA, cytoplasmatische aankleuring zonder het interlobulaire accent (dit is eigenlijk de definitie van een atypische C-ANCA), positieve ANA, of zelfs positieve centromeer aankleuring. De door de IC gehanteerde definitie luidt: alle overige neutrofiel-specifieke aankleuring van EtOH-gefixeerde neutrofiële granulocyten, meestal een combinatie van cytoplasmatische en perinucleaire aankleuring (2). Het is niet correct om dit patroon als ANCA-negatief te rapporteren; bovendien dient ook dit patroon aanleiding te geven tot doortesten voor MPO- en PR3-ANCA. Tenslotte bestaat de mogelijkheid dat aanwezigheid van ANCA niet te beoordelen is met behulp van IIF in verband met interferentie van ANA, inclusief cytoplasmatische fluorescentie. Negen laboratoria (26%) doen geen additionele testen om ANA interferentie vast te stellen. Er zijn wel 4 van de 9 laboratoria die melden bij de uitslag dat een ANA aanwezig kan zijn. De overige laboratoria maken gebruik van een ANA IIF bepaling (n=12; 35%), bij voorkeur in een serum verdunning die ook gebruikt wordt voor de ANCA IIF, en/of van formaline-gefixeerde neutrofiële granulocyten (n=13; 38%) om dit probleem te onderkennen. De meeste ANA reactiviteit is gevoelig voor fixatie met formaline en hierdoor wordt onderliggende ANCA met MPO- en PR3-activiteit zichtbaar als een granulaire

Tabel 3. Gebruikte technieken voor het vervolgen van vasculitis patiënten*

	Geen IIF	Wel IIF
PR3-ANCA** patiënt		
PR3-ANCA	6	7 (2)***
MPO- & PR3-ANCA	10	13 (5)
Geen specificiteitstest		-6 (1)
MPO-ANCA patiënt		
MPO-ANCA	7	6 (1)
MPO- & PR3-ANCA	10	13 (7)
Geen specificiteitstest	-	6 (2)

* Eén laboratorium heeft deze vraag niet beantwoord.

**Afkortingen: ANCA, anti-neutrofiële cytoplasmatische antistof; IIF, indirecte immuunfluorescentie; MPO, myeloperoxidase; PR3, proteinase 3.

*** Tussen haakjes het aantal laboratoria dat wel IIF toepast, maar geen titratie uitvoert.

cytoplasmatisch patroon. Ook indien er sprake is van ANA interferentie dienen vervolgtesten voor MPO- en PR3-ANCA ingezet te worden. Rapportage van de ANCA IIF kan dan volstaan met “niet te beoordelen”.

Detectie van MPO- en PR3-ANCA

In tabel 2 is een overzicht weergegeven van de technieken die worden toegepast binnen de verschillende laboratoria om de ANCA specificiteit te bepalen. Voor het meten van ANCA gericht tegen MPO en PR3 maken de meeste laboratoria gebruik van de ImmunoCAP, cq Phadia250 welke gebaseerd is op de fluorescent-enzym immuno-assay (FEIA) (6). Ten tijde van de enquête was het antigeen in deze methode direct gecoat op de drager. Intussen is de betreffende firma overgestapt op de meer gevoelige anchor-technologie voor zowel MPO- als PR3-ANCA. Het is aannemelijk dat alle FEIA gebruikers eveneens deze overstap hebben gemaakt. De laboratoria die verschillende testen inzetten, gebruiken de combinatie FEIA - capture ELISA of FEIA - immunoblot. In de IC wordt aangegeven dat MPO- en PR3-ANCA met behulp van ELISA bepaald dienen te worden. Men dient zich echter te realiseren dat ten tijde van het formuleren van de IC (1999) er nog geen alternatieve technieken beschikbaar waren. De NR onderkent het bestaan van nieuwe technieken wel en spreekt veelal over antigeen-specifieke testen. Tegenwoordig wordt er vooral onderscheid gemaakt op basis van de wijze waarop het antigeen gekoppeld is aan de drager: bij een directe binding (directe ELISA) spreekt men van 1ste generatie ANCA testen, bij binding via een monoclonale antistof (capture ELISA) spreekt men van 2de generatie ANCA testen, en bij binding via een linker-peptide (anchor-ELISA) spreekt men van 3de generatie ANCA testen. De NR geeft aan dat de 2de generatie testen met name beter zijn in termen van specificiteit; 3de generatie testen zijn niet opgenomen in de NR omdat hierover nog onvoldoende data beschikbaar waren.

Rapportage van MPO- en PR3-ANCA

De IC vermeldt dat uitslagen van de specificiteitstesten tenminste kwantitatief gerapporteerd moeten worden. De meeste laboratoria (n=31; 74%) doen dit ook.

Er zijn 10 laboratoria (24%) die alleen kwalitatieve resultaten doorgeven aan de kliniek. Eén laboratorium maakt in deze onderscheid tussen MPO-ANCA (kwalitatief) en PR3-ANCA (kwantitatief). Er zijn verschillende redenen die ten grondslag kunnen liggen aan de IC om uitslagen kwantitatief te rapporteren. Allereerst is meer recent gebleken dat hoog-positieve uitslagen een hogere positieve likelihood ratio hebben dan laag-positieve uitslagen. Dit geldt voor zowel MPO- als PR3-ANCA (7). Daarnaast biedt een kwantitatieve uitslag de mogelijkheid om de serologie van de patiënt te vervolgen in het kader van therapie effecten op ANCA-spiegels en het voorspellen van een recidief (waarover later meer).

Het test-algoritme

Volgens de IC dient er in de ANCA diagnostiek een screening uitgevoerd te worden met IIF. Positieve resultaten dienen onafhankelijk van het patroon doorgetest te worden voor zowel MPO- als PR3-ANCA (2). Dit algoritme wordt gebruikt door 23 laboratoria (53%). Er zijn echter 4 laboratoria (9%) die antigeen-specifieke testen uitvoeren op geleide van het ANCA IIF patroon (PR3-ANCA worden alleen getest bij een C-ANCA en MPO-ANCA alleen bij een P-ANCA). Het is bekend dat IIF patronen niet altijd de juiste specificiteit voorspellen. Optimaal worden alle sera getest met zowel IIF als antigeen-specifieke testen (2). Deze lijn wordt door 5 laboratoria (12%) gevolgd. Dit laatste verhoogt wel de sensitiviteit, maar gaat ten koste van de specificiteit. Het is juist de combinatie C-ANCA/PR3-ANCA en P-ANCA/MPO-ANCA die de beste testkarakteristieken heeft (5). De NR geeft de vrijheid om in het kader van de diagnostiek van kleine vaten vasculitis te starten met ofwel de IIF ofwel de antigeen-specifieke testen. In beide gevallen dient een positief resultaat gevolgd te worden door de alternatieve test (4). In Nederland zijn er 9 laboratoria (21%) die starten met antigeen-specifieke testen, maar positieve resultaten worden niet doorgetest met IIF.

Vervolgen van vasculitis patiënten met ANCA

Daar waar de NR geen uitspraak doet over het vervolgen/monitoren van ziekte-activiteit van vasculitis patiënten geeft de IC aan dat de antigeen-specifieke testen gebruikt dienen te worden, mits deze ten tijde van de diagnose positief zijn (2). Zoals in tabel 3 is aangegeven, gebruiken de meeste laboratoria combinaties van testen waarbij zowel MPO- als PR3-ANCA bepaald worden, onafhankelijk van de specificiteit vastgesteld tijdens de diagnose, al dan niet in combinatie met IIF. Er zijn 6 laboratoria (14%) waar alleen IIF gebruikt wordt en dit is niet conform de IC. Om therapie effecten te monitoren of eventuele recidieven van ziekte te kunnen ondersteunen dan wel te voorspellen, is het belangrijk dat resultaten kwantitatief gerapporteerd worden. Zoals reeds eerder benoemd, zijn er 10 (24%) en 11 laboratoria (26%) die, respectievelijk PR3- en MPO-ANCA, niet kwantitatief rapporteren. Een recente meta-analyse laat echter zien dat de voorspellende waarde van stijgingen in de ANCA-spiegels, en van het positief blijven van ANCA onder therapie, ten aanzien van een recidief beperkt is (8). Dit wordt

overigens vooral geweten aan de grote heterogeniteit in de betreffende studies waardoor een eventueel verband niet afdoende aan het licht komt.

Sneltesten in de ANCA diagnostiek

In het kader van vasculitis kan een snel (binnen 24 uur) testresultaat klinisch relevant zijn. De belangrijkste klinische indicaties hierbij zijn snel-progressieve glomerulonefritis en pulmonale hemorrhagie. In 35 laboratoria (81%) bestaat de mogelijkheid om binnen 24 uur een testresultaat te verkrijgen, al dan niet na verplichte consultatie. Zeven laboratoria (16%) voeren een eventueel sneltest-verzoek alleen tijdens kantooruren uit en één laboratorium (2%) voert helemaal geen ANCA sneltesten uit. Van de laboratoria die snelle ANCA diagnostiek beschikbaar stellen, gebruiken 20 laboratoria in de spoedsituatie alternatieve testmethoden; 5 van deze laboratoria doen dit alleen buiten reguliere openingstijden. De overige laboratoria gebruiken altijd de reguliere testmethoden. Met uitzondering van één laboratorium worden resultaten verkregen met alternatieve testmethoden later geconfirmeerd met de testen die gebruikt worden in de routine diagnostiek. Detectie van anti-GBM antistoffen (middels verschillende technieken) en van ANCA met behulp van IIF wordt door respectievelijk 27 (62%) en 14 (33%) van de laboratoria standaard uitgevoerd bij een ANCA sneltest verzoek. De NR beveelt de beschikbaarheid van snel-diagnostiek aan in geval van snel-progressieve glomerulonefritis en pulmonale hemorrhagie. Naast detectie van MPO- en PR3-ANCA wordt aanbevolen ook ANCA te bepalen met IIF en tevens anti-GBM antistoffen te meten; indien alternatieve methoden gebruikt worden, dienen verkregen resultaten bevestigd te worden in de reguliere diagnostiek (4).

ANCA diagnostiek voor darm- en leverziekten

ANCA zoals gedetecteerd met IIF komen niet alleen voor bij vasculitis. Met name het P-ANCA patroon is geassocieerd met chronische ontsteking en ANCA zijn derhalve prevalent bij reumatoïde arthritis (RA; 32%), autoimmuun hepatitis (AIH; 40-75%), primaire scleroserende cholangitis (PSC; 25-85%) en colitis ulcerosa (CU; 50-90%) (9). Het zijn dus vooral ziektebeelden die onder het aandachtsgebied van de maag-, darm- en lever (MDL)-artsen vallen. Het P-ANCA patroon is licht afwijkend, dat wil zeggen minder nucleaire extensie van de fluorescentie, van het klassieke P-ANCA patroon zoals dit door MPO-ANCA veroorzaakt wordt; vandaar dat dit patroon in de literatuur ook wel X-ANCA genoemd wordt. De antigenen die ten grondslag liggen aan deze P-ANCA zijn zeer divers en voornamelijk beperkt geïdentificeerd (9). Evident is dat deze P-ANCA niet geassocieerd is met MPO-ANCA. Door gebruik te maken van formale gefixeerde neutrofiële granulocyten kan dit onderkend worden omdat de betreffende antigenen gevoelig zijn voor deze fixatie, resulterend in een negatief resultaat. Van de 34 laboratoria die ANCA bepalingen met IIF uitvoeren, gebruiken 19 laboratoria (56%) naast de EtOH-gefixeerde neutrofielen ook formale-gefixeerde neutrofielen als substraat. Dertien van deze laboratoria doen dit mede in verband met de vraagstelling darm- en leverziekten.

Uit bovenstaande mag duidelijk zijn dat het belangrijk is onderscheid te maken tussen ANCA aanvragen in relatie tot de vraagstelling vasculitis versus aanvragen van MDL-artsen. Voor 31 laboratoria (72%) is duidelijk van welk specialisme een aanvraag afkomstig is. Zes laboratoria bewerkstelligen dit door op het aanvraagformulier de optie P-ANCA aan te bieden. Hoewel de onderliggende bedoeling hiervan goed is, is het merkwaardig om een testuitslag als aanvraag aan te bieden. Immers, het patroon P-ANCA is een resultaat en geen op zichzelf staande test. Negen van de 31 laboratoria (29%) verbinden consequenties aan het onderscheid in aanvraag. In het kader van darm- en leverziekten wordt in 5 laboratoria een positieve ANCA IIF niet opgevolgd met testen voor MPO- en PR3-ANCA. Dit wordt ook gesuggereerd in het addendum van de IC (3). Bovendien dient te worden opgemerkt dat, afhankelijk van de gebruikte techniek, P-ANCA in CU geassocieerd kan zijn met PR3-ANCA (10). Zonder bijbehorende, niet congruente IIF uitslag kan een geïsoleerde PR3-ANCA vanzelfsprekend een eigen leven gaan leiden en vasculitis suggereren. Al met al moet men zich echter wel blijven realiseren dat vasculitis zich ook gastro-enterologisch kan manifesteren. Tenslotte kunnen in het spectrum van darm- en leverziekten niet alleen ANA, maar ook anti-mitochondriën antistoffen (AMA) het aflezen van de ANCA IIF verstoren. AMA zullen in de regel een cytoplasmatische aankleuring geven in de EtOH-gefixeerde neutrofielen; deze aankleuring verdwijnt echter in formaline-gefixeerde neutrofiële granulocyten. Slechts 8 van de 34 laboratoria (24%) blijken hier op te anticiperen door middel van additionele testen. De IC en NR doen hierover geen uitspraak.

Discussie

De ANCA-enquête geeft door de hoge participatie (86%) een goed overzicht van de wijze waarop ANCA in Nederland worden bepaald. Door de tijdsperiode tussen het uitvoeren van de enquête en de publicatie van de data kan vanzelfsprekend een aantal veranderingen doorgevoerd zijn binnen de deelnemende laboratoria. De meest belangrijke verandering is dat de FEIA gebruikers in de loop van 2011 grotendeels overstapt zijn van een 1ste generatie ANCA test naar een 3de generatie ANCA test. Op zich houdt dat een verbetering in van de ANCA diagnostiek in Nederland. Opvallend is wel dat er door ongeveer de helft van de deelnemende laboratoria (49%) afgeweken wordt van de IC en NR. Belangrijke aspecten in deze zijn het niet uitvoeren van IIF, het niet juist benoemen van de ANCA-patronen, en het niet kwantitatief rapporteren van de ANCA uitslagen. Daarnaast is een aantal aspecten in de ANCA diagnostiek onvoldoende belicht in de IC en/of NR. Een voorbeeld hiervan is het belangrijke onderscheid tussen aanvragen in het kader van kleine vaten vasculitis en aanvragen in het kader van darm- en leverziekten.

De IC en de NR zijn zeer eenduidig over het gebruik van IIF in de ANCA diagnostiek. Desalniettemin zijn er 9 laboratoria die deze methode niet gebruiken naast de antigeen-specifieke testen. Na de introductie van 3de generatie ANCA testen op de ImmunoCAP, cq

Phadia250 is dit aantal zelfs verdubbeld, blijkt uit de inzendingen bij de rondzending SKML-ANCA-GBM voorjaar 2013. Als argument wordt vaak gebruikt dat de toegenomen sensitiviteit van de nieuwe generatie testen IIF overbodig maakt. Dit argument wordt echter niet onderbouwd door de literatuur. Wel is het zo dat de sensitiviteit van 2de en 3de generatie testen hoger is voor PR3-ANCA dan die van de 1ste generatie testen (11-13). Voor MPO-ANCA zijn de verschillen tussen de test-methodieken minder eenduidig (14, 15). Er is voornamelijk slechts één studie die de toegevoegde waarde van IIF ter discussie heeft gesteld (16). Het betreft een relatief kleine studie met 38 diagnostische sera van ANCA-geassocieerde vasculitis patiënten en 288 ziekte-controles. De resultaten tonen aan dat het voor kleine vaten vasculitis niet uitmaakt of screening plaatsvindt met IIF dan wel met antigeen-specifieke testen. Daarnaast blijkt dat IIF weinig toegevoegde waarde heeft bij patiënten met een hoge pre-test waarschijnlijkheid op de ziekte. Dit is een argument om, in tegenstelling tot het gestelde in de NR, geen IIF uit te voeren bij een aanvraag voor een sneltest. IIF draagt echter wel bij aan een betere diagnose bij patiënten met een lage pre-test waarschijnlijkheid. Aangezien deze studie is uitgevoerd met 1ste generatie ANCA testen blijft de vraag onbeantwoord of bij gebruik van 3de generatie ANCA testen IIF achterwege kan blijven. Deze suggestie wordt overigens wel gewekt in studies met 3de generatie PR3-ANCA testen. Deze studies laten immers een hogere sensitiviteit zien vooral bij patiënten met mildere klinische manifestaties (12, 13). De reden die vaak aangevoerd wordt om af te zien van IIF is dat het bewerkelijk is en expertise vergt die niet voorhanden is. Door de diagnostica industrie wordt het belang van IIF technieken echter onderkend en dit uit zich in de ontwikkeling van verregaande automatisering op dit gebied. Naast pipetteerautomaten behoort eveneens automatische patroonherkenning tot de mogelijkheden. Hoewel dit voor de ANCA patronen nog in de kinderschoenen staat (17), is dit een veelbelovende ontwikkeling die de logistieke problemen rond IIF kunnen oplossen. Onafhankelijk van de discussie over de rol van IIF in de diagnostiek van kleine vaten vasculitis, speelt IIF immers voornamelijk een blijvende rol in de diagnostiek bij darm- en leverziekten.

Al met al is het duidelijk dat er behoefte is aan een nieuwe internationale consensus over ANCA diagnostiek. Om voldoende onderbouwing hiervoor te hebben, is recent in Europees verband een multicenter studie gestart. In deze studie worden veel van de momenteel beschikbare ANCA testen gebruikt en kan op basis van beslisboom-analyse bekeken worden welk test-algoritme het meest optimaal is. In afwachting van de studieresultaten en de nieuwe consensus adviseren de auteurs het test-algoritme zoals uitgewerkt in figuur 1. De auteurs raden alle laboratoria ten zeerste aan om, tot de nieuwe consensus beschikbaar is, in de ANCA diagnostiek niet af te wijken van de momenteel geldende internationale en nationale richtlijnen. Voorlopig zijn die richtlijnen "the best we have"!

Referenties

1. Damoiseaux J, Bakker-Jonges L, Cohen Tervaert JW, Derksen R, Hooijkaas H, Kallenberg C, Klasen I, Limburg P, Smeenk R, Hamann D. Laboratoriumdiagnostiek van ANA, anti-ds-DNA- en anti-ENA-antistoffen: aanbevelingen naar aanleiding van een enquête. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2010; 35: 234-239.
2. Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, Hagen EC, Jayne D, Jennette JC, Paspaliaris B, Pollock W, Pusey C, Savage COS, Silvestrini R, Van der Woude F, Wieslander J, Wiik A. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 507-513.
3. Savige J, Dimech W, Fritzler M, Goeken J, Hagen EC, Jennette JC, McEvoy R, Pusey C, Pollock W, Trevisin M, Wiik A, Wong R. Addendum to the international consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 312-318.
4. CBO-richtlijn: diagnostiek kleine vaten vasculitis. Alphen aan den Rijn, The Netherlands: Van Zuiden Communications; 2010.
5. Choi HK, Liu S, Merkel PA, Colditz GA, Niles JL. Diagnostic performance of antineutrophil cytoplasmic antibody tests for idiopathic vasculitides: metaanalysis with a focus on antimyeloperoxidase antibodies. *J Rheumatol* 2001; 28: 1584-1590.
6. Damoiseaux J, Slot MC, Vaessen M, Stegeman CA, van Paassen P, Cohen Tervaert JW. Evaluation of a new fluorescent-enzyme immuno-assay for diagnosis and follow-up of ANCA-associated vasculitis. *J Clin Immunol* 2005; 25: 202-208.
7. Vermeersch P, Blockmans D, Bossuyt X. Use of likelihood ratio's can improve the clinical usefulness of enzyme immunoassays for the diagnosis of small-vessel vasculitis. *Clin Chem* 2009; 55: 1886-1888.
8. Tomasson G, Grayson PC, Mahr AD, LaValley M, Merkel AP. Value of ANCA measurements during remission to predict a relapse of ANCA-associated vasculitis - a meta-analysis. *Rheumatol* 2012; 51: 100-109.
9. Roozendaal C, Kallenberg CG. Anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies (ANCA) in autoimmune liver diseases. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 3034-3040.
10. Mahler M, Bogdanos DP, Pavlidis P, Fritzler MJ, Csernok E, Damoiseaux J, Bentow C, Shums Z, Forbes A, Norman GL. PR3-ANCA: a promising biomarker for ulcerative colitis with extensive disease. *Clin Chim Acta* 2013; in press.
11. Csernok E, Holle J, Hellmich B, Cohen Tervaert JW, Kallenberg CG, Limburg PC, Niles J, Pan G, Specks U, Westman K, Wieslander J, de Groot K, Gross WL. Evaluation of capture ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: first results from a multicentre study. *Rheumatol* 2004; 43: 174-180.
12. Hellmich B, Csernok E, Fredenhagen G, Gross WL. A novel high sensitivity ELISA for detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies against proteinase-3. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25: S1-S5.
13. Damoiseaux J, Dährnich C, Rosemann A, Probst C, Komorowski L, Stegeman CA, Egerer K, Hiepe F, Van Paassen P, Stöcker W, Schlumberger W, Cohen Tervaert JW. A novel enzyme-linked immunosorbent assay using a mixture of human native and recombinant proteinase-3 significantly improves the diagnostic potential for antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 228-233.
14. Holle JU, Herrmann K, Gross WL, Csernok E. Comparative analysis of different commercial ELISA systems for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies in ANCA-associated vasculitides. *Clin Exp Reumat* 2012; 30: S66-S69.
15. Radice A, Bianchi L, Sinico RA. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: methodological aspects and clinical significance in systemic vasculitis. *Autoimmun Rev* 2013; 12: 487-495.
16. Vermeersch P, Vervaeke S, Blockmans D, Van Hoovels L, Mariën G, Vanmaele H, Bossuyt X. Determination of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in small vessel vasculitis: comparative analysis of different strategies. *Clin Chim Acta* 2008; 397: 77-81.
17. Damoiseaux J, Mallet K, Vaessen M, Austen J, Cohen Tervaert JW. Automatic reading of ANCA-slides: evaluation of the AKLIDES system. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 762874.

Summary

Van der Molen RG, Roozendaal C, Damoiseaux JGMC. ANCA diagnostics: daily practice in the Netherlands in relation to the international consensus and national guidelines. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk. 2014; 39: 19-24

To gain insight in the laboratory diagnostics performed in the Netherlands for anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA), a questionnaire was sent to all Dutch diagnostic laboratories (n=50) who participate in the Dutch quality assessment (SKML) ANCA-GBM program. Due to the high response (86%), the Dutch situation has been very well documented. The results are summarized in this paper and compared to the International Consensus Statement on Testing and Reporting of ANCA (1999) and the Dutch CBO guidelines on small vessel vasculitis (2010). Major conclusions resulting from the questionnaire are that international and national guidelines are not consequently applied by all labs. However, it should be noted that with the development of new test systems, current guidelines need revision.

Keywords: Anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA, immunofluorescence testing, vasculitis, consensus, guidelines