

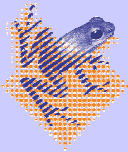
Nabespreking rondzendingen SKML ANCA-GBM

Dr Caroline Roozendaal
medisch immunoloog UMCG

Rotterdam, 4 april 2012

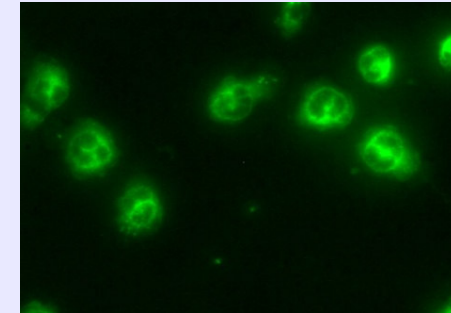
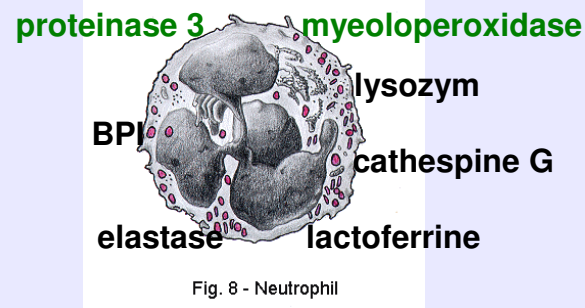
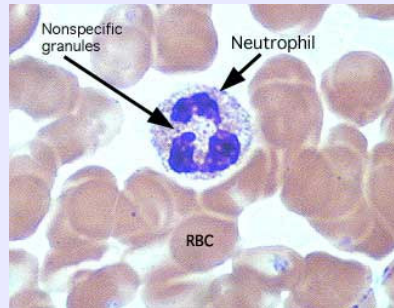
c.roozendaal@umcg.nl





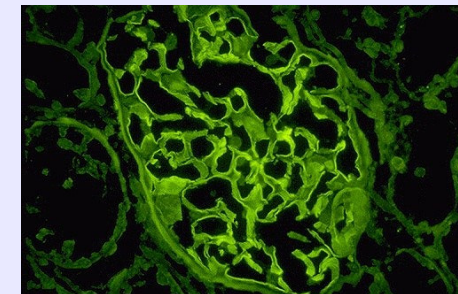
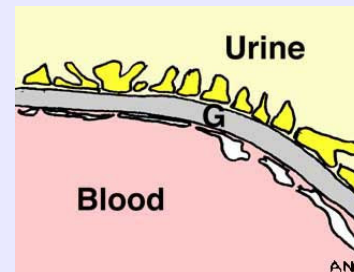
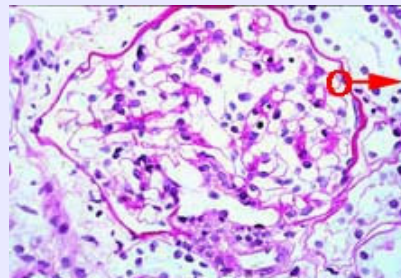
ANCA:

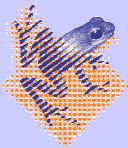
anti-neutrofiel cytoplasma-autoantistoffen



GBM:

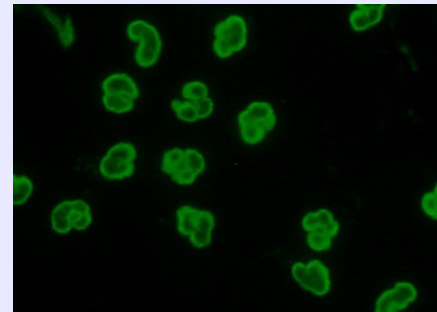
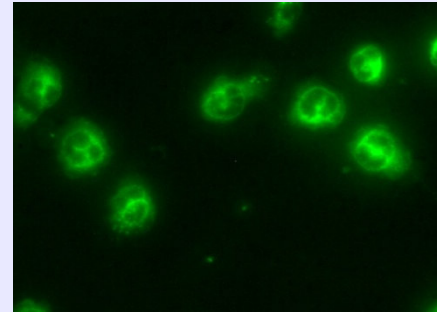
anti-glomerulaire basaalmembraan



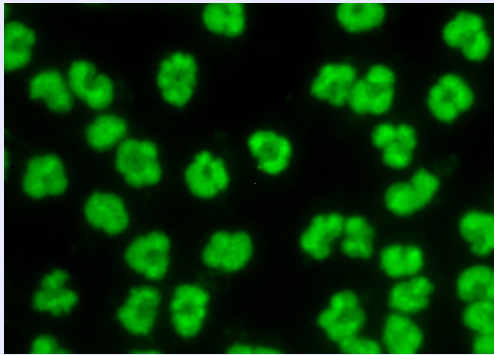
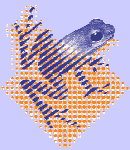


Drie verschillende ANCA-fluorescentiepatronen:

- C-ANCA (classical ANCA):
cytoplasma-fluorescentie
met accent tussen de kernlobben
- P-ANCA (perinuclear ANCA):
fluorescentie rondom de kern,
vaak ook op de kern
NB fixatie-artefact!
- atypische ANCA
alle overige patronen

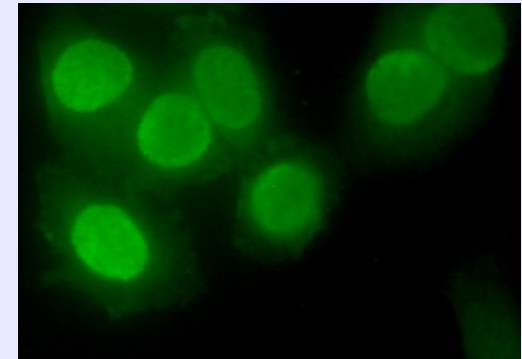


Kwantitatieve uitslag: titer



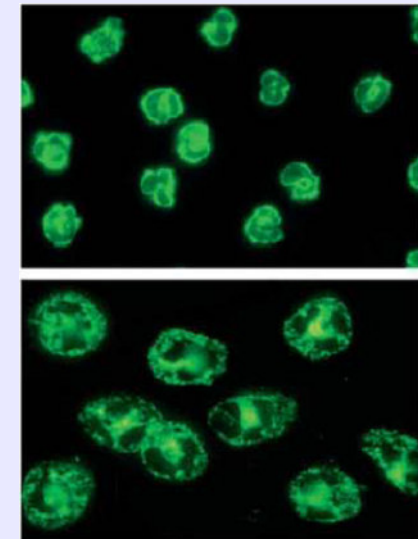
granuloctyes:
vals-positieve pANCA

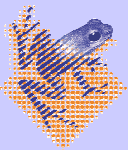
HEp2000-cellen:
homogene ANA



ANA kunnen een vals-positieve ANCA-uitslag geven:

- alle P-ANCA en A-ANCA sera van NIEUWE patiënten testen op ANA
 - ANA-bepaling (bv op HEp2 cellen)
 - granuloctyes gefixeerd met formaline





ANCA-specificiteitsbepaling:

ELISA / FEIA / immunoblot

anti-proteinase 3 (PR3)

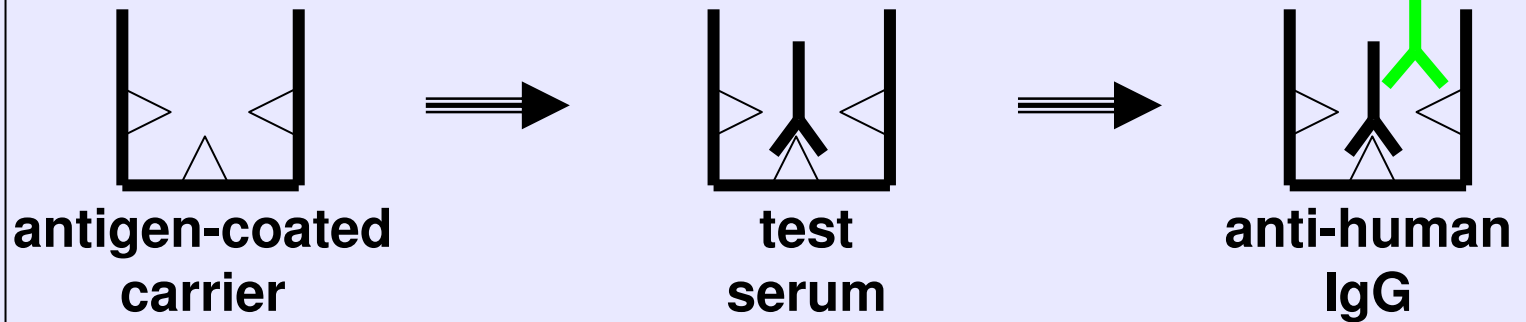
anti-myeloperoxidase (MPO)

(andere antigenen)

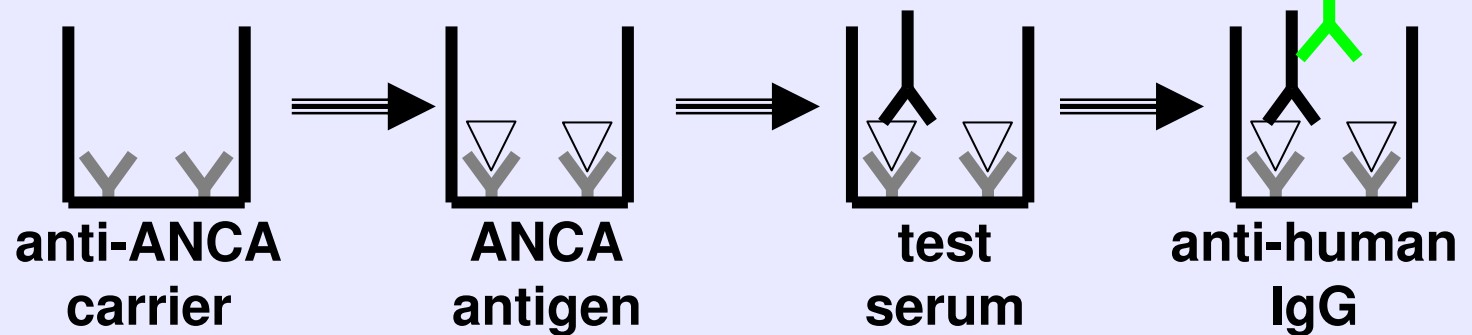
Directe versus capture / anchor systemen



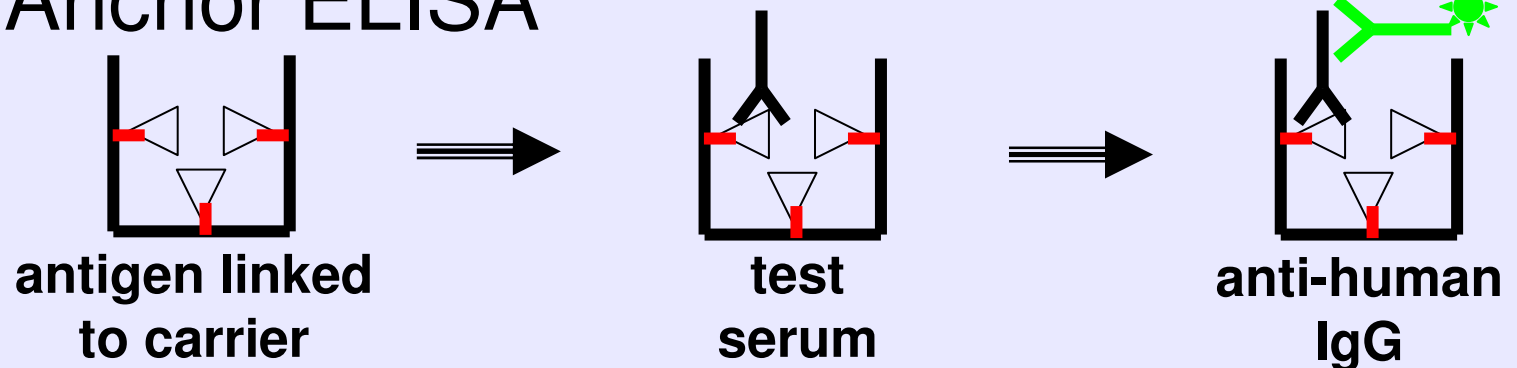
Direct ELISA

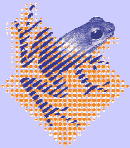


Capture ELISA



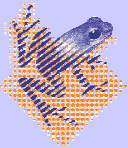
Anchor ELISA





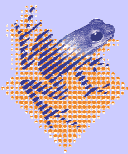
Opzet rondzending ANCA-GBM

- **Materiaal:**
 - Plasmaferesemateriaal van patiënten met ANCA-geassocieerde vasculitis of Goodpasture
- **Frequentie:**
 - 2x per jaar 9 monsters (maart en september)
- **Wijze van versturen:**
 - Per post vanuit Groningen, kamertemperatuur
- **Resultaatverwerking en rapportage:**
 - SKML QBase
- **Vragen:**
 - Inhoudelijk Caroline Roozendaal
 - Technisch en rapportage SKML-bureau

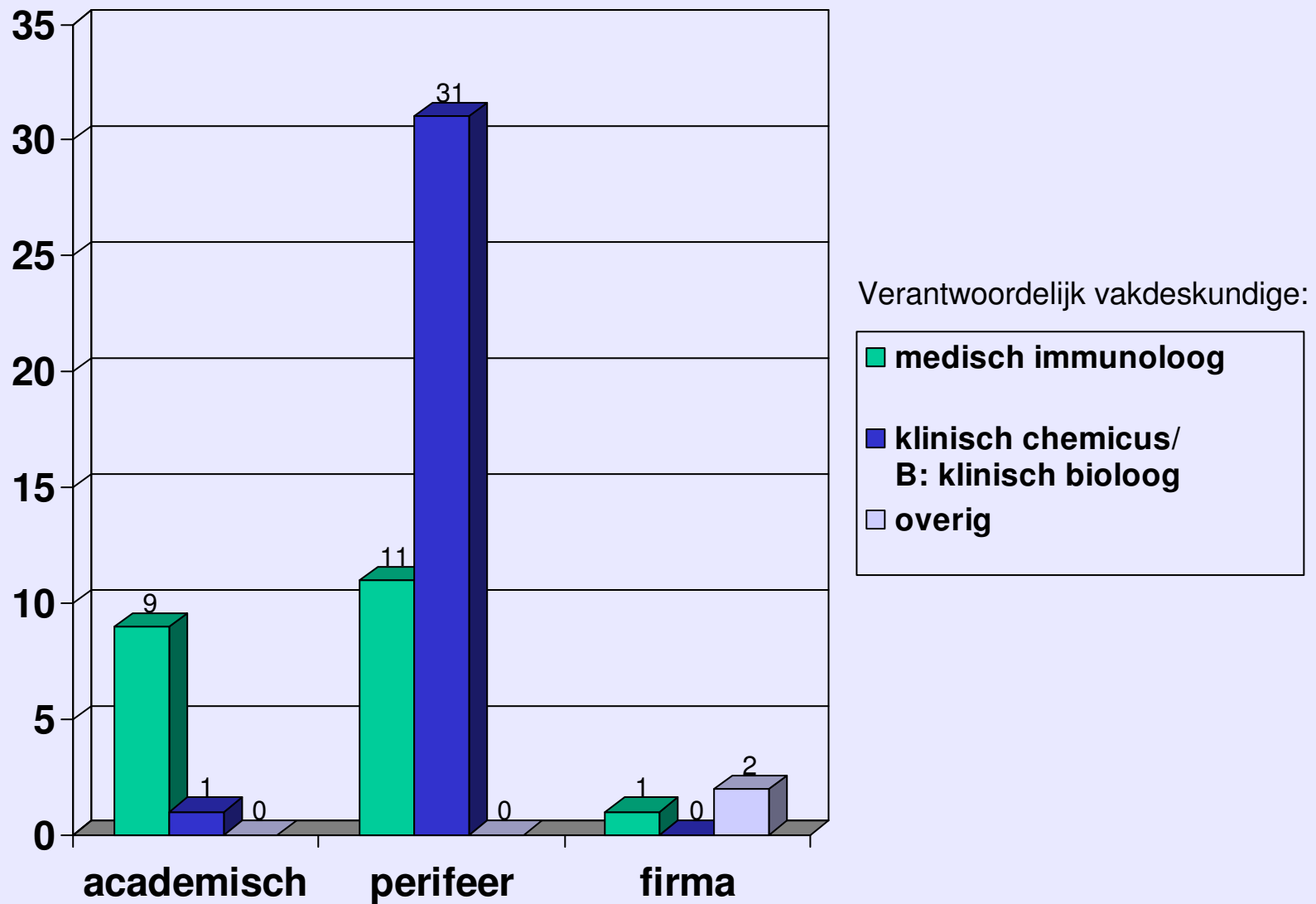


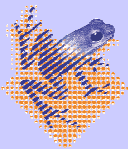
Gevraagde resultaten

- ANCA immuunfluorescentie, volgens de in uw laboratorium gebruikelijke techniek(en)
 - patroon op ethanol gefixeerde granulocyten
 - controle op aanwezigheid ANA: ANA-test, formaline-fixatie
 - conclusie (uw uitslag naar de kliniek): patroon + titer
- Anti-PR3 en anti-MPO specificiteitstesten, volgens de in uw laboratorium gebruikelijke techniek(en)
 - kwalitatief (pos/neg),
en indien van toepassing kwantitatief (in uw eigen eenheden)
- Anti-GBM, volgens de in uw laboratorium gebruikelijke techniek(en)
 - kwalitatief (pos/neg),
en indien van toepassing kwantitatief (in uw eigen eenheden)



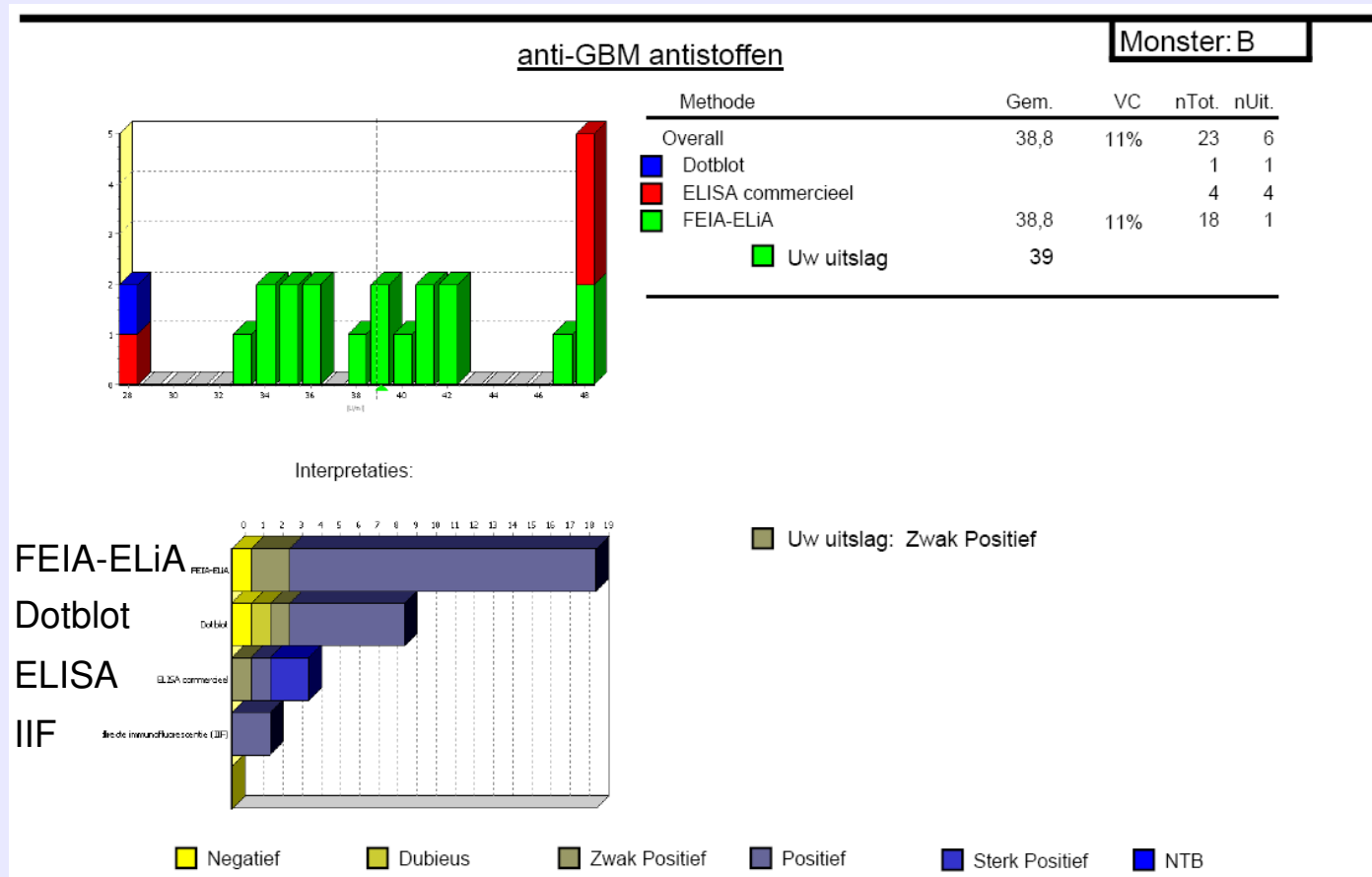
Deelnemers SKML ANCA-GBM rondzending (n=55)

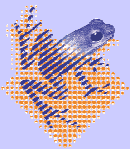




Anti-GBM: Resultaten

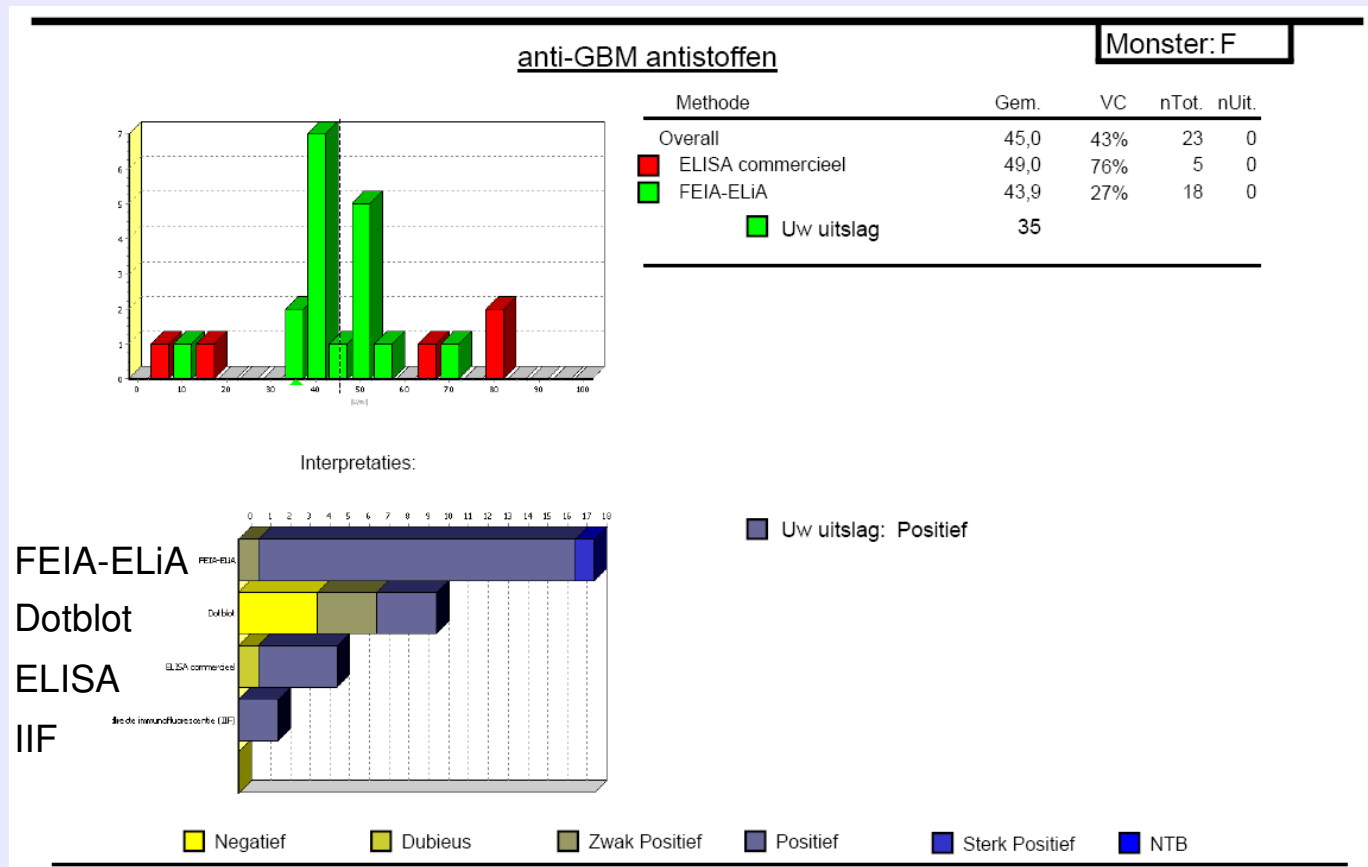
- 2010-2011:
 - 11 anti-GBM monsters:
 - 9 unaniem positief (FEIA VC 9-18%);
 - 2 monsters zwakker: 2010.2B en 2011.1F

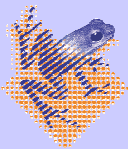




Anti-GBM: Resultaten

- 2010-2011:
 - 11 anti-GBM monsters:
 - 9 unaniem positief (FEIA VC 9-18%);
 - 2 monsters zwakker: 2010.2B en 2011.1F (10 dgn na start plasmaferese)

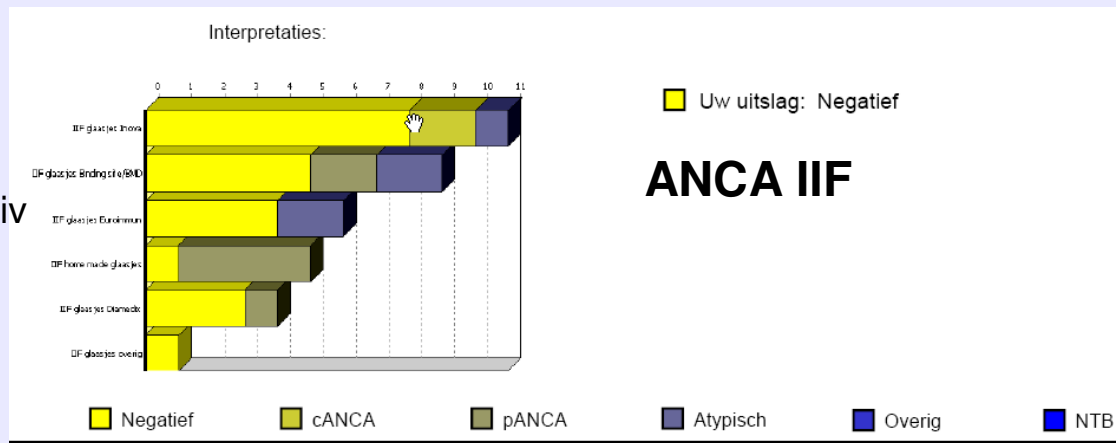




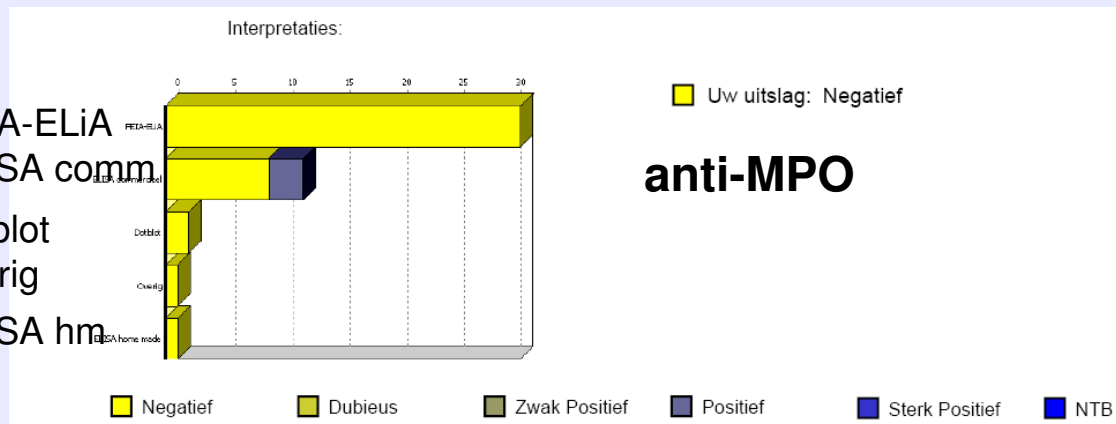
Anti-GBM: Resultaten

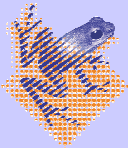
NB Anti-GBM en ANCA kunnen samen voorkomen!
Voorbeeld: monster 2010.2D:

glaasjes div



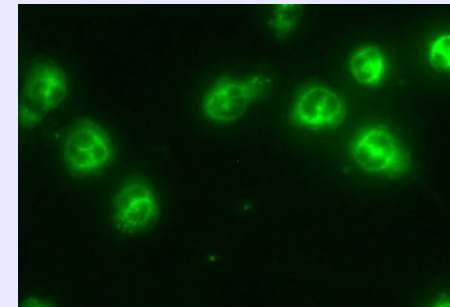
FEIA-ELiA
ELISA comm
dotblot
overig
ELISA hm

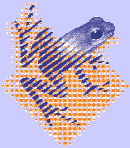




ANCA-IIF: Methoden

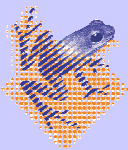
- Ethanol-gefixeerde granulocyten van verschillende producenten:
 - 12x Binding Site
 - 12x INOVA
 - 5x Euroimmun (Mosaic/BioCHIP)
 - 3x Diamedix
 - 1x BioRAD
 - 5x home made
- M.i.v. 2011.2 ook ANA en formaline:
 - 12x ethanol
 - 10x ethanol + ANA + formaline
 - 6x ethanol + ANA
 - 5x ethanol + formaline





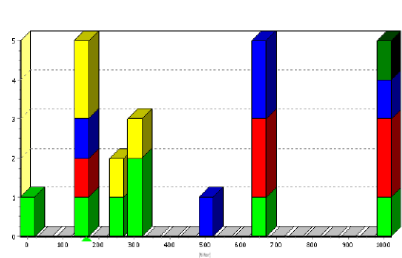
ANCA-IIF: Resultaten

- Geen duidelijke verschillen tussen de verschillende glaasjesproducenten
- Anti-PR3 positieve monsters geven vrijwel altijd een cANCA
- Anti-MPO positieve monsters: fluorescentiepatroon veel meer variabel, vaak in hetzelfde monster alle soorten patronen gezien



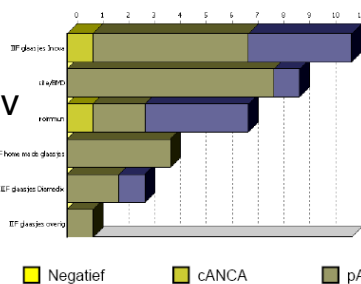
Monster : H
Materiaal :

ANCA IIF



Methode	Gem.	VC	nTot.	nUit.
Overall	420,8	70%	19	0
IIF glaasjes Binding site/BMD	480,0		4	0
IIF glaasjes Euroimmun	692,8	51%	5	0
IIF glaasjes Inova	286,0	73%	6	0
IIF home made glaasjes	224,0		4	0
Uw uitslag	160			

Interpretaties:

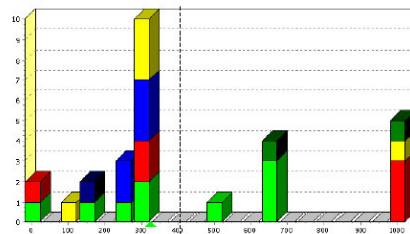


Uw uitslag: pANCA

2010.1H

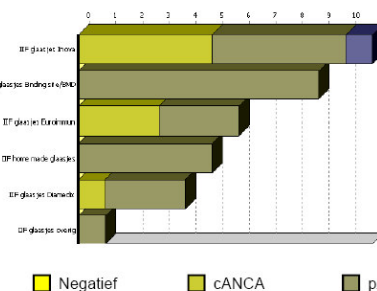
2010.1H = 2010.2F !

ANCA IIF



Methode	Gem.	VC	nTot.	nUit.
Overall	326,1	56%	25	2
IIF glaasjes Binding site/BMD	220,0		4	1
IIF glaasjes Diamedix	640,0		1	0
IIF glaasjes Euroimmun	265,0	42%	5	1
IIF glaasjes Inova	389,8	59%	9	0
IIF glaasjes overig	160,0		1	0
IIF home made glaasjes	294,4	12%	5	0
Uw uitslag	320			

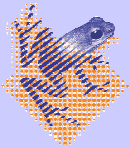
Interpretaties:



Uw uitslag: pANCA

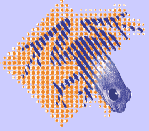
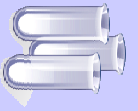
glaasjes div

2010.2F



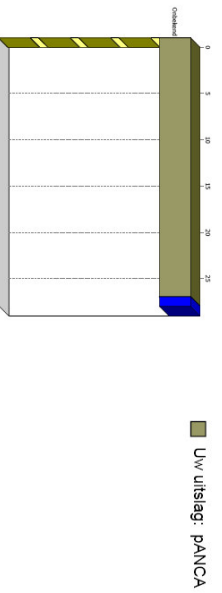
ANCA-IIF: Resultaten

- Geen duidelijke verschillen tussen de verschillende glaszjesproducenten
- Anti-PR3 positieve monsters geven vrijwel altijd een cANCA
- Anti-MPO positieve monsters: fluorescentiepatroon veel meer variabel, vaak in hetzelfde monster alle soorten patronen gezien
- Naast ethanol ook rapportage ANA, formaline en overall conclusie ANCA-IIF incl titer: nog niet door iedereen correct ingevuld



ANCA IIF (ethanol gefixeerd)

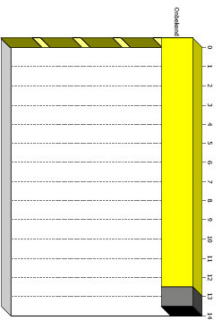
Interpretaties:



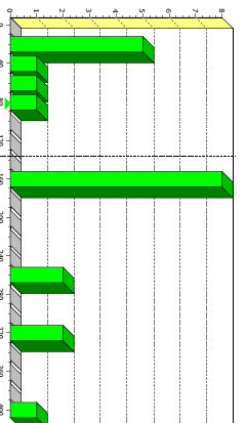
- Negatief
- CANCA
- PANCA
- Atypisch
- Overig
- NTB

ANCA IIF (formaline gefixeerd)

Interpretaties:



- CANCA
- ANA
- Negatief
- NTB
- NV



Interpretaties:

Uw uitslag: NTB

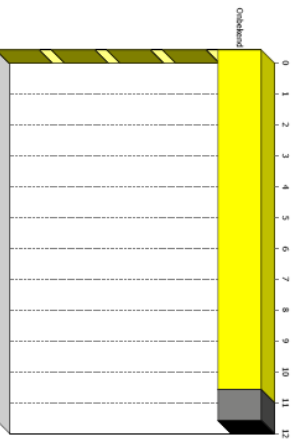
ANCA IIF conclusie

Methode	Gem.	VC	nTot.	nUit.
Overige methodes	135	74%	21	1
Uw uitslag	80			

2011.2G

ANA IIF interfererend met ANCA

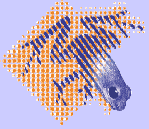
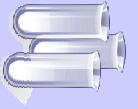
Interpretaties:



- Positief
- Negatief
- NV

Uw uitsla

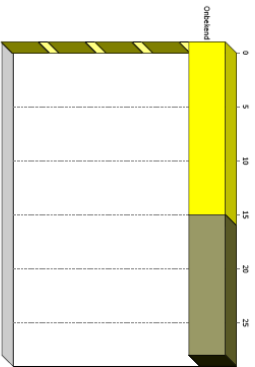
- Negatief
- CANCA
- PANCA
- Atypisch
- Overig
- NTB



ANCA IIF (ethanol gefixeerd)

Interpretaties:

Uw uitslag: Negatief

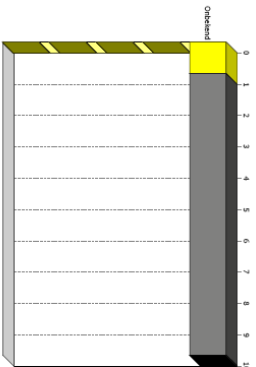


- Negatief
- CANCA
- PANCA
- Atypisch
- Overig
- NTB

ANCA IIF (formaline gefixeerd)

Interpretaties:

Uw uitslag: Negatief

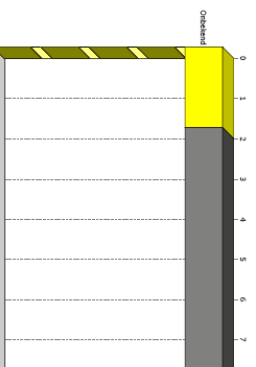


- CANCA
- ANA
- Negatief
- NTB
- NV

ANA IIF interfererend met ANCA

Interpretaties:

Uw uitslag: Negatief



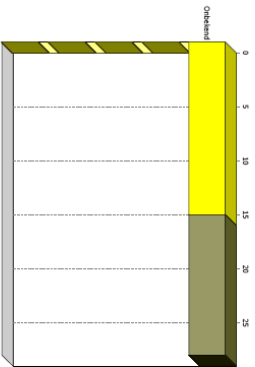
- Positief
- Negatief
- NV

2011.2F

ANCA IIF (ethanol gefixeerd)

Interpretaties:

Uw uitslag: Negatief

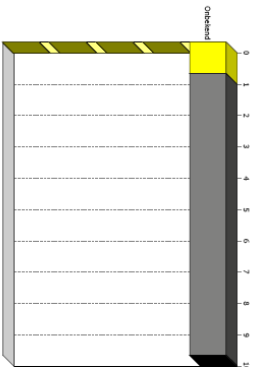


- Negatief
- CANCA
- PANCA
- Atypisch
- Overig
- NTB

ANCA IIF (formaline gefixeerd)

Interpretaties:

Uw uitslag: Negatief

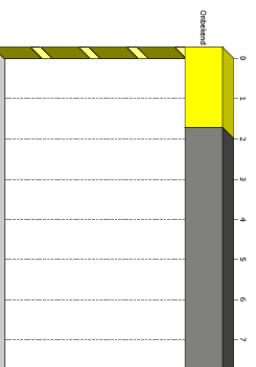


- CANCA
- ANA
- Negatief
- NTB
- NV

ANA IIF interfererend met ANCA

Interpretaties:

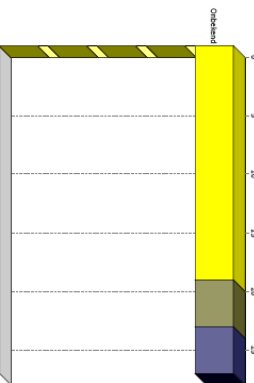
Uw uitslag: Negatief



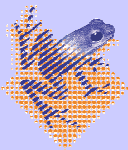
- Positief
- Negatief
- NV

ANCA IIF conclusie

Uw uitslag: Negatief

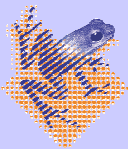


- Negatief
- CANCA
- PANCA
- Atypisch
- Overig
- NTB



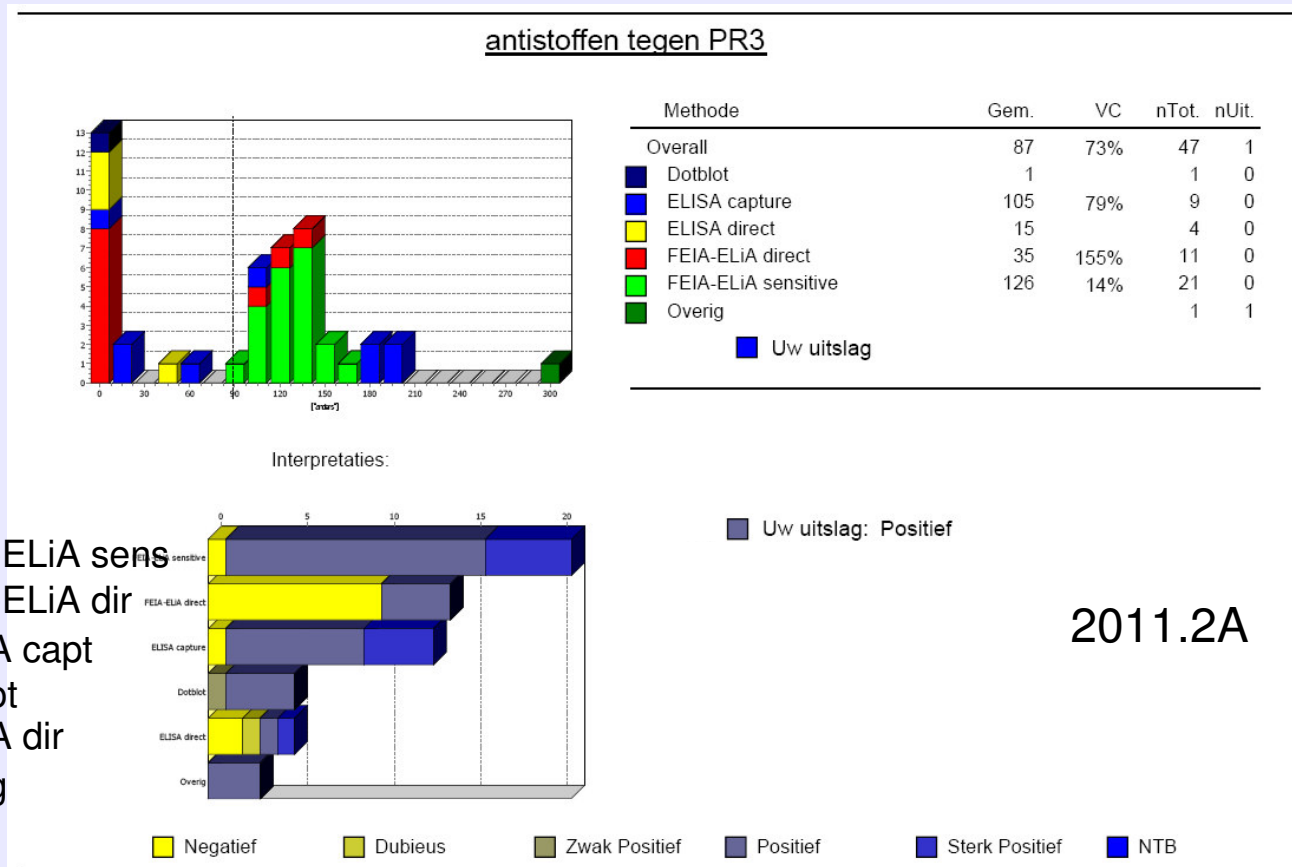
Anti-PR3 en anti-MPO: Methoden

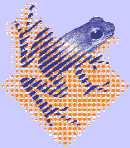
- FEIA n=35:
 - 24 anchor / high sensitive testen (NB eenheid IU/ml)
 - 11 direct gecoatete testen (niet iedereen rapporteert kwantitatief)
 - NB Niet iedereen heeft de juiste soort test ingevuld!



Anti-PR3 en anti-MPO: Methoden

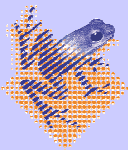
- FEIA n=35:
 - 24 anchor / high sensitive testen (NB eenheid IU/ml)
 - 11 direct gecoatete testen (niet iedereen rapporteert kwantitatief)
 - NB Niet iedereen heeft de juiste soort test ingevuld!





Anti-PR3 en anti-MPO: Methoden

- FEIA n=35
Thermo Fisher Scientific / Phadia / ImmunoCAP / UniCAP
 - n=24 anchor / high sensitive testen (NB eenheid IU/ml)
 - n=11 direct gecoatete testen (niet iedereen rapporteert kwantitatief)
- Capture ELISA n=10
Eurodiagnostica, Euroimmun, Menarini, INOVA,
PR3: Orgentec Alegria, home made
- Directe ELISA n=6
Eurodiagnostica, Hycor, MPO: Orgentec Alegria,
“Euroimmun analyzer van BMD”
- Dotblot n=7 BMD, Binding Site, Alphadia
- NB alleen kwalitatief! Géén kwantitatieve uitslag invullen, ook niet pos=1!
- Overig n=3
Euroimmun IF-spot, Alegria



Anti-PR3 en anti-MPO: Resultaten

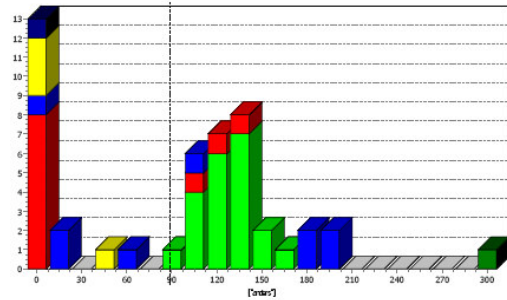
- De meeste testen pikken de meeste monsters wel op; soms een grenswaarde-discussie en een enkele misser
- De FEIA anchor testen pikken meer monsters op dan de FEIA directe testen



Anti-PR3 en anti-MPO: Resultaten

2011.2A

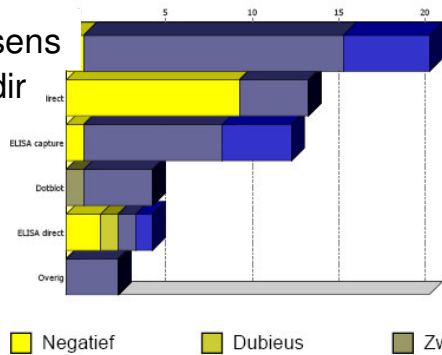
antistoffen tegen PR3



Methode	Gem.	VC	nTot.	nUit.
Overall	87	73%	47	1
Dotblot	1		1	0
ELISA capture	105	79%	9	0
ELISA direct	15		4	0
FEIA-ELiA direct	35	155%	11	0
FEIA-ELiA sensitive	126	14%	21	0
Overig			1	1

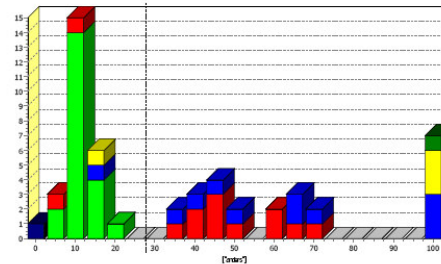
Interpretaties:

FEIA-ELiA sens
FEIA-ELiA dir
ELISA capt
dotblot
ELISA dir
overig



■ Negatief ■ Dubieus ■ Zwak Positief

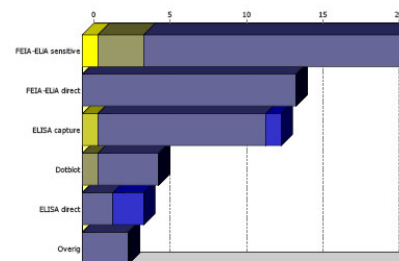
antistoffen tegen PR3



Methode	Gem.	VC	nTot.	nUit.
Overall	27	80%	51	7
Dotblot	1		1	0
ELISA capture	48	39%	11	3
ELISA direct	14		4	3
FEIA-ELiA direct	44	42%	13	0
FEIA-ELiA sensitive	11	23%	21	0
Overig			1	1

■ Uw uitslag

Interpretaties:

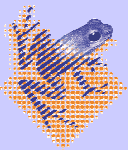


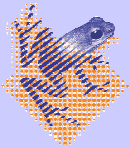
■ Uw uitslag: Positief

■ Negatief ■ Dubieus ■ Zwak Positief ■ Positief ■ Sterk Positief ■ NTB

2011.2H

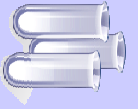
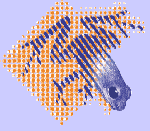
UMCC





Anti-PR3 en anti-MPO: Resultaten

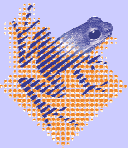
- De meeste testen pikken de meeste monsters wel op; soms een grenswaarde-discussie en een enkele misser
- De FEIA anchor testen pikken meer monsters op dan de FEIA directe testen
- Eén ELISA geeft regelmatig vals-positieve anti-PR3 (overigens alleen naast terecht positieve anti-MPO, personal comm)
- NB Veel clerical errors!
(verwisselingen, komma's verkeerd, getal goed maar interpretatie verkeerd...)



- We doen het goed...



Conclusie



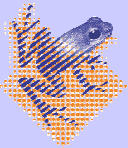
Conclusie

- We doen het goed...



- ... maar doen we het ook zoals het moet?





Géén ANCA-GBM rondzending zonder...



Grytsje Zandstra-Koning

Marieke Bruggeman-van der Grift

en alle andere analisten en medewerkers
van het Laboratorium Klinische Immunologie
in het UMCG!