

Laboratoriumdiagnostiek van ANCA: dagelijkse praktijk in Nederland

Renate van der Molen
Medisch Immunoloog

*Afdeling Laboratoriumgeneeskunde
Laboratorium Medische Immunologie
Universitair Medisch Centrum St Radboud
Nijmegen*

Doelstellingen

- Verbetering communicatie tussen klinici en laboratoriumspecialisten
- Standaardisatie van methodologie, testen en interpretatie van resultaten
- Harmonisatie van testalgoritmen



EASiTM
*European Autoimmunity
Standardisation Initiative*

Shoenfeld et al.
ANYAS 1109: 138-144 (2007)

Damoiseaux et al.
ANYAS 1173: 10-14 (2009)

Respons

Vragenlijst rondgestuurd aan alle deelnemers van de SKML “ANCA-GBM” rondzending (53 laboratoria)

- Nederlandse diagnostische laboratoria (n=50)
- Buitenlandse laboratoria (n=1)
- Bedrijven (n=2)

Respons:

43 vragenlijsten terug gestuurd van de Nederlandse diagnostische laboratoria (=86%)

Vragenlijst



- Categorieën:

1. Organisatie (n=5)
2. ANCA immunofluorescentie (n=16)
3. ANCA specificiteits testen (n=6)
4. ANCA aanvraag/algorithme (n=16)
5. ANCA cito aanvraag (n=6)

Focus

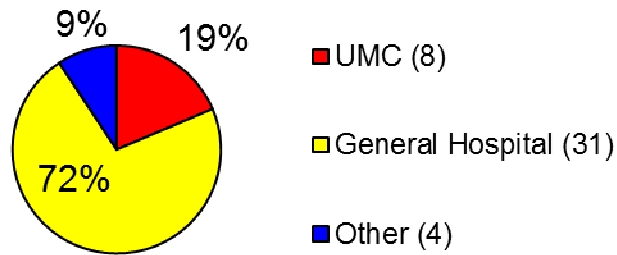
- ANCA-geassocieerde vasculitiden
 - Granulomatose met polyangiitis (Wegener Granulomatose)
 - Microscopische Polyangiitis
 - Churg-Strauss syndroom

NB → ANCA diagnostiek kan ook toegepast worden in de diagnostiek van inflammatoire darmziekten en andere niet-vasculitis ANCA geassocieerde Autoimmuunziekten

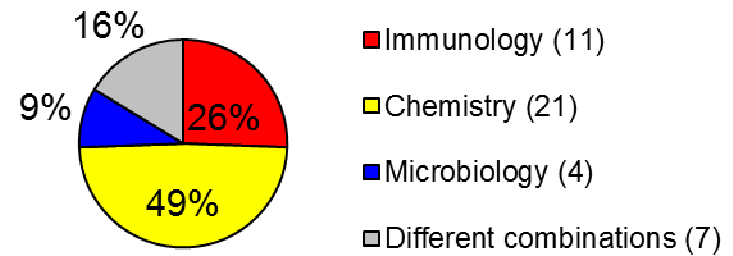
- Colitis Ulcerosa (50-70%)
- Autoimmune hepatitis type I (90%)
- Reuma (30%)

Organisatie

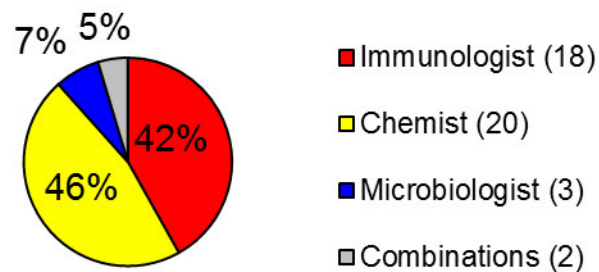
Organisation



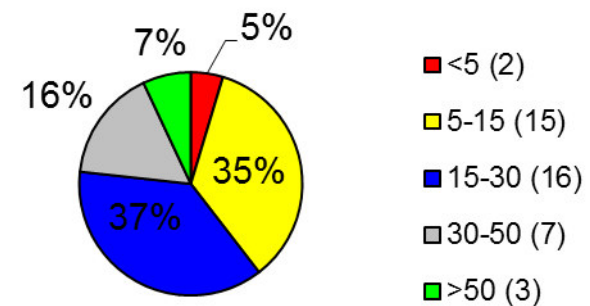
Laboratory type



Laboratory specialist



Number of ANCA requests (weekly)



Antwoorden van de vragenlijst zijn getoetst aan de internationale consensus en de CBO richtlijn

- Savige *et al.* (1999) Am J Clin Pathol 111: 507-13
- CBO Richtlijn Diagnostiek Kleinevatenvasculitis, Juli 2010



ANCA consensus

Immuunfluorescentie

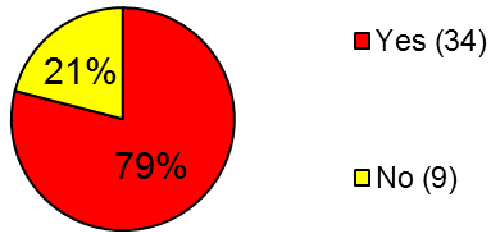
- IFT bij voorkeur voor alle nieuwe patiënten uitgevoerd (1,2)
- In-house gemaakte glaasjes zouden moeten bestaan uit cellen geïsoleerd van een buffycoat omdat deze zowel neutrofielen als lymfocyten bevatten, commerciële glaasjes mogen ook gebruikt worden (1)

1 Savige et al. (1999)
Am J Clin Pathol 111: 507-13

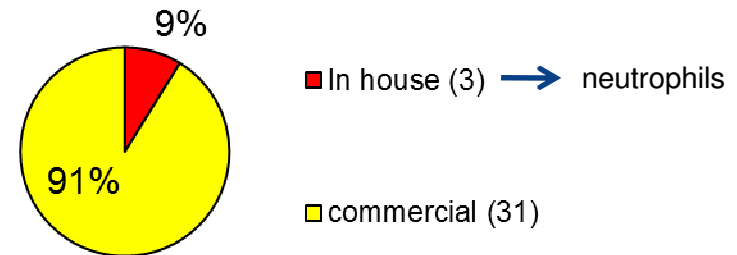
2 CBO Richtlijn Diagnostiek
Kleinevatenvasculitis, Juli
2010

ANCA immuunfluorescentie

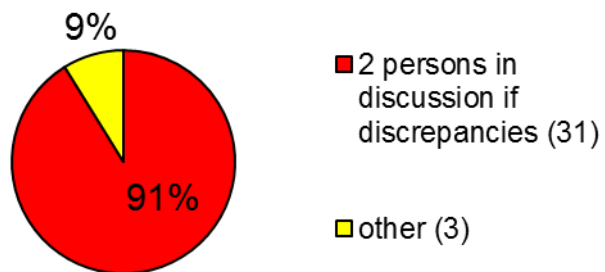
ANCA IIF



Source of ANCA IIF substrate



Reading ANCA IIF



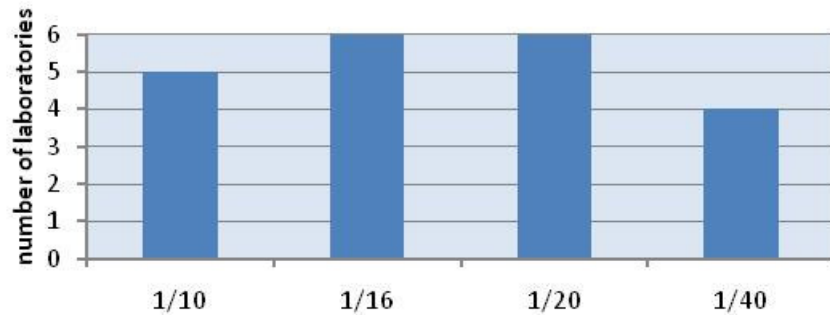
ANCA consensus

Titreeren

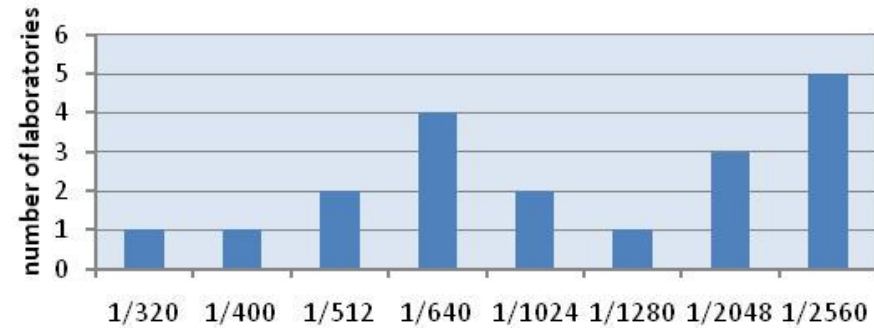
- Titreeren is niet nodig als neutrofielen en monocyten de enige fluorescerende cellen zijn; titreeren kan nuttig zijn als een interferende ANA of andere cytoplasmatische fluorescentie aanwezig is
- De IFT titer wordt bepaald bij patiënten die alleen positief zijn middels IFT en niet voor PR3 en/of MPO
- De fluorescentie intensiteit wordt gegradeerd van negatief, zwak positief of sterk positief op basis van de screenings verdunning

ANCA Titratie

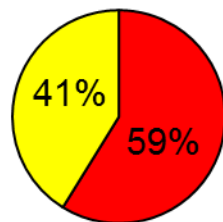
Screenings dilution



End dilution



ANCA titration



yes (20)

no (14)

Alle labs rapporteren de titer naar de kliniek

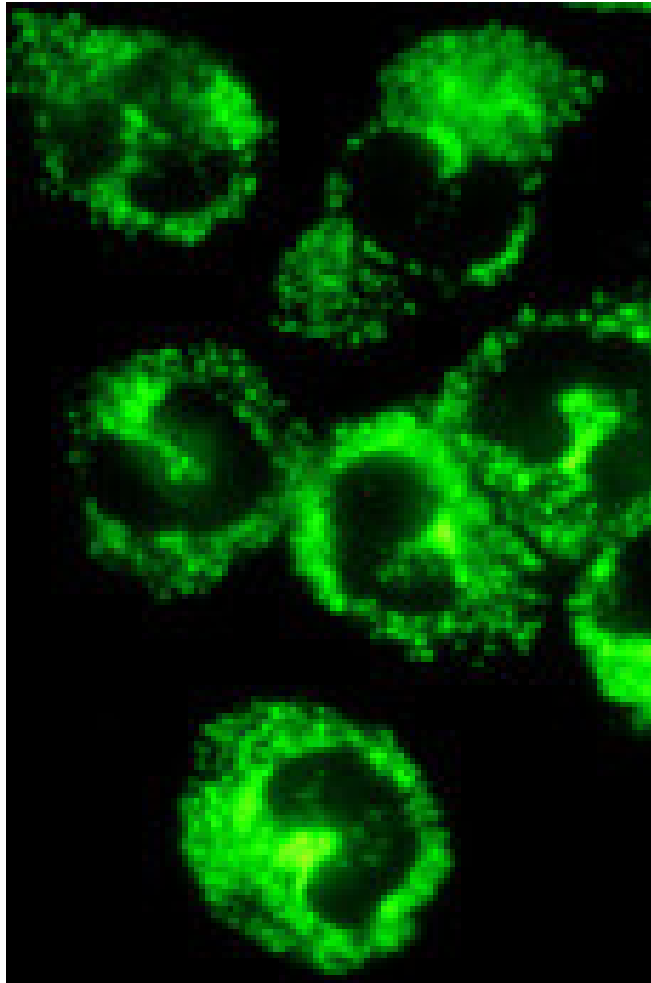
4 labs rapporteren alleen de fluorescentie intensiteit naar de kliniek

ANCA consensus

Nomenclature van ANCA patronen

- C-ANCA: Klassieke granulaire cytoplasmatische fluorescentie met accent tussen de kernlobben
- C-ANCA (atypisch): diffuse vlakke cytoplasmatische fluorescentie zonder accent tussen de kernlobben
- P-ANCA: fluorescentie rondom de kern (perinuclear) en waarbij ook de kern positief kan zijn; inclusief granulocyt-specifieke ANA
- Atypische ANCA: alle andere neutrofiel-specifieke of monocyt-specifieke reactiviteit, meestal een combinatie van cytoplasmatische en perinucleaire fluorescentie

ANCA patronen



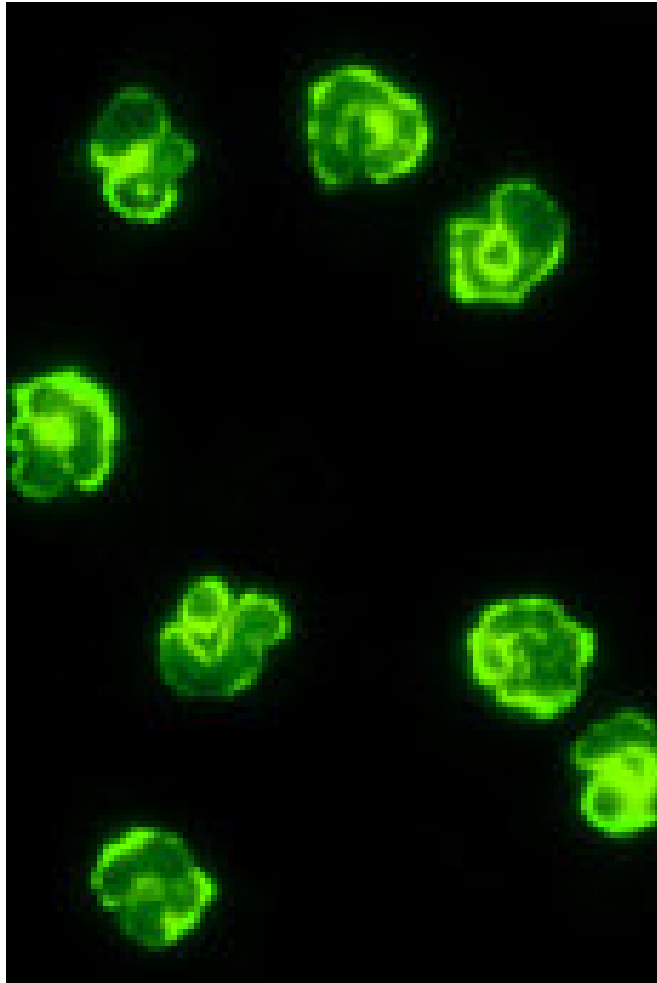
c-ANCA:

Cytoplasmatisch

Klassieke granulaire cytoplasmatische fluorescentie met accent tussen de kernlobben

Atypische C-ANCA: diffuse vlakke cytoplasmatische fluorescentie zonder accent tussen de kernlobben

ANCA patronen



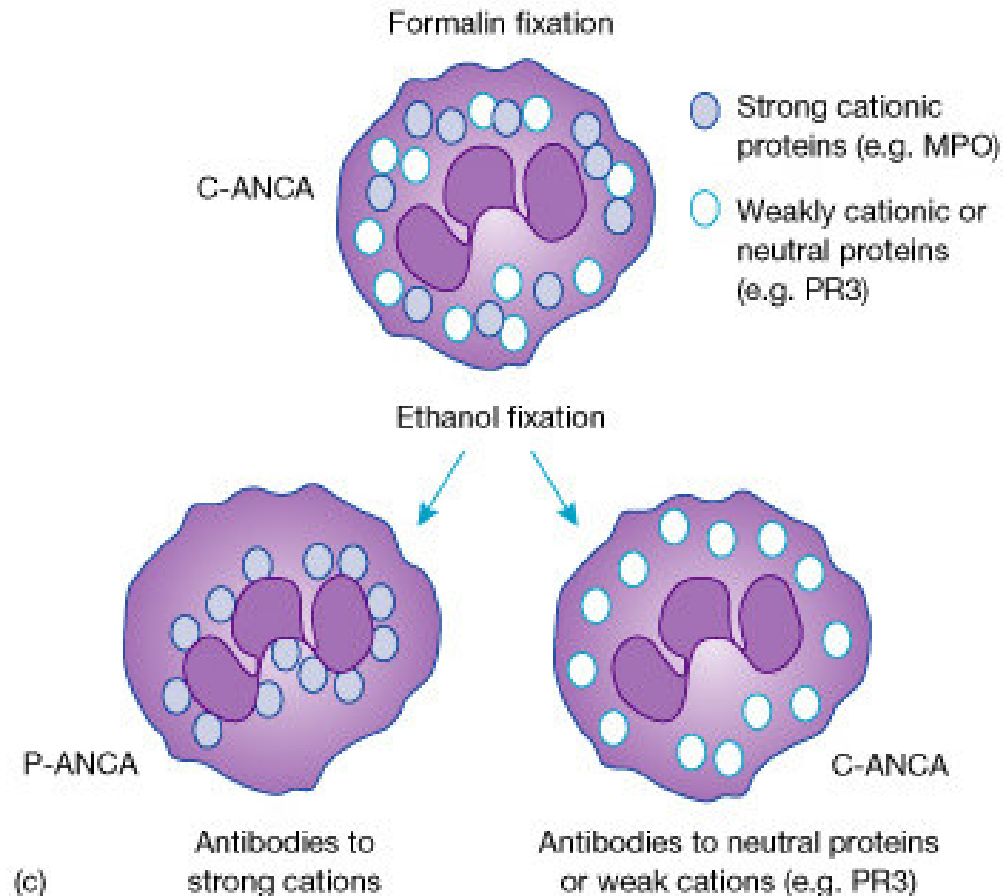
p-ANCA:

Perinuclear

fluorescentie rondom de kern en waarbij ook de kern kan aankleuren; inclusief granulocyt-specifieke ANA

**moeilijkheid is het onderscheid met de niet-granulocyt specifieke ANA

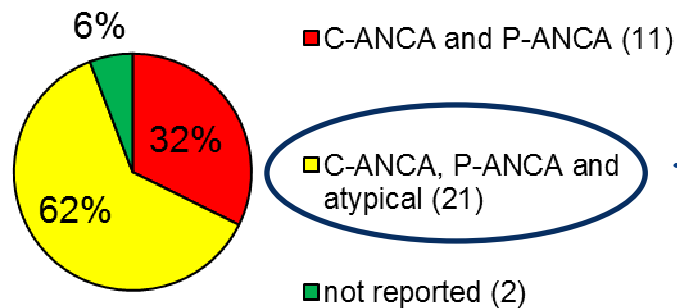
Ethanol versus Formaline fixatie



- Ethanol fixatie heeft invloed op spreiding van antigenen, sommige migreren richting kern en geven een p-ANCA beeld
- Gevolg mogelijke verwarring met ANA
- Formaline doet dit niet (c-ANCA en p-ANCA geven op formaline beide een cytoplasmatisch beeld)
- Met name in het kader van niet-vasculitis ANCA kunnen formaline glaasjes nuttig zijn

ANCA patterns

ANCA patterns reported



- PR3 en MPO negatief (2)
- Non-C en Non-P (5)
- Non-C en Non-P, ANA neg en pos op formaline (1)
- Non-C en non-P, C-ANCA op ethanol en neg op formaline en p-ANCA op ethanol en neg of p-ANCA op formaline (1)
- Non-C en Non-P, maar ook centromeren (1)
- Cytoplasmische aankleuring, niet c-ANCA, met of zonder kern aankleuring, niet ANA (1)
- Cytoplasmatische aankleuring, zonder specifieke accent tussen de kernlobben (2)
- Patroon met ANA en cytoplasmatische aankleuring (2)
- P-patroon op ethanol, formaline neg, ANA neg (5)
- ANA (1)

ANCA consensus

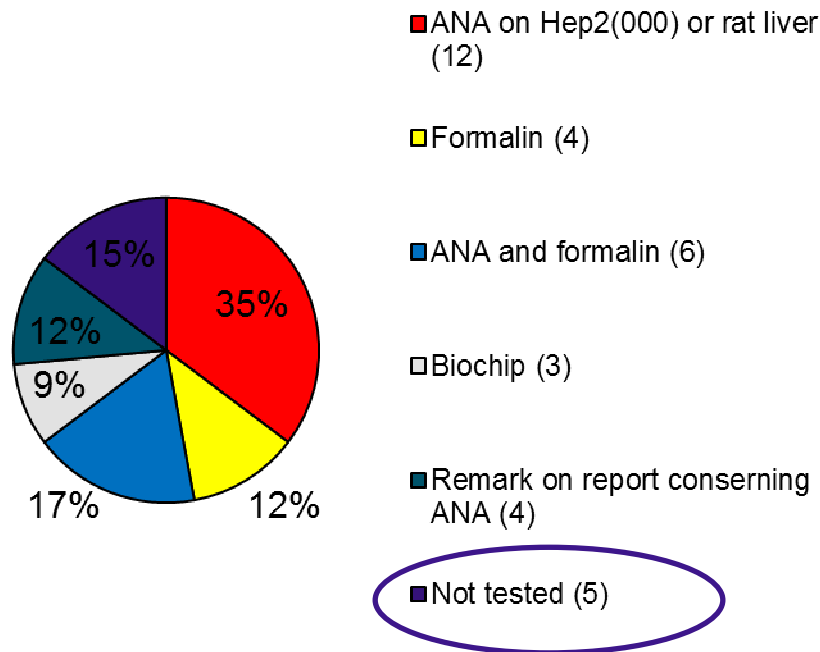
Storende ANA en anti-mitochondriën antistoffen

- Een storende ANA zou uitgesloten moeten worden (1)
- Monsters met positieve p-ANCA of atypische ANCA, samen met een positieve ANA dienen getest te worden voor PR3 en MPO middels ELISA (1)
- Voor mogelijk storende anti-mitochondriën antistoffen is geen consensus aanwezig

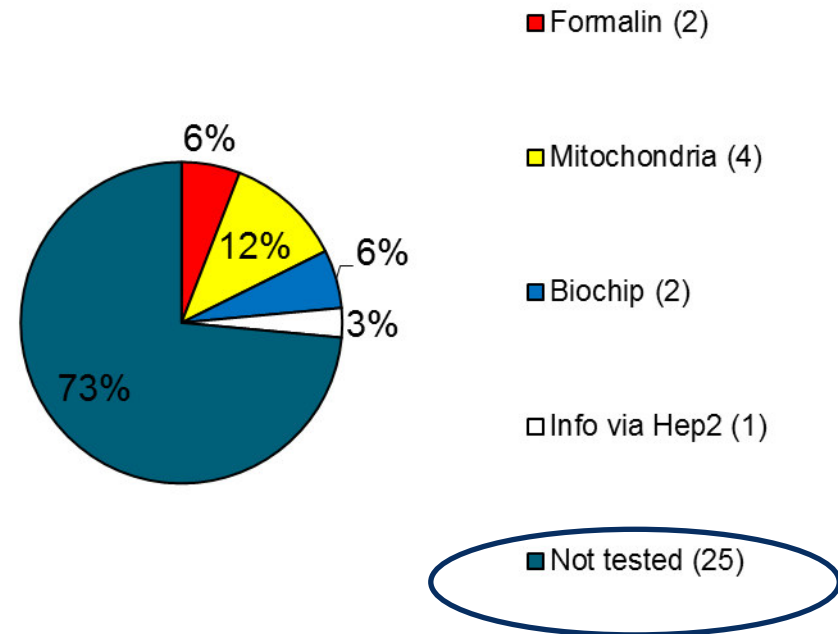
ANCA consensus

Storende ANA en anti-mitochondriën antistoffen

Interfering ANA



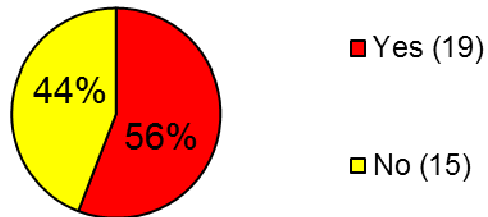
Interfering AMA



Formaline glaasjes

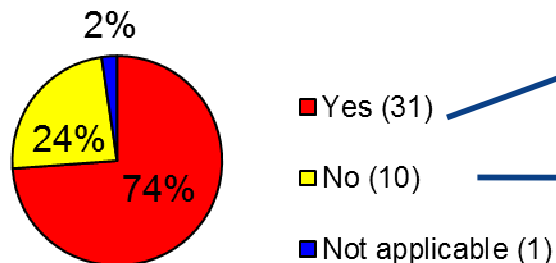
MDL?

Formalin slides



MDL	Ja	Nee	nvt
Formaline			
Ja	13	5	1
Nee	11	4	0

Gastro-enterology requests



- 8 labs gebruiken een andere strategie voor MDL aanvragen*

- 5 labs bieden een p-ANCA optie op het aanvraagformulier

- 1 lab gebruikt een andere strategie voor MDL aanvragen via de optie p-ANCA op het aanvraagformulier*

ANCA consensus

Antigeen specifieke testen

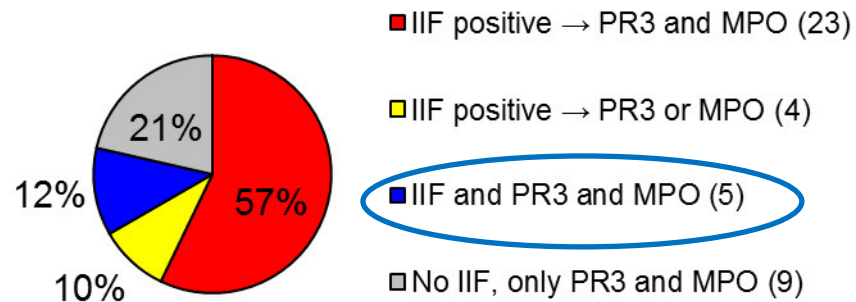
- Alle positieve IFT monsters zouden moeten worden getest voor PR3- en MPO-ANCA middels ELISA; idealiter zouden alle samples getest moeten worden (1,2)
- Resultaten worden berekend middels een standaard curve, resultaten zijn kwantitatief (1)
- Het gebruik van capture ELISA verdient de voorkeur boven de directe ELISA (2)

1 Savige et al. (1999)
Am J Clin Pathol 111: 507-13

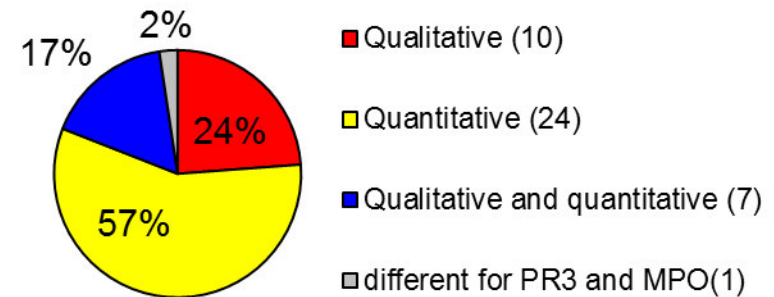
2 CBO Richtlijn Diagnostiek
Kleinevatenvasculitis, Juli
2010

PR3- and MPO-ANCA

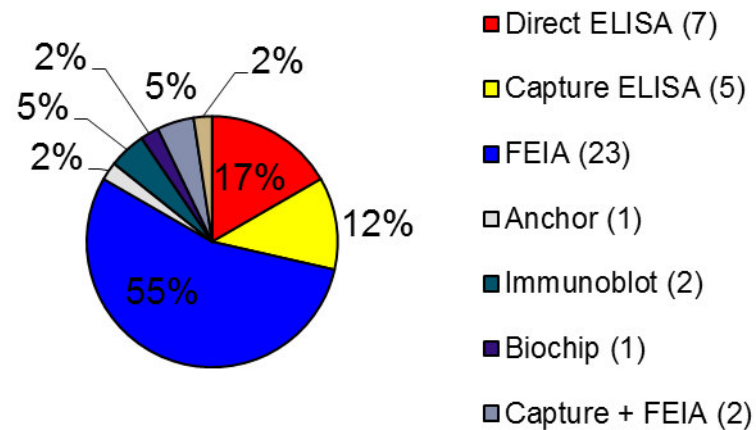
Test algorithm new patient



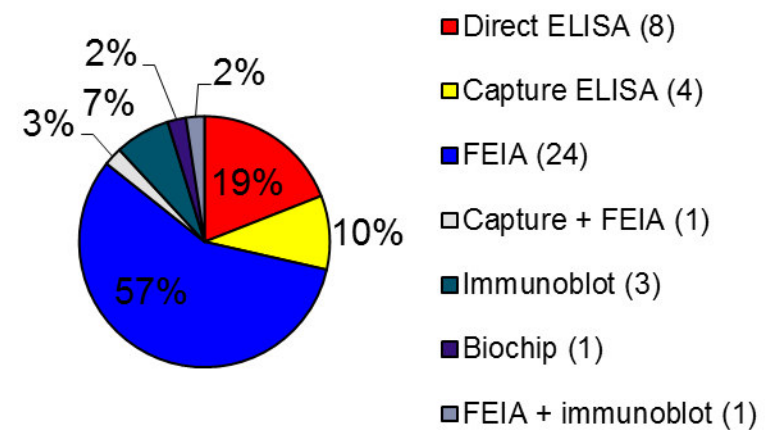
anti-PR3 or anti-MPO Reported



Method of PR3 detection



Method of MPO detection



Follow-up van AAV patiënten

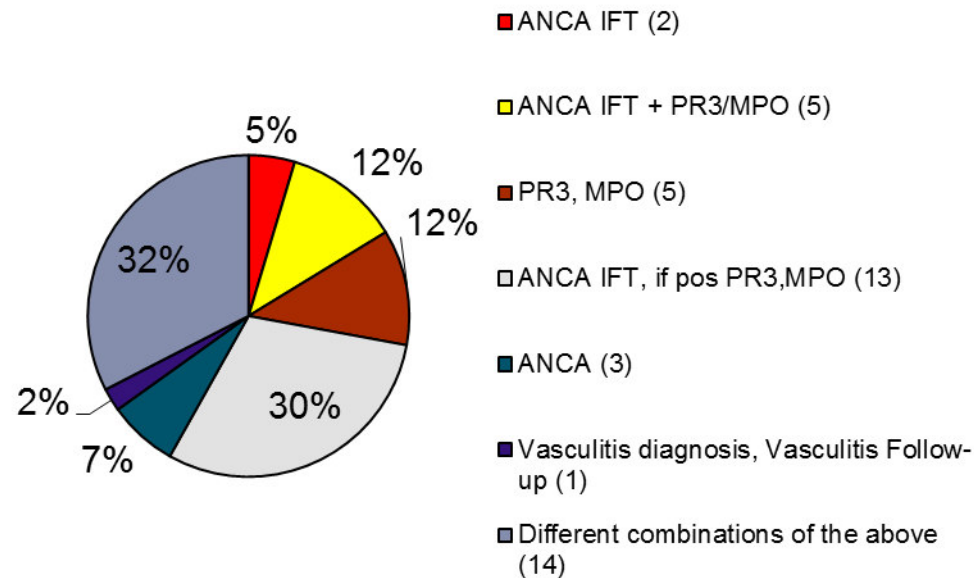
PR3-ANCA	PR3	PR3 & MPO	geen PR3/MPO
Geen IFT	6	10	-
IFT, geen tritratie	2	5	1
IFT met titratie	5	8	5

MPO-ANCA	MPO	MPO & PR3	geen PR3/MPO
Geen IFT	7	10	-
IFT, geen tritratie	1	7	2
IFT met titratie	5	6	4

- Kwantitatieve uitslag (IFT titer en/of specificiteit)
- PR3 41/43 labs
 - MPO 39/43 labs

Opties aanvraagformulier

Options labform

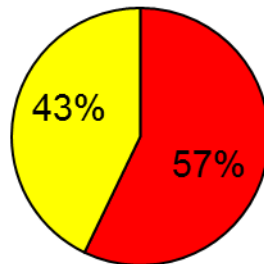


**6 labs hebben een extra optie P-ANCA op het aanvraagformulier

→Belangrijk is te benoemen wat je doet

Doorbellen van een positieve uitslag?

Nieuwe patient



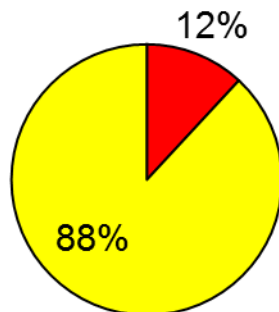
■ Yes (24)



8 labs alleen c-ANCA/PR3
2 labs concentratie afhankelijk

■ No (18)

follow up?



■ Yes (5)

■ No (37)

Wanneer advies:

- 4x titer stijging, >100% PR3/MPO (eigen studie resultaten)
- hoge concentratie, (niet bepaald)
- PR3 en MPO stijging (niet bepaald)
- IFT van negatief naar positief of 3 titerstappen (niet bepaald)
- Behoorlijke titer stijging of >20% PR3/MPO (20% is meer dan de intra-assay variatie)

→ **In elk geval cito's**

ANCA consensus

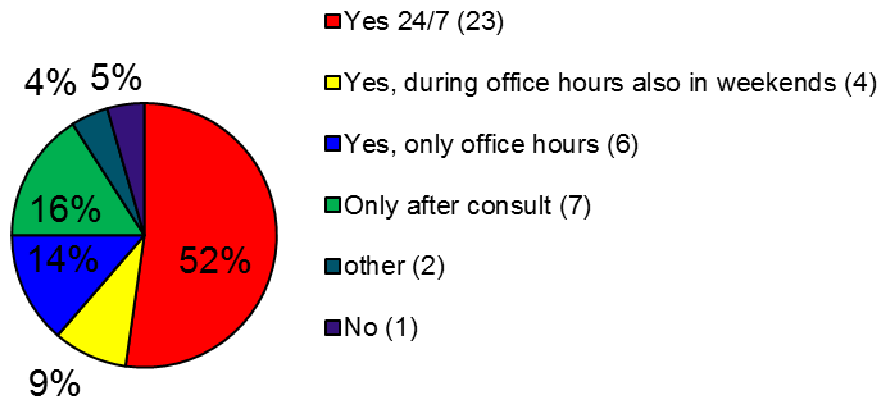
Cito ANCA aanvragen

- Cito ANCA testen zouden beschikbaar moeten zijn in elk geval waarbij er verdenking is op snel progressief nierfalen en pulmonale alveolaire hemorrhage
- Advies is dan ook te testen voor anti-GBM
- Cito testen zouden geconfirmeerd moeten worden met de reguliere test (systemen)

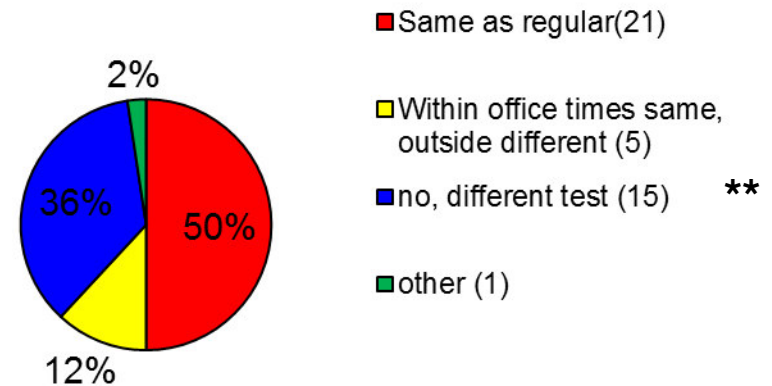
ANCA consensus

Cito ANCA testen

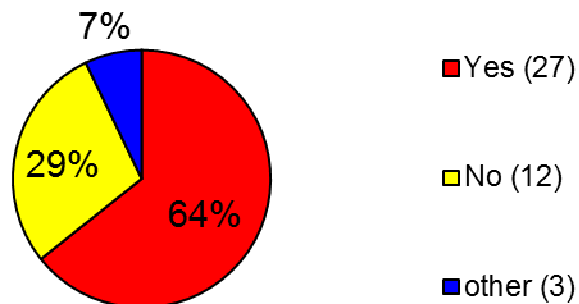
cito ANCA



Rapid ANCA test system *



GBM testing with rapid ANCA?



* 1 lab confirmeerd de cito niet met een reguliere test

** meestal de ANCA-GBM dotblot/ELISA

Conclusie deel I

- Internationale consensus en/of de CBO richtlijn wordt niet door iedereen standaard toegepast
 - *IFT*
 - *Nomenclature ANCA patronen*
 - *Capture ELISA*

Conclusie deel II

- In de huidige consensus en CBO richtlijn zijn hiaten aanwezig die opheldering behoeven
 - *Gebruik van commerciële glaasjes?*
 - *Gebruik andere testen dan ELISA?*
 - *Wat te doen bij follow up?*
 - *Formaline glaasjes wel of niet?*
 - *Doorbellen van positieve uitslagen?*
 - *Hoe om te gaan met het aanvraagformulier?*

Conclusie deel III

- Tijd voor nieuwe internationale consensus?
 - *Wat is de rol van IFT?*
 - *Gebruik formale gefixeerde granulocyten*
 - *Nieuwe testen voor antigeen specificiteit*

Veel dank!!

Caroline Roozendaal
Jan Damoiseaux



Alle labs die de vragenlijst
hebben ingevuld

