

De nieuwe internationale consensus met betrekking tot de ANCA-laboratoriumdiagnostiek bij ANCA-geassocieerde vasculitis

The novel international consensus on testing of ANCA-laboratory diagnostics in ANCA-associated vasculitis

Dr. J. Damoiseaux¹, dr. B. Meek², dr. C. Roozendaal³

SAMENVATTING

Antineutrofiële cytoplasmatische antistoffen (ANCA) vormen een belangrijke bijdrage aan de diagnostiek van kleinevatenvasculitis. De betreffende vasculitiden worden samengevat als ANCA-geassocieerde vasculitis. Sinds 1999 bestaat een internationale consensus over de meest geschikte methode voor de detectie van ANCA in het laboratorium. Het uitgangspunt hierbij is screening met een indirecte immunofluorescentietest op een substraat van neutrofiële granulocyten, indien positief gevolgd door immunoassays specifiek voor antistoffen tegen myeloperoxidase en proteïnase 3. Gedurende de laatste twee decennia zijn de antigeen-specifieke immunoassays sterk verbeterd en is de positie van de indirecte immunofluorescentietest in het algoritme ter discussie komen te staan. Op basis van de resultaten van een multicentrische studie is in 2017 een nieuwe internationale consensus gepubliceerd. In dit artikel worden allereerst de opzet en de resultaten van de multicentrische studie beschreven. Vervolgens worden de nieuwe aanbevelingen weergegeven met onderbouwing uit de studie. Tenslotte wordt implementatie van de nieuwe consensus in Nederlandse laboratoria bediscussieerd.

(NED TIJDSCHR ALLERGIE, ASTMA, KLIN IMMUNOL 2019;19:103-10)

SUMMARY

Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) are important in the diagnostic work-up for small vessel vasculitis. The respective vasculitides, therefore, are referred to as ANCA-associated vasculitis. Since 1999, an international consensus recommends that the detection of ANCA should start by testing with indirect immunofluorescence on neutrophilic granulocytes. If positive, this test should be followed by immunoassays specific for antibodies to myeloperoxidase and proteinase 3. In the last two decades, antigen-specific immunoassays have been enormously improved. Therefore, the position of the immunofluorescence test in the algorithm is being questioned. Based on the results of a multicentre study, a novel international consensus has been published in 2017. In the current manuscript, first, the design and results of the multicentre study will be described. Next, the novel recommendations will be included in combination with the scientific support obtained in the multicentre study. Finally, implementation of the novel consensus in Dutch laboratories will be discussed.

¹laboriumspecialist Medische Immunologie, Centraal Diagnostisch Laboratorium, Maastricht UMC+, Maastricht, ²laboriumspecialist Medische Immunologie, afdeling Medische Microbiologie en Immunologie, Sint Antoniusziekenhuis, Nieuwegein, ³laboriumspecialist Medische Immunologie, afdeling Laboratoriumgeneeskunde, UMCG, Groningen.

Correspondentie graag richten aan: dhr. dr. J. Damoiseaux, Centraal Diagnostisch Laboratorium, Maastricht UMC, P. Debyelaan 25, 6229 HX Maastricht, tel.: +31-0433876655, e-mailadres: jan.damoiseaux@mumc.nl

Belangenconflict: J. Damoiseaux heeft actief geparticipeerd in multicentrische ANCA-studie die is gesponsord door de deelnemende diagnosticabedrijven.

Financiële ondersteuning: J. Damoiseaux heeft sprekersvergoeding ontvangen van Euroimmun en Thermo-Fisher.

Trefwoorden: ANCA, antineutrofiële cytoplasmatische antistoffen, laboratoriumdiagnostiek, myeloperoxidase, proteïnase 3, vasculitis.

Keywords: ANCA, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, laboratory diagnostics, myeloperoxidase, proteinase 3, vasculitis.

ONTVANGEN 6 AUGUSTUS 2018, GEACCEPTEERD 22 JANUARI 2019.

INLEIDING

Antineutrofiële cytoplasmatische antistoffen (ANCA) spelen een belangrijke rol in de diagnostiek van kleinevaten-vasculitis, in het bijzonder granulomatose met polyangiitis (GPA) en microscopische polyangiitis (MPA).^{1,2} Van oudsher worden ANCA opgespoord met behulp van een indirecte immunofluorescentie (IIF)-test op een substraat van neutrofiële granulocyten. In het kader van ANCA-geassocieerde vasculitis (AAV) kunnen 2 fluorescentiepatronen gevonden worden: een granulaire cytoplasmatische patroon (C-ANCA) en een perinucleair patroon (P-ANCA). Indien één van beide patronen gevonden wordt, dient het resultaat opgevolgd te worden met een antigeen-specifieke test om vast te stellen of de ANCA gericht zijn tegen proteïnase 3 (PR3) of myeloperoxidase (MPO). Op basis van een multicentrische studie van Hagen, et al. is een internationale consensus bereikt die stelt dat bij verdenking op AAV deze procedure, screenen met IIF en bevestigen met antigeen-specifieke immunoassays, gevolgd dient te worden.^{3,4} Deze werkwijze is ook vastgelegd in de nationale CBO-richtlijn Diagnostiek kleinevatenvasculitis.⁵

Ondanks de internationale consensus en nationale richtlijn over de ANCA-procedure heeft de afgelopen 2 decennia een toenemend aantal Nederlandse laboratoria afstand gedaan van de ANCA-IIF-test. Op basis van een vragenlijst, opgesteld door de Nederlandse afdeling van het European Autoimmunity Standardisation Initiative (EASI), bleek in 2010 ongeveer 20% van de deelnemende laboratoria geen ANCA-IIF-test uit te voeren.⁶ Meer recentelijk bleek, op basis van participatie aan externe kwaliteitsrondzendingen van de Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoriumdiagnostiek (SKML), dat dit percentage inmiddels is gestegen tot 40%. Het schrappen van de ANCA-IIF-test wordt ook in verschillende mate waargenomen in andere Europese landen.⁷ De gebruikte argumenten betreffen de bewerkelijkheid van de IIF-test en de subjectiviteit van het aflezen. De antigeen-specifieke testen daarentegen, kunnen volledig geautomatiseerd worden uitgevoerd. Hoewel een aantal diagnostische bedrijven hierop heeft ingespeeld door ook de ANCA-IIF-test te automatiseren, vergt dit een relatief grote investering voor kleinere laboratoria.⁸

De centrale vraag die vervolgens gesteld is, betreft de rol van de ANCA-IIF-test op een substraat van neutrofiële granulocyten in de diagnostiek van AAV. Hoewel de immunoassays voor MPO- en PR3-ANCA de laatste 2 decennia sterk verbeterd zijn, ontbrak het tot voor kort aan een wetenschappelijke onderbouwing voor het schrappen van de ANCA-IIF-test. In dit artikel wordt een samenvatting gegeven van de opzet en resultaten van de recentelijke in-

ternationale multicentrische studie die heeft geleid tot een revisie van de internationale consensus over de ANCA-testen in het diagnostische proces van AAV. Vervolgens wordt deze nieuwe consensus toegelicht en bediscussieerd, mede in het licht van een eenduidige implementatie in de Nederlandse gezondheidszorg.

INTERNATIONALE MULTICENTRISCHE STUDIE VOOR ANCA-DIAGNOSTIEK

Om de rol van de ANCA-IIF-test te onderzoeken, is een multicentrische studie opgezet.⁹ Vanuit 4 internationale ANCA-expertiselaboratoria in het noorden van Europa (Bad Bramstedt, Kopenhagen, Leuven en Maastricht) zijn retrospectief sera geselecteerd van AAV-patiënten en relevante ziektecontroles. Insteek was om vanuit ieder centrum 100 sera te includeren van opeenvolgende AAV-patiënten en 250 sera van opeenvolgende ziektecontroles. Een belangrijk criterium voor inclusie van de AAV-sera was dat het serum afgenomen moest zijn ten tijde van de diagnose en voordat immunosuppressieve therapie werd gestart. Voor de ziektecontroles gold dat er sprake moest zijn van een ANCA-aanvraag in het kader van een verdenking op AAV, waarbij uiteindelijk geen diagnose van AAV werd gesteld. In totaal zijn 251 AAV-patiënten (186 GPA en 65 MPA) en 924 ziektecontroles geïncludeerd. De sera werden geanonimiseerd, gecodeerd en verdeeld in porties. De geplande ANCA-bepalingen, IIF-test op neutrofiële granulocyten (n=4) en antigeen-specifieke test (n=8), zijn gekozen op basis van het brede scala aan beschikbare technieken. Om te bewerkstelligen dat de commerciële IIF-testen en antigeen-specifieke testen op correcte wijze werden uitgevoerd, is de uitvoering in handen gegeven van de betreffende diagnostische bedrijven. Nadat alle resultaten beschikbaar waren, werden deze gedecodeerd en geanalyseerd. Omdat bij de antigeen-specifieke testen sprake is van 2 testresultaten, te weten MPO- en PR3-ANCA, zijn de data gecombineerd in de analyses voor het vaststellen van de testkarakteristieken. Negatief betekent dat beide testen negatief zijn; positief betekent dat tenminste één van beide testen positief is. Indien beide testen positief zijn, is gekozen voor de hoogste reactiviteit.

De ANCA-IIF-test is uitgevoerd in de expertiselaboratoria van zowel Kopenhagen als Bad Bramstedt. Het was opvallend dat de testkarakteristieken, samengevat in de 'area under the curve' (AUC) van een 'receiver operating characteristic curve' (ROC) in Bad Bramstedt (AUC= 0,923) beduidend beter waren dan in Kopenhagen (AUC= 0,843).¹⁰ Dit verschil bleek vooral te berusten op de gebruikte teststrategie. In Kopenhagen werd, volgens het originele ANCA-IIF-protocol, enkel gebruikgemaakt van ethanol-

TABEL 1. Verbetering van de testkarakteristieken van antigeen-specifieke ANCA-testen.

	PR3-ANCA	MPO-ANCA
Specificiteit in ziektecontroles		
1998: Hagen et al. (n=184)	86-89%	91%
2017: Damoiseaux et al. (n=924)*	98-99%	96-99%
Sensitiviteit bij GPA-patiënten		
1998: Hagen et al. (n=97)	65-67%	24%
2017: Damoiseaux et al. (n=186)	77-81%	9-12%
Sensitiviteit bij MPA-patiënten		
1998: Hagen et al. (n=44)	25-27%	58%
2017: Damoiseaux et al. (n=65)	5-9%	71-88%

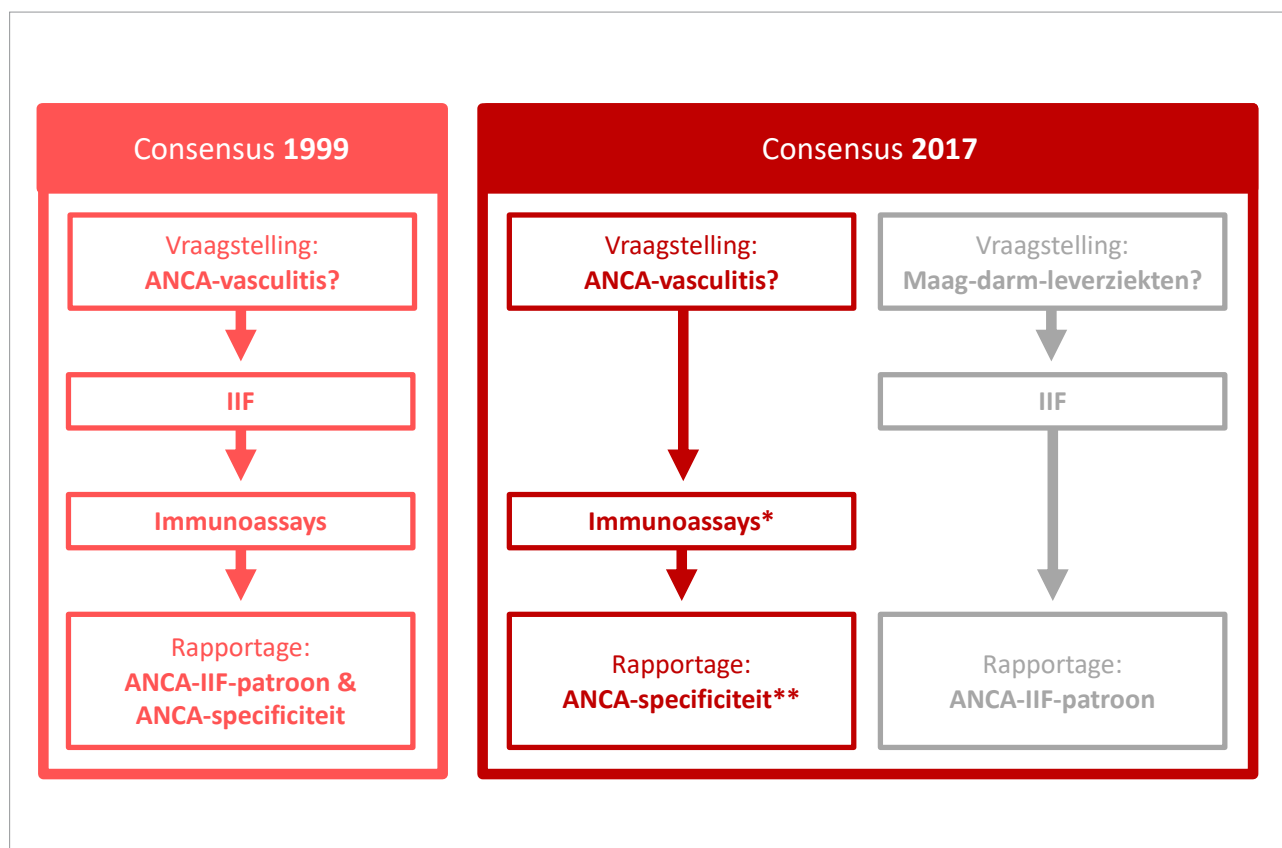
*De weergegeven resultaten van de multicentrische studie van Damoiseaux, et al. hebben betrekking op alle 8 geïncubeerde antigeen-specifieke ANCA-testen.

NB: hoewel er duidelijk sprake is van een verbetering in specificiteit is deze minder evident ten aanzien van de sensitiviteit omdat de verdeling PR3/MPO-ANCA binnen zowel de GPA- als de MPA-populatie verschilt tussen beide studies.

gefixeerde neutrofiele granulocyten, terwijl in Bad Bramstedt een combinatie van ethanol- en formaline-gefixeerde neutrofiele granulocyten werd gebruikt, waarbij tevens met HEp-2-cellen eventuele interfererende antinucleaire antistoffen (ANA) werden gedetecteerd. Met de combinatie van testen kon evident beter onderscheid gemaakt worden tussen AAV-patiënten en ziektecontroles. Dit werd bevestigd door de resultaten van 2 commerciële ANCA-IIF-testen die eveneens verschilden ten aanzien van het al dan niet additioneel aanwezig zijn van formaline-gefixeerde neutrofiele granulocyten en HEp-2-cellen.

Op basis van sensitiviteit en vooral specificiteit zijn de antigeen-specifieke testen uit de recentelijke multicentrische studie beter dan de testen uit de multicentrische studie van Hagen, et al., waarop de eerste internationale consensus uit 1999 is gebaseerd (zie Tabel 1).³ Bovendien blijken, met één enkele uitzondering, de huidige antigeen-specifieke immunoassays een significant hogere AUC (range 0,936-0,959) te bereiken dan de best beschikbare ANCA-IIF-test (0,923). De uitzondering had een AUC (0,919) die niet afweek van de ANCA-IIF-test. Deze test is in dit artikel verder buiten beschouwing gelaten. Aangezien de ANCA-IIF-test vooral als screeningstest wordt gebruikt, is het belangrijker om naar de sensitiviteit te kijken: de hoogste sensitiviteit die met de beste ANCA-IIF-test gehaald wordt (88,8%), wordt met de antigeen-specifieke immunoassays gehaald bij een hogere specificiteit (>93,7%). Deze data geven een eenduidig antwoord op de primaire onderzoeks-

vraag: goede immunoassays voor MPO- en PR3-ANCA zijn beter voor het screenen van patiënten met een verdenking op AAV dan IIF-testen op neutrofiele granulocyten. Aangezien de antigeen-specifieke immunoassays van de afzonderlijke firma's gebruikmaken van verschillende eenheden en afkapwaarden is een directe vergelijking van de testkarakteristieken niet goed mogelijk. Daarom is er allereerst voor gekozen om de sensitiviteit van de testen te vergelijken op basis van afkapwaarden gedefinieerd door de mate van specificiteit (respectievelijk 95%, 97,5%, 99% en 100%). Vervolgens is de vergelijking gemaakt op basis van 'likelihood ratio's (LR's), omdat deze testkarakteristiek het meest geschikt is om de toegevoegde waarde van het testresultaat voor de individuele patiënt te bepalen.¹¹ Tenslotte zijn de data geanalyseerd op basis van LR's voor testresultaatintervallen, wederom gedefinieerd door de afkapwaarden behorende bij eerdergenoemde specificiteitspercentages. Deze analyses hebben een aantal interessante bevindingen opgeleverd.¹² Vanzelfsprekend neemt de sensitiviteit af naarmate voor een hogere specificiteit wordt gekozen. Gelijktijdig neemt de LR voor een positief resultaat (LR+) toe naarmate voor een afkapwaarde met een hogere specificiteit wordt gekozen. Omgekeerd neemt de LR voor een negatief resultaat (LR-) af in deze situatie. Voor een significante bijdrage van een testresultaat in de diagnostische beslissing dient de LR+ en LR-, respectievelijk, >10 of <0,1 te zijn. Zelfs bij een afkapwaarde behorende bij 95%-specificiteit, een grens die laag is voor een rela-



FIGUUR 1. Testalgoritme voor de vraagstelling ANCA-geassocieerde vasculitis. De internationale consensus uit 1999 (links) geeft aan dat eerst getest wordt met de indirecte immunofluorescentie (IIF)-test op een substraat van neutrofiële granulocyten; als deze positief is, worden vervolgens antigeen-specifieke testen uitgevoerd voor MPO- en PR3-ANCA. De rapportage vermeldt het fluorescentiepatroon en de antigene specificiteit (bij voorkeur kwantitatief). De internationale consensus uit 2017 (rechts) maakt eerst onderscheid tussen de vraagstelling ANCA-vasculitis versus maag-darm-leverziekten. In geval van de vraagstelling ANCA-vasculitis kan worden volstaan met antigeen-specifieke testen voor MPO- en PR3-ANCA (bij hoge klinische verdenking en een negatief testresultaat is het raadzaam om additioneel een alternatieve testmethode te gebruiken; bij een laag-positief resultaat is het raadzaam om de uitslag te bevestigen met een alternatieve testmethode*). De rapportage vermeldt de antigene specificiteit (bij voorkeur kwantitatief en in relatie tot 'likelihood ratio's' voor testresultaatintervallen**). Hoewel de consensus uit 2017 hierover geen uitspraak doet, kan bij de vraagstelling darm- en leverziekten worden volstaan met de IIF-test.

tief weinig voorkomende ziekte als AAV, is de LR+ van de testen ruim boven de 10 (range 17,3-18,3); de LR- is ~0,1. Deze overeenkomst in LR+ wordt ook gezien bij een afkapwaarde behorende bij 97,5% (32,7-35,1) en 99% (65,4-82,2). Per definitie is de LR+ bij een afkapwaarde behorende bij 100%-specificiteit oneindig groot. Ook binnen de door genoemde specificiteitsgrenzen gedefinieerde testresultaatintervallen blijken de LR's van de verschillende immunoassays grote overeenkomsten te vertonen. Aangezien 8-12% van de AAV-patiënten een testresultaat heeft lager dan de afkapwaarde van 95%-specificiteit varieert de LR voor testresultaten <95%-specificiteit tussen 0,09 en 0,13. Dit betekent dat bij een negatief testresultaat AAV niet geheel uitgesloten kan worden. Indien het testresultaat is gelegen tussen de afkapwaarden behorende bij

95-97,5% en 97,5-99% blijven de bijbehorende LR's vrij laag: respectievelijk 0,64-3,35 en 3,18-14,68. Vooral voor het eerstgenoemde testresultaatinterval, vaak gelegen rond de door de firma gedefinieerde afkapwaarde, is het testresultaat van weinig toegevoegde waarde voor de diagnostische beslissing. Gelukkig heeft een substantieel deel van de AAV-patiënten (range 57,1-74,6%) een testresultaat in het interval van 99-100%-specificiteit. De bijbehorende LR's zijn hoog (55,8-76,7); deze uitslagen zijn zeer sterk ondersteunend voor een diagnose AAV.

Hoewel bovenstaande data suggereren dat er relatief weinig verschillen zijn tussen de immunoassays, in tegenstelling tot waarop vooraf op basis van de verschillende testmethodieken geanticipeerd werd, komen resultaten van afzonderlijke sera niet altijd overeen. Op basis van kwali-

tatieve resultaten (negatief-positief) is de concordantie tussen de testen rond de 90%.⁹ Concordantie is hierbij gedefinieerd als ofwel een negatief ofwel een positief resultaat in alle 7 testen. Een vergelijking van kwantitatieve data laat voor zowel MPO- als PR3-ANCA zeer matige correlaties zien.¹³ Hoewel een aantal testen geijkt is op internationale standaardpreparaten resulteert dat niet in betere correlaties. Dit betekent dat het, afhankelijk van de mate van klinische verdenking en het verkregen testresultaat, van toegevoegde waarde kan zijn om additioneel een alternatieve ANCA-test, bij voorkeur een antigeen-specifieke test, aan te vragen.

Vanzelfsprekend heeft deze multicentrische studie ook enkele tekortkomingen. Allereerst betreft het een retrospectieve studie, waardoor enerzijds het ANCA-testresultaat invloed gehad kan hebben op de gestelde diagnose, anderzijds is door de beperkte hoeveelheid beschikbaar rest-serum het scala te evalueren immunoassays beperkt gebleven. Daarnaast zijn alleen sera van GPA- en MPA-patiënten in de analyses meegenomen, terwijl ook eosinofiele GPA (EGPA) een erkende AAV-variant is. EGPA is niet meegenomen, omdat meer recentelijk is gebleken dat dit een heterogeen ziektebeeld is waarbij slechts een deel van de patiënten een ANCA-geassocieerde ziekte heeft. De consequentie van dit besluit is dat geen definitieve uitspraak gedaan kan worden over de inzet van ANCA-testen bij EGPA. Tenslotte is de studie uitgevoerd in een viertal Europese expertisecentra. Hoewel de vraag is of de resultaten mondiaal geëxtrapoleerd kunnen worden, is het aannemelijk dat de interpretatie wel valide is voor Nederland. Gegeven deze tekortkomingen is een aanzet gemaakt om op korte termijn een prospectieve studie te starten om de gevonden resultaten mondiaal te valideren.

DE NIEUWE INTERNATIONALE ANCA-CONSENSUS

De recentelijk gepubliceerde nieuwe internationale consensus over het testen van ANCA bij een verdenking op GPA en MPA bevat 5 aanbevelingen.¹⁴ Deze zijn samengevat in *Figuur 1* en hieronder verder toegelicht.

1. BIJ EEN VERDENKING OP AAV DIENT EEN ANCA-TEST AANGEVRAAGD TE WORDEN; DEZE AANVRAAG DIENT TE GESCHIEDEN IN DE CONTEXT VAN DE JUISTE KLINISCHE MANIFESTATIES ZOALS GEDEFINIEERD IN DE NIEUWE INTERNATIONALE CONSENSUS.

Vanzelfsprekend is een positief ANCA-testresultaat alleen niet diagnostisch; de diagnose dient gebaseerd te zijn op de combinatie van klinische manifestatie en pathologische be-

vingingen. Gegeven de goede testkarakteristieken van de antigeen-specifieke immunoassays voor MPO- en PR3-ANCA kunnen de testresultaten wel een belangrijke bijdrage leveren aan het stellen van de juiste diagnose. Aangezien AAV een relatief lage incidentie heeft, dient men zich bij het aanvragen van de ANCA-test bewust te zijn dat de kans op klinisch vals-positieve uitslagen toeneemt indien de test buiten de juiste context gebruikt wordt.⁸ Een klinisch vals-positieve uitslag is hierbij gedefinieerd als een positief testresultaat met onvoldoende bewijs voor de betreffende aandoening. Met andere woorden, de eerste aanbeveling komt erop neer dat in geval van een lage pre-testwaarschijnlijkheid op AAV, de kans op een verkeerde medische beslissing op basis van een positieve ANCA-testuitslag toeneemt. Dit kan een beslissing zijn in termen van verder medisch onderzoek of van diagnose en therapie.

2. VOOR HET AANTONEN VAN ANCA DIENT GEBRUIK TE WORDEN GEMAAKT VAN ANTIGEEN-SPECIFIEKE TESTEN (MPO- EN PR3-ANCA) MET EEN HOGE SENSITIVITEIT EN SPECIFICITEIT.

De resultaten van de multicentrische studie laten onomstotelijk zien dat de gebruikte immunoassays ten minste even goed (8/8), dan wel significant beter (7/8) zijn dan de meest optimale ANCA-IIF-testmethodiek.⁹ Dit is niet alleen gebaseerd op de AUC van de respectievelijke ROC-curves, maar de antigeen-specifieke testen hebben ook een betere specificiteit bij een sensitiviteit gelijk aan de maximale sensitiviteit van de betreffende ANCA-IIF-test.

3. INDIEN DE RESULTATEN VAN DE ANTIGEEN-SPECIFIEKE TESTEN NEGATIEF ZIJN EN ER TOCH EEN HOGE KLINISCHE VERDENKING IS OP AAV, TE WETEN GPA EN/OF MPA, IS HET RAADZAAM OM EEN ALTERNATIEVE TESTMETHODE UIT TE (LATEN) VOEREN, BIJ VOORKEUR EEN ALTERNATIEVE ANTIGEEN-SPECIFIEKE TEST, OM DE SENSITIVITEIT TE VERHOGEN.

Zoals is gebleken uit de resultaten van de multicentrische studie is de concordantie ten aanzien van kwalitatieve testuitslagen hoog, maar is deze niet absoluut.⁹ Daarom kan een test met een alternatieve testmethode een positief resultaat geven, terwijl de in gebruik zijnde antigeen-specifieke routine-ANCA-test negatief is. Overigens dient men er zich van bewust te zijn dat een negatieve uitslag de diagnose AAV niet uitsluit. Immers, bij ongeveer 10-15% van de AAV-patiënten is geen ANCA aantoonbaar. Dit be-

treft voornamelijk patiënten met loco-regionale ziektemanifestaties.

4. VOORAL IN HET GEVAL VAN LAAG-POSITIEVE RESULTATEN IS HET EVENEENS RAADZAAM OM EEN ALTERNATIEVE ANTIGEEN-SPECIFIEKE TESTMETHODE UIT TE (LATEN) VOEREN OM DE SPECIFICITEIT TE VERHOGEN.

Met name in het lagere gebied van het meetbereik (95-97,5% en 97,5-99% specificiteit-gedefinieerde afkapwaarden) is de toegevoegde waarde van een positief ANCA-resultaat beperkt.¹² De LR's nemen sterk toe indien dezelfde ANCA-activiteit gevonden wordt in een alternatieve testmethode. Voor toepassing van deze aanbeveling is het, vanzelfsprekend, aangewezen dat de resultaten kwantitatief worden gerapporteerd in combinatie met de afkapwaarde en de gebruikte testmethode.

5. DE KLINISCHE INTERPRETATIE VERBETERT INDIEN DE HOOGTE VAN DE ANCA-SPIEGELS IN HET BLOED WORDT MEEGEWOGEN, BIJ VOORKEUR OP BASIS VAN LR'S VOOR TESTRESULTAATINTERVALLLEN.

De studie van Bossuyt, et al. laat zien dat testresultaatintervallen vastgesteld kunnen worden door het gebruik van meerdere afkappunten, gedefinieerd door een oplopende specificiteit.¹² Deze testresultaatintervallen hebben verschillende LR's die hoger worden naarmate de specificiteit van het bijbehorende testresultaatinterval toeneemt. Hoewel de afkapwaarden getalsmatig afhankelijk zijn van de betreffende antigeen-specifieke immunoassay, blijken de LR's voor de testresultaatintervallen grote overeenkomst te vertonen tussen de verschillende antigeen-specifieke testen. Dit aspect biedt grote mogelijkheden voor harmonisatie van de ANCA-diagnostiek in het kader van AAV.

DISCUSSIE

De nieuwe internationale consensus over het testen van ANCA in het kader van AAV doet een aantal aanbevelingen over de wijze waarop de ANCA-testen optimaal ingezet, uitgevoerd en gerapporteerd dienen te worden.¹⁴ De meest in het oog springende aanbeveling betreft het verlaten van de ANCA-IIF-test op een substraat van neutrofiële granulocyten in de diagnostiek van AAV. De huidige immunoassays voor MPO- en PR3-ANCA blijken immers betere testkarakteristieken te hebben dan de best beschikbare ANCA-IIF-test.

De nieuwe consensus doet uitdrukkelijk geen uitspraak over een aantal aspecten. Allereerst is de consensus slechts gericht op GPA en MPA, omdat in de multicentrische stu-

die de resultaten van de EGPA-patiënten niet zijn geanalyseerd. Voor zover EGPA geassocieerd is met ANCA betreft dit overwegend MPO-ANCA. Er zijn geen aanwijzingen dat deze MPO-ANCA een andere reactiviteit hebben dan de MPO-ANCA van GPA- en MPA-patiënten. Het is meer dan aannemelijk dat de nieuwe consensus ook toepasbaar is voor patiënten met een verdenking op EGPA. Daarom wordt in dit artikel meer gegeneraliseerd gesproken over AAV. Bij een negatief resultaat zou men in geval van EGPA wel iets terughoudender kunnen zijn met het inzetten van een alternatieve immunoassay, omdat in ongeveer de helft van de EGPA-patiënten geen ANCA te detecteren is.

Het tweede punt waarover de consensus geen uitspraak doet, betreft de wijze waarop ANCA-testen uitgevoerd dienen te worden in het kader van maag-darm-leverziekten (MDL). Voor deze ziekten, zoals inflammatoire darmziekten en autoimmuunhepatitis, zijn de auto-antigenen waartegen de ANCA gericht zijn niet eenduidig gedefinieerd. Daarom blijft de ANCA-IIF-test op een substraat van neutrofiële granulocyten de aangewezen test voor deze ziekten, terwijl het uitvoeren van immunoassays voor MPO- en PR3-ANCA overbodig is. De resultaten van de antigeen-specifieke immunoassays kunnen zelfs tot verwarring leiden, omdat sommige patiënten met colitis ulcerosa en/of primaire scleroserende cholangitis PR3-ANCA-activiteit hebben. Deze reactiviteit is afhankelijk van de gebruikte immunoassay en gaat meestal gepaard met een P-ANCA patroon.¹⁵ Daarom bestaat er gerede twijfel of de betreffende antistoffen daadwerkelijk met PR3 reageren.

Tenslotte wordt in de consensus geen uitspraak gedaan over hoe snel een ANCA-resultaat beschikbaar dient te zijn om adequaat medisch handelen te faciliteren. Met name in geval van snel-progressieve glomerulonephritis en/of pulmonaire hemorragie is er sprake van een noodsituatie waarbij het van belang is om tijdig met de juiste behandeling te beginnen. Het is dan ook aangewezen om de ANCA-uitslagen tijdig beschikbaar te hebben. Tijdig betekent in deze bij voorkeur dezelfde dag, maar op zijn minst binnen 24 uur. Aangezien volgens de nieuwe consensus volstaan kan worden met immunoassays voor MPO- en PR3-ANCA, is dit met de huidige, veelal geautomatiseerde, testmethodes eenvoudiger te bewerkstelligen. Omdat de genoemde klinische manifestaties overlap vertonen met het syndroom van Goodpasture is het verstandig om gelijktijdig antistoffen tegen de glomerulaire basaal membraan (anti-GBM-antistoffen) te bepalen.

Implementatie van de nieuwe consensus heeft in een veelvoud van Nederlandse laboratoria reeds plaatsgevonden. Ongeveer 40% van de laboratoria had de ANCA-IIF-test al afgeschaft voordat de nieuwe consensus van kracht was.⁶

AANWIJZINGEN VOOR DE PRAKTIJK

- 1** Een antineutrofiele cytoplasmatische antistoffen (ANCA)-test dient aangevraagd te worden bij verdenking op ANCA-geassocieerde vasculitis; deze aanvraag dient te geschieden in de context van de juiste klinische manifestaties, zoals gedefinieerd in de nieuwe internationale consensus.
- 2** Voor het aantonen van ANCA dient gebruik te worden gemaakt van antigeen-specifieke testen (MPO- en PR3-ANCA) met een hoge sensitiviteit en specificiteit.
- 3** In geval van snel-progressieve glomerulonefritis en/of pulmonaire hemorragie dient de testuitslag binnen 24 uur beschikbaar te zijn, bij voorkeur in combinatie met de uitslag van anti-GBM-antistoffen.
- 4** Indien de resultaten van de antigeen-specifieke testen negatief zijn en er toch een hoge klinische verdenking is op ANCA-geassocieerde vasculitis, te weten GPA en/of MPA, is het raadzaam om een alternatieve testmethode uit te (laten) voeren, bij voorkeur een alternatieve antigeen-specifieke test, om de sensitiviteit te verhogen.
- 5** Vooral in het geval van laag-positieve resultaten is het eveneens raadzaam om een alternatieve antigeen-specifieke testmethode uit te (laten) voeren om de specificiteit te verhogen.
- 6** De klinische interpretatie verbetert indien de hoogte van de ANCA-spiegels in het bloed wordt meegewogen, bij voorkeur op basis van 'likelihood ratio's' voor testresultaat-intervallen.

De vraag is of hierbij is ondervangen dat de ANCA-aanvraag ook in het kader van MDL-ziekten kan zijn. Vanzelfsprekend kan in die gevallen volstaan worden met het verzenden van de aanvraag naar een laboratorium dat nog wel de ANCA-IIF-test op een substraat van neutrofiele granulocyten beschikbaar heeft, want het inzetten van de antigeen-specifieke immunoassays is hier niet op zijn plaats. Voor een correcte implementatie is het van belang dat de internationale consensus een plek krijgt in richtlijnen. Er zijn momenteel meerdere initiatieven op het gebied van AAV-richtlijnen. Allereerst heeft het College van Medisch Immunologen het op zich genomen de module over de ANCA-diagnostiek in de CBO-richtlijn Diagnostiek kleinevatenvasculitis aan te passen. Dit is momenteel een module in de richtlijndatabase van de Federatie van Medisch Specialisten. Daarnaast heeft de Nederlandse federatie voor Nefrologie een richtlijn in ontwikkeling over de diagnostiek en behandeling van AAV met nierbetrokkenheid. Tenslotte is het landelijke expertiseplatform Arthritis Research and Collaboration Hub (ARCH) in voorbereiding van het consensusdocument 'Zorgpad ANCA-geassocieerde vasculitis voor medici'. De laatste twee initiatieven doen ook uitspraken over de laboratoriumdiagnostiek van ANCA. Vanzelfsprekend is het van groot belang om deze initiatieven goed op elkaar af te stemmen om tot een eenduidige formulering te komen en eventuele

verschillen in interpretatie te voorkomen.

CONCLUSIE

Op basis van een multicentrische studie met als kernvraag de positionering van de Antineutrofiele cytoplasmatische antistoffen (ANCA) en de bijbehorende immunofluorescentie (IIF)-test, met neutrofiele granulocyten als substraat, in de diagnostiek van ANCA-geassocieerde vasculitis (AAV) is recentelijk een nieuwe internationale consensus gepubliceerd. Deze consensus geeft aan dat voor de ANCA-diagnostiek in AAV volstaan kan worden met goede antigeen-specifieke immunoassays (MPO- en PR3-ANCA). Voor de meest optimale interpretatie is het aangewezen om resultaten te presenteren als 'likelihood ratio's' (LR's) voor testresultaatintervallen. De implementatie van de nieuwe consensus vergt een goede afstemming tussen de verschillende betrokken partijen opdat de aanbevelingen eenduidig naar richtlijnen vertaald kunnen worden.

REFERENTIES

1. Rasmussen N, Wiik A, Jayne DR. A historical essay on detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *Nephrol Dial Transplant* 2015;30:1-7.
2. Cohen Tervaert JW, Damoiseaux J. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: how are they detected and what is their use for diagnosis, classification and follow-up? *Clin Rev Allergy Immunol* 2012;43:211-9.
3. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, et al. Diagnostic value of standardized

- assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR project for ANCA assay standardization. *Kidney Int* 1998;53:743-53.
4. Savige J, Gillis D, Benson E, et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999;111:507-13.
 5. CBO-richtlijn: diagnostiek kleine vaten vasculitis. Alphen aan den Rijn. The Netherlands: van Zuiden Communications; 2010.
 6. Van der Molen RG, Roozendaal C, Damoiseaux J. Detectie van ANCA in Nederlandse laboratoria: de klinische praktijk in relatie tot de internationale consensus en nationale richtlijn. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2014;39:19-24.
 7. Damoiseaux J, Heijnen I, Van Campenhout C, et al. An international survey on anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) testing in daily clinical practice. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1759-70.
 8. Csernok E, Moosig F. Current and emerging techniques for ANCA detection in vasculitis. *Nat Rev Rheum* 2014;10:494-501.
 9. Damoiseaux J, Csernok E, Rasmussen N, et al. Detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCAs): a multicentre European Vasculitis Study Group (EUVAS) evaluation of the value of indirect immunofluorescence (IIF) versus antigen-specific immunoassays. *Ann Rheum Dis* 2017;76:647-53.
 10. Csernok E, Damoiseaux J, Rasmussen N, et al. Evaluation of automated multiparametric indirect immunofluorescence assays to detect anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in granulomatosis with polyangiitis (GPA) and microscopic polyangiitis (MPA). *Autoimmun Rev* 2016;15:736-41.
 11. Bossuyt X. Clinical performance characteristics of a laboratory test. A practical approach in the autoimmune laboratory. *Autoimmun Rev* 2009;8:543-48.
 12. Bossuyt X, Rasmussen N, Van Paassen P, et al. A multicentre study to improve clinical interpretation of proteinase-3 and myeloperoxidase anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *Rheumatol* 2017;56:1533-41.
 13. Rasmussen N, Damoiseaux J, Csernok E, et al. Individual values of antineutrophil cytoplasmic antibodies do not correspond between antigen-specific assays. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:39-42.
 14. Bossuyt X, Cohen Tervaert JW, Arimura Y, et al. Revised 2017 international consensus on testing of ANCA's in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. *Nat Rev Rheum* 2017;13:683-92.
 15. Mahler M, Damoiseaux J, Ballet V, et al. PR3-anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in ulcerative colitis. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:27-30.