

1 Autoantistofbepalingen in de diagnostiek van ANA-geassocieerde auto-immuunziekten

2 Uitgangsvragen en aanbevelingen

3 Uitgangsvragen

4 Wat is de rol van antinucleaire antistoffen (ANA) HEp-2 IIF test binnen de diagnostiek van ANA-
5 geassocieerde auto-immuunziekten?

6 Hoe passen alternatieve testen voor de HEp-2 IIF test binnen de diagnostiek van ANA-geassocieerde auto-
7 immuunziekten?

8

9 Aanbevelingen

10 *Minimumnorm*

11 1. Voor de diagnostiek voor ANA-geassocieerde auto-immuunziekten – systemische auto-
12 immuunziekten, auto-immuun hepatitis (AIH) en juveniele idiopathische artritis (JIA) – moet
13 het laboratorium beschikken over een compleet repertoire aan autoantistofbepalingen:

- 14 a. de HEp-2 IIF test;
- 15 b. solid-phase immunoassays waarbij anti-ENA-antistoffen worden aangetoond
16 specifiek voor CENP-B, Sm (overwegend SmD), SS-A/Ro52, SS-A/Ro60, SS-B/La,
17 topoisomerase I (Scl-70), U1RNP en Jo-1;
- 18 c. anti-dsDNA-antistof test;
- 19 d. testen voor een uitgebreider panel aan idiopathische inflammatoire myopathie (IIM)-
20 gerelateerde antistoffen ter ondersteuning van het spectrum van IIM (anti-synthetase
21 syndroom/overlap myositis, dermatomyositis, necrotiserende myositis); en
22 e. testen voor antistoffen specifiek voor systemische sclerose (minimaal RNA
23 polymerase III).

24 2. Bovenstaand repertoire aan autoantistofbepalingen dient onafhankelijk van elkaar
25 aangevraagd te kunnen worden, maar kan daarnaast in een testalgoritme ondervangen
26 worden. Het testalgoritme dient kenbaar gemaakt te worden aan de aanvrager.

27 3. Uitsluitend wanneer gebruik gemaakt wordt van de HEp-2 IIF test mag deze als ANA-test
28 aangeboden worden. Alleen in geval van een nucleair patroon mag de uitslag als ANA-positief
29 gerapporteerd worden.

30 4. Indien in plaats van de HEp-2 IIF test gebruik gemaakt wordt van een screentest voor anti-
31 ENA-antistoffen gebaseerd op een mengsel van gedefinieerde antigenen, moet de test als
32 ENA screen aangeboden worden en moet het resultaat als ENA screen gerapporteerd
33 worden.

34 5. Indien de HEp-2 IIF test positief is, moet het patroon vastgelegd worden volgens ICAP
35 nomenclatuur en definities (minimaal competent-level, m.u.v. het dicht fijn gespikkeld

36 patroon [AC-2] dat onder de streefnorm valt); hierbij dient een onderscheid gemaakt te
37 worden tussen nucleaire, cytoplasmatische en mitotische patronen. Minimaal het
38 centromeerpatroon (AC-3) dient gerapporteerd te worden.

- 39 6. Een positieve HEP-2 IIF test wordt semi-kwantitatief gerapporteerd (titer of
40 kleuringsintensiteit).
- 41 7. Een positieve HEP-2 IIF test met een nucleair patroon (dat wil zeggen ANA-positief) moet
42 gevolgd worden door een ENA screen dan wel directe uittypering van anti-ENA-antistoffen
43 minimaal gericht tegen Sm(D), SS-A/Ro52, SS-A/Ro60, SS-B/La, topoisomerase I (Scl-70) en
44 U1RNP (met uitzondering van een aanvraag in het kader van AIH of JIA).
- 45 8. Minimaal een homogeen en gespikkeld ANA patroon (AC-1 en AC-4 of AC-5) moet gevolgd
46 worden door een anti-dsDNA-antistofbepaling (met uitzondering van een aanvraag in het
47 kader van AIH of JIA).
- 48 9. Een positieve ENA screen moet gevolgd worden door uittypering van minimaal de acht
49 standaard-ENA (CENP-B, Sm(D), SS-A/Ro52, SS-A/Ro60, SS-B/La, topoisomerase I (Scl-70),
50 U1RNP en Jo-1). Indien de ENA screen dsDNA bevat, dient ook voor anti-dsDNA-antistoffen
51 getest te worden bij een positieve ENA screen.
- 52 10. Uitslagen van anti-ENA-antistoffen moeten voor alle acht standaard-ENA (CENP-B, Sm(D), SS-
53 A/Ro52, SS-A/Ro60, SS-B/La, topoisomerase I (Scl-70), U1RNP en Jo-1) afzonderlijk kwalitatief
54 gerapporteerd worden (dus ook de negatieve resultaten); indien het resultaat van een ENA
55 screen als negatief wordt gerapporteerd, kan worden volstaan met het aangeven welke ENA
56 in die test aanwezig zijn.
- 57 11. De gebruikte techniek voor het aantonen van anti-dsDNA-antistoffen dient kenbaar gemaakt
58 te worden aan de kliniek. Resultaten van anti-dsDNA-antistoffen dienen (semi)kwantitatief
59 gerapporteerd te worden.
- 60 12. In het kader van JIA en AIH biedt de ENA screen geen alternatief en is de HEP-2 IIF test de
61 aangewezen methode.

62

63 *Streefnorm*

- 64 I. Alle nucleaire en cytoplasmatische patronen in de HEP-2 IIF test dienen gerapporteerd te
65 worden volgens ICAP nomenclatuur en definities (minimaal competent-level).
- 66 II. Indien een persisterende klinische verdenking bestaat op een ANA-geassocieerde
67 (reumatische) auto-immuunziekte bij een negatieve HEP-2 IIF test, dan dient het inzetten van
68 een ENA-screen overwogen te worden. Indien een persisterende klinische verdenking bestaat
69 op een ANA-geassocieerde auto-immuunziekte bij een negatieve ENA screen, dan dient het
70 inzetten van een HEP-2 IIF test overwogen te worden.

- 71 III. Een positieve bevinding voor anti-dsDNA-antistoffen in het diagnostisch traject dient
72 bevestigd te worden met testen (Farr of Crithidia lucilae IIF test) die met hoge specificiteit
73 anti-dsDNA-antistoffen aantonen.
- 74 IV. Indien er een klinische verdenking is aangeduid voor IIM en geen anti-Jo-1-antistoffen
75 gevonden zijn, is het raadzaam om voor overige IIM-gerelateerde autoantistoffen te testen.
- 76 V. Indien er een klinische verdenking is aangeduid voor systemische sclerose is het effectief om
77 eerst te screenen met een ANA-test of een alternatieve screentest (HEp-2 IIF test of ENA
78 screen). Een positief resultaat in de screentest dient opgevolgd te worden door het
79 uittyperen voor anti-CENP-B en anti-Topoisomerase I (Scl-70) antistoffen; indien deze
80 autoantistoffen niet aangetoond worden, is het raadzaam om te testen voor overige SSc-
81 specifieke autoantistoffen (minimaal RNA polymerase III).

82 Onderbouwing

83 De test voor antinucleaire antistoffen (ANA) wordt traditioneel uitgevoerd met behulp van een
84 indirecte immunofluorescentie (IIF) techniek met HEp-2 cellen (of een variant hiervan, zoals HEp-
85 2000 of HEp-2010 cellen) als substraat. Het American College of Rheumatology (ACR) heeft
86 vastgesteld voor welke ziektebeelden een ANA test van toegevoegde waarde is [1]: de test is zeer
87 bruikbaar voor het stellen van een diagnose systemische lupus erythematosus (SLE) en
88 systemische sclerose (SSc), bruikbaar voor het stellen van een diagnose idiopathische
89 inflammatoire myopathie (IIM) en het Sjögren's syndroom (SjS), zeer bruikbaar voor het
90 monitoren en prognose van juvenile idiopathische arthritis (JIA) en het Raynaud fenomeen, en als
91 onderdeel van de diagnostische criteria onmisbaar bij het stellen van een diagnose mixed
92 connective tissue disease (MCTD), medicijn-geïnduceerde lupus en auto-immuun hepatitis (AIH).
93 Hierbij is het uitgangspunt dat enkel autoantistoffen gericht tegen kernbestanddelen als ANA-
94 positief gerapporteerd worden.

95 Na introductie van alternatieve testmethodes en de constatering dat met name SLE patiënten
96 een negatief testresultaat hadden met deze nieuwe methodes (niet HEp-2 IIF), is door het ACR
97 de HEp-2 IIF test uitgeroepen als de gouden standaard voor het bepalen van ANA [2]. Er is echter
98 ruimte voor alternatieve testen, mits deze even goed zijn als de HEp-2 IIF test en de gebruikte
99 testmethode gecommuniceerd wordt naar de aanvrager. In welke mate en voor welk ziektebeeld
100 de alternatieve testmethode "even goed" moet zijn, wordt echter niet gespecificeerd. De
101 aanbevelingen van de European Autoimmunity Standardization Initiative (EASI)/International
102 Union of Immunological Societies (IUIS) geven iets meer ruimte voor alternatieve methodes, mits
103 dit kenbaar gemaakt wordt naar de aanvrager en de mogelijkheid geboden wordt alsnog een
104 HEp-2 IIF resultaat te verkrijgen, eventueel via een verwijzingslaboratorium [3].

105 De vraag of de HEp-2 IIF test de meest geschikte screeningstest is voor het brede scala aan ANA-
106 geassocieerde aandoeningen is eigenlijk door de ACR al beantwoord [1]. Wel is bekend dat de
107 sensitiviteit van IIF voor antistofdetectie tegen SS-A/Ro60 en Jo-1 antigenen lager is in
108 vergelijking met antigeen-specifieke immunoassays [4, 5]. IIM-specifieke autoantistoffen
109 kunnen, met een beperkte sensitiviteit, wel aangetoond worden in de HEp-2 IIF test, maar met
110 name de anti-synthetase antistoffen laten een cytoplasmatisch patroon zien en zijn in strikte zin
111 geen ANA.

112 Deze richtlijn beperkt zich tot ANA-geassocieerde auto-immuunziekten, te weten systemische
113 auto-immuunziekten (IIM, MCTD, SjS, SLE en SSc), JIA en AIH, en doet uitspraken over de
114 laboratoriumbepalingen van ANA en gerelateerde autoantistoffen.

115

116 Interpretatie minimumnorm

- 117 1. De respectievelijke testen kunnen ook beschikbaar worden gesteld via een
118 verwijzingslaboratorium. Daar waar gesproken wordt over de HEp-2 IIF test, worden ook alle
119 andere HEp-2 varianten hiervan bedoeld (bijvoorbeeld HEp-2000 en HEp-2010).
- 120 2. Het te gebruiken testalgoritme is deels vastgelegd in de minimumnormen 6-8. Daarnaast
121 geven de streefnormen II-V verder richting aan het te gebruiken testalgoritme.
- 122 3. Het rapporteren van cytoplasmatische (en eventueel mitotische) patronen mag niet als ANA-
123 positief resultaat gerapporteerd worden. Rapportage van dergelijke patronen dient voor de
124 aanvrager onderscheidend van een ANA-positief testresultaat plaats te vinden. Bij het vinden
125 van dubbelpatronen worden alle patronen vastgelegd conform ICAP. Vastleggen van
126 patronen kan dienen om te bepalen welke vervolgstest het meest passend is (testalgoritme),
127 om de uitslag van solid-phase testen te verifiëren (kwaliteitscontrole) en om een veranderd
128 patroon in kaart te brengen.
- 129 4. De screentest voor anti-ENA-antistoffen wordt gedefinieerd als ENA screen, en moet als
130 zodanig kenbaar gemaakt worden aan de kliniek, zodat helder is dat dit geen ANA-test
131 betreft.
- 132 5. Vastlegging van de ICAP patronen kan beperkt blijven tot de zogeheten “competente”
133 patronen (zie [6]; www.anapatterns.org); alleen een nucleair patroon wordt als ANA-positief
134 geïnterpreteerd, conform ICAP. Het centromeer HEp-2 IIF patroon moet gerapporteerd
135 worden, omdat dit patroon als item telt in de ACR/EULAR criteria voor de classificatie van SSc
136 [7]. Bij een lage titer centromeer patroon is het raadzaam om een bevestigingstest voor anti-
137 CENP-B-antistoffen uit te voeren.
- 138 6. Indien gebruik gemaakt wordt van software-ondersteunde IIF microscopie kan gebruik
139 gemaakt worden van een titervoorspelling op basis van de verkregen resultaten in de
140 screenings-verdunning. Een screeningstiters van 1:80 is gebruikelijk voor de HEp-2 IIF test,

141 maar ieder laboratorium zal dit in zijn eigen populatie en setting moeten testen (met als doel
142 95% specificiteit). Zowel voor titer als voor kleuringsintensiteit is er bewijs dat hoe hoger de
143 titer/intensiteit, hoe waarschijnlijker sprake is van een systemische auto-immuunziekte [8,
144 9]. In het geval van dubbelpatronen of verdenking op pro-zone effect, is titratie raadzaam.

145 7. Bij een bevinding van een nucleair patroon in de HEp-2 IIF test, is uittypering voor Jo-1 niet
146 noodzakelijk omdat reactiviteit tegen Jo-1 een cytoplasmatisch beeld oplevert. Voor de
147 verdenking IIM is een rechtstreekse analyse van anti-Jo-1-antistoffen wenselijk. Uittypering
148 voor CENP-B is niet noodzakelijk, omdat het vinden van het centromeer HEp-2 IIF patroon in
149 principe afdoende is [7]. Indien uittypering niet automatisch kan plaatsvinden, dient het
150 advies gegeven te worden een uittypering aan te vragen.

151 8. Anti-dsDNA-antistoffen resulteren in een nucleair homogeen HEp-2 IIF patroon, al dan niet
152 gemaskeerd door nucleair gespikkelde HEp-2 IIF patronen. Afhankelijk van het testalgoritme,
153 kan een anti-dsDNA-antistofbepaling volgen op iedere ANA (met uitzondering van een
154 aanvraag in het kader van AIH en JIA). Indien toevoeging van anti-dsDNA antistoffen niet
155 automatisch kan plaatsvinden, dient het advies gegeven te worden deze test aan te vragen.

156 9. Indien de ENA screen niet alle acht standaard-ENA bevat, dient de ontbrekende specificiteit
157 in het testalgoritme ondervangen te worden. Indien uittypering niet automatisch kan
158 plaatsvinden, dient het advies gegeven te worden deze uittypering aan te vragen.

159 10. Het is afdoende om de uitslagen kwalitatief te rapporteren; indien een klinische verdenking
160 voor MCTD is uitgesproken is kwantitatieve rapportage van anti-RNP antistoffen te
161 overwegen, maar een afkapwaarde voor klinische relevantie is niet vastgesteld.

162 11. Kwantitatieve rapportage van anti-dsDNA-antistoffen is van klinisch belang voor monitoring
163 van ziekteactiviteit. Daarbij is het van belang dat altijd dezelfde techniek gebruikt wordt om
164 anti-dsDNA-antistoffen te monitoren.

165 12. De ANA die gevonden worden in patiënten met AIH zijn doorgaans niet gericht tegen de
166 standaard-ENA of dsDNA [10] terwijl dit voor JIA nog onduidelijk is. In het kader van JIA is het
167 vinden van ANA voorspellend voor het ontwikkelen van uveïtis, en heeft daarmee directe
168 behandelconsequenties [11]. In het kader van AIH is het vermeldenswaardig dat de gevonden
169 ANA titer in de HEp-2 IIF test door een factor 2 gedeeld moet worden voor de diagnostische
170 criteria voor AIH (die gebaseerd zijn op het aantonen van ANA in levercoupes) [10]. In de
171 praktijk betekent dit, dat voor de diagnose AIH bij het item ANA 1 dan wel 2 punten behaald
172 worden bij een HEp-2 IIF titer ≥ 80 dan wel ≥ 160 , respectievelijk. Het laboratorium moet alert
173 zijn dat de titer mede wordt bepaald door zaken als de gebruikte HEp-2 cellijnvariant,
174 apparatuur en conjugaat.

175

176 Interpretatie streefnorm

- 177 I. De klinische relevantie van mitotische patronen is niet duidelijk en rapportage ervan wordt
178 daarom niet aanbevolen [6]. In tegenstelling tot de minimumnorm impliceert deze
179 streefnorm wel het vastleggen en rapporteren van het nucleaire dicht fijn gespikkeld patroon
180 (AC-2).
- 181 II. De HEp-2 IIF test kan beperkter sensitief voor anti-SS-A/Ro60-, anti-SS-A/Ro52- en anti-Jo-1-
182 antistoffen zijn. De ENA screen kan beperkter sensitief zijn voor nog onbekende of niet
183 beschikbare antigenen. Daarom wordt aanbevolen bij een persisterende klinische verdenking
184 van een ANA-geassocieerde (reumatische) auto-immuunziekte alsnog een ENA screen (bij
185 een negatieve HEp-2 IIF test) of een HEp-2 IIF test (bij een negatieve ENA screen) in te zetten.
- 186 III. Door EASI/IUIS worden de Farr-assay en de Crithidia lucilae IIF test (CLIFT) als meest geschikt
187 beoordeeld, omdat andere immunoassays minder specifiek zijn voor SLE. Daarom wordt
188 aanbevolen om in het diagnostisch traject een positieve bevinding in een alternatieve
189 immunoassay te bevestigen met de Farr-assay of de CLIFT. Dit is met name van belang bij
190 laag-positieve bevindingen, maar het is niet mogelijk hiervoor een afkapwaarde te definiëren.
191 De huidige beschikbare solid-phase testen zijn beperkt specifiek.
- 192 IV. Negatieve uitslagen van de HEp-2 IIF test en van anti-Jo-1-antistoffen zijn niet sensitief
193 genoeg om (het spectrum van) IIM betrouwbaar uit te sluiten.
- 194 V. In plaats van een multiplex immunoassay voor SSc-specifieke autoantistoffen kan eventueel
195 volstaan worden met een test voor anti-RNA polymerase III antistoffen.

196

197 **Conclusies**

198 Met hoog vertrouwen wordt geconcludeerd dat:

- 199 1. de bepaling van ANA een grote toegevoegde waarde heeft in de diagnostiek van ANA-geassocieerde
200 aandoeningen, mits uitgevoerd in de juiste klinische context [1, 2];
- 201 2. alternatieven voor de HEp-2 IIF test een volwaardige mogelijkheid kunnen bieden om ANA-
202 geassocieerde aandoeningen te diagnosticeren [3].
- 203 3. voor optimale diagnostiek zowel de HEp-2 IIF test als solid-phase testen noodzakelijk zijn.

204

205 **Referenties**

- 206 1. Solomon, D.H., et al., *Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear*
207 *antibody testing*. Arthritis Care & Research, 2002. **47**(4): p. 434-444.
- 208 2. Meroni, P.L. and P.H. Schur, *ANA screening: an old test with new recommendations*. Annals of the
209 rheumatic diseases, 2010. **69**(8): p. 1420-1422.
- 210 3. Agmon-Levin, N., et al., *International recommendations for the assessment of autoantibodies to*
211 *cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies*. Annals of the rheumatic diseases, 2014.
212 **73**(1): p. 17-23.
- 213 4. Bossuyt, X. and A. Luyckx, *Antibodies to extractable nuclear antigens in antinuclear antibody-*
214 *negative samples*. Clinical Chemistry, 2005. **51**(12): p. 2426-2427.

- 215 5. Yazdany, J., et al., *Choosing wisely: the American College of Rheumatology's Top 5 list of things*
216 *physicians and patients should question*. Arthritis care & research, 2013. **65**(3): p. 329-339.
- 217 6. Damoiseaux, J., et al., *Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: the*
218 *International consensus on ANA patterns (ICAP) perspective*. Annals of the rheumatic diseases,
219 2019. **78**(7): p. 879-889.
- 220 7. Van Den Hoogen, F., et al., *2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College*
221 *of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative*. Arthritis &
222 Rheumatism, 2013. **65**(11): p. 2737-2747.
- 223 8. De Beeck, K.O., et al., *Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by*
224 *solid phase assay*. Autoimmunity reviews, 2011. **10**(12): p. 801-808.
- 225 9. Oyaert, M., et al., *Added value of indirect immunofluorescence intensity of automated antinuclear*
226 *antibody testing in a secondary hospital setting*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine,
227 2016. **54**(2): p. e63-e66.
- 228 10. Hennes, E.M., et al., *Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis*. Hepatology,
229 2008. **48**(1): p. 169-176.
- 230 11. Giancane, G., et al., *Juvenile idiopathic arthritis: diagnosis and treatment*. Rheumatology and
231 therapy, 2016. **3**(2): p. 187-207.

232

233

234 Verantwoording

235 Autorisatiedatum en geldigheid

236 Uiterlijk in 2025 bepaalt het bestuur van het College van Medisch Immunologen (CMI) of deze module
237 nog actueel is. Zo nodig wordt een nieuwe werkgroep geïnstalleerd om de richtlijn te herzien.

238 De commissie Richtlijnen van het CMI is als houder van deze richtlijn(module) de eerstverantwoordelijke
239 voor het actueel houden van deze richtlijn. De andere aan deze richtlijn deelnemende wetenschappelijke
240 verenigingen of gebruikers van de richtlijn delen de verantwoordelijkheid en informeren de
241 eerstverantwoordelijke over relevante ontwikkelingen binnen hun vakgebied.

242 Doel en doelgroep

243 Deze richtlijn heeft als doel vast te stellen hoe ANA en ENA testen in het kader van de diagnostiek van
244 ANA-geassocieerde (reumatische) aandoeningen optimaal uitgevoerd, geïnterpreteerd en gerapporteerd
245 moeten worden. Doelgroep van deze richtlijn zijn laboratoriumspecialisten verantwoordelijk voor de
246 ANA- en ENA-diagnostiek en medisch specialisten verantwoordelijk voor de diagnostiek van ANA-
247 geassocieerde reumatische aandoeningen. De commissie Richtlijnen van het CMI heeft het initiatief
248 genomen om deze richtlijn te laten ontwikkelen en zal deze autoriseren.

249 Samenstelling werkgroep

250 De werkgroep bestaat uit Adriaan van Beek, Marco Schreurs, Henny Otten, Ferry Bergkamp en Jan
251 Damoiseaux.

252 Belangenverklaring

253 De werkgroepleden hebben schriftelijk verklaard of ze in de laatste vijf jaar een (financieel ondersteunde)
254 betrekking onderhielden met commerciële bedrijven, organisaties of instellingen die in verband staan met
255 het onderwerp van de richtlijn. Ook is navraag gedaan naar persoonlijke financiële belangen, belangen
256 door persoonlijke relaties, belangen d.m.v. reputatiemanagement, belangen vanwege extern gefinancierd
257 onderzoek en belangen door kennisvalorisatie. De belangenverklaringen zijn op te vragen bij het
258 secretariaat van het Kennisinstituut van Medisch Specialisten (KiMS). Een overzicht is hieronder
259 gepresenteerd.

Naam	Belangen	Toelichting
Adriaan van Beek	Nee	
Marco Schreurs	Ja (sprekersvergoeding van Thermo-Fisher en Biogen)	
Henny Otten	Nee	
Ferry Bergkamp	Nee	
Jan Damoiseaux	Ja (sprekersvergoeding van Euroimmun, Thermo-Fisher en Werfen/Inova)	

260

261 **Werkwijze – methode ontwikkeling**

262 Voor deze richtlijn is geen systematische literatuursearch verricht maar wel gebruik gemaakt van
263 internationale ANA consensus rapporten, relevante publicaties en de praktische implementeerbaarheid
264 van deze richtlijn. De richtlijn is opgesteld conform het document Richtlijn Commissie Richtlijnen CMI

265 **Zoekverantwoording**

266 N.v.t.

267 **Kennislacune**

268 In hoeverre zijn kwantitatieve uitslagen voor ENA relevant voor diagnose of monitoring van
269 ziekteactiviteit?

270

271