

CAT
Critically Appraised Topic

Kwantificatie van anti-dubbelstrengs DNA antistoffen: uitdagingen in het GZA ziekenhuis

Auteur: Dr. Philippe Willems
Supervisor: Apr. Biol. Sofie Schouwers

CLINICAL BOTTOM LINE

Systemische lupus erythematosus (SLE) is een chronische systeemziekte met een zeer divers klinisch beeld, waardoor het moeilijk is om deze diagnose te stellen op basis van klinische bevindingen alleen. Er zijn verschillende immunologische parameters die, aanvullend op de klinische presentatie van de patiënt, kunnen helpen om een onderscheid te maken met andere systemische reumatoïde aandoeningen (SRD) zoals bv. het syndroom van Sjögren, systeem sclerose, Deze parameters worden in verschillende SLE classificatiecriteria onder andere gespecificeerd als de aanwezigheid van antistoffen tegen nucleaire antigenen (ANA's) en anti-dubbelstrengs DNA antistoffen (anti-dsDNA antistoffen) in een abnormaal hoge titer. ANA's hebben een hoge sensitiviteit voor SLE en zijn hiervoor dus een goede screeningstest. Anti-dsDNA antistoffen hebben een specificiteit voor SLE van bijna 100 % en kunnen gebruikt worden als confirmatietest. Aangezien de concentratie aan anti-dsDNA antistoffen zou correleren met de SLE ziekteactiviteit, is kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen aanbevolen. Omdat dit momenteel nog niet gebeurt, zijn wij in het GZA ziekenhuis op zoek naar een methode om deze te kunnen kwantificeren. Er zijn verschillende technieken waarmee anti-dsDNA antistoffen opgespoord en/gekwantificeerd kunnen worden: indirecte immuunfluorescentie van *Crithidia luciliae* (CLIFT), radioimmunoassays (RIA's) en enzyme immunoassays (EIA's). Uit een literatuurstudie kon, voor de setting van het GZA ziekenhuis, geen duidelijk beste methode voor de kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen weerhouden worden. Verder bleek dat anti-nucleosoom antistoffen een beloftevol alternatief vormen voor de diagnose en follow-up van SLE. Om deze redenen werd in het GZA ziekenhuis een vergelijkende studie opgezet waarin de technische en klinische performantie van volgende testen zal vergeleken worden binnen de populatie van het GZA ziekenhuis:

- CLIFT met DAPI-conjugaat op het QUANTA-lyser® platform met aflezing op Nova View® (allen van Werfen, Barcelona, Spanje)
- QUANTA Lite® HA dsDNA ELISA (FARRZYME; Werfen, Barcelona, Spanje) op het QUANTA-lyser® platform
- Anti-dsDNA-NcX IgG ELISA (ANuA; Euroimmun AG, Lübeck, Duitsland) op het QUANTA-lyser® platform
- QUANTA flash® dsDNA (QUANTAFLASH) op het BIO-FLASH® platform (beide van Werfen, Barcelona, Spanje)

Op het moment van publicatie van deze CAT was het experimenteel luik van deze studie nog lopende.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Systemische lupus erythematosus (SLE) is een systeemziekte die vooral de huid, gewrichten en nieren aantast. Het klinisch beeld van SLE is zeer divers, wat een diagnose op basis van klinische bevindingen alleen meestal in de weg staat. Aangezien de behandeling het meest doeltreffend is in een vroeg stadium van de ziekte, heeft laboratoriumdiagnostiek hier een duidelijke toegevoegde waarde [1]. Serologische parameters voor SLE zijn, naast klinische bevindingen, opgenomen in de SLE-criteria van 'the American College of Rheumatology'. Deze worden onder andere gespecificeerd als de aanwezigheid van antistoffen tegen nucleaire antigenen (ANA's) en anti-DNA antistoffen in een abnormaal hoge titer [2].

Anti-DNA antistoffen is een breed begrip dat zowel aspecifieke antistoffen als SLE-specifieke antistoffen omvat. Aspecifieke DNA antistoffen kunnen gericht zijn tegen verschillende antigenen zoals bv. single stranded DNA, zijn meestal van het IgM isotype en vertonen doorgaans een lage aviditeit voor DNA. SLE-specifieke antistoffen zijn gericht tegen dubbelstrengs DNA (dsDNA), zijn meestal van het IgG isotype en vertonen doorgaans een hoge aviditeit voor DNA.

ANA's hebben een gevoeligheid voor SLE van meer dan 95 %, de gemiddelde specificiteit voor SLE wordt geschat op 57 % [3-4]. Anti-dsDNA antistoffen daarentegen hebben een specificiteit voor SLE van bijna 100 %; de gerapporteerde gevoeligheid varieert in verschillende studies tussen 25 % en 85 %. ANA's zijn dus een

goede screeningstest voor SLE, maar aanvullende diagnostiek van positieve stalen met een confirmatietest, zoals de bepaling van anti-dsDNA antistoffen, is aangewezen [4]. Deze strategie wordt ook toegepast voor de terugbetaling door het RIZIV van ‘antilichamen gericht tegen een specifiek nucleair antigen’ (RIZIV nomenclatuur artikel 24, diagnoseregulering 28). In het klinisch laboratorium van het GZA ziekenhuis worden alle ANA positieve stalen, getest met indirecte immunofluorescentie (IIF), onder andere verder getest voor de aanwezigheid van anti-dsDNA antistoffen en antistoffen tegen extraheerbare nucleaire antigenen (ENA).

Verschillende studies tonen een correlatie tussen de concentratie aan anti-dsDNA antistoffen en de SLE ziekteactiviteit [5]. Een stijging van de concentratie aan anti-dsDNA antistoffen zou mogelijks een klinische opstoot van SLE enkele weken kunnen voorafgaan [6, 7]. In de richtlijnen gepubliceerd door Tozzoli et al. in 2002 wordt dan ook geadviseerd om gediagnosticeerde SLE patiënten op regelmatige basis op te volgen met onder andere de bepaling van anti-dsDNA antistoffen [8].

In 2014 werden Belgische aanbevelingen gepubliceerd voor de bepaling van ANA en anti-dsDNA antistoffen. In deze aanbevelingen wordt gesteld dat anti-dsDNA antistoffen kwantitatief gerapporteerd moeten worden, samen met de techniek waarmee de antistoffen gedetecteerd werden. Verder raden zij ook af om hiervoor een dot analyse te gebruiken en wordt er benadrukt dat IIF op *Crithidia luciliae* (CLIFT) hiervoor een weinig gevoelige techniek is [9][22]. Aangezien anti-dsDNA antistoffen in het GZA ziekenhuis momenteel kwalitatief gerapporteerd worden op basis van CLIFT, wil ik naar aanleiding van deze richtlijnen nagaan wat de mogelijkheden zijn om anti-dsDNA antistoffen te kwantificeren in de setting van dit ziekenhuis.

QUESTION(S)

- 1) Vraag 1: Welke laboratoriumtesten zijn er beschikbaar voor de detectie en kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen en wat is hun performantie?
- 2) Vraag 2: Wat is de waarde van anti-nucleosoom antistoffen voor de laboratoriumdiagnostiek van SLE?
- 3) Vraag 3: Hoe kan de bepaling van anti-dsDNA antistoffen in het klinisch laboratorium van het GZA ziekenhuis geoptimaliseerd worden?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: "antibodies, antinuclear"[MeSH Terms] AND "quantification[All Fields]"
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)
- 3) Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>): "anti-dsDNA antibodies"
- 4) American College of Rheumatology (www.acr.org)
- 5) UpToDate Online version (2014-2015)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

- 1) Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)
 - Solomon, D.H., et al., *Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing*. Arthritis Rheum, 2002. **47**(4): p. 434-44.
 - Kavanaugh, A., et al., *Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens*. American College of Pathologists. Arch Pathol Lab Med, 2000. **124**(1): p. 71-81.
 - Van Blerk, M., et al., *Belgian recommendations on ANA, anti-dsDNA and anti-ENA antibody testing*. Acta Clin Belg, 2014. **69**(2): p. 83-6.
 - Tozzoli, R., et al., *Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases*. Am J Clin Pathol, 2002. **117**(2): p. 316-24.
- 2) Systematic Reviews and Meta-analyses
 - Bizzaro, N., et al., *Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker than anti-dsDNA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and a study of metanalysis*. Autoimmun Rev, 2012. **12**(2): p. 97-106.
- 3) Reviews
 - Hochberg, M.C., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(9): p. 1725.
 - Rouquette, A.M. and C. Desgruelles, *Detection of antibodies to dsDNA: an overview of laboratory assays*. Lupus, 2006. **15**(7): p. 403-7.
 - Ghirardello, A., et al., *Diagnostic accuracy of currently available anti-double-stranded DNA antibody assays. An Italian multicentre study*. Clin Exp Rheumatol, 2011. **29**(1): p. 50-6.
- 4) Original Articles
 - Fiegel, F., et al., *Autoantibodies to double-stranded DNA--intermethod comparison between four commercial immunoassays and a research biosensor-based device*. Lupus, 2010. **19**(8): p. 957-64.
 - Bootsma, H., et al., *Prevention of relapses in systemic lupus erythematosus*. Lancet, 1995. **345**(8965): p. 1595-9.
 - Bootsma, H., et al., *Anti-double stranded DNA antibodies in systemic lupus erythematosus: detection and clinical relevance of IgM-class antibodies*. Scand J Rheumatol, 1996. **25**(6): p. 352-9.
 - ter Borg, E.J., et al., *Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study*. Arthritis Rheum, 1990. **33**(5): p. 634-43.10.
 - Aarden, L.A., E.R. de Groot, and T.E. Feltkamp, *Immunology of DNA. III. Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique*. Ann N Y Acad Sci, 1975. **254**: p. 505-15.

- Antico, A., et al., *Diagnosing systemic lupus erythematosus: new-generation immunoassays for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the Crithidia luciliae immunofluorescence test*. *Lupus*, 2010. **19**(8): p. 906-12.
 - Satoh, M., et al., *Titration emulsion: a computer-assisted technique that simplifies the quantification of anti-dsDNA antibodies using the Crithidia luciliae assay*. *Lupus*, 2001. **10**(9): p. 632-6.
 - Bertin, D., et al., *Original approach for automated quantification of antinuclear autoantibodies by indirect immunofluorescence*. *Clin Dev Immunol*, 2013. **2013**: p. 182172.
 - Lim, T., et al., *Automated detection of anti-double-stranded DNA antibody in systemic lupus erythematosus serum by flow immunoassay*. *Anal Chem*, 1999. **71**(7): p. 1298-302.
 - Launay, D., et al., *Comparison of the Farr radioimmunoassay, 3 commercial enzyme immunoassays and Crithidia luciliae immunofluorescence test for diagnosis and activity assessment of systemic lupus erythematosus*. *Clin Chim Acta*, 2010. **411**(13-14): p. 959-64.
 - Mohan, C., et al., *Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus*. *J Exp Med*, 1993. **177**(5): p. 1367-81.
 - Isenberg, D.A., et al., *Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end?* *Rheumatology (Oxford)*, 2007. **46**(7): p. 1052-6.
 - Li, T., et al., *Anti-nucleosome antibodies outperform traditional biomarkers as longitudinal indicators of disease activity in systemic lupus erythematosus*. *Rheumatology (Oxford)*, 2015. **54**(3): p. 449-57.
- 5) Reference Works, Handbooks and Databases
- Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry (Sixth edition)
 - Medical Statistics at a Glance (Third edition)
- 6) Posters, "grey literature", presentations
- Berth M., Debeuf P. (2012, Oktober). Anti-double stranded DNA antibodies: evaluation using six different methods in het laboratory serving general physicians. Poster gepresenteerd op het jaarlijks symposium van de Belgische Vereniging voor Klinische Biologie van 2012, Gent, België.
 - Aanbevelingen van het expertencomité voor niet-infectieuze serologie, globaal rapport WIV 2013/2.

Vraag 1: Welke laboratoriumtesten zijn er beschikbaar voor de detectie en kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen en wat is hun performantie?

Er bestaan verschillende laboratoriumtesten om anti-dsDNA antistoffen op te sporen en/of kwantificeren in serum. In een eerste stap ga ik aan de hand van een literatuurstudie na welke technieken er momenteel beschikbaar zijn voor de detectie en kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen. In een tweede stap ga ik de performantie van de verschillende testen bespreken aan de hand van enkele vergelijkende studies.

- Welke testen zijn er beschikbaar voor de detectie en kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen.

- Indirecte Immunofluorescentie van *Crithidia luciliae* (CLIFT)

In een publicatie van Aarden et al. uit 1975 wordt voor het eerst beschreven dat het mitochondriaal DNA in de kinetoplast van de *Crithidia luciliae*, behorend tot de geflagelleerde protozoa, gebruikt kan worden als substraat voor de detectie van anti-dsDNA antistoffen met behulp van IIF [10]. Deze techniek detecteert enkel IgG antistoffen met een gemiddelde of hoge aviditeit voor anti-dsDNA. De aanwezigheid van histonen in de kinetoplast en van lipoproteïne-IgG complexen in het staal zou vals positieve resultaten kunnen genereren [11]. De CLIFT is relatief gebruiksvriendelijk, maar de performantie is afhankelijk van de ervaring van de microscopist en de bepaling van antistoffen met CLIFT is doorgaans kwalitatief [8, 12, 13]. Door de analyse te herhalen op een seriële dilutie van positief staal of de sterkte van de fluorescentie te scoren is het wel mogelijk om alsnog een semi-kwantitatief resultaat te rapporteren [14]. In een studie van Ter Borg et al. uit 1990 wordt echter geconcludeerd dat het gebruik van een seriële dilutie voor de kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen suboptimaal is om de ziekteactiviteit van SLE te monitoren [7]. Recent werd een commerciële kit met aangepast conjugaat op de markt gebracht die toelaat om de fluorescentie met een automatische microscoop af te lezen en zo een semi-kwantitatief resultaat voor anti-dsDNA antistoffen te genereren (CLIFT met DAPI conjugaat op Nova View®, beide van Werfen, Barcelona, Spanje).

- Radioimmunoassays (RIA)

- Farr analyse

Het principe van de Farr analyse berust op de precipitatie van radioactief gelabeld dsDNA met anti-dsDNA antistoffen bij een hoge zoutconcentratie. Deze techniek detecteert hoofdzakelijk IgM en IgG antistoffen met een hoge aviditeit voor dsDNA en wordt aanzien als de gouden standaard wat specificiteit voor SLE betreft [11]. Het is mogelijk om de titer van anti-dsDNA antistoffen met de Farr analyse te bepalen en zo de ziekteactiviteit van SLE op te volgen [14, 15]. De grootste nadelen van deze analyse zijn de arbeidsintensiteit en het gebruik van radioactieve reagentia [11].

- Polyethyleenglycol (PEG) assay

De PEG assay is een RIA welke gebruik maakt van radioactief gelabeld dsDNA als antigeen. Complexen gevormd tussen dsDNA en anti-DNA antistoffen wordt van elkaar gescheiden met behulp van een PEG-precipitatie. Deze analyse is gevoelig voor interferentie door aspecifieke binding van dsDNA met serumproteïnen [11].

- Enzyme immunoassay (EIA)

- Klassieke enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Het principe van ELISA's berust op het gebruik van een microtiterplaat, gecoat met dsDNA als substraat. Na applicatie van het staal worden enzyme-geconjugeerde antistoffen toegevoegd die gericht zijn tegen anti-dsDNA antistoffen. Het enzyme katalyseert een chemische reactie van waaruit de hoeveelheid antistof spectrofotometrisch bepaald kan worden. Er zijn verschillende commercieel beschikbare ELISA kits die anti-dsDNA antistoffen opsporen. Deze ELISA kits verschillen onderling onder andere in het dsDNA dat als antigeen gebruikt wordt, waardoor een verschil in performantie verwacht kan worden. ELISA's zijn over het algemeen gevoelige technieken waarmee IgG met zowel hoge als lage aviditeit voor dsDNA opgespoord kunnen worden [11]. De specificiteit van deze methode is minder goed aangezien opgespoorde antistoffen met lagere affiniteit ook aanwezig kunnen zijn bij andere ziektebeelden en bij gezonde

personen. De belangrijkste voordelen van het gebruik van ELISA's is de mogelijkheid om resultaten te kwantificeren en om de techniek te automatiseren [12].

- Fluorometrische Enzyme ImmunoAssay (FEIA)

Het principe van deze test is grotendeels vergelijkbaar met dat van ELISA's. In tegenstelling tot bij klassieke ELISA's wordt de aanwezigheid van anti-dsDNA antistoffen bij de FEIA gedetecteerd door het gebruik van met beta-galactosidase geconjugeerde antistoffen die een fluorescent signaal genereren na toevoeging van het substraat. Deze techniek zou specifiek zijn dan klassieke ELISA's door het toepassen van een wasstap die de binding van anti-dsDNA antistoffen met een lage aviditeit tegengaat [11, 12]. Ook met deze techniek kunnen anti-dsDNA antistoffen gekwantificeerd worden. De EliA™ (Phadia, Freiburg, Duitsland) is een voorbeeld van een geautomatiseerde FEIA die ontwikkeld is voor gebruik op het Immunocap™ platform (Phadia, Freiburg, Duitsland).

- Enzyme immunoassay op basis van chemoluminescentie (CLIA)

Deze assay berust eveneens op het principe van een klassieke ELISA, maar gebruikt chemoluminescentie voor de detectie van de antistoffen. Er zijn verschillende commerciële CLIA kits beschikbaar voor de detectie en kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen. De Liaison® dsDNA analyse is bijvoorbeeld ontwikkeld voor gebruik op het Liaison® platform van DiaSorin (Saluggia, Italië). Deze techniek zou relatief specifiek zijn voor de diagnose van SLE [11, 12]. Verder is er o.a. door Werfen (Barcelona, Spanje) een CLIA kit op de markt gebracht (QUANTA Flash® dsDNA) die ontwikkeld is voor gebruik op het BIO-FLASH® platform (Werfen, Barcelona, Spanje).

In de literatuur worden nog verschillende alternatieve technieken beschreven om anti-dsDNA antistoffen te kwantificeren. Zo werd in een studie van Bertin et al. uit 2013 in een groep van SLE patiënten een significante correlatie ($p < 0.01$) aangetoond tussen anti-dsDNA antistoffen, opgespoord met de EliA™, en een berekende fluorescentie index die een maat is voor de ANA fluorescentie ter hoogte van de kernregio. In hoeverre dit toepasbaar is voor de monitoring van SLE patiënten, moet nog verder onderzocht worden [15]. In een studie van Satoh et al. uit 2001 werd het gebruik van titratie emulatie van CLIFT analyses (Image Titer®, Rhigene inc., Des Plaines, US) vergeleken met conventionele titratie. Met titratie emulatie wordt de titer van anti-dsDNA

antistoffen geschat door de intensiteit van een fluorescentie signaal te vergelijken met een standaardcurve. In de studie wordt geconcludeerd dat het gebruik van titratie emulatie van CLIFT analyses een kosteneffectief en minder arbeidsintensief alternatief is voor de kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen met behulp van CLIFT op seriële diluties [14]. Verder wordt er in een studie van Lim et al. uit 1999 een methode beschreven om anti-dsDNA antistoffen op te sporen met behulp van flowcytometrie [16]. In de toekomst biedt de ontwikkeling van microarrays met immunologische targets en multiplex immunoassay mogelijk nog nieuwe opportuniteiten [11]. Deze laatste technieken zijn vaak nog experimenteel of worden nog niet op grote schaal toegepast omwille van financiële of praktische beperkingen. Aangezien ze niet meteen toepasbaar zijn in de setting van het GZA ziekenhuis, vallen ze buiten de scope van deze literatuurstudie.

- **Wat is de performantie van deze technieken?**

In een studie van Antico et al. uit 2010 werd de diagnostische performantie vergeleken tussen vier EIA's, een Farr assay (Immuno Biological Laboratories, Hamburg, Duitsland) en CLIFT (Euroimmun, Lübeck, Duitsland). Volgende EIA's werden in de studie geëvalueerd: de Liaison® dsDNA analyse (Diasorin, Saluggia, Italië) op basis van chemoluminescentie, de EliA™ dsDNA analyse (Phadia, Freiburg, Duitsland) die gebruik maakt van fluorescentie en twee klassieke ELISA's: de Organtec anti-dsDNA analyse (Organtec, Mainz, Duitsland) en Diastat™ analyse (Axis-shield Diagnostics, Dundee, VK). De populatie bestond uit 52 SLE patiënten, 28 patiënten met andere systemische reumatoïde aandoeningen (SRD's) dan SLE, 36 patiënten met een hepatitis C infectie en 24 patiënten met andere acute virale infecties. De performantiekarakteristieken van de verschillende testen zijn opgelijst in tabel 1. Alle geëvalueerde EIA's, met uitzondering van de EliA™ dsDNA analyse, waren gevoeliger dan de CLIFT en Farr assay. De specificiteit van de EIA's was vergelijkbaar met die van CLIFT en Farr analyse, met uitzondering van de Liaison® dsDNA analyse die minder specifiek was. In deze studie wordt geconcludeerd dat de bestudeerde EIA's een goed alternatief bieden voor de CLIFT en de Farr analyse. De CLIFT toonde in deze studie een dermate lage sensitiviteit dat de waarde ervan voor het screenen naar anti-dsDNA antistoffen in twijfel getrokken wordt [12].

In een gelijkaardige studie van Launay et al. uit 2010 werd de diagnostische performantie van de Farr assay (Trinity Biotech, Bray, Ierland), CLIFT (Diasorin, Antony, Frankrijk) en drie EIA's (Liaison® dsDNA analyse, de

EliA™ dsDNA analyse en de Diastat™ analyse) vergeleken. De populatie bestond uit 99 SLE patiënten, 53 patiënten met andere SRD's dan SLE en 101 gezonde patiënten. De performantiekarakteristieken van de verschillende testen, met als controlegroep patiënten met andere SRD's dan SLE, zijn opgelijst in tabel 1. De specificiteit van de Liaison® dsDNA, EliA™ dsDNA, Diastat™, CLIFT en Farr analyse ten opzichte van gezonde vrijwilligers was respectievelijk 96.0 %, 95.0 %, 94.1 %, 100.0 % en 98 %. De specificiteit ten opzichte van patiënten met andere SRD's dan SLE was respectievelijk 84.9 %, 94.3 %, 86.8 %, 100 % en 79.2 %. Ten opzichte van de controlegroep met andere SRD's dan SLE lag de specificiteit dus voor elke methode lager dan ten opzichte van de controlegroep met gezonde vrijwilligers. Dit illustreert dat de specificiteit van een test afhankelijk is van de gebruikte controlepopulatie. Gezien SLE patiënten in de klinische praktijk vooral van patiënten met andere SRD's dan SLE onderscheiden moeten worden, is de specificiteit berekend ten opzichte van deze controlegroep klinisch gezien meer relevant dan de specificiteit berekend ten opzichte van gezonde vrijwilligers. In de studie wordt geconcludeerd dat de Farr assay de beste performantie heeft om patiënten met SLE te diagnosticeren. De CLIFT toonde een zwakke sensitiviteit maar uitstekende specificiteit ten opzichte van patiënten met andere SRD's dan SLE. De performantie van de EIA's was wisselend [17].

In een studie van Fiegel et al. uit 2010 werden volgende vier commercieel beschikbare analyses vergeleken: de Farr assay (Trinity Biotech, Bray, Ierland), de Elia™ dsDNA analyse en twee klassieke ELISA's, namelijk de Bindazyme anti-dsDNA analyse en de Farrzyme (beide van The Binding Site Ltd, Birmingham, VK). De bestudeerde populatie bestond uit 50 patiënten met SLE, 39 patiënten met andere SRD's dan SLE en 20 gezonde vrijwilligers. De performantiekarakteristieken van de verschillende analyses zijn opgelijst in tabel 1. In de studie wordt geconcludeerd dat alle geëvalueerde methodes een goede performantie hebben voor de detectie van anti-dsDNA antistoffen. De beste performantie werd gezien met de EliA™ en Bindazyme analyse [1].

In een studie van Ghirardello et al. uit 2011 werd de diagnostische performantie voor het detecteren van anti-dsDNA antistoffen vergeleken tussen de Farrzyme analyse, de EliA™ dsDNA analyse, CLIFT (Inova Diagnostics, San Diego, VS) en een in huis gevalideerde Farr assay. De populatie bestond uit 223 SLE patiënten, 55 gezonde personen en 161 disease controls met virale infecties (n = 64), andere SRD's dan SLE (n = 64), cryoglobulinemie (n = 27) en neoplastische aandoeningen (n = 6). De performantiekarakteristieken van de verschillende analyses zijn opgelijst in tabel 1. Tegen de verwachting in, was de Farr analyse het meest gevoelig, gevolgd door de

CLIFT. De globale specificiteit van de vier testen was vergelijkbaar. De specificiteit van de Farrzyme, Farr assay, EliA™ en CLIFT ten opzicht van de populatie met andere SRD's dan SLE was respectievelijk 92 %, 75 %, 83 % en 81 %. De verrassend lage specificiteit van de Farr analyse zou kunnen verklaard worden door het feit dat er in deze studie gewerkt werd met een in-huis ontwikkelde Farr analyse waarvan de afkapwaarde werd bepaald in een populatie met gezonde vrijwilligers. Verder toonden de kwantitatieve resultaten van de Farrzyme, EliA™ en CLIFT onderling een significante correlatie ($p < 0.0001$) [13].

In een studie van Berth et al. uit 2012 werden uit 4128 consecutieve stalen, ingestuurd door huisartsen, 43 stalen weerhouden met een positief resultaat voor ANA's én grijze zone of positieve resultaten voor anti-dsDNA antistoffen met de EliA™ dsDNA analyse. Deze stalen werden vervolgens opnieuw geanalyseerd met volgende vijf technieken: CLIFT (Immunoconcepts, Sacramento, VS), de nucleosome DOT kit (Alphadia, Waver, België), de anti-dsDNA-NcX ELISA (Euroimmun), de anti-dsDNA microplaat EIA (Bio-Rad Kallestad) en Quanta Lite dsDNA SC ELISA (Inova Diagnostics, San Diego, VS). Aangezien bij de inclusie van de stalen geen rekening gehouden werd met de klinische gegevens van de patiënt, konden voor de geëvalueerde methoden geen performantiekarakteristieken berekend worden. Het aantal stalen met een positief of grijze zone resultaat varieerde sterk tussen de verschillende methodes, met een minimum van drie stalen met de CLIFT. Dit illustreert de grote variatie in performantie van verschillende technieken voor de detectie en/of kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen [23].

Tabel 1: Performantiekarakteristieken van verschillende analyses die anti-dsDNA antistoffen opsporen, op basis van enkele vergelijkende studies

Studie	Analyse	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)	AUC ⁵
Antico et al., 2010 ¹	Liaison®	84.6	82.9	0.832
	EliA™	73.0	97.7	0.901
	Organtec	82.7	96.5	0.883
	Diastat™	84.6	94.3	0.933
	CLIFT	55.8	96.5	ND
	Farr	78.8	90.9	0.897
Launay et al., 2010 ²	Liaison®	78.6	84.9	0.856
	EliA™	66.3	94.3	0.910
	Diastat™	77.8	86.8	0.848
	CLIFT	16.8	100	0.582
	Farr	79.8	79.2	0.892
Fiegel et al., 2010	Bindazyme	nb ⁴	nb	0.885
	EliA™	nb	nb	0.886
	Farrzyme	nb	nb	0.645
	Farr	nb	nb	0.770
Ghirardello et al., 2011 ³	EliA™	81	92	nb
	Farrzyme	66	91	nb
	CLIFT	83	91	nb
	Farr	95	89	nb

¹Sensitiviteit en specificiteit berekend volgens de cut-offs van de fabrikant en ten opzichte van de controlegroep met gezonde vrijwilligers en patiënten met andere SRD's dan SLE, ²Sensitiviteit en specificiteit berekend volgens de cut-offs van de fabrikant met als controlegroep patiënten met andere SRD's dan SLE, ³sensitiviteit en specificiteit berekend volgens de optimale cut-off volgens de auteurs en berekend ten opzichte van de hele controlepopulatie (voor samenstelling: zie tekst).

⁴nb = niet bepaald, ⁵AUC = Area Under the Curve

Conclusie

Uit deze literatuurstudie blijkt dat de CLIFT in verschillende studies een zwakke sensitiviteit toont voor de diagnose van SLE, waardoor het gebruik ervan als screeningstest mogelijks niet ideaal is. De Farr analyse toont in de verschillende studies een goede performantie voor de diagnose van SLE, maar is praktisch gezien niet uitvoerbaar in de setting van het GZA ziekenhuis. De performantie van de EIA's is wisselend, maar de EliA™ toont consequent een relatief grote Area Under the Curve (AUC). Uit deze literatuurstudie kon, voor de setting van het GZA ziekenhuis, geen duidelijk beste methode voor de kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen weerhouden worden. Om deze reden werd er besloten om zelf een vergelijkende studie uit te voeren waarin de performantie van verschillende technieken vergeleken wordt in de populatie van het GZA ziekenhuis (zie vraag 3).

Vraag 2: Wat is de waarde van anti-nucleosoom antistoffen voor de laboratoriumdiagnostiek van SLE?

Anti-nucleosoom antistoffen (ANuA's) zijn auto-antistoffen gericht tegen histonen, dsDNA of epitopen gecreëerd door de interactie tussen dsDNA en histonen. In een studie van Mohan et al. uit 1993 werd gesuggereerd dat nucleosomen het primair antigen vormen in SLE en dat dsDNA hier slechts een deel van uitmaakt [18]. Onder andere om deze reden werd ook in een publicatie van Isenberg et al. uit 2007 de hypothese gesteld dat de detectie van anti-dsDNA antistoffen in de toekomst mogelijk vervangen zal worden door de detectie van ANuA's [19]. Aan de hand van een literatuurstudie wil ik nagaan wat de wetenschappelijke evidentie is voor het gebruik van ANuA's voor de diagnose en/of opvolging van SLE.

- Wat is de performantie van ANuA analyses voor de diagnose van SLE?

In 2012 werd door Bizzaro et al. een systematische review en meta-analyse uitgevoerd om de diagnostische performantie van ANuA's voor de diagnose van SLE in kaart te brengen. Van de 610 artikels die initieel weerhouden werden, voldeden er uiteindelijk 37 (met data over 44 studies) aan de inclusiecriteria van deze studie. In 43 van de 44 geïncludeerde studies werden ANuA's opgespoord met een ELISA en in één studie gebeurde dit met een immuunfluorometrische test (ALBIA – Addressed Laser Beads Immuno Assay). Van de 43 studies die gebruik maakten van ELISA's, waren er zeven die met in huis gevalideerde ELISA's werkten. De overige 36 studies maakten gebruik van commercieel beschikbare kits die door elf verschillende fabrikanten geproduceerd werden.

Op basis van deze meta-analyse bij 4239 SLE patiënten en 6667 controlepatiënten, was de gemiddelde sensitiviteit van ANuA's voor de diagnose van SLE 61 % met een 95 % confidentie-interval (CI) van [60 %-62 %]. De gemiddelde specificiteit was 94 % met een 95 % CI van [94 %-95 %]. In de geïncludeerde studies varieerde de gerapporteerde specificiteit van 61 % tot 100 %. Deze variatie kan waarschijnlijk verklaard worden door het verschil in samenstelling van de controlegroep. De specificiteit werd daarom meer in detail bestudeerd door de verschillende controlepopulaties te stratificeren. Hieruit bleek dat de specificiteit ten opzicht van gezonde vrijwilligers het hoogst was (99.5 %) en dat, naast bij SLE patiënten, ANuA's het meest frequent werden aangetroffen bij patiënten met Mixed Connective Tissue Disease (MCTD) en systeem sclerose (SSc) (respectievelijk 25.3 % en 14.9 %). De aanwezigheid van ANuA's bij patiënten met MCTD is niet zo verrassend,

aangezien dit syndroom klinische en immunologische gelijkenissen vertoont met SLE. Voor SSc is de verklaring waarschijnlijk meer complex en zou er een verband zijn met het type nucleosoom dat als antigeen gebruikt wordt. Een beperking van deze studie, en eigen aan meta-analyses, is de heterogeniteit in analytische methodes die in de verschillende studies gebruikt werden voor de bepaling van ANuA's [20].

In de studie van Bizzaro werden 26 artikels (33 studies) geïncludeerd die de diagnostische performantie van ANuA's vergeleken met die van anti-dsDNA antistoffen bij in totaal 3191 SLE patiënten en 5529 controlepatiënten. Een meta-analyse van deze 33 studies toonde een hogere gevoeligheid (resp. 59.9 % en 52.4 %) en een vergelijkbare specificiteit (resp. 94.9 % en 94.2 %) van ANuA's ten opzichte van anti-dsDNA antistoffen voor de detectie van SLE. De kans op SLE bij aanwezigheid van ANuA's was respectievelijk 41 keer groter dan bij afwezigheid van ANuA's. Bij aanwezigheid van anti-dsDNA antistoffen was deze kans 28 keer groter dan bij afwezigheid van anti-dsDNA antistoffen. Zie tabel 2 voor een samenvatting van de performantiekarakteristieken die voor beide types van antistoffen in deze meta-analyse gerapporteerd werden [20].

Tabel 2: gemiddelde performantiekarakteristieken van ANuA's en anti-dsDNA antistoffen op basis van een meta-analyse van waarin deze antistoffen vergeleken werden

	ANuA		Anti-dsDNA antistoffen	
	%	[95 % CI]	%	[95 % CI]
Gepoolde sensitiviteit	59.9	[58.2 – 61.6]	52.4	[5.07 – 54.0]
Gepoolde specificiteit	94.9	[94.3 – 95.4]	94.2	[93.5 – 94.9]
Positieve LR ¹	14.3	[8.7 – 23.4]	12.7	[7.9 – 20.6]
Negatieve LR ²	0.39	[0.33 – 0.46]	0.47	[0.40 – 0.55]
DOR ³	41.0	[23.8 – 70.8]	27.8	[16.7 – 46.1]

¹positieve LR = positieve likelihood ratio (sensitiviteit/1 – specificiteit), ²negatieve LR = negatieve likelihood ratio (1 – sensitiviteit/specificiteit), ³DOR = diagnostic odd ratio (positieve LR/ negatieve LR met toepassing van een correctiefactor)

- **Wat is de performantie van ANuA analyses voor het opvolgen van de SLE ziekteactiviteit en nefritis?**

In de meta-analyse van Bizzaro et al. werden 22 studies geïncludeerd waarin de correlatie tussen de aanwezigheid van ANuA's enerzijds en SLE ziekteactiviteit en lupus nefritis anderzijds bestudeerd werd. In 19 studies (86.4 %) werd een statistisch significante correlatie gerapporteerd tussen de aanwezigheid van ANuA's en SLE ziekteactiviteit, wat over de studies heen resulteerde in een globale correlatie die statistisch significant was ($p < 0.0001$). In 13 van de 22 geïncludeerde studies (59.1 %) werd een statistisch significante correlatie aangetoond tussen ANuA's en lupus nefritis, wat resulteerde in een niet significante globale correlatie ($p = 0.365$). De auteurs merken wel op dat deze meta-analyse onvoldoende power heeft om sluitende uitspraken te doen over deze correlaties [20].

Een meer recente studie, die niet kon worden opgenomen in de meta-analyse van Bizzaro et al., is die van Li et al. uit 2014 waarin 51 SLE patiënten en 48 gezonde vrijwilligers gedurende 14 maanden klinisch en biochemisch opgevolgd werden. Klinisch werd de ziekteactiviteit beoordeeld aan de hand van de 'Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index' (SLEDAI-2K) score, waarbij een score van > 0 overeenkwam met de aanwezigheid van actieve SLE. De biochemische opvolging bestond onder andere uit de bepaling van ANuA's, anti-dsDNA antistoffen en complementfactor 3 (C3), respectievelijk uitgevoerd met een ELISA, de Farr analyse en nefelometrie. In deze studie werd geconcludeerd dat de specificiteit van C3 en anti-dsDNA antistoffen voor de detectie van actieve SLE, na een aanpassing van de afkapwaarden op basis van de Youden index, vergelijkbaar is met die van ANuA's (resp. 100 %, 83 % en 83 %). Verder werden deze drie biomarkers ook geëvalueerd voor de detectie van significante veranderingen in SLE ziekteactiviteit, wat gedefinieerd werd als een absoluut verschil in SLEDAI-2K score van minstens vier eenheden. Uit een 'one-way anova' analyse bleek dat enkel C3 en ANuA concentraties deze klinische veranderingen goed weerspiegelden ($p < 0.05$). Verder bleek uit een lineaire regressie dat, van de drie biochemische parameters, ANuA's het best correleerden met de SLEDAI-2K SCORE. Om die reden werd er geconcludeerd dat ANuA's, ten opzichte van anti-dsDNA antistoffen en C3, betrouwbaarder zijn voor het opvolgen van de ziekteactiviteit van SLE. Een beperking van deze studie was het feit dat anti-dsDNA antistoffen enkel met de Farr analyse bepaald werden en dat de performantie voor het bepalen ervan afhankelijk is van de gebruikte methode [21].

- **Conclusie**

Uit deze literatuurstudie blijkt dat ANuA's en goede diagnostische merker zijn voor de diagnose van SLE en dat ze hiervoor ten opzichte van anti-dsDNA antistoffen een superieure sensitiviteit en vergelijkbare specificiteit hebben. Verder blijkt dat ANuA's voor de opvolging van de SLE ziekteactiviteit een beloftevolle marker zijn. Om deze bevindingen na te gaan in de populatie van het GZA ziekenhuis, hebben wij beslist aan de vergelijkende studie van vraag 3 een ELISA toe te voegen waarin als antigeen gebruik gemaakt wordt van dsDNA, gekoppeld aan nucleosomen.

Vraag 3: Hoe kan de bepaling van anti-dsDNA antistoffen in het klinisch laboratorium van het GZA ziekenhuis geoptimaliseerd worden?

Uit de literatuurstudie blijkt dat er op dit moment, voor de setting van het GZA ziekenhuis, geen duidelijk beste methode is voor de kwantificatie van anti-dsDNA antistoffen (zie vraag 1). Verder zijn ANuA's een interessant alternatief voor de laboratoriumdiagnose en follow-up van SLE (zie vraag 2). Om deze redenen werd in het klinisch laboratorium van het GZA ziekenhuis een studie uitgevoerd waarin de performantie van verschillende analytische methoden voor de bepaling van anti-dsDNA antistoffen en ANuA's vergeleken werd. Rekening houdend met de wetenschappelijke evidentie en de beschikbare analyzers in het labo, werd er beslist om volgende vier commercieel beschikbare analyses te evalueren:

- CLIFT met DAPI-conjugaat op het QUANTA-lyser[®] platform met aflezing op Nova View[®] (allen van Werfen, Barcelona, Spanje)
- QUANTA Lite[®] HA dsDNA ELISA (FARRZYME; Werfen, Barcelona, Spanje) op het QUANTA-lyser[®] platform
- Anti-dsDNA-NcX IgG ELISA (ANuA; Euroimmun AG, Lübeck, Duitsland) op het QUANTA-lyser[®] platform
- QUANTA flash[®] dsDNA (QUANTAFLASH) op het BIO-FLASH[®] platform (beide van Werfen, Barcelona, Spanje)

De vier analyses werden eerst afzonderlijk technisch gevalideerd, waarna de klinische performantie ervan onderling vergeleken werd aan de hand van stalen die verzameld werden in de patiëntenpopulatie van het GZA ziekenhuis. De eigenschappen van de verschillende analyses worden vergeleken in bijlage 1.

- Technische validatie

- Methoden en populatie

Voor elke methode werd de within-day reproducibility, between-day reproducibility en juistheid geëvalueerd. De within-day reproducibility werd voor elke methode getest door drie patiëntstalen, met een concentratie aan anti-dsDNA antistoffen onder, rond en boven de afkapwaarde van de fabrikant, binnen één run in tienvoud te analyseren. De between-day reproducibility zal geëvalueerd worden door

dezelfde patiëntstalen én een positieve en negatieve kitcontrole met elke methode in tien verschillende runs te analyseren. Om de juistheid na te gaan werd een verdunningsreeks (400, 100, 50, 25 en 12.5 IU/mL) gemaakt van commercieel beschikbaar controlemateriaal voor anti-dsDNA antistoffen (Rel-03 DNA, SKML, Nijmegen, Nederland), die het meetbereik van de verschillende methoden overlapt. Verder werden twee externe kwaliteitscontroles (EKE), negatief voor anti-dsDNA antistoffen, opgevraagd bij het WIV (SN/10258 en SN/12152). Vervolgens zal elke verdunningsstap en negatieve EKE met elke methode in vijf verschillende runs geanalyseerd worden. Alle analyses worden uitgevoerd volgens de instructies van de fabrikant. Verder zal ook geëvalueerd worden in hoeverre de autotiter van de CLIFT + DAPI, gegenereerd door de Nova View[®], een betrouwbare schatting is van de werkelijke titer aan anti-dsDNA antistoffen.

- Resultaten

Aangezien het experimenteel luik van deze CAT op het moment van publicatie nog lopende was, kunnen enkel de voorlopige resultaten weergegeven worden. Voor de CLIFT + DAPI kunnen we nog geen resultaten tonen omwille van problemen met de positieve controle, waardoor op dit moment nog onderzocht wordt in hoeverre de reeds gegenereerde resultaten valide zijn. Ook de resultaten van de ANuA zijn nog niet beschikbaar omdat deze kit op het moment van publicatie nog niet beschikbaar was in het GZA labo. De resultaten voor de within-day reproducibility van de Farrzyme en QUANTAFLASH, na nazicht voor de aanwezigheid van outliers, zijn opgelijst in tabel 3. De between-day reproducibility van de Farrzyme en QUANTAFLASH op basis van de patiëntstalen werd respectievelijk al op vijf en vier runs bepaald (zie tabel 4 voor de voorlopige resultaten). De kitcontroles van de Farrzyme en QUANTAFLASH werden respectievelijk al in 5 en 8 verschillende runs bepaald (zie tabel 5 voor de voorlopige resultaten). De juistheid van de Farrzyme en QUANTAFLASH werd respectievelijk op 4 runs en 1 run bepaald (zie tabel 6 voor de voorlopige resultaten). Aangezien nog niet alle resultaten voor between-day reproducibility en juistheid verzameld werden, zijn deze resultaten nog niet nagekeken voor de aanwezigheid van outliers. De (voorlopige) resultaten voor juistheid van de Farrzyme en QUANTAFLASH, bepaald aan de hand van de dilutiereeks van commercieel referentiemateriaal, werden door middel van een Spearman analyse gecorreleerd met de doelwaarden en toonden voor beide een correlatiecoëfficiënt die groter was dan 99% (resp. 99.4% en 100%). Zie figuur 1 voor een grafische weergave van deze resultaten. Een lineaire regressie van de

Farrzyme ten opzichte van de doelwaarden toonde een statistisch significante proportionele fout ($p < 0.001$) en een niet significante systematische fout ($p = 0.3788$). Een lineaire regressie van de QUANTAFLASH ten opzichte van de doelwaarden toonde eveneens een statistisch significante proportionele fout ($p < 0.001$) en een niet significante systematische fout ($p = 0.0639$).

Tabel 3: voorlopige resultaten voor within-day reproducibility met CLIFT + DAPI, Farrzyme, ANuA en QUANTAFLASH

	CLIFT+DAPI (LIU) ¹	Farrzyme (IU/mL)			AnuA (IU/mL)	QUANTAFLASH (IU/mL)		
Cut-off	120	30			100	35-45		
Runs	nb ²	10			nb	10		
Level	nb	1	2	3	nb	1	2	3
Mean	nb	11,9	32,7	2263,2	nb	<9,8	46,6	323,6
Range	nb	[11,8- 11,98]	[30,5- 34,78]	[1470,64- 3423,3]	nb	<9,8	[44,9- 47,7]	[309,6- 337,1]
SD	nb	0,08	1,49	651,74	nb	nvt	0,93	8,80
CV (%)	nb	0,64	4,57	28,80	nb	nvt	1,99	2,72

¹LIU = Light Intensity Units, ²nb: resultaat nog niet beschikbaar op het moment van publicatie van de CAT

Tabel 4: (voorlopige) resultaten voor between-day reproducibility met CLIFT + DAPI, Farrzyme, ANuA en QUANTAFLASH op basis van patiëntstalen

	CLIFT+DAPI (LIU) ¹	Farrzyme (IU/mL)			ANuA (IU/mL)	QUANTAFLASH (IU/mL)		
Cut-off	120	30			100	35-45		
Runs	nb ²	5			nb	4		
Level	nb	1	2	3	nb	1	2	3
Mean	nb	11,70	39,73	2668,27	nb	<9,8	45,4	298,6
Range	nb	[11,25- 11,90]	[31,15- 54,98]	[1198,98- 5933,76]	nb	nvt	[40,3- 49,9]	[259,0- 326,4]
SD	nb	0,27	9,45	1944,88	nb	nvt	4,2	30,3
CV (%)	nb	2,27	23,79	72,89	nb	nvt	9,35	10,16

¹LIU = Light Intensity Units, ²nb: resultaat nog niet beschikbaar op het moment van publicatie van de CAT

Tabel 5: (voorlopige) resultaten voor between-day reproducibility met CLIFT + DAPI, Farrzyme, ANuA en QUANTAFLASH op basis van kitcontroles

	CLIFT+DAPI (LIU) ¹	Farrzyme (IU/mL)		ANuA (IU/mL)	QUANTAFLASH (IU/mL)	
Cut-off	120	30		100	35-45	
Runs	nb ²	5		nb	8	
Level	nb	Negatief	Positief	nb	Negatief	Positief
Mean	nb	11,7	250,4	nb	18,7	95,0
Range	nb	[11,09-11,95]	[241,66-257,75]	nb	[17,2-20,8]	[86,6- 110,6]
SD	nb	0,35	7,90	nb	1,5	7,6
CV (%)	nb	2,96	3,16	nb	8,15	7,96

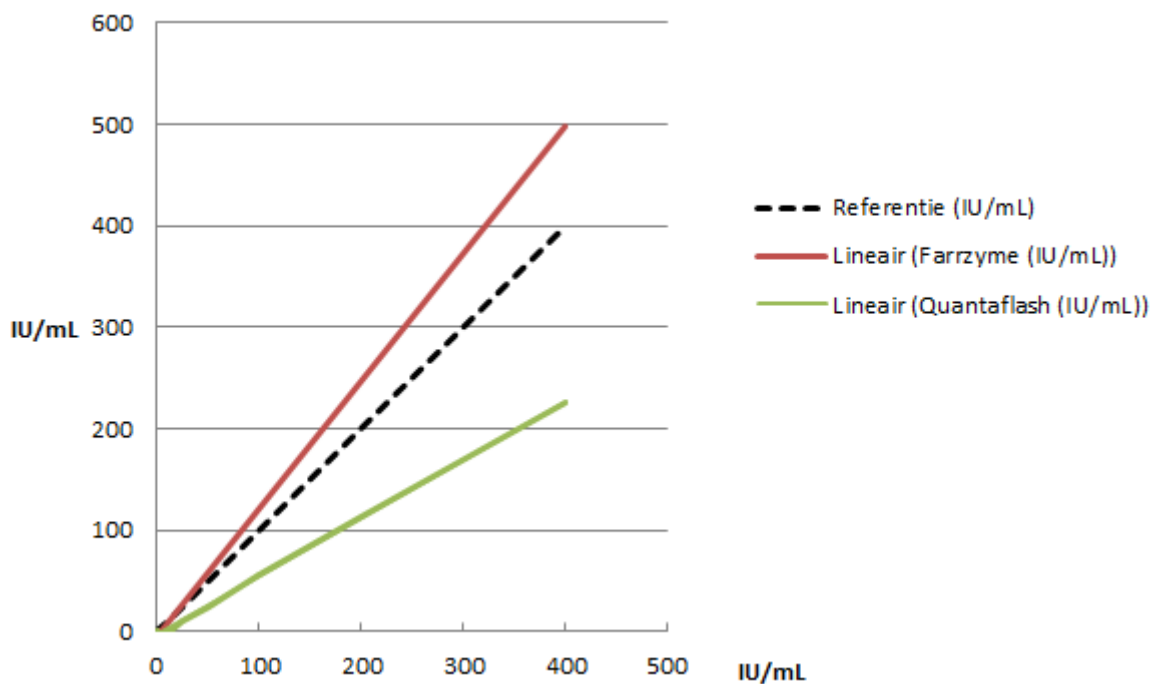
¹LIU = Light Intensity Units, ²nb: resultaat nog niet beschikbaar op het moment van publicatie van de CAT

Tabel 6: (voorlopige) resultaten voor juistheid met CLIFT + DAPI, Farrzyme, ANuA en QUANTAFLASH

	CLIFT+DAPI (LIU) ¹	Farrzyme (IU/mL)	ANuA (IU/mL)	QUANTAFLASH (IU/mL)
Cut-off	120	30	100	35-45
Runs	nb ²	4	nb	1
Doelwaarde (IU/mL)				
400	nb	515,18	nb	225,5
200	nb	221,30	nb	112,2
100	nb	111,74	nb	56,2
50	nb	51,23	nb	24,6
25	nb	17,52	nb	11,5
12,5	nb	11,96	nb	<9,8
Neg	nb	11,78	nb	<9,8 (neg)
Neg	nb	11,68	nb	<9,8 (neg)

¹LIU = Light Intensity Units, ²nb: resultaat nog niet beschikbaar op het moment van publicatie van de CAT

Figuur 1: grafische weergave van de (voorlopige) resultaten voor juistheid met Farrzyme en QUANTAFLASH



- Discussie

De within-day reproducibility van de Farrzyme en QUANTAFLASH heeft voor alle levels een CV kleiner dan 5 %, met uitzondering van de van de Farrzyme op level drie (28.80 %). Dit resultaat is enigszins verrassend aangezien men bij de hoge concentratie aan anti-dsDNA antistoffen in dit staal eerder lage CV's zou verwachten. Deze resultaten worden bevestigd met de (voorlopige) resultaten van de between-day reproducibility op basis van patiëntstalen, die voor level 2 en 3 met de Farrzyme opvallend hoge CV's laat zien (resp. 23.79 % en 72.89 %). De between-day reproducibility van de Farrzyme op basis van de kitcontroles daarentegen ligt veel lager (voor de positieve en negatieve controle resp. 2.96 % en 3.16 %). Een belangrijke opmerking hierbij is het feit dat het meetbereik voor anti-dsDNA antistoffen van de Farrzyme, zoals vermeld op de bijsluiter, het interval van 12.3 tem 1000 IU/mL omvat. De hoge CV's gedetecteerd voor de within-day en between-day reproducibility van de Farrzyme aan de hand van het patiëntstaal met anti-dsDNA antistoffen boven de afkapwaarde, kan dus verklaard worden door het feit dat deze buiten het meetbereik van de Farrzyme ligt. De CV's voor between-day reproducibility van de QUANTAFLASH liggen rond de 10 %.

De (voorlopige) resultaten voor juistheid van de Farrzyme en QUANTAFLASH correleerden mooi met de doelwaarden, maar toonden een statistisch significante proportionele fout. De grote verschillen in kwantitatieve resultaten tussen de Farrzyme en QUANTAFLASH onderling werden enigszins verwacht aangezien ook de afkapwaarden van deze kits verschillen. Zo genereerde het aliquot met doelwaarde 50 IU/mL met de Farrzyme bijvoorbeeld een positief resultaat (gemiddeld 51.23 IU/mL met afkapwaarde op 30 IU/mL); de QUANTAFLASH daarentegen genereerde hiervoor een negatief resultaat (24.6 IU/mL met afkapwaarde tussen de 35 en 45 IU/mL). Verder dient ook benadrukt te worden dat de voorlopige resultaten voor juistheid van de QUANTAFLASH slechts in 1 run bepaald werden en dat verdere resultaten afgewacht moeten worden alvorens hieruit conclusies te trekken. De correlatie tussen de kwantitatieve resultaten gegenereerd met de verschillende kits en de klinische relevantie ervan wordt verder getest door een populatie, samengesteld uit klinische stalen van het GZA ziekenhuis, te analyseren met de vier kits en de resultaten hiervan onderling te correleren.

- Conclusie

Het praktisch luik van de studie is op het moment van publicatie van deze CAT nog lopende, waardoor we nog geen definitieve conclusies kunnen trekken.

- **Klinische validatie**

- Methoden en populatie

Om de klinisch performantie van de vier methoden te kunnen vergelijken werd een patiëntenpopulatie samengesteld uit SLE patiënten (n = 59), patiënten gediagnosticeerd met andere SRD's dan SLE (n = 62), patiënten waarbij een SRD werd uitgesloten (Disease Controls group of DC groep; n = 50) en gezonde vrijwilligers (n = 30). [20] De populatie van gezonde vrijwilligers bestond uit medewerkers van de GZA ziekenhuizen en gaven allen een informed consent. De overige patiëntgroepen werden geselecteerd aan de hand van een query van alle patiënten waarvoor tussen januari en september 2014 een ANA-bepaling aangevraagd werd en waarvan de nodige klinische gegevens in het medisch dossier beschikbaar waren. Unieke patiënten werden op basis van hun klinische diagnose retrospectief in de SLE-, SRD- of DC groep geïnccludeerd. Vanaf begin oktober 2014 werden de groepen proactief verder aangevuld. In tabel 3 wordt de samenstelling van de populatie meer in detail weergegeven.

Nadat alle stalen geanalyseerd zijn met de vier methoden, zullen de resultaten onderling gecorreleerd worden aan de hand van een Spearman analyse. Sensitiviteit, specificiteit, positief en negatief predictieve waarden (resp. PPV en NPV) en likelihood ratios (LH) zullen berekend worden bij de afkapwaarden van de fabrikant. Voor de methoden die een kwantitatief resultaat genereren, zullen 'Receiver Operating Characteristic' (ROC) curves geconstrueerd worden en zullen de AUC waarden onderling vergeleken worden. De sensitiviteit van de verschillende kits kan vervolgens opnieuw berekend worden bij een specificiteit van 95 %. Een belangrijke opmerking bij de statistische verwerking van de resultaten, is dat de verzamelde stalen van SLE patiënten zowel afgenomen werden in het kader van diagnose als follow-up. Indien de patiënten al voor SLE behandeld worden, zouden de anti-dsDNA antistoffen mogelijks kunnen negativeren, wat de waarde ervan bij het construeren van ROC curves compromitteert. Om dit te voorkomen zullen de diagnostische SLE stalen geïdentificeerd worden en apart beschouwd worden in de

statistische verwerking. Voor de statistische analyses werd gebruik gemaakt van de MedCalc voor Windows, version 14.10.2 (MedCalc Software, Oostende, België).

Tabel 3: samenstelling populatie voor klinische validatie van de vier methoden

Patiëntengroep	Ziektebeeld	Aantal
SLE ¹	SLE	59
SRD ²	Reumatoïde artritis	20
	Polymyalgia reumatica	17
	Sclerodermie/systeemsclerose	7
	Polymyositis/dermatomyositis	4
	Syndroom van Sjögren	11
	Mixed connective tissue disease	1
	Cutane lupus	2
	Totaal SRD	62
DC ³	Exclusie van aanwezigheid SRD	50

¹systemische lupus erythematoses, ²systemic rheumatic disease, ³disease controls

- Resultaten

Nog niet beschikbaar op het moment van publicatie van deze CAT.

Bijlage 1: eigenschappen van de verschillende analyses

	CLIFT + DAPI	FARRZYME	ANuA	QUANTAFLASH
Principe	IIF	ELISA	ELISA	CLIA
Platform	NOVA View®	NOVA View®	NOVA View®	BIO-FLASH®
dsDNA bron	<i>Crithidia luciliae</i> kinetoplast	Kalf thymus	Werd opgevraagd	Synthetisch
Isotype antistoffen	IgG	IgG	IgG	IgG
Aviditeit	Gemiddeld tot hoog	Hoog	Niet gespecificeerd	Geen hoge aviditeit
Eenheid	LIU ¹ of titer	IU/mL	IU/mL	IU/mL
Afkapwaarde	120 LIU	30 IU/mL	100 IU/mL	35 IU/mL
Traceerbaarheid kalibratie	Werd opgevraagd	WHO referentieserum (Wo/80)	WHO referentieserum (Wo/80)	WHO referentieserum (Wo/80)
Catalogusprijs per kit excl. BTW (EUR)	893,00	522,00	304.76	453,00 ²
Aantal testen per kit	240	96	96	50
Catalogusprijs per test excl. BTW (EUR)	3,72	5,44	3.17	9,06 ²

¹ LIU = light intensity units, ² Prijs inclusief dsDNA control set (30 shifts) en dsDNA calibrator set (2 shifts)

To do/ACTIONS

- 1) Resultaten van de technische performantie van de vier kits (CLIFT + DAPI, Farrzyme, Quantaflash en ANuA) verder aanvullen
- 2) Klinische stalen analyseren met de vier kits
- 3) Statistische verwerking
 - a. Correlatie kwantitatieve resultaten ahv Spearman analyse
 - b. Sensitiviteit, Specificiteit, Likelihood Ratio's bij de cut-off van de fabrikant
 - c. Waar mogelijk, sensitiviteit van de kits onderling vergelijken bij 95% specificiteit
 - d. ROC curve construeren en AUC waarden vergelijken
- 4) Evaluatie autotiter CLIFT + DAPI
- 5) Beste methode kiezen en implementeren

References

1. Fiegel, F., et al., *Autoantibodies to double-stranded DNA--intermethod comparison between four commercial immunoassays and a research biosensor-based device*. *Lupus*, 2010. **19**(8): p. 957-64.
2. Hochberg, M.C., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(9): p. 1725.
3. Solomon, D.H., et al., *Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing*. *Arthritis Rheum*, 2002. **47**(4): p. 434-44.
4. Kavanaugh, A., et al., *Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens*. *American College of Pathologists*. *Arch Pathol Lab Med*, 2000. **124**(1): p. 71-81.
5. Bootsma, H., et al., *Prevention of relapses in systemic lupus erythematosus*. *Lancet*, 1995. **345**(8965): p. 1595-9.
6. Bootsma, H., et al., *Anti-double stranded DNA antibodies in systemic lupus erythematosus: detection and clinical relevance of IgM-class antibodies*. *Scand J Rheumatol*, 1996. **25**(6): p. 352-9.
7. ter Borg, E.J., et al., *Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study*. *Arthritis Rheum*, 1990. **33**(5): p. 634-43.
8. Tozzoli, R., et al., *Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases*. *Am J Clin Pathol*, 2002. **117**(2): p. 316-24.
9. Van Blerk, M., et al., *Belgian recommendations on ANA, anti-dsDNA and anti-ENA antibody testing*. *Acta Clin Belg*, 2014. **69**(2): p. 83-6.
10. Aarden, L.A., E.R. de Groot, and T.E. Feltkamp, *Immunology of DNA. III. Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique*. *Ann N Y Acad Sci*, 1975. **254**: p. 505-15.
11. Rouquette, A.M. and C. Desgruelles, *Detection of antibodies to dsDNA: an overview of laboratory assays*. *Lupus*, 2006. **15**(7): p. 403-7.
12. Antico, A., et al., *Diagnosing systemic lupus erythematosus: new-generation immunoassays for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the Crithidia luciliae immunofluorescence test*. *Lupus*, 2010. **19**(8): p. 906-12.
13. Ghirardello, A., et al., *Diagnostic accuracy of currently available anti-double-stranded DNA antibody assays. An Italian multicentre study*. *Clin Exp Rheumatol*, 2011. **29**(1): p. 50-6.
14. Satoh, M., et al., *Titration emulation: a computer-assisted technique that simplifies the quantification of anti-dsDNA antibodies using the Crithidia luciliae assay*. *Lupus*, 2001. **10**(9): p. 632-6.
15. Bertin, D., et al., *Original approach for automated quantification of antinuclear autoantibodies by indirect immunofluorescence*. *Clin Dev Immunol*, 2013. **2013**: p. 182172.
16. Lim, T., et al., *Automated detection of anti-double-stranded DNA antibody in systemic lupus erythematosus serum by flow immunoassay*. *Anal Chem*, 1999. **71**(7): p. 1298-302.
17. Launay, D., et al., *Comparison of the Farr radioimmunoassay, 3 commercial enzyme immunoassays and Crithidia luciliae immunofluorescence test for diagnosis and activity assessment of systemic lupus erythematosus*. *Clin Chim Acta*, 2010. **411**(13-14): p. 959-64.
18. Mohan, C., et al., *Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus*. *J Exp Med*, 1993. **177**(5): p. 1367-81.
19. Isenberg, D.A., et al., *Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end?* *Rheumatology (Oxford)*, 2007. **46**(7): p. 1052-6.
20. Bizzaro, N., et al., *Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker than anti-dsDNA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and a study of metanalysis*. *Autoimmun Rev*, 2012. **12**(2): p. 97-106.
21. Li, T., et al., *Anti-nucleosome antibodies outperform traditional biomarkers as longitudinal indicators of disease activity in systemic lupus erythematosus*. *Rheumatology (Oxford)*, 2015. **54**(3): p. 449-57.
22. Aanbevelingen van het expertencomité voor niet-infectieuze serologie, globaal rapport WIV 2013/2.
23. Berth M., Debeuf P. (2012, Oktober). Anti-double stranded DNA antibodies: evaluation using six different methods in het laboratory serving general physicians. Poster gepresenteerd op het jaarlijks symposium van de Belgische Vereniging voor Klinische Biologie van 2012, Gent, België.