



**CAT**  
**Critically Appraised Topic**

**Automatisatie van indirecte immunofluorescentie voor de bepaling van ANCA: is het de moeite waard?**

Author: Simon Degandt

Supervisor: Dr. H. Devos (AZ Sint-Jan Brugge-Oostende AV)

Search/methodology verified by: Dr. H. Devos (AZ Sint-Jan Brugge-Oostende AV)

Date: 16/02/2016

**CLINICAL BOTTOM LINE**

---

In het gebied van de auto-immuniteit is de laatste jaren een automatisatie en een digitalisering aan de gang van de indirecte immunofluorescentie (IIF), in de eerste plaats voor de bepaling van antinucleaire antistoffen (ANA). De redenen hiervoor zijn gekend: een betere standaardisatie, minder fouten, minder tijdrovend en de mogelijkheid om oude resultaten terug op te roepen.

In deze methodevergelijking van vier automatische IIF-systemen voor de bepaling van ANCA is gebleken dat de digitale microscopie evenwaardig is aan de manuele aflezing onder de LED fluorescentiemicroscop. De interpretaties door de software van de digitale microscopen blijken voor twee van de vier systemen een zeer hoge positieve likelihood ratio en een zeer lage likelihood ratio voor ANCA-geassocieerde vasculitis te hebben. Dergelijke expertsystemen zijn echter niet sluitend en zijn eerder een aanvulling op de menselijke aflezing op het scherm. Voor de digitale aflezing liggen de vier systemen zeer dicht bij elkaar wat betreft sensitiviteit, specificiteit en overeenkomst. Om een keuze te maken tussen deze systemen moet daarom gekeken worden naar andere eigenschappen waarin ze verschillen. Het gebruiksgemak voor het inzetten, het gebruiksgemak van de software, de aanwezigheid van een patiënten-databank, de autotiter-optie, de snelheid, de capaciteit, de kwaliteit van de beelden, de gemakkelijker van het aflezen, de service van de firma en uiteraard ook de kostprijs zullen de doorslag moeten geven. Welke eigenschap doorweegt is subjectief en hangt van laboratorium tot laboratorium.

**CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO**

---

In het klinisch laboratorium van AZ Sint-Jan Brugge wordt indirecte immunofluorescentie (IIF) voor ANA uitgevoerd op een automatisch systeem van Euroimmun. De IIF voor ANCA daarentegen wordt nog geïnterpreteerd onder een traditionele LED fluorescentie microscop. Uit een korte validatie van ANCA op het automatisch systeem is gebleken dat deze analyse nog onvoldoende betrouwbaar was.

Het doel van deze CAT is enerzijds een literatuurstudie uit te voeren rond ANCA en dan vooral rond de richtlijnen van ANCA-diagnostiek. Anderzijds bestaat deze CAT uit een methodevergelijking waarbij vier automatische IIF-systemen voor de bepaling van ANCA met elkaar worden vergeleken.

**QUESTION(S)**

---

- 1) *Wat zijn de huidige richtlijnen rond de bepaling van ANCA?*
- 2) *Zijn de geautomatiseerde alternatieven voor IIF bij ANCA voldoende performant om de huidige, manuele methode te vervangen?*

**REFERENCES**

---

- 1) Bosch X, Guilbert A, Font J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Lancet* 2006;368(9533):404-18.
- 2) Kallenberg CG. The diagnosis and classification of microscopic polyangiitis. *J Autoimmun* 2014;48-49:90-3.
- 3) Comarmond C, Cacoub P. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener): clinical aspects and treatment. *Autoimmun Rev* 2014;13(11):1121-5.
- 4) Khan I, Watts RA. Classification of ANCA-associated vasculitis. *Curr Rheumatol Rep* 2013;15(12):383.
- 5) Fries JF, Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, Arend WP, Calabrese LH, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of vasculitis. Summary. *Arthritis Rheum* [Internet] 1990;33(8):1135-6.

- 6) Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* [Internet] 1994;37(2):187-92.
- 7) Jennette J, Falk R, Bacon P, Basu N, Cid M, Ferrario F, et al. 2012 Revised international chapel hill consensus conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis Rheum* [Internet] 2013;65:1-11.
- 8) Watts R, Lane S, Hanslik T, Hauser T, Hellmich B, Koldingsnes W, et al. Development and validation of a consensus methodology for the classification of the ANCA-associated vasculitides and polyarteritis nodosa for epidemiological studies. *Ann Rheum Dis* [Internet] 2007;66(2):222-7.
- 9) Falk RJ, Gross WL, Guillevin L, Hoffman G, Jayne DR, Jennette JC, Kallenberg CG, Luqmani R, Mahr AD, Matteson EL, Merkel PA, Specks U, Watts R. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): an alternative name for Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis* 2011;70(4):704.
- 10) Stegeman CA, Tervaert JW, Sluiter WJ, Manson WL, de Jong PE, Kallenberg CG. Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med* 1994;120(1):12-7.
- 11) Savage CO, Winearls CG, Evans DJ, Rees AJ, Lockwood CM. Microscopic polyarteritis: presentation, pathology and prognosis. *Q J Med* 1985;56(220):467-83.
- 12) Greco A, Rizzo MI, De Virgilio A, Gallo A, Fusconi M, Ruoppolo G, Altissimi G, De Vincentiis M. Churg-Strauss syndrome. *Autoimmun Rev* 2015;14(4):341-8.
- 13) Guillevin L, Lhote F, Gayraud M, Cohen P, Jarrousse B, Lortholary O, Thibault N, Casassus P. Prognostic factors in polyarteritis nodosa and Churg-Strauss syndrome. A prospective study in 342 patients. *Medicine (Baltimore)* 1996;75(1):17-28.
- 14) Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin Chem* 2006;52(2):171-81.
- 15) Joossens S, Reinisch W, Vermeire S, Sendid B, Poulain D, Peeters M, Geboes K, Bossuyt X, Vandewalle P, Oberhuber G, Vogelsang H, Rutgeerts P, Colombel JF. The value of serologic markers in indeterminate colitis: a prospective follow-up study. *Gastroenterology* 2002;122(5):1242-7.
- 16) Savige J, Dimech W, Fritsler M, Goeken J, Hagen EC, Jennette JC, McEvoy R, Pusey C, Pollock W, Trevisin M, Wiik A, Wong R; International Group for Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. *Am J Clin Pathol* 2003;120(3):312-8.
- 17) Beauvillain C, Delneste Y, Renier G, Jeannin P, Subra JF, Chevailler A. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: how should the biologist manage them? *Clin Rev Allergy Immunol* 2008;35(1-2):47-58.
- 18) Lin MW, Silvestrini RA, Culican S, Campbell D, Fulcher DA. A dual-fixed neutrophil substrate improves interpretation of antineutrophil cytoplasmic antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Clin Pathol* 2014;142(3):325-30.
- 19) Verstockt B, Bossuyt X, Vanderschueren S, Blockmans D. There is no benefit in routinely monitoring ANCA titres in patients with granulomatosis with polyangiitis. *Clin Exp Rheumatol* 2015;33(2 Suppl 89):S-72-6.
- 20) Schmitt WH, van der Woude FJ. Clinical applications of antineutrophil cytoplasmic antibody testing. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16(1):9-17.
- 21) Melegari A, Bonaguri C, Russo A, Luisita B, Trenti T, Lippi G. A comparative study on the reliability of an automated system for the evaluation of cell-based indirect immunofluorescence. *Autoimmun Rev* 2012;11(10):713-6.
- 22) Damoiseaux J, Mallet K, Vaessen M, Austen J, Cohen Tervaert JW. Automatic reading of ANCA-slides: evaluation of the AKLIDES system. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:762874.;
- 23) Knütter I, Hiemann R, Brumma T, Büttner T, Großmann K, Cusini M, Pregolato F, Borghi MO, Anderer U, Conrad K, Reinhold D, Roggenbuck D, Csernok E. Automated interpretation of ANCA patterns - a new approach in the serology of ANCA-associated vasculitis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(6):R271.
- 24) Showman O, Agmon-Levin N, Gilburd B, Martins T, Petzold A, Matthias T, Shoenfeld Y. A fully automated IIF system for the detection of antinuclear antibodies and antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Immunol Res* 2015;61(1-2):135-40.

APPRAISAL

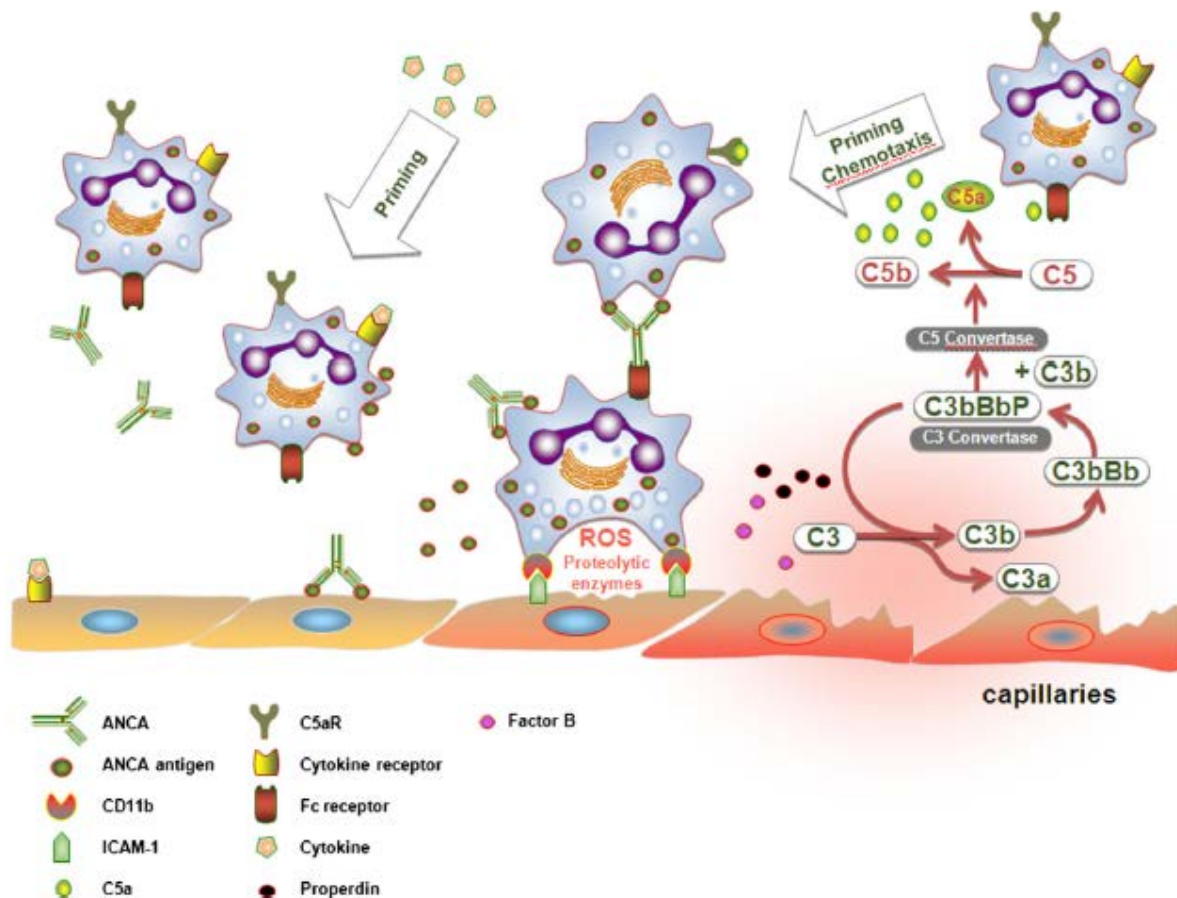
Luik 1: Literatuurstudie

a. Antineutrofiële cytoplasmatische antistoffen

Antineutrofiële cytoplasmatische antistoffen (ANCA) vormen de hoeksteen van de diagnostiek bij vasculitis. ANCA's zijn voornamelijk IgG antistoffen gericht tegen bestanddelen van de primaire granules in de lysosomen van neutrofielen en monocyten. Er zijn reeds verschillende antigenen geïdentificeerd waartegen deze antistoffen zijn gericht. De klinisch meest relevante zijn proteïnase 3 (PR3) en myeloperoxidase (MPO).

ANCA zijn bij toeval ontdekt in 1982 door Davies et al. tijdens het bestuderen van antinucleaire antistoffen (ANA) in serumstalen van patiënten met segmentale necrotiserende glomerulonefritis. A.d.h.v. indirecte immunofluorescentie (IIF) werd in de neutrofielen een diffuus cytoplasmatisch fluorescentiepatroon gezien. Vervolgens werd in 1985 door van der Woude et al. opgemerkt dat dit cytoplasmatisch ANCA-patroon (cANCA) voornamelijk voorkwam bij patiënten met granulomatose van Wegener. In 1988 rapporteerden Falk en Jennette een ANCA maar met een verschillend patroon, namelijk een perinucleair patroon (pANCA), bij patiënten met systemische vasculitis en idiopathische necrotiserende en snel progressieve glomerulonefritis. Daarnaast werd duidelijk dat het antigen MPO voornamelijk de oorzaak was van een pANCA patroon. In 1990 werd tenslotte de associatie tussen PR3 en het cANCA patroon bij granulomatose van Wegener aangetoond. (1)

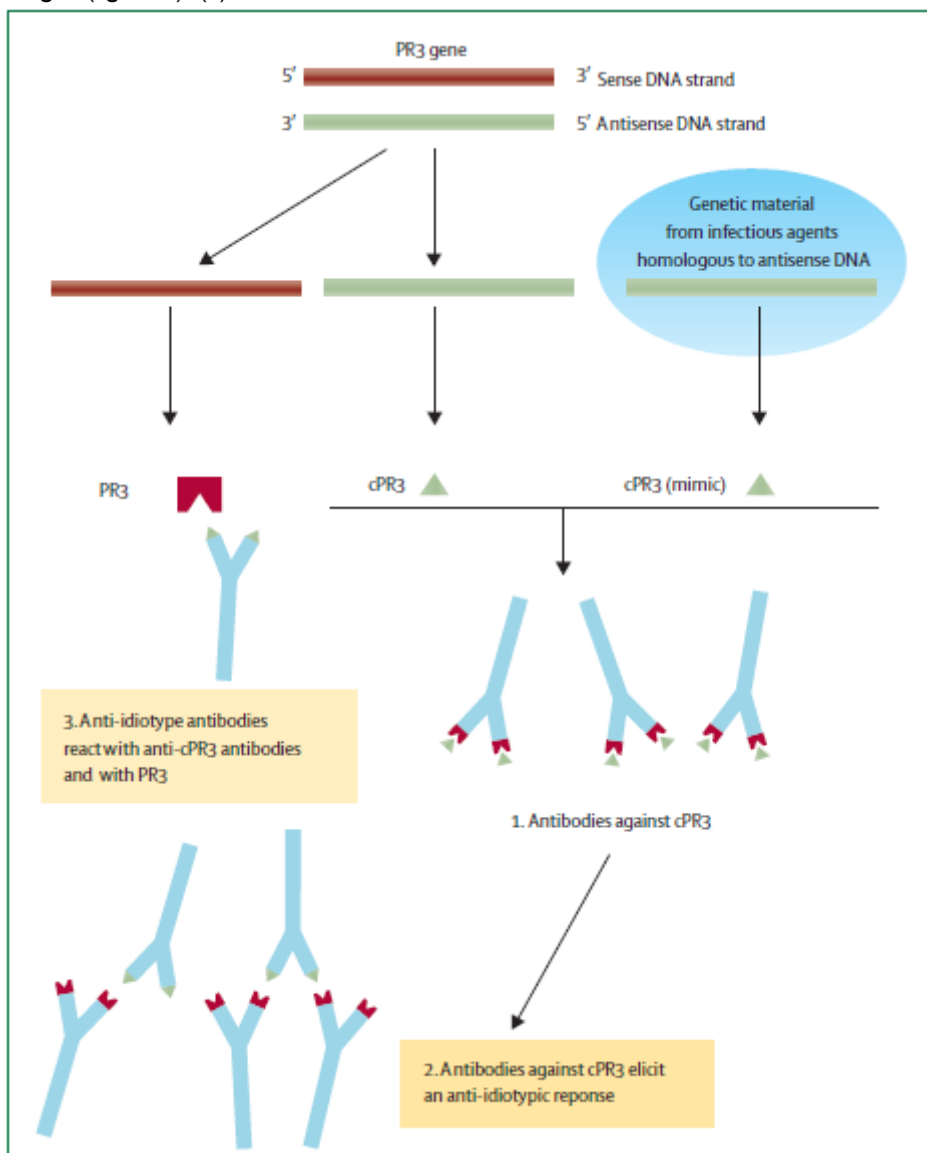
Naast een associatief bestaat er tevens een oorzakelijk verband tussen ANCA en vasculitis. ANCA's zouden een rol spelen in het ontstaan van vasculitis. In vitro is aangetoond dat ANCA's neutrofielen stimuleren tot een respiratoire burst en tot het vrijzetten van de inhoud van primaire granules. De vasculaire schade ontstaat vervolgens door een brede waaier aan neutrofiële effector functies zoals cytokine en chemokine release (figuur 1). (1, 2)



**Figuur 1** De aanwezigheid van ANCA's stimuleren neutrofielen tot een respiratoire burst en tot het vrijzetten van de inhoud van primaire granules ter hoogte van het vasculair endotheel. Dit resulteert in schade van de (kleine) bloedvaten en bijgevolg tot vasculitis. (2)

Het meest overtuigende argument voor een pathogene rol van MPO-ANCA werd aangetoond in experimentele dierenstudies. Het immuniseren van MPO-deficiënte muizen met muizen MPO resulteerde in de productie van anti-muis MPO antistoffen. Splenocyten van deze muizen werden vervolgens geïnjecteerd in imuundeficiënte en normale muizen. Bij de imuundeficiënte muizen resulteerde dit in een ernstige necrotiserende en snel progressieve glomerulonefritis en systemische necrotiserende vasculitis, inclusief pulmonaire capillaritis. In beide groepen werd er echter ook neerslag van immunocomplexen gezien, passend bij een pauci-immune vasculitis en glomerulonefritis. Het toedienen van pure anti-MPO IgG (en dus niet de volledige splenocyt) in imuundeficiënte en normale muizen resulteerde enkel in focale pauci-immune glomerulonefritis. ANCA spelen dus een rol in de pathogenese, maar ANCA alleen is niet voldoende om het ganse klinische beeld te verklaren. (1, 2)

Waarom ANCA's ontstaan is nog niet helemaal uitgeklaard. Een theorie opgeworpen door Pendergraft et al. suggereert dat PR3 ANCA ontstaat door een "autoantigen complementarity". Volgens deze theorie zou voor elke peptide, gecodeerd door een bepaald sense DNA, een complementair peptide bestaan dat gecodeerd wordt door het antisense DNA. Bij een auto-immuun ziekte zouden de auto-antistoffen niet gericht tegen het auto-antigen, maar tegen het complementaire peptide. Dit complementaire peptide kan afkomstig zijn van ofwel endogeen antisense DNA ofwel van identiek genetisch materiaal van een infectieus agens, zoals *Staphylococcus aureus* en *Entamoeba histolytica*. Dit peptide leidt dan tot de productie van antistoffen die vervolgens een anti-idiotypisch respons opwekken en de antistoffen die gevormd worden bij dit respons interageren tenslotte met het origineel auto-antigen (figuur 2). (1)



**Figuur 2** Schema van "autoantigen complementarity". Het complementair PR3 (cPR3) leidt tot het ontstaan van PR3-ANCA. (1)

Volgens een andere theorie van Gilligan et al. en Yang et al. ligt een dysfunctionele apoptose van neutrofielen aan de basis van het ontstaan van ANCA. Bij neutrofielen-apoptose verplaatsen de primaire granules naar de celoppervlakte. Normaal worden apoptotische cellen opgeruimd door macrofagen, maar in bepaalde omstandigheden kunnen dendritische cellen ook apoptotische neutrofielen opnemen. Dit leidt tot kruis-presentatie van eigen antigenen, de activatie van specifieke T-lymfocyten en uiteindelijk tot auto-immuniteit. (1)

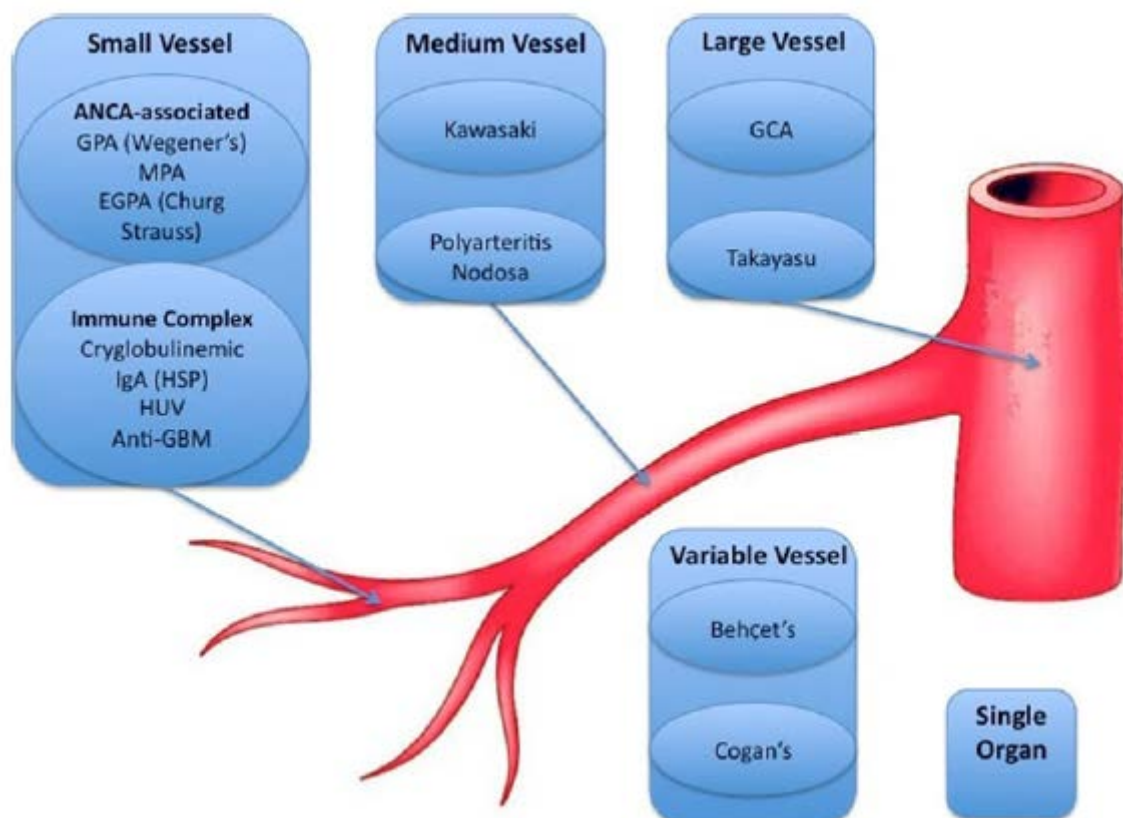
Er zijn enkele genen gedetecteerd die zouden geassocieerd zijn met ANCA-geassocieerde vasculitis. Het is zelfs zo dat MPO-ANCA en PR3-ANCA geassocieerd zijn met een aparte subset aan genen, wat impliceert dat MPO-ANCA en PR3-ANCA duidelijk apart afgeleide groepen zijn. Bij vasculitis met PR3-ANCA komen de genen *HLA-DP*, *SERPINA1* (codeert voor alfa-1-antitrypsine) en *PRTN3* (codeert voor proteïnase 3) voor, terwijl MPO-ANCA vasculitis geassocieerd is met het gen *HLA-DQ*. (1, 3)

Ook omgevingsfactoren kunnen leiden tot ANCA geassocieerde vasculitis. De twee meest frequente zijn medicatiegeïnduceerde vasculitis en de blootstelling aan silica. Er is een ganse waaier aan medicatie die vasculitis kan induceren. De meest frequente zijn de propylthiouracil, een thyreostaticum, en hydralazine, een direct werkend vasodilatantium. Deze twee geneesmiddelen kunnen een soort vasculitis induceren die sterk gelijkt op microscopische polyangiitis met MPO-ANCA. De blootstelling aan silica is geassocieerd met renale vasculitis die ook sterk gelijkt op microscopische polyangiitis met MPO-ANCA. Silica is een substantie die voorkomt in zand en steen en bijgevolg in materialen die gebruikt worden in de bouwsector zoals bakstenen en beton. Het breken, verpulveren of doorboren van deze materialen geeft aanleiding tot het vrijzetten van kleine silica-partikels in de lucht (silica-stof). Silica-partikels zijn sterke stimulators van T- en B-lymfocyten en de inhalatie van deze partikels door vatbare personen kan de productie van auto-antistoffen, zoals ANCA, triggeren. Daarnaast kan silica het vrijzetten van PR3 en MPO uit monocyten en macrofagen induceren, resulterend in ANCA-productie. (1, 4)

## b. ANCA geassocieerde ziektebeelden

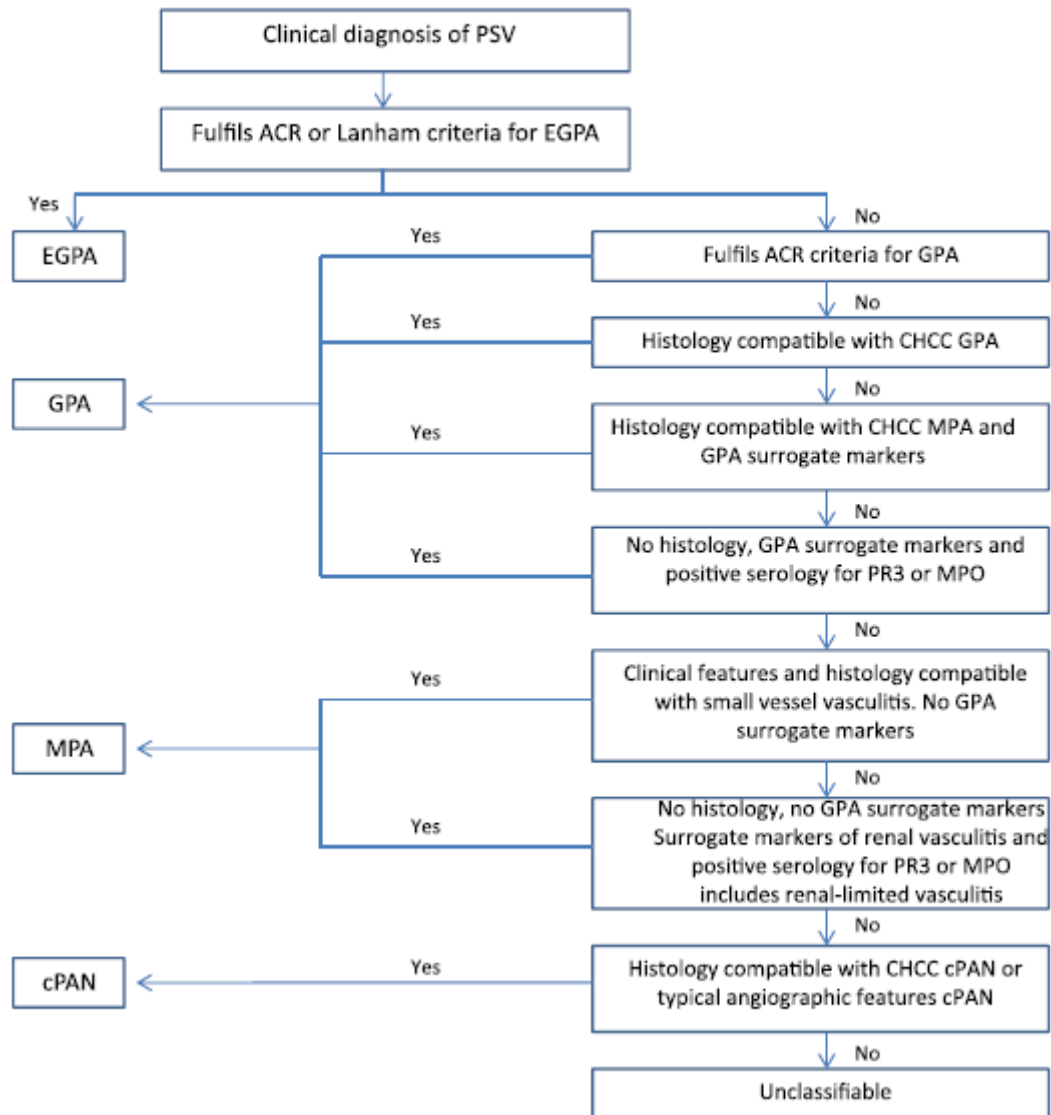
### i. **Vasculitis**

Vasculitis is een heterogene groep van systeemziekten die gekenmerkt wordt door inflammatie van bloedvaten resulterend in eindorgaanschade. Doorheen de jaren is gebleken dat het catalogeren van verschillende vasculitiden niet eenvoudig is. Een eerste officiële breed gedragen classificatie kwam van de American College of Rheumatology (ACR) in 1990. (5) Er werden zeven types van vasculitis gedefinieerd, waaronder granulomatose met polyangiitis (GPA), eosinofiele granulomatose met polyangiitis (EGPA) en polyarteritis nodosa (PAN). De entiteit microscopische polyangiitis (MPA) werd echter niet apart gedefinieerd. Op basis van de ACR criteria zou MPA verkeerdelijk worden onderverdeeld als GPA of PAN. Daarnaast werd ANCA-bepaling niet opgenomen in de criteria, voornamelijk omdat het bepalen van ANCA in die tijd nieuw was en nog niet overal werd uitgevoerd. Een derde grote tekortkoming was de beperkte diagnostische waarde van de classificatie: op basis van deze criteria was het mogelijk om een onderscheid te maken tussen de zeven gedefinieerde vasculitis-entiteiten, maar niet tussen vasculitis en andere aandoeningen. (4)



**Figuur 3** De verschillende groepen van vasculitis, onderverdeeld volgens de grootte van bloedvat dat wordt aangetast. (4)

In 1994 werd bij de eerste Chapel Hill Consensus Conference (CHCC) een nieuw classificatiemodel voorgesteld op basis van de grootte van het aangetaste bloedvat (figuur 3). (6) Er werden tien vasculitis-entiteiten opgenomen, inclusief MPA. Het belang van het testen naar ANCA werd erkend, maar diagnostische criteria werden niet opgenomen bij de definitie van de betreffende vasculitiden. In 2012 volgde een CHCC update waarbij voor het eerst een aparte subgroep werd gedefinieerd van ANCA-positieve vasculitiden, de zogenaamde ANCA-geassocieerde vasculitis (AAV). (7) Binnen de groep van small-vessel vasculitis werd AAV duidelijk afgezonderd van ANCA-negatieve vasculitiden die gekenmerkt worden door neerslag van immunocomplexen in de bloedvatwand zoals anti-GBM ziekte, cryoglobuline vasculitis, IgA vasculitis (Henoch-Schönlein) en hypocomplement vasculitis. Aangezien nog vele vasculitis-patiënten niet te classificeren waren op basis van de ACR criteria en/of de CHCC definities, bleken deze ontoereikend te zijn voor epidemiologische studies. (4)



**Figuur 4** EMA algoritme (2)

Als antwoord daarop werd in 2007 het European Medicines Agency (EMA) algoritme ontworpen (figuur 4). (8) Dit algoritme is een cascade-systeem voornamelijk gebaseerd op de ACR criteria. Met dit systeem kan bijna elk type van vasculitis ondergebracht worden in een bepaalde entiteit. Critici waarschuwen voor mogelijke foutieve classificatie van MPA patiënten in de GPA-groep omdat GPA hoger in de cascade voorkomt dan MPA. Aangezien er nog steeds geen internationale algemene classificatie met diagnostische criteria bestaat, is in 2011 een internationale studie opgericht voor het ontwikkelen van een nieuwe classificatie, namelijk de Diagnostic and Classification Criteria for Vasculitis (DCVAS) studie. De studie gaat uit van ACR en European League against Rheumatism (EULAR) en wordt in 2017 afgesloten. (4)

## ii. **ANCA-geassocieerde vasculitis**

AAV omvat GPA, MPA en EGPA. Deze groep behoort tot de small vessel vasculitis, maar is voor de rest een heterogene groep met verschillende eindorgaanschade en een verschillende frequentie van ANCA-positiviteit.

### I. **Granulomatose met polyangiitis (GPA)**

GPA, beter gekend als granulomatose van Wegener, werd voor het eerste beschreven door de Duitse patholoog Friedrich Wegener in 1937. In een poging om het aantal eponiemen te reduceren, kreeg de aandoening in 2011 de meer beschrijvende naam van granulomatose met polyangiitis. (3, 9)

GPA is een systemische, necrotiserende vasculitis geassocieerd met ANCA-positiviteit (cANCA) gericht tegen het antigen PR3. GPA wordt gekarakteriseerd door granulomateuze en necrotiserende inflammatoire letsels voornamelijk in de bovenste en onderste luchtwegen. Vaak is een pauci-immune glomerulonefritis geassocieerd, die snel progressief kan zijn. Op basis van de CHCC definities is GPA een necrotiserende



granulomateuze inflammatie van de bovenste en onderste luchtwegen met necrotiserende vasculitis van de kleine en middelgrote bloedvaten, i.e. capillairen, venen, arteriolen en arteries. Necrotiserende glomerulonefritis is frequent aanwezig, doch niet obligatoir. Volgens de CHCC definitie is er geen histologische bevestiging nodig om de diagnose van GPA te kunnen stellen. Toch wordt histologische bevestiging aangeraden. Vooral renale histologie is een prognostische factor die bepalend kan zijn voor de behandeling, voornamelijk bij plasmaferese. Volgens de ACR criteria moet GPA voldoen aan minstens 2 van de volgende 4 criteria: 1) sinus aantasting; 2) nodules, vaste pulmonaire infiltraten of caviteiten op RX thorax; 3) urinesediment met hematurie of rode bloedcel cilinders; 4) histologische granulomen in een arterie of in de perivasculaire zone van een arterie of arteriool. Deze criteria hebben een sensitiviteit van 88.2% en specificiteit van 92.0%. (1, 3)

De etiologie van GPA is niet volledig gekend en waarschijnlijk multifactorieel. Omgevingsfactoren zoals stof-inhalatie of blootstelling aan silica verklaren ongeveer 10% van de gevallen. Eventueel zou een infectieus agens een rol spelen in het triggeren van de ziekte. Zo zou dragerschap van *Staphylococcus aureus* in de neus geassocieerd zijn met ziekte-opstoten. (3, 10)

GPA kan acuut levensbedreigend zijn ten gevolge van ernstige en snel progressieve glomerulonefritis of levensbedreigende diffuse alveolaire hemorrhagie, als gevolg van een (pauci-immune) necrotiserende capillaritis. De ogen, het hart, de darmen, de huid, en het perifeer zenuwstelsel kunnen ook aangetast zijn bij GPA ten gevolge van een necrotiserende vasculitis van de kleine tot middelgrote bloedvaten. (1)

Grosso modo zijn er twee fenotypes van GPA: een systemische vorm en een gelokaliseerde vorm. De gelokaliseerde vorm manifesteert zich voornamelijk door neus-, keel- of oor-aantasting, die vaak recurrent of refractair is. Er is ANCA-positiviteit in 50-80% van de gevallen. Bij de systemische/diffuse/ernstige vorm is er vaak nier-aantasting, eventueel met intra-alveolaire hemorrhagie en eventueel met aantasting van minstens één vitaal orgaan of van een niet-vitaal orgaan, maar met constitutionele symptomen (koorts, gewichtsverlies). Initieel is de systemische vorm ernstiger, maar herval is zeldzaam. Transitie van de ene naar de andere vorm is mogelijk. Bij de systemische vorm bedraagt ANCA-positiviteit 90%. (1, 3)

Herval is frequent bij GPA. Een kwart van de patiënten hervallen binnen de eerste twee jaar na diagnose en meer dan de helft hervalt binnen de eerste vijf jaar. Het risico op herval zou zeven keer hoger zijn bij dragerschap van *Staphylococcus aureus* in de neus. (10) Daarom is langdurig gebruik van cotrimoxazole aangeraden bij GPA. Variatie in ANCA-titer op IIF is niet voorspellend voor herval, maar een blijvende ANCA-positiviteit wel.

GPA is een ernstige ziekte met bijna altijd een fatale afloop indien niet behandeld. Gelukkig gaan 90% van de patiënten in remissie met de correcte behandeling. De overlevingsgraad is 80% op 10 jaar. (3)

Als behandeling is er eerst een inductiefase van 3 tot 6 maanden, bestaande uit een systemische corticosteroïd in combinatie met een immunosuppressant zoals cyclofosfamide (Endoxan®) of rituximab (Mabthera®). Plasmaferese is in de initiële fase enkel voorbehouden voor de ernstige vormen van GPA met nier-aantasting of alveolaire hemorrhagie. In minder ernstige systemische of gelokaliseerde vormen kan ook methotrexate (Ledertrexate®) toegediend worden. Vervolgens wordt een onderhoudsfase gestart van 18 tot 24 maanden. Hierbij worden orale corticosteroïden gecombineerd met azathioprine (Imuran®), methotrexate (Ledertrexate®) of rituximab (Mabthera®). (3)

## 2. **Microscopische polyangiitis (MPA)**

MPA werd als aparte entiteit voorgesteld door Savage et al. in 1985. (11) Voordien vormde MPA een onderdeel van PAN. In tegenstelling tot PAN is er bij MPA bijna altijd een snel progressieve glomerulonefritis aanwezig, vaak met pulmonaire capillaritis. Daarnaast is PAN ANCA-negatief. (2)

Deze aandoening wordt gekenmerkt door een pauci-immune necrotiserende vasculitis van de kleine bloedvaten, zonder vorming van granuloma en al dan niet met aantasting van de middelgrote bloedvaten. De klinische draagwijdte is gelijkend op de GPA, behalve bij MPA is er minder vaak neus-, keel- en oor-aantasting. Ongeveer 90% van de patiënten hebben nier-aantasting. (1)

60% van de gevallen zijn MPO positief en 30% zijn PR3 positief. Patiënten met MPA hervallen minder vaak dan patiënten met GPA. (1)

Als inductiebehandeling wordt klassiek corticosteroïden gecombineerd met cyclofosfamide (Endoxan®) of rituximab (Mabthera®). In geval van ernstige nierschade wordt plasmaferese geassocieerd. Eenmaal remissie bereikt is, wordt als onderhoudsbehandeling gestart met azathioprine (Imuran®) of eventueel met methotrexate (Ledertrexate®) voor 18 maanden. (2)

## 3. **Eosinofiele granulomatose met polyangiitis (EGPA)**

EGPA, of Churg-Strauss syndroom, werd voor het eerst beschreven in 1951 door Churg en Strauss. Klinisch wordt deze aandoening gekarakteriseerd door astma, hypereosinofilie ( $>1500/\mu\text{L}$  of  $>10\%$ ) en transiënte pulmonaire infiltraties. Deze aandoening behoort enerzijds bij de AAV en anderzijds bij hypereosinofiele syndromen. Grosso modo kan je de klinische presentatie dan ook opdelen in twee groepen, enerzijds de groep



met vasculitis manifestaties en anderzijds de groep met meer eosinofiele manifestaties. Het onderscheid tussen beide groepen kan gemaakt worden op basis van ANCA-bepaling. De ANCA-positieve patiënten vertonen eerder de vasculitis-klachten zoals perifere neuropathieën, glomerulonefritis en purpura, terwijl de ANCA-negatieve groep zich eerder presenteert met myocardschade, longinfiltraten en gastro-intestinale symptomen. Klassiek wordt het ziekteverloop van EGPA opgedeeld in verschillende fasen. Eerst is er een prodroomfase, gekarakteriseerd door astma en rhinosinusitis. Daarna volgt een eosinofiele fase met perifere eosinofiele en orgaanaantasting (long, hart en gastro-intestinaal stelsel). Tenslotte is er een vasculitis-fase met klinische manifestaties ten gevolge van inflammatie van de kleine bloedvaten (perifere neuropathie, nierschade en huidletsels). Over het algemeen komt snel progressieve glomerulonefritis en pulmonaire hemorrhagie minder vaak voor bij EGPA, in vergelijking met MPA en GPA. Daarentegen is een levensbedreigende myocardiële vasculitis het meest waarschijnlijk in EGPA. (1, 12)

De typische histologische kenmerken zijn extravasculaire granuloma's en eosinofiel-rijke infiltraten in de luchtwegen, samen met necrotiserende vasculitis van de kleine en middelgrote bloedvaten. (1)

EGPA is over het algemeen een milder type van systeemvasculitis met een lagere mortaliteit, in vergelijking met andere vasculitis-types, indien behandeld. Onbehandeld vertoont EGPA dezelfde mortaliteit als GPA, namelijk ongeveer 50% na drie maanden. Een Franse vasculitis studiegroep heeft vijf prognostische factoren geformuleerd (five-factor score; FFS) (13):

1. Gestegen serum creatinine ( $>1.58$  mg/dL)
2. Proteïnurie ( $>1$  g/24u)
3. Gastro-intestinale betrokkenheid
4. Cardiomyopathie
5. Centraal zenuwstelsel betrokkenheid

Aanwezigheid van één prognostische factor ( $FFS \geq 1$ ), betekent reeds een lichte daling in de overleving, 81% tot 92% van de patiënten geraken in remissie onder de correcte behandeling. Echter 26% tot 28% hervallen na remissie. (12)

60% van de EGPA-patiënten vertonen ANCA-positiviteit, waarvan 30% MPO en 30% PR3. (1)

Bij prognostisch gunstige EGPA ( $FFS=0$ ) bestaat de behandeling uit een monotherapie van corticosteroiden. In geval van therapiefalen of hervall kan een immunosuppressant toegevoegd worden zoals azathioprine (Imuran®) of cyclofosfamide (Endoxan®). Bij de prognostisch minder gunstige groep ( $FFS \geq 1$ ) wordt er meteen gestart met een combinatie van corticosteroiden en immunosuppressanten. Andere geneesmiddelen die gebruikt kunnen worden zijn rituximab (Mabthera®), omalizumab (Xolair®), imatinib (Glivec®). Voorlopig wordt er op vlak van behandeling nog geen onderscheid gemaakt tussen de ANCA-positieve en de ANCA-negatieve patiënten met EGPA. (12)

### iii. **Andere ANCA-geassocieerde ziektebeelden**

#### 1. **Inflammatoire darmziekten**

Inflammatoire darmziekten zijn een groep van aandoeningen van het gastro-intestinaal stelsel, waarvan de ziekte van Crohn (CD) en colitis ulcerosa (CU) de twee grootste groepen zijn. ANCA is positief in 60-80% van CU en 5-25% van CD. Op indirecte immunofluorescentie vertonen deze een perinucleair patroon, waarbij vooral de rand van de kern fluoresceert, zonder uitbreiding naar het centrum van de kern. In vele klinisch laboratoria wordt dit patroon atypisch genoemd omdat de confirmatie op formaline-gefixeerde neutrofielen veelal negatief is, alsook de MPO-bepaling op ELISA. Het antigeen waartegen ANCA bij IBD gericht is, is niet gekend. Reeds verschillende antigenen zijn naar voren geschoven als mogelijk doelwit (serine proteasen cathepsine D en elastase, hydrolase bèta-glucuronidase, het ijzer-bindend eiwit lactoferrine, bactericidal permeability increasing (BPI) protein...), maar er wordt vermoed dat het oorzakelijk antigeen nog moet gevonden worden. (14)

Voor de diagnose van CD en CU heeft ANCA weinig nut, aangezien de te lage sensitiviteit en specificiteit en aangezien hier andere diagnostische technieken voor bestaan (anamnese, radiologie, endoscopie, biopsie en andere laboratoriumtesten zoals faecaal calprotectine). (14)

In 10-15% van de patiënten met inflammatoire darmziekte kan er nog geen diagnose van CD of CU gesteld worden, de zogenaamde "indeterminate colitis". Door de bepaling van ANCA te combineren met de bepaling van anti-*Saccharomyces cerevisiae* antistoffen (ASCA), zou het mogelijk moeten zijn om een vroegtijdige differentiatie tussen CD en CU te maken. In een multicenter studie met 97 patiënten met indeterminate colitis kon de combinatie ASCA+/ANCA- CD voorspellen in 80% van de patiënten (sensitiviteit 67%, specificiteit 78%, positieve likelihood ratio 3). De combinatie ASCA-/ANCA+ kon UC voorspellen in 64% van de patiënten (sensitiviteit 78%, specificiteit 67%, positieve likelihood ratio 2.3). Opmerkelijk in deze studie was dat bij 48.5% van de patiënten geen antistoffen konden aangetoond worden, noch ANCA, noch ASCA) en dat deze seronegatieve patiënten indeterminate bleven na ongeveer 10 jaar. (14, 15)

#### 2. **Andere**

Naast IBD kan er ook ANCA-positiviteit optreden bij andere aandoeningen zoals primaire scleroserende cholangitis (87% ANCA-positiviteit), auto-immune hepatitis type I (90% ANCA-positiviteit) en Felty syndroom (90% ANCA-positiviteit). Net als bij IBD zijn ook hier MPO en PR3 in de regel negatief. (1, 16)

## c. Het bepalen van ANCA

### i. Detectie-methodes voor ANCA:

Indirecte immunofluorescentie en ELISA zijn de meest gebruikte technieken. Een combinatie van beide technieken zorgt voor een specificiteit van 99% voor ANCA-geassocieerde vasculitis. De sensitiviteit voor GPA is 73% en voor MPA is 67%. (1)

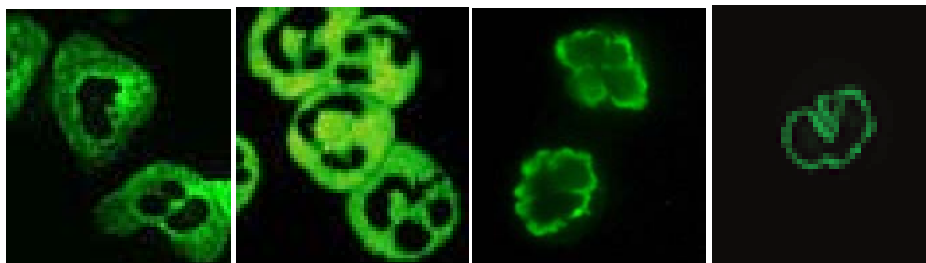
#### 1. *Indirecte immunofluorescentie*

Indirecte immunofluorescentie (IIF) is nog steeds de gouden standaard voor ANCA screening. De test gebeurt op ethanol-gefixeerde neutrofielen. Daarnaast worden ook formaline- en methanol-gefixeerde neutrofielen gebruikt om de verschillende fluorescentiepatronen beter af te lijnen. Er zijn drie patronen beschreven.

Het eerste patroon is het cytoplasmatisch patroon (**cANCA**) (figuur 5). Dit patroon is gedefinieerd als het diffuus, granulaire aankleuren van het cytoplasma van de neutrofielen, vaak met centrale of interlobulaire fluorescentie-accentuatie. Op formaline-gefixeerde neutrofielen is de fluorescentie grover. Op methanol-gefixeerde neutrofielen is het patroon identiek als het patroon op ethanol. Dit typische cANCA-patroon wordt meestal veroorzaakt door antistoffen gericht tegen PR3. Soms wordt er een homogeen, diffuus cytoplasmatisch patroon beschreven. Dit atypisch cANCA-patroon wordt soms als een apart patroon beschouwd en is niet geassocieerd met antistoffen tegen PR3 of MPO, maar wel met antistoffen gericht tegen BPI, die voornamelijk voorkomen bij chronische infecties zoals *Pseudomonas aeruginosa*-infecties bij patiënten met mucoviscidose en bij inflammatoire darmziekten. (1, 17)

Het tweede patroon is het perinucleair patroon (**pANCA**) (figuur 5). Dit patroon presenteert zich als een zone van hogere fluorescentie-intensiteit die kernlobben omgeeft waarbij het centrum van de kern grotendeels gespaard blijft. Op formaline is hetzelfde grover cytoplasmatisch patroon te zien zoals bij cANCA, terwijl op methanol er geen fluorescentie-aankleuring is. Op ethanol ontstaat er bij ANCA-antigenen zoals MPO een perinucleair patroon omdat deze antigenen kationen zijn die bij het fixeren met ethanol kunnen vrijkomen uit de cytoplasmatische granules en vervolgens migreren naar de positief geladen kernmembraan. Formaline zorgt voor een veel sterkere fixatie, waardoor de antigenen in de granules blijven en zo een cytoplasmatisch patroon tonen. Het sterkere fixeren van formaline zorgt ook voor de grovere korreling. De moeilijkheid is het onderscheid maken met ANA, waarbij de ganse celkern aankleurt. Op formaline is er bij de meeste ANA geen fluorescentie te zien. Soms gebeurt het dat bij het titreren van een pANCA op ethanol-gefixeerde neutrofielen dat het patroon wijzigt naar een cytoplasmatisch patroon bij de laatste verdunning. Dit is te verklaren doordat de weinige antistoffen die overblijven bij de laatste verdunning de hoogste affiniteit hebben voor een specifieke, intragranulair epitoom van het antigen. (1, 17)

Het derde patroon wordt het atypische patroon (**aANCA**) genoemd (figuur 5). Dit patroon omvat de patronen die zowel kenmerken van cANCA en pANCA vertonen, namelijk een zwak diffuse cytoplasmatische fluorescentie met sterke lineaire perinucleaire aankleuring. Op formaline is er ofwel geen fluorescentie te zien, ofwel een cytoplasmatisch patroon, afhankelijk van het doelwit-antigen. Op methanol is het patroon hetzelfde als op ethanol. (1, 17)



**Figuur 5** De verschillende fluorescentiepatronen van ANCA (van links naar rechts): cANCA, atypische cANCA, pANCA en atypische ANCA (aANCA). (18)

#### 2. *ELISA/immunodot*

Vaste fase assays zoals enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) of immunodot worden gebruikt om de specifieke antigenen aan te tonen waartegen ANCA gericht zijn. In het kader van AAV zijn MPO en PR3 de belangrijkste doelwit-antigenen. Andere antigenen waartegen ANCA kan gericht zijn (bijvoorbeeld BPI) zijn

zeer laag prevalent en zeer talrijk. Daarbij is er niet altijd een duidelijke associatie met een bepaalde pathologie, waardoor het eerder irrelevant is om deze antigenen op te sporen. (17)

Er zijn verschillende manieren om de antigenen MPO en PR3 te bepalen en te kwantificeren, maar er is geen internationale consensus rond de te gebruiken eenheid en cutoff. Daarom wordt er idealiter een semi-kwantitatief resultaat gerapporteerd, in plaats van het gemeten, kwantitatieve resultaat. (16)

## ii. **Richtlijnen**

In 1999 en 2003 werd in American Journal of Clinical Pathology richtlijnen voor ANCA-meting en -rapportering gepubliceerd door een internationale groep van experts, namelijk de International Consensus Statement (ICS). (16) Het doel was om technische moeilijkheden te minimaliseren en homogeniteit van resultaten te verhogen.

### 1. **Screening/confirmatie**

Volgens deze richtlijnen moet er eerst gescreend worden met IIF, en elk positief patroon moet geconfirmeerd worden met PR3- en MPO-ELISA. Screenen met ELISA en confirmeren met IIF wordt niet aangeraden omdat hierrond te weinig evidentie bestaat. Verder wordt opgemerkt dat IIF-negatieve stalen idealiter ook gecontroleerd worden met ELISA aangezien 5% van de serumstalen enkel positief zijn met ELISA. (16)

In de richtlijnen wordt voor IIF niet aangeraden om resultaten te confirmeren met formaline-gefixeerde neutrofielen omdat deze vals-negatief kunnen zijn in het geval van MPO-ANCA. Een recente studie van Lin et al. toont echter aan dat bij 129 serumstalen die met IIF positief waren op ethanol-gefixeerde neutrofielen en negatief op formaline-gefixeerde neutrofielen, er slechts 1 staal was dat MPO of PR3 positief was. Hieruit zou kunnen afgeleid worden dat IIF op formaline wel degelijk een meerwaarde kan hebben om het aantal MPO/PR3 bepalingen te reduceren. Deze studie had echter wel één grote tekortkoming, namelijk het ontbreken van de klinische achtergrond bij de stalen. (18)

### 2. **Rapportering**

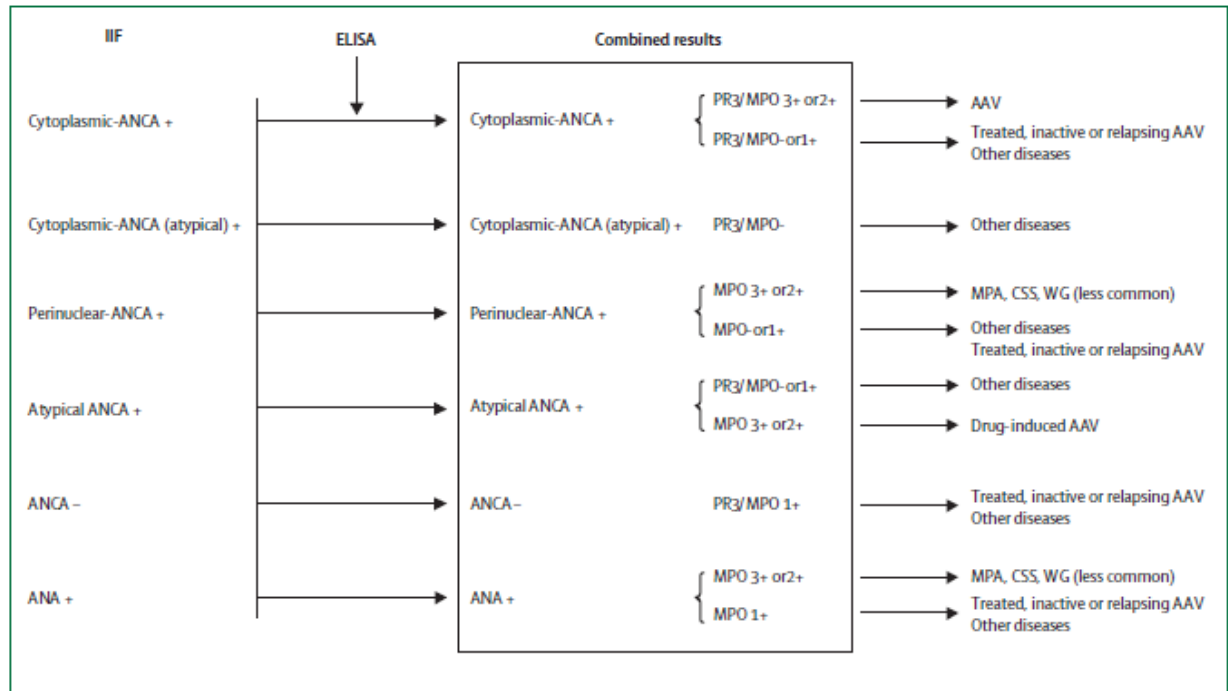
Wanneer resultaten wijzen op ANCA-geassocieerde vasculitis moet op het verslag vermeld worden dat deze resultaten best histologisch geconfirmeerd worden. ICS heeft standaard-antwoorden geformuleerd die gerapporteerd kunnen worden bij de voorlopige resultaten van IIF en bij de gecombineerde resultaten van IIF en ELISA, volgens een bepaald schema (figuur 6) (16)

De ICS richtlijnen raden verder aan om geen IIF-titers te rapporteren, maar wel de hoeveelheid antigenen via ELISA omdat deze meer nut hebben in ziekte-monitoring. Dit kwantitatief ELISA-resultaat wordt het best semi-kwantitatief uitgedrukt aangezien er geen consensus is rond gestandaardiseerde meeteenheden. (16)

De ICS richtlijnen raden verder aan om de atypische, diffuse cANCA als een aparte categorie te rapporteren, omdat deze niet gericht zijn tegen PR3 (zoals bij typische cANCA bij GPA), maar meestal tegen BPI. Verder wordt in de ICS richtlijnen alle perinucleaire patronen bij pANCA gerekend, ondanks er al dan niet nucleaire extentie is van fluorescentie. Veel klinische laboratoria gebruiken namelijk de term "atypische (p-)ANCA" bij het perinucleair patroon, waarbij de kern gespaard blijft. Volgens ICS is er te veel variatie tussen verschillende laboratoria of zelfs binnen eenzelfde laboratorium om het onderscheid binnen het perinucleair patroon te maken doordat er veel variatie zit op de ervaring van aflezen, op de fluorescentie-intensiteit en op het neutrofielen substraat. Best worden deze allemaal als pANCA beschouwd en geconfirmeerd met MPO-ELISA. Hierbij is het wel nodig dat de clinicus begrijpt dat pANCA niet altijd noodzakelijk wijst op vasculitis. (16)

In het geval van ANA-interferentie, mag er geen patroon beoordeeld worden, wordt de interferentie gerapporteerd en wordt MPO/PR3 gemeten. (16)

AAV is een zeer zeldzame aandoening. Als je daarom ANCA zou bepalen bij de algemene populatie, dus bij een lage pre-test probabilliteit, zou er veel vals-positieve resultaten bekomen worden, ondanks de hoge specificiteit. Indien ANCA enkel bepaald wordt bij patiënten met een hoge verdenking voor AAV (hogere pre-test probabilliteit), zouden er heel wat minder vals-positieve resultaten zijn. Daarom wordt geadviseerd om ANCA enkel aan te vragen indien er een sterk vermoeden is van ANCA-geassocieerde vasculitis. (1)



**Figuur 6** Interpretatieschema bij ANCA (1)

### 3. Follow-up

In 1985 werd het nut van ANCA-bepaling in de follow-up van GPA voorgesteld door Van der Woude et al, die opmerkte dat ziekte-remissie vaak overeenkwam met ANCA negativiteit. Persistierende of terugkerende cANCA-positiviteit binnen het eerste jaar van remissie is klinisch significant geassocieerd met ziekte-herval in ANCA-geassocieerde vasculitiden. Bij persistierende negatieve cANCA of pANCA daarentegen is het risico op herval heel laag. (1)

ICS raadt alvast aan om gekende patiënten met AAV niet op te volgen aan de hand van ANCA-titers maar wel met de concentratie van MPO/PR3. (16)

Een recentere studie van Verstockt et al. gaat nog een stap verder en geeft aan dat het zelfs niet nodig is om PR3 routinematig te bepalen bij de opvolging van een patiënt die in GPA-remissie is. Gezien de lage pre-test probabieliteit bij routine opvolging is de positieve predictieve waarde van een PR3-toename te laag (15.0%-22.5%). Enkel wanneer er klinisch vermoeden van herval is (i.e. een hoge pre-test probabieliteit) heeft een 75% stijging of het positief worden van PR3 een voldoende hoge positief predictieve waarde (77.5%-81.6%). (19)

Uit een meta-analyse van Schmidt en van der Woude is gebleken dat er geen klinische herval was bij 42% van de patiënten die een stijging van ANCA zagen bij IIF en bij 25% van de patiënten die een stijging van ANCA zagen op ELISA. (20) Gezien een aanzienlijk aandeel van de patiënten niet hervallen bij een MPO/PR3-stijging, gezien het ontbreken van statistisch krachtige benefit-risk trials en gezien de niet te verwaarlozen toxiciteit van immuunsuppressieve behandelingen wordt er niet aangeraden om patiënten te behandelen bij een toename van ANCA zonder duidelijke klinische symptomen. Patiënten in remissie moeten wel van dichtbij opgevolgd worden in geval van ANCA-toename. (1)

### iii. Terugbetaling in België

Wat betreft het bepalen van ANCA zijn er 3 regels opgesteld binnen artikel 24 van RIZIV-nomenclatuur.

556371	556382	Opzoeken van anti-neutrofielen-cytoplasma antilichamen	B 300	(Maximum 1)	
556393	556404	Titreeren van anti-neutrofielen - cytoplasma antilichamen	B 400	(Maximum 1)	(Diagnoseregul 64)
556570	556581	Opsporen van anti-PR3 of anti-MPO antilichamen	B 350	(Maximum 2)	(Diagnoseregul 64)

(Diagnoseregul 64: Mag slechts aan het RIZIV aangerekend worden als het opzoeken van anti-neutrofiële cytoplasma antistoffen (ANCA) positief is)

De terugbetalingsregels zijn dus niet helemaal conform de ICS richtlijnen. Enerzijds is er terugbetaling voorzien voor IIF-titratie (indien de screening positief is), terwijl ICS vooropstelt dat titratie overbodig is en beter kan vervangen worden door (semi-)kwantificatie van MPO/PR3. (16)

Anderzijds wordt de bepaling van PR3 en MPO enkel terugbetaald indien er eerst een screening gebeurd is, terwijl in follow-up best gebeurt aan de hand van MPO/PR3 bepaling, zonder IIF. (16)

#### iv. **Automatisatie**

De laatste jaren is er een trend in het automatiseren van IIF, onder meer in de hoop om de bepaling beter te kunnen standaardiseren. Er zijn reeds verschillende systemen op de markt die een pipetteerautomaat combineren met een automatische, digitale microscoop. Het gros van deze systemen zijn reeds uitgebreid gevalideerd voor de bepaling van ANA, terwijl de studies rond automatisatie van IIF bij ANCA eerder gering zijn.

In een eerste vergelijkende studie werd het AKLIDES-systeem (Medipan GmbH, Dahlewitz/Berlijn, Duitsland) vergeleken met de traditionele, manuele IIF voor ANA, anti-dubbelstrengs DNA antistoffen (dsDNA) en ook ANCA. (21) In totaal werden 272 serumstalen verzameld, 182 voor ANA, 44 voor dsDNA en 46 voor ANCA. De stalen voor ANCA werden afgenomen bij patiënten verdacht voor vasculitis. Deze serumstalen werden vervolgens ingezet op ethanol- en methanol-gefixeerde neutrofielen (AKLIDES C-ANCA en AKLIDES P-ANCA slides). Enerzijds werden de slides manueel afgelezen onder een fluorescentiemicroscoop en anderzijds werden de plaatjes ingelezen en geïnterpreteerd door het AKLIDES-systeem. De twee manieren van aflezen vertoonden een overeenkomst van 87% (40/46). Alle 6 discordante stalen waren MPO/PR3 negatief op ELISA. Verder waren 5 van de 6 discordanties negatief op AKLIDES en positief bij manuele microscopie. Het ene staal dat positief was op AKLIDES en negatief bij manuele microscopie bleek een staal te zijn met ANA interferentie. In deze studie was het echter niet helemaal duidelijk hoe de ANCA-patronen geïnterpreteerd werden: werden de atypische patronen als negatief beschouwd, of als positief? Ook de klinische achtergrond van de stalen ontbreekt. Daarnaast is het ook niet duidelijk of de aflezing op AKLIDES enkel gebeurde door de interpretatie-software of dat deze nog werd gecontroleerd door de gebruiker. (21)

In een tweede studie werd opnieuw het AKLIDES systeem geëvalueerd enkel voor het bepalen van ANCA op ethanol- en formaline-gefixeerde neutrofielen. (22) 196 serumstalen werden geselecteerd, 79 stalen van AAV patiënten en 117 relevante controlestalen (gezonde vrijwilligers, ANA-positieve stalen, AMA-positieve stalen, BPI-positieve stalen en stalen met een atypisch patroon). De stalen werden enerzijds afgelezen door het AKLIDES-systeem en anderzijds manueel afgelezen onder een LED fluorescentiemicroscoop door twee afzonderlijke aflezers. Voor de AAV stalen bleek het AKLIDES onvoldoende sensitief te zijn om cANCA te herkennen op ethanol-gefixeerde neutrofielen, maar wel op formaline-gefixeerde neutrofielen. Het omgekeerde werd opgemerkt bij pANCA, namelijk de aflezing op ethanol-gefixeerde neutrofielen bleek het meest gevoelig te zijn. Bij de controle sera kon het AKLIDES-systeem moeilijk differentiëren tussen pANCA en een nucleair patroon bij ANA-positieve stalen met een homogeen patroon, terwijl dit bij de visuele aflezing wel mogelijk was. Daarentegen was het AKLIDES-systeem wel in staat om een onderscheid te maken tussen een typische cANCA met PR3 en een atypische cANCA met BPI, terwijl dit bij visuele aflezing onmogelijk bleek. Verder merkten de auteurs op dat er van het systeem in de eerste plaats verwacht wordt dat deze positieve stalen oppikt ongeacht de patronen, gezien er altijd secundaire bevestiging volgt via MPO/PR3 ELISA-testen. Indien enkel positiviteit op ethanol- en/of formaline-gefixeerde neutrofielen van belang is, wordt een sensitiviteit van 94% en 96% behaald met het AKLIDES en met visuele aflezing, respectievelijk, wat betreft de stalen van patiënten met AAV. (22)

In een derde studie werden 342 stalen vergeleken waarvan 119 stalen van patiënten met AAV. (23) Opnieuw werd het AKLIDES systeem vergeleken met het visueel aflezen. Wat betreft positieve/negatieve discriminatie, was er een sterke overeenkomst tussen de interpretatie van het systeem en de visuele aflezing, op zowel ethanol- als formaline-gefixeerde neutrofielen. Wat betreft het differentiëren tussen cANCA en pANCA is er eveneens een sterke overeenkomst tussen beide manieren van aflezen. (23)

Tenslotte werd in een recente studie het HELIOS-systeem uitgetest voor zowel ANA als ANCA. (24) Wat betreft het ANCA-luik werden 170 stalen verzameld, waaronder 40 routine-stalen, 90 stalen van gezonde bloeddonoren en 40 MPO/PR3-positieve stalen. Een overeenkomst van 100% werd gezien tussen het HELIOS-systeem en de visuele aflezing wat betreft de routine-stalen en de controle-stalen. Voor de MPO/PR3-positieve stalen was er een goede overeenkomst van 95%. In deze studie bestond de controlegroep echter alleen uit stalen van gezonde vrijwilligers en de positieve groep enkel uit stalen met duidelijke MPO/PR3-positiviteit, waardoor deze goede correlatie met enige voorzichtig moet bekeken worden. (24)

## Luik 2: Methodevergelijking

### a. Inleiding

ANCA-diagnostiek wordt in het klinisch laboratorium van AZ Sint-Jan Brugge in twee stappen uitgevoerd, zoals beschreven in internationale richtlijnen. (16) Eerst worden stalen gescreend met IIF op ethanol- en formaline-gefixeerde neutrofielen (Accusay ANCA, Launch Diagnostics) met een verdunning van 1/20. Hiervoor worden de stalen ingezet met behulp van een pipetteerautomaat (Beeline 220s, HTZ), vervolgens worden de stalen visueel geïnterpreteerd onder een LED fluorescentiemicroscop (Lab A.I Axio, Zeiss) door twee aflezers. Positieve stalen worden in tweede tijd getitreerd en getest op MPO/PR3 via een ELIA-techniek (ImmunoCAP, Thermo Scientific). De laatste jaren is er een trend in het automatiseren van IIF, voornamelijk wat betreft ANA. De bedoeling van deze CAT is het vergelijken van vier verschillende automatische systemen die in staat zijn ANCA IIF uit te voeren.

### b. Materialen en methoden

#### i. Systemen

##### 1. Aesku

**Helios** (figuur 7) van de Duitse firma Aesku is een volledig geautomatiseerd IIF-systeem dat in staat is om de stalen in te zetten, alsook de ingezette slides af te lezen en te discrimineren tussen positieve en negatieve stalen. Het toestel bevat twee ingebouwde barcodelezers voor stalen en slides om een volledige traceerbaarheid te garanderen, drie naalden wat zorgt voor een hoge snelheid en het drogen van de slides overbodig maakt en een auto-focus epifluorescentie microscoop. Een unieke eigenschap is het automatisch dispenser van mounting medium op de slides die zonder dekglasjes kunnen afgelezen worden. Hierdoor kunnen de slides meteen na incuberen afgelezen worden zonder menselijke tussenkomst.

De Helios software analyseert de beelden volgens een wiskundig algoritme dat elk IIF-patroon analyseert en een pre-classificatie resultaat (positief/negatief) suggereert op basis van verschillende variabelen (structuuranalyse, fluorescentie-intensiteit, achtergrond/cel ratio...). Het systeem herkent dus geen patronen, maar kan wel een onderscheid maken tussen positief/negatief. Om de aflezer echter bij te staan in het bepalen van het fluorescentiepatroon, is er een patroon-bibliotheek geïntegreerd om de beelden te vergelijken. Verder kan het systeem voor ANA een eindtiter inschatten. Voor ANCA is dit echter (nog) niet mogelijk.

Per well worden er verschillende beelden genomen. Het aantal is gebruiker-afhankelijk en kan varieëren van 1 tot 10 (standaard 3). Beelden worden genomen met een 20x lens, maar kunnen op het scherm tot 650x vergroot worden.

Helios werkt met standard FITC fluorochroom (excitatie tussen 465 en 499 nm) en er is geen bijkomstige kleuring nodig om het beeld te kunnen focussen. Hierdoor kunnen de slides ook eenvoudig manueel herbekeken worden onder een traditionele microscoop. De cutoff-settings (positief/negatief) kunnen eenvoudig afgesteld worden per gebruiker.

In het systeem is geen patiëntenhistoriek aanwezig. Beelden worden weliswaar per run bewaard, maar niet per patiënt. Het is dus niet mogelijk om van een bepaalde patiënt beelden uit het verleden op te roepen.

Om het volledig geautomatiseerde systeem te kunnen gebruiken, dienen de ANCA-slides van Aesku gebruikt te worden (Aeskuslides ANCA ethanol en Aeskuslides ANCA formalin).

Helios wordt in België verdeeld door de firma BMD.



Figuur 7 Helios

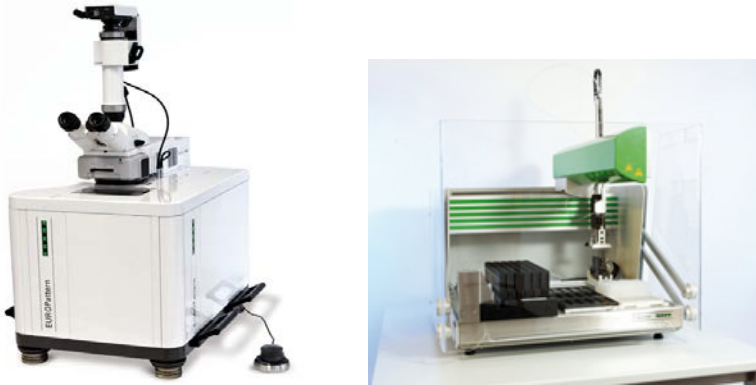
##### 2. Euroimmun

**EUROPattern** is een volledig geautomatiseerd systeem van de Duitse firma Euroimmun voor het nemen en archiveren van beelden bij IIF. Daarnaast kan het systeem ook nucleaire en cytoplasmatische patronen

herkennen. Nadat de slides in het magazijn van de EUROPattern microscoop zijn geplaatst, wordt er automatisch een foto genomen van de slides met een kleurencamera. Het systeem klasseert de beelden als negatief en positief en identificeert het patroon. Patroonherkenning gebeurt aan de hand van een rode contrastkleuring (propidium iodide), wat mogelijk maakt om de celkernen te identificeren. De classificatie is gebaseerd op het k-nearest neighbor algoritme met een training database van meer dan 5000 beelden. Per patiënt worden de beelden en resultaten bewaard die, bij een volgend staal van dezelfde patiënt, eenvoudig kunnen opgeroepen worden ter vergelijking.

In combinatie met EUROPattern biedt Euroimmun een pipetteerstation aan, namelijk de **IF Sprinter**. De IF Sprinter zorgt voor een volledig geautomatiseerde verwerking van de IIF slides voor ANA of ANCA. Om het volledig geautomatiseerde systeem te kunnen gebruiken, moeten de ANCA-slides van Euroimmun gebruikt worden (EUROPLUS Granulocyte Mosaic). Deze slides bestaan uit 10 biochips. Zo'n biochip bestaat vervolgens uit verschillende velden met verschillende substraten. Voor deze CAT werd gebruik gemaakt van slides waarop een biochip bestond uit vijf velden met de volgende substraten: ethanol-gefixeerde neutrofielen, formaline-gefixeerde neutrofielen, Hep2-cellen in combinatie met neutrofielen, MPO- en PR3-dots. Een voordeel hiervan is dat op één well het patroon meteen volledig kan worden geïnterpreteerd. Om de extra informatie die bekomen wordt door de MPO- en PR-dots niet te laten doorwegen in de interpretatie van de patronen, werden deze gemaskeerd voor deze CAT. Zo kon een eerlijke vergelijking met de andere systemen bekomen worden.

EUROPattern en IF Sprinter worden in België verdeeld door de firma Biognost.



**Figuur 8** EUROPattern (link) en IF Sprinter (rechts)

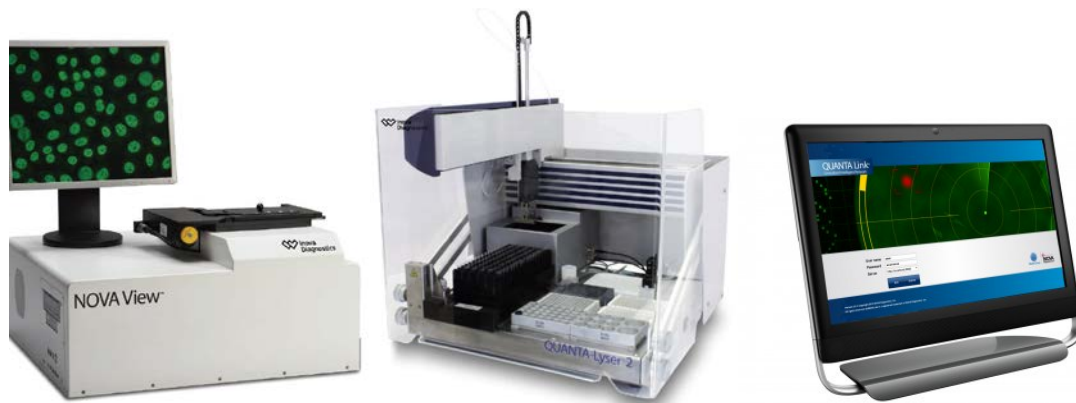
### 3. Inova Diagnostics/Werfen

**NOVA View** is een systeem van de firma Inova Diagnostics, een dochterbedrijf van de Spaanse firma Werfen. NOVA View bestaat uit een geautomatiseerde geïnverteerde LED fluorescentiemicroscoop met een krachtige interpretatie-software. De geautomatiseerde digitale microscoop creëert gekleurde digitale beelden met een hoge resolutie van welbepaalde gebieden op een well van een slide. Tijdens het scannen, plaatst de slidehouder de slide boven het objectief waarna deze kan focussen. Bij het focussen worden er reeds beelden genomen om na te gaan of aan bepaalde beeldkwaliteiten wordt voldaan, zoals de lichtintensiteit. Het conjugaat dat gebruikt wordt bij de slides van Inova Diagnostics, bevat het fluorescente DAPI. DAPI bindt sterk aan het A-T rijke gebieden in het DNA, waardoor het sterk de celkernen aankleurt. Vervolgens gebruikt de software de DAPI-fluorescentie om zich te focussen op zoveel mogelijk celkernen. Er worden per well drie tot vijf beelden genomen met zowel de DAPI-, als de FITC-filter, op een vergroting van 40x. Kern en cytoplasma intensiteit worden afzonderlijk gemeten. Per well moeten minstens 25 cellen geïdentificeerd kunnen worden. Samen met het nemen van de beelden, rapporteert NOVA View ook de gemiddelde, gemeten lichtintensiteit in light intensity units (LIU). Tenslotte doet het toestel aan patroonherkenning op basis van een software-algoritme. Daarbij wordt bij een positief staal met een bepaald patroon ook een geschatte eindtiter meegegeven, de zogenaamde autotiter. Per patiënt worden de beelden en resultaten bewaard die, bij een volgend staal van dezelfde patiënt, eenvoudig kunnen opgeroepen worden ter vergelijking.

In combinatie met NOVA View biedt Inova Diagnostics een pipetteerstation aan, namelijk de **QUANTA-Lyser**. De QUANTA-Lyser zorgt voor een volledig geautomatiseerde verwerking van de IIF slides voor ANA of ANCA. Om het volledig geautomatiseerde systeem te kunnen gebruiken, moeten de ANCA-slides van Inova Diagnostics gebruikt worden (NOVA Lite ANCA (Ethanol) Kit with DAPI en NOVA Lite ANCA (Formalin) Kit with DAPI).

Daarnaast is er ook een middleware, **QUANTA Link**, die de NOVA View en de QUANTA-Lyser verbindt. Hier worden de patroon-interpretaties uitgevoerd en beelden gearchiveerd.



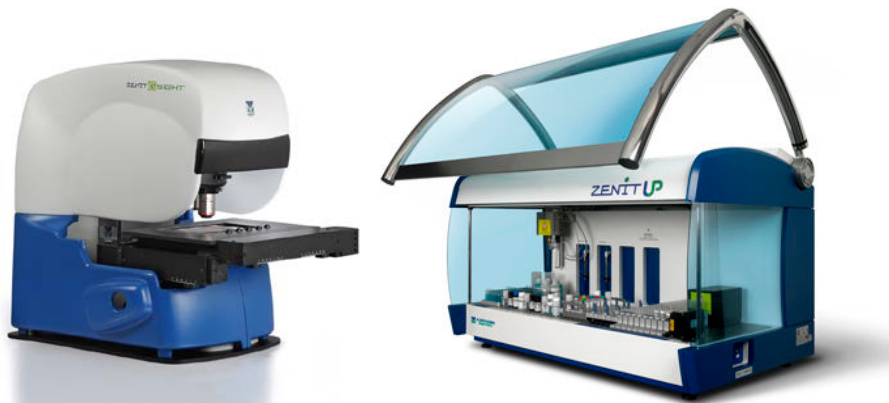


**Figuur 9** NOVA View (links), QUANTA-Lyser (midden) en QUANTA Link (rechts)

#### 4. **Menarini**

De **Zenit G-Sight** is een systeem van de Italiaanse firma Menarini. Zenit G-Sight bestaat uit een microscoop die voorzien is van een gemotoriseerde slide-houder, een LED-licht emitterende bron, een kleurencamera en software die ontwikkeld is om automatisch slides in te lezen en te interpreteren. Per well worden met een 40x objectief verschillende beelden genomen en deze worden softwarematig als een mozaïek terug aan elkaar gezet, zodat er beeld van de volledige well wordt bekomen. Om elke beeld van de mozaïek even scherp te krijgen wordt er gewerkt met vaste punten waarop telkens opnieuw wordt gefocust. Tijdens dit focussen wordt de versterking en belichtingstijd gemeten, waaruit de fluorescentietijd kan berekend worden. Kortweg gebruikt de software de tijd die nodig is om scherp te stellen als een maat voor de intensiteit. Deze intensiteit wordt uitgedrukt in een procentuele waarde. De software kan naast een positief/negatief discriminatie, ook verschillende fluorescentiepatronen herkennen. Per patiënt worden de beelden en resultaten bewaard die, bij een volgend staal van dezelfde patiënt, eenvoudig kunnen opgeroepen worden ter vergelijking.

In combinatie met Zenit G-Sight biedt Menarini een pipetteerstation aan, namelijk de **Zenit Up**. De Zenit Up zorgt voor een volledig geautomatiseerde verwerking van de IIF slides voor ANA of ANCA, naast andere ELISA-toepassingen. Om het volledig geautomatiseerde systeem te kunnen gebruiken, moeten de ANCA-slides van Menarini gebruikt worden (ANCA ethanol en ANCA formalin).



**Figuur 10** Zenit G-Sight (links) en Zenit Up (rechts)

#### ii. **Staalverzameling**

In totaal werden 86 serumstalen vergeleken (tabel I):

- 27 stalen waren van patiënten met een bewezen AAV (15x GPA, 9x MPA, 3x EGPA);
- 17 stalen van patiënten met een andere aandoening zoals IBD, auto-immune hepatitis, niet-ANCA geassocieerde vasculitis, andere reumatologische aandoeningen en fibromyalgie/ CVS (diseased controls);
- 15 stalen van gezonde vrijwilligers (healthy volunteers);
- 27 opeenvolgende stalen uit de routine.

**Tabel I** Patiëntengegevens (exclusief routinestalen). M: man; V: vrouw; AAV: ANCA-geassocieerde vasculitis; MPA: microscopische polyangiitis; GPA: granulomatose met polyangiitis; EGPA: eosinofiele granulomatose met polyangiitis; D: diagnostisch staal; F-U: staal in follow-up.

	M/V	Leeftijd (j)	Groep	Ziektebeeld	D / F-U		M/V	Leeftijd (j)	Groep	Ziektebeeld
1	M	60	AAV	MPA	F-U (immuunsuppressie)	28	M	34	Zieke controles	Chronisch vermoeidheidssyndroom
2	M	69	AAV	GPA	F-U (immuunsuppressie)	29	V	64	Zieke controles	Systemische lupus erythematoses
3	M	69	AAV	GPA	F-U (geen behandeling)	30	V	59	Zieke controles	Ziekte van Crohn
4	M	63	AAV	EGPA	F-U (geen behandeling)	31	V	63	Zieke controles	Systemische lupus erythematoses
5	V	77	AAV	GPA	F-U (immuunsuppressie)	32	M	53	Zieke controles	Colitis ulcerosa
6	V	84	AAV	MPA	F-U (geen behandeling)	33	M	32	Zieke controles	Chronisch vermoeidheidssyndroom
7	M	80	AAV	MPA	F-U (geen behandeling)	34	V	45	Zieke controles	Sjögren syndroom
8	V	88	AAV	GPA	F-U (geen behandeling)	35	V	44	Zieke controles	Fibromyalgie
9	M	60	AAV	MPA	F-U (immuunsuppressie)	36	M	64	Zieke controles	Takayasu arteritis
10	V	58	AAV	GPA	F-U (geen behandeling)	37	V	23	Zieke controles	Erythema nodosum
11	M	52	AAV	GPA	F-U (immuunsuppressie)	38	V	63	Zieke controles	Auto-immune hepatitis
12	V	51	AAV	GPA	F-U (immuunsuppressie)	39	V	77	Zieke controles	Fibromyalgie
13	V	53	AAV	GPA	F-U (immuunsuppressie)	40	V	48	Zieke controles	Ziekte van Crohn
14	V	75	AAV	MPA	F-U (immuunsuppressie)	41	V	62	Zieke controles	Auto-immune hepatitis
15	M	42	AAV	MPA	F-U (geen behandeling)	42	M	66	Zieke controles	Reumatoïde artritis
16	M	74	AAV	EGPA	F-U (immuunsuppressie)	43	V	34	Zieke controles	Ziekte van Crohn
17	M	71	AAV	GPA	F-U (geen behandeling)	44	M	68	Zieke controles	Ziekte van Crohn
18	M	66	AAV	MPA	F-U (geen behandeling)	45	M	64	Gezonde controles	/
19	M	86	AAV	MPA	D	46	V	46	Gezonde controles	/
20	M	50	AAV	GPA	F-U (immuunsuppressie)	47	V	57	Gezonde controles	/
21	V	77	AAV	GPA	F-U (geen behandeling)	48	V	49	Gezonde controles	/
22	V	52	AAV	GPA	F-U (geen behandeling)	49	V	46	Gezonde controles	/
23	M	57	AAV	GPA	F-U (geen behandeling)	50	V	60	Gezonde controles	/
24	V	72	AAV	MPA	D	51	V	22	Gezonde controles	/
25	M	64	AAV	MPA	F-U (immuunsuppressie)	52	M	56	Gezonde controles	/
26	V	61	AAV	GPA	F-U (geen behandeling)	53	V	42	Gezonde controles	/
27	M	82	AAV	MPA	D	54	V	45	Gezonde controles	/
						55	V	51	Gezonde controles	/
						56	M	26	Gezonde controles	/
						57	V	46	Gezonde controles	/
						58	V	45	Gezonde controles	/
						59	M	55	Gezonde controles	/

### iii. Opzet

Alle serumstalen werden bij ontvangst gemeten met de huidige routine methode volgens specificaties van de firma. Vervolgens werden de serumstalen gealiquoteerd en bewaard op  $-80^{\circ}\text{C}$  tot de dag van de analyse.

Alle stalen werden ingezet op de vier systemen volgens de richtlijnen van de desbetreffende firma. Vervolgens gebeurde de aflezing door de automatische, digitale microscopen, alsook de interpretatie met eventuele patroonherkenning (interpretatie 1: toestel). Daarna werden de resultaten digitaal, op het scherm, door twee aflezers geïnterpreteerd (interpretatie 2: digitaal). Tenslotte werden de slides nog eens door twee aflezers bekeken onder een LED fluorescentiemicroscoop (interpretatie 3: manueel). Indien de twee aflezers niet overeenkwamen, werd het desbetreffende staal nog eens door beide lezers samen bekeken om tot een consensus-resultaat te komen.

15 stalen uit de AAV-groep werden getitreerd om een eindtiter te berekenen.

Voor de aflezing werden de fluorescentiepatronen onderverdeeld in vier groepen:

1. "cANCA": cytoplasmatisch patroon op ethanol en positief op formaline
2. "pANCA": perinucleair patroon op ethanol en positief op formaline
3. "Atypische ANCA/ANA interferentie": positief op ethanol en negatief op formaline
4. "Negatief": negatief op ethanol

Ter evaluatie werden volgende aspecten gemeten:

#### – **Overeenkomst/agreement**

Per toestel worden de kappa-coëfficiënt van Cohen berekend tussen de verschillende interpretaties om te weten in hoeverre deze overeenkomen. Ook overeenkomst met de huidige methode wordt hierin opgenomen.

De kappa-coëfficiënt moet als volgt geïnterpreteerd worden:

Value of K	Strength of agreement
< 0.20	Poor
0.21 - 0.40	Fair
0.41 - 0.60	Moderate
0.61 - 0.80	Good
0.81 - 1.00	Very good

#### – **Sensitiviteit, specificiteit en likelihood ratio's**

Bij alle stalen, met uitzondering van de routine-stalen, is het klinisch beeld gekend. Op basis hiervan kan de sensitiviteit en de specificiteit per interpretatie, per toestel berekend worden. Hiervoor wordt er bij de interpretatie “cANCA” en “pANCA” als positief beschouwd en “Atypische ANCA/ANA interferentie” en “Negatief” als negatief. Bij de klinische groepen is de AAV-groep positief en de andere twee groepen negatief.

– **Patroonherkenning**

Naast het al dan niet herkennen van een ANCA-patroon wordt berekend hoeveel van de herkende patronen bij de AAV-groep als het juiste patroon herkend worden (“pANCA” of “cANCA”).

Ook het percentage “Atypische ANCA/ANA interferentie” per patiëntengroep wordt berekend. Bij de AAV-groep en groep van de gezonde vrijwilligers is deze best zo laag mogelijk, terwijl de groep van zieke controles dit patroon mogelijk kan vertonen.

– **Titraties**

Per toestel worden de 15 titraties vergeleken met de titraties van de huidige methode. De correlatie wordt berekend aan de hand van een Spearman’s rank test.

Daar waar mogelijk worden de titraties ook vergeleken met de gemeten intensiteit en met de autotiter.

– **Precisie**

Bij de toestellen waarbij een intensiteit-waarde wordt berekend, wordt de interrater precisie gemeten op drie QC-stalen van de firma (negatief, pANCA en cANCA) en op twee AAV-stalen (1x pANCA 1/640 en 1x cANCA 1/160). Telkens wanneer een run wordt ingezet worden deze stalen meebepaald. Er is geen consensus CV voorhanden in de literatuur, maar in deze studie werd een CV <20% vooropgesteld.

– **Varia**

Elk systeem wordt ook geëvalueerd op het gebruiksgemak bij het inzetten en het gebruiken van de software.

Daarnaast wordt er ook een vergelijking gemaakt tussen de verschillende kostprijzen van elk systeem.

## c. Resultaten

### i. Overeenkomst/agreement

#### 1. Aesku

COHEN KAPPA	Huidige methode	Helios Toestel	Helios Digitaal	Helios Manueel
Huidige methode	/	0,63	0,83	0,69
Helios Toestel	0,63	/	0,59	0,81
Helios Digitaal	0,83	0,59	0,76	0,72
Helios Manueel	0,69	0,81	0,72	/

Helios toont een goede overeenkomst tussen de huidige methode en digitale interpretatie (i.e. de interpretatie door twee aflezers op het scherm). De interpretatie door het toestel zelf en de manuele aflezing (i.e. de interpretatie door de twee aflezers onder de manuele LED fluorescentiemicroscop) komen ook goed overeen. De andere overeenkomsten zijn overwegend matig.

#### 2. Euroimmun

COHEN KAPPA	Huidige methode	EUROPattern Toestel	EUROPattern Digitaal	EUROPattern Manueel
Huidige methode	/	0,76	0,69	0,71
EUROPattern Toestel	0,76	/	0,74	0,75
EUROPattern Digitaal	0,69	0,74	0,86	0,71
EUROPattern Manueel	0,71	0,75	0,71	/

EUROPattern vertoont een goede overeenkomst voor alle combinaties.

### 3. Inova Diagnostics/Werfen

COHEN KAPPA	Huidige methode	NovaView toestel	NovaView digitaal	NovaView manueel
Huidige methode	/	0,76	0,78	0,82
NovaView toestel	0,76	/	0,94	0,81
NovaView digitaal	0,78	0,94	0,87	0,81
NovaView manueel	0,82	0,81	0,81	/

NOVA View vertoont een goede overeenkomst voor alle combinaties, vooral bij de combinatie digitale aflezing/interpretatie door het toestel is de overeenkomst bijna perfect.

### 4. Menarini

COHEN KAPPA	Huidige methode	G-Sight Toestel	G-Sight Digitaal	G-Sight Manueel
Huidige methode	/	0,57	0,75	0,67
G-Sight Toestel	0,57	/	0,75	0,52
G-Sight Digitaal	0,75	0,75	0,87	0,65
G-Sight Manueel	0,67	0,52	0,65	/

Zenit G-Sight toont een matige tot goede overeenkomst tussen de meeste interpretaties. Enkel de interpretaties tussen de twee digitale aflezers komen sterk overeen.

### 5. Inter-observer agreement

Belangrijk bij de digitale aflezing is het gemak waarmee kan afgelezen worden. Idealiter kan op het scherm meteen gezegd worden wanneer een staal positief of negatief is. Het gemak van aflezen komt deels tot uiting in

de overeenkomst tussen twee aparte aflezers. Indien de overeenkomst laag is, kan dit wijzen op een moeilijke aflezing.

<b>COHEN KAPPA</b>	Helios (Aesku)	EUROPattern (EuroImmun)	NovaView (Inova/Werfen)	G-Sight (Menarini)
Inter-observer (digitale aflezing)	0,76	0,86	0,87	0,87

Bij alle toestellen wordt een hoge overeenkomst gezien, al is deze bij Helios iets lager. De resultaten van beide aflezers komen dus telkens goed tot zeer goed overeen.

ii. **Sensitiviteit, specificiteit en likelihood ratio's**

		Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)	+LR	-LR
Huidige methode		88,9	87,5	7,11	0,13
Helios	Toestel	55,6	96,9	17,78	0,46
	Digitaal	88,9	93,8	14,22	0,12
	Manueel	59,3	93,8	9,48	0,43
EUROPattern	Toestel	88,0	100	$+\infty$	0,12
	Digitaal	70,4	100	$+\infty$	0,30
	Manueel	77,8	96,9	24,89	0,23
NOVA View	Toestel	75,0	93,1	10,88	0,27
	Digitaal	74,1	93,3	11,11	0,28
	Manueel	81,5	96,7	24,44	0,19
Zenit G-Sight	Toestel	63,0	96,9	20,15	0,38
	Digitaal	77,8	100	$+\infty$	0,22
	Manueel	81,5	93,8	13,04	0,20

In bovenstaande tabel worden alle kenmerken van de vier systemen samengevat per interpretatie-wijze. Indien specificiteit 100% is, is de positieve likelihood ratio onmeetbaar hoog. Dit wordt aangegeven met “ $+\infty$ ”.

Sensitiviteit en specificiteit worden berekend ten opzichte van het ziektebeeld. Aangezien IIF in de eerste plaats fungeert als screening, is het belangrijk dat de sensitiviteit voldoende hoog is en de negatieve likelihood ratio (LR) voldoende laag is. De hoogste sensitiviteitswaarden worden bekomen bij de huidige methode (88.9%), de digitale interpretatie bij Helios (88.9%) en de toestel-interpretatie bij EUROPattern (88.0%). Deze drie vertonen ook de laagste negatieve LR, namelijk 0.13, 0.12 en 0.12 respectievelijk.

Als alleen wordt gekeken naar de interpretaties door de software van de toestellen is de software van EUROPattern het meest performant, gevolgd door NOVA View, Zenit G-Sight en Helios.

Als per toestel de toestel-interpretaties worden vergeleken met de digitale aflezing, valt op te merken dat deze dicht bij elkaar liggen voor NOVA View en dat een digitale controle-aflezing hier quasi overbodig is. Voor Helios en Zenit G-Sight is de toestel-interpretatie richtinggevend, maar scoort de digitale aflezing toch beter. Hier is een digitale aflezing dus wel nodig. Bij EUROPattern scoort de software-interpretatie beter dan de digitale aflezing, toch is het resultaat van de software-interpretatie nog onvoldoende om blind op te vertrouwen.

De manuele aflezing en digitale aflezing zijn voor de meeste systemen evenwaardig. Bij NOVA View en EUROPattern doet de manuele aflezing het iets beter. Dit impliceert dat de digitale microscopie quasi even performant is ten opzichte van de manuele aflezing.

Bij de cijfers moeten echter ook enkele kanttekeningen gemaakt worden:

- Bij de manuele aflezing van de Menarini-slides is gebleken dat de patronen snel degraderen (voornamelijk het perinucleair patroon), waardoor deze manuele interpretatie niet helemaal correct is. Bij de slides van de andere firma's was dit niet het geval.
- Zoals eerder vermeld wordt er bij EUROPattern extra informatie bekomen onder de vorm van MPO- en PR3-dots. Hier werden deze dots gemaskeerd bij de interpretatie. Maar dezelfde oefening werd uitgevoerd met de dots.

		EUROPattern Digitaal		
		Pos	Neg	TOTAAL
Ziektebeeld	Pos	23	4	27
	Neg	0	32	32
	TOTAAL	23	36	59

		EUROPattern Digitaal		
		Pos	Neg	TOTAAL
Ziektebeeld	Pos	19	8	27
	Neg	0	32	32
	TOTAAL	19	40	59

Sensitiviteit (%)	85,2
Specificiteit (%)	100,0

+LR	+∞
-LR	0,15

Sensitiviteit (%)	70,4
Specificiteit (%)	100,0

+LR	+∞
-LR	0,30

Deze dots kunnen voornamelijk bij de digitale en manuele aflezing voor een positieve bias zorgen. Met behulp van de dots werden 4 resultaten die voordien negatief of atypisch waren, toch als positief beoordeeld. Hierdoor steeg de sensitiviteit naar 85.2% met een -LR van 0.15, wat een zeer goed resultaat is. De dots zijn dus een handig hulpmiddel om de doorslag te geven in geval van twijfel.

Bij een nieuwe aflezing wordt geprobeerd om geen rekening te houden met de resultaten van de dots. Daarbij werd een (lagere) sensitiviteit van 70,4% bekomen (-LR 0.30) en dezelfde specificiteit van 100%

- De patiëntengroepen in deze studie zijn relatief klein.
- De serumstalen zijn opgedeeld per klinische achtergrond. Bij de AAV-groep zijn dit echter vooral follow-up, en verkeren deze patiënten dus in verschillende fasen van de ziekte. Het bepalen van sensitiviteit en specificiteit op dergelijk populatie is dus niet sluitend, maar is wel richtinggevend.

### iii. Patroonherkenning

#### I. Helios



Automatisatie van indirecte immunofluorescentie voor de bepaling van ANCA: is het de moeite waard?

Helios	Correcte patroonherkenning (cANCA/pANCA)	Atypische ANCA/ANA interferentie		
		AAV groep	Zieke controles	Gezonde controles
Toestel	100,0	18,5	23,5	20,0
Digitaal	95,8	0,0	35,3	6,7
Manueel	100,0	18,5	29,4	6,7

De drie wijzen van interpreteren tonen een zeer goede tot uitstekende patroonherkenning. Het toekennen van het “atypische ANCA/ANA interferentie” patroon is laag in de AAV groep en bij de gezonde controles, en relatief hoger bij de zieke controles bij de digitale aflezing. Bij de interpretatie door het toestel en bij de manuele aflezing is het toekennen van het “atypische ANCA/ANA interferentie” patroon relatief hoger.

## 2. EUROPattern

EUROPattern	Correcte patroonherkenning (cANCA/pANCA)	Atypische ANCA/ANA interferentie		
		AAV groep	Zieke controles	Gezonde controles
Toestel	83,3	7,4	35,3	6,7
Digitaal	100,0	7,4	41,2	6,7
Manueel	90,5	11,1	17,6	0,0

De manuele en digitale aflezing vertonen een zeer goede tot uitstekende patroonherkenning. De patroonherkenning door het toestel is minder goed. Daarbij kregen twee stalen een dubbele interpretatie van de software.

Het toekennen van het “atypische ANCA/ANA interferentie” patroon is laag in de AAV groep en bij de gezonde controles, en relatief hoger bij de zieke controles bij de drie interpretatie-wijzen.

## 3. NOVA View

NOVA View	Correcte patroonherkenning (cANCA/pANCA)	Atypische ANCA/ANA interferentie		
		AAV groep	Zieke controles	Gezonde controles
Toestel	100,0	3,7	5,9	6,7
Digitaal	100,0	11,1	11,8	6,7
Manueel	100,0	0,0	35,3	20,0

De drie wijzen van interpreteren tonen een uitstekende patroonherkenning. In geval van ANCA-positiviteit op de slides van Inova Diagnostics is het patroon dus eenvoudig te herkennen.

Bij 1 staal kon het toestel echter geen titer toekennen en werd het als “unrecognisable” bestempeld. Het ging over cANCA 1/40 met een intensiteit van 55 LIU.

Het aantal “atypische ANCA/ANA interferentie” is relatief laag in de AAV groep en in de groep van gezonde controles. Enkel bij de manuele aflezing is er een hoger percentage bij de gezonde vrijwilligers.

#### 4. Zenit G-Sight

Zenit G-Sight	Correcte patroonherkenning (cANCA/pANCA)	Zenit G-Sight	Atypische ANCA/ANA interferentie		
			AAV groep	Zieke controles	Gezonde controles
Toestel	76,5	Toestel	22,2	23,5	26,7
Digitaal	95,2	Digitaal	7,4	29,4	26,7
Manueel	86,4	Manueel	0,0	17,6	26,7

De interpretatie door het toestel toont de laagste correcte patroonherkenning, de digitale aflezing de hoogste. De toestel-interpretatie vertoont een relatief hoog aantal "atypische ANCA/ANA interferentie" in de drie groepen. Bij de digitale en manuele aflezing is dit lager voor de AAV groep, maar hoog voor de groep van de gezonde controles.

#### iv. Titraties

##### 1. Helios

	Titer referentiemethode (1/x)	Titer digitaal afgelezen (1/x)	# titers verschil	Helios - Referentie
1	40	160	2	+
2	20	/	1	-
3	320	>1280	3	+
4	80	>1280	5	+
5	40	160	2	+
6	80	160	1	+
7	160	640	2	+
8	1280	1280	0	
9	80	160	2	+
10	160	80	2	-
11	640	640	0	
12	640	>1280	2	+
13	160	160	0	
14	80	160	1	+
15	40	40	0	

Spearman's rank order correlation	0,71 (95% CI: 0,323 - 0,899)
-----------------------------------	------------------------------

De titers bekomen met de digitale aflezing vertonen een matige correlatie en een breed confidentie-interval. In 8/15 (53%) van de gevallen is er meer dan 1 titratie verschil en bijna altijd is de titer van de digitale aflezing duidelijk hoger.

Automatisatie van indirecte immunofluorescentie voor de bepaling van ANCA: is het de moeite waard?

	Titer referentiemethode (1/x)	Titer interpretatie toestel (1/x)	# titers verschil	Helios - Referentie
1	40	80	1	+
2	20	/	1	-
3	320	>1280	3	+
4	80	320	2	+
5	40	80	1	+
6	80	80	0	
7	160	320	1	+
8	1280	1280	0	
9	80	160	1	+
10	160	80	1	-
11	640	640	0	
12	640	>1280	2	+
13	160	80	1	-
14	80	160	1	+
15	40	/	2	-

Spearman's rank order correlation	0,82 (95% CI: 0,540 - 0,940)
-----------------------------------	------------------------------

De titers bekomen met de toestel-interpretatie vertonen een betere correlatie. In 4/15 (27%) van de gevallen is er meer dan 1 titratie verschil en ook hier is de titer bijna altijd hoger in vergelijking met de huidige methode.

## 2. EUROPattern

Automatisatie van indirecte immunofluorescentie voor de bepaling van ANCA: is het de moeite waard?

	Titer huidige methode (1/x)	Titer digitaal afgelezen (1/x)	# titers verschil	EUROPattern - Huidig
1	40	80	1	+
2	80	40	1	-
3	320	320	0	
4	80	320	2	+
5	40	160	2	+
6	20	40	1	+
8	80	80	0	
9	160	160	0	
10	1280	1280	0	
11	160	160	0	
12	640	320	1	-
13	640	320	1	-
14	160	160	0	

Spearman's rank order correlation	0,796 (95% CI: 0,437 - 0,936)
-----------------------------------	-------------------------------

De titers bij de digitale aflezing komen goed overeen met de titers van de huidige methode. Slechts bij 2/14 (14%) is er meer dan 1 titratie verschil. De titers verschillen in beide richtingen.

Automatisatie van indirecte immunofluorescentie voor de bepaling van ANCA: is het de moeite waard?

	Autotiter (1/x)	Titer digitaal afgelezen (1/x)	# titers verschil	digitaal - autotiter
1	80	80	0	
2	20	40	1	+
3	80	320	2	+
4	40	320	3	+
5	320	160	1	-
6	80	40	1	-
8	80	80	0	
9	40	160	2	+
10	40	1280	5	+
11	320	160	1	-
12	320	320	0	
13	320	320	0	
14	320	160	1	-

Spearman's rank order correlation	0,124 (95% CI: -0,435-0,614)
-----------------------------------	------------------------------

De titers van de digitale aflezing komen niet goed overeen met de autotiter van de toestel-software. In 4/14 (29%) van de gevallen is er meer dan 1 titratie verschil, zelfs tot 3 en 5 titratiestappen verschil. Ook hier verschillen titers in beide richtingen.

Automatisatie van indirecte immunofluorescentie voor de bepaling van ANCA: is het de moeite waard?

	Titer huidige methode (1/x)	Autotiter (1/x)	# titers verschil	autotiter - huidig
1	40	80	1	+
2	20	20	0	
3	320	80	2	-
4	80	40	1	-
5	40	320	3	+
6	20	80	2	+
7	80	80	0	
8	160	40	2	-
9	1280	40	5	-
10	80	40	1	-
11	160	320	1	+
12	640	320	1	-
13	640	320	1	-
14	160	320	1	+
15	80	20	2	-
16	40	40	0	
17	320	80	2	-
18	320	320	0	
19	160	320	1	+
20	80	320	2	+
21	640	160	2	-
22	40	20	1	-
23	80	20	2	-
24	160	40	2	-

Spearman's rank order correlation	0,404 (95% CI: 0,001-0,694)
-----------------------------------	-----------------------------

Ook tussen de autotiter en de titers van de huidige methode is er een minder goede overeenkomst. Bij 11/24 (46%) is er meer dan 1 titratie verschil, tot zelfs 5 titraties verschil. De autotiter is overwegend lager dan de titer van de huidige methode.

### 3. NOVA View

Automatisatie van indirecte immunofluorescentie voor de bepaling van ANCA: is het de moeite waard?

	Intensiteit NOVA View (LIU)	Titer huidige methode (1/x)
1	235	160
2	631	640
3	262	80
4	373	320
5	147	40
6	5	20
7	1012	320
8	381	80
9	82	40
10	8	20
11	55	80
12	577	160
13	508	1280
14	315	80
15	235	160
16	631	640
17	1300	640
18	1300	640
19	390	1280
20	202	160
21	26	80
22	49	40
23	563	320
24	274	320
25	478	160
26	227	80
27	596	640
28	346	160
29	26	40
30	3	40
31	56	80
32	228	160

	Intensiteit NOVA View (LIU)	Titer digitaal afgelezen (1/x)	Titer toestel (1/x)
1	147	80	40
2	1012	1280	640
3	381	320	160
4	82	40	20
5	55	40	40
6	577	160	160
7	508	320	160
8	315	80	80
9	235	160	160
10	631	160	160
11	1300	1280	640
12	202	160	160
13	26	20	/
14	49	40	20

Spearman's rank order correlation	0,90 (95% CI: 0,708-0,968)	0,89 (95% CI: 0,676-0,968)	Spearman's rank order correlation	0,86 (95% CI: 0,727-0,929)
-----------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-----------------------------------	-------------------------------

De gemeten intensiteit op de ethanol-gefixeerde slides komt telkens zeer goed overeen met de titers van de digitale aflezing, van de toestel-interpretatie en van de huidige methode. De LIU-waarden kunnen dus beschouwd worden als een maat voor de titratie-sterkte.



## Automatisatie van indirecte immuunfluorescentie voor de bepaling van ANCA: is het de moeite waard?

	Autotiter (1/x)	Titer digitaal afgelezen (1/x)	# titers verschil	Titer digitaal - Autotiter
1	40	80	1	+
2	320	1280	2	+
3	80	320	2	+
4	20	40	1	+
5	20	40	1	+
6	160	160	0	
7	160	320	1	+
8	80	80	0	
9	80	160	1	+
10	160	160	0	
11	640	1280	1	+
12	40	160	2	+
13	20	40	1	+

	Autotiter (1/x)	Titer toestel (1/x)	# titers verschil	Titer toestel - Autotiter
1	40	40	0	
2	320	640	1	+
3	80	160	1	+
4	20	20	0	
5	20	40	1	+
6	160	160	0	
7	160	160	0	
8	80	80	0	
9	80	160	1	+
10	160	160	0	
11	640	640	0	
12	40	160	2	+
13	20	20	0	

	Autotiter (1/x)	Titer huidige methode (1/x)	# titers verschil	Titer huidige methode - Autotiter
1	80	160	1	+
2	160	640	2	+
3	80	80	0	
4	80	320	2	+
5	40	40	0	
6	320	320	0	
7	80	80	0	
8	20	40	1	+
9	20	80	2	+
10	160	160	0	
11	160	1280	3	+
12	80	80	0	
13	80	160	1	+
14	160	640	2	+
15	640	640	0	
16	640	640	0	
17	80	1280	4	+
18	40	160	2	+
19	20	40	1	+
20	160	320	1	+
21	80	320	2	+
22	160	160	0	
23	80	80	0	
24	160	640	2	+
25	80	160	1	+
26	20	80	2	+
27	80	160	1	+

Spearman's rank order correlation	0,88 (95% CI: 0,645-0,965)
-----------------------------------	-------------------------------

Spearman's rank order correlation	0,90 (95% CI: 0,681-0,969)
-----------------------------------	-------------------------------

Spearman's rank order correlation	0,75 (95% CI: 0,520-0,880)
-----------------------------------	-------------------------------

De autotiter-functie komt goed tot zeer goed overeen met de titers van de digitale aflezing, van de toestel-interpretatie en van de huidige methode.

Bij de vergelijking tussen de autotiter en de titers van de digitale aflezing zijn er 3/13 (23%) met meer dan 1 titratie verschil. Bij de vergelijking tussen de autotiter en de titers van de toestel-interpretatie zijn er 1/13 (8%) met meer dan 1 titratie verschil. Bij de vergelijking tussen de autotiter met de titers van de huidige methode zijn er 10/27 (37%) met meer dan 1 titratie verschil.

Opvallend is dat bij een verschil in titratie, de autotiter telkens lager ligt en dus een minder sterke titers rapporteert.

Automatisatie van indirecte immunofluorescentie voor de bepaling van ANCA: is het de moeite waard?

	Titer huidige methode (1/x)	Titer digitaal afgelezen (1/x)	# titers verschil	Titer digitaal - huidige methode
1	40	80	1	+
2	320	1280	2	+
3	80	320	2	+
4	40	40	0	
5	80	40	1	-
6	160	160	0	
7	1280	320	2	-
8	80	80	0	
9	160	160	0	
10	640	160	2	-
11	640	1280	1	+
12	160	160	0	
13	80	20	2	-
14	40	40	0	

	Titer huidige methode (1/x)	Titer toestel (1/x)	# titers verschil	Titer toestel - huidige methode
1	40	40	0	
2	320	640	1	+
3	80	160	1	+
4	40	20	1	-
5	80	40	1	-
6	160	160	0	
7	1280	160	3	-
8	80	80	0	
9	160	160	0	
10	640	160	2	-
11	640	640	0	
12	160	160	0	
13	40	20	1	-

Spearman's rank order correlation	0,76 (95% CI: 0,375-0,918)
-----------------------------------	-------------------------------

Spearman's rank order correlation	0,84 (95% CI: 0,537-0,951)
-----------------------------------	-------------------------------

De titers van de digitale aflezing en van de toestel-interpretatie correleren goed met de titers van de huidige methode.

Bij de vergelijking tussen de titer van de huidige methode en de titer van de digitale aflezing zijn er 5/14 (36%) met meer dan 1 titratie verschil. Bij de vergelijking tussen de titer van de huidige methode en de titer van de toestel-interpretatie zijn er 2/13 (15%) met meer dan 1 titratie verschil.

Bij allebei verschillen de titers in beide richtingen.

#### 4. Zenit G-Sight

Automatisatie van indirecte immunofluorescentie voor de bepaling van ANCA: is het de moeite waard?

	Intensiteit Zenit G-Sight (%)	Titer huidige methode (1/x)
1	4,58	160
2	48,23	640
3	18,27	80
4	40,26	320
5	29,5	40
6	0,29	20
7	80,86	320
8	62,22	80
9	23,94	40
10	14,42	20
11	14,8	80
12	46,6	160
13	58,26	1280
14	15,3	80
15	4,58	160
16	48,23	640
17	84,12	640
18	84,12	640
19	0	1280
20	22,29	160
21	42,65	80
22	12,08	40
23	52,2	320
24	43,89	320
25	42,41	160
26	28,34	80
27	19,13	640
28	48,65	160
29	2,55	40
30	17,03	40
31	16,97	80
32	18,18	160

	Intensiteit Zenit G-Sight (%)	Titer digitaal afgelezen (1/x)	Titer toestel (1/x)
1	29,5	40	20
2	80,86	640	320
3	62,22	160	160
4	23,94	20	/
5	14,42	/	20
6	14,8	20	20
7	46,6	80	80
8	58,26	640	320
9	15,3	40	20
10	4,58	80	40
11	48,23	160	160
12	84,12	320	320
13	22,29	80	40
14	42,65	40	40
15	12,08	20	/

Spearman's rank order correlation	0,77 (95% CI 0,405-0,923)	0,86 (95% CI 0,589-0,958)
-----------------------------------	------------------------------	------------------------------

Spearman's rank order correlation	0,33 (95% CI: -0,021-0,609)
-----------------------------------	--------------------------------

De gemeten intensiteit op de ethanol-gefixeerde slides correleert telkens goed met de titers van de digitale aflezing en van de toestel-interpretatie. De gemeten intensiteit correleert echter niet goed met de titers bekomen met de huidige methode, dit komt vooral door 1 uitbijter waarbij de huidige methode een titer rapporteert van 1/1280, terwijl op Zenit G-Sight de intensiteit 0% is. Het gaat hier echter over een staal van een patiënt uit de groep van de zieke controles waarbij de MPO- en PR3-bepaling negatief was. Wat betreft de AAV diagnostiek, is er dus geen klinische impact voor dit verschil in titers. Als dit staal geëxcludeerd wordt is de Spearman correlatie 0,66.

Automatisatie van indirecte immunofluorescentie voor de bepaling van ANCA: is het de moeite waard?

	Titer huidige methode (1/x)	Titer digitaal afgelezen (1/x)	# titers verschil	Titer digitaal - huidige methode
1	40	40	0	
2	320	640	1	+
3	80	160	1	+
4	40	20	1	-
5	80	20	2	-
6	160	80	1	-
7	1280	640	1	-
8	80	40	1	-
9	160	80	1	-
10	640	160	2	-
11	640	320	1	-
12	160	80	1	-
13	80	40	1	-
14	40	20	1	-

	Titer huidige methode (1/x)	Titer toestel (1/x)	# titers verschil	Titer toestel - huidige methode
1	40	20	1	-
2	320	320	0	
3	80	160	1	+
4	20	20	0	
5	80	20	2	-
6	160	80	1	-
7	1280	320	2	-
8	160	40	2	-
9	640	160	2	-
10	640	320	1	-
11	160	40	2	-
12	80	40	1	-

Spearman's rank order correlation	0,86 (95% CI: 0,611-0,956)
-----------------------------------	-------------------------------

Spearman's rank order correlation	0,84 (95% CI: 0,518-0,955)
-----------------------------------	-------------------------------

De titers van de digitale aflezing en van de toestel-interpretatie correleren goed met de titers van de huidige methode.

Bij de vergelijking tussen de titer van de huidige methode en de digitale aflezing zijn er 2/14 (14%) met meer dan 1 titratie verschil. Bij de vergelijking tussen de titer van de huidige methode en de toestel-interpretatie zijn er 5/12 (42%) met meer dan 1 titratie verschil.

Bij allebei is de titer van de huidige methode meestal hoger.

v. **Precisie**

I. **NOVA View**

### ETHANOL

	NC (firma)	PCp firma	PCc firma	PCp (patiënt)	PCc (patiënt)
aantal	5	5	5	5	6
gemiddelde	2,4	1035,2	1023,8	804	319,3
SD	0,55	133,84	284,83	145,52	73,92
<b>CV(%)</b>	<b>22,8</b>	<b>12,9</b>	<b>27,8</b>	<b>18,1</b>	<b>23,1</b>

### FORMALINE

	NC (firma)	PCp firma	PCc firma	PCp (patiënt)	PCc (patiënt)
aantal	4	4	4	5	8
gemiddelde	1,75	1082,25	784	505,4	340,6
SD	0,50	424,96	412,99	190,58	97,77
<b>CV(%)</b>	<b>28,6</b>	<b>39,3</b>	<b>52,7</b>	<b>37,7</b>	<b>28,7</b>

NC: negatieve controle; PC: positieve controle; p: perinucleair patroon; c: cytoplasmatisch patroon; SD: standaarddeviatie; CV: variatiecoëfficiënt.

Zowel op ethanol- als formaline-gefixeerde neutrofielen worden hoge CV% bekomen, voor alle controles. Slechts bij twee controles wordt het criterium van <20% behaald.

## 2. Zenit G-Sight

### ETHANOL

	NC (firma)	PCp firma	PCc firma	PCp (patiënt)	PCc (patiënt)
aantal	7	7	7	4	4
gemiddelde	0	99,10571429	90,20428571	57,16	37,0
SD	0,00	2,37	13,29	11,13	9,40
<b>CV(%)</b>	<b>/</b>	<b>2,4</b>	<b>14,7</b>	<b>19,5</b>	<b>25,4</b>

### FORMALINE

	NC (firma)	PCp firma	PCc firma	PCp (patiënt)	PCc (patiënt)
aantal	4	4	4	4	4
gemiddelde	1,84	72,61	77,32	50,09	30,5
SD	2,12	14,52	7,59	1,78	5,00
<b>CV(%)</b>	<b>115,5</b>	<b>20,0</b>	<b>9,8</b>	<b>3,6</b>	<b>16,4</b>

NC: negatieve controle; PC: positieve controle; p: perinucleair patroon; c: cytoplasmatisch patroon; SD: standaarddeviatie; CV: variatiecoëfficiënt.

De negatieve controle buiten beschouwing gelaten, toont de Zenit G-Sight een goede herhaalbaarheid (CV <20%), op 1 controle na.

vi. **Varia**

I. **Helios**

A. *Inzetten stalen*

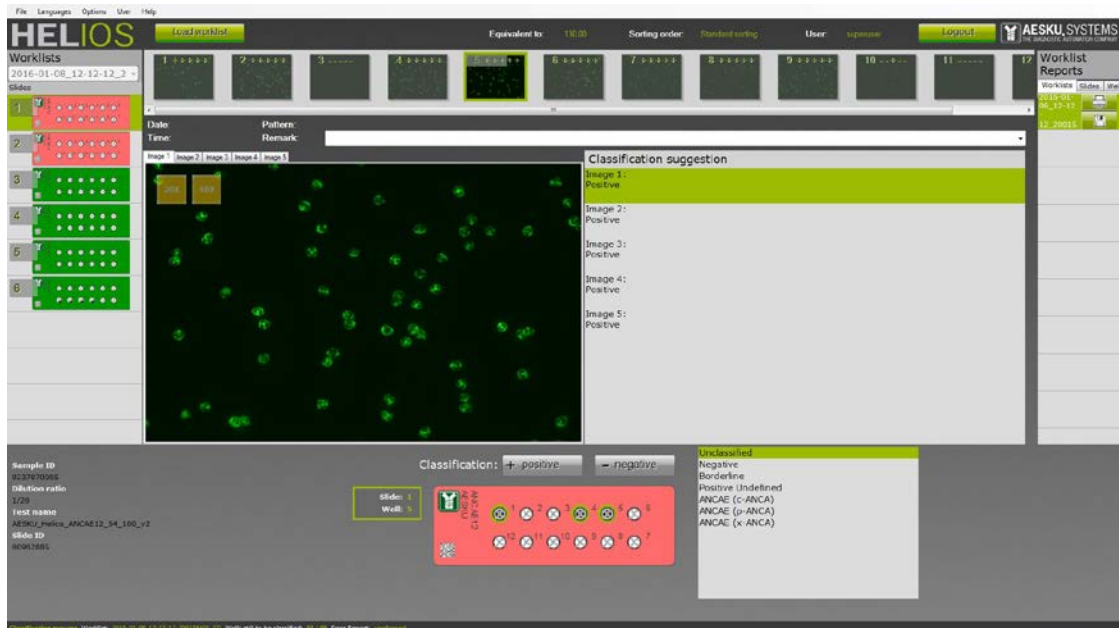
Helios is een pipetteerstation én een digitale microscoop in één. Na het plaatsen van de stalen en het laden van de reagentia (via een duidelijke wizard, figuur 11) is de kous af en doet het toestel de rest. Nadat de slides zijn ingezet wordt er automatisch mounting medium aangebracht en worden er meteen beelden genomen. Naargelang het aantal stalen, het aantal verdunningen en het aantal beelden dat wordt genomen varieert de duur van een run, maar gemiddeld duurt een run ongeveer 2 uren.



**Figuur 11** De Reagent loading wizard van Helios. Hierbij wordt stap voor stap overlopen welke reagentia je op het toestel moet laden.

B. *Software*

De software is zeer eenvoudig en duidelijk opgesteld (figuur 12). Vooral bij de aflezing is alles in één beeld weergegeven en kan van well naar well worden overgegaan zoals het manueel onder de microscoop gebeurt.

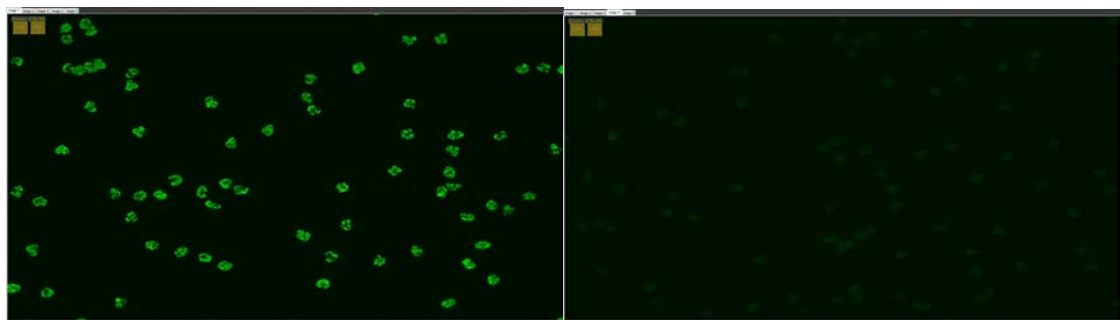


**Figuur 12** Het aflezingsscherm van Helios. Rechts kan je de slides zien en kan je eenvoudig van wel naar wel navigeren.

Een patiënten-databank is niet beschikbaar in het Helios-systeem. De runs worden wel bewaard, maar de resultaten zijn niet gelinkt aan een uniek patiëntnummer. Hierdoor is het niet mogelijk om de vorige resultaten van een bepaalde patiënt op te roepen. Ook in de nabije toekomst is het niet mogelijk om deze applicatie in de software op te nemen, maar de firma is wel bezig om een middleware op te markt te brengen, waarin de beelden per patiënt bewaard kunnen worden.

### C. Aflezing

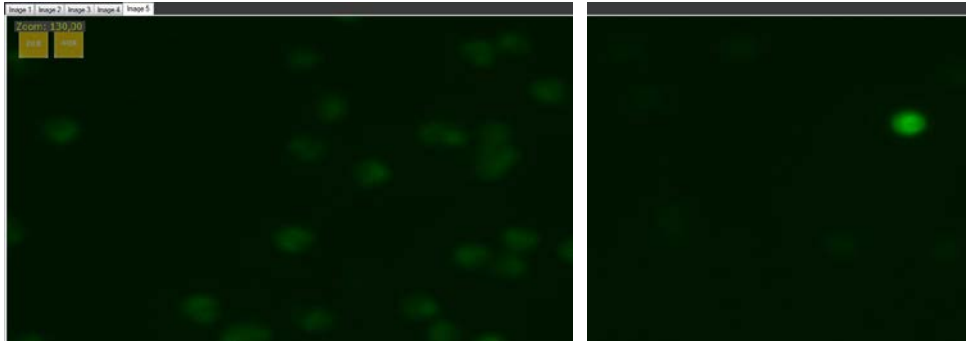
De patronen zijn goed te herkennen op zowel de ethanol- als op de formaline-gefixeerde beelden (figuur 13). Het verschil tussen negatief en positief is ook meestal duidelijk. Alleen bij de negatieve stalen is het eerst wat wennen: bij de negatieve stalen zijn er nog duidelijk neutrofielen te zien, maar deze fluoresceren niet.



**Figuur 13** Een positief p-patroon op Helios (links) en een negatief beeld op Helios (rechts).

Standaard worden er drie beelden genomen per well. Uit onze validatie is echter gebleken dat de afbeeldingen niet altijd scherp zijn (afbeelding 14). Onder andere hierdoor werd tijdens de validatie beslist om vijf beelden per well te nemen, in plaats van drie. Het is ook mogelijk om opnieuw beelden te nemen, maar dan moet de ganse slide opnieuw ingelezen worden (er kan dus niet 1 specifieke well opnieuw ingelezen worden) en hierbij worden alle voorgaande beelden overschreven.

De software doet geen patroonherkenning, maar discrimineert wel positief/negatief per afbeelding. Regelmatig gebeurt het dat het toestel een beeld als (vals)-positief beoordeelt door een aspecifieke, fluorescente spikkel (afbeelding 14).



**Figuur 14** Helios: wazig beeld (links); aspecifieke spikkel (rechts).

**D. Kostprijs (excl BTW)**

Het toestel kost **€89500**, inclusief computer en printer, installatie en programmatie, opleidingen en garantie voor 1 jaar. Bijkomende kosten zijn LIS-connectie en onderhoudscontract.

Wat betreft de reagentia kost 1 kit met ethanol-gefixeerde neutrofielen €514 en 1 kit met formaline-gefixeerde neutrofielen €554. Een kit bevat 10 slides van elk 12 wells (120 testen), 3 controles (negatieve controle, pANCA controle en cANCA controle), FITC-conjugaat, mounting medium, PBS en sample diluent. Naast een kit is enkel nog een microtiterplaat nodig om de verdunningen te kunnen uitvoeren (prijs onbekend).

Per test komt dit op **€8.9/test**, zonder rekening te houden met de aankoopprijs van het toestel, het onderhoudscontract, de microtiterplaten, testen die gebruikt worden voor QC, lege plaatsen op slides en de loonkosten van de MLT's.

**2. EUROPattern**

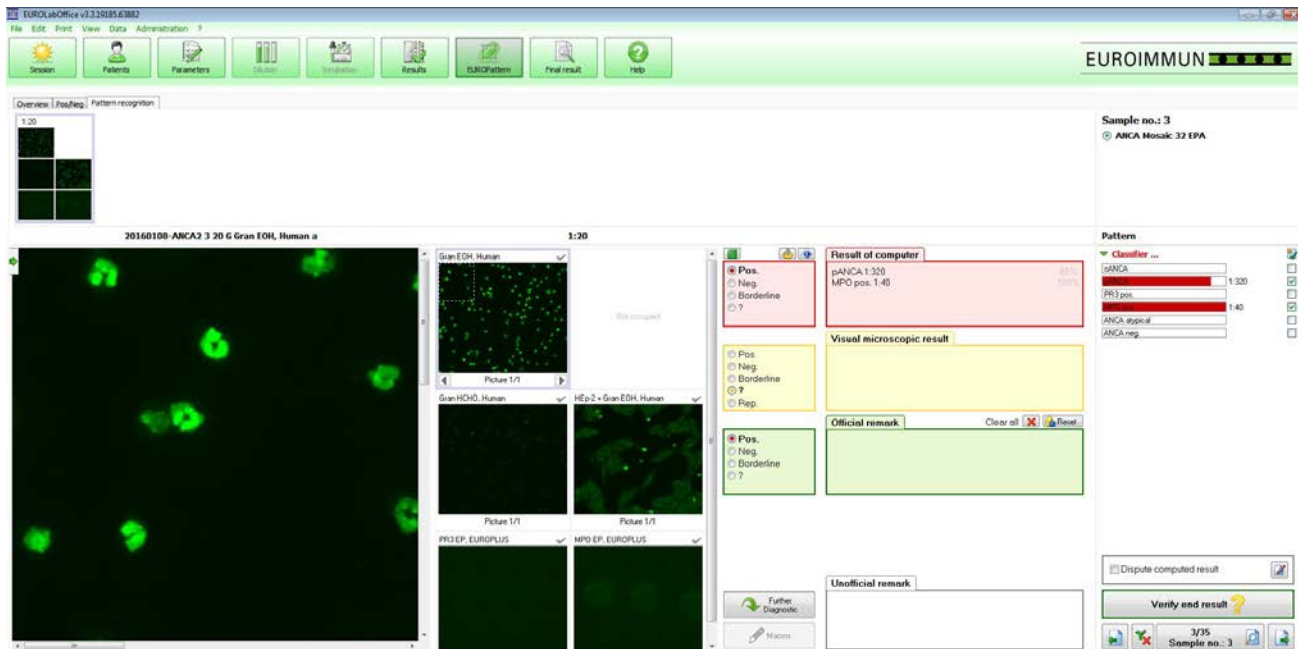
**A. Inzetten stalen**

Het inzetten van de stalen gebeurt aan de hand van de IF Sprinter. Een werklijst dient aangemaakt te worden, de slides en de serumstalen moeten op het toestel geplaatst worden en de reagentia moeten opgeladen worden. Na ongeveer anderhalf uur is het toestel klaar en kunnen de slides afgelezen worden. Hiervoor moet de werklijst worden doorgestuurd naar de EUROPattern, het mounting medium moet aangebracht worden op de slides en de slides moeten overgeplaatst worden op de microscoop. De microscoop heeft een kamer van verschillende niveau's waarin een 50 slides geladen kunnen worden.

**B. Software**

De software (EUROLabOffice) is niet erg intuïtief en komt in eerste instantie eerder complex over. Het onder knie krijgen van deze software vergt dan ook een langere leertijd. Aan de andere kant heeft deze software wel veel mogelijkheden. Zo heeft de software naast een patiënten-databank, opties zoals patroonherkenning en een autotiter. Voor ANCA wordt er geen fluorescentie-intensiteit getoond.





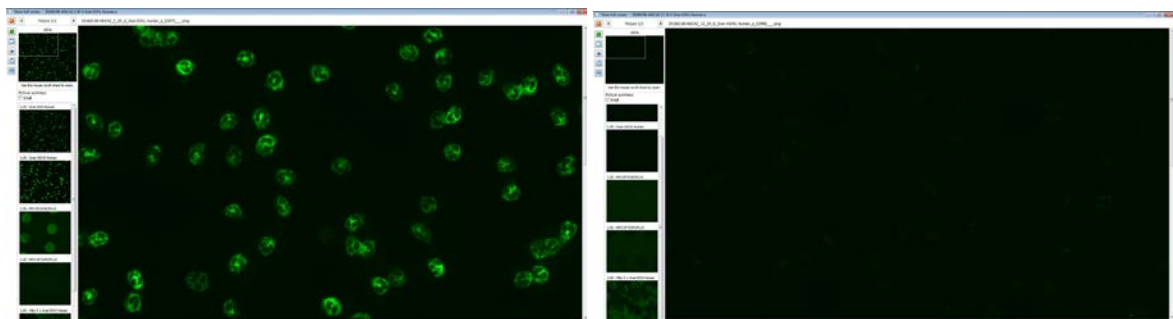
**Figuur 15** Afleesscherf bij EUROPattern

C. Aflezing

Het grote voordeel van EUROPattern is het gebruik van de microchips waarbij ethanol- en formaline-gefixeerde neutrofielen samen met Hep2-cellen in één beeld kunnen beoordeeld worden (figuur 15). Afhankelijk van het type van reagentia-kit kunnen ook MPO- en PR3-dots visueel beoordeeld worden.

Subjectief verloopt de aflezing vlot bij het merendeel van de stalen, maar toch is er soms twijfel bij de zwak positieve stalen. Vooral de stalen met een zwakke pANCA zijn vaak slechts zeer zwak positief op de formaline-gefixeerde neutrofielen.

Wat betreft de patroonherkenning zijn de beelden duidelijk genoeg (figuur 16).



**Figuur 16** Een positief c-patroon op EUROPattern (links) en een negatief beeld op EUROPattern (rechts).

D. *Kostprijs (excl BTW)*

Voor de toestellen werden geen catalogusprijzen vrijgegeven door firma omdat er bijna altijd met reagenscontracten gewerkt wordt.

Voor de reagentia-kits is de prijs afhankelijk van hoe de microchip is opgesteld. Grosso modo komt dit neer op met of zonder MPO-/PR3-dots. Een kit met dots kost €1280.13.

Een kit bevat 20 slides van elk 20 wells (200 testen), 3 controles (negatieve controle, pANCA controle en cANCA controle), FITC-conjugaat, mounting medium, PBS, Tween20 en dekglasjes. Naast een kit zijn er nog verdunningscupjes nodig om de verdunningen te kunnen uitvoeren (prijs onbekend).

Per test komt dit op **€6.4/test** (mét dots), zonder rekening te houden met de aankooprijzen van het toestel, het onderhoudscontract, de verdunningscupjes, testen die gebruikt worden voor QC, lege plaatsen op slides en de loonkosten van de MLT's.

3. **NOVA View**

A. *Inzetten stalen*

Het inzetten van de stalen gebeurt aan de hand van de QUANTA-Lyser. Een werklijst dient aangemaakt te worden, de slides en de serumstalen moeten op het toestel geplaatst worden en de reagentia moeten

opgeladen worden. Na ongeveer anderhalf uur is het toestel klaar en kunnen de slides afgelezen worden. Aangezien de testen gelinkt worden aan een specifieke slide door middel van een unieke slide-barcode, moet de werklijst niet manueel doorgestuurd worden. Door de slides opnieuw in te scannen bij het plaatsen in de NOVA View, weet de software over welke testen het gaat. De laadkamer van NOVA View beschikt slechts over 4 plaatsen, waardoor in geval van grote runs, de aflezing in verschillende stappen met gebeuren, waardoor het walk-away principe wat ondermijnd wordt.

#### B. Software

De resultaten kunnen afgelezen worden op de NOVA View zelf, maar bij voorkeur gebeurt dit via de middleware QUANTA Link. Het voordeel van deze middleware is de patiënten-databank en de mogelijkheid om andere testen en toestellen hierop aan te sluiten, zoals de BIO-FLASH voor de bepaling van MPO/PR3 bijvoorbeeld.

QUANTA Link presenteert de resultaten op een intuïtieve manier met tal van opties: patroonherkenning, autotiter, en intensiteitsbepaling (figuur 17). Met NOVA View worden voornamelijk kleine velden getoond met enkele neutrofielen, en geen groot veld waarbij kan ingezoomd worden.



**Figuur 17** Afleessscrem bij NOVA View/QUANTA Link met een p-patroon.

#### C. Aflezing

De beelden op de NOVA View zijn zeer duidelijk (figuur 17). Zowel voor positief/negatief discriminatie, als voor de patroonherkenning. Vermoedelijk is dit deels te wijten aan de hoge kwaliteit van de Inova-slides. Een aflezing op QUANTA Link verloopt over het algemeen snel, zonder veel twijfel.

#### E. Kostprijs (excl BTW)

**Toestellen:** de QUANTA-Lyser kost €28225 (enkel IFA-module) en de NOVA View kost €67225. Daarbij moet een ANCA-licentie aangekocht worden (€5375) en een jaarlijkse licentie voor de middleware QUANTA Link (€1950) (deze prijs varieert naargelang PC/server die hiervoor gebruikt wordt). Allemaal samen komt dit op **€102775**.

Wat betreft de **reagentia** kost 1 kit met ethanol-gefixeerde neutrofielen €1204 en 1 kit met formaline-gefixeerde neutrofielen kost €1380. Een kit bevat 20 slides van elk 12 wells (240 testen), 3 controles (negatieve controle, pANCA controle en cANCA controle), FITC-conjugaat, mounting medium, PBS en dekglasjes. De PBS in de kit is onvoldoende de kit te gebruiken op de QUANTA-Link. De extra PBS-flesjes die nodig zijn, worden door de firma kosteloos bijgeleverd. Naast een kit zijn ook nog verdunningscupjes nodig om de verdunningen te kunnen uitvoeren (prijs onbekend).

Per test komt dit op **€10.77/test**, zonder rekening te houden met de aankoopprijs van het toestel, het onderhoudscontract, de jaarlijkse QUANTA Link-licentie, de verdunningscupjes, testen die gebruikt worden voor QC, lege plaatsen op slides en de loonkosten van de MLT's.

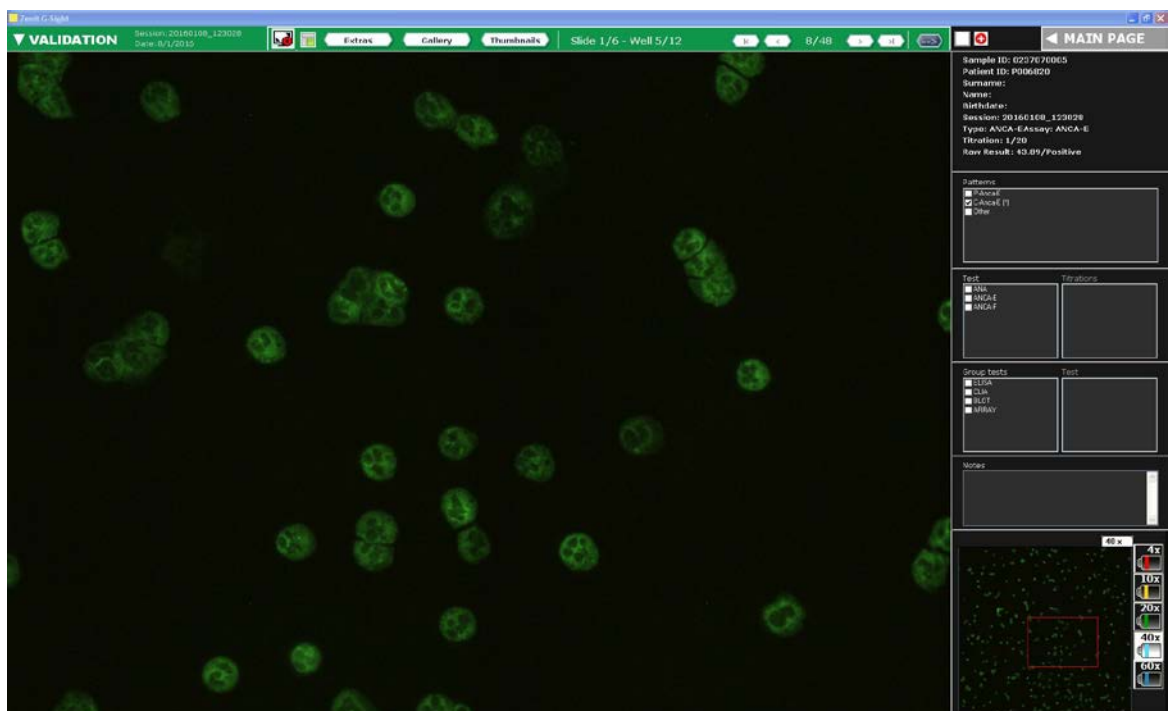
## 4. Zenit G-Sight

A. *Inzetten stalen*

Het inzetten van de stalen gebeurt aan de hand van de Zenit Up. Dit is een groot toestel dat nogal wat lawaai produceert. Het aanmaken van een werkljst en het plaatsen van de serumstalen, slides en reagentia verloopt zeer vlot en duidelijk. Na ongeveer anderhalf uur is het toestel klaar en kunnen de slides afgelezen worden. Hiervoor moet de werkljst worden doorgestuurd naar de Zenit G-Sight, het mounting medium moet aangebracht worden op de slides samen met een dekglasje en de slides moeten overgeplaatst worden op de microscoop. De microscoop heeft een tafel voor 8 slides, wat voor een doorsnee run meestal voldoende is. Voor het nemen van de beelden heeft de G-Sight veel tijd nodig. Dit komt voornamelijk doordat het toestel per well verschillende foto's neemt met een 40x vergroting en deze beelden dan samenvoegt om een groot, gedetailleerd beeld te bekomen per well.

B. *Software*

De Zenit G-Sight software is eenvoudig en duidelijk opgesteld (figuur 18). Het is eenvoudig om naar de verschillende beelden te navigeren. Naast het tonen van de beelden voert de software ook patroonherkenning uit en wordt er een intensiteit berekend per well. Er is ook een patiënten-databank aanwezig.



Figuur 18 Afleessscrem bij Zenit G-Sight met een c-patroon.

C. *Aflezing*

Het aflezen van de resultaten op Zenit G-Sight was soms niet eenvoudig. Bij de meerderheid van de stalen verloopt de aflezing vlot, maar bij een groot deel van de stalen was het voor de aflezers niet eenvoudig om positief van negatief te onderscheiden of om het correcte patroon te herkennen. Ook de software-interpretatie interpreteerde soms een verkeerd patroon. Vermoedelijk is dit niet enkel te wijten aan de digitale microscoop, maar ook aan de kwaliteit van de slides. Bij de manuele aflezing is alleszins gebleken dat de patronen zeer snel degraderen en dus zeer instabiel zijn.

F. *Kostprijs (excl BTW)*

Toestellen: de Zenit Up kost €47338 (IFA, ELISA en microarray; inclusief PC, printer, powerware en middleware) en de Zenit G-Sight kost €85000 (IFA en microarray; inclusief PC, printer en middleware). Samen komt dit op **€132338**.

Wat betreft de reagentia is het moeilijk | prijs te berekenen. Een kit met reagentia bevat namelijk enkel slides met 6 wells, terwijl in de meeste klinische laboratoria slides van 12 wells worden gebruikt. Daarom worden de slides met 12 wells, de controles, conjugaat, sample diluent, PBS en mounting medium los verkocht. In deze vergelijking wordt uitgegaan van de twee uitersten: de prijs van een volledige kit met slides van 6 wells en de prijs van de losse slides van 12 wells (zonder reagentia).

Per test komt dit op tussen **€5.6/test** (6 wells/slides + reagentia) en **€5.0/test** (12 wells/slides voor ethanol en 6 wells/slides voor formaline, zonder reagentia), zonder rekening te houden met de aankoopprijs van het toestel, het onderhoudscontract, de verdunningscupjes, testen die gebruikt worden voor QC, lege plaatsen op slides en de loonkosten van de MLT's.

## d. Conclusies

Voor het screenen naar ANCA blijft de indirecte immunofluorescentie (IIF) de referentiemethode. Volgens internationale richtlijnen is het voldoende om deze screening uit te voeren op ethanol-gefixeerde neutrofielen, en is de bepaling op formaline-gefixeerde neutrofielen niet nodig. Daarnaast zijn titraties op IIF overbodig en kunnen vervangen worden door de (semi-)kwantitatieve bepaling van MPO/PR3. Ook in opvolging wordt IIF best vervangen door de bepaling van MPO/PR3. De Belgische RIZIV-nomenclatuur is echter niet aangepast aan deze richtlijnen, waardoor de meeste klinische laboratoria nog steeds titraties uitvoeren op IIF en ook IIF uitvoeren bij opvolging van patiënten met ANCA-geassocieerde vasculitis.

In de methodevergelijking van vier automatische systemen is gebleken dat de digitale microscopie evenwaardig is aan de manuele aflezing onder de LED fluorescentiemicroscop. De interpretaties door de software van de digitale microscopen blijken voor twee van de vier systemen een zeer hoge positieve likelihood ratio en een zeer lage likelihood ratio voor ANCA-geassocieerde vasculitis te hebben. Dergelijke expertsystemen zijn echter niet sluitend en zijn eerder een aanvulling op de menselijke aflezing op het scherm. Voor deze digitale aflezing liggen de vier systemen zeer dicht bij elkaar wat betreft sensitiviteit, specificiteit en overeenkomst. Om een keuze te maken tussen deze systemen dient gekeken worden naar andere eigenschappen waarin ze verschillen. Het gebruiksgemak voor het inzetten, het gebruiksgemak van de software, de aanwezigheid van een patiënten-databank, de autotiter-optie, de snelheid, de capaciteit, de kwaliteit van de beelden, de gemakkelijker van het aflezen, de service van de firma en uiteraard ook de kostprijs zullen de doorslag moeten geven. Welke eigenschap doorweegt is subjectief en hangt van laboratorium tot laboratorium.