

**EXPERTISE EN DIENSTVERLENING
KWALITEIT VAN LABORATORIA**

**COMMISSIE VOOR KLINISCHE BIOLOGIE
EXPERTENCOMITE**

**EXTERNE KWALITEITSEVALUATIE VOOR
ANALYSES KLINISCHE BIOLOGIE**

**DEFINITIEF GLOBAAL RAPPORT
NIET-INFECTIEUZE SEROLOGIE – ANCA
ENQUETE 2020/2**

Sciensano/Niet-infectieuze serologie/42-NL

Expertise en dienstverlening
Kwaliteit van laboratoria
J. Wytsmanstraat, 14
1050 Brussel | België

www.sciensano.be

EXPERTENCOMITE

Sciensano					
Secretariaat		TEL:	02/642.55.22	FAX:	02/642.56.45
Dr. ir. S. Broeders	Enquêtecoördinator	TEL:	02/642.52.25		
		e-mail:	sylvia.broeders@sciensano.be		
Dr. K. Vernelen	Vervanger enquêtecoördinator	TEL:	02/642.55.29		
		e-mail:	kris.vernelen@sciensano.be		
Experten	Instelling				
Dr. C. Bonroy	UZ Gent				
Dr. X. Bossuyt	UZ Leuven				
Apr. S. Goletti	CHR Huy				
Apr. L. Lutteri	CHU Liège				
Apr. S. Schouwers	G.Z.A.				
Apr. L. Van Hoovels	OLVZ Aalst				
Dr. M. Vercammen	AZ Sint Jan Brugge				

Een voorlopige versie van dit rapport werd voorgelegd aan de experten op: 31/07/2020

Dit rapport werd besproken in de vergadering van het expertencomité van: 08/09/2020

Verantwoordelijkheden:

Tijdens deze vergadering werd het *ad hoc* expertencomité voor advies geraadpleegd over de inhoud van het globaal rapport, de interpretatie van de resultaten, de evaluatiecriteria en de organisatie van de volgende evaluaties. De verantwoordelijkheid voor de selectie van de gebruikte stalen en het definitieve ontwerp van de studie wordt door de dienst Kwaliteit van laboratoria van Sciensano genomen.

<p>Autorisatie verspreiding rapport: Door Broeders Sylvia, enquêtecoördinator, op 30/09/2020.</p>
--

Alle rapporten zijn tevens te raadplegen op onze website:

https://www.wiv-isp.be/QML/activities/external_quality/rapports/_nl/rapports_annee.htm

INHOUDSTAFEL

OPSPOREN, IDENTIFICATIE EN TYPERING VAN ANCA.....	4
EKE-SPECIFIEKE INFORMATIE.....	4
STAALINFORMATIE EN DEELNAME	5
STAALINFORMATIE	5
DEELNAME.....	5
RESULTATEN	6
OPSPOREN VAN ANCA EN PATROONTYPERING: INDIRECTE IMMUNOFLUORESCENTIE	6
IDENTIFICATIE VAN ANCA: IMMUNOASSAY	9
BESPREKING VAN DE RESULTATEN & CONCLUSIE.....	11

OPSPOREN, IDENTIFICATIE EN TYPERING VAN ANCA

EKE-SPECIFIEKE INFORMATIE

Het staal voor de EKE 2020/2 werd op 15 juni 2020 verstuurd naar de laboratoria. De afsluitingsdatum voor het inzenden van de resultaten was 29 juni 2020. De resultaten werden besproken en gevalideerd tijdens de vergadering van het expertencomité op 8 september 2020. Het voorlopige rapport was beschikbaar op onze website op 6 juli 2020. Het definitieve globale rapport was beschikbaar op onze website op 30 september 2020.

STAALINFORMATIE EN DEELNAME

Staalinformatie

Alle deelnemers aan de EKE 2020/2 ontvingen een vloeibaar plasmastaal **SN/14741** afkomstig van een patiënt met vasculitis. Wij danken Dr J.P. Tomasi (ex UCL Louvain) voor het bezorgen van dit staal.

Het staal werd vooraf goedgekeurd door de leden van het expertencomité en als volgt beoordeeld: ANCA positief, pANCA patroon (op ethanol gefixeerde neutrofiële granulocyten), MPO positief, PR3 negatief. Dit resultaat wordt beschouwd als het correct aanvaarde resultaat.

Aangezien alle experts hetzelfde advies gaven, wordt het staal als homogeen verdeeld beschouwd.

Deelname

In totaal hebben 85 Belgische laboratoria en 1 Luxemburgs laboratorium deelgenomen aan de EKE.

RESULTATEN

In totaal hebben 73 laboratoria (84.9%) gebruik gemaakt van indirecte immunofluorescentie (IIF) voor het opsporen en de patroontypering van de ANCA.

82 laboratoria (95.4%) hebben een identificatie uitgevoerd dmv een immunoassay.

69 laboratoria (80.2%) voerden zowel een IIF methode als een immunoassay uit.

Tabel 1: Overzicht van het aantal laboratoria dat een IIF of immunoassay, of een combinatie hiervan, heeft uitgevoerd

	N
IIF + Immunoassay	69
IIF	4
Immunoassay	13

Opsporen van ANCA en patroontypering: Indirecte Immunofluorescentie

73 laboratoria (84.9%) hebben gebruik gemaakt van IIF. Van de 13 laboratoria die geen IIF uitvoerden, gaven twee laboratoria aan dat zij hun stalen naar een extern laboratorium sturen en één deelnemer rapporteerde een defect toestel.

71 deelnemers (97.3%) rapporteerden een **correcte positieve fluorescentie** en twee geen fluorescentie.

70 van deze laboratoria (98.6%) rapporteerden een **correct positief pANCA** patroon op ethanol gefixeerde neutrofiële granulocyten inclusief drie deelnemers die een zwakke fluorescentie rapporteerden. Eén laboratorium observeerde een homogeen non perinucleair patroon.

Van de 70 deelnemers die een correct pANCA patroon observeerden, rapporteerden 55 een titer. Deze varieerde van 1/10 tot 1/640.

54 laboratoria rapporteerden een resultaat op formale gefixeerde neutrofiële granulocyten. 46 deelnemers (85.2%) rapporteerden een positief resultaat: 41 rapporteerden een cANCA patroon inclusief vijf deelnemers die een zwakke fluorescentie rapporteerden en vijf deelnemers rapporteerden een pANCA patroon.

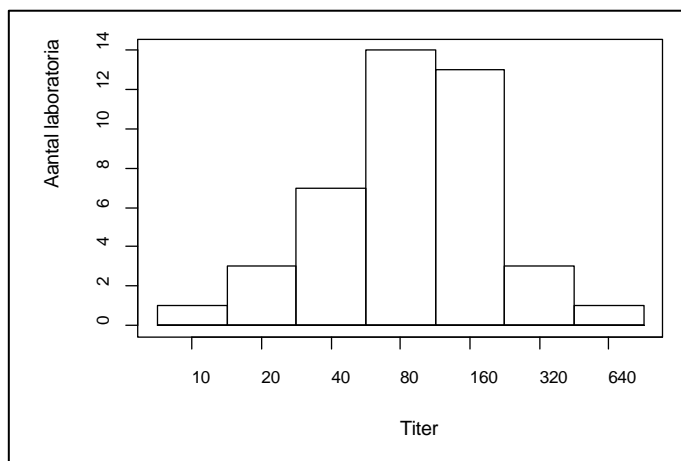
Een negatieve fluorescentie, een atypisch patroon, een negatieve fluorescentie op formale en een pANCA patroon op formale worden als verkeerd aanzien. Het pANCA patroon op formale is mogelijk een verkeerde rapportering. Daarom is het ook steeds belangrijk om een eindconclusie te rapporteren.

Tabel 2: Overzicht van de bekomen IIF resultaten

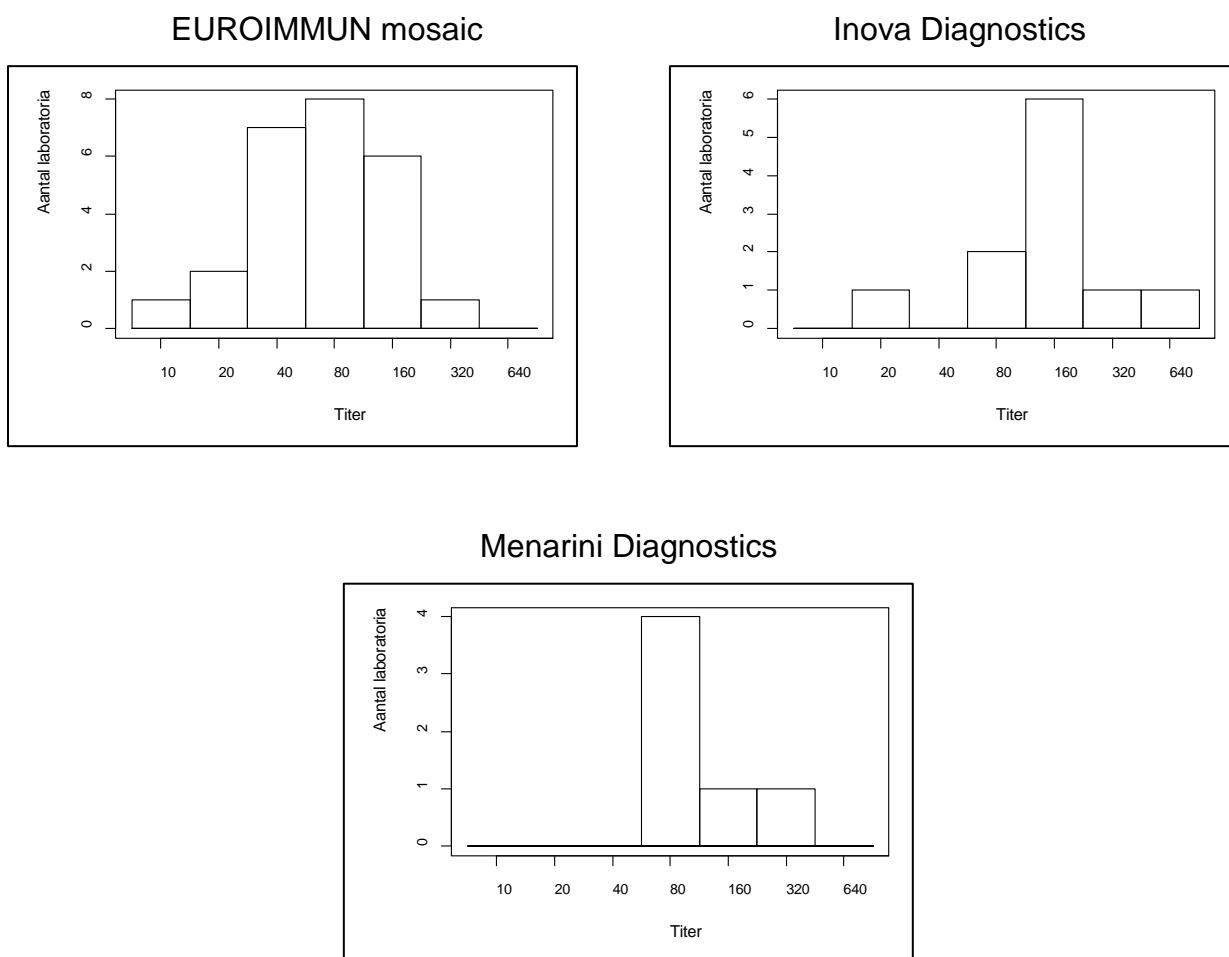
Methodes	N	Ethanol	Titer (# resultaten >1)	Formaline	Conclusie patroon	N	M
EUROIMMUN Mosaic	37	pANCA	10, >10(2), 20 >20(2), 40(2), 80(6), 160(5)	cANCA	pANCA	23 ^a	80
		pANCA	40	cANCA	/	1	
		pANCA	40(2), 80	pANCA	pANCA	4 ^b	
		pANCA	40	pANCA	/	1	
		pANCA	40, 80	Negatief	pANCA	3 ^b	
		pANCA	160, 320	/	pANCA	2	
		pANCA	20	/	/	1	
		Negatief	-	Negatief	-	1	
Homogeen non perinucl	40	Negatief	Atypische ANCA	1	-		
Inova Diagnostics	19	pANCA	>20, 160(3), 640	cANCA	pANCA	9 ^a	160
		pANCA	20, 80, 160(2), 320	/	pANCA	7 ^c	
		pANCA	80, 160	/	/	3 ^b	
Menarini Diagnostics	8	pANCA	80(2), 160, 320	cANCA	pANCA	4	80
		pANCA	/	/	pANCA	1 ^b	
		pANCA	80	Negatief	atypisch (pANCA beeld)	1	
		pANCA	80	Negatief	/	1	
		Negatief	-	Negatief	-	1	
EUROIMMUN	3	pANCA	40, 40	cANCA	pANCA	2	-
		pANCA	/	/	pANCA	1 ^b	
Launch Diagnostics (bmd)	3	pANCA	40, 80	cANCA	pANCA	2	-
		pANCA	160	/	pANCA	1	
Alphadia	1	pANCA	80	/	pANCA	1	-
BIO-RAD	1	pANCA	>80	/	pANCA	1	-
Immuno Concepts	1	pANCA	40	/	/	1	-

Resultaten aangeduid in het blauw worden als niet correct beschouwd

M: mediaan; /: niet gerapporteerd; -: niet van toepassing; ^a Vier deelnemers rapporteerden geen titer; ^b Eén deelnemer rapporteerde geen titer; ^c Twee deelnemers rapporteerden geen titer



Figuur 1: Globale titerverdeling voor de correct gerapporteerde pANCA patronen (N = 55; excl. gecensureerde waarden)



Figuur 2: Verdeling van de titers voor de IIF methoden waarvoor ≥ 6 deelnemers, met een correct pANCA patroon, een titer hebben vermeld, exclusief de gecensureerde waarden.

Identificatie van ANCA: Immunoassay

82 laboratoria (95.4%) hebben een immunoassay uitgevoerd. De vier laboratoria die geen immunoassay uitvoerden, gaven allen aan dat zij deze analyses doorsturen naar een extern laboratorium.

Alle deelnemers rapporteerden een **correct positief** resultaat.

79 deelnemers (96.3%) rapporteerden een **correct positief resultaat voor MPO**. 76 van deze laboratoria (96.2%) rapporteerden tevens een negatief resultaat voor PR3, drie laboratoria rapporteerden geen PR3 resultaat.

Drie laboratoria voerden enkel een screening uit (Orgentec Diagnostika - ELISA) en bekwamen een positief resultaat. Zij gaven aan deze stalen in routine naar een extern laboratorium door te sturen voor identificatie.

Eén laboratorium voerde een screening uit (EUROIMMUN Mosaic) in combinatie met een CLIA methode (IDS). Eén laboratorium gebruikte een FEIA methode (Phadia/Thermo Scientific) voor de MPO en PR3 analyse en bevestigde het PR3 resultaat met een ELISA (EUROIMMUN).

Tabel 3: Overzicht van de gebruikte immunoassays

Methode	Type assay				
	ELISA	FEIA	CLIA	DOT/LINE	BIOCHIP
ThermoScientific/Phadia		44			
Inova Diagnostics	1		8 ^a		
EUROIMMUN (Euroline)				7	
EUROIMMUN (Mosaic)					6
EUROIMMUN	6 ^b				
Orgentec Diagnostika (Launch Diagnostics)	3				
Diesse (bmd)	2				
AESKU Diagnostics (bmd)				2	
Alphadia				1	
Menarini Diagnostics/ImmunoDiagnosticSystems ^c			2		
Wieslab	1				
BIO-RAD				1	
TOTAAL	13	44	10	11	6

^a Er werd geen gemiddelde gemaakt: 5 deelnemers rapporteerden in iu/ml en 3 in CU; ^b Er werd geen gemiddelde gemaakt: 5 deelnemers rapporteerden een resultaat voor MPO en PR3, één enkel voor PR3;

^c Zelfde methode verdeeld door twee firma's

Voor de FEIA methode van Phadia/Thermo Scientific, die door ≥ 6 deelnemers gebruikt werd, werd een gemiddelde waarde en standaard deviatie berekend.

Methode	Gemiddelde	SD
Phadia/Thermo Scientific (FEIA)	41.03 IU/ml	6.13 IU/ml

De EUROIMMUN IIF mosaic (immunoassay op basis van Biochip) en sommige immunodot resultaten laten enkel een identificatie toe. Er wordt aangeraden om de ANCA immunoassay resultaten kwantitatief te rapporteren (uitzonderingen hierop zijn bvb sneltest in urgente context).

BESPREKING VAN DE RESULTATEN & CONCLUSIE

De evaluatie van de resultaten gebeurde op vier niveaus: resultaat van de IIF, ANCA patroon, resultaat van de immunoassay, globaal resultaat.

Van de 73 laboratoria die een IIF uitvoerden rapporteerden 71 een correct ANCA positief resultaat en twee een negatief IIF resultaat.

Van deze 71 deelnemers, rapporteerden 70 een correct pANCA patroon en één een homogeen non perinucleair patroon op ethanol gefixeerde granulocyten. 41 van de 46 deelnemers die een positief resultaat rapporteerden op formaline gefixeerde granulocyten, rapporteerden een cANCA patroon.

De 82 laboratoria die een immunoassay uitvoerden rapporteerden allen een correct positief resultaat. Van deze 82 deelnemers, rapporteerden 79 een correct positief MPO resultaat. Drie laboratoria voerden enkel een screening uit met positief resultaat.

Globaal gezien vonden 67 laboratoria de juiste combinatie pANCA en MPO terug. Er moet echter genoteerd worden dat 8 van deze laboratoria een verkeerd resultaat hebben gerapporteerd op formaline gefixeerde granulocyten nl pANCA of negatief.

Drie laboratoria rapporteerden een pANCA patroon, maar voerden geen immunoassay uit. Twee van deze laboratoria rapporteerden echter een verkeerd resultaat op formaline gefixeerde granulocyten nl pANCA of negatief.

Het rapporteren van een pANCA patroon op formaline is niet correct. Mogelijk gaat het hier om een verkeerde rapportering. Het is daarom belangrijk om op het antwoordformulier te rapporteren welk patroon men waarneemt op ethanol en formaline (indien iotgevoerd) alsook een conclusie ivm het patroon gelinkt aan het staal zodat de evaluatie correct kan gebeuren. Dit geldt ook voor de resultaten van de immunoassay alsook voor de combinatie van beide analyses in een algemeen besluit.

Eén laboratorium rapporteerde een homogeen non-perinucleair patroon op ethanol gefixeerde granulocyten en een negatief patroon op formaline gefixeerde granulocyten in combinatie met een positief MPO resultaat.

Tien van de 13 deelnemers die geen IIF hebben uitgevoerd, beschouwden het staal als MPO positief, de drie andere deelnemers voerden enkel een screening uit zonder verdere identificatie.

Twee laboratoria rapporteerden een negatieve IIF. Eén van deze laboratoria rapporteerde een positief MPO resultaat, het andere voerde geen immunoassay uit.

Bij de CLIA methode van Inova Diagnostics (QUANTA Flash®) worden de resultaten van de MPO en PR3 analyses gerapporteerd in CU. Het gebruik van een conversiefactor laat echter toe deze om te zetten in iu/ml. Het rapporteren in verschillende eenheden laat niet toe de resultaten te vergelijken. Hetzelfde geldt voor het vergelijken van resultaten afkomstig van verschillende methoden. Een recente studie (1) toont aan dat dit zelfs niet mogelijk is voor alle methoden bij het gebruik van een standaard. Het is dus belangrijk om hiermee rekening te houden bij de opvolging van patiënten en de analyses steeds uit te voeren met dezelfde methode, in eenzelfde labo en de resultaten op dezelfde manier (eenheden) te rapporteren.

Tabel 4: Overzicht van de bekomen resultaten

IIF resultaat	ANCA patroon			Immunoassay resultaat		N
	Ethanol	Formaline	Conclusie	MPO	PR3	
Positief	pANCA	cANCA	pANCA	+	-	39
			pANCA	/	/	1
			/	+	-	1
	pANCA	/	pANCA	+	-	14
			/	+	-	5
	pANCA	pANCA	pANCA	+	-	4
			/	/	/	1
	pANCA	Negatief	pANCA	+	-	3
			/	+	-	1
			Atypisch (pANCA)	/	/	1
	Homogeen non perinucl	Negatief	Atypische ANCA	+	-	1
	/	/	/	/	+	-
/	/	/	/	Screening +		3
Negatief	-	-	-	+	-	1
				/	/	1

Resultaten aangeduid in blauw worden als niet correct beschouwd; /: niet uitgevoerd.

Voor een diagnostische vraagstelling in de context van vasculitis wordt geadviseerd steeds een immunoassay uit te voeren, zoals ook wordt aangegeven in de guidelines van 2017 (2). Er moet hierbij genoteerd worden dat deze richtlijnen zijn opgesteld in het kader van een diagnostische vraagstelling en niet voor de opvolging van patiënten of patiënten onder behandeling. Bij deze laatsten is een negatieve IIF en positieve immunoassay mogelijk (zie ook het rapport van de EKE 2018/2).

Thans kan in België volgens de huidige RIZIV-nomenclatuur (artikel 24) het "Opsporen van anti-PR3 of anti-MPO antilichamen" enkel aangerekend worden indien de verstrekking "Opzoeken van anti-neutrofielen antilichamen" positief is (diagnoseregule 64). Een voorstel tot wijziging werd ingediend in de werkgroep immunologie van de commissie klinische biologie en wordt momenteel geëvalueerd.

Verder wordt ook geadviseerd om steeds een correlatie te maken tussen het bekomen IIF patroon en de resultaten van de immunoassay. In geval van discordantie is het belangrijk te correleren met het klinisch beeld, eventuele therapie, en een aanvullende commentaar toe te voegen aan het rapport.

Referenties

- 1) Bossuyt *et al.*, 2020 Standardisation of PR3-ANCA and MPO-ANCA : evaluation of certified reference materials. *Ann Rheum Dis* 0: 1–3 DOI:10.1136/annrheumdis-2020-217416
- 2) Bossuyt *et al.*, 2017 Revised 2017 international consensus on testing of ANCAs in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. *Nature Reviews Rheumatology* 13: 683–692 DOI:10.1038/nrrheum.2017.140

EINDE

© Sciensano, Brussel 2020.

Dit rapport mag niet gereproduceerd, gepubliceerd of verdeeld worden zonder akkoord van Sciensano. De individuele resultaten van de laboratoria zijn vertrouwelijk. Zij worden door Sciensano niet doorgegeven aan derden, noch aan de leden van de Commissie, de expertencomités of de werkgroep EKE.