

ANA

ANA analyse og anvendelse i praksis

Trine Korsholm
Klinisk Immunologisk Afdeling
Aarhus Universitetshospital, Skejby

CEK
Oktober 2016

Stil gerne spørgsmål undervejs



ANA

- ANA er en screeningsundersøgelse for tilstedeværelse af antinukleære antistoffer. Hvis screeningsundersøgelsen er positiv, kan der suppleres med undersøgelse af specifikke antinukleære antistoffer målrettet klinisk mistanke.
- ANA findes også hos raske (øget forekomst med stigende alder) og hos patienter med anden sygdom end ANA-associeret bindevævssygdom, hvorfor der ved rekvisition af ANA uden symptomer/klinik tydende på ANA-associeret bindevævssygdom forekommer mange falsk positive resultater.

ANA

Antistoffer mod kerne (og cytoplasma)-associerede proteiner og DNA

Systemiske, inflammatoriske bindevævssygdomme

Systemisk Lupus Erythematosus (SLE)

Medikamentel lupus

Sjögrens Syndrom (SS)

Sklerodermi (SSc)

Mixed Connective Tissue Disease (MCTD)

Polymyositis / Dermatomyositis

ANA anvendes

- diagnostisk
- prognostisk
- monitorering af sygdomsaktivitet

Autoimmun hepatit + Primær biliær cirrose

(- diagnostisk)

Organspecifik autoimmun sygdom (ex. thyreoidea)

Virale infektioner (HCV, HIV, CMV, EBV)

Bakteriel endocarditis, TB

Raske (kvinder, ældre)

ANA + (HEp-2)

Et forstyrrende element

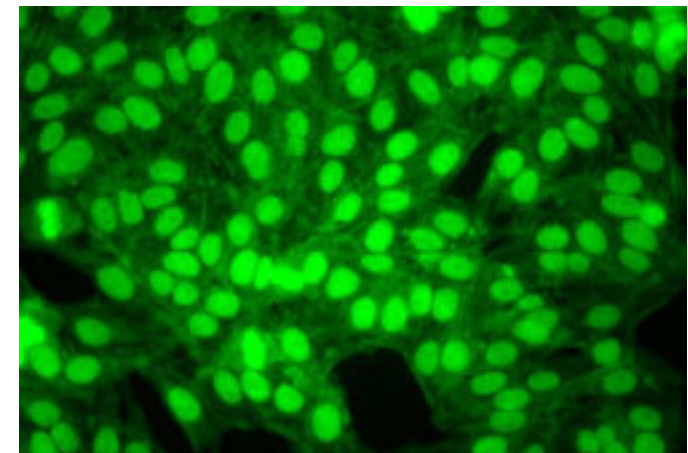
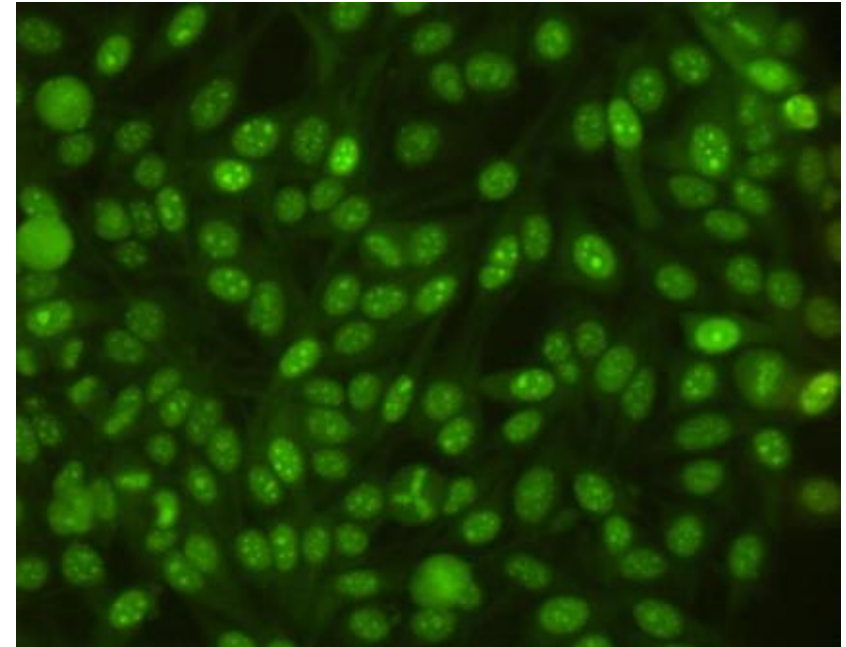
ANA-associerede sygdomme

Sygdom	Incidens i DK
SLE	200
Sjögrens Syndrom	1800
Systemisk sklerodermi	15-40
Mixed Connective tissue Disease	200
Polymyositis / dermatomyositis	40

ANA screening - metoder

ANA IIF HEp-2

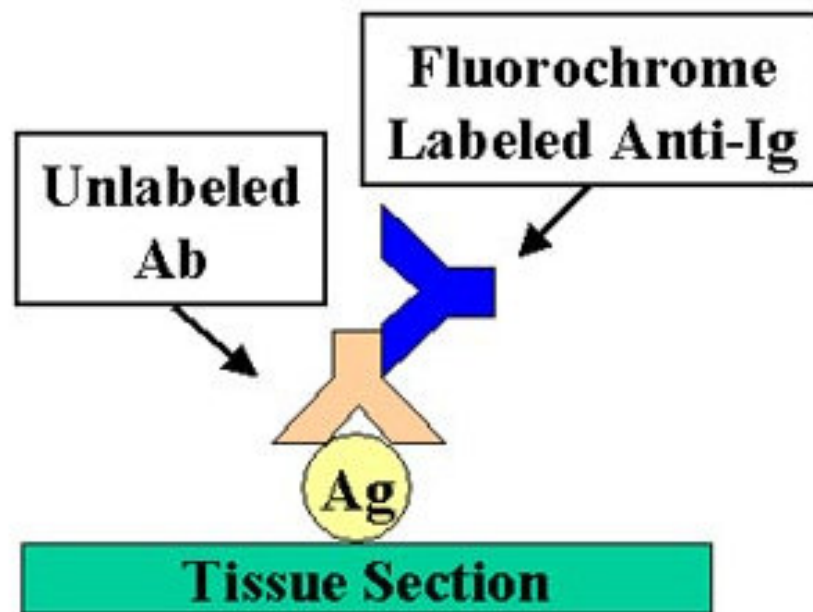
- Golden standard*
- Cellemorfologi
HEp-2-celler (larynxcarcinom)
 - store kerner
 - høj delingsaktivitet
 - ensartet antigendistribution
- ~ 40 forskellige mønstre kan erkendes
(> 100 forskellige autoantistoffer)
- påviser antistoffer mod kerne- **og** cytoplasmatiske bestanddele



*Agmon-Levin N, et al. *Ann Rheum Dis* 2013;0:1–7.

Påvisning af autoantistof

Indirekte immunfluorescens (IIF)

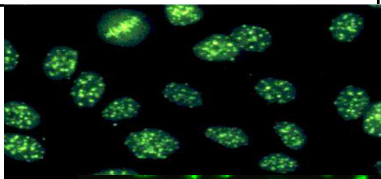
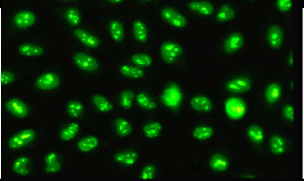
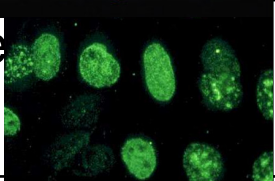
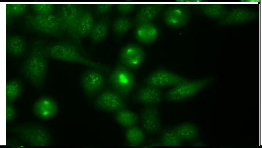
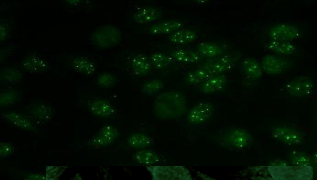
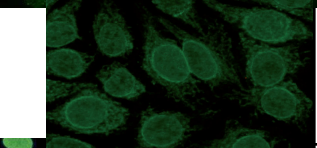
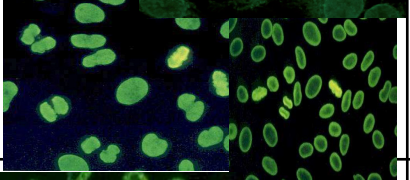
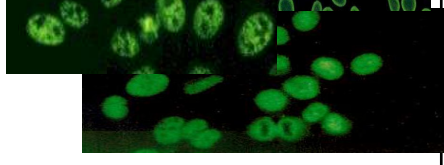


Mønster:

Styrke: + ++ +++

Titer: 1:160, 1:320, etc.



Mønster		Antistof specificiteter	Hyppigste sygdomsassociationer
Centromer		Centromere (A,B,C..H)	Systemisk sklerodermi (limited) Raynaud's
Nucleoli		RNA pol I/III, fibrillarin, PM-SCI	Systemisk sklerodermi (diffus) (SLE)
Prolifererende celler		PCNA (DNA polymerase δ)	SLE (< 5%)
Mitosespindel		Centriole	Mycoplasma pneumoni (systemisk sklerodermi, Raynaud's)
Nukleære dots		Sp-100, PML	Primær biliær cirrose (Immuninflammatorisk bv-sygdom)
Laminer/ kernemembran		Laminer (A,B,C)	Seronegativ arthritis, Sjögren's, SLE Primær biliær cirrose
Homogen/ perifer		DNA, histoner, Scl70, kromatin	SLE, medikamentelt induceret lupus, SSc, JIA.
Plettet		U1-RNP, hnRNP, Sm, SSA, SSB, RNA pol II / III, Mi-2	MCTD, SLE, Sjögrens, systemisk sklerodermi, PM/DM

ANA-screening

Nye teknologier og platforme til screening

- oprensede / rekombinante antigener bundet til en fast overflade.
- varierende antal antigener / epitoper relevante for immuninflammatorisk bindevævssygdom

↓ sensitivitet, ↑ specificitet

Falsk negative eller Falsk positive?
--

Gentofte Hospital
Klinisk Biokemisk Afdeling

Dato: 25-02-13 LN / PBS
dd-mm-år Prod. Kval.

P-Bindevævssygdom-relateret antistof(IgG); arb.stofk.
(dn, fib, rna, rp, pmsc, pcna, mi, rn, sm, ro, la, ce, sc, jo)



Metodeblad nr. M-166/03

Udarbejdet af: Lis Nielsen	Taget i brug: 01.03.2013	Revision: 01.03.2016
	Erstatter: 01.09.2012	

NPU terminologi (DK)	Plasma—Bindevævssygdom-relateret antistof(Immunglobulin G); arbitrær stofkoncentration (proceduredefineret enhed).
NPU terminologi (UK)	P—Connective tissue disease related antibody; arb.subst.c.(proc.) = ? (p.d.u)
Nationalt kortnavn	Bindevævssygdom-relateret-Ab;P
Synonym	ANA
	Testen er en screening, der anvendes ved bindevævssygdomme. Der måles for tilstedeværelse af nedenstående antistoffer og ved positiv eller inkonklusiv screenings resultat udspecificeres for tilstedeværelse af alle enkelt antistoffer:

EliA ANA CTD-screening

17 antigener

dsDNA (SLE)

Sm (SLE)

SSA (Ro60+52) (SS, SLE)

SSB (La) (SS, SLE)

U1RNP (70,A,C) (MCTD)

CENP-B (Sclerodermi)

Scl70 (Sclerodermi)

Jo-1 (Myositis)

- Rib-P (SLE)

- PCNA (SLE)

- fibrillarin (Sclerodermi)

- RNA pol III (Sclerodermi)

- PM-SCL (myosit/sclerodermi)

- Mi-2 (dermatomyositis)

OBS! Histoner (÷ medikamentelt induceret lupus, JIA-børn, andre)

hnRNP's, nucleosomer (SLE-børn (voksne))

andre klinisk relevante er ikke indeholdt.

ALMEN PRAKSIS VS. SPECIALAFD

I almen praksis bruges ANA mest som en del af en pakke mhp. screening for autoimmunsygdom.

På en specialafdeling bruges ANA mere specifikt til at stille en diagnose.

ANA metode: IIF HEp-2 vs EIA

ANA HEp-2, IIF

Høj sensitivitet

Lav specificitet

Falsk positive

Høj negativ prediktiv værdi og LR-

OBS SSA / Jo-1 / RNA Pol III:
VARIABEL detektion i HEp-2

Manuel, tidskrævende, miljø- og
ressourcetung

Subjektivitet

Low through-put

Manglende standardisering

ANA CTD, EIA

Høj specificitet

Lavere sensitivitet?

Falsk negative

Høj positiv prediktiv værdi og LR+

OBS Adskillige relevante antigener ikke
indeholdt
(÷ JIA, medikamentel LE, andre)

Fuldautomatisk

High through-put

Diagnostisk performance

Diagnostic performance in incident patients				
	EliA CTD Screen		IIF, HEp-2	Combined
n = 253	> 0,7	> 1,0	1:≥ 160	ECS+IIF
Sensitivity	91	85	89	92
Specificity	94	96	89	80
LR+	15	21	7	4,5
LR-	0,13	0,21	0,16	0,12
Diagnostic performance estimated from samples of incident CTD patients and diseased controls. LR: Likelihood ratio. ECS: Elia CTD Screen				

Korsholm T, Trolborg A, Nielsen BD. Autoimmunity Congress 2014

LR+ > 10	LR- < 0.1	værdifuld test med betydelig klinisk signifikant forskel ml. pre- og post-test sandsynlighed for sygdom
LR+ 5 -10	LR- 0.1-0.2	moderat signifikant forskel
LR+ 2 - 5	LR- 0.2-0.5	potentiel forskel
LR+ 1		test uden diagnostisk værdi

Agreement

Agreement in CTD patients (prevalent and incident patients)

CTD patients	EliA CTD Screen			
IIF,HEp-2	Neg	> 0,7	> 1,0	Total
Neg	17	21	19	38
Pos	17	122	114	139
Total	34	143	133	177

IIF,HEp-2+, EliA CTD-: SLE (SSA-) og SSc

IIF,HEp-2-, **EliA CTD+:** SS og PM/DM, SLE og SSc

Agreement in controls (diseased controls and blood donors)

Controls	EliA CTD Screen			
IIF,HEp-2	Neg	> 0,7	> 1,0	Total
Neg	263	10	6	273
Pos	26	1	1	27
Total	289	11	7	300

Agreement

Agreement in CTD patients per disease entity (prevalent and incident patients)

	SLE	SS	SSc	MCTD	PM/DM
IIF,HEp-2+, EliA CTD-	10	1	5	0	1
IIF,HEp-2-, EliA CTD+	9	5	3	0	4

Korsholm T, Trolborg A, Nielsen BD. Autoimmunity Congress 2014

Agreement in CTD patients (prevalent and incident patients)

	Antibody specificities
IIF,HEp-2+, EliA CTD-	Histone? Nucleosome? RNPs? Th/To? Others
IIF,HEp-2-, EliA CTD+	SSA (Ro52+Ro60), dsDNA, PCNA, RNA Pol III, Jo-1

ANA I ALMEN PRAKSIS

Incidens ANA-associeret CTD: 500 (2300) / år, 15% har muskulo-skeletale problemer

Elia CTD Screen

RM: 1.300.000 indbyggere	52 nye SLE / år
Der udføres 20.000 ANA / år	47 sandt positive (= SLE)
	800 'falsk' positive (= non-ANA associeret sygdom/raske))



Så vil hver 18. med positiv ANA have SLE

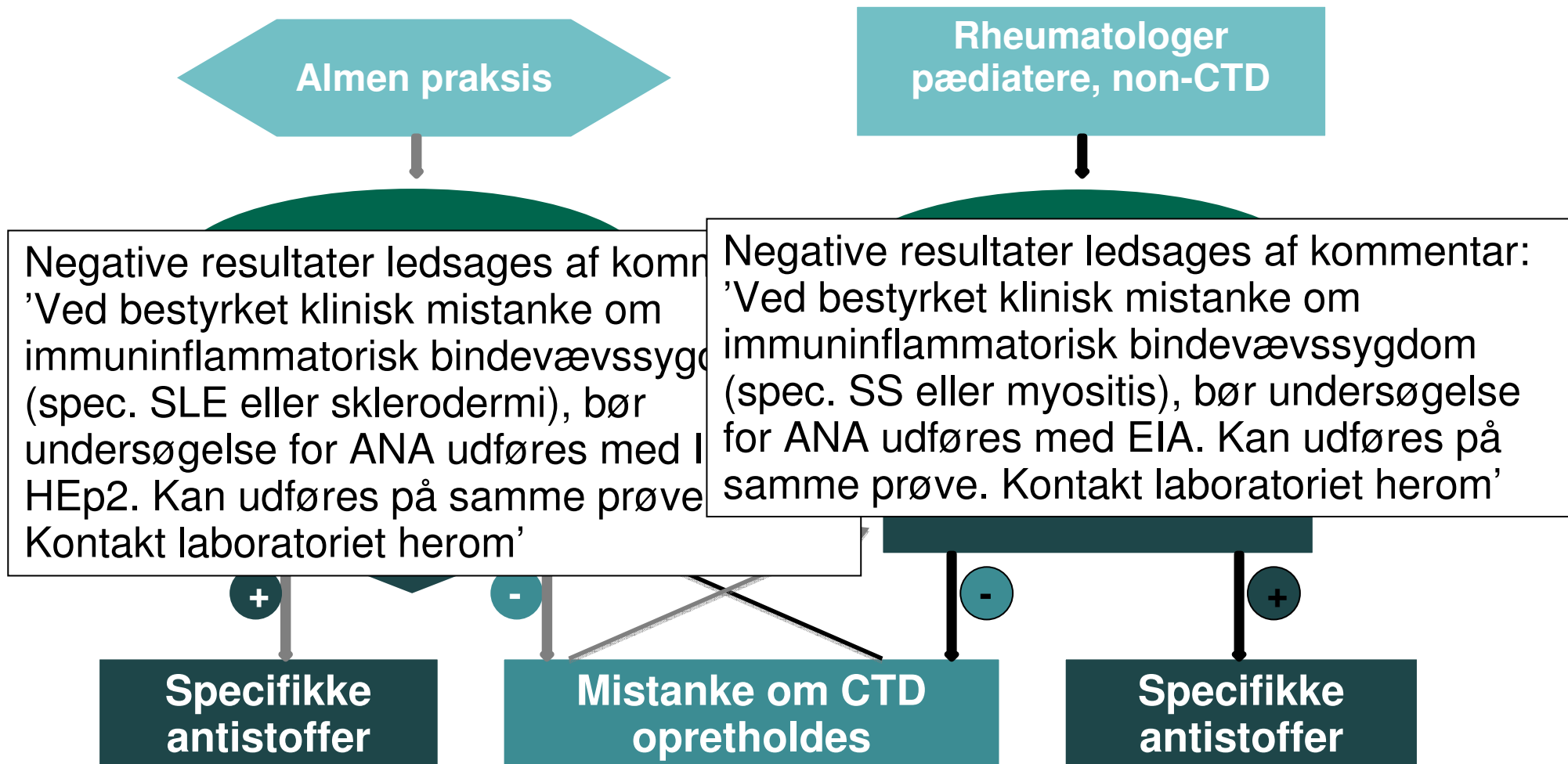
ANA HEp-2 immunflouescens

RM: 1.300.000 indbyggere	52 nye SLE / år
Der udføres 20.000 ANA / år	47 sandt positive (=SLE)
	2200 'falsk' positive (= non-ANA associeret sygdom/raske)



Så vil kun hver 50. med positiv ANA have SLE

ANA algoritme KIA, Skejby



ANA algoritme KIA, Skejby

Optimal patientdiagnostik forudsætter:

To-vejskommunikation mellem laboratorie og klinikere (vigtigt!)

→ klinisk information fra klinikere til lab muliggør valg af optimal analyse

→ informative svar fra laboratoriet inkl.

- specifikation af analysemetode og metodens performance
- tolkning og relevant videre udredning (hvis klinisk indiceret)

→ bidrager til optimal diagnostik

P-Bindevævssygdomassocieret Ab (ANA) - Indikation

- Analyse for ANA skal IKKE anvendes som screeningstest for at vurdere træthed, feber, rygsmerter, eller andre smerter i bevægeapparatet uden øvrige kliniske manifestationer.
- Primær analyse for ANA er ikke indiceret, medmindre symptomer og klinik giver mistanke om **ANA-associeret bindevævssygdom** (herunder systemisk lupus erythematosus, sklerodermi, Sjögrens syndrom, polymyositis / dermatomyositis eller mixed connective tissue disease)

Analysen kun indiceret hvis ≥ 1 af flg. er tilstede:

Lysoverfølsomhed

Hudforandringer (SLE, scleroderma, dermatomyositis or vasculitis)

Proteinuri (persisterende)

Arthritis (nonerosiv, 2 eller flere led)

Hæmatologisk påvirkning (hæm. anæmi, leuko-/ lymfopeni, tbc-peni)

Raynaud's fænomen (nylig debut)

Orale ulcera eller mundtørhed (oral eller nasopharynx)

Øjentørhed

Serositis (symptomer på eks. pleuritis, pericarditis)

Progredierende, symmetrisk svækkelse

Neurologiske symptomer (Herunder psykose, kramper)

Opsummering

En positiv ANA skal ses i lyset af et **samlet sygdomsbillede**

Positiv ANA i kombination med kliniske fund indikerer reumatologisk systemsygdom

Titeren / Ratio korrelerer ikke med sygdomsaktivitet eller prognose

Tilfældigt fund af positiv ANA har lille informationsværdi

Fund af negativ ANA bør ikke føre til udelukkelse af immuninflammatorisk bindevævssygdom, hvis der er klinisk mistanke hertil.

ANA skal kun rekvireres ved symptomer på immuninflammatorisk bindevævssygdom

IIF versus EIA: Dedikeret anvendelse giver optimal diagnostik.

Kommunikation mellem klinikere og laboratorie er $\alpha\omega$ for korrekt diagnostik

Tak

Mundtligt omtalt reference under præsentationen omhandlende 'The Canadian Rheumatology Association Choosing Wisely recommendation' vedr ANA og RF:

Ferrari R: Evaluation of the Canadian Rheumatology Association Choosing Wisely recommendation concerning anti-nuclear antibody (ANA) testing. Clin Rheumatol 2015;34:1551