

35. Ketikoglou I, Moulakakis A. Autoimmune pancreatitis. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 211-215.
36. Kawa S, Ota M, Yoshizawa K, Horiuchi A, Hamano H, Ochi Y, Nakayama K, Tokutake Y, Katsuyama Y, Saito S, Hasebe O, Kiyosawa K. HLA DRB10405-DQB10401 haplotype is associated with autoimmune pancreatitis in the Japanese population. *Gastroenterology* 2002; 122: 1264-1269.
37. Okazaki K, Uchida K, Ohana M, et al. Autoimmune-related pancreatitis is associated with autoantibodies and a Th1/Th2-type cellular immune response. *Gastroenterology* 2000; 118: 573-581.

## Summary

*Autoimmune diseases of the liver. Bakker-Jonges LE, van Buuren HR. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006; 31: 281-289.*

Autoimmune hepatitis (AIH), primary biliary cirrhosis (PBC), primary sclerosing cholangitis (PSC) and autoimmune pancreatico-cholangitis (APC) are chronic autoimmune liver diseases of unknown cause which may all lead to cirrhosis and liver failure. Diagnosis is based on a combination of clinical, laboratory, radiological and histological findings. Laboratory

investigations are of key importance with respect to diagnosis, prognosis and for monitoring disease activity and response to therapy. Characteristic findings in AIH are the presence of antinuclear, anti-smooth muscle and anti-soluble liver antigen (SLA) antibodies and elevated IgG-serum levels. Presence of antimitochondrial antibodies and elevated serum-IgM levels are important for diagnosing PBC. In PSC no typical autoantibodies are found and diagnosis is mainly based on biliary imaging. APC patients usually have increased serum IgG or IgG4 levels. AIH and PBC mainly affect women. For both diseases effective therapy, prednisone/azathioprine and urodeoxycholic acid respectively, is available. PSC and APC predominantly affect men. For PSC no effective medical treatment has been established. Liver transplantation is an option in the late stage of the disease. APC can be effectively treated with prednisone. AIH can occur in patients who also suffer from PBC or PSC. In patients with this overlap syndrome immunosuppressive therapy is usually indicated.

*Keywords: autoimmune hepatitis; primary biliary cirrhosis; primary sclerosing cholangitis; autoimmune pancreatico-cholangitis; autoantibodies; PBC; PSC; APC*

*Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006; 31: 289-295*

## ANCA en vasculitis, een complexe relatie

P.C. LIMBURG<sup>1</sup> en C.G.M. KALLENBERG<sup>2</sup>

De ontdekking van autoantistoffen tegen cytoplasmatische bestanddelen van neutrofielen (ANCA) in het bloed van patiënten met vasculitis van de kleine vaten heeft sterk bijgedragen aan de diagnostiek van deze aandoeningen en aan het pathofysiologisch denken over het mechanisme van deze ziekten. De vasculitis is een indirect gevolg van de interactie tussen aan het endotheel gehechte geactiveerde neutrofielen, bijvoorbeeld tijdens een infectie, en tegen deze neutrofielen gerichte autoantistoffen. De belangrijkste ANCA-antigenen zijn proteinase 3 (PR3) en myeloperoxydase (MPO). Autoantistoffen tegen deze eiwitten zijn in meer of mindere mate specifiek geassocieerd met de verschillende vormen van vasculitis van kleine vaten. Serologische detectie van deze autoantistoffen dient bij voorkeur uitgevoerd te worden middels een combinatie van een indirecte immunofluorescentietest op humane granulocyten en een antigeenspecifieke test, zoals een al dan niet geautomatiseerde ELISA test of een immunoblottest. Hierover bestaan internationale consensus afspraken.

*Laboratorium Centrum en Afdeling Pathologie en Laboratoriumgeneeskunde<sup>1</sup> en Afdeling Interne Geneeskunde<sup>2</sup>, Universitair Medisch Centrum Groningen*

Correspondentie: prof.dr. P.C. Limburg, Afdeling Pathologie en Laboratoriumgeneeskunde UMCG, Hanzeplein 1, Postbus 30.001, 9700 RB Groningen.  
E-mail: p.c.limburg@lc.umcg.nl

*Trefwoorden: ANCA, antistoffen; antineutrofiel-cytoplasmatische; proteinase-3; glomerulair basaalmembraan; myeloperoxydase; anti-MPO, anti-GBM, anti-PR3, cANCA; vasculitis; ziekte van Wegener, polyangiitis, Churg-Strauss*

Vasculitis is een verzamelnaam voor ziekten die gekarakteriseerd worden door acute of chronische ontsteking van bloedvaten, zich uitend in microscopische en macroscopische schade aan de bloedvaatwand en ischemische schade aan weefsels of organen die voor de bloedvoorziening afhankelijk zijn van de aangedane bloedvaten. De klinische manifestaties worden bepaald door de aard en lokalisatie van de aangedane bloedvaten en door de aard en omvang van de ontstekingsreactie. Vasculitis kan een secundaire manifestatie zijn van een systemische auto-immuunziekte, zoals gesystematiseerde lupus erythematosus (SLE), of van infectieuze aandoeningen. In deze gevallen wordt de vasculitis vooral veroorzaakt door depositie van gevormde immunocomplexen, of door vorming in situ van immunocomplexen. Depositie van deze immunocomplexen is dan veelal aantoonbaar in biopten van aangedane vaten. Vasculitis kan ook een op zich staande ziekte zijn zonder een aanwijsbare andere onderliggende ziekte en we spreken dan van een primaire of idiopathische vasculitis. De primaire vasculitiden worden ingedeeld op basis van de grootte van de aangedane vaten en de histopathologie van de lesies in combinatie met klinische verschijnselen.

**Tabel 1.** Primaire vasculitis

Aangedane vaten	Ziektebeelden	Geassocieerde autoantistoffen
Grote vaten	Reuscelarteritis Takayasu's arteritis	Geen Geen
Middelgrote vaten	Ziekte van Kawasaki Polyarteritis nodosa	Geen Geen
Kleine vaten	Ziekte van Goodpasture Ziekte van Wegener (WG) Microscopische polyangiitis (MPA) Idiopathische necrotiserende crescentische glomerulonefritis (iNCGN) Syndroom van Churg-Strauss (CSS)	Anti-GBM (type-IV-collageen) 100% ANCA, anti-PR3 70% (anti-MPO 20%) ANCA, anti-MPO 70% (anti-PR3 20%) ANCA, anti-MPO 70% (anti-PR3 20%) ANCA, anti-MPO 40% (anti-PR3 5%)
	Henoch-Schönlein purpera Cryoglobulinemische vasculitis Leukocytoclastische vasculitis van de huid	Geen Type-II-cryoglobulinen 100% Geen

De diagnostiek van de vasculitiden richt zich op de klinische manifestaties, op histopathologisch onderzoek, en op serologie. Bij patiënten met anti-GBM-glomerulonefritis (ziekte van Goodpasture) zijn immuunglobulinedeposities in de nieren goed aantoonbaar. Bij patiënten met de ziekte van Wegener (WG), microscopische polyangiitis (MPA), idiopathische necrotiserende crescentische glomerulonefritis (iNCGN), of het syndroom van Churg-Strauss zijn ook bij evidente glomerulonefritis geen of slechts spaarszaam immuundeposities aantoonbaar en spreken we van een pauci-immun vasculitis. Met name voor de diagnostiek van vasculitis van de kleine vaten betekende de ontdekking van het voorkomen van autoantistoffen tegen cytoplasmatische antigenen in neutrofielen (ANCA) een grote vooruitgang. In 1982 werden deze autoantistoffen tegen neutrofielen voor het eerst beschreven door Davies et al. (1), maar deze publicatie bleef onopgemerkt. Studies in Kopenhagen naar neutrofiel-specifieke antinucleaire antistoffen en in Groningen naar circulerende immuncomplexen bij patiënten met vasculitis (2) leidden tot de definitieve beschrijving van de antineutrofielcytoplasma-antistoffen (ANCA) en tot de erkenning van de grote betekenis daarvan voor de diagnostiek en het begrip van de pathofysiologie van vasculitis van de kleine vaten (tabel 1).

### Proteinase 3 (PR3) en myeloperoxidase (MPO)

Klassiek worden ANCA's bepaald met een indirecte immuunfluorescentietest op ethanolgefixeerde humane granulocyten. In deze test kunnen drie immuunfluorescentiebeelden herkend worden: een cytoplasmatisch patroon (cANCA), een perinucleair patroon (pANCA) (figuur 1) en een atypisch patroon. Een cANCA-patroon wordt vrijwel altijd bepaald door de aanwezigheid van antistoffen tegen het proteïnase-3 (PR3), terwijl een pANCA-patroon veelal, maar niet exclusief, bepaald wordt door de aanwezigheid van antistoffen tegen myeloperoxidase (MPO). Ook antistoffen tegen andere intracellulaire antigenen kunnen vergelijkbare immuunfluorescentiepatronen

geven, zodat diagnostiek naar ANCA's altijd onderdeel zal zijn van breder serologisch onderzoek (zie onder). Voor de idiopathische vasculitiden zijn PR3 en MPO, naast antistoffen tegen de glomerulaire basaalmembraan (anti-GBM), de belangrijkste autoantigenen.

PR3 is een van de vier serineproteïnases die zich bevinden in de azurofiële korrels van de granulocyt en in mindere mate in de granula van de monocyt (3). Naast PR3 betreft dit het homologe humane leukocyt-elastase (HLE), cathepsine G (CatG) en azurocidine (AZU). PR3 ligt in de zure granula van de neutrofiel opgeslagen als inactief enzym en kan na degranulatie van de granulocyt middels een pH-afhankelijke conformatieverandering geactiveerd worden. Eenmaal geactiveerd is PR3 een krachtig proteolytisch enzym, met een katalytisch centrum dat sterke overeenkomst vertoont met dat van HLE en CatG. Daarmee heeft PR3 een grote overeenkomst in substraatspecificiteit met beide genoemde homologe serineproteïnases. Naast anti-microbiële activiteit, vooral tegen gram-negatieve bacteriën, speelt PR3 een belangrijke rol bij de migratie van granulocyten door basaalmembranen. Net als HLE kan PR3 vele extracellulaire matrixeiwitten en bestanddelen van de basaalmembraan afbreken. De betreffende substraten zijn ondermeer elastine, fibrinogeen, fibronectine, laminine, vitronectine, collageen-type-IV en proteoglycanen. Ook is PR3 mogelijk betrokken bij de proteolytische 'processing' van ontstekings-eiwitten. PR3 kan IL-1 $\beta$  en membraangebonden TNF $\alpha$  of de receptor voor interleukine-2 splitsen. Splitsing van IL-8 of TGF $\beta$  door PR3 leidt tot activatie van deze chemokinen/cytokinen, terwijl splitsing van IL-6 juist leidt tot inactivatie. De fysiologische betekenis van deze verschillende activiteiten van PR3 is nog onduidelijk.

De activiteit van PR3 staat, net als die van de andere serineproteïnases, sterk onder controle van constitutief geproduceerde serineproteïnaseremmers, bekend als de 'serpins'. De belangrijkste fysiologische remmer van PR3 is  $\alpha_1$ -antitrypsine ( $\alpha_1$ -protease-inhibitor), ook de belangrijkste remmer van HLE.

Complexen van serineproteïnasen met  $\alpha_1$ -AT worden vervolgens snel uit de circulatie geklaard. Daarnaast wordt de activiteit van PR3 sterk geremd door het in de huid geproduceerde elafin en in mindere mate door  $\alpha_2$ -macroglobuline. In de circulatie komt PR3 dan ook alleen voor in gecomplexeerde en dus geïnactiveerde vorm gebonden aan enzymremmers en vrijwel niet als vrij enzym. Opvallend genoeg wordt PR3 niet geremd door secretoire leukoproteïnase-inhibitor (SLPI), een krachtige remmer van HLE en CatG, dat normaal in hoge concentraties voorkomt in epiteelcellen van de long, waarmee PR3 in de long een specifieke pathofysiologische rol kan spelen, bijvoorbeeld bij patiënten met een  $\alpha_1$ -AT-deficiëntie.

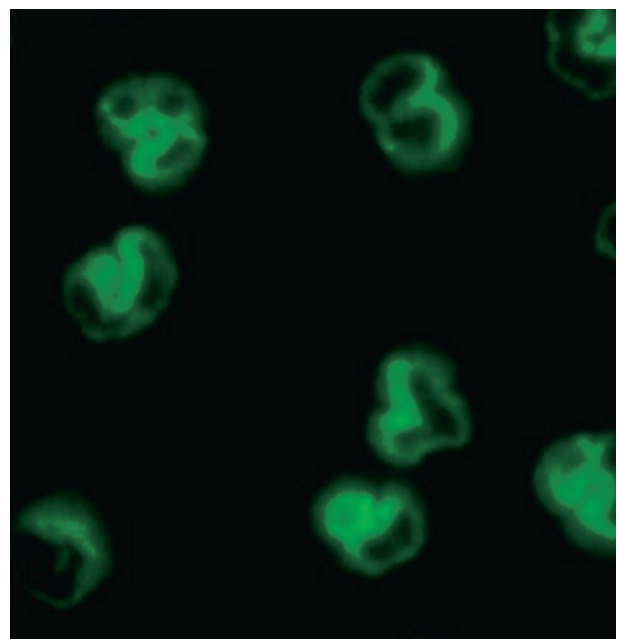
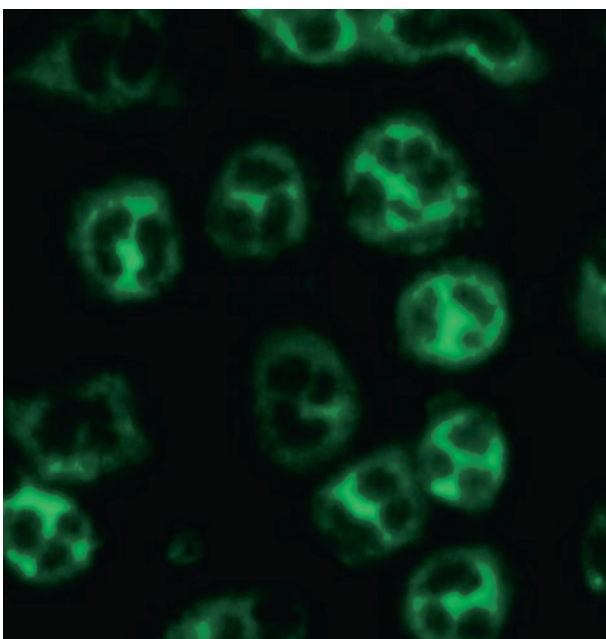
MPO is een krachtig oxidatief enzym (4). Het ligt net als PR3 opgeslagen in de azurofiele granula van de neutrofiële granulocyt en in de granula van de monocyt en is verwant aan eosinofielperoxidase en lactoperoxidase. Kwantitatief vormt MPO een van de belangrijkste eiwitten in de azurofiele granula en na activatie van de granulocyt komt MPO vrij in zowel de gevormde fagosomen als in de extracellulaire ruimte. Daar is MPO in staat uit waterstofperoxide de vorming van hypochloriet (HOCl) en andere reactieve zuurstofmetabolieten te katalyseren, waarmee het een grote rol speelt in de afweer tegen bacteriën en schimmels, maar ook potentiëel schade kan aanbrengen aan eigen weefsel, met name de bloedvaten. Ook voor MPO bestaat er een constitutief geproduceerde remmer, het ceruloplasmine, dat na complexering het MPO inactieveert en klaring van gevormde complexen verzorgt.

Zoals gezegd kunnen PR3 en MPO na activatie van de granulocyt middels degranulatie uit de neutrofiel vrijkomen. Voor PR3 en in mindere mate voor MPO geldt dat er ook extracellulaire expressie kan plaatsvinden na partiële activatie, bekend als priming, waarbij het MPO en PR3 tot expressie komen op de celmembraan (5). Dit is vooral goed bestudeerd na

priming van neutrofielen met TNF- $\alpha$ , waarbij is aangetoond dat de translocatie van deze eiwitten vanuit de granula naar de celmembraan gereguleerd wordt door de intracellulaire signaaltransductieroutes, met name de 'mitogen activated protein kinase' (MAPK)-route (6, 7). Expressie van deze eiwitten op het oppervlak van geprimeerde neutrofielen is in vivo bij patiënten aantoonbaar, hetgeen betekent dat een willekeurige ontstekingsreactie, bijvoorbeeld tijdens infectie, aanleiding kan geven tot expressie van normaal intracellulair gelokaliseerde autoantigenen op het celoppervlak van de neutrofiel. In die situatie kan interactie met eventueel aanwezige autoantistoffen plaatsvinden.

#### ANCA: anti-PR3 en anti-MPO

Uitgebreid onderzoek heeft aangetoond dat vrijwel alle ANCA's bij patiënten met vasculitis gericht zijn tegen of PR3, of MPO. Slechts bij hoge uitzondering komen deze antistoffen bij een patiënt tegelijk voor en moet men in een dergelijke situatie bedacht zijn op specifieke reacties in de gehanteerde serologische technieken (zie onder). Alhoewel de granula in de granulocyt vele eiwitten bevatten en hoewel een aantal van die eiwitten een sterke homologie kunnen vertonen, zoals geldt voor de vier serineproteïnasen, zijn deze eiwitten slechts bij hoge uitzondering doelwit van een auto-immuunrespons. Incidenteel worden er autantistoffen gevonden die gericht zijn tegen HLE of tegen CatG. Frequenter, maar toch nog zeldzaam, zijn autoantistoffen beschreven die gericht zijn tegen 'bactericidal permeability increasing protein' (BPI), lysozym, of lactoferrine. Deze antistoffen kunnen voorkomen bij verschillende ziektebeelden, waaronder patiënten met cystic fibrosis (anti-BPI), reumatoïde artritis en primaire biliaire cirrose, chronisch actieve auto-immuunhepatitis, primair scleroserende cholangitis, inflammatoire darmziekte (anti-lactoferrine) (8). Gezien de beperkte klinische en diagnostische



**Figuur 1.** Immuunfluorescentiepatroon van op ethanol gefixeerde humane leukocyten: cytoplasmatisch (cANCA, links) en perinuclear (pANCA, rechts).



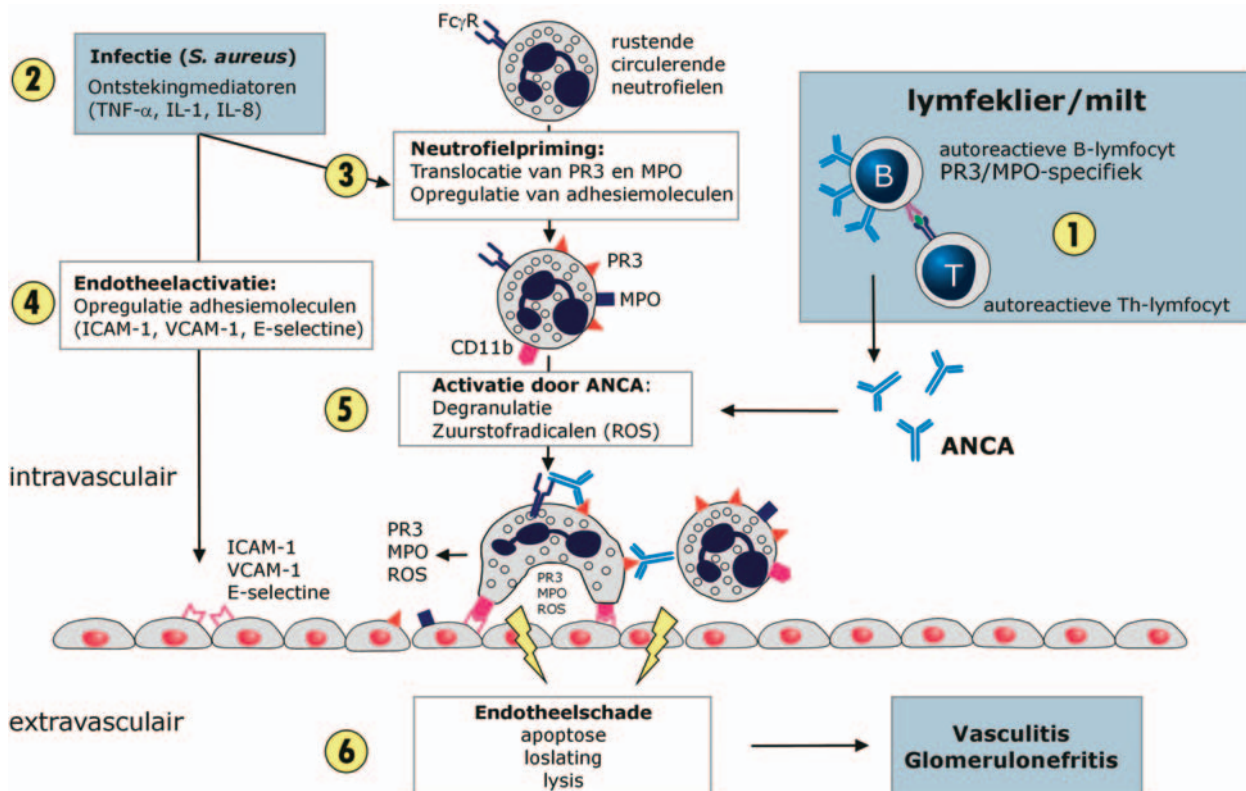
betekenis van de ANCA's anders dan anti-PR3 of anti-MPO worden die antistoffen slechts zelden bepaald en zullen ze hier niet verder besproken worden. De antistoffen tegen PR3 zijn specifiek voor PR3 en vertonen geen kruisreactiviteit met de sterk homologe eiwitten HLE, CatG of AZU. Functioneel onderzoek heeft laten zien dat anti-PR3-antistoffen een remmende werking hebben op de enzymatische activiteit van PR3, zonder de enzymatische activiteit van HLE te beïnvloeden (9). Gedenatureerd PR3 wordt niet herkend door anti-PR3-antistoffen bij patiënten, dit in tegenstelling tot de vele monoklonale antistoffen die geproduceerd zijn, zodat een goede epitoomapping van anti-PR3 moeizaam is gebleken. Alhoewel de feitelijke autoantigene epitopen op PR3 niet goed beschreven zijn is het wel duidelijk dat dit aantal epitopen beperkt is, de epitopen sterk afhankelijk zijn van de tertiaire structuur van het eiwit, en deze in ieder geval het actieve centrum van het enzym betreffen. Deze specificiteit van de anti-PR3-antistoffen is er mogelijk ook mede de oorzaak van dat er tot op heden nog geen goed diermodel voor anti-PR3-geassocieerde vasculitis bestaat. Anti-PR3-antistoffen zijn specifiek voor patiënten met kleinevatenvasculitis, die tegenwoordig worden samengevat onder de term ANCA-geassocieerde vasculitis (AAV). Het betreft hier patiënten met de ziekte van Wegener (WG, 70% anti-PR3), microscopische polyangiitis (MPA, 20% anti-PR3), idiopathische necrotiserende crescentische glomerulonefritis (iNCGN, 20% anti-PR3), of het syndroom van Churg-Strauss (CSS, 10% anti-PR3). De antistoffen tegen MPO zijn voor hun binding minder gevoelig voor de tertiaire structuur van het MPO en in verschillende diermodellen is de pathofysiologische betekenis van deze antistoffen aangetoond (10).

Binnen de groep van AAV-patiënten worden anti-MPO-antistoffen gevonden bij patiënten met WG (20% anti-MPO), MPA (70% anti-MPO), iNCGN (70% anti-MPO) en CSS (40% anti-MPO). Daarnaast worden anti-MPO-antistoffen ook sporadisch gevonden bij patiënten met de ziekte van Goodpasture (20% anti-MPO), naast het voorkomen van antistoffen tegen GBM. Buiten deze populaties komen anti-MPO-antistoffen zelden voor, met uitzondering van sporadische patiënten met medicamenteus geïnduceerde vasculitis, zoals bij gebruik van propylthiouracil (PTU). In die gevallen hebben patiënten naast anti-MPO vaak ook antistoffen tegen lactoferrine of elastase.

### Pathofysiologie

De relatie tussen het voorkomen van autoantistoffen tegen PR3 of MPO en het optreden van vasculitis is complex. Enerzijds zijn de autoantistoffen bij AAV gericht tegen intracellulaire bestanddelen van granulocyten (en monocyten) en kan er dus niet sprake zijn van een directe interactie van de autoantistoffen met het autoantigeen. Anderzijds uiteten deze auto-immuunziekten zich op het niveau van het endotheel, zonder dat er sprake is van histologisch aantoonbare depositie van antistoffen of immunocomplexen. Het huidige pathofysiologische model voor ANCA-geassocieerde vasculitis staat samengevat in figuur 2 (naar Muller-Kobold en anderen) (11):

1. Patiënten met AAV produceren om nog onbekende redenen autoantistoffen tegen intracellulaire bestanddelen van neutrofielen (en monocyten), met name tegen PR3 of MPO. Deze antistoffen komen vrij in de circulatie voor en immunocomplexen zijn meestal niet aantoonbaar, noch in de circulatie, noch in de lesies.



**Figuur 2.** Pathofysiologisch model voor ANCA-geassocieerde vasculitis.

2. Tijdens een ontstekingsreactie, bijvoorbeeld als gevolg van een acute infectie of chronisch dragerschap van *Staphylococcus aureus*, worden ontstekingsmediatoren geproduceerd, waaronder TNF- $\alpha$  en IL-1 $\beta$ .
3. Door directe interactie met bacteriële bestanddelen (LPS) of indirect via cytokinen (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) worden neutrofielen geactiveerd (geprimed), hetgeen leidt tot translocatie van autoantigenen (PR3, MPO) naar het celoppervlak van de neutrofiel en verhoogde expressie van adhesiemoleculen (CD11b).
4. Dezelfde ontstekingsmediatoren activeren het endotheel en induceren de (verhoogde) expressie van adhesiemoleculen (ICAM-1, VCAM-1, E-Selectine), waarna binding van de geactiveerde neutrofielen plaats kan vinden.
5. Ter plaatse van het geactiveerde endotheel en de gehechte neutrofielen kunnen de autoantistoffen (ANCA), middels binding aan de tot expressie gebrachte autoantigenen, de neutrofielen activeren. Bij deze activatie zijn de receptoren voor IgG (Fc $\gamma$ R) op de neutrofiel betrokken.
6. Dit leidt tot verdere expressie van autoantigen (translocatie), het vrijkomen van proteolytische enzymen (degranulatie) en de productie van zuurstofradicalen ('oxidatieve burst'). Hierdoor zal schade aangebracht worden aan het betreffende endotheel (vasculitis), zonder dat er daadwerkelijk op het endotheel autoantistof- of immuncomplexdepositie plaatsvindt.

In dit model zijn de autoantistoffen dus niet direct pathogeen, maar kunnen ze slechts in samenhang met een ontstekingsreactie van pathofysiologische betekenis zijn. De bijdrage van de ontstekingsreactie richt zich op de activatie/priming van zowel het endotheel als de neutrofiel, terwijl de autoantistof vooral versterkende invloed heeft op de lokale neutrofielactivatie, hetgeen leidt tot lokale schade aan het endotheel.

### ANCA testen

ANCA's zijn ontdekt door het gebruik van gefixeerde humane granulocyten in indirecte immunfluorescentietesten (IIF), gelijk het gebruik van gekweekte epitheelcellen (Hep2) in de ANA-diagnostiek. Alhoewel hier discussie over is, is de ANCA-IIF-test op gefixeerde granulocyten nog steeds de meest gebruikte screeningstest voor het aantonen van ANCA's. Zoals gezegd worden er drie ANCA-patternen herkend (12): cANCA, pANCA en atypische ANCA. Alhoewel een cANCA bij een relevante klinische verdenking meestal synoniem is met anti-PR3 en pANCA in mindere mate synoniem met anti-MPO, is het niet verantwoord om hier in de praktijk van uit te gaan. Een positieve ANCA-IIF-test moet altijd bevestigd worden met een antigeenspecifieke test, veelal een ELISA. De belangrijkste redenen hiervoor zijn, dat er naast de twee genoemde antigenen ook andere eiwitten in de granulocyt aanwezig zijn waartegen autoantistoffen gemaakt kunnen worden (bijvoorbeeld anti-lactoferrine), die een met cANCA of pANCA vergelijkbaar IIF-patroon kunnen geven, maar niet specifiek zijn voor AAV. Daarnaast kunnen patiënten

ook antistoffen hebben tegen kernantigenen (ANA), die een positief resultaat geven in de ANCA-IIF-test. Bedacht moet worden dat het pANCA-patroon van anti-MPO-antistoffen in de ANCA-IIF-test berust op een fixatie artefact. MPO ligt, net als PR3, in de azurofiele granulae van de granulocyt. MPO heeft een zeer hoog iso-elektrisch punt, waardoor dit sterk positief geladen eiwit tijdens het fixatieproces kan hechten aan de negatief geladen celkern. Dit geldt ook voor een aantal andere eiwitten, zoals lactoferrine en elastase. In de praktijk zijn hierdoor vele pANCA's niet specifiek voor anti-MPO, maar het gevolg van de aanwezigheid van andere autoantistoffen. Om eenheid te brengen in het testen op de aanwezigheid van ANCA zijn internationaal geaccepteerde consensusafspraken gemaakt (13, 14). Deze consensusafspraken betreffen 1: de klinische indicatiestelling voor de aanvraag (zie tabel 2), 2: het bepaling algoritme, 3: de te gebruiken technieken en QC-vereisten en 4: het interpreteren en rapporteren van de resultaten.

Met name het bepaling algoritme staat tegenwoordig ter discussie (15). Men gaat uit van een screeningstest middels de ANCA-IIF test, inclusief de controle op de aanwezigheid van antinucleaire antistoffen (ANA). Deze keus wordt bepaald door het gegeven dat in de internationale studies de ANCA-IIF-test het meest gevoelig was en dat ca. 10% van de ANCA-positieve patiënten met klinisch suspecte AAV negatief waren in (ELISA-)confirmatietesten voor anti-PR3 en anti-MPO. Met de introductie van nieuwe gevoeliger testen, specifiek voor anti-PR3 of anti-MPO, zou een initiële screening met ANCA-IIF achterwege kunnen blijven. Dit zou het geval kunnen zijn bij het gebruik van de gevoeliger zogenaamde 'antigen capture'-testen, maar deze testen zijn niet algemeen in gebruik. Het reguliere SKML-kwaliteitsonderzoek in Nederland heeft laten zien dat vele van de huidige commerciële testen nog niet voldoen aan de vereisten voor een screeningstest. Gezien het grote aantal beschikbare testen voor anti-PR3 en anti-MPO en de nog groeiende automatisering op dit gebied is het verstandig vooralsnog vast te houden aan de oorspronkelijke consensusafspraken. Dit betekent dat een laboratorium in ieder geval een ANCA-IIF-test zal uitvoeren en goede kennis moet hebben van de interpretatie van de resultaten. Indien een testmonster zowel positief is

**Tabel 2.** Klinische indicaties voor het aanvragen van ANCA serologie (naar referentie 13)

---

Glomerulonefritis, vooral indien snel progressief
Pulmonale (alveolaire) hemorragie, vooral het pulmonaair-renaal syndroom
Ernstige huidvasculitis
Multipole longnoduli
Chronische destructie van de bovenste luchtwegen
Lang bestaande sinusitis of otitis
Stenose van de trachea
Mononeuritis multiplex of andere perifere neuropathie
Retro-orbitazwelling
Astma en bloedeosinofiele, vooral bij afwezigheid van allergie

---

in de ANCA-IIF-test als in de ANA-IIF-test, dan zal altijd uittitratie van het monster in beide testen nodig zijn.

De klinische manifestaties van een zich ontwikkelende vasculitis kunnen zich heel geleidelijk presenteren, of kunnen een zeer acuut beloop hebben (16). Hierin verschillen patiënten met een MPO- of PR3-ANCA. Bij patiënten met MPO-ANCA ontwikkelt de ziekte zich veelal geleidelijk, terwijl bij patiënten met PR3-ANCA de ziekte zich veelal acuut aandient. Bij een dergelijke acute presentatie is snelle diagnostiek noodzakelijk, waarbij naast bijvoorbeeld microbiologisch onderzoek, differentiaaldiagnostisch onderzoek naar de verschillende vasculitiden (tabel 2) vereist is. Hieronder valt ook onderzoek naar de aanwezigheid van autoantistoffen tegen de glomerulaire basaalmembraan (anti-GBM). In die gevallen kan voor sneldiagnostiek gebruik worden gemaakt van geautomatiseerde systemen of van zogenaamde dot-blottesten, waarbij gelijktijdig onderzoek naar het voorkomen van PR3-ANCA, MPO-ANCA en anti-GBM mogelijk is. De snelheid en eenvoudige toepasbaarheid in acute situaties is een groot voordeel van dergelijke testen. De betrouwbaarheid van deze testen is op dit moment echter nog zodanig dat aanvullend onderzoek zoals boven besproken nodig blijft (17).

### Follow-up

Naast de betekenis als diagnostische test in het kader van een mogelijke AAV, speelt het bepalen van ANCA ook een rol bij het vervolgen van een patiënt. Meerdere studies hebben aangetoond dat de ANCA-spiegel, gemeten middels een kwantitatieve ELISA of na uittitratie in de ANCA-IIF-test, geassocieerd is met ziekteactiviteit, alhoewel er ook studies zijn waarin dat niet aangetoond kon worden (18). Die associatie is niet zodanig dat het kwantificeren van ANCA als directe maat voor ziekteactiviteit gehanteerd kan worden, maar is wel zodanig dat het positief blijven van een patiënt in de ANCA-serologie indicatief is voor het optreden van een mogelijke relapse van de ziekte. Daarmee heeft het positief blijven van de ANCA-serologie, eventueel in combinatie met een stijging van de ANCA-spiegel, een prognostische betekenis voor het mogelijk optreden van een recidief. Naast de ANCA-serologie geldt dat ook voor de andere twee factoren die een rol spelen in de pathofysiologie van AAV, te weten het chronisch dragerschap van *Staphylococcus aureus* (priming van neutrofielen en activatie van endotheel) en de expressie van het autoantigeen op het celoppervlak van de neutrofiel, een voorspellende betekenis hebben voor het optreden van exacerbaties. Voor het chronisch dragerschap van *Staphylococcus aureus* kon aangetoond worden dat dit geassocieerd is met een verhoogd risico op het optreden van relapses bij patiënten met de ziekte van Wegener (19). Behandeling van deze patiënten met bijvoorbeeld co-trimoxazol reduceerde het aantal exacerbaties met 60% (20). Ook de potentiële expressie van het betrokken autoantigeen (PR3 of MPO) speelt een rol bij het risico op het optreden van relapses bij patiënten met PR3-ANCA (21). Zoals boven beschreven brengen neutrofielen na priming PR3 tot

expressie op het celoppervlak. In deze expressie bestaan er verschillen tussen individuen, en binnen individuen kunnen er verschillen bestaan tussen populaties van neutrofielen. Om nog onverklaarde redenen kunnen neutrofielen na priming veel of juist weinig PR3 op het celoppervlak tot expressie brengen, hetgeen leidt tot twee duidelijk te onderscheiden populaties van neutrofielen. Individuen kunnen neutrofielen hebben van één van deze beide populaties (hoge expressie of lage expressie) of zelfs beide populaties tegelijk (zgn. bimodale expressie). Dit gegeven lijkt genetisch bepaald te zijn. Aangetoond kon worden dat de mate van PR3-expressie na priming van de neutrofiel voor patiënten met PR3-ANCA een risicofactor is voor het herhaald optreden van een exacerbatie, al is de klinische betekenis hiervan vooralsnog van beperkte betekenis.

### Therapeutisch perspectief

Patiënten met actieve ANCA-geassocieerde vasculitis worden gewoonlijk behandeld met een combinatie van corticosteroiden en cyclofosfamide. Deze behandeling induceert bij de meeste patiënten (tot 90%) remissie, maar gaat ook gepaard met aanzienlijke langetermijnmorbiditeit en soms zelfs mortaliteit. Minder toxische alternatieven, zoals het gebruik van methotrexaat, zijn soms mogelijk, maar hebben onvoldoende effectiviteit bij patiënten met uitgebreide ziekte en pulmonale betrokkenheid (22). Gezien de centrale rol die PR3-ANCA en MPO-ANCA spelen in het pathofysiologisch model voor ANCA-geassocieerde vasculitis, is therapie selectief gericht op de autoantistofproductie, of op de autoantistofproducerende cellen, een mogelijk alternatief. Recentelijk kon aangetoond worden dat bij patiënten met systemische auto-immuunziekten, zoals reumatoïde artritis, behandeling met een B-celdepletierend monoklonaal antistof (anti-CD20, Rituximab) leidde tot een aanzienlijke klinische verbetering (23). Inmiddels wordt deze behandeling ook onderzocht bij patiënten met ANCA-geassocieerde vasculitis en de eerste resultaten zijn bemoedigend (24). Het is daarbij nog onduidelijk of het effect van deze behandeling, primair gericht op de perifere B-cel populatie, maar niet direct op de feitelijke antistofproducerende plasmacellen, afhankelijk is van de invloed op de autoantistoffen, of van de rol die de autoreactieve B-cel kan spelen in de activatie van autoreactieve T-cellen (zie stap 1 in figuur 1). Nader onderzoek zal moeten leren welke plaats deze therapie heeft in de behandeling van ANCA-geassocieerde vasculitis en welk mechanisme aan de werking ten grondslag ligt.

### Literatuur

1. Davies DJ, Moran JE, Niall JF, Ryan GB. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982; 285: 606.
2. Woude FJ van der, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, Es LA van, Giessen M van der, Hem GK van der, The TH. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985; I: 425-429.



3. Geld YM van der, Limburg PC, Kallenberg CGM. Proteinase 3, Wegener's autoantigen: from gene to antigen. *J Leuk Biol* 2001; 69: 177-190.
4. Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* 2000; 7: 53-58.
5. Witko-Sarsat V, Cramer EM, Hieblot C, Guichard J, Nusbaum P, Lopez S, Lesavre P, Halbwachs-Mercalli L. Presence of proteinase 3 in secretory vesicles: evidence of a novel, highly mobilizable intracellular pool distinct from azurophil granules. *Blood* 1999; 94: 2487-2496.
6. Suzuki K, Hino M, Hato F, Tatsumi N, Kitagawa S. Cytokine-specific activation of distinct mitogen-activated protein kinase subtype cascades in human neutrophils stimulated by granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha. *Blood* 1999; 93: 341-349.
7. Kettritz R, Schreiber A, Luft FC, Haller H. Role of mitogen-activated protein kinases in activation of human neutrophils by antineutrophil cytoplasmic antibodies. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 36-47.
8. Roozendaal C, Horst G, Pogany K, Milligen van Wit de AW, Kleibeuker JH, Haagsma EB, Limburg PC, Kallenberg CG. Prevalence and clinical significance of anti-lactoferrin autoantibodies in inflammatory bowel diseases and primary sclerosing cholangitis. *Adv Exp Med Biol* 1998; 443: 313-319.
9. Geld YM van der, Tool AJ, Videler J, de Haas M, Cohen Tervaert JW, Stegeman CA, Limburg PC, Kallenberg CGM, Roos D. Interference of PR3-ANCA with the enzymatic activity of PR3: differences in patients during active disease or remission of Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol* 2002; 129: 562-570.
10. Huugen D, Tervaert JW, Heeringa P. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and pathophysiology: new insights from animal models. *Curr Opin Rheumatol*. 2004; 16: 4-8.
11. Muller Kobold AC, van der Geld YM, Limburg PC, Cohen Tervaert JW, Kallenberg CGM. Pathophysiology of ANCA associated glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1366-1375.
12. Savige JA, Paspaliaris B, Silvestrini R, Davies D, Nikoloutsopoulos T, Sturgess A, Neil J, Pollock W, Dunster K, Hendle M. A review of immunofluorescent patterns associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and their differentiation from other antibodies. *J Clin Pathol* 1998; 51: 568-575.
13. Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, et al, Esnault V, Falk RJ, Hagen EC, Jayne D, Jennette JC, Paspaliaris B, Pollock W, Pusey C, Savage CO, Silvestrini R, van der Woude F, Wieslander J, Wiik A.. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *A. J Clin Pathol* 1999; 111: 507-513.
14. Savige J, Dimech W, Fritzler M, Goeken J, et al 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. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 312-318.
15. Schmitt WH, van der Woude FJ. Clinical applications of antineutrophil cytoplasmic antibody testing. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 16: 9-17.
16. Franssen CFM, Gans ROB, Arends B, Hageluku C, ter Wee PM, Gerlag PGG, Hoorntje SJ. Differences between anti-myeloperoxidase and anti-proteinase 3 associated renal disease. *Kidney Int* 1995; 47: 193-199.
17. Rutgers A, Damoiseaux J, Roozendaal C, Limburg PC, Stegeman CA, Cohen Tervaert JW. ANCA-GBM dot-blot: evaluation of an assay in the differential diagnosis of patients presenting with rapidly progressive glomerulonephritis. *J Clin Immunol* 2004; 24: 435-440.
18. Kallenberg CGM, Stegeman CA, Bootsma H, Bijl M, Limburg PC. Quantitation of autoantibodies in systemic autoimmune diseases: clinically useful? *Lupus* 2006; 15: 1-6.
19. Stegeman CA, Cohen Tervaert JW, Sluiter WJ, Manson WL, Jong PE de, Kallenberg CGM. Association of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse in Wegener's granulomatosis. *Ann Intern Med* 1994; 120: 12-17.
20. Stegeman CA, Cohen Tervaert JW, Jong PE de, Kallenberg CGM. Trimethoprim-sulfamethoxazole (co-trimoxazole) for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis. Dutch co-trimoxazole study group. *N Engl J Med* 1996; 335: 16-20.
21. Rarok AA, Stegeman CA, Limburg PC, Kallenberg CGM. Neutrophil membrane expression of proteinase 3 (PR3) is related to relapse in PR3-ANCA-associated vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2232-2238.
22. Groot K de, Rasmussen N, Bacon PA, Cohen Tervaert, Feighery C, Gregorini G, Gross WL, Luqmani R, Jayne DR et al, for the European Vasculitis Study Group. Randomized trial of cyclophosphamide versus methotrexate for induction of remission in early systemic antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthr Rheum* 2005; 52: 2461-2469.
23. Edwards JC, Zzepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RW, Shaw T. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004; 350: 2572-2581.
24. Stasi R, Stipa E, Del Poeta G, Amadori S, Newland AC, Provan D. Long-term observation of patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis treated with rituximab. *Rheumatol* 2006; in press.

---

## Summary

*ANCA and vasculitis, a complex relationship. Limburg PC, Kallenberg CGM. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006; 31: 289-295.*

The discovery of autoantibodies to cytoplasmic constituents of neutrophils (ANCA) in blood of patients with small-vessel vasculitis has contributed considerably to the diagnosis of these diseases as well as to the knowledge of its pathophysiology. The vasculitis is an indirect result of the interaction between activated neutrophils adherent to the endothelium, for instance during infection, and autoantibodies to these neutrophils. The most important ANCA antigens are proteinase 3 (PR3) and myeloperoxidase (MPO). Autoantibodies to these proteins are more or less specifically associated with the different forms of small-vessel vasculitis. Serological detection of these autoantibodies should ideally be performed by a combination of an indirect immunofluorescence test on human neutrophils and an antigen specific test, such as an ELISA or an immunoblot test, according to international consensus statements.

*Keywords: ANCA; anti neutrophil cytoplasmic antibodies; anti-PR3; anti-proteinase3; anti-MPO; anti-myeloperoxidase; anti-GBM; glomerular basal membrane; perinuclear; vasculitis, Wegener's disease, Polyangitis, Churg-Strauss syndrome*