

Casuïstiek

Een patiënt met spierzwakte: onjuiste interpretatie van een laboratoriumuitslag bevestigt de juiste diagnose

J. M. M. RONDEEL¹, H. van der LEEDEN², W. van GELDER¹, R. B. DINKELAAR¹

Een 48-jarige patiënt wordt opgenomen met ernstige progressieve spierzwakte waarvoor kunstmatige ademhaling nodig is. Als onderdeel van uitgebreid laboratoriumonderzoek worden auto-antistoffen tegen nucleaire antigenen (ANA) en extraheerbare nucleaire antigenen (ENA) aangevraagd. Indirecte immunofluorescentie van HEp-2 cellen na incubatie met serum van de patiënt laat een gespikkeld patroon zien. Bij Ouchterlony immunodiffusie wordt een precipitatielijns gezien met volledig identiteitsverband met anti-Jo-1 bevattend controleserum. Deze bevinding, de verhoogde spierenzymen (CK > 25000 U/l) een huidbiopt en elektromyografisch onderzoek bevestigen de diagnose dermatomyositis (DM). Onderzoek van het serum met een recombinant ELISA-techniek, waarin o.a. een recombinant Jo-1 antigeen voorkomt, is echter negatief. Onderzoek met specifieke ELISA's laat zien dat het serum geen anti-Jo-1 bevat maar anti-Mi2, eveneens een marker voor DM.

Wij concluderen dat het controleserum bij immunodiffusie naast anti-Jo-1 activiteit ook overige antilichaamactiviteit bevatte en dus niet mono-specifiek was. De precipitatielijns werd daarom ten onrechte geïnterpreteerd als passend bij anti-Jo-1 auto-antistoffen. Dit "vals-positieve" resultaat paste wel bij de juiste diagnose die bij gebruik van een routine ELISA gemist zou zijn. Bij de interpretatie van het ANA/ENA onderzoek met verschillende technieken moet men hierop bedacht zijn.

Trefwoorden: auto-immuniteit; ANA; ENA; ELISA; immunofluorescentie; immunodiffusie; dermatomyositis; polymyositis

Het laboratorium kan een belangrijke rol spelen in de diagnostiek van autoimmuunziekten (1). Hiertoe worden verschillende technieken en strategieën gebruikt. Auto-antistoffen tegen nucleaire antigenen (ANA) worden meestal onderzocht d.m.v. indirecte immunofluorescentie op HEp-2 cellen, een humane epitheliale cellijn die kernantigenen sterk tot expressie

brengt (2). Bij een positief resultaat wordt o.a. onderzoek verricht naar auto-antistoffen tegen specifieke extraheerbare nucleaire antigenen (ENA) d.m.v. Ouchterlony immunodiffusie. Beide technieken worden steeds meer verdrongen door ELISA technieken die kwantificeerbaar en minder arbeidsintensief zijn en gemakkelijker te interpreteren (3).

Het identificeren van een specifieke auto-antistof d.m.v. ELISA berust echter op een ander principe. Dit kan in de praktijk aanleiding geven tot verschillende interpretaties en de diagnostiek bemoeilijken. Aan de hand van een casus wordt dit verder toegelicht.

Casus

Een 48-jarige man werd medio 1996 opgenomen i.v.m. ernstige progressieve spierzwakte. De patiënt was reeds langer bekend met tintelingen in vingers en tenen en pijnlijke knie- en ellebooggewrichten. Daarbij waren ook de proximale spieren van armen en benen pijnlijk met ter plaatse roodheid van de huid met jeuk.

Bij opname viel op dat de man zich moeilijk bewoog en erythemateuze huidinduraties had op de armen, benen, buik en rug. Er was een oedemateuze zwelling onder de ogen. De proximale gewrichten (schouders, heupen) waren pijnlijk en de patiënt kon onmogelijk vanuit liggende houding overeind komen. Tijdens opname kreeg patiënt moeite met slikken en ophoesten zodat verpleging op de ICU noodzakelijk was. Door de progressieve spierzwakte kon patiënt nog slechts hoofd, handen en voeten iets bewegen. Er ontstond een ademhalingsstilstand en de patiënt moest beademd worden via een tracheostoma. Bij uitgebreid laboratoriumonderzoek vielen o.a. de sterk verhoogde gehalten op van de spierenzymen in serum: tijdens opname steeg het CK gehalte tot 27000 U/l, het ASAT tot 800 U/l en het LDH tot 2760 U/l. Een huidbiopt vertoonde afwijkingen met enkele kenmerken van MCTD (mixed connective tissue disease). Dermatologisch en neurologisch (elektromyografisch) onderzoek bevestigden de klinische diagnose dermatomyositis. De patiënt werd behandeld met prednison en immuunsuppressiva. Hierdoor ontstond echter een trombo- en leukopenie met secundair een herpes simplex type II en cytomegalie virus infectie. Er ontstond een geleidelijke daling van de spierenzymen (voor een deel toe te schrijven aan de verminderde spiermassa). Een jaar na begin van opname is de patiënt nog steeds ernstig beperkt in zijn functioneren.

Afdeling Klinische Chemie¹ en afdeling Reumatologie², Drechtsteden Ziekenhuis Dordrecht

Correspondentie: Dr J. M. M. Rondeel, arts-assistent klinische chemie, Afdeling Klinische Chemie, Drechtsteden Ziekenhuis, Postbus 444, 3300 AK Dordrecht.
Ingekomen: 25.08.97

Materiaal en Methoden

Serum van de patiënt werd tijdens opname onderzocht op auto-antistoffen tegen kernantigenen. Ons laboratorium gebruikt daarvoor de volgende testen. Onderzoek op ANA's wordt verricht door serum van de patiënt in een verdunning van 1:40 te incuberen met HEP-2 cellen (Immunoconcepts, distributeur: BioMedical Diagnostics, Brugge, België) waarna anti-IgG gelabeld met fluoresceïne wordt toegevoegd. Zowel de intensiteit als het patroon van fluorescentie wordt vervolgens beoordeeld. De intensiteit wordt vergeleken met een negatieve (intensiteit 0) en een positieve controle (intensiteit 3+) die door de fabrikant geleverd worden. Men onderscheidt de volgende nucleaire fluorescentiepatronen: gespikkeld, homogeen, nucleolair en anti-centromeer. Daarnaast kan men een veelvoud aan cytoplasmatische patronen onderscheiden, waarvan vnl. de anti-mitochondriale fluorescentie van belang is. Een homogeen kernbeeld kan passen bij antistoffen tegen dubbelstrengs-DNA (anti-dsDNA). Dit wordt bevestigd door serum te incuberen met de flagellaat *Crithidia lucilliae*. Bij aanwezigheid van anti-dsDNA zal diens kinetoplast een positieve fluorescentie opleveren. De titer van de anti-dsDNA-antistoffen kan vervolgens kwantitatief bepaald worden in een ELISA of Farr assay.

Tegelijkertijd met het ANA-onderzoek wordt onderzoek verricht naar het voorkomen van specifieke auto-antistoffen tegen ENA's d.m.v. Ouchterlony immunodiffusie (Biolab; distributeur: Gull, Limal, België). In eerste instantie wordt het patiëntenserum gescreend met een milt-thymusextract waarin alle ENA's voorkomen. Bij aanwezigheid van een precipitatielijns wordt vervolgens verder getypeerd door het serum van de patiënt te vergelijken met controlesera met bekende antilichaam activiteit tegen SS-A, SS-B, Scl-70, Sm, RNP, PCNA of Jo-1. De controlesera worden door de fabrikant geleverd.

Als onderdeel van een vergelijkingsstudie werd het bovenstaande patiëntenserum ook onderzocht met een ELISA (4). Deze screen ELISA bevat de volgende recombinant antigenen in natuurlijke conformatie (Varelixa, Elias; distributeur: Immuno Quality Products, Groningen): SS-A, SS-B, Sm, RNP, Sm-RNP, Scl-70, Jo-1, PM-Scl, dsDNA, histonen, CENP-B. Hiertoe wordt serum (titer 1:100) in een 96 wells microtiterplaat geïncubeerd, waarna geconjugeerd anti-IgG wordt toegevoegd en een substraat. De absorptie wordt vervolgens bij 450 nm afgelezen en vergeleken met die van een kalibrator. Indien de absorptie van het patiëntenserum een factor 1,4 of meer bedraagt van die van de kalibrator wordt het resultaat als positief geïnterpreteerd. De specificiteit van het serum wordt vervolgens in een profiel ELISA onderzocht (4).

Resultaten

Het serum van onze patiënt werd volgens de in "materiaal en methoden" beschreven technieken onderzocht. Bij het ANA-onderzoek werd een 3+ gespikkeld patroon gezien. Screening op ENA's was positief en er was een precipitatielijns met milt-thymusextract met volledig identiteitsverband met controleserum

dat anti-Jo-1 bevatte. Een tweede precipitatielijns tussen het milt-thymusextract en het anti-Jo-1 controleserum werd niet opgemerkt. De screen ELISA was negatief (absorptie 0.3 x absorptie kalibrator), evenals de profiel ELISA met Jo-1. Het serum werd daarom verder onderzocht door een referentielaboratorium (Dr. G. Hulin, Wavre, België). Deze bevestigden de positieve ANA (titer 1:1280) maar concludeerden met verschillende specifieke ELISA's dat het serum geen anti-Jo-1 bevatte, maar anti-Mi2, een marker voor polymyositis.

Discussie

Polymyositis is een zeldzame autoimmuunziekte die meestal tussen het 40e en 60e levensjaar begint (5). Er bestaat ook een juveniele vorm die in de puberteit ontstaat. Spierzwakte vormt de belangrijkste klacht en is vaak gelokaliseerd in de schouder- en bekken-gordel. Distale of bulbair spieren zijn zelden aange-tast en ondanks de uitgebreide spierontstekingen klaagt slechts 50% van de patiënten over spierpijn. Vaak zijn er pijnlijke gewrichten, soms een manifeste artritis. Wanneer de spierzwakte gepaard gaat met huidafwijkingen is er sprake van dermatomyositis: paars doorschijnende (heliotrope) verkleuringen in het gelaat en rode plekken op de strekzijde van ellebogen en knieën zijn hiervoor karakteristiek. Aandoeningen van de inwendige organen zijn zeldzaam. De diagnose berust op criteria die in 1975 opgesteld zijn (6). Van belang hiervoor zijn het klinisch beeld (progressieve symmetrische spierzwakte), elektro-myografisch onderzoek, histologisch onderzoek van een spierbiopt en afwijkende spierenzymen in serum. Vooral het CK gehalte is een gevoelige parameter. Men zij er echter op bedacht dat op de lange termijn spieratrofie kan ontstaan waardoor het CK gehalte daalt. In 10-15% van de gevallen gaat de ziekte gepaard met een maligniteit. Overlapsyndromen met andere autoimmuun-aandoeningen komen voor in 10% van de gevallen. Men onderscheidt aldus 5 typen: een zuivere polymyositis, een zuivere dermatomyositis, een poly- of dermatomyositis bij een maligniteit, een juveniele vorm en een overlapsyndroom. De ziekte wordt behandeld met prednison, evt. gecombineerd met immuunsuppressiva. De prognose wordt mede bepaald door de aanwezigheid van een evt. maligniteit, overige autoimmuunaandoening en aandoeningen van hart of longen.

Verscheidene auto-antistoffen zijn beschreven bij dit syndroom: zowel antistoffen tegen Jo-1 (histidyl-t-RNA synthetase) als tegen Mi-2 (een kernantigeen van 50-58 Kd) komen voor (7, 8). Overige auto-antistoffen kunnen voorkomen indien sprake is van een overlapsyndroom. Hoewel detectie van auto-antistoffen niet strikt noodzakelijk is voor het stellen van de diagnose (6), kan dit wel behulpzaam zijn bij het formuleren van een differentiaal diagnose.

Het laboratorium heeft verscheidene technieken tot zijn beschikking om serum te onderzoeken op auto-antistoffen. De klassieke immunologische technieken als Ouchterlony immunodiffusie en immuunfluorescentie zijn arbeidsintensief, vergen veel ervaring en zijn soms moeilijk te interpreteren. ELISA's daaren-

tegen zijn gebruiksvriendelijk, gemakkelijk te interpreteren en kwantificeerbaar. Veelal wordt gepretendeerd dat ELISA's gevoeliger zouden zijn alhoewel gedegen onderzoek op dit gebied ontbreekt. Van grote essentie bij de verscheidene technieken is de conformatie van het gebruikte antigeen. Bij fluorescentieonderzoek met cellen of weefsels komen kernantigenen op natuurlijke wijze (d.w.z. in natuurlijke conformatie) tot expressie hoewel fixatie technieken hierop van invloed kunnen zijn (9). ELISA's maken vaak gebruik van gezuiverde antigenen met afwijkende conformatie zodat bindingskarakteristieken sterk kunnen afwijken. ELISA's gebaseerd op recombinant DNA technologie zouden dit probleem echter niet hebben (3).

De detectie van auto-antistoffen bij Ouchterlony immunodiffusie berust op een geheel ander principe. Hierbij wordt serum van de patiënt vergeleken met controlesera met bekende activiteit. Deze sera zijn afkomstig van patiënten met bekende auto-immuun aandoeningen en zijn volgens opgave van de fabrikant mono-specifiek. Het anti-Jo-1 controle serum is volgens de fabrikant afkomstig van een patiënt met polymyositis en bevat blijkbaar naast anti-Jo-1 ook anti-Mi2 activiteit. Dit antigeen komt niet voor in de recombinant ELISA en werd daarom gemist. De uitslag van het immunodiffusie onderzoek paste bij de aanwezigheid van anti-Jo-1 antistoffen. Op theoretische gronden had bij aanwezigheid van 2 antistoffen (anti-Jo-1 en anti-Mi-2) in het controleserum een dubbele precipitatielijijn moeten worden gezien. In de praktijk kan het echter lastig zijn om deze te onderscheiden: de lijnen kunnen zeer dicht bijeen liggen of ogenschijnlijk in elkaar doorlopen, terwijl dit feitelijk niet het geval is.

In ieder geval werd met de immunodiffusietechniek een positief resultaat gevonden, passend bij de diagnose dermatomyositis hetgeen bij gebruik van de ELISA niet zou zijn gevonden.

Wij concluderen dat controlesera bij Ouchterlony immunodiffusie blijkbaar niet altijd mono-specifiek zijn. Dit kan leiden tot een verkeerde interpretatie van een laboratorium uitslag. Dat dit niet altijd tot een verkeerde diagnose hoeft te leiden, bewijst deze casus.

Literatuur

1. Osterland CK. Laboratory diagnosis and monitoring in chronic systemic autoimmune diseases. *Clin Chem* 1994; 40: 2146-2154.

2. Slater CA, Davis RB, Shmerling RH. Antinuclear antibody testing. A study of clinical utility. *Arch Intern Med* 1996; 156: 1421-1425
3. Stahnke G, Höpfl P, Haubruck H, Cook NJ, Liedvogel B. Anti-RNP in vitro diagnosis by means of recombinantly expressed U1-68-, U1-A- and U1-C proteins. XIIIth European Congress of Rheumatology, June, 1995, Amsterdam.
4. Rondeel JMM, Gelder W van, Leeden H van der, Dinkelaar RB. Laboratoriumdiagnostiek van auto-immuun ziekten (AIZ): immunofluorescentie (IF) of ELISA? *Ned Tijdschr Klin Chem* 1997; 22: 117.
5. In: Bijlsma JWJ, Breedveld FC, Dequeker J, Linden S van der, Putte LBA van de, Rijswijk MH van, Veys EM. *Leerboek reumatologie*. Bohn, Stafleu, Van Loghum 1992; 139-142.
6. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis. *N Engl J Med* 1975; 292: 344-347.
7. Mimori T. Structures targeted by the immune system in myositis. *Current opinion in rheumatology* 1996; 8: 521-527.
8. Vazquez-Abad D, Rothfield NF. Sensitivity and specificity of anti-Jo-1 antibodies in autoimmune diseases with myositis. *Arthritis and Rheumatism* 1996; 39: 292-296.
9. Savage JA, Davies DJ, Gatenby PA. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): their detection and significance: report from workshops. *Pathology* 1994; 26: 186-193.

Summary

A patient with muscle weakness. False interpretation of laboratory result leading to the correct diagnosis. Rondeel JMM, Leeden H van der, Gelder W van, Dinkelaar RB. Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 34-36.

A 48 year old patient was admitted to the hospital with severe progressive muscle weakness for which artificial respiration was necessary. As part of extensive laboratory investigation auto-antibodies to nuclear antigens (ANA) and extractable nuclear antigens (ENA) were requested. Indirect immunofluorescence of Hep-2 cells after incubation with the patient's serum (ANA) showed a speckled pattern. Ouchterlony immunodiffusion (ENA) showed a precipitation line with full identity with control serum containing anti-Jo-1. This result, together with increased muscle enzymes (CK > 25000 U/L) and the results of a skin biopsy and electromyography confirmed the diagnosis dermatomyositis (DM). However, a recombinant ELISA could not confirm the presence of anti-Jo-1. Specific ELISAs showed that the patient's serum did not contain anti-Jo-1, but anti-Mi2, another marker for DM.

We conclude that the control serum used in the immunodiffusion technique contained antibody activities other than anti-Jo-1 and, thus, was not monospecific. The precipitation line was therefore, falsely identified as the result of anti-Jo-1. This "false-positive" result, however, confirmed the correct diagnosis and would have been missed when ELISA had been used. One should be aware of this pitfall when interpreting ANA/ENA results by different techniques.

Key-words: ANA; ENA; immunodiffusion; immunofluorescence; ELISA; auto-immunity; dermatomyositis; polymyositis