

Erasmus MC

Universitair Medisch Centrum Rotterdam



**Nabespreking SKML rondzending
Collageen
4 april 2012**

Diana Dufour - van den Goorbergh
Afdeling Immunologie
Erasmus MC te Rotterdam



Rondzending collageen

Rondzendingen: 2010.2 - 2011.1 - 2011.2

Frequentie: versturen 1x per jaar
uitvoeren 2x per jaar

Materiaal: afkomstig van patiënten
gevriesdroogd

Antistoffen: anti-nucleaire antistoffen (ANA)
dsDNA
ENA

ANA bepaling

Systemische Lupus Erythematosus (SLE)

American College of Rheumatology (ACR) 1982

- Criteria
- 1 Vlindervormig erytheem
 - 2 Discoïde rash
 - 3 Fotosensitiviteit
 - 4 Orale ulcers
 - 5 Arthritis
 - 6 Serositis (pleuritis of pericarditis)
 - 7 Nieraandoening
 - 8 Neurologische aandoening (beroerte of psychose)
 - 9 Hematologische aandoening (leuko- of lymfocyto- of trombocytopenie)
 - 10 Immunologische aandoening
 - Positief voor antistoffen tegen dsDNA of Sm of antifosfolipiden
 - 11 ANA

ANA positiviteit (%)

Autoimmuunziekte

SLE	>99
RA	25
sclerodermie	30
polymyositis/dermatomyositis	20
mixed connective tissue disease' (MCTD)	100
primair syndroom van Sjögren	40-75

Geneesmiddel geïnduceerde LE 100

Maligniteiten 20

Infectieziekten 5-30

Oudere personen 10-35

Gezonden <5

ANA bepaling

In gezonde controle groep ANA positief < 5%

Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors.

Fernandez SA et al. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo 2003; 58: 315–9

Pattern on the antinuclear antibody–HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody–positive healthy individuals and patients with Autoimmune Rheumatic Diseases.

Mariz HA et al. Arthritis Rheum 2011; 63: No. 1: 191–200

ANA bepaling



Indirecte Immunofluorescentie gouden standaard

ANA screening: an old test with new recommendations

Pier Luigi Meroni, Peter H Schur

Ann Rheum Dis 2010;**69**:1420–1422. doi:10.1136/ard.2009.127100

Laboratoriumdiagnostiek van ANA, anti-ds-DNA- en anti-ENA-antistoffen:
aanbevelingen naar aanleiding van een enquête

J. Damoiseaux, L. Bakker-Jonges, J.W. CohenTervaert, R. Derksen, H. Hooijkaas, C. Kallenberg, I. Klasen,
P. Limburg, R. Smeenk en D. Hamann

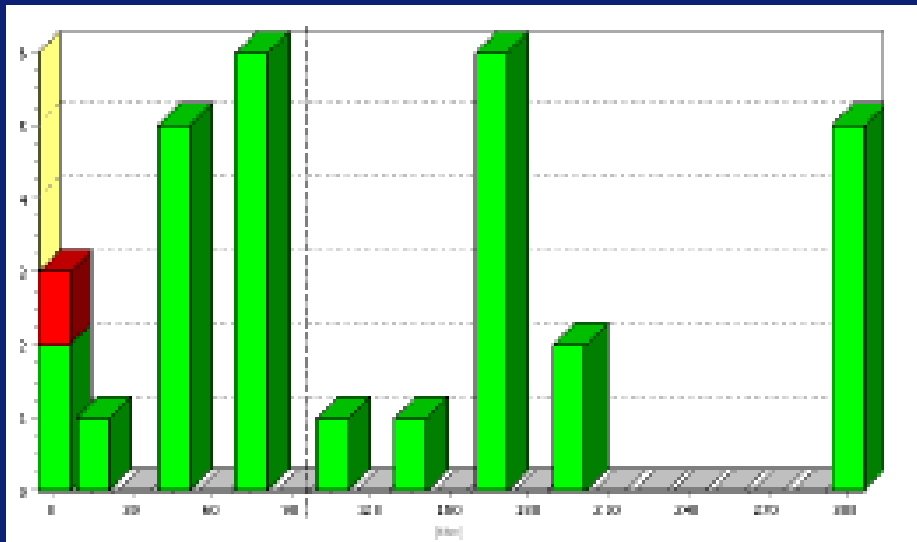
Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2010; 35: 234-239

ANA bepaling

testsysteem		2010.2	2011.1	2011.2
IIF	BMD	22	23	23
	ImmunoConcepts	13	13	13
	EuroImmuno	4	4	4
	Home-made	2	2	1
	Agnos	1	1	1
	Diasorin	1	1	1
	INOVA	1	1	1
ELISA	BioRad	1	1	1
	DiaMedix	-	1	1
Luminoscentie	BMD	1	1	-
	Phadia	1	1	1
Overig	Agnos	1	1	-
	BMD	1	1	1
	ImmunoConcepts	-	-	1
	Phadia	-	1	1
Totaal		49	52	50

Opvallende resultaten ANA

Grote spreiding kwantitatieve resultaten



Bekend gegeven, zo ook bij andere rondzendingen

- screeningsverdunning als resultaat wanneer er niet getitreerd wordt
- titer met resultaat $>$ wordt weergegeven eindresultaat
- gebruik van testsystemen welke manueel beoordeeld worden
- standaardisatie titraties moeilijk

ANA HEp-celijn substraten

Percentage ANA positieve resultaten

Periode	Positieve resultaten (%)
2007	28
2008	27
2009	28
2010 tot oktober	31
2010 vanaf oktober	40
2011 tot augustus	42
2011 vanaf half oktober	26

Bloedbankdonoren op 9 substraten getest (*eis max.5-10% positief*)

Resultaat: 2 substraten < 10% positieve resultaten

Opvallende resultaten ANA / ENA

Anti-centromeren

Aantal testsystemen	2010.2	2011.1	2011.2
1	57	58	56
2	6	5	5
≥3	2	2	2
Totaal	65	65	63

Opvallende resultaten ANA / ENA

Anti-centromeren aan de hand van 1 testsysteem

		2010.2	2011.1	2011.2
FEIA	ImmunoCAP/ELiA	39	39	39
Immunoblot	BMD	2	2	2
	Euroimmun	6	6	6
	Innogenetics	2	2	1
	Orgentec Diagnostics	1	1	1
	IIF	BMD	2	3
	ImmunoConcepts	1	1	-
ELISA	Biorad	1	1	1
	Orgentec Diagnostics	1	1	1
	Phadia	1	1	1
Overig	BMD	1	1	1
Totaal		57	58	56

Opvallende resultaten ANA / ENA

2011.2 monster D; anti-CenpB positief

<u>ANA typering</u>		
	Uw uitslag	Alle uitslagen
Sterkste patroon	Centromeren	38 X Nucleolair 4 X Centromeren 3 X Gespikkeld 1 X Nuclear dots
Aantal ANA patronen	2	23 X 2 21 X 1 1 X 3

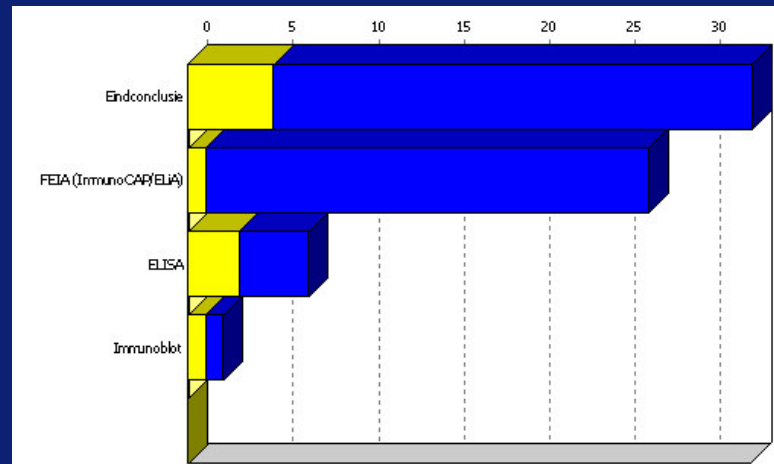
Aantal patronen	1
Nucleolair	19
Centromeren	1
Gespikkeld	1

Anti-centromeren op HEp-cel lijn

- bij sterke patronen kan deze gemist worden → titreren
- niet alleen anti-CenpB → bevestigen mbv ander testsysteem

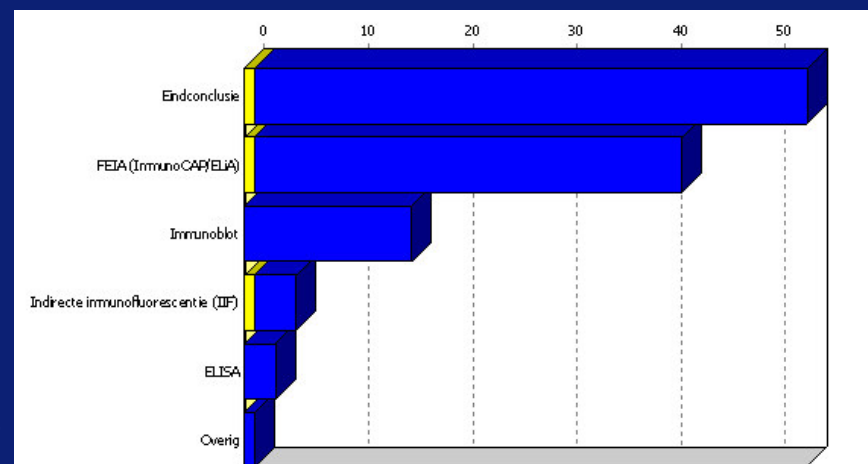
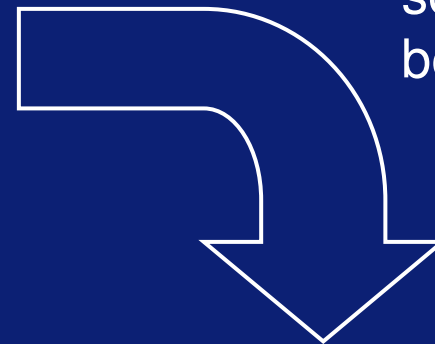
Opvallende resultaten ANA / ENA

Anti-CenpB (2010.2 A)



ENA screen

Niet alle ENA screeningstesten bevatten anti-CenpB



Anti-CenpB

Opvallende resultaten ENA

ENA typering aan de hand van 1 testsysteem

Antigeen	2010.2 (%)	2011.1 (%)	2011.2 (%)
SS-A/Ro (52 + 60kD)	60	59	58
SS-A/Ro (60 kD)	4	4	4
SS-A/Ro (52 kD)	1	1	1
SS-B	87	88	87
Sm	87	88	87
RNP	81	81	76
Jo-1	87	88	86
Topoisomerase I (Scl-70)	87	88	86
Ribosomaal P proteïn (rRNP)	91	94	93

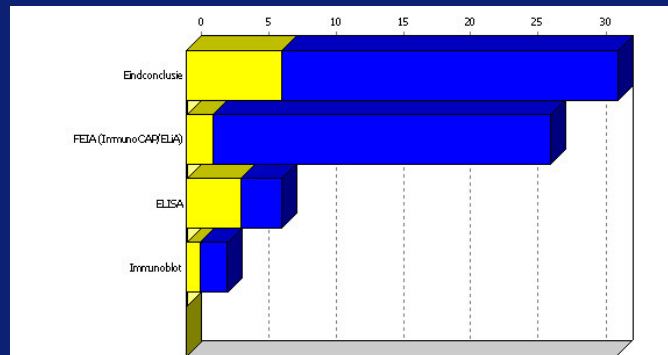
Opvallende resultaten ENA

SS-A/Ro (52+60kD)	SS-A/Ro (52kD)	SS-A/Ro (60kD)	2010.2	2011.1	2011.2
X	X	X	10	10	10
	X	X	11	11	10
X	X		1	2	3
X		X	1	1	1
X			41	40	39
	X		1	1	1
		X	3	3	3
Totaal			68	68	67

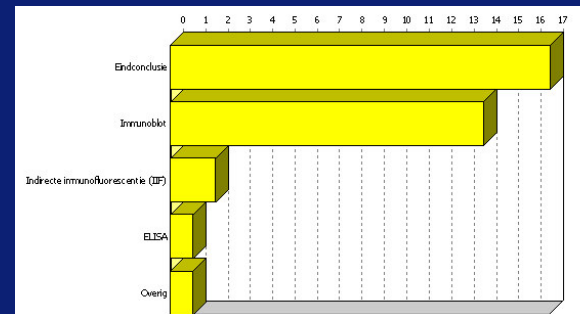
IIF kan SS-A/Ro 60kD missen

Opvallende resultaten ENA

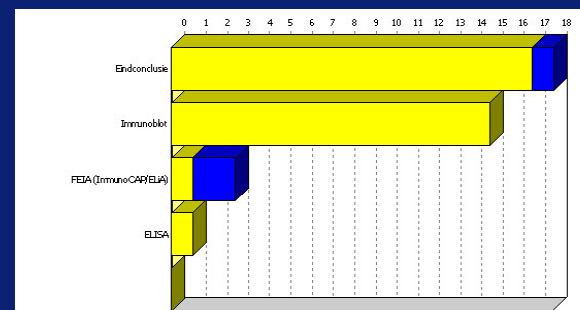
Anti-SS-A/Ro 52kD en/of 60kD (2010.2 D)



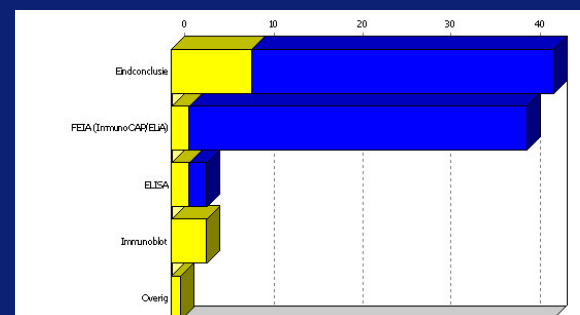
ENA screen



SS-A/Ro 52kD



SS-A/Ro 60kD

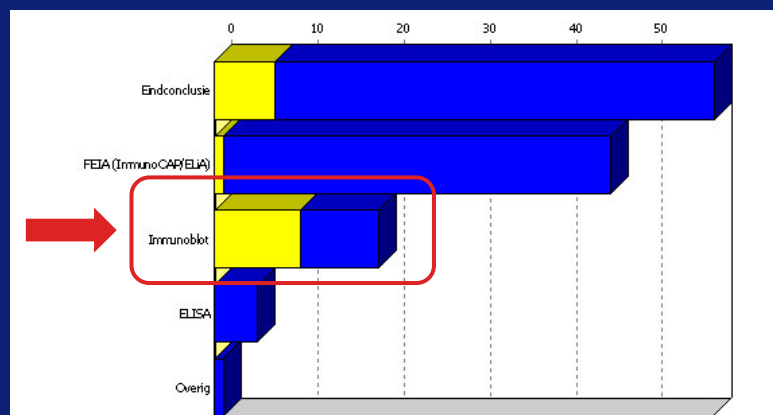


SS-A/Ro 52+60kD

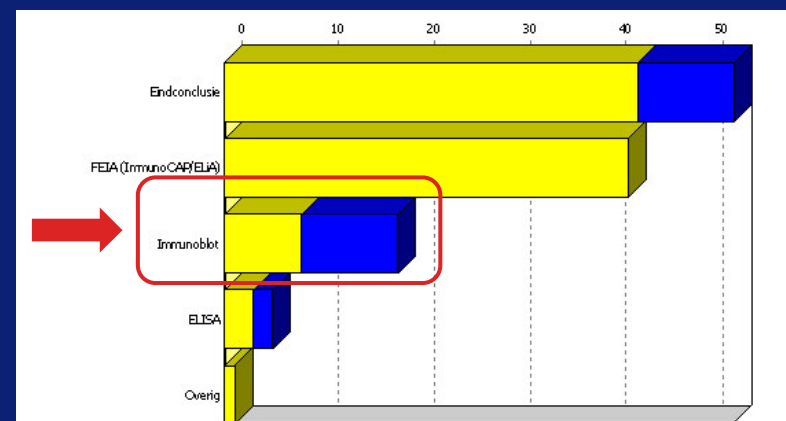
Overige aantoonbare antistoffen:
histon en nucleosomen

Opvallende resultaten ENA

Anti-SS-B/La 2011.2 E en 2011.2 F



2011.2 E

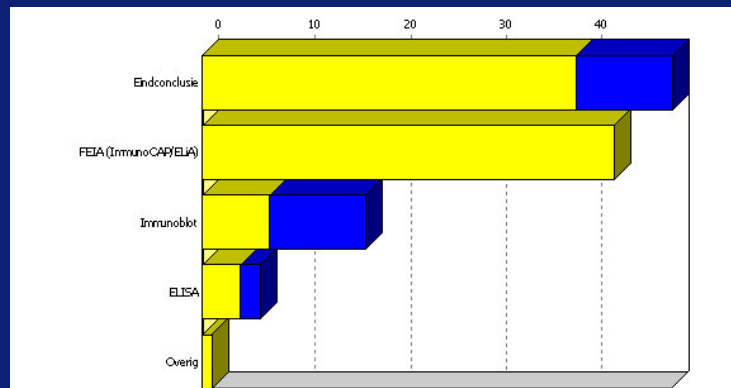


2011.2 F

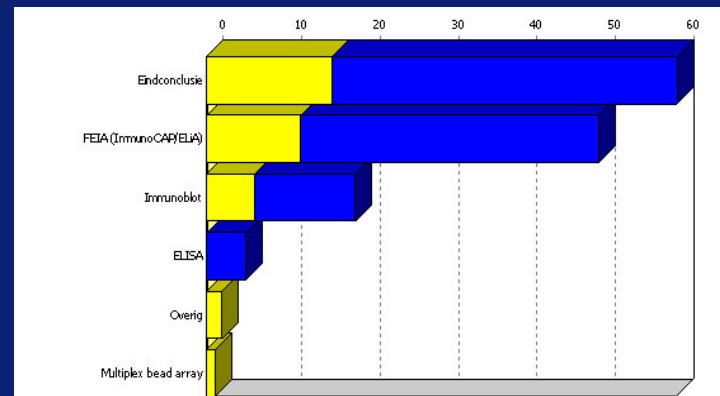
Blot	SS-B/La antigeen
BMD	?
Eurolmmun	gezuiverd
Innogenetics	recombinant
Orgentec Diagnostics	gezuiverd

Opvallende resultaten ENA

Anti-RNP

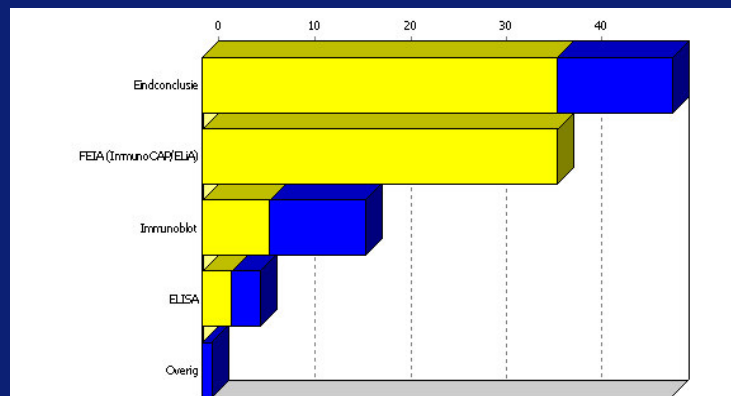


2011.2 A



2011.1 E

Anti-Sm



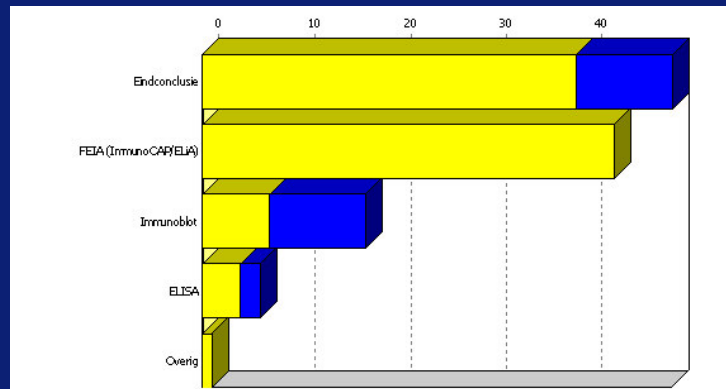
2011.2 A

Opvallende resultaten ENA

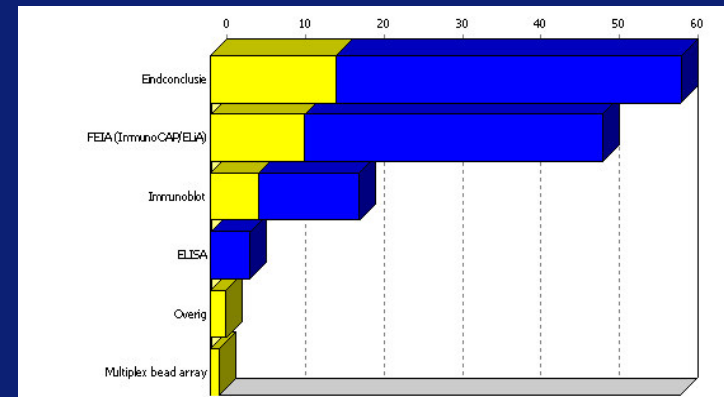
Methode	Firma	RNP antigeen	Sm antigeen
ELISA	Biorad	gezuiverd RNP/Sm complex	gezuiverd Sm
	Immunoconcepts	gezuiverd RNP	gezuiverd Sm
	INOVA	gezuiverd RNP/Sm complex	gezuiverd Sm
	Orgentec diagnostics	recombinant RNP70	gezuiverd Sm
	Pharmacia & Upjohn	gezuiverd RNP/Sm complex recombinant RNP70 (U1 snRNP 70 kD) recombinant U1RNP (U1 snRNP 70 kD, A, C) gezuiverd RNP/Sm complex	synthetisch SmD
FEIA	ImmunoCAP/ELiA	recombinant RNP70 (U1 snRNP 70 kD) recombinant U1RNP (U1 snRNP 70 kD, A, C)	gezuiverd Sm
Immunoblot	BMD	?	?
	Euroimmun	nRNP/Sm complex	gezuiverd Sm
	Innogenetics	recombinant RNP-70k, RNP-A en RNP-C	recombinant SmB en synthetisch SmD
	Orgentec diagnostics	gezuiverd RNP/Sm complex	gezuiverd Sm
Multiplex bead array	BMD	gezuiverd RNP/Sm complex	gezuiverd Sm

Opvallende resultaten ENA

Anti-RNP

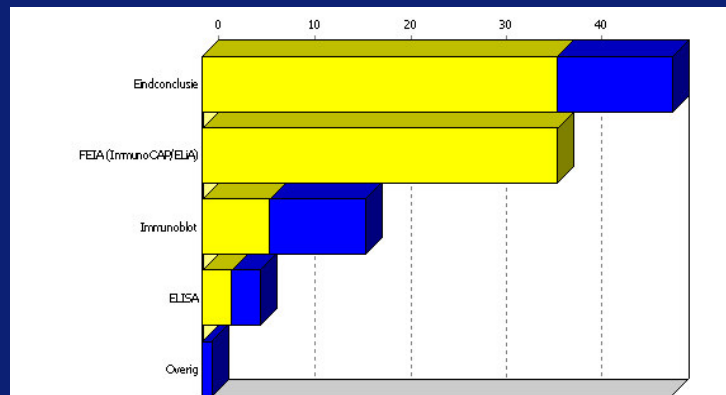


2011.2 A



2011.1 E

Anti-Sm



2011.2 A

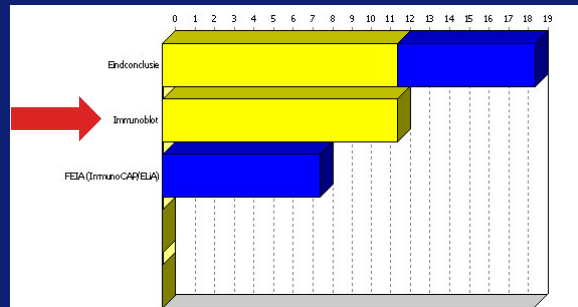
2011.2 A RNP negatief
Immunoblot neg of dubieus
ELISA RNP/Sm lager dan Sm

Sm bevat D band

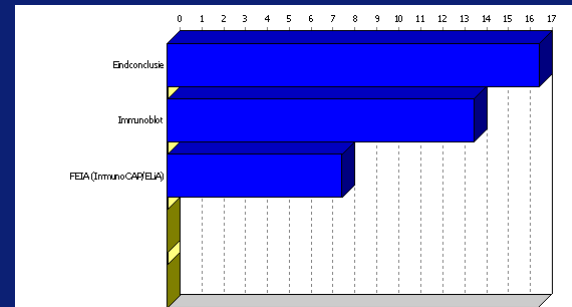
2011.1 E RNP-A en RNP-C

Opvallende resultaten ENA

Anti-ribosomaal P protein (rRNP)



2011.2 C



2011.2 F

Methode	Firma	Ribosomaal P protein antigeen
ELISA	Pharmacia & Upjohn	recombinant P0, P1, P2
	Ortho Clinical Diagnostics	?
FEIA	ImmunoCAP/ELiA	recombinant P0, P1, P2
Immunoblot	Euroimmun	gezuiverd P0, P1, P2
	Innogenetics	synthetisch Ribo-P
Multiplex bead array	BMD	gezuiverd Ribo-P

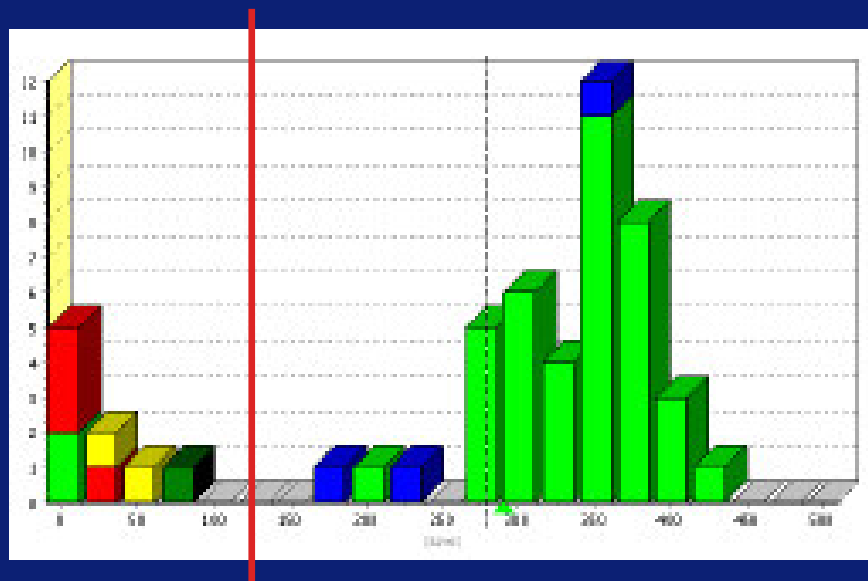
Waarheid??

Anti-dsDNA bepaling

testsysteem		2010.2	2011.1	2011.2
FEIA	Phadia	49	47	48
IIF	ImmunoConcepts	6	6	6
	BMD	4	4	4
	Diasorin	1	1	1
	INOVA	1	1	1
	Agnos	1	1	-
RIA	Siemens-DPC	2	2	2
	DPC	1	1	1
	Eigen reagens	1	1	1
ELISA	Biorad	1	1	1
	Home-made	1	1	1
	Orgentec diagnostics	-	1	1
	Siemens-Dade Behring	1	-	-
	Overigen	-	1	1
Immunoblot	BMD	1	1	1
	Euroimmun	1	1	1
Delfia	Eigen reagens	1	1	1
Totaal		72	71	71

Opvallende resultaten anti-dsDNA

anti-dsDNA 2011.2 monster E



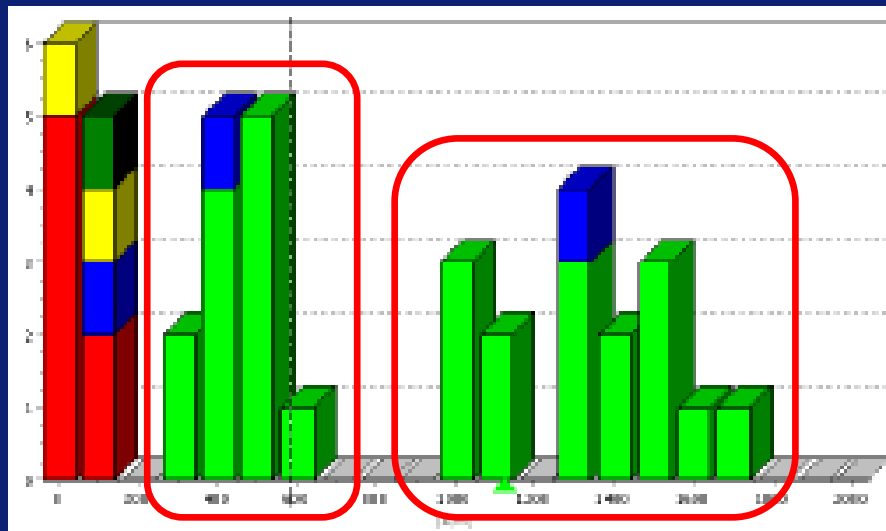
Method	Gem.	VC
Overall	277,2	46%
Delfia	86,0	
ELISA	247,9	
FEIA (ImmunoCAP/ELiA)	321,7	27%
Indirecte immunofluorescentie (IIF)	8,4	
Radioimmunoassay (RIA)	42,5	

Discrepante resultaten

- IIF, RIA en Delfia negatief
- ELISA en FEIA positief
- RIA en IIF zijn zeer specifiek met name bij hoog avide antistoffen
- Mogelijk aanwezigheid van IgG anti-dsDNA met laag aviditeit

Opvallende resultaten Anti-dsDNA

Anti-dsDNA 2011.2 monster A



Methode	Gem.	VC
Overall	678,7	83%
Delfia	71,0	
ELISA	606,9	
FEIA (ImmunoCAP/ELiA)	923,2	52%
Indirecte immunofluorescentie (IIF)	35,8	110%
Radioimmunoassay (RIA)	39,5	

FEIA gebruikers

- 1 deelnemer kwalitatief resultaat
- 20 deelnemers resultaat >
- 12 deelnemers resultaat 300 – 600 IU/ml
- 15 deelnemers resultaat 978 – 1720 IU/ml

Opvallende resultaten Anti-dsDNA

Mogelijke oorzaken algemeen

- Gevriesdroogd serum, is er een homogene oplossing

Mogelijke oorzaken Phadia ImmunoCAP 100/250/1000

- Bij 'Above' resultaat wordt de exportwaarde in IU/ml vanuit IDM opgegeven
- Monster wordt onverdund aangeboden in ampullen met puntbodem ipv rond- of platbodem



- Pipetteerfout Phadia ImmunoCAP 100/250/1000
- ???

Bij kleine volume aan monster → manuele voorverdunnen

Conclusie

- Blijf alert op gebruikte testsystemen
- Blijf bewust van de sterke en zwakke punten (beperkingen) van gebruikte testsystemen
- Kies voor de “beste” prijs / kwaliteit verhouding van de beschikbare testsystemen

Met dank aan:

Prof. Dr. H. Hooijkaas

Dr. M. Schreurs

Alle medewerkers Medische Immunologie,
werkgroep AID, Erasmus MC
Sectie HIM-SKML

