

Kwaliteitssysteem FOR-003E

CAT

Critically Appraised Topic

Titel: De klinische waarde van bijnier- en hart autoantistoffen voor de diagnose van Addison ziekte en gedilateerde cardiomyopathie

Author: Dr. W. Maurissen

Supervisor: Prof. Dr. X. Bossuyt

Date: 3/3/2009

Clinical bottom line

---

### Bijnier autoantistoffen

De ziekte van Addison is een pathologisch proces van de bijniercortex, die zorgt voor een insufficiënte productie van glucocorticoïden, mineralocorticoïden en sex steroiden. Tegenwoordig is auto-immuniteit de voornaamste oorzaak van primair adrenocorticaal falen. Omdat er geen gouden standaard bestaat voor de diagnose van autoimmune bijnier insufficiëntie zullen enkel de resultaten van autoantilichamen kunnen gebruikt worden om te discrimineren tussen autoimmune en niet autoimmune gevallen. De gelijktijdige aanwezigheid van zowel 21-hydroxylase (21OH) antilichamen (bepaald via een immunoprecipitatie assay) en bijniercortex autoantilichamen (ACA) (bepaald via indirecte immunofluorescentie) kan men gebruiken als gouden standaard voor de diagnose van de autoimmune vorm van primaire bijnier insufficiëntie. Er bestaan twee commercieel verkrijgbare immunoprecipitatie assays om 21OH antilichamen op te sporen. De eerst ontwikkelde assay maakte gebruik van <sup>35</sup>S-gelabelde 21-OH en de andere van <sup>125</sup>I-gelabelde 21-OH. Een vergelijking tussen deze twee assays toont aan dat de met <sup>125</sup>I-gelabelde 21-OH assay gevoeliger, goedkoper, veiliger en een betere precisie heeft dan de met <sup>35</sup>S-gelabelde 21-OH assay. De specificiteit berekend bij gezonde bloed donor patiënten is voor de ACA test ongeveer 99% en voor de 21OH test 97% (met <sup>125</sup>I-gelabelde 21-OH assay). Bij een populatie van patiënten met een andere autoimmuun ziekte is de specificiteit van beide assays ook groter dan 95%. Maar deze specificiteit kan in werkelijkheid nog groter zijn want bij ACA en/of 21-OH Abs-positieve individuen zonder

Contact: Dienstsecretariaat tel: 016 34 70 19

bijnierinsufficiëntie was het cumulatieve risico om Addison ziekte te ontwikkelen 47.5%, met een jaarlijkse incidentie van 4.9%. De sensitiviteit van deze assays is niet te bepalen omdat deze assays zelf gebruikt worden als referentie methode om te besluiten tot een autoimmune etiologie van bijnier insufficiëntie.

Er werd een sterke correlatie gevonden tussen ACA titers en 21-OHAbs (<sup>35</sup>S-gelabelde 21-OH assay) levels. De levels van 21-OHAbs en ACA zijn significant geassocieerd met de ernst van de bijnier dysfunctie in de preklinische periode en hebben een voorspellende waarde om de ziekte te ontwikkelen.

Slechts enkele gespecialiseerde laboratoria voeren beide assays uit. In UZ Gasthuisberg voert men enkel de ACA test uit. Indien slechts één van de twee testen positief is, sluit dit niet noodzakelijk een non-autoimmune oorzaak uit. De waarschijnlijkheid van een correcte etiologische classificatie van autoimmuun Addison ziekte, indien er maar één assay uitgevoerd wordt varieert met de autoantibody titer. Een hoge titer geeft een grote waarschijnlijkheid op een auto-immune Addison ziekte, en een lagere titer geeft een lagere waarschijnlijkheid op een auto-immune Addison ziekte.

### Hart autoantistoffen

Gedilateerde cardiomyopathy wordt gekarakteriseerd door de dilatatie en een verminderde contractie van één of beide ventrikels. Deze patiënten hebben een verminderde systolische functie en de ziekte kan evolueren naar finaal hartfalen. Arrhythmiën, tromboembolen, en “sudden death” zijn veel voorkomend.

Myocarditis is een inflammatie van de hartspier dat geïdentificeerd kan worden door klinische of histopathologische criteria.

In UZ Gasthuisberg voert men de indirecte immunofluorescentie (IIF) test voor hart

Autoantibodies (AHA) uit. AHA opsporen is geen goede test om myocarditis uit te sluiten, wel om de diagnose te bevestigen. Bij gezonde familieleden van gedilateerde cardiomyopathie patiënten, is een positieve AHA op baseline een onafhankelijke voorspeller van ziekte ontwikkeling binnen de 5 jaar. Het is nuttig om symptoom vrije familieleden te screenen en op te volgen want AHA komen voor bij asymptomatische familieleden, jaren voordat er een echocardiografische abnormaliteit zichtbaar is. Zo kan een vroege diagnose gesteld worden en een preventieve behandeling opgestart. Maar er is wel nog een grote studie nodig met een langere follow-up tijd om de rol van dit autoantilichaam als prognostische marker te kunnen bevestigen.

Er verandert niets aan de therapie indien er hart autoantistoffen aanwezig zijn.

### Bijnier autoantistoffen

Vraag 1: Welke is de beste test(en) om auto-immune Addison ziekte te diagnosticeren?

Vraag 2: Zijn titers van ACA/21-OH Abs belangrijk?

Vraag 3: Is het nuttig om de Steroid-producerende cell autoantilichamen op te sporen?

### Hart autoantistoffen

Vraag 1: Wat is de indicatie voor het opsporen van hart autoantistoffen?

Vraag 2: Verandert er iets aan de therapie indien er hart autoantistoffen aanwezig zijn?

## Bijnier autoantistoffen

### Relevant evidence/References

---

#### Guidelines

1. Laboratory endocrine testing guidelines : Addison's disease. Toward Optimized Practice [Alberta]. 2008 update.  
[http://www.cma.ca/index.cfm/ci\\_id/54490/la\\_id/1.htm?cpgId=5186](http://www.cma.ca/index.cfm/ci_id/54490/la_id/1.htm?cpgId=5186)

#### Review

2. Autoimmunity in Addison's disease. Martín Martorell P, Roep BO, Smit JW. Neth J Med. 2002 Aug;60(7):269-75. Review
3. Autoimmune adrenal insufficiency and autoimmune polyendocrine syndromes: autoantibodies, autoantigens, and their applicability in diagnosis and disease prediction. Betterle C, Dal Pra C, Mantero F, Zanchetta R. 2002 Jun;23(3):327-64. Endocr Rev.
4. Adrenal insufficiency. Oelkers W. N Engl J Med. 1996 Oct 17;335(16):1206-12. Review.

#### Original Articles

5. Autoantibodies in Addison's disease. Anderson JR, Goudie RB, Gray KG, Timburry GC. Lancet 1957 1:1123-1124.

6. Studies of the adrenal antigens and autoantibodies in Addison disease. Blizzard RM, Kyle M. *J Clin Invest* 1963 42:1653-1660.
7. Adrenal-cortex autoantibodies and steroid-producing cells autoantibodies in patients with Addison's disease: comparison of immunofluorescence and immunoprecipitation assays. Betterle C, Volpato M, Pedini B, Chen S, Smith BR, Furmaniak J. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Feb;84(2):618-22.
8. Steroid 21-hydroxylase autoantibodies: measurements with a new immunoprecipitation assay. Tanaka H, Perez MS, Powell M, Sanders JF, Sawicka J, Chen S, Prentice L, Asawa T, Betterle C, Volpato M, Smith BR, Furmaniak J. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 May;82(5):1440-6.
9. Addison's disease-serological studies. Nerup J. *Acta Endocrinol.* 1974 76:142-158.
10. Adrenal cortex and steroid 21-hydroxylase autoantibodies in adult patients with organ-specific autoimmune diseases: markers of low progression to clinical Addison's disease. Betterle C, Volpato M, Rees Smith B, Furmaniak J, Chen S, Greggio NA, Sanzari M, Tedesco F, Pedini B, Boscaro M, Presotto F. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Mar;82(3):932-8.
11. Immunoprecipitation assay for autoantibodies to steroid 21-hydroxylase in autoimmune adrenal diseases. Colls J, Betterle C, Volpato M, Prentice L, Smith BR, Furmaniak J. *Clin Chem.* 1995 Mar;41(3):375-80.
12. Adrenal cortex autoantibodies in subjects with normal adrenal function. Betterle C, Coco G, Zanchetta R. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005 Mar;19(1):85-99.
13. High diagnostic accuracy for idiopathic Addison's disease with a sensitive radiobinding assay for autoantibodies against recombinant human 21-hydroxylase. Falorni A, Nikoshkov A, Laureti S, Grenbäck E, Hulting AL, Casucci G, Santeusanio F, Brunetti P, Luthman H, Lernmark A. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995 Sep;80(9):2752-5.
14. Estimated risk for developing autoimmune Addison's disease in patients with adrenal cortex autoantibodies. Coco G, Dal Pra C, Presotto F, Albergoni MP, Canova C, Pedini B, Zanchetta R, Chen S, Furmaniak J, Rees Smith B, Mantero F, Betterle C. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 May;91(5):1637-45. Epub 2006 Mar 7.
15. Levels of adrenocortical autoantibodies correlate with the degree of adrenal dysfunction in subjects with preclinical Addison's disease. Laureti S, De Bellis A, Muccitelli VI, Calcinaro F, Bizzarro A, Rossi R, Bellastella A, Santeusanio F, Falorni A. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Oct;83(10):3507-11.

16. Italian Addison network study: update of diagnostic criteria for the etiological classification of primary adrenal insufficiency. Falorni A, Laureti S, De Bellis A, Zanchetta R, Tiberti C, Arnaldi G, Bini V, Beck-Peccoz P, Bizzarro A, Dotta F, Mantero F, Bellastella A, Betterle C, Santeusanio F; SIE Addison Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Apr;89(4):1598-604.
17. Steroid-cell autoantibodies are preferentially expressed in women with premature ovarian failure who have adrenal autoimmunity. Falorni A, Laureti S, Candeloro P, Perrino S, Coronella C, Bizzarro A, Bellastella A, Santeusanio F, De Bellis A. *Fertil Steril.* 2002 Aug;78(2):270-9.
18. Autoantibodies against recombinant human steroidogenic enzymes 21-hydroxylase, side-chain cleavage and 17alpha-hydroxylase in Addison's disease and autoimmune polyendocrine syndrome type III. do Carmo Silva R, Kater CE, Dib SA, Laureti S, Forini F, Cosentino A, Falorni A. *Eur J Endocrinol.* 2000 Feb;142(2):187-94.

## **Clinical/Diagnostic scenario**

---

### **1. Addison ziekte**

#### **A. Prevalentie en etiologie**

De ziekte van Addison is een pathologisch proces van de bijniercortex, die zorgt voor een insufficiënte productie van glucocorticoïden, mineralocorticoïden en sex steroïden. Addison ziekte ontstaat als 90% van de bijniercortex vernietigd is. (2) De ziekte kan dus lange tijd in subklinische toestand blijven. De prevalentie van Addison ziekte in de populatie is laag, gaande van 0.45 gevallen per 100.000 inwoners in New Zeeland tot 11.7 gevallen per 100.000 inwoners in Italië. (3) Vroeger voordat antibiotica algemeen gebruikt werden, was tuberculose de voornaamste oorzaak van primair adrenocortical falen. Tegenwoordig is auto-immuniteit de voornaamste oorzaak. (3) Adrenoleukodystrophy is de meest voorkomende oorzaak van Addison ziekte die niet geassocieerd is met auto-immuniteit of tuberculose bij mannen. (3) (etiologie van Addison ziekte: attachment 1).

#### **B. Klinische manifestatie**

De symptomen spierzwakte, rusteloosheid, orthostatische duizeligheid, gewichtsverlies, en anorexia zijn gelijk voor primaire en secundaire bijnier insufficiëntie. Ze zijn niet specifiek en komen meestal geleidelijk op. Sommige patiënten presenteren initieel met gastrointestinale symptomen. Het meest specifieke symptoom van primaire bijnier insufficiëntie is hyperpigmentatie van de huid en de mucosa. Dit is te wijten aan de hoge corticotropine concentratie die ontstaat door een verminderde cortisol feedback. Een zeer lichte huidskleur

Contact: Dienstsecretariaat tel: 016 34 70 19

kan voorkomen bij patiënten met secundaire bijnier insufficiëntie en dit wegens de corticotropine deficiëntie. Een ander specifiek symptoom van primaire bijnier insufficiëntie is zout “craving”. Een dalend libido en amenorrhea kunnen voorkomen bij zowel primaire als secundaire bijnier insufficiëntie. Orthostatische hypotensie is meer uitgesproken in primaire dan in secundaire bijnier insufficiëntie, wegens de aldosterone deficiëntie en hypovolemie.

### C. Laboratorium diagnostiek van primaire en secundaire bijnier insufficiëntie

Bij patiënten met een vermoeden van bijnier insufficiëntie wordt dringend aangeraden een corticotropine (ACTH) stimulatie test uit te voeren. Het toedienen van glucocorticoïden bij patiënten met een positieve stimulatie test zal dan de levensreddende behandeling zijn. (1) Met de corticotropine stimulatie test kan men ook primaire en milde secundaire bijnier insufficiëntie van elkaar onderscheiden. Bij ernstige secundaire bijnier insufficiëntie zal er zoals bij primaire bijnier insufficiëntie ook geen cortisol respons optreden na injectie van 250µg synthetisch corticotropine en dit wegens bijniercortex atrofie. (4)

Bij mensen met niet specifieke klachten van bijnier insufficiëntie kunnen bepaalde labo testen leiden tot de diagnose. Typisch kunnen hyponatriëmie, hyperkaliëmie, acidose, weinig verhoogde creatinine concentraties, hypoglycemie, hypercalciëmie, milde normocyttaire anemie, lymphocytose en milde eosinophilie voorkomen. (4) Een ochtend (8-9u) plasma cortisol concentratie van minder dan 3µg/dl (83 nmol/L) is indicatief voor klinische bijnier insufficiëntie terwijl een ochtend plasma cortisol concentratie van 19µg/dl (525 nmol/L) de diagnose uitsluit. (4) Patiënten met primaire bijnier insufficiëntie hebben een plasma corticotropine concentratie van meer dan 100 pg/ml (22 pmol/L), zelfs al zit de plasma cortisol concentratie binnen de normale referentiewaarden. Een normale plasma corticotropine concentratie sluit primaire bijnier insufficiëntie uit, maar niet secundaire. De basale plasma aldosteron concentratie is laag bij primaire bijnier insufficiëntie, terwijl de plasma renine activiteit verhoogd is wegens het natrium verlies.

## 2. Ethiologische diagnostiek van auto-immune Addison ziekte

### A. Klinische classificatie van auto-immune Addison ziekte

In 1957 heeft men ontdekt dat de idiopathische Addison ziekte van auto-immune oorsprong is. En dit door de ontdekking van circulerende bijniercortex auto-antilichamen (ACA) bij deze patiënten. (3)

In 1980 classificeerde Neufeld en Blizzard polyglandulaire auto-immuun ziekten in vier klinische clusters (Attachment 2). Volgens deze classificatie is de auto-immune Addison ziekte één van de belangrijkste componenten van auto-immuun polyglandulaire syndromen (APS) type 1,2 en 4. (3)

APS type 1 heeft een prevalentie gaande van 1 op 9000 in de Iraans-joodse gemeenschap tot 1 op 80.000 in Noorwegen. De prevalentie van APS type 2 ligt tussen 1.4 tot 2 per 100.000 inwoners. (3)

De geïsoleerde Addison ziekte is de vierde klinische presentatie van de ziekte. Deze wordt gedefinieerd door de afwezigheid van een andere klinische auto-immuun ziekte.

#### B. Vier goed gedefinieerde klinische entiteiten met dezelfde serologische markers

Het belangrijkste criteria voor de identificatie van de auto-immune oorsprong van bijnier insufficiëntie zijn de aanwezigheid van circulerende ACA en/of 21-OH Abs en de evidentie van een normale/atrofische bijnier cortex. Andere klinische (leeftijd van ontstaan, type van auto-immuun geassocieerde ziekte, aanwezigheid van candidiasis, aanwezigheid van hypogonadisme) en/of genetische bevindingen (mutaties van AIRE gen, HLA-DR, CTLA-4) worden verondersteld voor te komen in de context van auto-immuun Addison ziekte. De vier klinische vormen van auto-immune Addison ziekte worden allen gekarakteriseerd door de aanwezigheid van ACA en/of 21-OH Abs en een normale of atrofische bijnier. (3)

### 3. Serologische markers van Auto-immuun Addison ziekte

Één van de kenmerken voor auto-immuun ziektes is de aanwezigheid van antilichamen gericht tegen zelfantigenen. De belangrijkste auto-antilichamen betrokken bij bijnier auto-immuniteit zijn Adrenal Cortex Autoantibodies (ACA) of steroid 21-Hydroxylase Antibodies (21-OH Abs) en steroid-producerende cell autoantilichamen (StCA).

#### A. Adrenal Cortex Autoantibodies (ACA)

ACA zijn ontdekt in 1957 door Anderson *et al.*. (5) Zij gebruikten een complementfixatie test. Blizzard and Kyle introduceerden de indirecte immunofluorescentie (IIF) test voor ACA in 1963. (5) ACA zijn orgaan specifieke autoantilichamen die meestal reageren met de drie lagen van de bijnier cortex. Ze produceren een homogeen “cytoplasm-staining pattern” met de IIF test. (3) Bij patiënten met autoimmune Addison ziekte worden ACA, gebruik makende van IIF, gevonden bij 81%. Bij patiënten met geen autoimmune Addison ziekte worden ook geen ACA gevonden. (7) In een andere studie werden ACA gevonden bij 30 patiënten die geen Addison ziekte hadden. (8) De prevalentie van ACA bij patiënten met autoimmuun Addison ziekte is 90% in deze met recent ontstaan van de ziekte ( $\leq 2$  jaar), en 79% in deze met langdurige ziekte ( $> 2$  jaar). (3) Bij de patiënten met een Addison ziekte waarbij men geen ACA kan opsporen, is de etiologie in principe idiopatisch. Men kan dus geen sensitiviteit van de IIF test voor ACA bepalen.

##### a. *Testprincipe*

ACA worden gedetecteerd met de klassieke indirecte immunofluorescentie techniek. Hierbij wordt er gebruik gemaakt van normaal menselijk bijnier weefsel, waarop het te testen serum wordt aangebracht. Geit antihuman IgG geconjugeerd aan fluoresceïne isothiocyanaat wordt

vervolgens toegevoegd. De sera die kleuring van bijnier weefsel aantonen bij een verdunning 1:2 worden als positief beoordeeld. Titers van ACA worden bepaald door de verdunning te verdubbelen tot het eind punt.

#### B. Steroid 21-hydroxylase antibodies (21-OH Abs)

In 1992 is steroid 21-hydroxylase (21OH) geïdentificeerd als het belangrijkste bijnier autoantigen bij patiënten met autoimmuun Addison ziekte. (3) ACA herkent een  $M_r$  55,000 autoantigen gelokaliseerd in de microsomale subcellulaire fractie van de adrenocorticale cellen, dewelke geïdentificeerd wordt als het steroid synthetiserende enzym 21-hydroxylase. (15) 21-OH Abs kunnen gemeten worden door immunoprecipitatie assays (IPA). IPA voor 21-OH Abs kan uitgevoerd worden, gebruik makende van  $^{35}\text{S}$ -gelabelde 21-OH, tot expressie gebracht in een *in vitro* transcriptie/translatie systeem. Verder bestaat er een IPA die gebaseerd is op  $^{125}\text{I}$ -gelabelde recombinant menselijke 21-OH geproduceerd in gisten, om 21-OH Abs te op te sporen. (3)

##### 1. $^{35}\text{S}$ -gelabelde 21-OH, tot expressie gebracht in een *in vitro* transcriptie/translatie systeem

###### a. *Testprincipe* (11)

Deze immunoprecipitatie assay (IPA) wordt uitgevoerd op een 96-well filtratie plaat systeem, dat een filter met  $0.45\mu\text{m}$  poriën bevat.  $50\mu\text{L}$  van  $^{35}\text{S}$ -gelabelde 21-OH wordt schuddend geïncubeerd met verdund serum ( $50\mu\text{L}$  10x verdund in Tris buffer) voor 2 uur op kamertemperatuur. Vervolgens wordt  $50\mu\text{L}$  "Protein A-Sepharose" (10x verdund in Tris buffer) toegevoegd aan elke microtiter well. Het staal wordt 1 uur schuddend geïncubeerd op kamertemperatuur. De plaat wordt op een zuig unit geplaatst, en de immuun complexen gebonden aan Protein A-Sepharose worden 3 keer gewassen met  $250\mu\text{L}$  Tris buffer. Tot slot wordt de bodem van elke well gedeponereerd in een vial die 2 mL scintillatie vloeistof bevat en de radioactiviteit wordt gemeten met een scintillatie coueter. Negatieve en positieve referentie sera worden geïncubeerd in elke assay. De resultaten worden uitgedrukt als 21-OH antibody index. Deze wordt als volgt berekend.  $21\text{-OH antibody index} = 100 \times (\text{cpm (onbekend)} - \text{cpm (neg. controle)}) / (\text{cpm (pos. controle)} - \text{cpm (neg. controle)})$ .

###### b. *Analytische performantie* (13)

###### *Detectie limiet*

De detectie limiet van de IPA werd geschat als het gemiddelde  $+3\text{SD}$  van de 21-OH antibody indexen verkregen bij sera van 26 individuen zonder Addison ziekte. Deze index waarde was hier 2.6. Falorni et al. (13) analyseerde sera van 70 individuen zonder Addison ziekte en bekwam een index van 0.04 als de bovenste level van het normale.

###### *Precisie*



De intraassay variatie coëfficiënt CV was 1.7% (n=8) voor serum met hoge levels van 21-OH Abs (mean 21-OH index, 60), 4.6% (n=8) voor serum met medium levels van 21-OH Abs (mean 21-OH index, 24), en 3.1% (n=8) voor serum met lage levels van 21-OH Abs (mean 21-OH index, 6). De interassay CV (met 2 gescheiden loten van gelabeld 21-OH) was 5.5% (n=5) voor serum met hoge levels van 21-OH Abs, 5.8% (n=5) voor serum met medium levels van 21-OH Abs.

2. 21-OH Ab assay gebaseerd op <sup>125</sup>I-gelabelde 21-OH geproduceerd in gisten

a. *Testprincipe (8)*

50µL van menselijk 21-OH gelabeld met <sup>125</sup>I wordt geïncubeerd op 4°C met 20µL onverdund test serum. Na 18 uur incubatie, 50µl “solid phase protein A (RSR)” wordt toegevoegd, en de incubatie voortgezet voor 1 uur op 4°C. Tris buffer (1mL) wordt toegevoegd, en na centrifugatie (1500 x g voor 30 min bij 4°C), wordt het supernatans verwijderd, en het pellet gecount voor <sup>125</sup>I.

b. *Analytische performantie (8)*

*Detectie limiet*

Een 21-OH Ab standaard curve werd opgesteld door gebruik te maken van verdunningen van een hoog 21-OH Ab-positief serum. In de aanwezigheid van 1U/ml (arbitraire units) van de standaard, zal 4% van het <sup>125</sup>I-gelabelde 21-OH gebonden worden. De binding zal verhogen tot 65% in de aanwezigheid van 100U/ml. De mean+-SD van 21-OH Ab level in sera van 243 gezonde bloed donoren was 0.081+-0.364U/ml. Dit veronderstelt een onderste detectielimiet (gebaseerd op dit gemiddelde +-3SD) van ongeveer 1U/ml.

*Precisie*

De interassay variatie coëfficiënt CV was 1.5% (n=6) voor serum met hoge levels van 21-OH Abs (mean, 13.9U/ml), 2.2% (n=6) voor serum met medium levels van 21-OH Abs (mean, 9.8U/ml), en 2.6% (n=6) voor serum met lage levels van 21-OH Abs (mean, 3.1U/ml). De intraassay CV was 1.3% (n=6) voor serum met hoge levels van 21-OH Abs (mean 13.9U/ml), 2.1% (n=6) voor serum met medium levels van 21-OH Abs (mean, 9.9U/ml), en 2.2% (n=6) voor serum met lage levels van 21-OH Abs (mean, 3.2U/ml).

## **Comments en kritische reflectie**

---

### **Vraag 1: Welke is de beste test(en) om auto-immune Addison ziekte te diagnosticeren?**

#### **1. Huidige procedure in UZ Gasthuisberg**

In UZ Gasthuisberg voert men enkel de indirecte immunofluorescentie (IIF) test voor Adrenal Cortex Autoantibodies (ACA) uit. Er wordt menselijk bijnier weefsel gebruikt voor het

uitvoeren van de test. De sera die kleuring van bijnier weefsel aantonen bij een verdunning 1:10 worden als positief beoordeeld. Bij elke run (1x/week) neemt men telkens 1 positieve en 1 negatieve controle mee. Er worden echter geen titers bepaald. Afhankelijk van de sterkte van de fluorescentie wordt een positief resultaat weergegeven als 1+ of 2+. Een onduidelijke sterkte protocollert men als dubieus.

## **2. $^{125}\text{I}$ -gelabelde 21-OH assay versus $^{35}\text{S}$ -gelabelde 21-OH assay**

In tegenstelling tot de  $^{35}\text{S}$ -gelabelde 21-OH assay, wordt onverdund serum gebruikt bij de  $^{125}\text{I}$ -gelabelde 21-OH assay, en dit zou detectie van autoantistoffen bij lagere concentratie kunnen toelaten. De sensitiviteit van  $^{125}\text{I}$ -gelabelde 21-OH assay zou dan ook beter kunnen zijn dan die van de  $^{35}\text{S}$ -gelabelde 21-OH assay. Ook de productie van  $^{35}\text{S}$ -gelabelde 21-OH is duur en kost tijd, terwijl  $^{125}\text{I}$ -gelabelde 21-OH gemakkelijk te produceren is. Het omgaan met en counting van  $^{125}\text{I}$  is veel meer opportuun dan  $^{35}\text{S}$ . De precisie van de  $^{125}\text{I}$ -gelabelde 21-OH assay is beter dan die van de  $^{35}\text{S}$ -gelabelde 21-OH assay.

## **3. $^{125}\text{I}$ -gelabelde 21-OH assay versus IIF test voor ACA**

Beide testen hebben een vergelijkbare klinische specificiteit. Bij een populatie van gezonde bloed donoren bedraagt deze voor de  $^{125}\text{I}$ -gelabelde 21-OH assay 97.53% (n=243) (8) en voor de IIF test voor ACA 99.7% (n=338) (10). Bij een populatie van patiënten met een andere autoimmuun ziekte bedraagt deze voor de  $^{125}\text{I}$ -gelabelde 21-OH assay 98.41% (n=378) (8) en voor de IIF test voor ACA 92 tot 99% (9-10). De sensitiviteit kan men niet bepalen omdat bij een bijnier insufficiënte patiënt waarbij men geen auto-antilichamen detecteert, men niet kan zeggen dat de etiologie van de ziekte auto-immune is. De definitie van auto-immune Addison ziekte zegt ons dat er auto-antistoffen aanwezig moeten zijn om auto-immuniteit te bewijzen. Er bestaat een goede vergelijking tussen de ACA titers en de 21OH Abs index ( $^{35}\text{S}$  assay) ( $r=0.85$ ) (7). Betterle *et al.* vond eveneens een goede correlatie tussen de ACA titers en de 21OH Abs waarde ( $^{125}\text{I}$  assay) ( $r=0.69$ ) (3). ( Het nadeel van de  $^{125}\text{I}$ -gelabelde 21-OH assay is de aanwezige radioactiviteit en de lange incubatietijd en dus een langere TAT ten opzichte van de IIF test voor ACA. Het nadeel van de IIF test voor ACA is dat men moet beschikken over de nodige expertise voor de beoordeling van het resultaat. Beide testen zijn ongeveer evenwaardig.

### **Vraag 2: Zijn titers van ACA/21-OH Abs belangrijk?**

#### **1. Levels van ACA's en 21-OH Abs**

Tussen 1963 en 2003 werden ACA's en/of 21-OHAbs opgespoord bij ongeveer 32000 individuen zonder klinische autoimmune Addison ziekte (23480 met autoimmuun ziektes, 1273 bij gehospitaliseerde patiënten, eerste graad relatives, 6488 normale controles). Bij 430 individuen (1.3%) werd een positief resultaat bekomen. Het cumulatieve risico om Addison ziekte te ontwikkelen bij ACA en/of 21-OHAbs-positieve individuen was 47.5%, met een jaarlijkse incidentie van 4.9% (12). Volgens Coco *et al.* is het cumulatieve risico bij patiënten groepen met vergelijkbare kenmerken om Addison ziekte te ontwikkelen bij ACA positieve patiënten 48.5% terwijl dit bij ACA negatieve patiënten 8.7% (14). ACA (indirecte immunofluorescentie) en/of 21-OHAbs (<sup>125</sup>I-gelabelde 21-OH assay) zijn bruikbare merkers voor de voorspelling van hypoadrenalisme bij patiënten zonder klinische bijnier dysfunctie. Attachment 3 toont het risico op het ontwikkelen van autoimmune Addison ziekte volgens leeftijd, geslacht, bijnier functie bij het eerste onderzoek, bijnier antilichaam titers, aanwezigheid van andere ziektes, en HLA-DRB1 bij patiënten met ACA bij het opstarten van de studie naar follow-up toe (14). De output van de multivariate analysis met het Cox model (bevattende leeftijd, geslacht, bijnier functie bij het eerste onderzoek, bijnier antilichaam titers, en aanwezigheid van andere ziektes bij het eerste onderzoek) kunnen gebruikt worden om een voorspellingsalgoritme na 5 jaar follow-up op te stellen. Attachment 4 geeft dit voorspellingsalgoritme weer (14). Op basis van het hieruit bekomen risico score wordt een timing aanbevolen voor een klinische en laboratorium evaluatie. (Attachment 5) Remissie van subklinische adrenocorticale dysfunctie kan voorkomen bij ACA-positieve patiënten (14,15). 5 stages van adrenocorticale dysfunctie worden herkend bij mensen met bijnier autoantilichamen. (Attachment 6) Er werd een sterke correlatie gevonden tussen ACA titers en 21-OHAbs (<sup>35</sup>S-gelabelde 21-OH assay) levels (15). De levels van 21-OHAbs en ACA zijn significant geassocieerd met de ernst van de bijnier dysfunctie in de preklinische periode. Vroege biochemische tekens van bijnier dysfunctie kunnen spontaan in remissie gaan, en dit parallel met het verdwijnen van zowel ACA en 21OHAbs (15). De index van 21-OHAbs (<sup>35</sup>S-gelabelde 21-OH assay) was omgekeerd evenredig gecorreleerd met de duur van de ziekte. (13)

## **2. Diagnostische criteria voor etiologische classificatie van primaire Addison ziekte**

Omdat er geen onafhankelijke gouden standaard bestaat voor de diagnose van autoimmune bijnier insufficiëntie zullen enkel de resultaten van autoantilichamen kunnen gebruikt worden om te discrimineren tussen autoimmune en niet autoimmune gevallen. De gelijktijdige aanwezigheid van zowel 21OHAbs en ACA is de gouden standaard voor de diagnose van de autoimmune vorm van primaire adrenale insufficiëntie. Maar slechts enkele gespecialiseerde laboratoria voeren beide assays uit. Indien slechts één van de twee testen positief is, sluit dit niet noodzakelijk een non-autoimmune oorzaak uit. De diagnose van TBC-AD is gebaseerd op een positieve voorgeschiedenis en op radiologische bevindingen van TBC zoals een vergroting

van de bijnier met of zonder calcificaties. Het detecteren van ACA of 21OHAbs bij deze patiënten is dus niet voldoende om de diagnose van TBC-AD uit te sluiten. De diagnose van adrenoleukodystrofie (ALD) is gebaseerd op de aanwezigheid van verhoogde plasma levels van very long chain fatty acids (VLCFA's). De genetische vormen van primaire adrenale insufficiëntie (nl. X-linked adrenal hypoplasia congenita, triple A syndroom en Kearns-Sayre syndroom) worden gediagnosticeerd door genotypering. Ook de AIRE gen mutatie wordt opgespoord bij vermoeden van APS 1. De detectie van ACA bij patiënten met verhoogde VLCFA's, toont aan dat de aanwezigheid van enkel ACA, ALD niet kan uitsluiten. Hypothetisch zijn er twee mogelijkheden die de aanwezigheid van deze autoantistoffen kunnen verklaren. Ofwel zijn er twee verschillende vormen van primaire bijnier insufficiëntie aanwezig bij dezelfde patiënt ofwel meer waarschijnlijk zijn dit vals positieve resultaten van de autoantibody assays.

De waarschijnlijkheid van een correcte etiologische classificatie van autoimmuun Addison ziekte varieert met de autoantibody titer. Hoe hoger de antibody level, hoe hoger de waarschijnlijkheid van correcte classificatie van de patiënt als autoimmuun (16). In 83-95% van de 21OHAbs positieve patiënten, antibody levels hoger dan 0.135-0.240 bevestigen een waarschijnlijkheid van autoimmuniteit hoger dan 99%, onafhankelijk van de ACA assay. Om dezelfde waarschijnlijkheid te bekomen door gebruik te maken van enkel de ACA assay, zal de eind punt titer 6-12 moeten bedragen. Bij deze titer worden 29-35% patiënten met lagere antibody titer uitgesloten. (attachment 7) De waarschijnlijkheid van een correcte etiologische classificatie van autoimmuun Addison ziekte, indien er maar één assay uitgevoerd wordt varieert met de autoantibody titer. Een hoge titer geeft een grote waarschijnlijkheid op een auto-immune Addison ziekte, en een lagere titer geeft een lagere waarschijnlijkheid op een auto-immune Addison ziekte. Bij patiënten met lagere antilichaam levels, zal men op zoek moeten gaan naar andere oorzaken van bijnier insufficiëntie. Indien er geen etiologisch verklaring kan gegeven worden voor de primaire bijnier insufficiëntie blijft de reden idiopatisch. De afwezigheid van detecteerbare bijnier autoantibodies kan de mogelijkheid van een autoimmuun origine van de ziekte niet volledig uitsluiten, omdat autoantilichamen vroeger aanwezig konden zijn maar verdwenen wanneer de analyse werd uitgevoerd, of omdat autoantistoffen die nog niet geïdentificeerd zijn de oorzaak kunnen zijn van het autoimmuun proces.

### **Vraag 3: Is het nuttig om de Steroid-producerende cell autoantilichamen op te sporen?**

ACA en Steroid-producerende cell autoantilichamen (StCA) reageren met de bijnier cortex en geven een identiek immunofluorescentie patroon weer na een indirecte immunofluorescentie test op bijnier weefsel. Een onderscheid tussen beide autoantistoffen is mogelijk door een

indirecte immunofluorescentie test op bijnier en op testis en/of ovarium weefsel uit te voeren. Indien de patiënt StCA bevat, zal de indirecte immunofluorescentie test op gonadaal weefsel positief zijn. ACA kan aanwezig zijn in de afwezigheid van StCA, maar StCA is altijd geassocieerd met ACA. (3) Bij patiënten met autoimmune Addison ziekte correleert StCA met de aanwezigheid van primair gonadaal falen. De aanwezigheid van klinische en laboratorium tekens van de menopauze voor de leeftijd van 40 jaar noemt men prematuur ovarian falen. (17) 20% van de patiënten met autoimmune Addison ziekte zonder gonadaal falen zijn StCA positief. De follow-up van StCA-positieve patiënten met autoimmune Addison ziekte zonder primair gonadaal falen toont een hoog risico op de ontwikkeling van gonadaal falen bij vrouwen maar niet bij mannen. (3) Bij mannen zullen deze autoantilichamen zelden testiculair falen veroorzaken, waarschijnlijk omdat de bloed-testis barrière de testikels beschermt. (18) 26% van de vrouwen en 4% van de mannen met autoimmune Addison ziekte zijn StCA positief. (3) Bij patiënten met klinisch primair gonadaal falen zonder Addison ziekte vind men bij 7% StCA terug. Al deze StCA-positieve primair gonadaal falende patiënten zonder Addison ziekte waren ook positief voor ACA/21-OH Abs. Ze hebben dus een hoog risico om in de toekomst een autoimmune Addison ziekte te ontwikkelen. (3) StCA worden gevonden bij 62% van de patiënten die lijden aan APS type 1, bij 29% van type 2 en bij 12% van de geïsoleerde Addison zieke patiënten. (3) De belangrijkste gonadale autoantilichamen zijn autoantilichamen tegen  $17\alpha$ -hydroxylase en P450 side chain cleavage enzyme. Bij patiënten die lijden aan autoimmune Addison ziekte is de frequentie van StCA significant geassocieerd ( $P < 0.001$ ) met de meting van autoantilichamen tegen  $17\alpha$ -hydroxylase en/of P450 side chain cleavage enzyme. (7) Er wordt verondersteld dat  $17\alpha$ -hydroxylase Abs en P450 side chain cleavage enzyme Abs de belangrijkste componenten zijn van StCA gemeten door de IIF test. Men kan deze autoantilichamen bepalen via een immunoprecipitatie assay gebruik makende van  $^{35}\text{S}$ -gelabelde  $17\alpha$ -hydroxylase of P450 side chain cleavage enzyme. Deze testen zijn vergelijkbaar met de  $^{35}\text{S}$ -gelabelde 21-OH assay die hierboven besproken werd. (7) Bij patiënten met autoimmune Addison ziekte en primair gonadaal falen worden ten minste StCA,  $17\alpha$ -hydroxylase Abs of P450 side chain cleavage enzyme Abs gevonden (buiten één patiënt met het syndroom van Turner). (3) (attachment 8)

De indirecte immunofluorescentie test op ovarium weefsel is nuttig indien de patiënt klachten heeft van primair gonadaal falen. Als deze test dan positief is, zal de patiënt ook positief voor ACA/21-OH Abs zijn. Hij heeft dan een hoger risico om een klinische autoimmune Addison ziekte te ontwikkelen. Eveneens is deze test nuttig bij patiënten met een klinische autoimmune Addison ziekte zonder primair gonadaal falen. Als de StCA test hier positief is, heeft de patiënt meer kans om in de toekomst gonadaal te falen. Tot slot is de test ook nuttig bij patiënten met autoimmune Addison ziekte en primair gonadaal falen. Zodoende kan de etiologie van het

primair gonadaal falen bepaald worden. We moeten er wel aan denken dat het mogelijk is dat de StCA test negatief kan zijn terwijl er toch een autoimmune oorzaak van het primair gonadaal falen bestaat. De autoimmune oorzaak kan dan bevestigd worden doordat de patiënt autoantilichamen heeft gericht tegen 17 $\alpha$ -hydroxylase en/of P450 side chain cleavage enzyme. Er verandert niets aan de therapie indien de StCA test positief is, en hierdoor is het niet nuttig om deze test aan te bieden.

## Situatie UZ Gasthuisberg

---

### Van januari 2000 tot juni 2008 (ongeveer 8.5 jaar)

Totaal aantal stalen: 709

Aantal negatieve stalen: 668

Aantal positieve en dubieuze stalen: 41

Aantal positieve of dubieus positieve patiënten: 32

Dubieus: 3

Positief 1+: 18

Positief 2+: 11

## To do/Actions

---

1. Het bepalen van de titers is nuttig omdat er bij risicopatiënten een risico score kan opgesteld worden voor het ontwikkelen van klinische Addison ziekte. Op basis van deze risico wordt een timing aanbevolen voor een klinische en laboratorium evaluatie.
2. Het bepalen van de titers is ook nuttig want hoe hoger de antilichaam titer, hoe hoger de waarschijnlijkheid van correcte classificatie van de patiënt als autoimmuun. Een hoge titer geeft een grote waarschijnlijkheid op een auto-immune Addison ziekte, en een lagere titer geeft een lagere waarschijnlijkheid op een auto-immune Addison ziekte.
3. De StCA test laat toe een auto-immune oorzaak van infertiliteit aan te tonen. Een positief resultaat verandert evenwel de therapie niet.

## Attachments

---

Attachment 1 (3)

Contact: Dienstsecretariaat tel: 016 34 70 19

TABLE 1. Etiology of adrenocortical insufficiency or AD

---

Primary adrenocortical insufficiency

1. Autoimmune adrenalitis
2. Infectious adrenalitis
  - Tuberculosis
  - Fungal
  - Viral (HIV, CMV)
3. Neoplastic diseases
  - Adrenal carcinomas
  - Metastasis: lung, breast, stomach, lymphomas
4. Adrenal hemorrhage
  - Waterhouse-Friderichsen syndrome
  - Anticoagulation therapy (dicumarol, heparin)
  - Traumas (external or by invasive procedures)
5. Adrenal thrombosis
  - Systemic lupus erythematosus
  - Panarteritis nodosa
  - Antiphospholipid syndrome
  - Traumas
6. Drug-induced
  - Adrenolytic therapy (mitotane, aminoglutetimide, trilostane)
  - Other agents (ketoconazole, etomidate, rifampin, cyproterone acetate)
  - Anticoagulation
7. Other causes
  - Sarcoidosis
  - Amyloidosis
  - Hemochromatosis
  - Histiocytosis
8. Neonatal
  - Maternal Cushing's syndrome
  - Traumas at birth
9. Genetic
  - Adrenoleukodystrophy
  - Congenital adrenal hypoplasia
  - Familial ACTH resistance syndromes
    - Familial glucocorticoid deficiency
    - Triple A syndrome
  - Kearns-Sayre syndrome
  - Congenital adrenal hyperplasia
  - Smith-Lemli-Opitz syndrome

Secondary adrenocortical insufficiency

1. Pituitary or metastatic tumor
2. Craniopharyngioma
3. Pituitary surgery or irradiation
4. Lymphocytic hypophysitis
5. Sarcoidosis
6. Histiocytosis
7. Empty sella syndrome
8. Hypothalamic tumors
9. Withdrawal from steroid therapy
10. Sheehan syndrome
11. Head trauma, lesions of the pituitary stalk
12. Pituitary surgery for adenoma

---

CMV, Cytomegalovirus.

Attachment 2 (3)

TABLE 5. Classification of the APS according to Neufeld and Blizzard (71)

APS type 1	Chronic candidiasis, chronic hypoparathyroidism, autoimmune AD (at least two present)
APS type 2	Autoimmune AD + autoimmune thyroid diseases and/or type 1 diabetes mellitus (AD must always be present)
APS type 3	Thyroid autoimmune diseases + other autoimmune diseases (excluding autoimmune AD, hypoparathyroidism, chronic candidiasis)
APS type 4	Two or more organ-specific autoimmune diseases (which do not fall into type 1, 2, or 3)

Attachment 3 (14):

TABLE 2. Risk for the development of AAD according to age, gender, adrenal function, adrenal antibody titers, presence of nonadrenal diseases, and HLA-DRB1 in patients with ACA at entry into the follow-up

Predictor variable	No. of enrolled patients	No. of patients developing AAD (%)	Univariate analysis HR (95% CI)	P	Multivariate analysis HR (95% CI)	P
Age (yr)						
<16	20	14 (70.0)	5.02 (2.44–10.33)	<0.001	1.47 (0.46–4.68)	0.52
≥16	80	17 (21.2)	1 <sup>a</sup>		1 <sup>a</sup>	
Gender						
Male	20	10 (50.0)	3.02 (1.36–6.67)	0.01	3.37 (1.38–8.24)	0.01
Female	80	21 (26.2)	1 <sup>a</sup>		1 <sup>a</sup>	
Adrenal function						
Impaired (stages 1–3)	30	20 (66.7)	6.10 (2.89–12.90)	<0.001	6.15 (2.79–13.57)	<0.001
Normal (stage 0)	70	11 (15.7)	1 <sup>a</sup>		1 <sup>a</sup>	
Antibody titers						
High	38	16 (42.1)	1.98 (0.98–4.02)	0.06	3.33 (1.43–7.78)	<0.001
Low-medium	62	15 (24.2)	1 <sup>a</sup>		1 <sup>a</sup>	
Coexisting diseases						
Clinical or potential APS type 1	17	14 (82.3)	5.07 (2.49–10.33)	<0.001	5.23 (1.53–17.92)	0.01
Other conditions	83	17 (20.7)	1 <sup>a</sup>		1 <sup>a</sup>	
HLA-DRB1 typing						
DRB1*03 and/or *04	39	13 (33.3)	0.96 (0.44–2.08)	0.92	– <sup>b</sup>	–
Other DRB1	40	13 (32.5)	1 <sup>a</sup>			

Results of HRs for univariate and multivariate analysis.

<sup>a</sup> Reference cell used in the Cox's proportional hazards model.

<sup>b</sup> Excluded from the multivariate analysis because not statistically significant at the univariate level.

Attachment 4 (14):



TABLE 3.  $\beta$ -Coefficients underlying clinical AAD prediction scores using the reported categorical variables at patient's enrollment

Predictor variable	$\beta$
Age (yr)	
<16	0.38
$\geq 16$	0
Gender	
Male	1.21
Female	0
Adrenal function	
Impaired (stages 1–3)	1.82
Normal (stage 0)	0
Antibody titers	
High	1.20
Low-medium	0
Coexisting disease	
Clinical or potential APS type 1	1.66
Other conditions	0
Baseline survival function at 5 yr, $s(t)$	0.9712

The  $\beta$ -coefficients given in this table are used to calculate a Prognostic Index (PI) (24).

$$PI = \sum_{k=1}^P \hat{\beta}_k z_k$$

PI is exponentiated and used to calculate 5-yr probability of developing AAD. A detailed explanation and an example are shown below:

*Equation 1:*  $PI = 0.38$  (if age <16 yr) + 0 (if age  $\geq 16$  yr) + 1.21 (if sex male) + 0 (if sex female) + 1.82 (if adrenal function impaired) + 0 (if adrenal function normal) + 1.20 (if antibody titer high) + 0 (if antibody titer low-medium) + 1.66 (if APS type 1 component diseases present) + 0 (if other conditions present).

*Equation 2:*  $B = \exp(PI)$

*Equation 3:*  $P = 1 - [s(t)]^B$  (where  $s(t) = 0.9712$ )

*Example 1:* Consider an adult man with normal adrenal function, high antibody titers, and with APS type 1. From Equation 1,  $PI = 0 + 1.21 + 0 + 1.20 + 1.66 = 4.07$ . From Equation 2,  $B = 58.56$ . Finally, from Equation 3,  $P = 0.82$ , giving an 82% probability (high) of developing AAD over 5 yr.

*Example 2:* Consider an adult man with normal adrenal function, high antibody titers, and with other autoimmune conditions. From Equation 1,  $PI = 0 + 1.21 + 0 + 1.20 + 0 = 2.41$ . From Equation 2,  $B = 11.34$ . Finally, from Equation 3,  $P = 0.28$ , giving a 28% probability (moderate) of developing AAD over 5 yr.

*Example 3:* Consider an adult woman with normal adrenal function, high antibody titers, and with other autoimmune conditions. From Equation 1,  $PI = 0 + 0 + 0 + 1.20 + 0 = 1.20$ . From Equation 2,  $B = 3.32$ . Finally, from Equation 3,  $P = 0.09$ , giving a 9% probability (low) of developing AAD over 5 yr.

## Attachment 5: (14)

TABLE 4. Proposed assessment intervals in patients with adrenal autoantibodies (without clinical AAD) on the basis of the risk score (see factor sum model risk formula in Table 3)

Risk score (%)	Baseline risk	Assessment intervals (months)
$\leq 10$	Low	24–36
11–39	Moderate	12–18
$\geq 40$	High	6–12

## Attachment 6: (15)

Stage 0 = normale adrenale functie.

Stage 1 = hoge plasma renine activiteit en lage aldosteron levels.

Stage 2 = stage 1 en geen cortisol respons op ACTH.

Stage 3 = stage 2 en verhoogde basale ACTH levels.

Stage 4 = klinische Addison ziekte.

Contact: Dienstsecretariaat tel: 016 34 70 19

## Attachment 7: (16)

TABLE 3. Threshold levels of adrenal autoantibodies for probability of accurate diagnosis of AAD

% Probability of autoimmunity	Lab 1 21OHAb		Lab 2 21OHAb		Lab 3 ACA		Lab 4 ACA	
	thresh.	p.le	thresh.	p.le	thresh.	p.le	thresh.	p.le
75	0.061	0	0.113	5.9	1.88	0	4.13	13.6
90	0.084	3.0	0.163	11.1	3.04	16.0	6.42	13.6
95	0.099	4.5	0.197	13.3	3.83	16.0	7.96	13.6
98	0.119	5.3	0.222	14.8	4.84	28.8	9.94	34.8
99	0.135	5.3	0.240	17.0	5.58	28.8	11.42	34.8
99.96	0.200	6.8	0.273	20.0	8.99	39.2	18.00	50.8

thresh., Threshold of 21OH index or of the reciprocal of ACA endpoint dilution titer; p.le, percentile.

## Attachment 8: (3)

TABLE 12. Immunological combinations in 13 patients with autoimmune AD and POF

Patients	ACA	21-OH Abs	StCA	17 $\alpha$ -OH Abs	P450 scc Abs
1. APS 1 + POF	+	+	+	+	+
2. APS 1 + POF	+	+	+	+	+
3. APS 1 + POF	+	+	+	+	+
4. APS 1 + POF	+	+	+	+	+
5. APS 1 + POF <sup>a</sup>	+	+	-	-	-
6. APS 2 + POF	+	+	+	+	-
7. APS 2 + POF	+	+	+	-	+
8. APS 2 + POF	+	+	+	-	+
9. APS 2 + POF	+	+	+	-	+
10. APS 2 + POF	+	+	-	-	+
11. APS 2 + POF	+	+	+	+	-
12. APS 2 + POF	+	+	+	+	+
13. AD + POF (APS 4)	+	+	+	+	+
	13/13	13/13	11/13	8/13	10/13

[Modified from C. Betterle *et al.*: *J Clin Endocrinol Metab* 84:618-622, 1999 (211). © The Endocrine Society.]

<sup>a</sup> Turner's syndrome.

## Hart autoantistoffen

### Relevant evidence/References

#### Guidelines

1. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies.  
Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. *Circulation*. 1996 Mar 1;93(5):841-2.

#### Original Articles

2. Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy. Manolio TA; Baughman KL, Rodeheffer R, Pearson TA, Bristow JD, Michels VV, Abelmann WH, Harlan WR. *Am J Cardiol* 1992 Jun 1;69(17):1458-66.
3. Idiopathic dilated cardiomyopathy. Dec GW, Fuster V. *N Engl J Med* 1994 Dec 8;331(23):1564-75.
4. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK. *N Engl J Med* 2000 Apr 13;342(15):1077-84.
5. Diagnosis of myocarditis: death of Dallas criteria. Baughman KL. *Circulation*. 2006 Jan 31;113(4):593-5. Review.
6. Evaluation of postmortem endomyocardial biopsy specimens from 38 patients with lymphocytic myocarditis: implications for role of sampling error. Hauck AJ, Kearney DL, Edwards WD. *Mayo Clin Proc* 1989 Oct;64(10):1235-45.
7. Current role of endomyocardial biopsy in the management of dilated cardiomyopathy and myocarditis. Wu LA, Lapeyre AC 3rd, Cooper LT. *Mayo Clin Proc* 2001 Oct;76(10):1030-8.
8. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis. Caforio AL, Calabrese F, Angelini A, Tona F, Vinci A, Bottaro S, Ramondo A, Carturan E, Iliceto S, Thiene G, Daliento L. *Eur Heart J*. 2007 Jun;28(11):1326-33. Epub 2007 May 9.
9. Circulating cardiac-specific autoantibodies as markers of autoimmunity in clinical and biopsy-proven myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. Caforio AL, Goldman JH, Haven AJ, Baig KM, Libera LD, McKenna WJ. *Eur Heart J*. 1997 Feb;18(2):270-5.
10. Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy become undetectable with disease progression. Caforio AL, Goldman JH, Baig MK, Haven AJ, Dalla Libera L, Keeling PJ, McKenna WJ. *Heart*. 1997 Jan;77(1):62-7.
11. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F, Pieroni M, Thiene G, Maseri A. *Circulation*. 2003 Feb 18;107(6):857-63.
12. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. Caforio AL, Mahon NJ, Tona F, McKenna WJ. *Eur J Heart Fail*. 2002 Aug;4(4):411-7
13. Recent insights into the role of autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Lappé JM, Pelfrey CM, Tang WH. *J Card Fail*. 2008 Aug;14(6):521-30. Epub 2008 May 27.

14. Novel organ-specific circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy. Caforio AL, Bonifacio E, Stewart JT, Neglia D, Parodi O, Bottazzo GF, McKenna WJ. J Am Coll Cardiol. 1990 Jun;15(7):1527-34.
15. Prospective familial assessment in dilated cardiomyopathy: cardiac autoantibodies predict disease development in asymptomatic relatives. Caforio AL, Mahon NG, Baig MK, Tona F, Murphy RT, Elliott PM, McKenna WJ. Circulation. 2007 Jan 2;115(1):76-83. Epub 2006 Dec 18
16. Adult myocarditis in a general hospital: observations on 605 autopsies. Burlo P, Comino A, Di Gioia V, Passarino G, Mollo F. Pathologica. 1995 Dec;87(6):646-9.
17. Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment. Magnani JW, Dec GW. Circulation. 2006 Feb 14;113(6):876-90.

## **Clinical/Diagnostic scenario**

---

### **1. Gedilateerde cardiomyopathie**

#### **A. Prevalentie en etiologie**

Een patiënt lijdt aan gedilateerde cardiomyopathie als de linker ventrikel ejection fraction <40 percent van het normale is of als de fractionele verkorting minder dan 25 percent is. (1) Gedilateerde cardiomyopathie is verantwoordelijk voor ongeveer 10.000 doden en 46.000 gehospitaliseerde patiënten per jaar in Amerika. (2) Gedilateerde cardiomyopathie kan veroorzaakt worden door een variëteit van disorders. In veel gevallen kan er geen etiologie aangetoond worden en zal de cardiomyopathie idiopathisch geacht worden. Felker et al. bepaalde de relatieve frequentie van de verschillende oorzaken bij patiënten met initieel onverklaarde cardiomyopathie. Hij bekwam bij 50% een idiopathische etiologie, bij 9% een myocarditis, bij 7% een ischemische hart ziekte, bij 5% een infiltratieve ziekte, bij 4% peripartum cardiomyopathie, bij 4% hypertensie, bij 4% een HIV infectie, bij 3% connective tissue ziekte, bij 3% drugs misbruik, bij 1% doxorubine en bij 10% nog een andere zeldzame etiologie. (4) (Attachment 1) In deze studie zitten niet de gemakkelijk te identificeren oorzaken van hartfalen, zoals ischemische hartziekte en hypertentie. Patiënten met deze oorzaken van hartfalen zijn dus ondervertegenwoordigd in de cohort. (4)

#### **B. Klinische presentatie**

De meeste patiënten die een gedilateerde cardiomyopathie ontwikkelen hebben een leeftijd tussen de 20 en 60 jaar, maar gedilateerde cardiomyopathie kan ook voorkomen bij kinderen en bij ouderen. (3) De symptomen van hartfalen (progressieve dyspnoe, verminderde inspanningscapaciteit, orthopnoe, paroxysmale nachtelijke dyspnoe, en perifere oedemen) zijn het meest voorkomend. Maar andere presentaties zoals de incidentiële detectie van

asymptomatische cardiomegalie en symptomen die het gevolg zijn van gedilateerde cardiomyopathie zoals arrhythmie, geleidingsstoornis, tromboembolische complicaties of “sudden death” kunnen leiden tot de diagnose. (3)

### C. Prognose

De hazard ratios voor dood (follow-up periode is 4.4 jaar) voor elke etiologische groep, worden bepaald en vergeleken met de groep met idiopathische cardiomyopathie (de welke een hazard ratio heeft voor dood van 1.0, per definitie). (Attachment 2) De patiënten met peripartale cardiomyopathie hebben de beste prognose van al de subgroepen en zijn de enigste groep die een significant betere kans op overleven heeft dan de groep van patiënten met idiopathische cardiomyopathie. Myocarditis patiënten hebben een vergelijkbare kans op overleven dan de patiënten met idiopathische cardiomyopathie. (4) De identificatie van de onderliggende oorzaak van hartfalen is dus van prognostisch belang.

## 2. Myocarditis

### A. Prevalentie en etiologie

Myocarditis is een inflammatie van de hartspier dat geïdentificeerd kan worden door klinische of histopathologische criteria. Een prevalentie van 5.1% bekwam Burlo et al. door het nemen van post-mortem myocard bioties. Geen van deze myocarditis patiënten werden door de arts herkend tijdens hun leven. (16) Myocarditis heeft een acute en een chronische stage van inflammatoire myocardiale ziekte en kan idiopathisch, viraal en/of auto-immuun van oorsprong zijn. In ontwikkelde landen zijn virale infecties de meest frequente oorzaak van myocarditis.

### B. Klinische presentatie

De klinische manifestaties van deze ziekte kan strek variëren van asymptomatische veranderingen op een ECG tot fulminant hartfalen; aritmie; hart blok; pijn op de borst of plotse dood.

### C. Diagnostiek

De diagnose van myocarditis is gebaseerd op endomyocardiale biopsie. (8) De Dallas criteria werden in 1986 voorgesteld om tot de diagnose van myocarditis te komen. Men spreekt over een patiënt met myocarditis volgens de Dallas criteria indien er een inflammatoir infiltraat en geassocieerde myocyt necrose of schade niet gekarakteriseerd door een ischemische gebeurtenis aanwezig is. Borderline myocarditis bevat een minder intens inflammatoir infiltraat en geen evidentie van myocyt destructie. (5) De diagnostische accuraatheid van de Dallas criteria voor de diagnose van myocarditis wordt in vraag gesteld. Volgens een studie van 38 gevallen, waarbij autopsie gebruikt wordt als gouden standaard, is de sensitiviteit 60% en de specificiteit 80%. (6) Een sensitiviteit van 35% werd bekomen als men de kliniek en de hartfunctie als gouden standaard beschouwd. (7) Deze lage sensitiviteit van de endomyocardiale biopsie kan men gedeeltelijk wijten aan het focale en transiënte voorkomen

van de inflammatoire infiltraten. Ook werd er geen correlatie aangetoond tussen de aanwezigheid van anti-hartspier autoantistoffen (AHA) en biopsie positiviteit bij patiënten met klinische myocarditis. Dit toont aan dat de diagnose van myocarditis niet enkel op basis van histologie kan gesteld worden. (9)

Er werd aangetoond bij post-mortem studies dat door het nemen van één endomyocardiale biopsie, histologische myocarditis in 25% van de patiënten aangetoond kan worden. Met >5 biopsies kan myocarditis gediagnosticeerd worden bij ongeveer twee derde van de gevallen. Er werd ook een variatie aangetoond in de expert interpretatie van het histologisch materiaal. (5) Een viraal genoom kan aanwezig zijn in het myocardium met onvoldoende histologische veranderingen om te matchen met de Dallas criteria. (5) Een positieve biopsie zal dus de diagnose van myocarditis bevestigen, maar een negatieve biopsie kan de diagnose niet uitsluiten.

#### D. Etiopathogenese van myocarditis

Myocarditis (gediagnosticeerd op basis van de Dallas criteria) wordt geclassificeerd als auto-immuun (positieve AHA en negatieve virus PCR) in 48% van de gevallen, als viraal (positieve virale PCR en negatieve AHA) in 9%, als viraal en immune (positieve virale PCR en positieve AHA) in 12% en als idiopatisch of cel gemedieerd (negatieve virale PCR en negatieve AHA) in 31% van de gevallen. (8)

Polymerase chain reaction op endomyocardiale biopsie is de gouden standaard voor de diagnose van virale myocarditis of cardiomyopathie. Door gebruik te maken van indirecte immunofluorescentie kunnen circulerende orgaan specifieke anti-hart autoantistoffen opgespoord worden, dewelke een niet-invasieve autoimmune merker is van myocarditis en gedilateerde cardiomyopathie. (8)

### **3. Serologische markers van Auto-immune myocarditis en gedilateerde cardiomyopathie**

#### A. Anti-hart autoantibodies (AHA)

##### a. *testprincipe*

ACA worden gedetecteerd met de klassieke indirecte immunofluorescentie techniek. Hierbij wordt er gebruik gemaakt van bloedgroep O normaal menselijk atrium weefsel, waarop het te testen serum wordt aangebracht. Geit antihuman IgG geconjugeerd aan fluoresceïne isothiocyanaat wordt vervolgens toegevoegd. De sera die kleuring van atrium weefsel aantonen bij een verdunning 1:10 worden als positief beoordeeld. (8)

#### B. De verschillende soorten hart autoantibodies

##### a. *Anti- $\alpha$ en Anti- $\beta$ myosine autoantibodies*

De Anti- $\alpha$  myosine autoantibodies zijn hart specifiek en de Anti- $\beta$  myosine autoantibodies zijn slechts partieel hart specifiek. (12) De aanwezigheid van Anti- $\alpha$  myosine autoantibodies bij

patiënten met chronische myocarditis correleert met het verminderen van de linker ventriculaire systolische functie en het verhogen van de diastolische stijfheid. (13) Deze autoantistoffen zijn te bepalen met een niet commercieel verkrijgbare ELISA assay. (12)

*b.  $\beta$ 1 Adrenoreceptor autoantibodies*

De aanwezigheid van  $\beta$ 1 Adrenoreceptor autoantibodies voorspelt een verhoogt risico op alle oorzaken van cardiovasculaire mortaliteit na een periode van 10 jaar follow-up bij patiënten met idiopatische gedilateerde cardiomyopathy. (13) Deze autoantistoffen zijn te bepalen met een niet commercieel verkrijgbare ELISA assay

*c. andere*

Cardiac Troponin I Autoantibodies en antoantibodies tegen het myosine light chain kunnen ook voorkomen. Er zijn ook nog andere autoantilichamen tegen componenten van de hartspier gevonden. (bv. tegen de mitochondriën)

## **Comments en kritische reflectie**

---

### **1. Huidige procedure in UZ Gasthuisberg**

In UZ Gasthuisberg voert men enkel de indirecte immunofluorescentie (IIF) test voor hart Autoantibodies (AHA) uit. Er wordt menselijk hartspier weefsel gebruikt voor het uitvoeren van de test. De sera die kleuring van hartspier weefsel aantonen bij een verdunning 1:10 worden als positief beoordeeld. Bij elke run (1x/week) neemt men telkens 1 positieve en 1 negatieve controle mee. Er worden echter geen titers bepaald. Afhankelijk van de sterkte van de fluorescentie wordt een positief resultaat weergegeven als 1+ of 2+. Een onduidelijke sterkte protocolleert men als dubieus. Er wordt ook gekeken of het sarcolemma aankleurt ofdat de vezels aankleuren. Een positief resultaat wordt geprotocolleerd al positief voor sarcolemma autoantilichamen of positief voor vezel autoantilichamen.

### **Vraag 1: Wat is de indicatie voor het opsporen van hart autoantistoffen?**

AHA wordt gedetecteerd bij 56% van de patiënten met myocarditis bewezen op basis van de Dallas criteria. (8) Van deze 56% bevatten 41% orgaan specifieke autoantistoffen en 15% partieel orgaan specifieke autoantistoffen (de skeletspier fluoresceert partieel met de indirect immunofluorescentietest). De frequentie van orgaan specifieke AHA is hoger bij patiënten met myocarditis (41%) dan bij patiënten met een niet-inflammatoire hart ziekte (1%), ischemische hart-ziekte (1%), of bij normale bloed donoren (2.5%). De frequentie van partieel orgaan-specifieke AHA is ook hoger bij patiënten met myocarditis (15%) dan bij patiënten met niet

inflammatoire hartziekte (4%), ischemische hartziekte (1%), of bij normale bloed donoren (3%). (8)

Als we de orgaan specifieke en partieel orgaan specifieke AHA samenvoegen kunnen we uit de gegevens van de hierboven gegeven resultaten de performantiekarakteristieken van de AHA test voor het opsporen van myocarditis bepalen. De sensitiviteit is 56%, de specificiteit is 96%, de positief predictieve waarde is 75%, de negatief predictieve waarde is 90%, de positieve likelihood ratio (LR+) is 14 en de negatieve likelihood ratio (LR-) is 0.46. De likelihood ratio is een maat voor de kracht waarmee de test bij positief resultaat de waarschijnlijkheid van ziekte verhoogt en de mate van kracht waarmee de test bij negatief resultaat de waarschijnlijkheid van ziekte vermindert. Een LR+  $\geq 10$  wordt soms beschouwd als indicatief voor de aanwezigheid van ziekte, een LR-  $\leq 0,1$  wordt beschouwd als indicatief voor de afwezigheid van ziekte. Bij deze test is de LR- niet  $\leq 0,1$  en dus is de kans om een negatief resultaat te bekomen bij een zieke patiënt is niet voldoende kleiner dan de kans om een negatief resultaat te bekomen bij een niet zieke patiënt. De kans om een positief resultaat te bekomen bij een zieke patiënt is wel voldoende groter (hier 14x) dan de kans om een positief resultaat te bekomen bij een niet zieke patiënt. AHA is dus geen goede test om myocarditis uit te sluiten, maar wel om de diagnose te bevestigen.

Bij patiënten met volledige skeletale spier cross-activiteit vond Caforio *et al* vergelijkbare proporties tussen de groepen en dus geen hogere frequentie bij patiënten met myocarditis. (12) AHA wordt meer gedetecteerd bij patiënten in de acute fase van myocard inflammatie dan in de chronische fase. (10)

AHA worden ook gevonden bij ongeveer 30% van de patiënten met idiopatisch gedilateerde cardiomyopathie en in 20 tot 30% bij hun asymptomatische relatives. (12,14)

AHA bij patiënten met gedilateerde cardiomyopathie worden ondetecteerbaar bij progressie van de ziekte. Patiënten maken eerst een préklinische fase door met hoge antilichaam titers, maar zonder herkenbare hart dysfunctie. AHA bij gedilateerde cardiomyopathie is geassocieerd met het begin van de ziekte. Het is nuttig om symptoom vrije familieleden te screenen en op te volgen want AHA komen voor bij asymptomatische familieleden, jaren voordat er een echocardiografische abnormaliteit zichtbaar is. Zo kan een vroege diagnose gesteld worden en een preventieve behandeling opgestart. (10) Bij gezonde familieleden van gedilateerde cardiomyopathie patiënten, is een positieve AHA op baseline een onafhankelijke voorspeller van ziekte ontwikkeling binnen de 5 jaar. (15) Er zijn wel nog grote studies nodig met een lange follow-up tijd om de rol van dit antilichaam als een prognostische marker te kunnen bevestigen. (10)

**Vraag 2: Verandert er iets aan de therapie indien er hart autoantistoffen aanwezig zijn?**

Contact: Dienstsecretariaat tel: 016 34 70 19



## Gedilateerde cardiomyopathie

Tot nu toe is er geen therapie die bewezen effectief is voor de behandeling van idiopathisch gedilateerde cardiomyopathie. Prednisone, thalidomide, en azathioprine resulteren dikwijls in belangrijk nadelige nevenwerkingen en slecht enkele studies tonen hiermee slechts een gedeeltelijk succes. Anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  (Infliximab, Etanercept of Pentoxifylline) therapie toont ook geen significante verbetering van de klinische toestand, de hospitalisatiedagen voor hartfalen of overlijden. (13)

Al deze therapieën verminderen de algemene immunologische respons maar geen van deze therapieën heeft de antilichaam expressie als target. Er zijn twee strategieën getest die deze expressie als target heeft: immunoabsorptie en intraveneuze immunoglobuline therapie.

Klinische trials die gebruik maken van immunoabsorptie zijn weergegeven in attachment 3.

Deze studies tonen een succes maar veel van deze studies hebben een kleine sample grote, veelal enkel afkomstig uit één bepaald centrum, en veel studies gebruiken geen goede controle patiënten en zijn niet geblindeerd. De selectie criteria variëren ook sterk tussen de verschillende studies. De invasieve en gecompliceerde aspecten van het immunoabsorptie proces zorgen ervoor dat deze techniek niet breed gebruikt wordt voor deze indicatie. (13) Er zou een studie kunnen opgesteld worden waarbij men immunoabsorptie therapie uitvoert op enerzijds patiënten met gedilateerde cardiomyopathie en autoantistoffen en anderzijds op patiënten met gedilateerde cardiomyopathie zonder autoantistoffen. Enkel indien patiënten met autoantistoffen een beter nut ondervinden van de therapie dan patiënten zonder autoantistoffen, is het nuttig om de hart autoantistoffen te bepalen voor deze indicatie. Dit is nog niet getest.

Klinische trials die gebruik maken van intraveneuze immunoglobuline therapie zijn weergegeven in attachment 4. Deze therapie is effectief in enkele kleine studies, en kan een veiliger alternatief zijn dan de immunoabsorptie therapie. De timing van therapie is wel belangrijk want het resultaat verschilt als de therapie in de acute of de chronische fase van de ziekte wordt toegediend.

De trails die er vandaag bestaan zijn “underpowered” en hun focus ligt niet op een specifieke populatie binnen de idiopathisch gedilateerde cardiomyopathie patiënten. Het is zeer onwaarschijnlijk dat alle patiënten met idiopathisch gedilateerde cardiomyopathie voordeel van deze therapie zullen hebben. Men zou moeten kunnen te weten komen welke patiënten met idiopathisch gedilateerde cardiomyopathie een onderliggende autoimmune etiologie heeft. Dit zal men nog moeten onderzoeken met goede studies om zo eventueel het nut van een bepaalde therapie bij een selectieve groep patiënten aan te tonen.

## Myocarditis

De behandeling van myocarditis blijft vooralsnog supportief. Immunosuppressie is niet effectief als een routine behandeling voor acute lymfocytische myocarditis. Trials voor antivirale therapieën, zoals interferon- $\beta$ , suggereren een potentiële therapeutische rol, maar hebben verdere investigaties nodig. (17) Bijvoorbeeld Caforio *et al* toont aan dat patiënten met een positieve PCR voor een virus een slechtere prognose hebben dan patiënten met een negatieve PCR voor een virus. (8) De blijvende aanwezigheid van een virus in het myocard is geassocieerd met de progressieve verslechtering van de hartfunctie. Een spontane klaring van het virus brengt een significante verbetering weer van de hartfunctie. Door interferon- $\beta$  therapie bij virus-positieve gedilateerde cardiomyopathie patiënten, zal het virus geklaard worden en de linker ventrikel functie significant verbeteren. (13) Maar de aanwezigheid van enterovirus RNA replicatie is niet geassocieerd met een verslechtering van de linker ventriculaire functie in vergelijking met de virus-negatieve groep. De klinische significantie van virale aanwezigheid, als het primaire pathofysiologische proces bij patiënten met idiopathisch gedilateerde cardiomyopathie is nog niet volledig bewezen. (13)

De standaard therapie voor acute cardiomyopathie blijft een supportieve hemodynamisch en cardiovasculair therapie. De farmacologische therapie zou moeten bestaan uit een regime dat de hemodynamica en de symptomen verbetert. (crf. Hartfalen) (17)

### To do/Actions

---

Er bestaan nog veel open vragen:

Wordt de test gericht aangevraagd? (volgens een telefonisch contact met Cardiologie en Neurologie wordt deze test niet gericht aangevraagd)

Nog te doen: Het in kaart brengen van wie vraagt de test aan en voor welke indicatie?

Er is nood aan een goede studie naar diagnostiek en therapie toe. (met geïsoleerde hart autoantilichamen bv. Anti- $\beta_1$  adrenoreceptor, Anti- $\alpha$  myosin heavy chain en Anti- $\beta$  myosin heavy chain).

### Attachments

---

Attachment 1: (4)

**TABLE 1. FINAL DIAGNOSES IN 1230 PATIENTS WITH INITIALLY UNEXPLAINED CARDIOMYOPATHY.**

DIAGNOSIS	NUMBER (%)
Idiopathic cardiomyopathy	616 (50)
Myocarditis	111 (9)
Ischemic heart disease	91 (7)
Cardiomyopathy due to infiltrative myocardial disease	59 (5)
Amyloidosis	36
Sarcoidosis	14
Hemochromatosis	9
Peripartum cardiomyopathy	51 (4)
Cardiomyopathy due to hypertension	49 (4)
Cardiomyopathy due to infection with the human immunodeficiency virus	45 (4)
Cardiomyopathy due to connective-tissue disease	39 (3)
Scleroderma	12
Systemic lupus erythematosus	9
Marfan's syndrome	3
Polyarteritis nodosum	3
Dermatomyositis or polymyositis	3
Nonspecific connective-tissue disease	3
Ankylosing spondylitis	2
Rheumatoid arthritis	1
Relapsing polychondritis	1
Wegener's granulomatosis	1
Mixed connective-tissue disease	1
Cardiomyopathy due to substance abuse	37 (3)
Chronic alcohol abuse	28
Cocaine abuse	9
Cardiomyopathy due to doxorubicin therapy	15 (1)
Cardiomyopathy due to other causes	117 (10)
Restrictive cardiomyopathy	28
Familial cardiomyopathy	25
Valvular heart disease	19
Endocrine dysfunction	
Thyroid disease	7
Carcinoid	2
Pheochromocytoma	1
Acromegaly	1
Neuromuscular disease	7
Neoplastic heart disease	6
Congenital heart disease	4
Complication of coronary-artery bypass surgery	4
Radiation	3
Critical illness	3
Endomyocardial fibroelastosis	1
Thrombotic thrombocytopenic purpura	1
Rheumatic carditis	1
Drug therapy (not including doxorubicin)	
Leukotrienes	2
Lithium	1
Prednisone	1
Total	1230 (100)

**TABLE 3. ASSOCIATION BETWEEN CLINICAL VARIABLES AND SURVIVAL.\***

VARIABLE	UNADJUSTED ANALYSIS		MULTIVARIATE ANALYSIS	
	HAZARD RATIO FOR DEATH (95% CI)	P VALUE	HAZARD RATIO FOR DEATH (95% CI)	P VALUE
<b>Cause</b>				
Idiopathic cardiomyopathy†	1.00		1.00	
Peripartum cardiomyopathy	0.14 (0.05–0.44)	0.001	0.31 (0.09–0.98)	0.05
Cardiomyopathy due to hypertension	0.69 (0.35–1.35)	0.28	0.74 (0.36–1.52)	0.42
Cardiomyopathy due to myocarditis	0.74 (0.49–1.10)	0.13	1.05 (0.67–1.61)	0.82
Cardiomyopathy due to other causes	1.21 (0.85–1.72)	0.28	1.30 (0.89–1.91)	0.18
Cardiomyopathy due to connective-tissue disease	1.44 (0.85–2.43)	0.18	1.75 (1.02–3.01)	0.04
Cardiomyopathy due to substance abuse	1.45 (0.88–2.38)	0.15	1.41 (0.79–2.53)	0.25
Cardiomyopathy due to ischemic heart disease	2.01 (1.46–2.77)	<0.001	1.52 (1.07–2.17)	0.02
Cardiomyopathy due to doxorubicin therapy	2.64 (1.35–5.17)	0.005	3.46 (1.67–7.18)	0.001
Cardiomyopathy due to HIV infection	4.00 (2.80–5.74)	<0.001	5.86 (3.92–8.77)	<0.001
Cardiomyopathy due to infiltrative myocardial disease	4.79 (3.36–6.81)	<0.001	4.40 (3.04–6.39)	<0.001
<b>Demographic characteristics</b>				
Age (each additional decade of life)			1.20 (1.10–1.30)	<0.001
Male sex			1.26 (1.00–1.60)	0.05
White race			0.98 (0.78–1.23)	0.88
<b>Hemodynamic characteristics</b>				
Pulse pressure (each increment of 5 mm Hg)			0.97 (0.94–1.00)	0.04
Heart rate (each increment of 10 beats/min)			1.05 (0.99–1.11)	0.13
Pulmonary-artery systolic blood pressure (each increment of 5 mm Hg)			1.11 (1.04–1.17)	0.001
Pulmonary-capillary wedge pressure (each increment of 5 mm Hg)			1.00 (0.91–1.11)	0.93
Cardiac index (each increment of 1 liter/min/m <sup>2</sup> )			0.94 (0.78–1.13)	0.53

\*In multivariate analysis, survival was adjusted for demographic and hemodynamic characteristics. CI denotes confidence interval, and HIV human immunodeficiency virus.

†Idiopathic cardiomyopathy served as the reference category.

Attachment 3: (13)

**Table 2.** Summary of Trials Evaluating the Efficacy of Immunoabsorption in Idiopathic Dilated Cardiomyopathy

Trial	Study Design	Intervention	Patient # (Treated/Controls)	Baseline Characteristics	Follow-up	Results
Dorffel, 1997 <sup>59</sup>	CS	IA for 5 days	9/0	NYHA III/IV, LVEF <25%, positive for B <sub>1</sub> AR autoantibodies	5 days	Improved CO (3.7 ± 0.8 to 5.5 ± 1.8 L/min, <i>P</i> < .01), and decreased MAP (76.0 ± 9.9 to 65.0 ± 11.2 mm Hg, <i>P</i> < .05).
Muller, 2000 <sup>23</sup>	CC	IA for 5 days	17/17	NYHA II-IV, LVEF <30%, positive for B <sub>1</sub> AR autoantibodies	12 months	Improved LVEF in treatment group (22.3 ± 3.3% to 37.9 ± 7.9%; <i>P</i> = .0001). No change in control group. Levels of B <sub>1</sub> AR autoantibodies decreased with IA and did not return during follow-up.
Felix, 2000 <sup>60</sup>	RCT	IA for 3 days with 0.5 g/kg of IgG substitution on day 3, followed by 2 sessions once per month for 3 months	9/9	NYHA III/IV, LVEF <30%	3 months	Increased CI in the treatment group (2.3 ± 0.1 L/min/m <sup>2</sup> to 3.0 ± 0.3 L/min/m <sup>2</sup> ; <i>P</i> = .01 vs. baseline, <i>P</i> = .05 vs. controls).
Wallukat, 2002 <sup>62</sup>	CS	Selective removal of B <sub>1</sub> AR antibodies over 5 days	8/0	LVEF <35%, positive for B <sub>1</sub> AR autoantibodies	12 months	Improved LVEF (28.5 ± 6.1 to 36.6 ± 10.7; <i>P</i> = .002). Levels of B <sub>1</sub> AR autoantibodies decreased with IA and did not return during follow-up.
Felix, 2002 <sup>61</sup>	CC	IA for 3 days	11/9	NYHA III/IV, LVEF <30% vs. healthy controls	3 days	Improved CI (2.2 ± 0.1 to 2.7 ± 0.2 L/min/m <sup>2</sup> ; <i>P</i> < .01).
Mobini, 2003 <sup>36</sup>	CS	IA for 3 days with 0.5 g/kg of IgG substitution on day 3, followed by 2 sessions once per month for 3 months	22/0	NYHA III-IV, LVEF <30%	3 months	No difference in CI and LVEF between B <sub>1</sub> AR antibody-positive and B <sub>1</sub> AR antibody-negative patients.
Staudt, 2005 <sup>64</sup>	CC	IA with improved IgG3 removal vs. normal IA	9/9	NYHA III/IV, LVEF <35%	3 months	Greater improvement in LVEF using IA with improved IgG3 removal (24.3 ± 2 to 34.7 ± 4% vs. 21.6 ± 2% to 24.4 ± 2%; <i>P</i> < .05).
Schimke, 2001 <sup>63</sup>	CS	Selective removal of B <sub>1</sub> AR antibodies	8/0	Not reported	12 months	Significant decrease in oxidative stress and an increase in wall motion velocity and LVEF.
Staudt, 2006 <sup>66</sup>	RCT	One session of IA vs. 1 session per month for 3 months	11/11	NYHA III/IV, LVEF <35%	6 months	Improved LVEF ( <i>P</i> < .01), but no difference between groups.
Cooper, 2007 (65)	CS	IA for 5 days	4/0	NYHA II/III, mean LVEF 34.6 ± 12.3%	6 months	Decrease in total IgG and IgG3 ( <i>P</i> < .05), but no change in LVEF.

B<sub>1</sub>AR, beta-1 adrenoreceptor; CC, case control; CI, cardiac index; CO, cardiac output; CS, case series; IA, immunoabsorption; LVEF, left ventricular ejection fraction; MAP, mean arterial pressure; NYHA, New York Heart Association class; RCT, randomized controlled trial; Ig, immunoglobulin.

## Attachment 4: (13)

**Table 3.** Summary of Trials Evaluating the Efficacy of Intravenous Immunoglobulin in Idiopathic Dilated Cardiomyopathy

Study	Design	Intervention	Patient No. (treated/controls)	Baseline Characteristics	Follow-up	Results
Drucker 1994 <sup>73</sup>	CC	2 g/kg IVIg over 24 h	21/25	Pediatric patients presenting with acute myocarditis and historical controls	12 months	The treated group had a greater likelihood of achieving normal LVEF at 1 y ( <i>P</i> = .03), and the probability of survival tended to be higher among IVIg-treated patients (0.84 vs. 0.60, <i>P</i> = .069).
McNamara, 1997 <sup>71</sup>	CS	2 g/kg IVIg over 2–4 days	10/0	Symptoms <6 months, NYHA III-IV, LVEF <40%	12 months	Improved LVEF (24 ± 2% to 41 ± 4%; <i>P</i> = .003).
Gullestad, 2001 <sup>69</sup>	RCT	0.4 g/kg IVIg for 5 days followed by 0.4 g/kg monthly for 5 months	ICM 11/12 iDCM 9/8	NYHA II/III, LVEF <40%	6.5 months	Improved LVEF in the treatment group (26 ± 2% to 31 ± 3%; <i>P</i> < .01); significant decrease in anti-inflammatory markers and BNP ( <i>P</i> < .001).
McNamara, 2001 <sup>70</sup>	RCT	2 g/kg IVIg over 2 days	62/31	Symptoms <6 mo, NYHA II/III, LVEF <40%	12 months	Improved LVEF when compared to baseline (25 ± 0.08% with 42 ± 14%; <i>P</i> < .001), but no difference between treatment and placebo.
Kishimoto, 2003 <sup>72</sup>	CS	1-2 g/kg IVIg over 2 days	9/0	Symptoms <6 months, NYHA III-IV, LVEF <40%	12 days	Improved LVEF (19 ± 7.5% to 35 ± 9.1%; <i>P</i> < .01).

CS, case series; CC, case control; ICM, ischemic cardiomyopathy; iDCM, Idiopathic dilated cardiomyopathy; IVIg, intravenous immunoglobulin; LVEF, left ventricular ejection fraction; RCT, randomized controlled trial; NYHA, New York Heart Association class.