

## Free Communications

### Liquoronderzoek in de differentiële diagnostiek van multipele systeematrofie

W.F. ABDO<sup>1</sup>, B.R. BLOEM<sup>1</sup> en M.M. VERBEEK<sup>1,2</sup>

Multipele systeematrofie (MSA) kenmerkt zich klinisch door een combinatie van parkinsonisme, cerebellaire klachten, autonome functiestoornissen en in mindere mate ook piramidale afwijkingen. Wanneer de parkinsonistische verschijnselen het klinisch beeld domineren (MSA-P) is het vaak moeilijk deze aandoening te differentiëren van de ziekte van Parkinson (ZvP). Wanneer bij het debuut de cerebellaire klachten domineren (MSA-C) kan het onderscheid tussen MSA-C en de zogenaamde idiopathische late-onset cerebellaire ataxie (ILOCA) klinisch niet eenvoudig zijn. Omdat de mediane overleving en het klinisch beloop van MSA aanzienlijk ongunstiger zijn dan van ZvP en ILOCA, is het onderscheid tussen deze ziektebeelden van groot belang. In de praktijk blijkt het, met name in de eerste jaren van het ziektebeloop, echter niet altijd mogelijk om op zuiver klinische gronden een goed onderscheid te maken tussen MSA-P en ZvP of MSA-C en ILOCA. Dit resulteert in een relatief hoog percentage van fout-positieve en -negatieve diagnoses.

In dit artikel zullen wij kort de resultaten van enkele studies bespreken waarbij we de aanvullende waarde van liquoronderzoek in het differentiëren van MSA van ZvP en ILOCA hebben onderzocht.

#### Onderzoeksresultaten

##### *Liquoronderzoek als diagnosticum bij het differentiëren tussen MSA-P en ZvP (1, 2)*

In deze studies werden, behalve routine liquorparameters, ook diverse hersenspecifieke eiwitten en neurotransmittermetabolieten geanalyseerd. Uit deze twee studies bleek dat de concentraties van meerdere hersenspecifieke eiwitten verhoogd zijn bij MSA-P waarbij neurofilament-‘light’- en -‘high-chain’-eiwitanalyses (respectievelijk NFL en NFH), en in mindere mate het tau-eiwit, het beste discrimineerden, met een sensitiviteit en specificiteit > 83% (zie tabel 2). De dopaminerge (HVA), serotonerge (5-HIAA) en noradrenerge (MHPG) neurotransmittermetabolieten waren alle ver-

laagd bij patiënten met MSA-P. De MHPG-analyse discrimineerde het beste tussen ZvP en MSA-P (zie tabel 2). Multivariate logistische regressie resulteerde in het volgende model:  $X = NFL + 0,15 \times \text{Tau}$  met een sensitiviteit van 88% voor het aantonen van MSA-P en specificiteit van 87% voor het uitsluiten van ZvP.

##### *Liquoronderzoek als diagnosticum bij het differentiëren tussen MSA-C en ILOCA (3)*

In deze studie analyseerden we, behalve de routine-liquorparameters, wederom hersenspecifieke eiwitten en neurotransmittermetabolieten. Bij MSA-C vonden we in vergelijking met ILOCA verhoogde concentraties van NFL, NFH (en in mindere mate tau) en verlaagde concentraties van HVA, 5-HIAA en MHPG. Resultaten van de ROC-analyse staan vermeld in tabel 3.

Multivariate logistische regressie resulteerde in het volgende model:  $X = 162 - 6,4 \times \text{NFL} + 2,3 \times \text{MHPG} - 0,5 \times \text{Tau}$ . Door middel van deze formule was het (theoretisch) mogelijk om onze patiënten met een sensitiviteit en specificiteit van 100% van elkaar te onderscheiden.

##### *Liquorparameters in MSA-C vs. MSA-P (4)*

In deze studie vergeleken we de bovengenoemde liquorparameter bij MSA-C- en MSA-P-patiënten. We vonden geen statistische significante verschillen tussen de algemene liquorparameters, hersenspecifieke eiwitten en neurotransmittermetabolieten.

#### Interpretatie

Uit de bovenstaande studies blijkt dat middels liquoronderzoek MSA redelijk betrouwbaar van de ZvP en ILOCA onderscheiden kan worden. De concentraties van meerdere hersenspecifieke eiwitten waren bij MSA-patiënten verhoogd en de concentratie van de neurotransmittermetabolieten verlaagd. Globaal kunnen de verschillende neurodegeneratieve bewegingsstoornissen op basis van liquoronderzoek ingedeeld worden zoals weergegeven in figuur 1.

De verhoogde concentraties van hersenspecifieke eiwitten worden waarschijnlijk veroorzaakt door de uitgebreidere en versnelde degeneratie van neuronale en gliale celpopulaties in het centrale zenuwstelsel bij MSA. Studies van andere onderzoeksgroepen hebben ook aangetoond dat met name de concentraties van neurofilamenteiwitten kunnen differentiëren tussen patiënten met ZvP en MSA-P (5). Ook in onze studies waren de best discriminerende analyses diverse axonale eiwitten zoals NFL, NFH en tau. Deze eiwit-

Afdeling Neurologie, Parkinson Centrum Nijmegen (ParC)<sup>1</sup> en Laboratorium Kindergeneeskunde en Neurologie<sup>2</sup>, Universitair Medisch Centrum St. Radboud Nijmegen

Het onderzoek en drs. W.F. Abdo werden ondersteund door onderzoekssubsidie van de Stichting Internationaal Parkinson Fonds. Dr. ir. M.M. Verbeek werd o.a. ondersteund door een subsidie van het ZonMW (nummer 917.46.331, ‘Vidi Programma’).

**Tabel 1.** Totale patiëntenpopulatie met gemiddelde leeftijd en ziekteduur ± standaarddeviatie

	MSA-C	MSA-P	ZvP	ILOCA	Controles
Leeftijd (jr)	60,9 ± 7,8	59,6 ± 6,6	52,5 ± 10,8	61 ± 10,5	52,8 ± 9,2
Ziekteduur (jr)	4,1 ± 2,2	4,1 ± 2,1	3,6 ± 2,8	7,3 ± 4,4	n.v.t.
Aantal	27	19	31	18	106

**Tabel 2.** ROC-analyse voor het onderscheid tussen MSA-P en ZvP

Liquorparameter	Afkappunt	Sensitiviteit	Specificiteit
NFL (ng/l)	> 17,15	83 %	90 %
NFH (ng/l)	> 114,5	83 %	87 %
Tau (ng/l)	> 227	76 %	97 %
MHPG (nM)	< 40,5	94 %	83 %

**Tabel 3.** ROC-analyse voor het onderscheid tussen MSA-C en ILOCA

Liquorparameter	Afkappunt	Sensitiviteit	Specificiteit
NFL (ng/l)	> 24,4	79 %	94 %
NFH (ng/l)	> 145	87 %	83 %
MHPG (nM)	< 40,5	86 %	75 %
HVA (nM)	< 40,5	71 %	68 %
5-HIAA (nM)	< 40,5	59 %	100 %

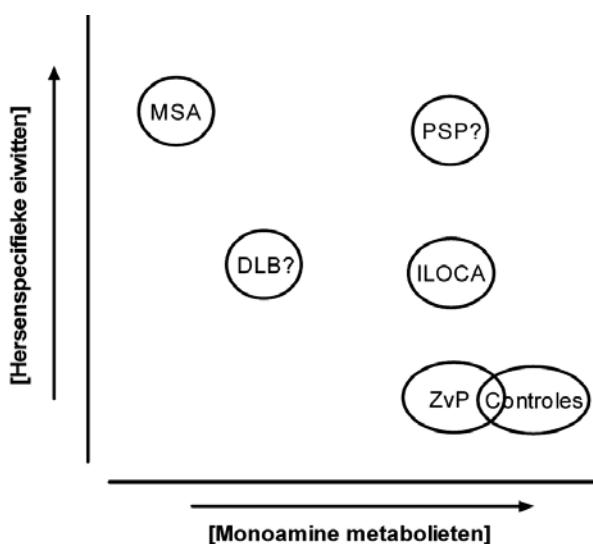
ten spelen een grote rol in het intact houden van het axonaal cytoskelet en bij axonaal transport. Wanneer grote aantallen neuronen bij het neurodegeneratief proces te gronde gaan, leidt dit tot onherroepelijke schade en verval van de lange en vaak grote (gemyeliniseerde) axonen van deze neuronen. Juist bij MSA is er sprake van verval van meerdere systemen waarbij grote gemyeliniseerde axonen degenereren (b.v. de piramidebanen), wat kan leiden tot hogere extracellulaire concentraties van cytoskeleteiwitten.

Dopaminerge, noradrenerge en serotonerge neuronale populaties zoals de substantia nigra (dopamineproductie; metabooliet: HVA), locus coeruleus en kernen in de ventrolaterale medulla (noradrenalineproductie; metabooliet: MHPG) en de nucleus van raphe (serotonineproductie; metabooliet: 5-HIAA) zijn bij MSA sterker aangedaan dan bij de andere aandoeningen, wat

resulteert in een verminderde aanmaak in het centrale zenuwstelsel van deze neurotransmitters. Onze bevindingen van verlaagde concentraties van deze neurotransmittermetabolieten (HVA, 5-HIAA en MHPG) bij MSA in vergelijking met ZvP en ILOCA sluiten aan bij eerdere bevindingen (6, 7). De MHPG-analyse was het meest discriminerend van de drie neurotransmittermetabolieten. De afname van deze noradrenerge metabooliet correleert ook met het klinisch beeld van MSA waarbij het autonoom falen (grotendeels noradrenerg gereguleerd) zeer uitgesproken is.

Momenteel loopt er in het UMC St Radboud een groot prospectief opgezet onderzoek, waaraan 165 parkinsonistische patiënten meewerken, met onder andere als doel om de bovenstaande resultaten te valideren. Over 1,5 jaar is de follow-up ten einde en zullen de resultaten bekend zijn.

Zowel MSA als de ZvP worden neuropathologisch gekenmerkt door de neerslag van het eiwit alfa-synucleïne in aangedane structuren van het centrale zenuwstelsel. Het analyseren van de concentratie alfa-synucleïne in liquor zou mogelijk, in combinatie met de neurofilamenten, van waarde kunnen zijn. Middels de commercieel verkrijgbare alfa-synucleïneassays is het tot op heden niet goed mogelijk geweest om de concentratie van alfa-synucleïne in de liquor te meten. Vorig jaar is het een onderzoeksgroep gelukt om de liquorconcentratie van alfa-synucleïne te meten (8). De betrouwbaarheid van deze assay staat ter discussie vanwege de concentratieprocedure die aan de assay vooraf gaat. Onze groep heeft inmiddels deze assay geoptimaliseerd en de resultaten van alfa-synucleïneanalyse in liquor van parkinsonistische patiënten zullen binnenkort bekend worden.



**Figuur 1.** Globaal overzicht van het spectrum van de afwijkingen in de concentraties van liquorparameters bij de verschillende extrapyramidale stoornissen. Met de hersenspecifieke eiwitten wordt met name NFL en NFH bedoeld. PSP = progressieve supranucleaire paralyse, DLB = dementie met Lewy-bodies. PSP en DLB zijn andere parkinsonistische syndromen die in de differentiaaldiagnose van MSA en de ZvP staan. Vraagtekens duiden op nog onvoldoende wetenschappelijke onderbouwing.

## Referenties

1. Abdo WF, Jong D de, Hendriks JCM et al. Cerebrospinal fluid analysis differentiates multiple system atrophy from Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2004; 19: 571-9.
2. Abdo WF, Bloem BR, Geel WJ van, Esselink RA, Verbeek MM. CSF neurofilament light chain and tau differentiate multiple system atrophy from Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2007; 28: 742-7.

3. Abdo WF, Warrenburg BP van de, Munneke M et al. CSF analysis differentiates multiple-system atrophy from idiopathic late-onset cerebellar ataxia. *Neurology*. 2006; 67: 474-9.
4. Abdo WF, Warrenburg BP van de, Kremer HP, Bloem BR, Verbeek MM. CSF biomarker profiles do not differentiate between the cerebellar and parkinsonian phenotypes of multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat Disord*. 2007. [Epub ahead of print]
5. Holmberg B, Rosengren L, Karlsson JE, Johnels B. Increased cerebrospinal fluid levels of neurofilament protein in progressive supranuclear palsy and multiple-system atrophy compared with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1998; 13: 70-7.
6. Polinsky RJ, Jimerson DC, Kopin IJ. Chronic autonomic failure: CSF and plasma 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol. *Neurology*. 1984; 34: 979-83.
7. Polinsky RJ, Brown RT, Burns RS, Harveywhite J, Kopin IJ. Low lumbar Csf levels of homovanillic-acid and 5-hydroxy-indoleacetic acid in multiple system atrophy with autonomic failure. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988; 51: 914-9.
8. Tokuda T, Salem SA, Allsop D et al. Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 349: 162-6.

*Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2007; 32: 252-254

## **Harmonisation of CEA, CA 125, CA 15.3 and CA 19.9 assay results: a pilot study within the framework of the Dutch Project 'Calibration 2000'**

A.Y. DEMIR<sup>1</sup>, J.M.G. BONFRÈR<sup>2</sup> and E.G.W.M. LENTJES<sup>1</sup>

Many quality-management systems focus on the reduction of intra- and inter-laboratory variations. The extend of imprecision can have a large impact on patient classification, on the number of patients to be treated and on the follow-up strategy of patients. When internationally accepted cut-off values without the specification of the method are used in guidelines for the treatment of patients having malignancies, differences in treatment will exist as a result of lack of proper calibration and harmonisation of tumor marker assays. It is common knowledge that a patient should preferably be diagnosed and also monitored within one hospital due to the differences in assay methodologies and lack of harmonisation of results. Calibration and harmonisation of the immunoassay technologies and the continuity of such harmonization in time are, therefore, very important. The most important handicap in the calibration and harmonization of tumor marker assay results is the lack of a uniform calibrator or a harmonization sample among laboratories. In addition, there are neither reference methods for CEA, CA 125, CA 15.3 and CA 19.9 nor reference materials except for CEA assays.

In the Netherlands the project 'Calibration 2000' has aimed to harmonise laboratory results from as many laboratory disciplines as possible via calibration by development of commutable, human matrix based, secondary reference materials (Baadenhuijsen et al. 2002). The present study is a pilot study within the framework of this initiative. The Dutch national exter-

nal quality assessment schemes (SKML-Endocrinology-EQAS) for tumor markers (CEA, CA125, CA15.3 and CA19.9) demonstrate systematic differences between methods (Figure 1a). This makes it likely that a commutable calibrator with native patient material can possibly reduce these differences and will harmonise patient results (Miller et al. 2006). The surveys are provided with two lyophilised human serum pools supplemented with 2 to 5 patient samples and include six surveys per year. In the present study it was, therefore, aimed to assess potential calibrators, for their suitability as a commutable calibrator for tumor marker assays.

### **Materials and Methods**

A modified NCCLS EP14 protocol, the 'twin-study design', which in essence is a multicenter, split-patient-sample, between-field-methods protocol, is used. The patient sera and potential calibrators were simultaneously analyzed for the tumor markers CEA, CA 125, CA 15.3 and CA 19.9 in the same analytical run.

Laboratories using different immunoassay technologies (e.g.: IMx, AxSYM, Architect, E170, Immulite 2000, Centaur) were invited to participate in this study. The study protocol consisted of an exchange of ten fresh patient sera between each of two laboratories forming a laboratory couple; seven laboratory couples were formed. The ten fresh patient sera were split into two portions. Potential calibrators were human serum pools, either liquid (n=8, SEPOOL) or lyophilized (n=1, LYOPHIL) and a commercially available liquid Bioref human serum (BIOREF) supplemented with tumor markers. To evaluate the effect of standardization, all assay results were recalculated on the basis of one of the potential calibrators.

---

*Department of Clinical Chemistry and Haematology<sup>1</sup>, University Medical Center, Utrecht, The Netherlands and Antoni van Leeuwenhoek Hospital<sup>2</sup>, Amsterdam, The Netherlands*