

# **PAOKC-cursus**

## **Liquor cerebrospinalis en andere lichaamsvochten**

**Nederlandse  
Vereniging voor  
Klinische  
Chemie**

**Donderdag 23 mei 2002  
Auditorium Ziekenhuis Gelderse Vallei  
Ede**

## **ORGANISATIE**

De cursus wordt georganiseerd door de Kring Gelre van de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie.

### **Organisatiecommissie**

Dr. P.M.W. Janssens	Ziekenhuis Rijnstate Arnhem
Dr. M.H. de Keijzer	Universitair Medisch Centrum St. Radboud Nijmegen
Dr.ir. A.W.H.M. Kuypers	Universitair Medisch Centrum St. Radboud Nijmegen
Drs. J. Stakenburg	Gelre Ziekenhuizen Apeldoorn
Dr. A.C.W. Swart	Ziekenhuis Gelderse Vallei Ede
Dr.ir. M.M. verbeek	Universitair Medisch Centrum St. Radboud Nijmegen
Prof.dr. R.A. Wevers	Universitair Medisch Centrum St. Radboud Nijmegen

## **SPREKERS**

**Dr. H. Baadenhuijsen**

Klinisch Chemicus  
UMC St. Radboud, Nijmegen

**Dr. M. Janssen**

Reumatoloog  
MS Centrum Nijmegen, Nijmegen

**Dr. P. Jongen**

Neuroloog  
MS Centrum Nijmegen, Nijmegen

**Prof.dr. C.J.J. Mulder**

Maag-darm-leverarts  
Ziekenhuis Rijnstate, Arnhem

**Mw. dr. J.E. Nagtegaal**

Ziekenhuisapotheker  
Ziekenhuis Eemland, Amersfoort

**Prof.dr. H. Reiber**

Clinical Chemist  
Universität Göttingen, Göttingen

**Dr. H.A. Ross**

Biochemicus  
UMC St. Raboud, Nijmegen

**Prof.dr. A. Twijnstra**

Neuroloog  
Academisch Ziekenhuis Maastricht, Maastricht

**Mw. dr. M.J.T. van de Ven**

Longarts  
Ziekenhuis Rijnstate, Arnhem

**Dr.ir. M.M. Verbeek**

Biochemicus  
UMC St. Radboud, Nijmegen

**Drs. J.L. Yntema**

Kinderlongarts  
UMC St. Radboud, Nijmegen

## PROGRAMMA

08.30 – 09.40 **Registratie, koffie**

09.40 – 09.45 **Opening**  
Dr. M.H. de Keijzer

### Ochtendprogramma

*Voorzitter Dr. M.M. Verbeek (Dr. M.H. de Keijzer)*

09.45 – 10.25 **Algemene liquordiagnostiek en diagnostiek van neurodegeneratieve aandoeningen**  
Dr.ir. M.M. Verbeek

10.25 – 11.05 **CSF protein analysis, evaluation of immunoglobulin patterns in quotient diagrams and quality control**  
Prof.dr. H. Reiber

11.05 - 11.20 **Koffie**

11.20 – 11.55 **State of the art liquoronderzoek bij Multiple Slerose**  
Dr. P. Jongen

11.55 - 12.30 **Liquor onderzoek bij neuro-oncologische problematiek**  
Prof.dr. A. Twijnstra

12.30 – 13.30 **Lunch**

### Middagprogramma

*Voorzitter Dr P.M.W. Janssens*

Inleiding: differentiatie en diagnostiek van lichaamsvochten

13.40 – 14.00 **To make money out of shit**  
Prof.dr. C.J.J. Mulder

14.00 – 14.20 **Opzet en toepassing van diverse bepalingmethoden voor melatoninen: het hormoon van het donker**  
Dr. J.E. Nagtegaal

14.20 – 14.40 **Meting van steroidhormonen in speeksel: mogelijkheden en beperkingen**  
Dr. A. Ross

14.40 – 14.55 **Thee**

14.55 – 15.15 **Diagnostiek met betrekking tot pleuravocht: klinische implicaties**  
Dr. M.J.T. van de Ven

15.15 – 15.35 **Nut een noodzaak van metingen in synoviaalvocht**  
Dr. M. Janssen

15.35 – 16.15 **Zweet en Cystic Fibrose/Resultaten SKZL zweettest enquête**  
Dr. J.L. Yntema / Dr. H. Baadenhuijsen

16.15 **Sluiting en borrel**

# INHOUD

	pagina
<b>Algemene liquor diagnostiek en diagnostiek van neurodegeneratieve aandoeningen</b> <i>M.M. Verbeek</i>	5
<b>CSF protein analysis, evaluation of immunoglobulin patterns in quotient diagrams and quality control</b> <i>H. Reiber</i>	13
<b>Klinisch belang van liquoranalyse bij multiple sclerose</b> <i>P. Jongen</i>	14
<b>Neuro-oncology and Cerebrospinal fluid</b> <i>A. Twijnstra</i>	17
<b>Herkenning van verschillende lichaamsvloeistoffen</b> <i>P.M.W. Janssens</i>	21
<b>How to make money out of shit</b> <i>C.J.J. Mulder</i>	24
<b>Opzet en toepassing van diverse bepalingsmethoden voor melatonine: het hormoon van het donker</b> <i>J.E. Nagtegaal</i>	25
<b>Meting van steroïdhormonen in speeksel: mogelijkheden en beperkingen</b> <i>H.A. Ross</i>	27
<b>Diagnostiek met betrekking tot pleuravocht: klinische implicaties</b> <i>M.J.T. van de Ven</i>	30
<b>Onderzoek van synoviaal vocht</b> <i>M. Janssen</i>	32
<b>De gestoorde zweettest en cystic fibrosis: het pathofysiologisch verband</b> <i>J.L. Yntema</i>	35
<b>Resultaten SKZL Zweettest enquête</b> <i>H. Baadenhuijsen</i>	38

# Algemene liquor diagnostiek en diagnostiek van neurodegeneratieve aandoeningen

M. M. Verbeek

## Samenstelling en productie van liquor

Liquor cerebrospinalis (Engels: cerebrospinal fluid, CSF) bevindt zich in de ventrikels van de hersenen en in de subarachnoïdale ruimtes en staat in nauw contact met de extracellulaire vloeistof van de hersenen<sup>1</sup>. De samenstelling van de liquor is aldus een afspiegeling van het metabolisme van de hersenen. Ondanks de grote vooruitgang op het gebied van niet-invasieve beeldvormende technieken als MRI en CT, maakt de lumbale punctie, waarbij liquor afgenomen wordt, nog steeds een belangrijk onderdeel uit van de neurologische diagnostiek.

Liquor is een dynamisch medium dat continu circuleert en voortdurend wordt aangemaakt en weer geabsorbeerd en fungeert min of meer als het drainage systeem van de hersenen. Onder normale omstandigheden wordt er bij de mens ongeveer 0.35 ml/min (500 ml/dag) liquor gevormd. Het totale volume van normale liquor bedraagt 150 ml, wat betekent dat de liquor ongeveer 4 keer per dag wordt verversd. Hoewel de exacte locaties van de productie van liquor nog niet opgehelderd zijn, zijn er in elk geval twee mechanismen van liquor productie bekend. Het grootste deel van de liquor wordt gevormd in de plexus choroïdeus van de zijventrikels en in geringere mate door de plexus choroïdeus van de derde en vierde ventrikels. Liquor wordt hier gevormd door filtratie van plasma door gefenestreerde capillairen en actief transport van water en opgeloste stoffen door de epitheelcellen van de bloed-liquor barrière. Daarnaast bestaan er aanwijzingen dat liquor gevormd kan worden door "lymfge-achtige" drainage van extracellulaire vloeistof van de hersenen. Resorptie van liquor vindt voor het grootste deel plaats in de arachnoïdale villi en granulaties. De liquor wordt hier opgenomen in de circulatie; de drijvende kracht achter deze resorptie is het verschil tussen de liquordruk en de veneuze druk. Een obstructie in de liquor circulatie, een overmatige liquorproductie of tekort schietende resorptie leidt tot een hydrocephalus.

In diverse opzichten weerspiegelt de samenstelling van liquor die van het bloedplasma, maar dan in een sterk verdunde vorm. Actief transport en cerebrale productie van bepaalde componenten dragen bij tot de specifieke samenstelling van liquor. Deze samenstelling is sterk aan veranderingen onderhevig onder invloed van diverse neurologische aandoeningen. Diverse parameters zijn voorhanden om deze veranderingen waar te nemen.

## Neurochemische parameters in liquor

### *Bloedpigmenten en cellen*

Liquor cerebrospinalis is normaal gesproken een kristalheldere en kleurloze vloeistof. Het is daarom relatief eenvoudig om vast te stellen aan de hand van bloedpigmenten of er een bloeding heeft plaats gevonden in de hersenen. De aanwezigheid van erythrocyten is de eerste indicator voor een bloeding. Het aantal rode bloedcellen is gewoonlijk maximaal in de eerste 24 uur en neemt geleidelijk af gedurende de hierop volgende dagen. Door hemolyse van rode bloedcellen komt oxyhemoglobine al binnen 2 uur na de bloeding vrij. Oxyhemoglobine is rood en na verdunning roze of oranje. De maximale hoeveelheid hemoglobine wordt bereikt na 24-48 uur en verdwijnt vervolgens in de volgende 7 tot 10 dagen. Macrofagen en andere cellen in de leptomeningen zetten hemoglobine om in bilirubine. Bilirubine is een ijzervrij geel-gekleurd derivaat van hemoglobine. Daarom wordt bilirubine later aangetroffen dan hemoglobine (vanaf ongeveer 10 uur na de bloeding). Bilirubine verdwijnt slechts langzaam en kan meer dan 14 dagen aanwezig blijven in de liquor. In ons laboratorium worden bloedpigmenten spectrofotometrisch bepaald. Indien de absorptie bij 415 nm groter is dan 0.023 wordt een volledig spectrum gemaakt waaruit de concentraties hemoglobine en bilirubine bepaald worden. De tweede afgeleide van het signaal tussen 573 en 578 nm (hemoglobine) en 460 en 478 nm (bilirubine) is recht evenredig met de concentratie van het

betreffende bloedpigment. De hoeveelheid bilirubine wordt gecorrigeerd voor de bilirubine aanwezig ten gevolge van sterk verhoogd liquoreiwit. Tenslotte kan er nog methemoglobine aangetroffen worden, een bruin reductieproduct (donkergeel bij verdunning) van hemoglobine, aangetroffen bij ingekapselde subdurale hematomen.

Het is belangrijk onderscheid te maken tussen bloed in de liquor ten gevolge van een traumatische punctie of een subarachnoïdale bloeding. Bij een traumatische punctie en afname van liquor in verschillende buizen, zal de liquor roodgekleurd zijn in de eerste buis en helder in de laatste. Bij een subarachnoïdale bloeding zijn alle buizen rood gekleurd. Na centrifugatie van liquor is het supernatant helder in geval van een traumatische punctie en rood ten gevolge van hemolyse van rode bloedcellen bij een bloeding als het bloed 4 uur of langer aanwezig is geweest in de liquorruimtes.

In liquor worden gewoonlijk maximaal 4 leukocyten per  $\mu\text{l}$  aangetroffen. Dit getal kan, behalve door bloedingen, sterk toenemen ten gevolge van bijvoorbeeld infecties, ontstekingen of tumoren. Bij pleiocytose kan een differentiatie van cellen aanvullende informatie geven (zie hierna bij "infecties"). Ten gevolge van een traumatische punctie neemt het aantal leukocyten ook toe, en wel met ongeveer 1 leukocyt per 700-1000 erythrocyten. Bij zeer jonge kinderen (preterm, neonaten) is het aantal leukocyten in de liquor hoger dan  $4/\mu\text{l}$ ; een aantal van  $20/\mu\text{l}$  is nog normaal.

#### *Glucose, lactaat en pyruvaat*

De hersenen zijn voor de energie voorziening sterk afhankelijk van glucose. De glucose concentratie in liquor is sterk afhankelijk van de heersende serumconcentratie. De glucose liquor/bloed ratio is hoger dan 0.5 onder normale omstandigheden. Een verlaagde glucose ratio wordt aangetroffen bij diverse aandoeningen, o.a. bacteriële meningitis, leptomenigeale metastasen en subarachnoïdale bloedingen. Een genetisch defect in het glucose transporter eiwit verantwoordelijk voor transport van glucose over de bloed-hersens barrière leidt ook tot een sterk verlaagde glucose ratio.

De lactaat concentratie in liquor is niet afhankelijk van de bloedconcentratie. Een sterk verhoogde concentratie van lactaat in liquor wordt aangetroffen bij infecties veroorzaakt door bacteriën of schimmels, terwijl de lactaat concentratie bij virale infecties normaal of slechts licht verhoogd is. Bij een bacteriële infectie is het D-lactaat gehalte verhoogd. Patiënten met een defect in de mitochondriële ademhalingsketen kunnen eveneens een verhoogd lactaat gehalte in liquor hebben. Ten gevolge van een CVA kan lactaat ook verhoogd zijn. Ook bij patiënten met een leptomenigeale metastase of primaire cerebrale tumor kan het lactaat gehalte verhoogd zijn. Erythrocyten zetten eveneens glucose anaeroob om in lactaat en kunnen dus ook bijdragen aan een verhoogd lactaat gehalte.

De verhouding tussen de concentraties lactaat en pyruvaat weerspiegelt de redox staat van de hersenen ofwel de verhouding tussen anaerobe en aerobe conversie van glucose. Ten gevolge van hypoxie of ischemie kan de lactaat/pyruvaat ratio sterk verhoogd zijn.

#### *Eiwit en albumine*

Het totaal eiwit gehalte in liquor is bij vele aandoeningen verhoogd en is een tamelijk specifieke marker voor neurologische ziekte. De concentratie totaal eiwit in liquor is sterk afhankelijk van de leeftijd en varieert tussen 300 en 1100 mg/L. Grofweg 60% van het totale eiwit bestaat uit albumine. Het functioneren van de bloed-liquor barrière (het epitheel van de plexus choroïdeus) wordt vastgesteld door bepaling van de ratio tussen albumine in liquor en bloed (Q-albumine); deze is methode-onafhankelijk en tevens onafhankelijk is van de serumconcentratie (zie onder). Evenals het gehalte aan totaal eiwit is deze Q-albumine sterk leeftijdsafhankelijk.

Verschiedene neurologische omstandigheden kunnen aanleiding geven tot verhoogde permeabiliteit van de BLB zoals: anoxie, ischemie, intoxicatie, ontsteking en trauma capitis. Een lichte BLB-permeabiliteitsstoornis (Q-Albumine tot  $8 \times 10^{-3}$ ) komt voor o.a. bij multiple sclerose (MS), neurosyfilis, neurodegeneratieve aandoeningen, alcoholische polyneuropathie en chronische HIV-encephalitis; een matige BHB-stoornis (Q-Albumine tot  $25 \times 10^{-3}$ ) o.a. bij virale meningitis, MS, Guillain-Barré Syndroom en Chronische Inflammatoire Demyeliniserende

Polyneuropathie, neuroborreliose, neurosyphilis, encephalitis door herpes simplex, opportunistische infecties (toxoplasmose, CMV, cryptococcon), diabetische polyneuropathie, herseninfarct en meningoencephalitis; een ernstige BLB-stoornis ( $Q\text{-Albumine} > 25 \times 10^{-3}$ ) bij bacteriële meningitis, neuroborreliose, neurotuberculose. Een verhoogde Q-Albumine t.g.v. een liquorcirculatiestoornis komt voor bij ruimte-innemende processen, zoals tumoren en (subarachnoïdale) bloedingen.

### *Immuunglobulinen in liquor*

De concentratie van immuunglobulinen in liquor is sterk afhankelijk van de heersende serumconcentratie en wordt bepaald door het transport over de bloed-liquor barrière. Voor het vaststellen van een intrathecale productie van immuunglobulinen, wordt er gebruik gemaakt van de relatie tussen Q[IgG] (of IgM, IgA) en Q[albumine]. Aangezien de passage van eiwitten over de bloed-liquor barrière afhankelijk is van het molecuulgewicht, wordt er relatief minder IgG ( $M_w=150$  kD) dan albumine ( $M_w=67$  kD) over de bloed-liquor barrière getransporteerd. Het verband tussen Q[IgG] en Q[albumine] is dan ook niet lineair. De intrathecale productie van immuunglobulinen kan berekend worden via formules of zichtbaar worden gemaakt met behulp van een empirisch diagram dat het verband tussen Q[IgG] en Q[albumine] weergeeft. De intrathecale productie van IgG is meestal in de vorm van een oligoclonale respons. De gevoeligste methode om dit vast te stellen is iso-electrisch focussing gevolgd door immunoblotting met specifieke anti-IgG antilichamen (zie figuur 2). Verschillende patronen kunnen worden waargenomen. Bij een normale iso-electrische focussing worden geen oligoclonale IgG banden aangetroffen (figuur 2A). Een monoclonale productie van IgG resulteert in een zeer karakteristiek beeld in serum en liquor (figuur 2B). Een systemische oligoclonale immuunrespons resulteert in oligoclonale IgG banden in zowel serum als liquor (figuur 2C). Indien unieke oligoclonale banden worden aangetroffen in liquor (figuur 2D) betekent dit dat er een intrathecale infectie, ontsteking of auto-immuun reactie is opgetreden. Intracerebrale IgG productie wordt zeer frequent ( $\pm 90\%$ ) aangetroffen bij multiple sclerose patiënten. IgG productie wordt ook waargenomen bij patiënten met een chronische meningitis of encephalitis, bij cerebrale vasculitis en lupus erythematosus, neurosyphilis en auto-immuun ziekten als neuro-Behçet, acute disseminated encephalomyelitis, neurosarcoïdose en AIDS-dementie complex. Bij patiënten met neuroborreliose wordt er eerst een verhoogde IgM productie gevonden, pas veel later gevolgd door een IgG productie. IgA productie wordt aangetroffen bij aseptische meningitis, herpes encephalitis en neurotuberculosis. IgM productie, gevolgd door IgG productie, wordt bij diverse infectieziekten gemeten en bij MS.

### *$\beta_2$ -transferrine*

Het vaststellen van eventuele lekkage van liquor cerebrospinalis naar neus of oor, meestal ten gevolge van een trauma, is belangrijk in de diagnostiek, omdat hierdoor het risico op een bacteriële meningitis verhoogd geacht moet worden. Een dergelijke liquorlekkage kan vastgesteld worden door de analyse van het  $\beta_2$ -transferrine eiwit.  $\beta_2$ -transferrine maakt ongeveer 15% uit van de totale hoeveelheid transferrine in liquor, en wordt niet aangetroffen in serum, neusvocht, tranen of andere lichaamsvloeistoffen.  $\beta_2$ -transferrine wordt gevormd doordat siaalzuur groepen afgesplitst worden van het natieve molecuul, het zogenaamde  $\beta_1$ -transferrine, onder invloed van de enzymatische neuraminidase activiteit aanwezig in de hersenen. In verouderde literatuur wordt  $\beta_2$ -transferrine (asialo-transferrine) ook wel tau-transferrine of simpelweg tau genoemd, wat beslist niet verward moet worden met het microtubuli-bindende eiwit *tau* (zie ook hierna).  $\beta_2$ -transferrine wordt geanalyseerd in lichaamsvochten door middel van elektroforese, gevolgd door blotting van de eiwitten op nitrocellulose en immunodetectie met transferrine antilichamen. Op deze wijze wordt het  $\beta_2$ -transferrine duidelijk gescheiden van het  $\beta_1$ -transferrine, waarmee dus aangetoond kan worden of een lichaamsvloeistof al dan niet liquor bevat.

### *Hersenspecifieke eiwitten*

Er bestaat een toenemende behoefte om de mate van celschade in de hersenen ten gevolge van een infectie, neurologische ziekte of ongeval vast te stellen. De aanwezigheid in liquor van specifieke eiwitten geproduceerd door de verschillende (cellulaire) compartimenten van de hersenen kunnen een indruk geven van de mate van de aangerichte schade. Reeds enkele jaren is het in ons laboratorium mogelijk om routinematig de volgende eiwitten te meten in liquor: S-100, een calciumbindend eiwit, geproduceerd door gliale cellen (astrocyten, Schwann cellen, oligodendrocyten); glial fibrillary acidic protein (GFAP), een intermediair filament eiwit van astrocyten; neuron-specific enolase (NSE), geproduceerd door neuronen in de hersenen en myelin basic protein (MBP), dat onderdeel uitmaakt van de myeline schede van de axonen. MBP wordt geproduceerd door oligodendrocyten. De myeline schede die axonen omgeeft zorgt voor een hogere geleidingssnelheid van de elektrische signalen die door de neuronen worden uitgezonden. Bij beschadiging van de myeline schede zal het transport van signalen door de uitlopers van de neuronen sterk vertraagd worden. Bij diverse demyeliniserende aandoeningen kan een verhoogd MBP niveau in de liquor aangetoond worden. Verhoogde NSE spiegels kunnen worden gevonden bij cerebrale ischemie, tumoren, bloedingen, ontstekingen en bij neurotrauma door beschadiging van neuronen. NSE concentraties zijn ook sterk verhoogd in liquor van Creutzfeld-Jakob patiënten. Bij de ziekte van Tay-Sachs worden ook hoge NSE waarden in liquor aangetroffen. Verhoogde S100-spiegels in liquor worden aangetroffen bij acute beschadigingen van het CZS o.a. bij cerebrovasculaire accidenten, virale infecties en trauma capitis, waarbij de hoogte van de S100-spiegel gerelateerd is aan de ernst van de ziekte en de uitgebreidheid van de lesies. S-100 in liquor is ook sterk verhoogd bij Creutzfeld-Jakob disease

Van recenter datum is de mogelijkheid om de neuronale eiwitten tau en amyloïd  $\beta$  protein ( $A\beta$ ) te bepalen, waarvan de betekenis groot is voor met name de diagnose van dementie syndromen; zie onder "neurodegeneratieve aandoeningen".

Naar verwachting zal het arsenaal aan eiwitten dat een specifieke diagnostische betekenis heeft voor neurologische aandoeningen sterk toenemen. Een verbreding van het panel aan eiwitten dat inzicht kan geven in functionele of structurele verstoringen van diverse typen hersencellen (neuronen, astrocyten, oligodendrocyten, microglia) zal meer specifieke informatie opleveren over de schade die is ontstaan in de hersenen.

#### *Neurotransmitters*

Met behulp van HPLC analyse kunnen in liquor de metabolieten van de biogene monoamine neurotransmitters serotonine, dopamine en noradrenaline gemeten worden. 5-Hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) is een metaboliet van serotonine, homovanillic acid (HVA) is een metaboliet van dopamine en 3-methoxy-4-hydroxyphenylethylene glycol (MHPG) is een metaboliet van noradrenaline. Sterk afwijkende (meestal verlaagde) niveaus van deze metabolieten worden aangetroffen in liquor van patiënten met een genetisch defect in een van de enzymen die betrokken zijn bij het metabolisme van deze neurotransmitters<sup>2</sup>. Het is bekend dat er een ventriculospinale concentratiegradiënt bestaat van deze neurotransmitter metabolieten; het is voor de analyse van bovengenoemde componenten dan ook belangrijk dat een gestandaardiseerde fractie van de liquor afgenomen en onderzocht wordt.

#### *Aanbevelingen voor de praktijk*

In elk klinisch chemisch laboratorium zouden de volgende bepalingen uitgevoerd moeten kunnen worden in liquor: cellen (+ differentiatie), bloedpigmenten, glucose, lactaat, totaal eiwit, albumine, en, waar mogelijk, IgG. De bepaling van oligoclonale IgG banden dient te geschieden met behulp van iso-electrisch focussing gevolgd door immunoblotting. Indien om organisatorische redenen (kosten, aantallen monsters) het niet mogelijk deze methode toe te passen of voldoende ervaring op te bouwen in de interpretatie, verdient het aanbeveling deze analyses uit te besteden. Dit geldt eveneens voor specialistische bepalingen als de hersenspecifieke eiwitten S100, MBP, NSE en GFAP, IgA, IgM, neurotransmitter metabolieten,  $A\beta_{42}$ , tau, en  $\beta_2$ -transferrine.

#### **Indicaties voor liquoronderzoek**

### *Infecties*

Ondanks dat de hersenen goed beschermd worden door invloeden van buitenaf door de bloed-hersen barrière, is het mogelijk dat de hersenen geïnfecteerd worden door virussen, bacteriën of schimmels, leidend tot een meningitis of encephalitis<sup>3</sup>. Een snelle diagnose van de veroorzaker is dan een vereiste en onderzoek aan liquor is dan de meest voor de hand liggende methode om vast te stellen om wat voor type infectie het gaat. Bij patiënten met een *bacteriële* meningitis (zie tabel I) wordt in het algemeen een (sterk) verhoogd cel aantal waargenomen, met name van polynucleaire leukocyten. Bovendien is het totaal eiwit gehalte van de liquor sterk verhoogd evenals de lactaat concentratie, terwijl de glucose concentratie lager dan normaal is. Microbiologisch onderzoek (Gram kleuring en kweek van de bacteriën) zijn belangrijke aanvullende onderzoeken voor het vaststellen van een bacteriële infectie.

Een *virale infectie* daarentegen gaat vaak gepaard met een toename van mononucleaire lymfocyten in de liquor (hoewel deze in de eerste 48 uur vooraf gegaan kan worden door een polynucleaire leukocytaire respons) en een normale of licht verlaagde glucose en normale of licht verhoogde lactaat spiegel. Het eiwit gehalte is normaal of licht verhoogd. Het aantonen van virussen door middel van kweken is mogelijk, maar niet altijd positief. Met behulp van een PCR reactie voor diverse virussen (bijv. Herpes simplex virus I, cytomegalovirus, varicella zoster virus, Epstein-Barr virus, JC virus, enterovirussen) kan een hoge sensitiviteit en specificiteit van de diagnose bereikt worden. Echter, een positieve PCR reactie wordt met name in de eerste 7-10 dagen aangetroffen; hierna is een antilichaam productie gericht tegen het veroorzakende virus aantoonbaar.

Bij een meningitis veroorzaakt door de *tuberkel bacterie* (*Mycobacterium tuberculosis*) wordt meestal een mononucleaire celrespons, verhoogd eiwit en lactaat gehalte en een verlaagd glucose gehalte waargenomen. PCR voor het aantonen van *Mycobacterium* is een belangrijke diagnostische test.

Infectie van het centraal zenuwstelsel door schimmels kan veroorzaakt worden door een verscheidenheid aan schimmels. In de liquor worden meestal een verhoogd cel aantal aangetroffen (meestal lymfocyten, maar polynucleaire leukocyten zijn ook mogelijk), een verlaagde glucose spiegel en verhoogd totaal eiwit gehalte.

De ziekte van Lyme (*Borrelia*) wordt veroorzaakt door infectie met de spirocheet *Borrelia burgdorferi*, die overgebracht wordt na een tekenbeet. Lyme meningitis of neuroborreliose kan binnen enkele maanden na de initiële infectie ontstaan door invasie van het centraal en/of perifere zenuwstelsel door de spirocheet. De afwijkingen die waargenomen worden in de liquor betreffen: verhoogd cel aantal (lymfocyten, monocytten of beiden); verhoogd eiwit en albumine ratio. Het aantonen van intrathecale productie van antilichamen tegen *B. burgdorferi* is een specifieke test voor de diagnose van neuroborreliose. In de vroege fase na infectie (< 3 maanden) wordt de liquor gekarakteriseerd door productie van specifieke IgM antilichamen en een sterkere pleiocytose dan in de latere fase na infectie (> 3 maanden), waarbij er specifieke IgG productie aangetoond kan worden.

### *Neuronale auto-immuun ziekten*

Diverse niet-infectieuze ziekten vertonen symptomen die sterk lijken op infecties van het centraal zenuwstelsel. Hiertoe behoren diverse auto-immuun ziekten die zich kunnen uitbreiden naar het centraal zenuwstelsel, zoals vasculitis, systemische lupus erythematosus, ziekte van Behçet, syfilis en sarcoïdose. De liquor is bij deze patiëntencategorieën niet altijd afwijkend, maar de volgende afwijkingen kunnen worden aangetroffen: verhoogd eiwitgehalte, toegenomen cel aantal (meestal mononucleaire cellen, maar ook polymorfe nucleaire cellen worden ook waargenomen), intrathecale IgG productie en oligoclonale IgG banden.

### *Inflammatoire demyeliniserende polyneuropathie*

Er bestaan twee belangrijke aandoeningen die gekenmerkt worden door demyelinisatie van de axonale wortels: chronisch inflammatoire demyeliniserende polyradiculoneuropathie (CIDP) en de acute variant, het Guillain-Barré syndroom (GBS). Bij beide aandoeningen worden in de liquor een verhoogd eiwitgehalte aangetoond, een verhoogde Q[albumine], maar in het

algemeen is het celtantal in liquor niet of nauwelijks verhoogd. Daarnaast kan, ten teken van demyelinisatie, een verhoging van MBP worden aangetoond. Verder kunnen identieke oligoclonale IgG banden aangetoond worden in zowel serum als liquor, als weergave van een systemische inflammatoir proces.

### *Neurodegeneratieve aandoeningen*

De belangrijkste ontwikkelingen in de liquordiagnostiek over de laatste jaren hebben plaatsgevonden op het terrein van de diagnostiek van neurodegeneratieve aandoeningen in het algemeen en dementie syndromen in het bijzonder. Er bestaan diverse dementiesyndromen, waarvan de ziekte van Alzheimer de belangrijkste vorm is. Verder onderscheid men nog o.a. fronto-temporale dementie, vasculaire (of multi-infarct) dementie en Lewy-body dementie. De ziekte van Alzheimer wordt gekenmerkt door een aantal karakteristieke lesies in de hersenen, namelijk seniele plaques en neurofibrillaire tangles<sup>5</sup>.

Het Microtubuli Associated Protein Tau (kortweg: Tau eiwit) is een axonaal eiwit met als meest waarschijnlijke functie de stabilisatie van microtubuli, cytoskeletstructuren waarlangs cytoplasmatisch transport plaatsvindt. Tau - in een hypergefosforyleerde vorm - is de belangrijkste component van neurofibrillaire tangles die voorkomen in de hersenen van Alzheimer patiënten. Mutaties in het gen voor Tau kunnen ook leiden tot frontotemporale dementie. De functie van het amyloïd  $\beta$  protein ( $A\beta$ ) is nog onbekend.  $A\beta$  is een afsplitsingsproduct van het amyloïd precursor eiwit APP en is het belangrijkste bestanddeel van seniele plaques bij de ziekte van Alzheimer. Het komt voor in verschillende isovormen, waarvan  $A\beta_{40}$  en  $A\beta_{42}$  de belangrijkste zijn.

Sinds eind 2000 is het in ons laboratorium mogelijk om liquor op tau en  $A\beta_{42}$  te analyseren. Diverse studies hebben inmiddels aangetoond dat in de liquor van Alzheimer patiënten in vergelijking met controle personen het niveau van totaal Tau (de som van normaal en hypergefosforyleerd Tau) significant verhoogd is en de concentratie  $A\beta_{42}$  significant verlaagd is. Specificiteit en sensitiviteit van de gecombineerde analyse van  $A\beta_{42}$  en tau is vrij hoog voor het stellen van de diagnose Alzheimer vs. controles (85% en 87%, respectievelijk), maar is vooralsnog beperkter voor de differentiële diagnose Alzheimer vs. andere dementie syndromen (85% and 58%, respectievelijk)<sup>6</sup>. Uit een prospectieve studie bleek echter een hoge voorspellende waarde van deze analyses voor de diagnose ziekte van Alzheimer<sup>7</sup>. Bij een prevalentie van 45% was de positief voorspellende waarde 90% en de negatief voorspellende waarde 95% van deze gecombineerde testen. Diagnostiek van dementiesyndromen wordt momenteel vooral verricht op basis van neurologisch en neuropsychologisch onderzoek dat diverse herhaalbezoeken vereist om een definitieve diagnose te stellen. Echter, onderzoek aan tau en  $A\beta_{42}$  in liquor van patiënten met de ziekte van Alzheimer en andere dementie syndromen kan een goede aanvulling vormen in de differentiële (vroeg)diagnostiek van dementiesyndromen.

De analyse van Tau in liquor lijkt een bredere toepassing te hebben. Diverse artikelen beschrijven afwijkende concentraties van Tau in liquor bij verschillende neurodegeneratieve aandoeningen. Er zijn op dit moment tegenstrijdige rapporten over de concentratie van Tau bij vasculaire dementie en frontotemporale dementie. De hoeveelheid Tau in liquor bij deze patiënten met vasculaire dementie is ofwel verhoogd<sup>7,8</sup> of normaal<sup>6</sup> (beiden bij een normaal  $A\beta_{42}$ ) bij vasculaire dementie<sup>8</sup>; ook bij frontotemporale dementie zou Tau normaal<sup>6,9</sup> of verhoogd zijn<sup>10</sup> bij een normaal  $A\beta_{42}$ . Tau is ook verhoogd bij corticobasale degeneratie, maar niet bij progressive supranuclear palsy<sup>11</sup>. Daarentegen is beschreven dat  $A\beta_{42}$  niveaus verlaagd zijn (bij normale Tau concentratie) bij patiënten met Lewy body dementie<sup>7,12</sup>. Zeer hoge Tau concentraties (> 1500 pg/ml) worden aangetroffen bij patiënten met Creutzfeld-Jakob<sup>13,14</sup>. Analyse van Tau voor de diagnose Creutzfeld-Jakob kan plaatsvinden met een zeer hoge specificiteit en sensitiviteit.

Zeer recente studies tonen aan dat bij patiënten respectievelijk met een milde vorm van de ziekte van Alzheimer (MMSE>20)<sup>15</sup> en met "mild cognitive impairment" (MMSE>26)<sup>15</sup> de concentraties van Tau en  $A\beta_{42}$  in de liquor reeds afwijkend zijn.

Andere veelbelovende biochemische markers in liquor voor differentiële diagnostiek van neurodegeneratieve aandoeningen zijn neurofilament light chain<sup>9</sup>, gefosforyleerd tau<sup>17</sup> en  $\alpha$ -synucleïne.

**Tabel I:** Karakteristieke liquor afwijkingen bij infecties van het centraal zenuwstelsel.

liquor parameter	bacterie	virus	schimmel	tuberculose	borrelia
celaantal	1000-10.000	<300	20-1000	50-500	<500
mono/poly-nucleaire cellen	poly	mono	mono (poly)	mono	mono
Eiwit	verhoogd	normaal	verhoogd	verhoogd	verhoogd
Glucose	sterk verlaagd	normaal	verlaagd	verlaagd	normaal
Lactaat	sterk verhoogd	normaal of licht verhoogd	verhoogd	verhoogd	normaal
IgG	normaal	40%	100%	70%	50%
IgM	normaal	70%	100%	50%	50%
Oligoclonale IgG banden	geen	40%	100%	70%	50%

## Literatuur

1. R.A. Fishman, Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system, W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA, 1992, 2<sup>e</sup> editie.
2. Hoffmann GF, Surtees RAH, Wevers RA, Cerebrospinal fluid investigations for neurometabolic disorders. *Neuropediatrics* (1998), 29:59-71.
3. C.M. Marra, Neurologic Clinics, Central nervous system infections, vol. 17, no. 4, W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA, 1999.
4. Andersson M, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 1994, 47:897-902.
5. Verbeek MM, Ruiters DJ, de Waal RMW, The role of amyloid in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biol. Chem.* (1997), 378:937-950.
6. Hulstaert F, Blennow K, Ivanoiu A, Schoonderwaldt HC, Riemenschneider M., De-Deyn PP, Bancher C, Cras P, Wiltfang J, Mehta PD, Iqbal K, Pottel H, Vanmechelen E, and Vanderstichele H (1999) Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF, *Neurology* **52**: 1555-1562
7. Andreasen, N., Minthon, L., Davidsson, P., Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Winblad, B., and Blennow, K. (2001) Evaluation of CSF-tau and CSF-A beta 42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice, *Arch. Neurol.* **58**, 373-379.
8. Andreasen, N., Vanmechelen, E., Van-de-Voorde, A., Davidsson, P., Hesse, C., Tarvonen, S., Raiha, I., Sourander, L., Winblad, B., and Blennow, K. (1998) Cerebrospinal fluid tau protein as a biochemical marker for Alzheimer's disease: a community based follow up study, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **64**, 298-305.
9. Sjogren, M., Rosengren, L., Minthon, L., Davidsson, P., Blennow, K., and Wallin, A. (2000) Cytoskeleton proteins in CSF distinguish frontotemporal dementia from AD, *Neurology* **54**, 1960-1964.
10. Green, A.J., Harvey, R.J., Thompson, E.J., and Rossor, M.N. (1999) Increased tau in the cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal dementia and Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* **259**, 133-135.
11. Urakami, K., Wada, K., Arai, H., Sasaki, H., Kanai, M., Shoji, M., Ishizu, H., Kashihara, K., Yamamoto, M., Tsuchiya-Ikemoto, K., Morimatsu, M., Takashima, H., Nakagawa, M., Kurokawa, K., Maruyama, H., Kaseda, Y., Nakamura, S., Hasegawa, K., Oono, H., Hikasa, C., Ikeda, K., Yamagata, K., Wakutani, Y., Takeshima, T., and Nakashima, K. (2001) Diagnostic significance of tau protein in cerebrospinal fluid from patients with corticobasal degeneration or progressive supranuclear palsy, *J. Neurol. Sci.* **183**, 95-98.

12. Kanemaru, K., Kameda, N., and Yamanouchi, H. (2000) Decreased CSF amyloid beta42 and normal tau levels in dementia with Lewy bodies, *Neurology* **54**, 1875-1876.
13. Otto, M., Wiltfang, J., Tumani, H., Zerr, I., Lantsch, M., Kornhuber, J., Weber, T., Kretzschmar, H.A., and Poser, S. (1997) Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease, *Neurosci. Lett.* **225**, 210-212.
14. Otto M, Wiltfang J, Cepek L, Neumann M, Mollenhauer B, Steinacker P, Ciesielczyk B, Schulz-Schaeffer W, Kretzschmar HA, Poser S. Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2002; 58:192-197.
15. Galasko, D., Clark, C., Chang, L., Miller, B., Green, R.C., Motter, R., and Seubert, P. (1997) Assessment of CSF levels of tau protein in mildly demented patients with Alzheimer's disease [see comments], *Neurology* **48**, 632-635.
16. Andreasen, N., Minthon, L., Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Davidsson, P., Winblad, B., and Blennow, K. (1999) Cerebrospinal fluid tau and Ab42 as predictors of development of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment., *Neurosci. Lett.* **273**, 5-8.
17. Kohnken R, Buerger K, Zinkowski R., Miller C, Lerkman D, DeBernardis J, Shen J, Möller H-J, Davies P, Hampel H, Detection of tau phosphorylated at threonine 231 in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci. Lett.* 2000, 287: 187-190.

# CSF protein analysis evaluation of immunoglobulin patterns in quotient diagrams and quality control

*H. Reiber*

The analysis of albumin and IgG together with IgA and IgM in cerebrospinal fluid (CSF) and serum and their evaluation in CSF/serum quotient diagrams [1,2,3] gives early evidence to support diagnosis of acute and chronic inflammatory diseases (tuberculous meningitis, neuroborreliosis, complications in bacterial meningitis like formation of a brain abscess, or opportunistic infections in HIV encephalitis, etc.). The hyperbolic discrimination functions in quotient diagrams for detection of intrathecal immunoglobulin synthesis avoids the many false positive interpretations obtained with earlier, still frequently used linear interpretation functions. Together with cell count, cell differentiation, lactate, oligoclonal IgG a basic CSF analysis program also represents the rationale for decisions about further diagnostic analytical approaches, such as PCR, specific antibody analysis, or analysis of brain-derived proteins.

The polyspecific antibody synthesis against neurotropic viruses(4) is used to identify chronic inflammatory processes of the autoimmune type(e.g. multiple sclerosis or autoimmune diseases with involvement of the CNS).

Tau protein,  $\beta$ -amyloid 1-42, neuronspecific enolase, S100 protein, protein 14-3-3 support the differential diagnosis of Alzheimer's disease, Creutzfeldt Jakob disease amongst other causes of neurodegenerative processes(1,5).

The compilation of cerebrospinal fluid (CSF) patient data together with a graphical display of immunoglobulin patterns in a single CSF report has two main advantages: Analytical and clinical plausibility control of a complex set of data improves quality assessment and allows improved clinical specificity and sensitivity for recognition of disease-related, "typical" data patterns.

Actual external quality control by CSF survey (6) takes advantage of the method-independent quality of CSF/serum concentration quotients and asks for clinically relevant interpretation of the data. As an additional aspect of general quality assessment in clinical neurochemistry and CSF analysis the widespread use of automated on-line evaluation programs can now be combined with knowledge-based programs for interpretation by clinical chemists and neurologists (3). These programs are based on knowledge about neuroimmunology, blood-CSF barrier function and dysfunction ,i.e. in particular the influence of CSF flow on concentrations of blood- and brain-derived proteins(5) in CSF.

## References

1. Reiber H and Peter JB (2001). Cerebrospinal fluid analysis – disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 184:101-122.
2. Reiber H (2002). Knowledge base and interpretation of disease-related data patterns . CD-ROM ed by Beckman Coulter, Krefeld, Germany..
3. Reiber H, Otto M, Trendelenburg Chr and Wormek A (2001). Reporting cerebrospinal fluid data – knowledge base and interpretation software. *Clin Chem Lab Med*, 39:324-332.
4. Reiber H, Ungefehr St, Jacobi Chr (1998). The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 4:111-117.
5. Reiber H (2001). Dynamic of brain proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta*;310:173-186.
6. Reiber H (1995). External quality assessment in clinical neurochemistry: Survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. *Clin Chem* 41:256-263.

# Klinisch belang van liquoranalyse bij multiple sclerose

Dr. P. Jongen

## Klinische aspecten

Multipiele sclerose (MS) is een multiloculaire aandoening van de witte stof van het centrale zenuwstelsel, die histopathologisch gekenmerkt wordt door haarden van ontsteking, myelineafbraak, axonverlies en gliose. Het ziektebeloop is chronisch en kent een aantal varianten. Bij 70% van de patiënten treden de eerste klachten treden op in de vorm van aanvallen, die spontaan, geheel of grotendeels, herstellen (*aanvalsgewijze vorm*). Bij een typische aanval nemen de klachten in de loop van dagen of weken toe, blijven dan weken stabiel om vervolgens gedurende weken of maanden te herstellen. Bij 10% van de patiënten komen de eerste klachten geleidelijk, meestal loopproblemen (*primaire progressie*). Bij de meeste patiënten met de aanvalsgewijze vorm worden na gemiddeld 10 tot 15 jaar de aanvallen minder uitgesproken en treedt alsnog geleidelijke toename van klachten op (*secundaire progressie*). Bij 10% van de patiënten treden van begin af aan zeer frequent aanvallen op met weinig herstel en tevens geleidelijke verslechtering tussen de aanvallen (*aanvalsgewijs-progressief beloop*); binnen enkele jaren zijn deze patiënten rolstoelgebonden. Het andere uiterste van het klinisch spectrum wordt gevormd door hen die slechts zelden aanvallen vertonen, met goed herstel, en na 15 jaar nog geen belemmeringen van de ziekte (*goedaardig beloop*).

Vanwege het multiloculaire karakter van MS zijn de klachten zeer divers: tintelingen, dove plekken, verminderd gezichtsvermogen aan een oog, moeite met lopen, dubbelzien, krachtsvermindering in arm(en) of been(en), coördinatieproblemen, blaasklachten, problemen met ontlasting, geheugen en concentratiezwakte, onduidelijk spreken, spierkrampen, aangezichtspijn.

De oorzaak van MS is multifactorieel waarbij niet bij elke patiënt dezelfde factoren een rol zullen spelen. Naast genetische predispositie - vastgelegd in meerdere genen – lijken virale of bacteriële infecties cruciaal bij het ontwikkelen van de ziekte. Het *aanvalsgewijze* beginstadium van MS wordt pathofysiologisch gekenmerkt door ontsteking, myelineverlies en, in mindere mate, axonverlies. Aan de ontsteking gaat een (auto)immuunreactie vooraf, gericht tegen onder meer het myeline basisch proteïne (MBP) - een bouwsteen van myeline. In de progressieve fases (primair of secundair) staat degeneratie van axonen en zenuwcellen op de voorgrond, met nog weinig myelineafbraak en nauwelijks ontsteking.

Bij MS is analyse van de liquor cerebrospinalis van belang bij:

1. *diagnose*: aanwijzingen voor ontsteking en intrathecale activiteit van het immuunsysteem.
2. *differentiële diagnose*: uitsluiten van andere mogelijke afwijkingen als verklaring van de klachten
3. *bepalen van ziekteactiviteit*

## Diagnose

De inflammatoire factor van het ziekteproces kan in de liquor worden weerspiegeld door :

1. *verhoogde albumineratio*; deze is een indicatie voor de mate waarin de intrathecale bloedvaten verhoogd doorlaatbaar zijn,
2. *een verhoogd celgehalte*, 5 - 50 per mm<sup>3</sup>; het celgehalte is een maat voor de cellulaire component van het ontstekingsproces en als zodanig een maat voor de ontsteking.

Bij MS is het immuunsysteem in het CZS (intrathecaal) geactiveerd, waarbij meerdere klonen plasmacellen IgG produceren. Deze intrathecale IgG-productie kan worden aangetoond door het *oligoclonale karakter* ervan of de *mate* ervan aan te tonen.

1. detectie van *oligoclonale (meer dan twee) IgG banden (OCB)* in de liquor met behulp van iso-electrische focusing. Gepaarde liquor- en serummonsters worden geanalyseerd, waarbij drie patronen afwijkingen kunnen worden vastgesteld: a) OCB in liquor, geen banden in

serum, b) OCB in liquor, een geringer aantal banden in serum, c) OCB in liquor en identiek bandenpatroon in serum (spiegelbeeld). De afwijkingen a) en b) wijzen op (extra) intrathecale activiteit van het immuunsysteem, en pleiten aldus voor MS.

Conform de aanbevelingen van een internationale consensus is iso-electrische focusing de preferente techniek om OCB aan te tonen, bij controle van de kwaliteit. Electroforese is niet sensitief genoeg en een fout-negatieve uitkomst kan bijdragen tot het onterecht verwerpen van de diagnose MS.

2. de *mate van intrathecale IgG productie* kan worden gemeten middels de formule van Reiber of via de IgG-index, uitgedrukt in g/l.

3. aantonen van *lichte ketens* kan een bijdrage leveren aan de diagnose wanneer 1) en 2) negatief zijn.

In recent geformuleerde criteria voor de diagnose MS wordt expliciet de aanwezigheid van OCB genoemd, aan te tonen met iso-electrische focusing. In bepaalde klinische situaties is het al of niet aanwezig zijn van OCB of verhoogde IgG-index doorslaggevend voor de diagnose MS. Bij de primair progressieve vorm van MS is het aanwezig zijn van genoemde liquorafwijkingen volgens de nieuwe diagnosecriteria zelfs obligaat.

### **Differentiële diagnose**

Bij elke patiënt die verdacht wordt van MS dienen, conform de criteria, in voldoende mate andere afwijkingen als verklaring van de klachten te worden uitgesloten. Bij de aanvalsgwijze vorm van MS richt de differentiële diagnose zich op 1) *chronische infecties*, met name borrelia en lues, en 2) *systemische autoimmuunaandoeningen*.

Serologisch bloedonderzoek is hier het meest belangrijk, waarbij de uitgebreidheid van het onderzoek wordt ingegeven door bevindingen bij anamnese en lichamelijk onderzoek. Liquoronderzoek kan zinvol zijn om bij serologisch aangetoonde Borrelia- of luesinfectie de aanwezigheid van neuro-borreliose of neuro-lues vast te stellen door detectie van specifieke intrathecale OCB en bepaling van de intrathecale antilichaamindex (IAI) voor IgM, IgG en IgA.

Bij de differentiële diagnose van het primair progressieve type van MS speelt liquoronderzoek geen rol van betekenis. Een vitamine B12 deficiëntie wordt met bloedonderzoek vastgesteld.

### **Ziekteactiviteit**

Liquoronderzoek draagt bij om de mate van ziekteactiviteit bij een individuele patiënt in te schatten.

1) Bij niet herstellende terugvallen wijst een verhoogde albumine-index en een verhoogd celgehalte in de liquor op voortzetting van het *ontstekingsproces*. Naarmate de ontstekingshaard dichter bij de liquorruimte is gelokaliseerd zal de kans op een verhoogd celgehalte groter zijn. Vooral actieve ruggenmergshaarden geven een verhoogd celtaal, en juist bij deze lokalisatie is adequate behandeling noodzakelijk vanwege de grote kans op hinderlijke restverschijnselen.

2) *Intrathecale IgM synthese* lijkt op te treden bij patiënten met een actievorm van MS, die aanleiding geven tot meer beperkingen en handicap.

3) De *mate van intrathecale IgG synthese* is een maat voor progressie.

3) *Weefselverval* leidt tot het vrijkomen van markermoleculen in de liquor. De concentratie van celtypengebonden afbraakproducten is een maat voor omvang van de specifiek afbraak. Zo is de hoogte van de concentratie MBP een maat voor myelineafbraak. Omdat, vergeleken met het klinisch herstel, de daling van de liquor MBP-concentratie later optreedt, is MBP niet geschikt om de actuele ziekteactiviteit te bepalen. Zijn er aanwijzingen voor afbraak van axonen of glia, dan is blijkbaar het ziekteproces niet beperkt tot inflammatie en demyelinisatie, maar is het, getuige het celverval, meer destructief van aard. Dit gegeven kan therapeutische consequenties hebben.

4) Met *multimodaal liquoronderzoek*, waarbij gelijktijdig verschillende aspecten van het ziekteproces in kaart worden gebracht, kunnen patiënten in de aanvalsgwijze fase worden onderscheiden van die in de fase van secundaire progressie zijn. Toepassing is nog beperkt.

## Literatuur

- Villar LM, Masjuan J, Gonzalez-Porque P, Plaza J, sadaba MC, Roldan E, Bootello A, Alvarez-Cermeno JC. Intrathecal IgM synthesis in neurological diseases: relationship with disability in multiple sclerosis. *Neurology* 2002;58:824-6.
- Izquierdo G, Angulo S, Garcia-Moreno JM, Gamaro MA, Navarro G, Gata JM, Ruiz-Pena JL, Paramo MD. Intrathecal IgG synthesis: marker of progression in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 2002;105:158-63.
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin F, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-127.
- Cepok S, Jacobsen M, Schock S, Omer B, Jaekel S, Boddeke I, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B. Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlation with disease progression in multiple sclerosis. *Brain* 2001;124:2169-76.
- Jenkins MA, Cheng L, Ratnaik S. Multiple sclerosis: use of light-chain typing to assist diagnosis. *Ann Clin Biochem* 2001;38:235-41.
- Sindic CJ, van Antwerpen MP, Goffette S. The intrathecal humoral immune response: laboratory analysis and clinical relevance. *Clin Chem Lab Med* 2001;333-40.
- Cole SR, Beck RW, Moke PS, Kaufman DI, Tourtelotte W. The predictive value of CSF oligoclonal bands for multiple sclerosis 5 years after optic neuritis. *Neurology* 1998;51:885-7.
- Brasher GW, Follender AB, Spikerman AM. The clinical value of commonly used spinal diagnostic studies in the evaluation of patients with suspected multiple sclerosis. *Am J Manag Care* 1998;4:1119-21.
- Massaro AR, Tonali P. Cerebrospinal fluid markers in multiple sclerosis: an overview. *Mult Scler* 1998;4:1-4.
- Jongen PJH, Lamers KJB, W Doesburg, W Lemmens, OR Hommes. Cerebrospinal fluid analysis differentiates between relapsing remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;63:446-51.
- Rudick RA, Medendorp SV, Namey M, Boyle S, Fischer J. Multiple sclerosis progression in a natural history study: predictive value of cerebrospinal fluid free kappa light chains. *Mult Scler* 1995;1:150-5.
- Lamers KJB, de Jong JG, Jongen PJH, Kock-Jansen MJ, Teunesen MA, Prudon-Rosmulder EM. Cerebrospinal fluid free kappa light chains versus IgG findings in neurological disorders: qualitative and quantitative measurements. *J Neuroimmunol* 1995;62:19-25.

# Neuro-oncology and Cerebro spinal fluid

A. Twijnstra

Leptomeningeal metastases (LMM) are an important neurologic complication that may occur at any time during the course of systemic cancer. Although the exact incidence of LMM is not known, it is found at autopsy in 8% of cancer patients.(1) While any systemic cancer can metastasize to the leptomeninges, it occurs most often in patients with non-Hodgkin lymphoma (5-15%). Of the solid tumors, the adenocarcinomas are most likely to seed to the leptomeninges. For example, breast cancer accounts for 22-54% of LMM in solid tumors, followed by lung cancer (1-26%) and malignant melanoma (7-15%).(2)

Several routes of neoplastic infiltration of the subarachnoid or ventricular cavity have been recognized. Kokkoris (3) found that in the majority of cases of solid tumors, neoplastic cells reached the meninges by haematogenous., centripetal spread from adjacent bone metastases, mostly from the vertebral bodies. In leukemic patients, Price and Johnson (4) and Azzarelli et al (5) demonstrated the entry of neoplastic cells into the cerebrospinal fluid (CSF) causing LMM from cerebral metastases is rare, since a fibrous reaction provoked by the cerebral tumor normally prevents such an entry. However, subependymal metastases may reach the ventricular surface, causing LMM.

The clinical presentation of LMM is variable. Its neurological symptoms can be explained by invasion of neoplastic cells at three anatomical levels: the brain, the cranial nerves, and the spinal cord and nerve roots. The signs and symptoms of brain dysfunction due to LMM are mainly headache (40%), gait problems (46%), cognitive dysfunction (50%) and, less frequently, seizures (15%) or disturbances of consciousness (13%).(6)

Cranial nerve abnormalities, mostly involving more than one nerve, are often found, resulting especially in disturbances of ocular movement or facial weakness.

Spinal symptoms and signs can be found in 50% of the patients, with radicular pain and dysfunction at more than one level being most common.

The pathophysiology of LMM is poorly understood. Some of the symptoms can be explained by the obstruction of normal CSF-flow due to obstruction of foramina of the fourth ventricle by neoplastic cells, causing hydrocephalus. Other explanations of the development of brain dysfunction include the metabolic competition between normal and malignant cells for essential nutrients like glucose (7), the parenchymal invasion of neoplastic cells along Virchow-Robin spaces<sup>4</sup> and a diminished cerebral blood flow due to vascular changes caused by LMM.

At the microscopical level, LMM often consists of a diffuse infiltration of malignant cells in the subarachnoid space. This characteristic pattern is especially found at the base of the brain.

## **Diagnostic procedures for LMM**

Early identification and treatment of LMM may prevent serious neurologic symptoms. Several diagnostic procedures can be applied to establish the diagnosis.

### *Cytology of CSF aspirates*

The demonstration of neoplastic cells in CSF by cytologic evaluation is generally regarded as the most important diagnostic criterion for LMM.(8) Several studies have reported a high specificity of this technique, reporting false positive rates of less than 2%. However, this technique is only moderately sensitive, with 15-20% of the clinically suspected cases remaining persistently negative even after repeated lumbar punctures. Furthermore, the cytologic diagnosis in pathologically focal LMM shows a higher percentage of false-negative cases.

The main reasons for these diagnostic problems are: (a) the morphologic resemblance of malignant cells to ependymal cells, (b) the non-malignant aspect of lymphocytes in leptomeningeal localization of non-Hodgkin lymphoma or leukemia, (c) the presence of blood due to traumatic lumbar punctures, and (d) the fact that often only a small number of cells can be evaluated.(9)

Because of this low sensitivity of cytologic examination, additional tests are required to establish the diagnosis. On the other hand, the sensitivity of CSF cytology might increase by increasing the number of cells on the slides to be examined. This might be achieved by using coated glass slides, because cells might attach to the slides more firmly. Large volumes of CSF (e.g., 15 ml) increase the likelihood of finding tumor cells.

#### *Biochemical markers*

The diagnostic potential of biochemical tumor markers in the CSF has been studied for  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ 2-microglobulin, lactate dehydrogenase (LDH),  $\alpha$ -fetoprotein ( $\alpha$ -FP), carcino-embryonic antigen (CEA), tissue polypeptide antigen (TPP-A), myelin basic protein (MBP),  $\beta$ -human chorionic gonadotropin ( $\beta$ -HCG) and creatine kinase-BB (ck-BB).(10,11) Although all of these can be informative to some extent, none of these markers is sensitive enough to improve the cytologic diagnosis of LMM. However, in the case of glucose phosphate isomerase the specificity was found to be high (92%), suggesting that it can be of diagnostic aid. Furthermore, CSF sL-selectin (the shed form of L-selectin, an adhesion molecule) as a marker of LMM of sL-selectin positive leukemia demonstrated its usefulness in the detection of meningeal involvement and the monitoring of patients treated for LMM of sL-selectin positive leukemia.(12)

#### *Immunocytochemistry*

Besides the use of biochemical markers to improve the diagnosis of LMM, the usefulness of monoclonal antibodies has been studied.(13,14) In solid tumor diagnosis, immunocytochemistry seems to be of minor importance, but in the case of leukemia or lymphoma, antibodies against surface markers on lymphocytes can be very useful. Furthermore, cell surface markers can be used to distinguish between reactive and neoplastic lymphocytes by demonstrating monoclonality as a sign of malignancy whenever the cytology of the CSF remains unclear. More recently, soluble levels of surface antigens (CD4 and CD27) were demonstrated to be very useful immunocytological markers for LMM in lymphoid disease.(15,16)

It can be concluded from the immunocytochemical marker studies that these markers are not useful in case of LMM of solid tumors, but that they can be very informative in cases of LMM of lymphoid malignancies.

#### *Cell genetic-studies*

Since it is thought that malignancy develops due to genetic alterations, cell genetic analysis has been studied to improve the diagnosis of LMM. First, in vivo chromosome analysis of metaphasic cells was reported to be useful.(17) Subsequently, newer cytogenetic techniques were studied, such as flowcytometry (FCM) and DNA single cell cytometry.(18,19)

Both techniques measure the chromosomal content of cells. DNA single cell cytometry determines the DNA content of chosen cells using a TV-image analysis system combined with an automated microscope. FCM determines the DNA-RNA content by measuring the fluorescence emission of stained DNA and RNA with an argon ion laser at the appropriate wave length. An increased chromosomal content (aneuploidy) measured by these methods can be considered a sign of malignancy. Both techniques give extra diagnostic information, but the sensitivity is too low (69-79%) to improve the diagnosis of LMM. Furthermore, the numbers of cells required (at least 500 cells in the study by Cibas et al (18)) is a disadvantage of the FCM technique.

Amplification of specific genetic alterations using the polymerase-chain reaction (PCR) technique has been studied in cases of leukemia and lymphomas with known genetic alterations.(20) Van Dongen et al (21) demonstrated that PCR combined with immunological

marker analysis in cases of acute leukemia can be used to detect minimal residue of disease. They were able to detect leukemic cells at a frequency as low as one in 1,000 to 10,000 cells. Rhodes et al (22) compared PCR with conventional cytology of CSF and concluded that PCR can establish the correct diagnosis when cytology is not conclusive. The main disadvantage of the PCR technique is that the genetic alteration of the neoplastic process must be known, which is often not the case (especially in solid tumors).

In conclusion, recent development in the diagnostic procedure of LMM have shown some promising markers (both immunological and cytogenetic) for LMM, especially in patients with leukemia or lymphomas.

### **Fluorescence in situ hybridization for detection of genomic aberrations**

Fluorescence in situ hybridization (FISH) technique, which uses chromosome specific probes, allows the detection of numerical chromosome aberrations in the interphase nucleus, and is generally referred to as 'interphase cytogenetics'.(23) The developments in probe labeling techniques, the generation of different types of probes and technical improvements in the processing of biological materials have now reached a point where the FISH technique can be considered a significant adjunct to the more established methods for detection and characterization of genetic aberrations in cancer.(24-27) The FISH methods have been successfully applied to a variety of cell and tissue preparations, such as single cells isolated from solid cancers, cells isolated from paraffin sections, cells from frozen sections and cytological samples.

Several types of DNA probe can be used to detect numerical and structural chromosome aberrations in cancer cells. DNA probes recognizing tandemly repeated DNA sequences, which are mostly present in the centromeric and telomeric regions, are now routinely applicable in daily practice. The sequences targeted by these probes are typically alpha satellite or satellite III sequences, which are usually repeated a hundred to thousand fold. This results in DNA targets of up to several thousands of kilobase pairs (KBP) localized in the compact centromeric regions of the individual chromosomes. Such repetitive probes have been developed for most of the human chromosomes and many are now commercially available.(28-30)

### **Literatuur**

1. Little JR, Dale AJ, Okazaki H. Meningeal carcinomatosis. Clinical manifestations. Arch Neurol 1974;30:138-143.
2. Wasserstrom WR, Glass JP, Posner JB. Diagnosis and treatment of leptomeningeal metastases from solid tumors: experience with 90 patients. Cancer 1982;49:759-772.
3. Kokkoris CP. Leptomeningeal carcinomatosis. How does cancer reach the pia-arachnoid? Cancer 1983;51:154-160.
4. Price RA, Johnson WW. The central nervous system in childhood leukemia: I. The arachnoid. Cancer 1973;31: 520-533.
5. Azzarelli B, Mirkin D, Goheen M, Muller J, Crockett C. The leptomeningeal vein. A site of re-entry of leukemic cells into the systemic circulation. Cancer 1984;54:1333-1343.
6. Twijnstra A, Glass JP. Leptomeningeal metastasis from solid extracranial tumors. In: Twijnstra A, Keyser A, Ongerboer de Visser BW, eds. Neuro-Oncology. Amsterdam: Elsevier Science Publ BV, 1993:257-265.
7. Hiesiger EM, Picco-Del Bo A, Lipschutz LE, et al. Experimental meningeal carcinomatosis selectively depresses local cerebral glucose utilization in rat brain. Neurology 1989;39:90-95.
8. Glass JP, Melamed M, Chernik NL, Posner JB. Malignant cells in cerebrospinal fluid (CSF): the meaning of a positive CSF cytology. Neurology 1979;29:1369-1375.
9. Van Heerde P. Cytology of cerebrospinal fluid. In: Twijnstra A, Keyser A, Ongerboer de Visser BX, eds. Neuro-oncology. Amsterdam: Elsevier Science Publ BV, 1993:266-271.
10. Twijnstra A. Cerebrospinal fluid biochemical markers in central nervous system metastasis: clinical applications. Thesis. University of Maastricht, The Netherlands, 1986.

11. Twijnstra A, Van Zanten AP. Biochemical markers in cerebrospinal fluid. In: Twijnstra A, Keyser A, Ongerboer de Visser BW, eds. *Neuro-oncology*. Amsterdam: Elsevier Science Publ BV, 1993:272-274.
12. Stucki A, Cordeg AS, Monai N, De Flangergues JC, Shapira M, Spertini O. Cleaved L-selectin concentrations in meningeal leukaemia. *Lancet* 1995;345:286-289.
13. Hancock WW, Medley G. Monoclonal antibodies to identify tumour cells in CSF. *Lancet* 1983;2(8352):739-740.
14. Coakham HB, Garson JA, Brownell B, et al. Use of monoclonal antibody panel to identify malignant cells in cerebrospinal fluid. *Lancet* 1984;1(8386):1095-1098.
15. Uozumi K, Hanada S, Ishitsuka K, et al. Elevated soluble CD4 levels in the cerebrospinal fluid in patients with adult T-cell leukemia. *Am J Hematology* 1994;46:95-100.
16. Kersten MJ, Evers LM, Dellelijn PLI, et al. Elevation of cerebrospinal fluid soluble CD27 levels in patients with meningeal localization of lymphoid malignancies. *Blood* 1996;87:1985-1989.
17. Granberg-Öhman IF, Andersson BI, Gupta SK, Lying-Tunell UM. Chromosome analysis in meningeal carcinomatosis. *Acta Neurol Scandinav* 1979;60:255-259.
18. Cibas ES, Malkin MG, Posner JB, Melamed MR. Detection of DNA abnormalities by flow cytometry in cells from cerebrospinal fluid. *Am J Clin Pathol* 1987;88:570-577.
19. Dux R, Kindler-Röhrborn A, Annas M, Faustmann P, Lennartz K, Zimmerman CW. A standardized protocol for flow cytometric analysis of cells isolated from cerebrospinal fluid. *J Neurol Sci* 1994;121:74-78.
20. Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Cohen P, Cossman J. Detection of occult follicular lymphoma by specific DNA amplification. *Blood* 1988;72:1822-1825.
21. Van Dongen JJM, Breit TM, Adriaansen JH, Beishuizen A, Hooykaas H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by immunological marker analysis and polymerase chain reaction. *Leukemia* 1992;6:47-59.
22. Rhodes CH, Glantz MJ, Glantz L, et al. A comparison of polymerase chain reaction examination of cerebrospinal fluid and conventional cytology in the diagnosis of lymphomatous meningitis. *Cancer* 1996;77:543-548.
23. Cremer T, Landegent J, Bruckner A, et al. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet* 1986;74:346-352.
24. Poddighe PJ, Ramaekers FCS, Hopman AHN. Interphase cytogenetics of tumors. *J Pathol* 1992;166:215-224.
25. Hopman AHN, Voorter CEM, Ramaekers FCS. Detection of genomic changes in cancer by in situ hybridization. *Mol Biol Rep* 1994;19:31-44.
26. Lichter P, Boyle AL, Cremer C, Ward DC. Analysis of genes and chromosomes by non-isotopic in situ hybridization. *Genet Anal Techn Appl* 1991;8:24-35.
27. Speel EJM, Ramaekers FCS, Hopman AHN. Cytochemical detection systems for in situ hybridization, and the combination with immunocytochemistry 'Who is still afraid of Red, Green and Blue?'. *Histochem J* 1995;27:833-858.
28. Van Oostenbrugge RJ, Hopman AHN, Arends JW, Ramaekers FCS, Twijnstra A. The value of interphase cytogenetics in cytology for the diagnosis of leptomeningeal metastases. *Neurology* 1998;51:906-908.
29. Van Oostenbrugge RJ, Twijnstra A. Presenting features and value of diagnostic procedures in leptomeningeal metastases. *Neurology* 1999;53:382-385.
30. Van Oostenbrugge RJ, Hopman AH, Arends JW, Ramaekers FC, Twijnstra A. Treatment of leptomeningeal metastases evaluated by interphase cytogenetics. *J Clin Oncol* 2000 May; 18 (10): 2053-2058.

# Herkenning van verschillende lichaamsvloeistoffen

*P.M.W. Janssens*

Een paar keer per jaar komt op het klinisch chemisch laboratorium een monster binnen met de vraag of kan worden vastgesteld 'wat dit monster nu precies is'. Vaak worden daar dan een aantal mogelijkheden bij opgenoemd. De gestelde vraag varieert daarbij van dringend gewenste herkenning tot curieuze nieuwsgierigheid. Te weten wat dit vocht nu precies is kan belangrijk zijn als onderdeel van een diagnostisch proces of behandeling, om inzicht te krijgen in wat er in het lichaam plaatsvindt dat leidt tot betreffende vochtophoping of productie, of om te controleren of het vocht dat is verkregen (uit drain of bij een punctie) overeenkomt met hetgeen men verwachtte te krijgen.

Lichaamsvochten zijn zelden een statisch gebeuren. Dit geldt zowel voor de samenstelling ervan als voor hun voorkomen. Van veel lichaamsvochten varieert de samenstelling afhankelijk van normale fysiologische processen en externe prikkels, zoals het geval is bij bijvoorbeeld gal, maag- en darmvocht, chylus, semen, cervixslijm, vruchtwater, moedermelk, urine en zweet. Daarnaast veranderen veel vochten van samenstelling onder invloed van ziekte. Natrium en chloride in zweet - ionen die vergeleken met sereuze vochten in zweet een karakteristiek lage concentratie hebben en daarmee soms identificerend kunnen zijn - stijgen bijvoorbeeld kenmerkend bij cystische fibrose; eiwit in liquor - dat normaliter kenmerkend laag is vergeleken met serum - is verhoogd bij diverse hersenziekten.

Dit zijn slechts enkele voorbeelden van stoffen in lichaamsvloeistoffen die er in principe altijd zijn, die veranderen onder invloed van ziekte. Doch voor diverse vochten geldt dat er van het betreffende vocht geen noemenswaardige hoeveelheid aanwezig is zolang er geen ziekte is. Dergelijke vochten ontstaan pas als gevolg van ziekte. Dit is bijvoorbeeld het geval met sputum, pleuravocht, cystevocht, exsudaten (zoals een middenoor-effusie) en synoviaalvocht. Voor stoffen die in deze vochten voorkomen is het eerder regel dan uitzondering dat hun aanwezigheid al dan niet karakteristiek samenhangt met de ziekte in kwestie, zoals bijvoorbeeld gezegd kan worden voor cholesterol en LDH in exsudaten, triglyceriden in pleuravocht bij een chylothorax en uraat in synoviaalvocht bij jicht. Meting van dergelijke stoffen in aangeboden vochten kan dan zowel identificerend zijn voor de ziekte als voor het vocht. Dat talloze andere stoffen en cellen, niet in de tabel opgesomd, in uiteenlopende lichaamsvochten onder invloed van ziekteprocessen veranderen en soms zeer zinvol gemeten kunnen worden, mag bekend worden verondersteld. Een verkregen lichaamsvocht en ziekte zijn niet los van elkaar te zien.

Sommige stoffen zijn in hun voorkomen beperkt tot één of enkele lichaamsvloeistoffen. Daarmee zijn ze vaak ideaal om een vocht als zodanig te identificeren. Het is echter niet per se nodig alleen dergelijke stoffen te gebruiken. Vaak gaat het in de praktijk om een beperkte keuze tussen een paar mogelijkheden. Vaak kan men al ver komen door te inventariseren welk van de stoffen karakteristiek verschillen tussen de overwogen vloeistoffen en die stoffen dan te meten. Verder is er niet altijd sprake van zuivere vloeistoffen. Vaak gaat het om (mogelijke) mengsels, wat identificatie van en onderscheid tussen vloeistoffen uiteraard moeilijker, zo niet onmogelijk maakt. Soms kan in de rapportage alleen worden volstaan met uitspraken in de trant van "waarschijnlijk dit of dat (of juist niet). Uitleg is doorgaans wel noodzakelijk.

Identificatie van een vloeistof kan worden opgevat als een puzzel en/of uitdaging die neergelegd wordt bij het laboratorium. Onderstaande tabel kan behulpzaam zijn bij dat puzzelproces. Bewust zijn in de tabel veelal stoffen/cellen opgenomen waarvoor bepalingen in de meeste klinisch chemische laboratoria voorhanden zijn. Voor veel vloeistoffen zijn er nog diverse andere stoffen die karakteristiek zijn voor het betreffende vocht, soms zelfs meer karakteristiek dan de hier opgesomde stof(fen). Echter de bepaling daarvan is dan vaak niet makkelijk voorhanden, of wordt weinig frequent uitgevoerd, zodat hij weinig nut heeft voor de alledaagse klinische praktijk in de meeste ziekenhuizen. De opsomming is dus allerminst

uitputtend. Verder is het goed zich te realiseren dat, zoals eerder gezegd, ziekte de samenstelling van een vocht danig kan beïnvloeden en dat identificatie soms kan worden gedaan met andere dan de opgenoemde stoffen gebruik makend van typische verschillen tussen de paar mogelijke opties.

### Karakteristieke bepalingen voor verschillende lichaamsvloeistoffen

Lichaamsvloeistof	bepaling van	interpretatie/commentaar
Vruchtwater (amnionvloeistof)	$\alpha$ -foetoproteïne foetaal fibronectine eiwit varentest	> 100 maal hoger dan serumwaarde <sup>1</sup> 3,8-8,5 g/l (28 wk zwanger); 1,5-3,5 g/l (38 wk) <sup>4</sup>
Ascites	albuminegradient	serumwaarde - asciteswaarde < 11 g/l suggereert exsudaat, zou betrouwbaarder voor onderscheid met transsudaat zijn dan LDH of totaal eiwit <sup>4</sup>
Cervixslijm	gel, zeer taai en elastisch	
Chylus	chylomicronen triglyceriden	> 1,24 mmol/l <sup>5</sup>
Darmvloeistof	voedselresten, bacteriën coproporfyrine	
Foetaal bloed	foetale erythrocyten HbF	
Gal	bilirubine	> 1000 x maal serumwaarde (>1 mmol/l)
Liquor (CSF)	$\beta$ 2-transferrine (tau, asialo-transferrine) prealbumine eiwit	uniek voor liquor ook in traanvocht, moedermelk, vruchtwater $\approx$ 100 maal lager dan serumgehalte
Lymfe	lymfocyten	geen erythrocyten chemische samenstelling varieert afhankelijk van de plaats waar de lymfe vandaan komt en type aandoening
Maagvloeistof	pH chloride	1-2 > 160 mEq/l
Middenoor-effusie	LDH eiwit	> 3 maal serumwaarde <sup>2</sup> vergelijkbaar met serum <sup>2</sup>
Moedermelk	lactose natrium	tot 200 mmol/l $\approx$ 5 mEq/l
Neusvocht	kalium glucose	12-30 mEq/l lager dan in bloed
Pancreasvocht	$\alpha$ -amylase lipase pH	pancreas-specifiek enzym te onderscheiden van dat uit speekselklieren > 2000 x serumwaarde $\approx$ 8.0

Pleuravocht	totaal eiwit LDH cholesterol albuminegradient	afhankelijk van de ziekte die tot de vochtophoping heeft geleid en het gewenste onderscheid transsudaat / exsudaat (interpretatie: zie bij transsudaat/exsudaat) <sup>5</sup> serumwaarde - pleurawaarde < 12g/l suggereert exsudaat <sup>5</sup>
	triglyceriden tumormarkers	afhankelijk van de ziekte <sup>5</sup> afhankelijk van de ziekte <sup>5</sup>
Prostaatvloeistof	PSA zure fosfatase citraat	> 1000 x serumwaarde <sup>6</sup> > 200 x serumwaarde tot 25 mmol/l
Semen	spermatozoën PSA	> 1000 x serumwaarde <sup>6</sup>
Speeksel	$\alpha$ -amylase	speekselklier-specifiek enzym te onderscheiden van dat uit pancreas
	natrium kalium	5-30 mEq/l ca. 20 mEq/l
Sputum	secretair IgA	waarden afhankelijk van aandoening
Synoviaalvocht	mucine stolsel hyaluronzuur (muco- polysaccharide)	ontstaat na toevoeging van azijnzuur
Traanvocht	lysozym retinol-bindend proteïne	tot 1,5 g/l
Transsudaat / Exsudaat	totaal eiwit LDH	exsudaat: > 30 g/l of ratio t.o.v. serum > 0,5 <sup>5</sup> exsudaat: > 0,7 x bovengrens ref. waarde of ratio t.o.v. serum > 0,6
	cholesterol albumine	exsudaat > 1,3 mmol/l
Urine	ureum	> 50 mmol/l
	kreatinine	> 0,5 mmol/l
Zweet	natrium	< 35 mEq/l

*Nb. Indien in de lijst geen bron is aangegeven is dit gegeven terug te vinden in referenties 1+3,4 (met referentie aldaar).*

#### Literatuur

1. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry. Saunders comp. 3-ed. 1999.
2. Juhn SK, Huff JS. Biochemical characteristics of middle ear effusions. Ann Otol Rhinol Laryngol 1976; 85, Suppl 25 pt2: 110-116.
3. de Keijzer MH en Doelman CJA, Ned Tijdschr Klin Chemie 1993; 18: 317-321 en Janssens PMW, Ned Tijdschr Klin Chemie 1994; 19: 140.
4. Kjeldsberg CR, Knight JA. Body Fluids. Am Soc Clin Pathol Chicago 1993, 3-ed (ISBN 0-89189-344-X).
5. Tarn AC, Lapworth R. Biochemical analysis of pleural fluid: what should we measure? Ann Clin Biochem 2001; 38: 311-322.
6. Schieferstein G. Prostate-specific antigen (PSA) in human seminal plasma. Arch Androl 1999; 42: 193-197.

# How to make money out of shit

*C.J.J. Mulder*

In de jaren '30 van de vorige eeuw wilde Willem Dicke de klachten van zijn patiënten met coeliakie vertalen in objectieve getallen. Remsporen op het toilet was niet voldoende. De vetbalans werd ontwikkeld om zijn gelijk te bewijzen. De crosby-capsule van de jaren '50 verving de vetbalans. De vetbalans gebruiken we nu voornamelijk om patiënten met pancreassubstitutie goed in te stellen. We moeten ons realiseren dat dit nog vrijwel de klassieke test van de jaren '40 is. Indien bij anemie er remsporen op het toilet zijn bepalen we soms een elastase en verder werd er gebiopteerd met endoscopen en werden er zgn. suikerabsorptietesten en/of H<sub>2</sub>-ademtesten verricht. Onderzoek van de faeces op het laboratorium raakt uit.

Eind jaren '60 dachten we dat de faeces occultbloed-test de doorbraak zou brengen voor colonkanker screening. De gezondheidsraad stelt dat het onderzoek naar bloed in de ontlasting resultaat oplevert, maar veel nadelen kent. Zo is de test ongeschikt om voorlopers van dikke darmkanker te ontdekken. Er zijn teveel positieve foutmeldingen. Het meest positief is de sigmoidoscopie. Faeces occult wordt vrijwel alleen defensief gebruikt. Een eenvoudige faecesvertering is prima om te weten of er iets afwijkend is en om te weten of de patiënten echt diarree heeft. Het bepalen van het faeces-gewicht zegt, wat over de vezelintake. Een faeces-output van <200 gram per 3 dagen verklaart de buikpijn van de IBS-patient goed. Het verschil herkennen van secretoire versus osmotische diarree vraagt soms om faeces-onderzoek. De osmolaliteit van faeces kan zowel worden gemeten als berekend door de Na<sup>+</sup> en K<sup>+</sup> concentratie in de faeces met 2 te vermenigvuldigen. Osmotische diarree wordt gekarakteriseerd door een osmol-gap van >60 mOsm/mg faeces. Doch deze vorm van diarree stopt indien men niet eet.

# Opzet en toepassing van diverse bepalingmethoden voor melatonine het hormoon van het donker.

*J.E. Nagtegaal*

In de hersenen bevindt zich de pijnappelklier waar het neurohormoon melatonine wordt gesynthetiseerd. Gedurende de avond neemt de productie van melatonine toe. 's Nachts wordt tussen 01.00 en 05.00 uur de maximumconcentratie bereikt. Vervolgens neemt deze weer af tot een serumniveau van minder dan 10 pg/ml overdag.

De licht-donker cyclus synchroniseert via het netvlies het ritme van de melatonine secretie tot ongeveer 24 uur; dit wordt het circadiane ritme genoemd. In het netvlies zelf wordt eveneens melatonine geproduceerd, en ook dit proces heeft een circadiaan verloop [1]. Naast het effect van licht, verandert de melatonine secretie tevens als gevolg van het ouder worden. Jonge kinderen hebben de hoogste spiegels.

Melatonine receptoren zijn aanwezig in: de hersenen, het netvlies, de geslachtsorganen en de uterus. De belangrijkste melatonine receptoren bevinden zich in de suprachiasmatische nuclei van de hypothalamus en de pars tubularis van de hypofyse.

De Supra Chiasmatische Nucleus (SCN) is de pacemaker die verscheidene circadiane ritmen reguleert; zoals de synthese van melatonine, de synthese van cortisol en het verloop van de lichaamstemperatuur. Vergeleken met andere circadiane ritmen, lijkt de 24 uren afgifte van melatonine relatief stabiel en weinig onderhevig aan invloeden van buitenaf. Hierdoor is het endogene melatonine ritme een betrouwbare parameter voor chronobiologische studies.

Melatonine kan rechtstreeks in speeksel en serum worden bepaald middels Radio Immuno Assays (RIA). Met deze bepalingen heeft de afdeling Klinische Chemie van de Gelderse Vallei de afgelopen jaren veel ervaring opgedaan. Ook analyse met behulp van de Gas Chromatografische-Massa Spectrometer (GC-MS) is in de literatuur beschreven [2], wij hebben hier echter geen ervaring mee. In urine kan de metaboliet 6-sulfatoxy melatonine met RIA worden bepaald.

In ons onderzoek hebben we de bepaling van zogenaamde 24 uren melatonine curven in serum en later in speeksel gebruikt voor zowel diagnostische als therapeutische doeleinden. Allereerst werd de curve gebruikt om de Dim Light Melatonin Onset (DLMO) te bepalen. De DLMO is gedefinieerd door Lewy en coauteurs als het tijdstip waarop de plasma spiegel 10 pg/ml bedraagt, bij een stijgende curve [3]. Bij patiënten met het Delayed Sleep Phase Syndrome (DSPS), een slaap-waak stoornis waarbij mensen pas extreem laat in slaap vallen [4], hebben wij onderzocht of de DLMO afwijkend was van een populatie mensen met een normaal slaap-waak ritme. Vervolgens zijn deze DSPS patiënten op basis van de DLMO behandeld met exogeen melatonine. Bij gezonde mensen was namelijk aangetoond dat exogeen melatonine het meest effectief de endogene melatonine curve beïnvloedt wanneer het 5 uur voor de DLMO wordt ingenomen.

In een vergelijkend onderzoek hebben we gevonden dat de 'Dim Light Melatonin Onset' (DLMO) van 10 pg/ml in serum, bij DSPS patiënten overeenkomt met een DLMO van 4 pg/ml in speeksel [5].

Aan melatonine wordt een aantal eigenschappen toegeschreven: hypnotische, fase verschuivende, temperatuurregulerende en radicalenvangende eigenschappen. Voor het onderzoek van exogeen melatonine bij mensen kan chemisch gesynthetiseerd melatonine worden toegepast. Melatonine heeft een korte halfwaardetijd van 30-60 minuten. De farmaceutische toedieningsvorm en de aanwezigheid van voedsel in de maag bepalen het tijdsverloop tussen de inname en de topspiegel. Melatonine wordt door de lever

gemetaboliseerd. De belangrijkste metabooliet, 6-sulfatoxy melatonine, wordt in de urine uitgescheiden.

Uit de studie in DSPS patiënten, is gebleken dat de DLMO van DSPS patiënten later wordt bereikt dan bij gezonde vrijwilligers. Na behandeling met melatonine gedurende twee weken, ingenomen 5 uur voor de individuele DLMO bij de uitgangssituatie, was de DLMO gemiddeld anderhalf uur vervroegd. Opvallend was de verandering van de vorm van de endogene melatonine curve: de stijgende curve was vervroegd, terwijl de dalende curve niet was verschoven. Het temperatuursminimum was niet vervroegd na behandeling met melatonine. Tijdens de periode waarin melatonine werd gegeven was er een significante vervroeging van het inslaaptijdstip en een afname van de slaaplatentie. Patiënten voelden zich 's morgens ook beter uitgerust gedurende de periode waarin zij melatonine slikten. De eindconclusie was dat behandeling met 5 mg melatonine ingenomen 5 uur voor de DLMO, het inslaaptijdstip en de endogene melatonine aanmaak vervroegt [6].

De verbetering door melatonine is zelden blijvend. De verslechtering zet meestal niet direct in. Dagan e.a. hebben beschreven dat de inslaap-, en ontwaaktijden *voor* behandeling bij de mensen die *direct* terugvielen veel later waren dan bij de mensen waar het effect enige tijd aanbleef [7]. Om beter inzicht te krijgen in de pathofysiologie van DSPS en het werkingsmechanisme van exogeen melatonine, lijkt het zinvol om de periode tussen stopzetting van melatonine inname en de daaropvolgende terugval te bestuderen. Wellicht valt daarover in de toekomst meer te vertellen.

#### Literatuur

1. Arendt J. Biochemistry of the pineal. In: *Melatonin and the mammalian pineal gland*, Arendt J, (ed). Chapman and Hall, London, UK, 1 ed. 1995: 27-63.
2. Neuwelt EA, Lewy AJ. Disappearance of plasma melatonin after removal of a neoplastic pineal gland. *New Engl J Med* 1983; 19: 1132-1135.
3. Lewy AJ, Ahmed S, Latham Knackson JM, Sack RL. Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase-response curve. *Chronobiology Int* 1992; 9: 380-392.
4. Diagnostic Classification Steering Committee of the American Sleep Disorders Association. The International Classification of Sleep Disorders. Diagnostic and coding manual. 1990: 128-133.
5. Nagtegaal, A.B.H. Peeters, A.C.W. Swart, M.G. Smits, G.A. Kerkhof, Y.G. van der Meer. Correlation between concentrations of melatonin in saliva and serum in patients with delayed sleep phase syndrome. *Ther Drug Mon* 1998; 20, 181-183.
6. Nagtegaal JE, G.A. Kerkhof, M.G. Smits, A.C.W. Swart, Y.G van der Meer. Delayed sleep phase syndrome: a placebo-controlled study on the effects of melatonin administered 5 hours before the individual dim light melatonin onset. *J Sleep Res* 1998; 7,135-143.
7. Dagan Y, Yovel I, Hallis D, Eisenstein M, Raichik I. Evaluating the role of melatonin in the long-term treatment of delayed sleep phase syndrome (DSPS). *Chronobiology Int* 1998; 15(2), 181-190.

# Meting van steroïdhormonen in speeksel: mogelijkheden en beperkingen.

H.A. Ross

Reeds in de zestiger jaren maten Katz en Shannon [1] cortisol in speeksel, maar door de komst van de immunoassays werd het pas mogelijk om het potentieel van speekselmetingen van steroïdhormonen te gaan verkennen. Een eerste samenvatting hiervan werd gegeven door Riadh-Fahmi in 1982 [2]. Veel wetenschappelijke toepassingen zijn nog gevolgd, maar qua omvang het meest succesvol lijkt de toepassing in gedragswetenschappelijk onderzoek waar b.v. het speeksel cortisol als maat voor stress wordt gebruikt. In de ziekenhuislaboratoria heeft routinematige bepaling echter nooit een grote plaats veroverd.

Potentiële voordelen van het meten van steroïdhormonen in speeksel t.o.v. plasma zijn:

- 1) Speeksel is bij benadering als ultrafiltraat van serum te beschouwen.  
Als dit juist is, is meting in speeksel vergelijkbaar met meting van vrij hormoon in serum.
- 2) "Schone" matrix, geen bindende eiwitten
- 3) Gemakkelijke, stressloze afname:
  - a. maakt frequente afname mogelijk, ook in de thuissituatie
  - b. afname bij kleine kinderen eenvoudiger
  - c. minder ethische problematiek bij onderzoeksaanvragen

## Speeksel als ultrafiltraat van serum.

Steroïden kunnen volgens Vining [3] vanuit de bloedbaan op twee manieren in het speeksel terechtkomen: diffusie door de speekselklier cel of convectie door de ruimte tussen de cellen. De eerste route wordt vooral gevolgd door de lipofiele moleculen, d.w.z. de vrije, niet geconjugeerde steroïden terwijl de tweede door wateroplosbare, dus de geconjugeerde steroïden wordt doorlopen. Bij hogere speekselproductie vanuit de cel blijft de concentratie van de via de cel getransporteerde steroïden gelijk, de concentratie van de steroïden die niet via de cel getransporteerd worden, daalt daarentegen. Experimenteel werd dit aangetoond doordat speeksel cortisol onafhankelijk was van stimulatie van de speekselvloed tot het vijfvoudige terwijl de concentratie DHEAS in speeksel daarbij significant daalde.

Voor de ongeconjugeerde steroïden geldt, dat de concentratie in speeksel sterker een afspiegeling is van de vrije dan van de totale concentratie in serum [2,4,5]. Dit is verklaarbaar als aangenomen wordt dat de speekselklier alleen toegankelijk is voor het vrije, niet aan transport eiwitten gebonden steroïd. Een noodzakelijke tweede aanname daarbij is, dat de dissociatie van de steroïd-eiwit complexen niet snelheidsbepalend is voor het transport van vrij steroïd door de speekselklier cel. Zou dit wel het geval zijn, dan zou de speekselconcentratie vooral met de concentratie eiwitgebonden steroïd in serum moeten correleren. Het is niet altijd even eenvoudig om de werkelijke verbanden op het spoor te komen, omdat variaties in serum totaal en vrij hormoon meestal sterk parallel lopen. Pas bij grote verschillen in serum binding, zoals tussen groepen vrouwen die wel en geen orale anticonceptiva gebruiken, is te beoordelen of de speeksel concentratie beter met vrij dan met totaal steroïd in serum correleert. Variatie in binding ontstaat ook bij de fluctuaties van cortisol over de dag. Bij een stijgend vrij cortisol raakt het CBG verzadigd, zodat het gebonden cortisol geen gelijke tred kan houden met het vrije cortisol. Hierdoor stijgt het totale cortisol minder sterk dan het vrije, hetgeen ook tot uiting komt in het speeksel cortisol.

Het beschouwen van speeksel als een rechtstreeks ultrafiltraat van serum is echter veel te simpel. Om het beperkt te houden tot corticosteroïden en androgenen, valt meteen op dat speeksel cortisol lager is dan vrij cortisol in serum ( $9,2 \pm 3,9$  vs.  $18,1 \pm 7,9$  nmol/l), terwijl voor de metaboliet cortison het omgekeerde geldt ( $24,2 \pm 5,4$  vs.  $10,8 \pm 2,6$  nmol/l) [6]. Voor testosteron geldt het omgekeerde: speeksel testosteron is hoger dan vrij testosteron in serum ( $23,6 \pm 6,8$  vs.  $8,3 \pm 3,4$  pmol/l), terwijl de concentratie van de voorloper androsteendion in speeksel lager is dan de vrije concentratie in plasma ( $0,37 \pm 0,15$  vs.  $0,44 \pm 0,15$  nmol/l) [7]. Er

is een theorie volgens welke het speeksel testosteron afkomstig is van het albuminegebonden ("bioavailable") testosteron [8]. Dit zou dan een verklaring vormen van het relatief hoge speeksel testosteron. Voor androsteendion zou dan echter hetzelfde moeten gelden. Waarschijnlijker lijkt het dat hier interconversie van testosteron en androsteendion in de speekselklier cel in het spel is [7], hetgeen ook zou kunnen gelden voor cortisol/cortison waarvan de aanwezigheid van het hiervoor benodigde enzym in speekselklierweefsel is aangetoond [9].

### **Monsternamen en bepaling van steroïdhormonen in speeksel.**

Speeksel kan gecontamineerd zijn met bloed (vele mogelijke oorzaken), slijmvliessen en/of voedselresten. Verder kan het visceus zijn waardoor het lastig te behandelen is. Het volume per monster kan verhoogd worden door stimulatie van de speekselvloed d.m.v. citroenzuur. Storing in de immunoassay door pH verandering kan het gevolg zijn. Het gebruik van kleine tampons die enige tijd in de wang gehouden worden zijn als oplossing voor genoemde problemen toegepast. De hoeveelheid speeksel die hieruit verkregen wordt is voor hormonen met lage concentratie te klein. Ook is interferentie door materialen in de tampon en verliezen door adsorptie mogelijk [10]. De meest risicovolle wijze van afname is door verzamelen nadat zorgvuldig de mond is gespoeld van 5-10 ml, zonder stimulatie. Het monster kan door ultrasoon trillen hanteerbaar worden gemaakt, waarbij ook mogelijke insluitingen worden opgeheven.

Ongemodificeerde, directe immunoassays zijn meestal minder geschikt voor meting in speeksel, vanwege ontoereikende gevoeligheid of specificiteit. De onderlinge concentratieverhoudingen van steroïden verschillen sterk van die in serum, zodat kruisreacties die in serum niet relevant zijn, dat in speeksel wel kunnen zijn. In het algemeen worden met directe immunoassays hogere waarden gevonden dan wanneer eerst een extractie en chromatografische voorzuivering wordt toegepast.

### *Enkele toepassingen*

Het specifieke voordeel van de mogelijkheid tot frequent afnemen kan te hulp worden geroepen bij de diagnose van Cushing's syndroom als de gebruikelijke suppressietests geen eenduidige resultaten geven. Een gestoord dagritme van cortisol kan soms pas bij langdurig vervolgen worden vastgesteld, iets wat met speekselmetingen, waarbij de patiënt zelf thuis voor het verzamelen zorg draagt veel eenvoudiger realiseerbaar is dan met venapunctie [11].

Een andere omstandigheid waarin frequente venapunctie bezwaarlijk is, is bij pasgeborenen met congenitale bijnierhyperplasie t.g.v. 21-hydroxylase deficiëntie. Voor een goede controle op de substitutietherapie is frequente monsternamen zeer wenselijk. Bepaling van 17 OH-progesteron en androsteendion in speeksel biedt hierbij uitkomst [12]. Bij het vervolgen van substitutie therapie met hydrocortison is meting van speeksel cortisol ook zinvol [13].

De laatste jaren neemt het aantal publicaties op antropologisch en gedragswetenschappelijk terrein waarbij steroïdhormonen in speeksel worden gemeten, sterk toe. Ongetwijfeld speelt hierbij een rol dat men m.b.v. metingen in speeksel onderzoek kan verrichten waarvoor geen toestemming verkregen zou worden indien bloedafname daarvoor vereist zou zijn (als voorbeeld zie [14]). Aangezien i.h.a. geen al te grote belangstelling vanuit deze hoek voor analytisch-technische aspecten van de gebruikte meetmethoden te verwachten is, bestaat de kans dat de uitkomsten van dergelijke onderzoeken in belangrijke mate zullen afhangen van de keuze die daarbij is gemaakt voor een bepaalde commerciële methode.

### **Literatuur**

1. Katz FH, Shannon IL 1964 Identification and significance of parotid fluid corticosteroids. Acta Endocrinol (Copenh) 46): 393
2. Riad-Fahmy D, Read GF, Walker RF, Griffiths K 1982 Steroids in saliva for assessing endocrine function. Endocr Rev 3:367-395
3. Vining RF, McGinley RA 1983 Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. Clin Chem 29: 1752-1756

4. Vining RF, McGinley RA, Maksytyis JJ, Ho KY. 1983 Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann Clin Biochem* 20:329-335
5. Baxendale PM, Jacobs HS, James VHT 1982 Salivary testosterone: relationship to unbound plasma testosterone in normal and hyperandrogenic women. *Clin Endocrinol* 16: 595-603
6. Meulenbergh PM, Ross HA, Swinkels LM, Benraad TJ 1987 The effect of oral contraceptives on plasma-free and salivary cortisol and cortisone. *Clin Chim Acta* 165:379-385
7. Swinkels LM, van Hoof HJ, Ross HA, Smals AG, Benraad TJ 1992 Low ratio of androstenedione to testosterone in plasma and saliva of hirsute women. *Clin Chem* 38:1819-1823
8. Partridge WM, Demers LM 1991 Bioavailable testosterone in salivary glands. *Clin Chem* 37:139-140
9. Ferguson MM, MacPhee GB 1975 Kinetic study of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in rat submandibular salivary glands. *Arch Oral Biol* 20:241-245
10. Shirtcliff EA, Granger DA, Schwartz E, Curran MJ 2001 Use of salivary biomarkers in biobehavioural research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psychoneuroendocrinology* 26: 165-173
11. Hermus AR, Pieters GF, Borm GF, Verhofstad AA, Smals AG, Benraad TJ, Kloppenborg PW 1993 Unpredictable hypersecretion of cortisol in Cushing's disease: detection by daily salivary cortisol measurements. *Acta Endocrinol* 128: 426-432
12. Otten BJ, Wellen JJ, Rijken JC, StoeligaGB 1983 Salivary and plasma androstenedione and 17-hydroxyprogesterone levels in congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 57:1150-1154
13. Gröschl M, Rauh M, Dörr HG 2002 Cortisol and 17-hydroxyprogesterone kinetics in saliva after oral administration of hydrocortisone in children and young adolescents with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocr Metab* 87:1200-1204
14. Berg SJ, Wynne-Edwards KE 2001 Changes in testosterone, cortisol and estradiol levels in men becoming fathers. *Mayo Clin Proc* 76:582-592

# Diagnostiek met betrekking tot pleuravocht klinische implicaties.

M.J.T. van de Ven

## Klinische symptomen van pleuravocht

1. Dyspnoe (>50%)
2. Pijn op de borst
3. Paraneoplastische symptomen als cachexie, anorexie

## Diagnostiek pleuravocht

Is het een transudaat of een exsudaat:

Bepalen van de **criteria van Light**:

1. Ratio van eiwitgehalte in het pleuravocht / eiwitgehalte in het serum is >0.5
2. de ratio van LDH in het pleuravocht / serum-LDH is >0.6
3. LDH in pleuravocht is >200 E/L of >2/3 van de bovengrens van de referentiewaarde in het serum

## Alternatief: serum/pleuravocht cholesterol

Routine laboratoriumonderzoek van een **exsudaat** omvat:

- Aspect van het vocht
- Klinische chemie: totaal eiwit, LDH, glucose, amylase, pH
- Hematologie: Hb, Ht, differentiatie, leukocyten
- Microbiologie: directe preparaten en kweken
- Cytologie

**Tabel 1.** Differentiaaldiagnose transudaat/exsudaat

Transudaat	Exsudaat
Congestive heart failure	Maligniteit: mesothelioom, gemetastaseerd proces
Pericard ziekte	Infektieus: bacterieel/viraal/tuberculose, actinomyces, nocardia, schimmels, parasitair
Cirrhose	Longembolie
Nephrotisch syndroom	Gastro-intestinale ziekte: o.a. oesophagusperforatie, pancreasziekte, intra-abdominale abcessen
Myxoedeem	Collageen (systeem) ziekte: reumatoïde pleuritis, Lupus Erythematosus, Sjögren, Churg-Strauss syndroom, M. Wegener
Longembolie	Na thorax/hartchirurgie
Sarcoidose	Asbest expositie
	Sarcoidose
	Medicamenteus geïnduceerd: o.a. nitrofurantoin, cordarone
	Haematothorax
	Chylothorax
	Na radiotherapie
	Trapped lung
	Zeldzaam: Yellow-nail syndroom, Meigs' syndroom

**Tabel 2.** Interpretatie van metingen in pleuravocht en klinische betekenis

Parameter	Interpretatie
celtelling en differentiatie	leucocyten telling: weinig diagnostische waarde neutrofielen verhoogd: infectie lymfocyten verhoogd: tuberculose?
pH, glucose, LDH	van additieve waarde voor thoraxdrainage bij parapneumonische effusie: - pH > 7,20: afwachten - pH > 7,00 en ≤ 7,20 controle pleurapunctie binnen 1-2 dagen - pH ≤ 7,00 : actieve thoraxdrainage - Bij pH ≤ 7,20 pH, glucose <2.2 mmol/L en LDH > 1000 IE/L: cave fibropurulente status!
amylase	verhoogd (speeksel)amylase: oesophagus-ruptuur
chylomicronen, triglyceriden > 110 mg/dL	chylothorax
adenosine deaminase (ADA): ADA <sub>1</sub> en ADA <sub>2</sub>	ADA <sub>1</sub> ↑: empyeem, parapneumonische effusie ADA <sub>2</sub> ↑: tuberculeuze pleuritis
interferon-γ	tuberculeuze pleuritis

### Literatuur

1. Management of pleural disease. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, 2001;22,591-701.
2. Bauwens AMM, De Graaf CS, Boersma WG. Pleuravocht en empyeem als complicatie van pneumonie. NTVG 2002;146,464-469.
3. Statement of the American Thoracic Society: management of malignant pleural effusions. Am J Respir Crit Care Med 2000;162,1987-2001.
4. Riantawan P, Chaowalit P, Wongsangiem M, Rojanarawee Wong P. Diagnostic value of pleural fluid adenosine deaminase in tuberculous pleuritis with reference to HIVcoinfection and a bayesian analysis. Chest 1999;116,97-103.
5. Van Noord JA. Pleuravocht. Hoofdstuk 3. Longziekten, Band 1. Editors: M. Demedts, J.H. Dijkman, C. Hilvering, D.S.Postma. 1999. Van Gorcum Assen.

# Onderzoek van synoviaal vocht.

*M. Janssen*

Het onderzoek van synoviaalvocht is een van de meest nuttige diagnostische procedures bij een patiënt met gewrichtsklachten. Een probleem is, dat niet altijd gewrichtsvocht is te aspireren omdat er weinig is of omdat het gewricht moeilijk toegankelijk is.

Er zijn drie belangrijke redenen om onderzoek van synoviaalvocht te doen nl:

1. differentiatie tussen niet-inflammatoire, inflammatoire en haemorrhagische zwelling van een gewricht;
2. microbiologisch onderzoek;
3. onderzoek naar de aanwezigheid van kristallen.

## **Differentiatie tussen niet-inflammatoire en inflammatoir**

Bij punctie van een gewricht valt onmiddellijk op of het synoviaalvocht helder, troebel of haemorrhagisch is. Haemorrhagisch vocht komt voor bij een haemartros (gewrichtsbloeding). We zien dat na een trauma, stollingsstoornis (bijv. haemofilie en bij gebruik van orale anticoagulantia) en zeldzaam bij gewrichtstumoren.

Helder synoviaalvocht bevat weinig of geen leucocyten. Dit vocht past bij niet-inflammatoire ("orthopaedische") aandoeningen.

Inflammatoir vocht is troebel door de aanwezigheid van leucocyten. Het past bij inflammatoir ("reumatologische") aandoeningen. Als afkappunt tussen niet-inflammatoir en inflammatoir wordt i.h.a. 2000 leucocyten  $\text{mm}^3$  aangehouden. Deze scheiding is niet absoluut en overlap komt voor. In de tabel staan enkele oorzaken aangegeven.

Differentiatie van de aanwezige witte bloedcellen levert additionele aanknopingspunten voor een inflammatoire artritis op. Indien de differentiatie voor meer dan 75% uit polymorf nucleaire cellen bestaat verhoogd dit de kans op de aanwezigheid van een inflammatoire aandoening (sensitiviteit 75%; specificiteit 92%).

Een minder specifiek kenmerk van niet-inflammatoir vocht is dat een vallende druppel van een naald zeer visceus is en draden van 5 à 6cm lengte trekt, terwijl inflammatoir synoviaalvocht zich gedraagt als water. Wanneer er sprake is van een bacteriële infectie van een gewricht (septische artritis) zal het synoviaalvocht i.h.a. eruit zien als pus. Het aantal leucocyten zal boven de 50.000  $\text{mm}^3$  liggen. Een lager aantal leucocyten sluit een bacteriële infectie echter niet uit (m.n. TBC, schimmelinfecties). Bij aandoeningen als reumatoïde artritis en reactieve artritis (dit is een artritis bij een infectie op afstand) zal men regelmatig ook meer dan 50.000 leucocyten/ $\text{mm}^3$  aantreffen. Ten behoeve van onderzoek wordt het synoviaal vocht bij voorkeur in een EDTA buis of nog in de spuit aangeboden aan het laboratorium. Materiaal dient zo snel mogelijk onderzocht te worden, daar anders veranderingen in het synoviaal vocht optreden.

## **Microbiologisch onderzoek**

Zeer belangrijk is ook het microbiologische onderzoek van synoviaalvocht.

Dit bestaat uit een gram-kleuring en een kweek. Binnen enkele minuten kan het resultaat van een gram-preparaat bekend zijn. Dit geeft richting aan de keuze van het antibioticum. De uitslag van een positieve kweek zal i.h.a. één of hooguit enkele dagen op zich laten wachten.

Een belangrijke uitzondering vormt een infectie met gonococcen. Het gram preparaat zal meestal negatief zijn, en de aanvrager zal moeten aangeven dat aan deze mogelijkheid gedacht wordt, omdat in het algemeen kweken op een speciaal medium moeten worden ingezet.

Zeker niet ieder synoviaalvocht behoeft microbiologisch onderzoek.

Het klinische beeld (vooral koude rillingen, hoge koorts en plotselinge artritis) blijft de belangrijkste leidraad voor aanvraag van dit onderzoek.

Tenslotte dient nog gewezen te worden op de mogelijkheid van PCR onderzoek. Sporadisch wordt dit toegepast bij onderzoek naar Lyme artritis of TBC. Mogelijk dat deze methode in de toekomst meer toepassing zal vinden.

### Onderzoek naar kristallen

Dit is zeer belangrijk onderzoek en vindt plaats met een polarisatie microscoop. Een fractie van een druppel of alleen de inhoud van de punctienaald is soms voldoende om een diagnose te kunnen stellen. De inhoud van de naald kan op een objectglaasje worden gespoten.

De belangrijkste categorieën zijn jicht en pseudo-jicht, of beter gezegd calcium pyrofosfaat deposition disease (CPPD). De sensitiviteit voor kristallen onderzoek is niet 100% maar ervaren onderzoekers scoren 90-95% voor jicht en 75-80% voor pseudo-jicht. Door het synoviaalvocht te centrifugeren alvorens het sediment te onderzoeken kunnen deze percentages nog iets worden verbeterd.

Ook andere kristallen kunnen voorkomen, zoals oxalaat- en hydroxyapatiet kristallen. Deze kristallen worden gemist bij het routine onderzoek, bovendien zijn ze zeer zeldzaam. Apatietkristallen kunnen worden gevonden met de alizarine-rood kleuring, een bewerkelijk, weinig gebruikte methode.

Andere meer frequent voorkomende kristallen in synoviaalvocht zijn kristallen na een intra-articulare corticosteroïd injectie, vetbolletjes (zgn. maltezer kruizen) en cholesterolkristallen. Deze laatste bevindingen hebben geen klinische betekenis. Tenslotte is het van belang om onderzoek naar kristallen en leucocyten in synoviaalvocht snel na de punctie te verrichten (binnen enkele uren) daar anders celtellingen en kristalonderzoek onbetrouwbaar worden.

### Conclusie

Onderzoek van synoviaalvocht is voor de kliniek van gewrichtsziekten een onmisbare en uiterst belangrijke pijler in de diagnostiek.

**Tabel:** Indeling in niet-inflammatoire (leucocyten in synoviaalvocht  $\leq 2000/\text{mm}^3$ ) en inflammatoire (leucocyten  $> 2000/\text{mm}^3$ ) oorzaker van artritis.

niet-inflammatoir	inflammatoir
geïsoleerde primaire osteoartrose <sup>1</sup> trauma en mechanische oorzaken <sup>1</sup> (o.a. meniscusscheur, gescheurde kruisbanden of collaterale banden)	reumatoïde artritis <sup>1</sup> kristalartritis <sup>1</sup> (o.a. jicht en pseudo-jicht) <sup>2</sup>
gewrichtsbloeding aseptische osteonecrose gewrichtsmuis amyloïdartropathie <sup>7</sup> neuroartropathie (Charcot gewricht) <sup>7</sup> gewrichtstumoren (o.a. synovitis villonodularis pigmentosa, synoviosaroom) <sup>7</sup>	arthritis psoriatica <sup>3</sup> reactieve artritis <sup>4</sup> septische artritis <sup>5</sup> palindroom reuma <sup>6</sup> systemische lupus erythematoses <sup>7</sup> polyarteriitis nodosa <sup>7</sup>
Metabole gewrichtsziekten (o.a. hemochromatose, acromegalie, chronose, hyperparathyreoïdie)* bloedziekten <sup>7</sup> (o.a. haemofilie, sikkelcelanaemie)	immuuncomplexartritis <sup>7</sup> (o.a. endocarditis, cryoglobulinaemie)

\* Bij hyperparathyreoïdie gaat het vaak om kristalartritis (pyrofosfaatstapeling, pseudo-jicht)

1. Deze aandoeningen zijn niet zeldzaam, alle andere niet-inflammatoire aandoeningen wel.
2. Aangevoerd door het aantonen van kristallen in synoviaal vocht middels een polarisatiemicroscoop (reumatoloog)
3. Psoriasis veelal aanwezig maar niet altijd.
4. Na infectieuze gastro-enteritis, een venerische infectie of streptococce angina (post streptococce reactieve artritis, acuut reuma)

5. Patiënt vaak acuut ziek, vaak immunocompromised door hoge leeftijd, diabetes mellitus of onderliggende maligniteit. Porte d'entree vooral huid (ulcera, wondjes tussen tenen), urinewegen en luchtwegen
6. Klassiek is artritis: duur korter dan 4 dagen, gevolgd door een klachtenvrij interval. Tijdens artritis heeft de patiënt vaak koorts. Sporadisch vindt evolutie tot reumatoïde artritis plaats.
7. Extreem zeldzaam.

## Literatuur

- Shmerling RH. Synovial fluid analysis. A critical reappraisal. *Rheum Dis Clin North Am* 1994; 20:503-12.
- Shmerling RH, Delbanco TL, Tosterson ANA, Trentham D.A. Synovial fluid tests. What should be ordered? *JAMA* 1990; 264:1009-14.
- Pasqual E. Persistence of monosodium urate crystals and low grade inflammation in the synovial fluid of patients with untreated gout. *Arthritis Rheum* 1991; 34:141-145.
- Kerolus G, Clayburne G, Schumacher HR. Is it mandatory to examine synovial fluid promptly after arthrocentesis. *Arthritis Rheum* 1989; 32:271-8.
- Dieppe P, Hornby J, Swam A et al. Laboratory handling of crystals. *Ann Rheum Dis* 1983; 42:60-3.
- Paul H, Reginato AJ, Schumacher HR. Alizarine red S staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1983; 26:191-200.
- Schumacher HR, Verghese Cherian P, Reginato AJ et al. Intra-articular apatite crystal deposition. *Ann Rheum Dis* 1983; 42:54-9.
- Schumacher HR, Reginato AJ. Atlas of synovial fluid analysis and crystal identification. 1991. Lea and Febiger, Philadelphia, London.

# De gestoorde zweettest en cystic fibrosis: het pathofysiologisch verband.

*J.L. Yntema*

## **Inleiding**

Cystic fibrosis (CF) is een autosomaal recessief erfelijke aandoening die veroorzaakt wordt door een mutatie in het gen dat codeert voor het CF transmembraan regulator eiwit (CFTR). De incidentie in Nederland wordt geschat op 1:3600 levendgeborenen. Sinds het gendefect in 1989 werd ontdekt is over de functie van CFTR veel bekend geworden. CFTR functioneert normaal als een cyclisch adenosine monofosfaat (cAMP)-gereguleerd chloride kanaal. Door een defect in het CFTR ontstaan functionele afwijkingen in de apicale membraan van epitheel cellen in verschillende organen, met name in de exocriene klieren van de luchtwegen en pancreas en in de zweetklier. Deze afwijkingen spelen een belangrijke rol bij het ontstaan van klinische verschijnselen van de ziekte zoals chronische bacteriele luchtweginfecties en gestoorde groei door malabsorptie van vet. De belangrijkste afwijking in de zweetklier is het ontstaan van een verhoogd zoutgehalte in zweet. Omdat zweet gemakkelijk en niet-invasief te verzamelen is neemt de zweettest van oudsher een belangrijke plaats in bij de diagnostiek van CF. De 'trias' chronische hoest, groeiachterstand en gestoorde zweettest is nog altijd klassiek voor het stellen van de diagnose CF.

## **De rol van CFTR**

Het onderhouden van de vocht en electrolietenbalans over epitheliale oppervlakken is een complex proces. Een verandering in de ene ionenstroom (bijvoorbeeld chloride) leidt tot veranderingen in het transport van andere ionen (bijvoorbeeld natrium) en water. Met het ontrafelen van de functie van CFTR bleken lang niet alle veranderingen in het ionen transport over het epitheliale membraan verklaard te kunnen worden. Nu is bekend dat er naast CFTR nog tal van andere ionenkanalen bij dit transport betrokken zijn. Ook is nu bekend dat CFTR niet alleen de functie van een c-AMP gereguleerd chloridekanaal heeft, maar soms ook het transport van andere ionen reguleert. Over de interactie tussen deze verschillende kanalen is nog weinig bekend. De mate van expressie van CFTR is per orgaan zeer verschillend. Ook blijkt de functie van CFTR niet in elk orgaan hetzelfde. De afwezigheid van CFTR leidt dan ook tot orgaan-specifieke pathologie. In de luchtweg en darm bijvoorbeeld is de regulatie van het volume van het mucus functioneel het belangrijkste, in de zweetklier de resorptie van zout en niet de regulatie van het volume. In de pancreas speelt het CFTR een rol in de regulatie van zowel het volume als het bicarbonaatgehalte van het secreet.

## **Zweetklier**

De zweetklier is een complexe structuur, die schematisch verdeeld kan worden in een kliergedeelte waarin isotone vloeistof wordt uitgescheiden, en een buisgedeelte waarin zout maar geen water wordt terug geresorbeerd. Chloride wordt transcellulair getransporteerd door apicale en basale chloridekanalen. CFTR reguleert waarschijnlijk het chloride transport in de apicale (lumenzijde) van de ductale cel. Hoe het chloridetransport in het basale kanaal wordt gereguleerd is nog niet opgehelderd. Natrium wordt geresorbeerd via een Na-kanaal aan de apicale zijde en uit de cel getransporteerd via een basaal gelegen Na-K-ATPase. Er is geen collateraal watertransport omdat de "tight junctions" tussen de ductale cellen dit beletten. Het resultaat is de uitscheiding van een hypotone waterige vloeistof die door verdamping van water een koelend effect heeft.

## **Luchtwegeepitheel**

Het ionentransport in het luchtweg epitheel vertoont in principe veel overeenkomst met het transport in de zweetklier. Echter, in de luchtweg is er wel collateraal watertransport via de

"tight junctions" mogelijk (Figuur 1). Dit heeft dan ook belangrijke gevolgen voor het volume en de viscositeit van het bronchiale secret. Aanvankelijk werd gedacht dat ook de zoutconcentratie van het bronchiale secret was veranderd, maar dit is nu voldoende weerlegd. Bij een defect in het CFTR is er een toegenomen transport van natrium en collateraal water naar de serosa kant van het epitheel. Het gevolg is een reductie van het mucusvolumen en toename van de viscositeit. Dit leidt indirect tot een gestoorde lokale afweer van de mucosa tegen bacteriën en een influx van ontstekingscellen. Het gevolg is een chronische cyclus van infectie en ontsteking, met uiteindelijk een ernstig verlies van longcapaciteit.

### **Pancreas**

In de pancreas komt het CFTR voornamelijk tot expressie in de klierbuizen. Het ductale epitheel produceert een bicarbonaat-rijke vloeistof, die de enzymproducten afkomstig uit de acinaire cellen in de richting van de dunne darm spoelt. Waarschijnlijk komt het CFTR in de apicale membraan aan de lumenkant tot expressie, parallel geschakeld met een chloride-bicarbonaat wisselaar. De door het CFTR in het lumen uitgescheiden chloride ionen worden hierbij uitgewisseld tegen bicarbonaat.

Afwezigheid van CFTR leidt tot afname van het water- en bicarbonaat gehalte van het pancreas secret. Door de verhoogde viscositeit ontstaat verstopping, autodigestie van de pancreas door enzymen en uiteindelijk fibrose. Dit proces is reeds bij de geboorte in een vergevorderd stadium. Groeivertraging door chronisch tekort aan spijsverteringsenzymen is een vroeg kenmerk van CF. De autodigestie van de pancreas wordt gereflecteerd door een verhoogd gehalte van trypsine in het bloed, dat met een immunologische techniek gemeten kan worden. Deze bloedtest, de immuun-reactief trypsine (IRT) bepaling, leent zich voor screening in de periode kort na de geboorte. In deze periode is een zweettest nog niet mogelijk door onvoldoende zweetsecretie.

### **Darm**

Evenals in het bronchusepitheel is de belangrijkste functie van CFTR in het darmepitheel de regulatie van de chloride excretie in de apicale membraan en daarmee indirect de regulering van het vochtvolume van de darminhoud. Afwezigheid van CFTR leidt tot dehydratie van de darminhoud. Dit leidt tot ernstige stoornissen in de continuïteit van de darm die zich kort na de geboorte presenteert (meconium ileus). Ook op latere leeftijd kunnen klachten van verstopping en zelfs afsluiting (ileus) van de darm optreden.

### **Overige organen.**

CFTR blijkt ook in de epitheliale cellen van andere organen tot expressie te komen.

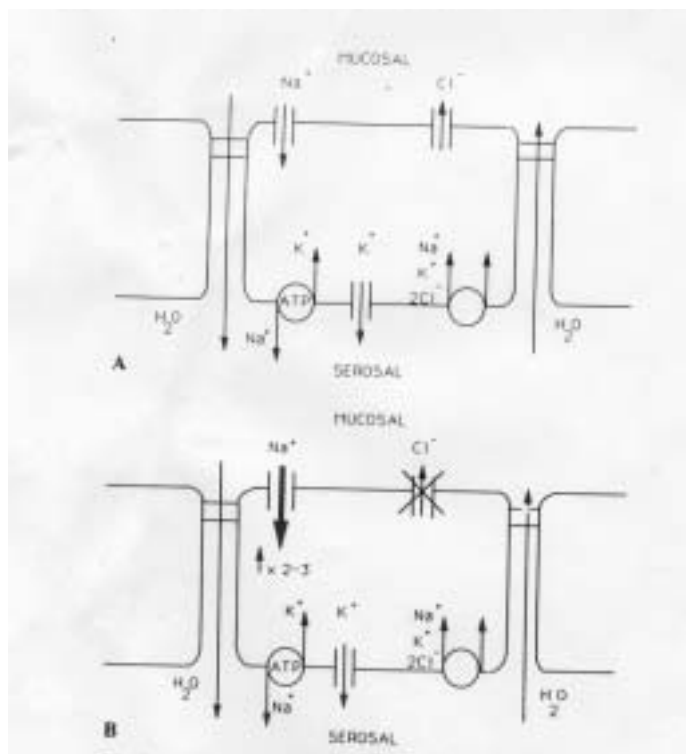
In de epididymis en de eileider heeft het de functie om voldoende vloeistof uit te scheiden om het transport van sperma of eicel door de klierbuizen te "smeren". Afwezigheid van CFTR leidt bij mannen dan ook vrijwel altijd tot infertiliteit. Bij vrouwen is er meestal sprake van verminderde vruchtbaarheid.

Ook in de nier en uterus komt CFTR tot expressie. In de nier is de expressie zelfs hoger dan in enig ander orgaan. Toch heeft een defect in het CFTR in deze organen geen functiestoornis tot gevolg.

### **Conclusie**

Na de ontdekking van het gen-defect dat verantwoordelijk is voor de ziekte cystic-fibrosis is het fundamenteel en klinisch onderzoek naar CF in een stroomversnelling geraakt. Dit heeft geleid tot tal van nieuwe inzichten in de pathofysiologie van CF. Uit dit onderzoek blijkt dat de rol van CFTR veel complexer is dan met aanvankelijk vermoedde. Opheldering van de verschillende functies van CFTR zal het inzicht in de verscheidenheid in klinische expressie van de ziekte vergroten. Het zal echter veel langer duren tot de toename in kennis van de pathofysiologie leidt tot klinisch bruikbare therapieën.

Figuur 1.



Schematische weergave van de ionenstromen in luchtweg epitheel.  
A. De normale toestand, met functioneel CFTR in de apicale membraan.  
De toestand bij CF, met toegenomen transport van  $\text{Na}^+$  en collateraal water

# Resultaten SKZL Zweettest enquête

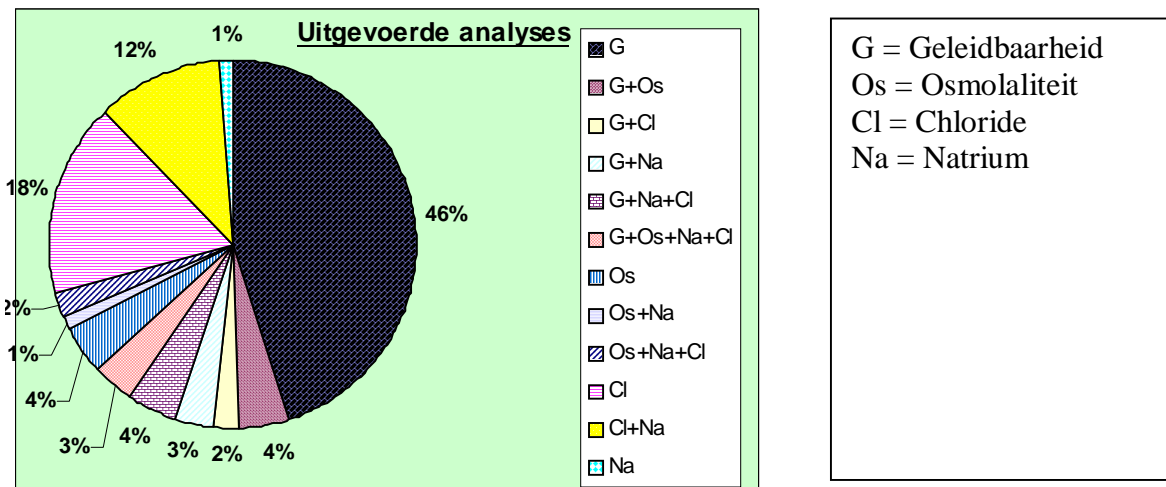
*H. Baadenhuijsen*

Naar aanleiding van verzoeken uit het deelnemersveld heeft de Stichting Kwaliteitsbewaking Ziekenhuis laboratoria (SKZL) in oktober 2001 een éénmalige rondzending "Zweettest" georganiseerd. Ondanks een CBO consensus (april 1988) bestaat er nog steeds een discussie over de meest in aanmerking komende bepalingen die uitgevoerd moeten worden om tot een betrouwbare uitslag van een zweettest te komen. Het gaat daarbij over het "geschil" of er een kwantitatieve meting van  $\text{Na}^+$  en  $\text{Cl}^-$  in het opgewekte zweet moet worden uitgevoerd (eerste keus vlgs CBO consensus) dan wel of er volstaan kan worden met de meting van de elektrische geleidbaarheid en eventueel daarnaast nog een meting van de osmolaliteit. De eerste aanpak is de klassieke Gibson en Cooke methode. De tweede aanpak, die in de CBO consensus wordt gekarakteriseerd als een kwalitatieve test, wordt gebruikt in het inmiddels breed ingeburgerde Macroduct systeem. De gemeten geleidbaarheid wordt veelal uitgedrukt als som van  $[\text{Na}^+] + [\text{Cl}^-]$  in de vorm van NaCl equivalenten. Het is daarbij duidelijk dat de kalibratie van zo'n systeem bijzondere aandacht verdient omdat zweet naast andere Na en Cl ook andere ionen als kalium en bicarbonaat bevat.

In het licht van deze nuances werd als inleiding op de feitelijke rondzending een schriftelijke inventarisatie uitgevoerd bij de deelnemers van de chemie enquêtes van een aantal gegevens en omstandigheden bij de uitvoering van de zweettest in de betreffende laboratoria.

- Er werden 125 formulieren toegestuurd naar de potentiële laboratorium locaties. Hiervan werden 90 ingevulde formulieren geretourneerd. Dit komt overeen met een respons van 72%.
- Het gemiddelde aantal op de laboratoria uitgevoerde zweettesten per jaar was 50, met een minimum van 5, een maximum van 150 en een mediaan van 40.
- Op de vraag wat de minimale hoeveelheid zweet was die het laboratorium nodig heeft voor analyse antwoordt 36% met 10-20  $\mu\text{l}$ , 32% met 20-40  $\mu\text{l}$ , 20% met 40-60  $\mu\text{l}$  en 12% met een hoeveelheid  $>100 \mu\text{l}$ .
- De (klinische) uitvoering van de zweettest geschiedt in 81 % van de gevallen door het laboratoriumpersoneel en in 19% door verplegend personeel, met de notie dat in alle academische ziekenhuizen de test door verplegend personeel wordt uitgevoerd.
- In alle gevallen wordt het zweet opgewekt met behulp van pilocarpine iontoforetische stimulatie.
- In 98% van de gevallen wordt met het Macroduct systeem gewerkt. In 2% wordt met een Skin-Cl elektrode gewerkt.
- 50% van de laboratoria voert de test in enkelvoud uit. De andere helft voert, voor zover de beschikbaarheid van het materiaal dat toelaat, een test in meervoud uit.

- Het spectrum aan uitgevoerde analyses wordt weergegeven met het volgende diagram:



In 46% van de gevallen wordt als enige parameter de geleidbaarheid gemeten en in 62% van de gevallen wordt geleidbaarheid hetzij als enige, hetzij in combinatie met andere parameters gemeten. Meting van alleen Chloride in 18% en Chloride samen met Natrium in 12% van de gevallen.

Er werd ook geïnventariseerd wat de laboratoria voor beoordelingsgrenzen hanteren.

In de CBO consensus worden de volgende beoordelingsintervallen voor  $[Cl^-]$  en  $[Na^+]$  gehanteerd:

$[Cl^-]$ of $[Na^+] > 100$	: positief
$60 < [Cl^-] < 100$ en $[Cl^-] > [Na^+]$	: positief
$60 < [Cl^-] < 100$ en $[Cl^-] < [Na^+] + 10$	: mogelijk vals positief ; 1 x herhalen
$30 < [Cl^-] < 60$ en $[Cl^-] > [Na^+]$	: mogelijk positief; 1 x herhalen
$30 < [Cl^-] < 60$ en $[Cl^-] < [Na^+] + 10$	: normaal

Voor de te hanteren beslissingsgrenzen van de geleidbaarheidsmeting zijn geen officiële standpunten te vinden. Recente literatuur geeft aan dat bij resultaten lager dan 60 mmol/l (NaCl) equivalenten de test negatief is, tussen 60 en 80 dubieus en groter dan 80 positief.

De inventarisatie laat een spreiding zien van de gerapporteerde bovengrenzen van normaal voor Chloride (gemiddelde, laagst gerapporteerde waarde, hoogst gerapporteerde waarde): 48, 20, 100 en een ondergrens voor vaststellen CF: 61, 40, 80.

Voor Natrium zijn de gerapporteerde waarden respectievelijk: 48, 30, 60 en 64, 10, 100.

Voor de gerapporteerde grenzen bij het gebruik van de geleidbaarheid als criterium: Bovengrens van normaal (NaCl equivalenten): 62, 40, 90 en ondergrens CF: 78, 50, 100. Conclusie moet zijn dat er (te) grote verschillen zijn in de gehanteerde beslissingsgrenzen.

Voor de bepaling van  $Cl^-$  wordt 60% van de gevallen de Cl-counter gebruikt. Voor de bepaling van  $Na^+$  wordt in 75% van de gevallen gebruik gemaakt van een vlamfotometer.

Voor de bepaling van de geleidbaarheid wordt in alle gevallen het Sweat-Check systeem van Wescor gebruikt.

90% van de laboratoria geeft aan dat de gebruikte beoordelingsgrenzen afkomstig zijn uit de literatuur. 10% geeft aan grenzen te gebruiken die zelf zijn vastgesteld. Bijna geen van de laboratoria is direct betrokken bij een verdere confirmatie van positieve uitslagen.

Bij de feitelijke rondzending waren twee monsters betrokken die in eigen beheer waren aangemaakt en samengesteld als waterige oplossingen van NaCl en Ureum. De ingewogen waarden waren respectievelijk voor monsters A en B: Natrium 27 en 60 mmol/l, Chloride 27 en 60 mmol/l, Ureum 7 en 10 mmol/l. Hieruit valt te berekenen dat de geleidbaarheidsuitkomsten in mmol/l (NaCl) equivalenten eveneens op resp. 27 en 60 dient uit te komen en dat de osmolaliteit resp. 61 en 130 mosmol/kg moet zijn.

De gemiddelde uitslagen en de variatiecoëfficiënt (CV%) in de toegestuurde monsters waren als volgt:

	A	B	
Chloride (mmol/l)	24.9	60.2	
CV%		8.3%	7.0%
Natrium (mmol/l)	25.3	60.4	
CV%		9.4%	7.1%
(NaCl) mmol/l	27.5	60.9	
CV%		5.0%	5.1%
Osmol (mosmol/kg)	58.9	123.8	
CV%		14.5%	5.3%

Gemiddeld komen de waarden goed overeen met de ingewogen target waarden. Als de gevonden tussenlaboratorium spreidingen worden vergeleken met die van dezelfde bepalingen in serum moet worden geconcludeerd dat ze toch wel veel groter zijn. Een belangrijke oorzaak zal waarschijnlijk zijn dat de gebruikte methodes zijn gekalibreerd op andere nominale waarden. De spreiding in de geleidbaarheidsresultaten is gunstig kleiner dan in die van Natrium en Chloride. Als bedacht wordt dat met deze rondzending slechts het analytische traject kon worden bestudeerd en dat met name het pré-analytische traject een voornamelijk variatiebron van de uiteindelijke uitkomsten is, dan dient de eindconclusie te zijn dat er behoefte is aan een grotere eenduidigheid in zowel uitvoering van de analyses als consistentie van de te hanteren beslissingsgrenzen. Dit laatste kan nog geïllustreerd worden met de uitkomsten van monster B. Op grond van de geleidbaarheidsuitkomsten en afgezet tegen de eigen beslissingsgrenzen zouden 36 laboratoria het monster als negatief voor CF hebben beoordeeld en 7 laboratoria als positief voor CF. Als alleen op de chloride uitkomsten was gevestigd dan was dit beeld: 19 laboratoria negatief en 11 laboratoria positief voor CF.