

Enzymun-Test® NSE - erste klinische Erfahrungen

Enzymun-Test® NSE - First Clinical Experiences

G. M. Oremek^{1,2}, U. B. Seiffert¹

Zusammenfassung: In der vorliegenden Studie wird der mit zwei monoklonalen Antikörpern arbeitende Enzymun-Test® NSE für die Bestimmung der neuron-spezifischen Enolase am ES700 Analyzer mit zwei radioimmunologischen, einem fluorometrischen und drei enzymimmunologischen Verfahren verglichen. Für den Enzymun-Test® NSE wurde an 200 gesunden Probanden (100 Männer und 100 Frauen) als Referenzbereich 2,15–15,25 µg/l ermittelt. Der Median lag bei 6,6 µg/l und der Mittelwert bei 6,92 ± 1,8 µg/l. Außerdem wurden mit denselben Methoden Serumproben von 70 Patienten mit benignen Lungenerkrankungen und von 300 Patienten mit verschiedenen Karzinomen untersucht. Der Korrelationskoeffizient zwischen dem Enzymun-Test® NSE und dem NSE-RIA-Pharmacia liegt bei r = 0,96. Die Stabilität der Serumproben bei Lagerung zwischen 2 und 8 °C ist über einen Zeitraum von 24 Stunden nicht gewährleistet.

Schlüsselwörter: Karzinom, kleinzelliges/Diagnostik; Lungenneoplasma/Serum; Neuron-spezifische Enolase/Serum; Phosphopyruvathydratase/Serum; Sensitivität und Spezifität.

Summary: In this study we compared the Enzymun-Test® NSE for the determination of neuron-specific enolase with two monoclonal antibodies, performed on the ES700 Analyzer, with two radioimmunologic tests, one fluoroimmunometric test and three enzyme immunoassays. The reference range for the Enzymun-Test® NSE was determined in 200 healthy volunteers (100 men and 100 women) by 2,15–15,25 µg/l. The median concentration of NSE in serum was 6,6 µg/l and the mean value amounted 6,92 ± 1,8 µg/l. Additionally, serum specimens of 70 patients with benign lung disease and of 300 patients with various carcinoma were analyzed using the same method. The correlation coefficient between the Enzymun-Test® NSE and the radioimmunological method NSE-RIA-Pharmacia was r = 0.96. NSE concentrations in serum specimens are not stable for 24 hours at storage temperatures between 2 to 8 °C.

¹ Klinisch-Chemisches Zentrallaboratorium des Zentrums der Inneren Medizin

² Korrespondenzadresse: Dr. G. M. Oremek, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Klinisch-Chemisches Zentrallaboratorium des Zentrums der Inneren Medizin, Theodor-Stern-Kai 7, D-60590 Frankfurt/Main, Fax +49-69-6301-7202

Eingegangen: 13. Feb. 1996/Angenommen: 4. Juni 1996

Keywords: Carcinoma, Small Cell/diagnosis; Lung Neoplasms/serum; Neuron-Specific Enolase/serum; Phosphopyruvate Hydratase/serum; Sensitivity and Specificity.

Die Enolasen (Phosphopyruvathydratasen) stellen eine Gruppe dimerer Enzyme dar, die bei der Glykolyse die Umwandlung von 2-Phosphoglycerat in Phosphoenolpyruvat katalysieren. Ein Enzymmolekül setzt sich aus zwei der drei bekannten Untereinheiten (α , β oder γ) zusammen. Die Untereinheiten zeigen deutliche Unterschiede bezüglich ihrer immunologischen und biochemisch-physikalischen Eigenschaften sowie ihrer Organspezifität. Die γ -Subeinheit wird mit relativ hoher Spezifität von ausgereiften Nervenzellen und neuro-endokrinen Zellen, den sogenannten APUD-Zellen gebildet [2]. APUD-Zellen kommen verstreut in Darm und Lunge sowie in endokrinen Organen vor. Die Neuronspezifische Enolase (NSE) wird von malignen Tumoren neuroektodermalen Ursprungs wie kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Neuroblastomen, Darmkarzinoiden und medullären Schilddrüsenkarzinomen vermehrt gebildet [1,2].

In den Testsystemen wird ein γ -spezifischer Antikörper verwendet, wodurch beide Dimere in vergleichbar hoher Empfindlichkeit erfaßt werden.

Material und Methoden

Probanden und Patientenkollektive

Der Referenzbereich wurde an 200 gesunden Probanden (100 Frauen und 100 Männern) im Alter von 18 bis 65 Jahren ermittelt. In die Gruppe gesunder Probanden wurden Personen einbezogen, die keine Beschwerden haben und bei denen 20 Parameter der klinischen Chemie, Blutbild, Urinstatus sowie Gerinnungsstatus keine pathologischen Werte aufwiesen. Des weiteren wurden 70 Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung und 300 Patienten mit verschiedenen Karzinomen untersucht (siehe Tab. 1).

Analysenmethoden

Die Bestimmungen wurden entsprechend den Angaben der Hersteller durchgeführt.

Tabelle 1 Gesamtübersicht der untersuchten Patientengruppen

Krankheitsbild	Anzahl
Benigne Lungenerkrankung insgesamt	70
Bronchitis	20
Sarkoidose	30
Fibrose	20
Maligne Lungenerkrankungen insgesamt	300
kleinzelliges Bronchialkarzinom	80
großzelliges Bronchialkarzinom	70
Prostatakarzinom	40
Blasenkarzinom	45
Mammakarzinom	65

Tabelle 2 Mittelwert und Standardabweichung der mit sieben verschiedenen Methoden bei 200 Probanden gemessenen NSE-Konzentrationen ($\mu\text{g/l}$)

Methode	Mittelwert $\bar{x} \pm 2$ SD
1	6,92 \pm 1,8
2	7,5 \pm 1,7
3	7,2 \pm 2,2
4	7,0 \pm 1,9
5	9,4 \pm 1,8
6	8,4 \pm 2,1
7	7,6 \pm 1,9

Tabelle 3 Medianwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Spannweite der in den einzelnen Gruppen erhaltenen Meßwerte der Konzentration von NSE im Serum, gemessen mit Enzymun-Test® NSE

	n	$\bar{x} \pm 2$ SD	Median	Range
Kontrollgruppe	200	6,92 \pm 1,8	6,6	2,1 - 15,25
Benigne Lungenerkrankungen	70	7,3 \pm 1,8	6,4	2,1 - 15,4
Kleinzell.	80	38,0 \pm 21,0	25,0	10,2 - 122,7
Bronchialkarzinom				
Großzell.	70	9,5 \pm 1,8	8,0	3,0 - 25,8
Bronchialkarzinom				
Prostatakarzinom	40	7,3 \pm 1,9	6,6	2,2 - 12,0
Blasenkarzinom	45	9,0 \pm 3,1	8,4	6,8 - 11,7
Mammakarzinom	65	7,4 \pm 2,0	5,1	3,6 - 11,0

- Methode 1: Enzymun-Test® NSE - Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
- Methode 2: [4,5] NSE-RIA - Pharmacia GmbH, Freiburg [3,4]
- Methode 3: CIS-NSE-ELSA - CIS Diagnostic GmbH, Dreieich
- Methode 4: [4] Delfia®-NSE-Testkit - Pharmacia GmbH, Freiburg
- Methode 5: [5] Cobas® Core NSE-EIA - Hoffmann La Roche, Basel
- Methode 6: CIS-NSE-EIA - CIS Diagnostic GmbH, Dreieich
- Methode 7: LIA-mat-NSE - Byk-Sangtec Diagnostica, Dietzenbach

Nicht standardisierte Abkürzungen: APUD, amine precursor uptake and decarboxylation; NSE, neuron-specific enolase.

Ergebnisse und Diskussion

Die mit 7 verschiedenen Methoden gemessenen NSE-Konzentrationen bei gesunden Probanden sind in Tabelle 2 dargestellt.

Die mit dem Enzymun-Test® ermittelten NSE-Referenzwerte für 200 gesunde Probanden liegen zwischen 2,15 $\mu\text{g/l}$ und 15,25 $\mu\text{g/l}$ (Tabelle 2). Die 5% Perzentile liegt bei 3,25 $\mu\text{g/l}$, die 95% Perzentile bei 8,50 $\mu\text{g/l}$, der Median bei 6,6 $\mu\text{g/l}$. Bei der Kontrollgruppe ergaben sich keine Geschlechtsdifferenzen der Referenzwerte. Die in den Patientengruppen mit großzelligem Bronchialkarzinom, Prostatakarzinom, Blasenkarzinom und Mammakarzinom ermittelten Serum-NSE-Konzentrationen sind gegenüber der gesunden Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht (t-Test: $p > 0,1$). Dagegen finden sich in der Gruppe der Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom gegenüber allen übrigen Vergleichsgruppen signifikant (t-Test: $p < 0,001$) erhöhte Werte der NSE-Konzentration im Serum. Medianwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Spannweite der in den einzelnen Gruppen erhaltenen Meßwerte sind in Tabelle 3 zusammengefaßt [5,6,7,8]. Ein Vergleich der Häufigkeitsverteilungen der Serum-NSE-Konzentrationen in den Patientengruppen mit klein- bzw. großzelligem Bronchialkarzinom zeigt eine nur geringe Überlappung (siehe Abb. 1).

Diagnostische Spezifität und Sensitivität

Von den 200 untersuchten, klinisch und klinisch-chemisch unauffälligen, gesunden Probanden zeigten 95% NSE-Konzentrationen unter 10 $\mu\text{g/l}$, 5% wiesen Konzentrationen zwischen 10 $\mu\text{g/l}$ -15,25 $\mu\text{g/l}$ auf. In

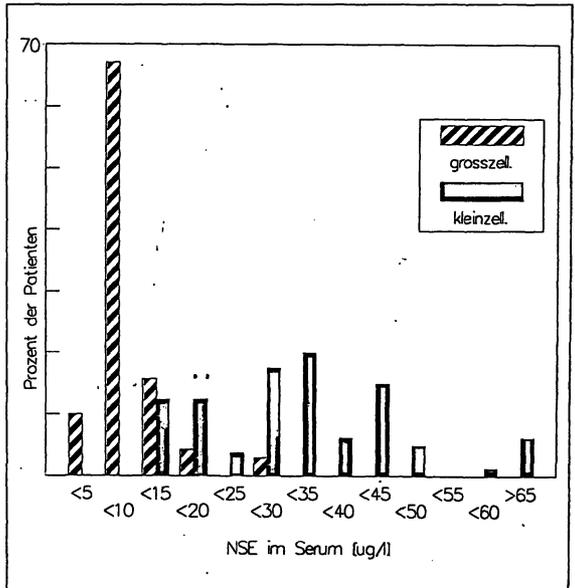


Abbildung 1 Häufigkeitsverteilung der NSE-Konzentrationen im Serum von Patienten mit kleinzelligem und großzelligem Bronchialkarzinom

der Literatur wird die 95%-Grenze für Gesunde mit 13,1 $\mu\text{g/l}$, 14,5 $\mu\text{g/l}$ bzw. 18 $\mu\text{g/l}$ angegeben [3,10].

Um eine organbezogene Aussage über die Spezifität machen zu können, untersuchten wir 70 Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung und legten die 95%-Grenze zugrunde. Die Konzentrationen von NSE bei Patienten mit Bronchitis, Sarkoidose oder Fibrose lagen signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Kruskal-Wallis-Test, $p < 0,005$). Die dabei vorliegenden Konzentrationserhöhungen lagen jedoch im wesentlichen innerhalb des Referenzbereiches (siehe Tabelle 3).

Beim kleinzelligen Bronchialkarzinom lag die diagnostische Sensitivität bei 66%, und unabhängig von der Histologie zeigte NSE eine Sensitivität von 48% bei einer Spezifität von 95%.

Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen die bereits von Voruntersuchern beschriebene hohe Sensitivität und Spezifität von NSE beim kleinzelligen Bronchialkarzinom [3,10,11].

Keine Aussagekraft besitzt die NSE-Bestimmung bei Tumoren der Prostata, Blase und Mamma; die NSE-Konzentrationen liegen hier im Referenzbereich.

Probenstabilität

Die Seren der Probanden wurden bei Temperaturen zwischen 2 und + 8 °C über 24 Stunden gelagert. Die Messung der NSE-Konzentration zeigte einen Anstieg um bis zu 20% gegenüber der Frischmessung. Dieses präanalytische Stabilitätsverhalten von NSE in Serum und Plasma wurde bereits beschrieben. Unsere Ergebnisse stehen damit im Einklang [9].

Präzision

10-fach-Bestimmungen von NSE in Serumproben mit Methode 1 ergaben bei durchschnittlichen Konzentrationen von 5,5 und 18 $\mu\text{g/l}$ Variationskoeffizienten von 2,3 bzw. 1,8%. Die Präzisionsprüfung von Tag zu Tag ergab bei 10 Doppelbestimmungen mit Kontrollsera (Tumormarkerkontrolle Charge 18860101, Boehringer Mannheim GmbH) und einer mittleren Konzentration von 51,48 $\mu\text{g/l}$ einen Variationskoeffizienten von 3,6% bzw. von 6,1% bei einer mittleren Konzentration von 5,12 $\mu\text{g/l}$.

Praktikabilität

Der Enzymun-Test® NSE erwies sich als praktikabel besonders wegen der Automatisierung am ES700. Es ist damit geeignet, große Serien in kurzer Zeit abzuarbeiten. Der Testansatz ist einfach, die Präzision in Serie bei frischen Proben sehr gut.

Die automatisierte Bestimmung von NSE ergänzt die Palette der Tumormarkerassays an den ES-Systemen

Tabelle 4 Methodenvergleich: Enzymun-Test® NSE (γ) gegen die Methoden 2 - 6. Korrelationskoeffizienten und Gleichungen der linearen Regression

Vergleichsmethode (x)	r	Regressionsgleichung
2	0,96	$\gamma = 1,02x + 0,04$
3	0,94	$\gamma = 1,002x + 0,06$
4	0,98	$\gamma = 1,12x + 0,05$
5	0,92	$\gamma = 1,005x + 0,1$
6	0,90	$\gamma = 1,10x + 0,2$
7	0,95	$\gamma = 0,985x - 0,35$

men und besitzt einen hohen diagnostischen Wert bei Patienten mit kleinzelligen Bronchialkarzinomen.

Methodenvergleich

Die mit der Enzymun-Test® NSE-Methode erhaltenen Werte der NSE-Konzentration im Serum zeigen eine sehr gute Korrelation zu den radiochemischen Methoden und der Fluoreszenz-Methode (Tabelle 4).

Literatur

- Schmechel D. γ -subunit of the glycolytic enzyme enolase: non-specific or neuron-specific. Lab Invest 1985;52:239-42.
- Tapia K, Polak JM, Barbosa AJA, Bloom SR, Marangos PJ, Dermody C, Pearce AGE. Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumours. Lancet 1981;1:808-11.
- Ebert W, Hug G, Stabrey A, Bülzenbruck H. Neuron-spezifische Enolase (NSE) als Marker für das kleinzellige Bronchialkarzinom. Vergleich des neuen NSE EIA Roche mit dem NSE RIA Pharmacia. Tumordiagn & Therap 1990;11:60-7.
- Ebert W, Hug G, Stabrey A, Bülzenbruck H, Drings P. Evaluation der Tumormarker NSE und CEA für Diagnose und Verlaufskontrolle des kleinzelligen Bronchuskarzinoms. Ärztl Lab 1989;35:1-10.
- Lorenz J, Mai GA, Schulz V. Neuronspezifische Enolase - Ein selektiver Marker des kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Prax Klein Pneumol 1986;40:100-2.
- Cunningham RT, Johnston CF, Gareth BI, McIlrath EM, McNeil A, Buchanan KD. Development of a radioimmunoassay for neuron specific enolase (NSE) and its application in the study of patients receiving intrahepatic arterial streptozotocin and fluridone. Clin Chim Acta 1990;189:275-86.
- Coquera A, Vasse M, Thiberville L, Basset C, Nouvet G, Testart J. Importance du milieu de recueil pour le dosage de la NSE dans le sang. Interet du recueil sur citrate. Immunoanal Biol Spec 1991;25:59-61.
- Oremek GM, Boeckmann W, Seiffert UB, Jonas D. Neuron-Spezifische Enolase (NSE) - Ein Marker für das metastasierende Seminom. Lab med 1993;17:34-6.
- Gross J, Ungethüm U, Moller R, Priem F, Heldt J, Ziebig R, Pawlow I. Präanalytische Faktoren der NSE-Bestimmung im Blut. Lab med 1995;19:286-9.
- Stieber P, Müller Ch, Hasholzer U, Dienemann H, Fiebig M, Fateh-Moghadam A: Cyfra 21-1 - Ein neuer Marker beim Bronchialkarzinom. Lab med 1993;17:328-32.
- Oremek GM, Seiffert UB, Sickmeier R, Kirsten R. Cyfra 21-1 ein neuer Tumormarker aus der Zytokeratinreihe in Differentialdiagnostik von Lungenerkrankungen. Med Klin 1995;21:23-6.