

Prævalensundersøgelse af falsk positive resultater på dexamethason suppressionstesten om efteråret på klinisk raske heste

Anne Mette Have Lindberg, cand. med. vet., Kolding Dyrehospital.

Summary

Aims: The dexamethasone suppression test (DST) is an established method for diagnosing equine Pituitary Pars Intermedia Dysfunction (PPID, Equine Cushing's Disease). However, recent studies have reported incidences of false positive test results. These are mainly seen in late summer and early autumn and are believed to be a result of a naturally occurring increased activity in the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis at that time of year. The objective of this study was to investigate the prevalence of false positives on the DST in the autumn. **Method:** A modified over-night DST was applied to 39 clinically healthy Icelandic horses in October 2009. Blood samples were collected at time point 0 and 19 hours post-injection of dexamethasone. Samples were analyzed for concentrations of cortisol using a chemiluminescent immunoassay. Cut-off values were 1.0 µg/dl. **Results:** In all 39 horses the cortisol levels were successfully suppressed after 19 hours. None of the horses were tested positive for PPID. **Conclusion:** In this population of 39 horses no test positive results were found on the DST and thus no false positives. **Practical significance:** Contrary to similar studies there were no false positive results in this population of horses. However, it is not believed that the possible occurrence of false positive test results should be ignored, and further studies are needed to establish the frequency of false positives in late summer and early autumn. It may be relevant to define a different set of cut-off values for a positive DST for that time of year.

Sammendrag

Formål: Dexamethason suppressionstesten (DST) er en velkendt testmetode til diagnosticering af equin Pituitaria Pars Intermedia Dysfunktion (PPID, Equine Cushings Syndrom). Nyere studier rapporterer imidlertid om falsk positive testresultater. Disse ses hovedsagligt i sensommeren og de tidlige efterårsmåneder og menes at være et resultat af en naturlig forøget aktivitet i den hypothalamo-hypofyseal-adrenocortikale akse på denne årstid. Formålet med nærværende studium var at undersøge prævalensen af falsk positive på DST om efteråret. **Metode:** 39 klinisk raske islandske heste blev undersøgt med en modificeret over-night DST i oktober 2009. Blodprøver blev udtaget til tiderne 0 og 19 timer efter injektion af dexamethason. Prøverne blev analyseret for cortisolkoncentrationen med et chemiluminescent immunoassay. Cut-off værdien var 1,0 µg/dl. **Resultater:** Hos alle 39 heste sås en succesfuld suppression af cortisolkoncentrationen efter 19 timer. Ingen af hestene testede positivt for PPID. **Konklusion:** I denne population af 39 heste fandtes ingen test-positive på DST og dermed ingen falsk positive. **Klinisk relevans:** I modsætningen til lignende studier fandtes ingen falsk positive på DST i denne population af heste. Det menes imidlertid ikke, at den mulige forekomst af falsk positive testresultater kan ignoreres, og yderligere undersøgelser er påkrævet for at afdække prævalensen af falsk positive i sensommeren og det tidlige efterår. Det kunne være relevant at definere en specifik cut-off værdi for en positiv DST på denne årstid.

Indledning

Equin Pituitaria Pars Intermedia Dysfunktion (PPID) er en neurodegenerativ lidelse i adenohipofysens pars intermedia (PI). Sygdommen, der også kaldes Equine Cushing's Syndrom, er karakteriseret ved tilstedeværelse af adenomer og adenomatøs hyperplasi i PI (Glover et al., 2009; McFarlane et al., 2005). PPID er en af

de hyppigste endokrine lidelser hos ældre heste og ponyer. Prævalensen under danske forhold estimeres til ca. 21% for heste fra 15 år og opefter (Christiansen, 2009).

Heste, der lider af PPID, er i forøget risiko for en række alvorlige komplikationer som laminitis, sekundære infektioner, nedsat sårheling og kronisk hyperglykæmi. Andre typiske

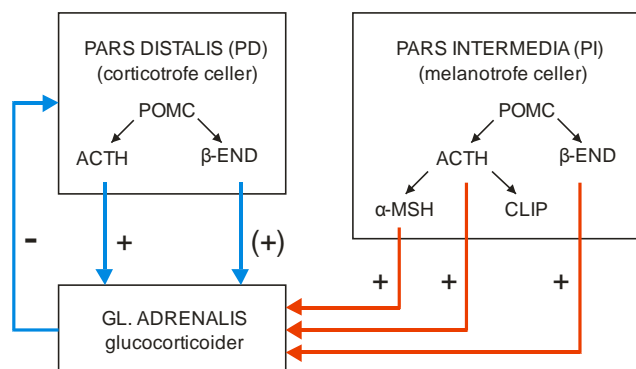
symptomer er hirsutisme, abnormal fedtfordeling, hyperhidrose, polyuri/polydipsi (PU/PD), motionsintolerance, infertilitet og vægttab (Donaldson et al., 2002; McCue, 2002; Couëtil et al., 1996, Hillyer et al., 1992). Hirsutisme anses for værende næsten patognomisk for lidelsen men optræder først relativt sent i forløbet (Couëtil et al., 1996; McCue, 2002).

I tilfælde af fremskreden PPID kan en sandsynlighedsdiagnose stilles på baggrund af anamnese og kliniske symptomer. Subkliniske tilfælde samt tilfælde, hvor det kliniske billede er uspecifikt, kræver imidlertid en objektiv test, før diagnosen kan stilles. PPID kan behandles med dopaminagonisten pergolid. Dette er en livslang behandling, der kræver en jævnlig justering af dosis (Donaldson et al., 2002). En pålidelig test til såvel diagnosticering som monitorering er derfor påkrævet, hvis denne gruppe af patienter skal behandles optimalt.

Patofysiologi

Adenohypofysen hos hest udgøres foruden PI af pars distalis (PD) og pars tuberalis. PD består af

corticotrofe celler, mens PI består af melanotrofe celler. Corticotrofe og melanotrofe celler syntetiserer det samme precursorhormon, pro-opiomelanocortin (POMC), men kløver det efterfølgende til forskellige peptider. Hovedprodukterne af corticotroferne er ACTH og β -endorfin-relateret peptid (Wilson et al., 1982), mens hovedprodukterne af melanotroferne er α -melanocyststimulerende hormon (α -MSH), β -endorfin-relateret peptid og corticotropin-lignende intermediært peptid (CLIP) (Millington et al., 1988). Der dannes desuden en mindre mængde ACTH i PI (Orth & Nicholson, 1982). Corticotrofernes sekretion styres via negativ feedback af glucocorticoider. Melanotroferne mangler glucocorticoidreceptorer, og POMC-expressionen er her i stedet under lokal tonisk inhibitorisk kontrol af neurotransmitteren dopamin (Saland, 2001). Hos raske heste er den adrenocortikale steroidgenese hovedsagligt opretholdt af den corticotrofe sekretion af ACTH (Orth & Nicholson, 1982) (figur 1).



Figur 1. Schematisk illustration af corticotrofernes og melanotrofernes sekretion af pro-opiomelanocortin (POMC)-deriverede peptider i henholdsvis PD og PI. I PD spaltes POMC til ACTH og β -endorfin-relateret peptid (β -END), mens POMC i PI spaltes til α -melanocyststimulerende hormon (α -MSH), ACTH, corticotropin-lignende intermediært peptid (CLIP) og β -END. Hos raske heste stimuleres den adrenocortikale steroidgenese primært af corticotroft ACTH, der reguleres via glucocorticoidernes negative feedback (blå pile). Hos heste med PPID ses en markant stigning i syntetiseringen af POMC-deriverede peptider i PI som en følge af hyperplasi, adenomdannelse og nedsat lokal inhibitorisk dopaminerg kontrol. Disse peptider stimulerer den adrenocortikale steroidgenese (røde pile), hvilket resulterer i en melanotrof adrenocortikal glucocorticoid dysfunktion.

En vigtig faktor for udviklingen af PPID er tab af dopaminerg inhibitorisk kontrol af melanotroferne. Heste med PPID er vist at have en otte gange lavere koncentration af dopamin og dopaminmetabolitter i PI end raske heste (Millington et al., 1988). Dopamin hæmmer ikke blot POMC-dannelsen men også proliferation af endokrine celler (Chronwall et al., 1987). Manglende inhibition fører derfor til hyperplasi af

PI og en følgende markant stigning i syntetiseringen af bl.a. α -MSH, β -endorfin-relateret peptid og CLIP samt en mindre stigning i dannelsen af ACTH (Wilson et al., 1982). Adenomer i PI ses hyppigt hos heste med PPID (Glover et al., 2009). Disse opstår pr. definition uafhængigt af kroppens signalstoffer, og det vides ikke, om tilstedeværelsen af adenomer eventuelt kan være medvirkende til udvikling af

dopaminerg neurodegeneration. Adenomerne i PI forårsager ofte en kompression af det omkringliggende væv (Glover et al., 2009). De er typisk hormonproducerende, men hormonet kan være biologisk inaktivt (Yoshikawa et al., 2001; Orth & Nicholson, 1982).

Ændringen i sekretionen af de melanotrofe POMC-deriverede peptider påvirker den adrenale cortex's sekretion af cortisol. Dette sker ved mindst to mekanismer. Frigivelsen af ACTH fra PI hos heste med PPID er relativt større end hos raske heste, og denne stigning er nok til at stimulere adrenocortical steroidgenese (McFarlane et al., 2006). Dertil kommer, at de andre POMC-deriverede peptider potentiiserer effekten af ACTH. Alpha-MSH og β -endorfin-relateret peptid er vist at kunne inducere op til en seksfoldig stigning i den steroidgene effekt af ACTH (Seger & Bennett, 1986; Shanker & Sharma, 1979). Derved kan en mindre stigning i ACTH sammen med en større stigning i de potentiiserende peptider forårsage en melanotrof-medieret adrenocortikal glucocorticoid dysfunktion (figur 1).

Det basale plasmacortisolniveau hos heste med PPID er både målt at ligge over og under basalniveauet hos raske dyr (Andrews et al., 1997; Dybdal et al., 1994; Eiler et al., 1997). Der er imidlertid tegn på, at den adrenale cortex's normale circadiane rytme for cortisolsekretionen brydes ved PPID, hvilket kan resultere i en stigende 24 timers akkumulativ cortisolkoncentration (Dybdal et al., 1994; Boujon et al., 1993). Traditionelt er de kliniske symptomer ved PPID forsøgt forklaret alene ud fra cortisol. Der er dog i et nyere studium fundet PPID-relaterede læsioner i organer som nyre, lever, lunge, hjerte og skjoldbruskkirtel, og det brede kliniske symptombillede skal derfor sandsynligvis ses som et kombineret resultat af øget POMC-sekretion, fysisk forstørrelse af PI samt patologiske forandringer i en stor del af kroppens vitale organer (Glover et al., 2009).

Dexamethason suppressionstesten

Den modificerede over-night dexamethason-suppressionstest (DST), som beskrevet af Dybdal et al. (1994), betegnes traditionelt som gold standard for antemortem diagnostik af PPID under praksisforhold. Denne test tager udgangspunkt i de melanotrofe cellers insensitivitet for glucocorticoid negativ feedback. Ved tildeling af

glucocorticoidet dexamethason (DEX) vil den melanotrofe adrenocorticosteroidgenese hos syge heste kunne differentieres fra den corticotrofe steroidgenese hos raske dyr, idet kun sidstnævnte vil respondere på testen ved suppression af cortisolfrigivelsen. DST blev oprindeligt tildelt en sensitivitet og specificitet på 100 (Dybdal et al., 1994), men senere studier har vist, at pålideligheden af testen her er overestimeret.

Der er blandt andet flere nyere studier, der påpeger et problem med falsk positive på DST. Dette er specielt gældende i sensommeren og efteråret og menes at være en følge af en normalfysiologisk stigning i den hypothalamohypofyseal-adrenocortikale (HHA) aksens aktivitet som et respons på faldende lysmængde. Donaldson et al. (2005) testede eksempelvis 39 klinisk raske dyr i januar og september og fandt, at kun 74% af dyrene havde en negativ test i september. Samtlige prøver havde været negative den foregående januar. Cut-off værdien for en positiv DST er en cortisolkoncentration højere end eller lig 1,0 $\mu\text{g}/\text{dl}$. Blandt hestene med en positiv test blev der målt cortisolværdier op til 3,1 $\mu\text{g}/\text{dl}$. I en anden undersøgelse viste dexamethason-suppressionskomponenten af en kombineret DST/thyrotropin-releasing hormon (TRH)-stimulationstest, at i alt seks ud af 25 heste testede falsk positivt. Tre ud af de seks falsk positive blev fundet blandt syv testede heste i august, mens andre falsk positive blev detekteret i februar (1/4 heste), april (1/4 heste) og december (1/5 heste) (Frank et al., 2006). Der blev hos disse heste målt cortisolkoncentrationer op til 6,1 $\mu\text{g}/\text{dl}$. Begge nævnte undersøgelser blev foretaget på det nordamerikanske kontinent i et klima med fire distinkte sæsoner. Hyppigheden af falsk positive må på baggrund af disse studier forventes at være højest omkring august og september måned på den nordlige halvkugle.

En diagnostisk test ønskes at have en høj sensitivitet og specificitet, idet disse er et mål for, hvor godt testen korrekt identificerer henholdsvis syge og raske dyr. Hvis den ene eller begge er lav, har det betydning for diagnostikkens sikkerhed. Ud fra de omtalte fund af falsk positive kunne det tyde på, at DST har en nedsat specificitet i sensommeren og efteråret. Det er vigtigt at klarlægge problemets omfang, således at raske heste ikke fejldiagnosticeres med lidelsen PPID.

Formål

Formålet med nærværende studium var at undersøge prævalensen af heste, der om efteråret får et falsk positivt testresultat på dexamethason suppressionstesten. Dette blev gjort ved at teste en population af klinisk raske islandske heste i oktober måned.

Materialer og metoder

Population

Undersøgelsen blev foretaget på 39 tilfældigt udvalgte klinisk raske islandske heste. Hestene var mellem fem og 25 år gamle (mean 12,9) og havde en kønsfordeling på 18 hopper (46,2%), 19 vallakker (48,7%) og to hingste (5,1%). De var opstaldet på i alt seks forskellige lokaliteter i Sydjylland og på Fyn. Samtlige heste gik i løsdrift med naturligt læhegn eller med adgang til et skur. Alle hestene var vant til håndtering. Samtlige prøver blev foretaget i oktober 2009. Hestene blev vurderet uden almen sygdom på baggrund af ejerens oplysninger og ved inspektion umiddelbart før prøveudtagningen. Eksklusionskriterier var anamnese om drægtighed, nuværende eller historisk laminitis, kroniske infektioner, PU/PD og hirsutisme. Der blev ikke foretaget post-mortemundersøgelser på hestene.

Diagnostisk test

Der blev udført en modificeret over-night DST som beskrevet af Dybdal et al. (1994) på alle hestene i deres vante omgivelser. Testen blev udført ved at sammenligne cortisolindholdet i

serum henholdsvis før og efter en intramuskulær injektion af 40 µg/kg dexamethason. Der blev brugt Dexadreson® vet. 2 mg/ml. Hestens vægt blev bestemt ved gjordmål. Den første blodprøve (0-prøven) blev udtaget umiddelbart før dexamethasoninjektionen i tidsrummet kl. 16-18. Den anden blodprøve (s-prøven) blev udtaget i tidrummet kl. 11-13 den følgende dag. Begge prøver blev udtaget fra vena jugularis.

Prøverne blev nedkølet umiddelbart efter udtagningen. Serum blev centrifugeret fra inden for tre timer og holdt nedkølet, indtil laboratorieanalyserne blev foretaget. Alle cortisolværdierne blev bestemt med et humant chemiluminescent immunoassay valideret til heste og blev angivet i nmol/L. Den benyttede analysemetode havde en nedre detektionsgrænse på 27,6 nmol/L. Resultaterne blev efterfølgende omregnet til enheden µg/dl ved at dividere den målte værdi med omregningsfaktoren 27,6^a. Testen blev betegnet som positiv, hvis cortisolindholdet i s-prøven var højere end eller lig 1,0 µg/dl.

Resultater

Alle 39 prøver var negative, idet samtlige heste havde et cortisolindhold på s-prøven på under 1,0 µg/dl. Cortisolkoncentrationen på 0-prøven var gennemsnitligt $2,7 \pm 0,8$ µg/dl (tabel 1). Ingen af de undersøgte individer viste tegn på laminitis efter DST.

	Værdi	Median ± sd
Antal	39	
Køn (hoppe/vallak/hingst)	18/19/2	
Alder (år)	5 - 25	12,9 ± 5,7
Cortisolkonc. 0-prøve (µg/dl)	< 1,0 - 4,4	2,7 ± 0,8
Cortisolkonc. s-prøve (µg/dl)	< 1,0	

Tabel 1. Data for forsøgsindividerne og resultater af DST.

Diskussion

Der blev i nærværende undersøgelse ikke fundet falsk positive på DST. I andre studier er der fundet falsk positive på DST over store dele af året med en markant højere prævalens i sensommeren og efterårsmånederne (Frank et al., 2006; Donaldson et al., 2005). Donaldson et al. (2005) er det mest fremtrædende eksempel med 26% falsk positive i september måned.

Sandsynligheden for at få falsk positive blandt 39 heste i oktober forventedes på baggrund af dette at være høj.

Den manglende overensstemmelse med resultaterne i nævnte undersøgelse kan ikke umiddelbart forklares. Den benyttede testprotokol for DST er veldokumenteret, og suppressionen på s-værdierne i nærværende studium viser netop, at DEX-indgiften har haft den ønskede effekt.

Blodprøverne blev undersøgt med et chemiluminescent immunoassay valideret til heste, hvilket ligeledes var tilfældet i Donaldson et al. (2005). Normalområdet for det basale cortisolniveau hos rideheste er målt til $3,1 \pm 1,2$ $\mu\text{g}/\text{dl}$ for prøver udtaget mellem kl. 17 og 18 (Lindner et al., 1990). Den målte middelværdi i nærværende studium ligger på niveau med dette. De anvendte dyr blev holdt under ekstensive forhold, og opstaldningsformen, hvor dyrene kun udsættes for naturligt lys, er ligeledes sammenlignelig med Donaldson et al. (2005). Studiepopulationen i nærværende undersøgelse blev udgjort af islandske heste, og det kan ikke afvises, at racen er en faktor for forekomsten af falsk positive. Islandske heste formodes dog at være af samme type som hovedparten af forsøgsdyrene i Donaldson et al. (2005), hvor 29 ud af 39 testede heste var fritlevende dyr på åbne landområder. I modsætningen til i nærværende studium var alle fritlevende hopper her drægtige på testtidspunkterne. Dette bør ligeledes ikke være årsagen til den høje prævalens af falsk positive tests, idet der ikke blev fundet en forskel på plasma ACTH-koncentrationerne for disse i forhold til undersøgelsens øvrige dyr. Klimaet, dyrene holdes under i de to studier, er ligeledes sammenligneligt. Begge undersøgelser blev foretaget på den nordlige halvkugle i tempereret klima, hvor der ses fire distinkte sæsoner med både maksimal temperatur og nedbørmængde i juli^b.

Årsagen til sensommerens og efterårsmånedernes øgede forekomst af falsk positive på DST menes at være en naturlig forøget aktivitet i HHA-aksen som et respons på årstidens faldende lysmængde. En høj sekretion af melanotrop POMC kan potentielt holde cortisolkoncentrationen over cut-off værdien for DST trods DEXs suppression af den corticotrofe steroidgenese. Teorien underbygges af, at der i adskillige studier på raske heste er fundet et forhøjet basalniveau af POMC-derivater i sensommeren og efteråret. Beech et al. (2009) påviste eksempelvis sæsonmæssige ændringer i plasmakoncentrationen af α -MSH og ACTH, hvor begge begyndte at stige op til august, nåede den maksimale koncentration sidst i august til midt i september og faldt i oktober. McFarlane et al. (2004) har ligeledes fundet en signifikant sæsonvariation i α -MSH-koncentrationen. Basalniveauet var her højest i september, og

sammenlignet med forårsmånederne var stigningen henholdsvis 11 og to-foldig for ponyer og heste. Variationen mellem de enkelte dyr var desuden højest i efteråret. Nævnte to undersøgelser blev begge foretaget på dyr opstaldet i den mid-atlantiske region i USA og/eller i det sydøstlige Canada. Endelig har Donaldson et al. (2005) påvist en signifikant højere basal ACTH-koncentration i september i forhold til januar og maj. De målte værdier lå inden for referenceområdet for henholdsvis 97% og 100% af dyrene i januar og maj, mens dette kun var tilfældet for henholdsvis 5% og 8% i to på hinanden følgende septembermåneder. I overensstemmelse med dette fandt Beech et al. (2007) ligeledes, at den basale ACTH-koncentration blev påvirket af årstiden samt, at dette var mest udtalt i september.

Hos adskillige andre dyrearter er der ligeledes påvist en sammenhæng mellem årstid og koncentration af cortisol eller POMC-derivater, her i blandt hos hamster (Mercer et al., 2000), egern (Boswell et al., 1994) og vædder (Ssewanyana et al., 1990). Hos mennesket er der en velkendt sammenhæng mellem lysmængden og produktionen af α -MSH, idet α -MSH vides at være ansvarlig for evnen til at danne melanin som et respons på sollys (Novales, 1972). Det virker på baggrund af dette sandsynligt, at en del af forklaringen på efterårsmånedernes overrepræsentation af falsk positive på DST kan findes i en sæsonbetonet variation i POMC-ekspressionen. Da der tilsyneladende er tale om en normalfysiologisk stigning, kunne det være relevant at definere en specifik cut-off værdi højere end $1,0$ $\mu\text{g}/\text{dl}$ for en positiv DST på denne årstid. En sæsonkorrigeret cut-off værdi kunne eventuelt angives i forhold til det daglige antal timer med dagslys.

Et andet forhold, der potentielt kunne forårsage falsk positive på DST, er en aldersbetonet nedsat negativ feedback af DEX på de corticotrofe celler. Herved vil den normale corticotrofe steroidgenese helt eller delvist være opretholdt på testens s-prøve. Der er fundet evidens for, at der netop sker en naturlig ændring i HHA-aksen i retning mod dette, idet der hos eksempelvis både rotter og aber ses en dårligere negativ feedback på indgift af DEX hos ældre end hos unge dyr (Hatzinger et al., 1996; Gust et al., 2000). Studiet af Donaldson et al. (2005) tyder på, at et lignende forhold gør sig gældende hos heste,

idet forsøgsheste, der testede falsk positivt på DST her var signifikant ældre end heste, der havde en s-prøve inden for normalområdet. I samme undersøgelse blev der desuden fundet en positiv korrelation mellem alder og basalniveau af henholdsvis ACTH og cortisol. Disse sammenhænge sås efterår og vinter for ACTH og efterår for cortisol, og det kan på baggrund af dette tænkes, at sæsonfaktoren i forhold til falsk positive forstærkes af høj alder. I nærværende undersøgelse testedes heste i alderen fem til 25 år. Da der ikke blev fundet falsk positive i denne population, kan teorien dog ikke umiddelbart understøttes.

Ud over problemerne med falsk positive er der undersøgelser, der stiller spørgsmålstegn ved DSTs repetérbarhed. I et mindre studium blev syv heste testet på dag 0, 30 og 60. Alle heste testede positivt for PPID på den første test, men fem ud af syv heste havde et negativt testresultat på hver af de følgende tests. Kun en af hestene havde en positiv test på samtlige tre prøver^c. Årstiden for prøveudførelsen blev ikke oplyst. Såfremt den første test blev foretaget om efteråret, kunne falsk positive på denne eventuelt forklare uoverens-

stemmelsen hos heste, der testede negativt på de to følgende tests. Det kan eventuelt ligeledes forklare to positive tests hos en enkelt hest før en negativ på dag 60, og dette specielt da cortisol-koncentrationen (1,1 µg/dl) på testen efter 30 dage kun lige var over cut-off værdien på 1,0 µg/dl^c. Det er imidlertid sværere at forsvare resultater med en positiv, en negativ og en positiv test ud fra teorien om årstidsbestemte falsk positive.

Ud over DST har adskillige andre testmetoder været afprøvet til diagnosticering af PPID. Der er blandt andet lavet statiske tests som plasmamålinger af den basale koncentration af cortisol (van der Kolk et al., 1995), ACTH (Perkins et al., 2002; Couëttil et al., 1996; van der Kolk et al., 1995), β-endorfin^d og α-MSH^d. Dertil kommer dynamiske tests som eksempelvis målinger af plasmacortisol- eller ACTH-niveauet efter TRH-stimulation (Frank et al., 2006; Beech et al., 2007) og efter en kombineret DST/TRH-stimulation (Frank et al., 2006; Eiler et al., 1997). De rapporterede minimale og maksimale sensitiviteter og specificiteter er angivet i tabel 2. I en del af undersøgelseerne er disse ikke beregnet.

		Se	Sp
Statiske tests / basalkoncentra- tionsmåling	ACTH	81,8 ¹ -100 ²	78 ³ -100 ¹
	Cortisol	15 ²	
	α-MSH	88 ⁴	84,2 ⁴
	β-endorfin	88 ⁴	84,2 ⁴
Dynamiske tests	DST	23 ⁵ -100 ⁶	76 ⁷ -100 ⁶
	TRH-stim.	41 ⁷	92 ⁷
	DST/TRH-stim.	88 ⁷	76 ⁷

Tabel 2. Oversigt over sensitiviteter (se) og specificiteter (sp) på statiske og dynamiske tests til diagnosticering af PPID. ¹Couëttil et al. (1996), ²van der Kolk et al. (1995), ³Perkins et al. (2002), ⁴Horowitz et al. (2003), ⁵Beech et al. (2007), ⁶Dybdal et al. (1994), ⁷Frank et al. (2006).

En diagnostisk tests sensitivitet og specificitet er som tidligere nævnt et udtryk for, hvor godt testen er i stand til korrekt at identificere henholdsvis syge og raske dyr. Man skal være varsom med at sammenligne forskellige undersøgelser af en given tests sensitivitet og specificitet, idet der kan være variationer i de benyttede testprotokoller, der kan have betydning for resultaterne. En af de faktorer, der varierer mellem de enkelte undersøgelser af eksempelvis DST, er tidspunkterne for blodprøveudtagningerne. I de af Dybdal et al. (1994) beskrevne protokoller for både standard-24-timers DST og den modificerede over-night DST skal testen igangsættes i

løbet af eftermiddagen og frem til midnat. Rationalet for dette er ACTHs circadiane udskillelsesrytme, idet suppressionen på de corticotrofe celler skal iværksættes før den naturligt øgede sekretion i løbet af natten og morgenen. I eksempelvis Beech et al. (2007) blev DEX indgivet mellem kl. 14 og 15, mens Frank et al. (2006) igangsatte DST-komponenten i en kombineret DST/TRH-stimulationstest om morgenen, hvor cortisolkoncentrationen teoretisk burde være på sit højeste. I den kombinerede test gives TRH desuden tre timer efter DEX-administrationen, og det vides ikke, hvorvidt indgift af de to hormoner umiddelbart efter

hinanden påvirker resultaterne. I nogle studier består kontrolgruppen derudover af raske heste, mens den i andre udgøres af heste med anden sygdom end PPID. I Frank et al. (2006) benyttedes eksempelvis kontrolheste med lidelser som kongestiv hjertesvigt og recidiverende luftvejsobstruktion (RAO). Da det vides, at ACTH udskilles ved stress, kan det tænkes, at kontrolheste som disse giver et anderledes testresultat end raske heste. Problemet i at sammenligne resultaterne fra de forskellige undersøgelser illustreres af variationen i de angivne værdier i tabel 2.

Som nævnt er sensitiviteten og specificiteten ikke nødvendigvis beregnet i undersøgelserne af de diagnostiske metoders sikkerhed. Det er derfor vigtigt ikke kun at evaluere de tilgængelige tests ud fra disse. I eksempelvis McFarlane et al. (2006) vurderedes muligheden for at diagnosticere PPID ved TRH-stimulation i stedet ud fra antallet af falsk positive, og resultaterne herfra figurerer derfor ikke i en oversigt som tabel 2. I den nævnte undersøgelse indikerede TRH-stimulation at give 44-63% falsk positive, og TRH-stimulations-testens høje specificitet på 92 som angivet i Frank et al. (2006) kunne altså ikke genfindes her.

For at kunne bestemme sensitiviteten og specificiteten af en testmetode er det nødvendigt at have en gold standard for, hvornår dyret skal klassificeres som værende sygt eller raskt. Et kritisk punkt for evalueringen af tests for PPID er netop definitionen af, hvorvidt en hest lider af PPID. Nogle studier grupperer forsøgsdyrene ud fra de kliniske symptomer, men med hirsutisme som en mulig undtagelse er ingen af de såkaldte klassiske symptomer på PPID patognomiske for lidelsen. En del af symptomerne ses ved helt almindelige aldersbetingede phenotypiske ændringer, og andre kan skyldes tilstedeværelsen af forskellige andre patologiske tilstande. En gruppe heste blev eksempelvis kategoriseret som syge, fordi de udviste to eller flere af følgende symptomer: laminitis, hirsutisme, abnormal fældning, abnormal fedtfordeling, nedstemthed, tab af epaxial muskelmasse og tilbagevendende infektioner (Beech et al., 2007). Det blev ikke angivet, hvor mange af hestene, der havde hirsutisme som det ene symptom. Med et udvælgelseskræterium som dette øges risikoen for negative testresultater på formodede positive heste, hvorved testen fejlagtigt konkluderes at have en lav sensitivitet. I omtalte undersøgelse

blev DST netop tildelt en høj specificitet (100%) men en lav sensitivitet (23-66%). I flere af de øvrige undersøgelser benyttedes de kliniske symptomer ligeledes til at kategorisere alle eller en del af forsøgsdyrene som syge eller raske (Couëtil et al., 1996; McFarlane et al., 2006; Dybdal et al., 1994). Hirsutisme anses som nævnt for værende næsten patognomisk for PPID, men det menes først at optræde relativ sent i sygdomsforløbet. Hvis hirsutisme konsekvent bruges som kriterium, fås sandsynligvis en højere sensitivitet af de benyttede tests, men man er interesseret i at udvikle og evaluere undersøgelsesmetoder, der kan diagnosticere lidelsen i det subkliniske eller tidlige kliniske stadie.

Histopatologiske forandringer i hypofysen er ligeledes blevet brugt som gold standard for tilstedeværelsen af PPID i forbindelse med evaluering af diagnostiske antemortem tests (Frank et al., 2006; van der Kolk et al., 1995). Ved at benytte histologi kan den årstidsbestemte bias muligvis undgås, idet der eksempelvis ikke er fundet evidens for, at efterårets forøgede aktivitet i HHA-aksen er tilstrækkelig til at forårsage hyperplasi af de melanotrofe celler (Beech et al., 2007). Histologi har desuden den fordel, at PPID-heste med adenomer, der producerer inaktivt hormon, korrekt klassificeres som syge. Disse vil ikke kunne diagnosticeres på antemortem tests. Problemet med at klassificere syge heste ud fra de histopatologiske forandringer er imidlertid, at der hos raske heste sker en række aldersbetingede ændringer i hypofysen, der minder om de tidlige forandringer ved PPID. I et histopatologisk studium af 100 klinisk raske heste i alderen to til 28 år fandtes der en signifikant sammenhæng mellem alder og tilstedeværelsen af læsioner som cyster, hyperplasi og adenomer i både PI og PD. Blandt de 100 heste havde 6,5% ingen læsioner, 4,5% læsioner i PD, 26% læsioner i PI og 63% læsioner i både PD og PI. Kun 3% af hestene blev klassificeret som PPID-heste (van der Kolk et al., 2004). Det blev ikke oplyst, hvilke kriterier PPID blev diagnosticeret efter. Ved at bruge histopatologi som gold standard risikeres raske heste med normalfysiologiske aldersbetingede forandringer i PI altså at blive fejldiagnosticeret med PPID. Et studium som Beech et al. (2007) illustrerer problemet. Her blev DST blandt andet udført på ti klinisk raske heste med hyperplastiske forandringer. Der blev lavet i alt tolv tests, hvoraf syv var negative og fem var

positive. Den ene af de to heste, der blev dobbelttestet, havde en positiv og en negativ test, mens den anden havde to positive tests. På baggrund af ovenstående kan det ikke ud fra histologien vides, hvilke heste, der lider af PPID og hvilke, der blot har aldersbetingede hyperplastiske forandringer. Dette bevirker, at det er behæftet med meget stor usikkerhed at angive testens sensitivitet og specificitet. I Frank et al. (2006) blev histopatologiske forandringer ligeledes benyttet til at definere henholdsvis case og kontrolgruppe. Der vil tilsvarende Beech et al. (2007) være et potentielt problem med overestimering af falsk negative, hvorved både sensitiviteten og specificiteten af de evaluerede tests vil være angivet for lavt.

Da PPID er en langsomt progredierende lidelse, vil overgangen fra almindelige aldersbetingede læsioner til de tidligere patologiske forandringer i PI være svær at definere. I et studium af McFarlane et al. (2005) vurderede syv forskellige patologer histologiske snit af PI fra ti heste med milde symptomer på PPID. Kappa-værdien blev udregnet som et mål for overensstemmelsen mellem patologerne. Kappa-værdier tolkes som 'meget god' (0,81-1), 'god' (0,61-0,8), 'moderat' (0,41-0,6), 'rimelig' (0,21-0,4) eller 'dårlig' (under 0,2). Kappa-værdien for denne undersøgelse var $0,34 \pm 0,069$, hvilket vil sige, at der kun var en 'rimelig' overensstemmelse mellem patologerne om, hvorvidt hestene havde histologiske fund, der tydede på PPID. Samtlige patologer var vant til at vurdere endokrine forandringer. Der blev desuden udført antemortem tests for PPID på hestene i form af DST og sæsonkorrigeret α -MSH-koncentrationsbestemmelse. I alt fire heste blev vurderet at have PPID ud fra en af de to tests. Den histologiske vurdering var i overensstemmelse med antemortem testresultater i 79% af tilfældene. Generelt mangler der konsensus omkring den histopatologiske definition af PPID. PPID er blevet diagnosticeret ud fra PI adenomer og adenomatøs hyperplasi (Glover et al., 2009; McFarlane et al., 2005), PI hyperplasi alene (Beech et al., 2007) samt PI/PD adenomer og PI cyster (Frank et al., 2006). Den høje prævalens af aldersbetingede hypofyselæsioner hos raske heste, den ringe overensstemmelse mellem patologers vurdering samt den manglende definition på en PPID-læsion viser begrænsningerne i at bruge histopatologi som gold standard.

Som det fremgår af ovenstående, er både diagnosticeringen af PPID og evalueringen af de diagnostiske metoder problematisk. Der er mange faktorer, der potentielt kan påvirke resultaterne, og der findes ikke på nuværende tidspunkt en sand gold standard, som de forskellige tests kan evalueres imod. Samtlige forhold, der udgør en potentiel bias for testresultaterne, vil ligeledes være mulige fejlkilder i forhold til at finde den sande prævalens af sæsonbetingede falsk positive. Tests som DST og DST/TRH-stimulation har deres berettigelse i diagnostikken, men det er vigtigt, at klinikeren er bevidst om den valgte tests styrker og svagheder. Indtil problemet med falsk positive i sensommeren og om efteråret er bedre undersøgt, bør DST bruges med forsigtighed på denne tid af året. En negativ test vil med stor sandsynlighed betyde, at hesten er rask, mens et positivt resultat bør tilvejebringe en fornyet test i løbet af vinteren eller foråret. Risikoen for falsk positive i sensommer- og efterårsmånederne kan i øvrigt tænkes ligeledes at være forøget ved de øvrige tests, idet de alle er rettet mod at detektere en dysfunktionel eller hyperreaktiv PI.

I nærværende undersøgelse blev der ikke fundet falsk positive på DST. Det er muligt, at dette havde forholdt sig anderledes, hvis studiet var blevet foretaget i august eller september. Den reelle risiko for falsk positive på grund af faldende lysmængde kunne sandsynligvis afdækkes bedre, hvis en forsøgsdyrspopulation blev fulgt med hyppigt gentagne tests fra sommer- til vintersolhverv. En sådan undersøgelse ville samtidig kunne bruges til at definere en sæsonjusteret cut-off værdi for en positiv DST, hvorved specificiteten af testen ville øges væsentligt. Diagnosticeringen af PPID i sensommeren og efterårsmånederne vil dog med al sandsynlighed vedblive at være problematisk, idet sekretionen af de POMC-derivede peptider på denne årstid er vist at have en betydelig variation hos raske heste (McFarlane et al., 2004).

Konklusion

Formålet med nærværende studium var at undersøge prævalensen af raske heste, der om efteråret tester falsk positivt på dexamethason suppressionstesten. I den benyttede population af 39 klinisk raske islandske heste fandtes ingen test-positive og dermed ingen falsk positive. Da dette imidlertid ikke er i overensstemmelse med lignende undersøgelser, menes det ikke, at den

mulige forekomst af falsk positive testresultater kan ignoreres. Yderligere undersøgelser er påkrævet for at afdække prævalensen af falsk positive i sensommeren og det tidlige efterår, og det kunne være relevant at definere en specifik cut-off værdi for en positiv dexamethason suppressionstest på denne årstid.

Fodnoter

^ahttp://www.labor-limbach.de/Einheiten-Umrechner.einheiten_umrechner.0.html

^bKlimadata for København, Danmark: http://www.dmi.dk/dmi/klima_ref_kbh.htm

Klimadata for Philadelphia, Pennsylvania, USA: <http://www.dmi.dk/dmi/verden/verdensvejr.htm?country=USA&city=200001238>

^cMeisner, T.J., Beard, L.A., Schmall, S.M., Reed, S.M. (2003): Results of overnight dexamethasone suppression test repeated over time in horses suspected of having equine cushing's disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17, p. 420 (abstract).

^dHorowitz, M.L., Neal, L., Watson, J.L. (2003): Characteristics of plasma adrenocorticotropin, β -endorphin and α -melanocyte stimulating hormone as diagnostic tests for pituitary pars intermedia dysfunction in the horse. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17, p. 386 (abstract).

Taksigelser

Centrallaboratoriet KU-LIFE og Claus Stjernegaard takkes for velvillig assistance i forbindelse med de udførte laboratorieanalyser. Desuden takkes Hestens Værn samt Jubilæumsfonden for Kongeriget Danmarks Hesteforsikring for økonomisk støtte til projektet.

Referencer

Andrews, F.M., Eiler, H., Oliver, J.W., Fecteau, K.A., Green, E.M., McCracken, M. (1997): Diagnosis of pituitary adenoma by using a combined dexamethasone suppression and TRH stimulation test. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, 43, pp. 349-351.

Beech, J., Boston, R.C., McFarlane, D., Lindborg, S. (2009): Evaluation of plasma ACTH, α -melanocyte-stimulating hormone, and insulin

concentrations during various photoperiods in clinically normal horses and ponies and those with pituitary pars intermedia dysfunction. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235(6), pp. 715-722.

Beech, J., Boston, R., Lindborg, S., Russell, G.E. (2007): Adrenocorticotropin concentration following administration of thyrotropin-releasing hormone in healthy horses and those with pituitary pars intermedia dysfunction and pituitary gland hyperplasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 231(3), pp. 417-426.

Boswell, T., Woods, S.C., Kenagy, G.J. (1994): Seasonal changes in body mass, insulin and glucocorticoids of free-living golden-mantled ground squirrels. *General and Comparative Endocrinology*, 96, pp. 339-346.

Boujon, C.E., Bestetti, G.E., Meier, H.P., Straub, R., Junker, U., Rossi, G.L. (1993): Equine pituitary adenoma: a functional and morphological study. *Journal of Comparative Pathology*, 109, pp. 163-178.

Christiansen, A. (2009): Prævalens af equine Cushings syndrom blandt ældre heste på Syd- og Vestsjælland. *Dansk Veterinær Tidsskrift*, 7, pp. 24-29.

Couëttil, L., Paradis, M.R., Knoll, J. (1996): Plasma adrenocorticotropin concentration in healthy horses and in horses with clinical signs of hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 10(1), pp. 1-6.

Chronwall, B.M., Millington, W.R., Griffin, W.S., Unnerstall, J.R., O'Donohue, T.L. (1987): Histological evaluation of the dopaminergic regulation of proopiomelanocortin gene expression in the intermediate lobe of the rat pituitary, involving in situ hybridization and [³H]thymidine uptake measurement. *Endocrinology*, 120, pp. 1201-1211.

Donaldson, M.T., LaMonte, B.H., Morresey, P., Smith, G., Beech, J. (2002): Treatment with pergolide or cyproheptadine of pituitary pars intermedia dysfunction (Equine Cushing's

- Disease). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16, pp. 742-746.
- Donaldson, M.T., McDonnell, S.M., Schanbacher, B.J., Lamb, S.V., McFarlane, D., Beech, J. (2005): Variation in plasma adrenocorticotrophic hormone concentration and dexamethasone suppression test results with season, age, and sex in healthy ponies and horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19, pp. 217-222.
- Dybdal, N.O., Hargreaves, K.M., Madigan, J.E., Gribble, D.H., Kennedy, P.C., Stabenfeldt, G.H. (1994): Diagnostic testing for pituitary pars intermedia dysfunction in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204(4), pp. 627-632.
- Eiler, H., Oliver, J.W., Andrews, F.M., Fecteau, K.A., Green, E.M., McCracken, M. (1997): Results of a combined dexamethasone suppression/thyrotropin-releasing hormone stimulation test in healthy horses and horses suspected to have a pars intermedia adenoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 211(1), pp. 79-81.
- Frank, N., Andrews, F.M., Sommardahl, C.S., Eiler, H., Rohrbach, B.W., Donell, R.L. (2006): Evaluation of the combined dexamethasone suppression/thyrotropin-releasing hormone stimulation test for detection of pars intermedia pituitary adenomas in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20, pp. 987-993.
- Glover, C.M., Miller, L.M., Dybdal, N.O., Lopez, A., Duckett, W.M., McFarlane, D. (2009): Extrapituitary and pituitary pathological findings in horses with pituitary pars intermedia dysfunction: A retrospective study. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(3), pp. 146-153.
- Gust, D.A., Wilson, M.E., Stocker, T., Conrad, S., Plotsky, P.M., Gordon, T.P. (2000): Activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is altered by aging and exposure to social stress in female rhesus monkeys. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(7), pp. 2556-2563.
- Hatzinger, M., Reul, J.M.H.M., Landgraf, R., Holsboer, F., Neumann, I. (1996): Combined dexamethasone/CRH test in rats: hypothalamo-pituitary-adrenocortical system alterations in aging. *Neuroendocrinology*, 64, pp. 349-356.
- Hillyer, M.H., Taylor, F.G.R., Mair, T.S., Murphy, D., Watson, T.D.G., Love, S. (1992): Diagnosis of hyperadrenocorticism in the horse. *Equine Veterinary Education*, 4(3), pp. 131-134.
- Lindner, A., Will, Y., Chrispeels, J. (1990): Reference values for cortisol, T₄ and T uptake in different groups of horses determined by fluorescence polarization immunoassay. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 103(12), pp. 411-416.
- McCue, P.M. (2002): Equine Cushing's disease. In: *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practise*, 18, pp. 533-543.
- McFarlane, D., Beech, J., Cripp, A. (2006): α -melanocyte stimulating hormone release in response to thyrotropin releasing hormone in healthy horses, horses with pituitary pars intermedia dysfunction and equine pars intermedia explants. *Domestic Animal Endocrinology*, 30, pp. 276-288.
- McFarlane, D., Donaldson, M.T., McDonnell, S.M., Cribb, A.E. (2004): Effect of season and sample handling on measurement of plasma α -melanocyte-stimulating hormone concentrations in horses and ponies. *American Journal of Veterinary Research*, 65(10), pp. 1463-1468.
- McFarlane, D., Miller, L.M., Craig, L.E., Dybdal, N.O., Habecker, P.L., Miller, M.A., Patterson, J.S., Cribb, A.E. (2005): Agreement in histologic assessments of the pituitary pars intermedia in aged horses. *American Journal of Veterinary Research*, 66(12), pp. 2055-2059.
- Mercer, J.G., Moar, K.M., Ross, A.W., Hoggard, N., Morgan, P.J. (2000): Photoperiod regulates arcuate nucleus POMC, AGRP, and leptin receptor mRNA in Siberian hamster hypothalamus. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278(1), pp. 271-281.
- Millington, M.G., Dybdal, N.O., Dawson, Jr.R., Manzini, C., Mueller, G.P. (1988): Equine

Cushing's Disease: differential regulation of β -endorphin processing in tumors of the intermediate pituitary. *Endocrinology*, 123, pp. 1598-1604.

Novales, R.R. (1972): Recent studies of the melanin-dispersing effect of MSH on melanophores. *General and Comparative Endocrinology*, 3, suppl. 1, pp. 125-135.

Orth, D.N. & Nicholson, W.E. (1982): Bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in normal equine pituitary tumors of horses with Cushing's disease. *Endocrinology*, 111(2), pp. 559-563.

Perkins, G.A., Lamb, S., Erb, H.N., Schanbacher, B., Nydam, D.V., Divers, T.J. (2002): Plasma adrenocorticotropin (ACTH) concentrations and clinical response in horses treated for equine Cushing's disease with cyproheptadine or pergolide. *Equine Veterinary Journal*, 34(7), pp. 679-685.

Saland, L.C. (2001): The mammalian pituitary intermediate lobe: an update on innervation and regulation. *Brain Research Bulletin*, 54(6), pp. 587-593.

Seger, M. & Bennett, H. (1986): Structure and bioactivity of the amino-terminal of proopiomelanocortin. *Journal of Steroid Biochemistry*, 25, pp. 703-710.

Shanker, G. & Sharma, A. (1979): Beta-endorphin stimulates corticosterone synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 86, pp. 1-5.

Ssewanyana, E., Lincoln, G.A., Linton, E.A., Lowry, P.J. (1990): Regulation of the seasonal cycle of β -endorphin and ACTH secretion into the peripheral blood of rams. *Journal of Endocrinology*, 124, pp. 443-454.

Van der Kolk, J.H., Heinrichs, M., van Amerongen, J.D., Stoker, R.C.J., in de Wal, L.J., van den Ingh, T.S.G.A.M. (2004): Evaluation of pituitary gland anatomy and histopathologic findings in clinically normal horses and horses and ponies with pituitary pars intermedia

adenoma. *American Journal of Veterinary Research*, 65(12), pp. 1701-1706.

Van der Kolk, J.H., Wensing, T., Kalsbeek, H.C., Breukink, H.J. (1995): Laboratory diagnosis of equine pituitary pars intermedia adenoma. *Domestic Animal Endocrinology*, 12, pp. 35-39.

Wilson, M.G., Nicholson, W.E., Holscher, M.A., Sherrell, B.J., Mount, C.D., Orth, D.N. (1982): Proopiomelanocortin peptides in normal pituitary, pituitary tumor, and plasma of normal and Cushing's horses. *Endocrinology*, 110(3), pp. 941-954.

Yoshikawa, H., Oishi, H., Sumi, A., Ueki, H., Oyamada, T., Yoshikawa, T. (2001): Spontaneous pituitary adenomas of the pars intermedia in 5 aged horses: Histopathological, immunohistochemical and ultrastructural studies. *Journal of Equine Science*, 12(4), pp. 119-126.