



ORIGINAL

Pacientes con deterioro cognitivo leve y reducción de la proteína $A\beta_{1-42}$ en LCR evolucionan rápidamente a enfermedad de Alzheimer[☆]

J.A. Monge-Argilés^{a,*}, J. Sánchez-Payá^b, C. Muñoz-Ruiz^c, A. Pampliega-Pérez^a,
M.J. Gómez-López^d, E. Rodríguez Borja^c, J. Montoya-Gutiérrez^a y C. Leiva-Santana^a

^a Servicio de Neurología, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, España

^b Servicio de Medicina Preventiva, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, España

^c Laboratorio de Inmunología, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, España

^d Neuropsicóloga Clínica, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, España

Recibido el 18 de diciembre de 2010; aceptado el 27 de marzo de 2011

Accesible en línea el 31 de mayo de 2011

PALABRAS CLAVE

Biomarcadores
en LCR;
Deterioro cognitivo
leve;
Enfermedad
de Alzheimer;
Proteína $A\beta_{1-42}$;
Proteína T-tau;
Proteína P-tau_{181p}

Resumen

Introducción: En muchos artículos recientes, el análisis de las proteínas $A\beta_{1-42}$, tau total (T-tau) y tau fosforilada (P-tau) en LCR puede discriminar entre los pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL) estables y aquellos otros que van a progresar a enfermedad de Alzheimer (EA). Nuestro objetivo fue comprobar la capacidad de estas proteínas del LCR para discriminar, entre nuestros pacientes DCL, según la evolución clínica en el año siguiente a la punción lumbar. **Material y métodos:** Se incluyó a 36 pacientes DCL amnésico (criterios de Petersen 2006) procedentes de la consulta de deterioro cognitivo del Hospital General de Alicante. Usando los reactivos INNO-BIA Alzbio-3 (Innogenetics), cuantificamos las proteínas $A\beta_{1-42}$, T-tau, P-tau_{181p} en LCR, y calculamos los cocientes T-tau/ $A\beta_{1-42}$ y P-tau_{181p}/ $A\beta_{1-42}$. El estudio fue aprobado por el comité ético de investigación del Hospital General de Alicante.

Resultados: En los 12 meses posteriores a la punción lumbar, 14 pacientes DCL (38%) evolucionaron a EA. Estos pacientes, presentaron menores niveles de $A\beta_{1-42}$ (285,3 vs. 377,7 ng/ml, $p < 0,02$), y un aumento en el valor del cociente P-tau_{181p}/ $A\beta_{1-42}$ (0,25 vs. 0,16, $p < 0,02$) que los pacientes que se mantuvieron estables. No hubo diferencias significativas en el resto de las variables estudiadas.

Conclusiones: Nuestros pacientes DCL que presentaron niveles reducidos de la proteína $A\beta_{1-42}$ y elevación del cociente P-tau_{181p}/ $A\beta_{1-42}$ en LCR, evolucionaron rápidamente a EA. Estos resultados pueden ayudar a conseguir el objetivo de identificar de forma precoz a los pacientes DCL con peor pronóstico.

© 2010 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

[☆] Este trabajo fue presentado en la Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología 2010.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: monge_jos@gva.es (J.A. Monge-Argilés).

KEYWORDS

CSF biomarkers;
Mild cognitive
impairment;
Alzheimer's disease;
 $A\beta_{1-42}$ protein;
T-tau protein;
P-tau_{181p} protein

Patients with mild cognitive impairment and a reduced CSF $A\beta_{1-42}$ protein progress rapidly to Alzheimer's disease

Abstract

Introduction: Some studies have shown that CSF amyloid-beta 1-42 ($A\beta_{1-42}$), total tau (T-tau) and tau phosphorylated at threonine 181 (P-tau_{181p}) proteins are useful diagnostic markers for distinguishing between clinically stable mild cognitive impairment (MCI) patients and those who will develop Alzheimer's disease (AD).

Our objective was to test the ability of this technique to discriminate in our cohort of MCI patients, according to the clinical outcome, one year after the lumbar puncture.

Material and methods: A total of 36 MCI patients were included from the local hospital memory clinic. Using INNO-BIA AlzBio-3 reagents from Innogenetics, we measured CSF $A\beta_{1-42}$, T-tau and P-tau_{181p} proteins, and calculated the T-tau/ $A\beta_{1-42}$ y P-tau_{181p}/ $A\beta_{1-42}$ ratios. This project was approved by the local ethics committee.

Results: One year after the lumbar puncture, 14 MCI patients (38%) developed AD. These patients had lower $A\beta_{1-42}$ protein levels (285.3 vs 377 ng/ml, $P < .02$) and higher P-tau_{181p}/ $A\beta_{1-42}$ ratio (0.25 vs 0.16, $p < .02$) than the clinically stable patients.

Conclusions: Our MCI patients with lower $A\beta_{1-42}$ protein levels and an increased P-tau_{181p}/ $A\beta_{1-42}$ ratio progressed quickly to AD. These results may help to identify those MCI patients with a poorer prognosis.

© 2010 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Muchos autores consideran al deterioro cognitivo leve (DCL) como el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA)¹. Así, el 40-60% de los pacientes con DCL desarrollan EA durante los siguientes 5 años², aunque otro porcentaje importante mantiene una forma estable de deterioro cognitivo³.

Desde hace varios años, se vienen utilizando diferentes técnicas complementarias para intentar identificar a aquellos pacientes DCL que van a desarrollar una demencia, con el fin de tratarlos de forma precoz, o al menos, intentar retrasar y paliar los devastadores efectos de la enfermedad. Entre las mencionadas técnicas complementarias, destaca el análisis de las proteínas $A\beta_{1-42}$, T-tau y P-tau en LCR, así como los cocientes entre la proteína $A\beta_{1-42}$ y ambas proteínas tau, por reflejar la relación entre ambas vías patogénicas de EA. Su estudio ha dado lugar a un elevado número de trabajos publicados⁴⁻⁷ y también a diferentes metaanálisis de su capacidad predictiva para el diagnóstico de EA⁸⁻¹⁰.

Por otra parte, publicaciones recientes utilizan estos biomarcadores para reconocer a aquellos pacientes DCL que van a evolucionar rápidamente a demencia^{11,12}, e incluso, para identificar aquellos pacientes ya demenciados y que van a evolucionar más rápidamente¹³.

El objetivo del presente trabajo es comprobar si esta técnica puede diferenciar entre nuestros pacientes DCL estables y aquellos otros que han progresado a EA en los meses siguientes a la punción lumbar (PL).

Materiales y métodos

Diseño del estudio

Estudio de cohortes.

Sujetos a estudio

Se incluyó a 36 pacientes con DCL amnésico diagnosticados según los criterios de Petersen 2006³, todos ellos pertenecientes a la consulta de deterioro cognitivo del Hospital General Universitario de Alicante, algunos de los cuales son seguidos desde hace varios años. Su estudio incluye exploración física y neurológica, estudio neuropsicológico, escala de depresión de Yesavage (15 ítems), analítica sanguínea, neuroimagen estructural cerebral y PL. Estos pacientes son seguidos en la consulta externa con revisiones cada 6 meses, como mínimo. En éstas se valora la evolución a EA, según los criterios NINCDS-ADRDA¹⁴ y la valoración en la escala GDS. Según la evolución a los 12 meses tras la PL, diferenciamos a los pacientes en estables (DCL-e) o evolucionados a EA (DCL-p).

Criterios de inclusión

Pacientes con DCL amnésico mayores de 55 años. Para la inclusión en el estudio y realización de la PL firmaron consentimiento informado.

Criterios de exclusión

La presencia de demencia o de cualquier otra enfermedad neurológica, psiquiátrica o sistémica que pudiera provocar deterioro cognitivo, el tratamiento anticoagulante y la falta de consentimiento informado. Valoración en la escala de depresión de Yesavage superior a 5 puntos.

Procedimientos

El neurólogo responsable emitía un diagnóstico de DCL amnésico puro o amnésico multidominio, de acuerdo con los criterios de Petersen³. Posteriormente, se realizó el estudio neuropsicológico que incluía la evaluación de la memoria,

lenguaje, funciones ejecutivas, atención y capacidades visuo-constructivas, mediante los test Mini Mental State Examination (MMSE), test auditivo-verbal de Rey, test del trazo (TMT) y test del informador (TIN). La alteración de una función se definió como un resultado Z de $-1,5$ o menor, lo cual es al menos 1,5 desviaciones estándar por debajo de la media de los sujetos control, en al menos uno de los test usados para estudiar esa función. Los criterios para considerar el paso de DCL-e a DCL-p fueron un descenso en MMSE mayor de 2 puntos y/o un aumento en TIN superior a 7 puntos.

Se realizó neuroimagen en todos los pacientes con DCL (RM cerebral en la mayoría de los casos o, únicamente, tomografía computarizada cerebral, en 5 de ellos), para descartar otras lesiones cerebrales responsables del cuadro clínico.

Obtención y análisis del líquido cefalorraquídeo

Se realizó entre febrero 2008 y febrero 2009. Las muestras se obtuvieron entre las 10 y las 14 horas. La PL la realizó el neurólogo responsable, con una aguja 20 x 3½. El LCR se recogió en tubos estándar y fue congelado en menos de una hora a -80° . En el caso de ser LCR sanguinolento era centrifugado antes de la congelación. Previamente a la obtención de los tubos para congelar, se recogía un tubo para la realización de bioquímica y recuento celular. En ningún caso, dicho recuento mostró más de 100 hematíes.

Tras la PL, se aconsejaba a todos los pacientes evitar maniobras de Valsalva durante al menos 3 días.

Cuantificación de los niveles de proteínas del líquido cefalorraquídeo $A\beta_{1-42}$, T-tau y P-tau_{181p}

Se realizó usando la tecnología xMAP Luminex con los reactivos INNO-BIA AlzBio3 de Innogenetics (Gante, Bélgica). Los detalles de esta combinación de reactivos para inmunoensayo y plataforma analítica están publicados previamente¹⁵.

Todas las muestras fueron analizadas de forma simultánea, al final del reclutamiento y de forma ciega para los datos clínicos. Las muestras de 19 pacientes fueron analizadas por duplicado.

Variables del estudio

Se estudiaron los niveles de proteínas del LCR $A\beta_{1-42}$, T-tau, P-tau_{181p}, así como los cocientes T-tau/ $A\beta_{1-42}$ y P-tau_{181p}/ $A\beta_{1-42}$. Estos últimos cocientes están siendo muy utilizados por diversos autores, ya que parecen reflejar la relación entre la vía amiloide y la vía tau de la enfermedad¹⁶.

Análisis estadístico

La fiabilidad de la técnica ha sido calculada mediante el coeficiente de correlación intraclass.

Para el análisis del tipo de distribución de cada variable se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Para la comparación entre 2 grupos: las pruebas de la t de Student para variables paramétricas y U- Mann Whitney para las variables no paramétricas.

Además, se realizó el análisis de las curvas COR para determinar los mejores valores de corte para la medida de

las variables. El mejor valor de corte se definió atendiendo sobre todo a la mayor sensibilidad. Después se obtenía la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) para dicho punto de corte y cada variable.

En todos los contrastes de hipótesis se utilizó el nivel de significación estadística de $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó con el paquete SPSS v. 10.0.

Criterios éticos

Los laboratorios farmacéuticos que han becado este proyecto no han tenido ningún papel en el diseño, colección o interpretación de datos ni en la redacción de este trabajo.

Este proyecto fue aprobado por el comité ético de investigación clínica del Hospital General de Alicante, tras la contratación de un seguro de responsabilidad civil.

Resultados

Fiabilidad de la técnica

En los 19 casos analizados por duplicado el coeficiente de correlación intraclass es del 0,94 para la proteína $A\beta_{1-42}$, del 0,96 para la proteína T-tau y del 0,95 para la proteína P-tau.

Comparación grupo DCL-e versus grupo DCL-p

Al estudiar la evolución a demencia de nuestros pacientes en los primeros 12 meses tras la realización de la PL observamos que 14 (38%) de ellos habían progresado a demencia. Al comparar estos grupos podemos resaltar:

- Características clínico-demográficas (tabla 1): no existen diferencias significativas en la edad de ambos grupos ni en la mayoría de las variables estudiadas. Sin embargo, los pacientes DCL-e tenían un más alto porcentaje de antecedentes de depresión (46% versus 18%) y un tiempo de evolución más largo, desde el comienzo de los síntomas hasta la realización de la PL.
- Comparación de los niveles de proteínas y cocientes (tabla 2): las distinciones entre ambos grupos las realizan la proteína $A\beta_{1-42}$ ($p < 0,02$) y el cociente P-tau/ $A\beta_{1-42}$ ($p < 0,02$). El resto de las variables estudiadas no alcanzan significación estadística.
- En la tabla 3 aparecen los resultados de las curvas COR para cada una de las variables estudiadas. Los valores de sensibilidad y VPN son para los puntos de corte elegidos son superiores al 70% en 4 y 3 variables, respectivamente.

Discusión

Nuestros pacientes DCL que progresaron a EA, en el primer año tras la PL, presentaron un nivel promedio de proteína $A\beta_{1-42}$ inferior al grupo de pacientes que se mantenían estables clínicamente. Estos resultados parecen útiles para identificar a los pacientes DCL con peor pronóstico y están en la línea de algunos trabajos publicados recientemente^{11,12}. Landau et al¹¹ describen

Tabla 1 Características clínicas y demográficas de los grupos DCL-e y DCL-p

	Grupo DCL-e	Grupo DCL-p	p
Número de casos	22	14	
Sexo (M/F)	9/13	3/11	
Edad (años)	73,43 ± 6,63	73,86 ± 6,95	NS
Media ± DS			
Antecedentes			
DM	3	3	
HTA	9	7	
HPL	13	4	
Depresión	11	3	
Hábitos tóxicos	No	No	
Antecedentes familiares demencia	8	2	
Años escolarización	4,4	5,8	NS
Inicio de los síntomas (meses), media ± DS	38,22 ± 7,3	25,71 ± 5,6	0,05
MMSE Folstein inicio	25	24	NS
Tipo DCL	Amnésico: 6 A/ Multido- minio:16	Amnésico: 4 A/ Multido- minio: 10	
Otras pruebas neuropsicológicas:			
TIN	80 ± 6	81 ± 8	NS
TMT (s)	68 ± 26	70 ± 24	NS
Test A-V de Rey	24,7 ± 8,3	23,2 ± 7,6	NS

DM: diabetes mellitus; HTA: hipertensión arterial; HPL: hiperlipidemias; NS: no significativo; TIN: test del informador; TMT: test del trazo o trail making test; test A-V de Rey: test auditivo verbal de Rey.

Tabla 2 Comparación de las concentraciones de los tres biomarcadores y cocientes entre biomarcadores para los pacientes DCL-e y los DCL-p

	DCL-e (n = 22)	DCL-p (n = 14)	Nivel de significación(p < 0,05)
Aβ ₁₋₄₂ (pg/ml)			
Media ± DS	377,73 ± 130,77	285,37 ± 73,36	0,02
T-tau (pg/ml)			
Media ± DS	75,13 ± 34,85	88,30 ± 40,82	0,3
P-tau _{181p} (pg/ml)			
Media ± DS	52,57 ± 24,95	66,44 ± 23,87	0,1
T-tau/ Aβ ₁₋₄₂			
Media ± DS	0,23 ± 0,15	0,34 ± 0,19	0,07
P-tau _{181p} /Aβ ₁₋₄₂			
Media ± DS	0,16 ± 0,11	0,25 ± 0,12	0,02

al aumento del cociente P-tau_{181p}/Aβ₁₋₄₂ como predictor de rápido empeoramiento cognitivo, y en nuestra experiencia vemos esta circunstancia en los pacientes DCL con peor pronóstico. Este cociente es utilizado por diferentes autores como un reflejo de la relación

entre las vías amiloide y tau^{11,16}, ambas alteradas en la EA.

Además, encontramos un descenso en la proteína Aβ₁₋₄₂, en este mismo grupo de pacientes, hallazgo que se considera actualmente como el primero en aparecer en los pacientes

Tabla 3 Resultados de las curvas COR para los diferentes parámetros utilizados

Parámetros	Aβ ₁₋₄₂	T-tau	P-tau	T-tau/Aβ ₁₋₄₂	P-tau/Aβ ₁₋₄₂
Valor límite	320	77,5	54,5	0,18	0,17
Sensibilidad (%)	71	57	79	91	71
Especificidad	64	64	60	50	64
Valor predictivo positivo (%)	56	50	55	52	71
Valor predictivo negativo (%)	7	70	81	84	64

EA, incluso antes de desarrollar DCL, lo que da mayor consistencia a nuestros resultados, respecto a los obtenidos por Blom et al¹². Estos autores comunican un aumento en los niveles de T-tau y P-tau en los pacientes que van a progresar rápidamente a EA.

En nuestra experiencia, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de proteína p-tau_{181p} entre ambos grupos, observamos que son mayores en el grupo DCL-p. La elevación de este biomarcador en LCR es considerada actualmente como el hallazgo más específico de EA, tanto en estudios clínicos^{7,9} como aquellos otros confirmados por autopsia¹⁷.

Al analizar los resultados de las curvas COR, encontramos alta sensibilidad y VPN para P-tau y el cociente T-tau/AB₁₋₄₂. El resto de resultados es más discreto, pero no podemos olvidar que estamos analizando pacientes que pueden tener como única diferencia su ritmo de progresión hacia EA. En cualquier caso, estos resultados acentúan la importancia de realizar la cuantificación de los tres biomarcadores, así como de los cocientes utilizados.

Los nuevos criterios para la investigación en EA, proponen que tanto RM, PET como los biomarcadores en LCR pueden sostener el diagnóstico de EA en pacientes con DCL amnésico¹⁸. Sin embargo, el análisis del LCR presenta ventajas con respecto a las otras dos técnicas. Por una parte, es más barato y más fácil de obtener que el PET, además de que esta técnica estudia actualmente solo la vía amiloide, y su uso sigue estando muy restringido. Por otra parte, los cambios en LCR reflejan la patología de EA antes que la volumetría¹⁹. Por tanto, parece particularmente preferible para el diagnóstico muy precoz de EA¹⁹, aunque se trata de técnicas complementarias, y la mayoría de trabajos que combinan la capacidad predictiva del análisis del LCR con otras técnicas como la RM así concluyen²⁰.

Desde un punto de vista metodológico, la utilización de la técnica xMAP Luminex parece presentar algunas ventajas con respecto al análisis del LCR mediante ELISA. La cuantificación simultánea de los tres biomarcadores, mejora el manejo técnico y el control de calidad de los ensayos, según algunos autores²¹. En nuestro caso, la realización de todas las cuantificaciones de forma simultánea, la obtención del LCR en una franja horaria reducida, así como la práctica identidad de la edad entre los grupos comparados disminuyen considerablemente los factores de confusión. Los resultados obtenidos en los coeficientes de correlación intraclass para los tres biomarcadores dan cuenta de la alta fiabilidad de la técnica utilizada.

Entre las limitaciones del estudio anotamos:

- Tiempo corto de seguimiento. Sin embargo, las diferencias obtenidas entre los pacientes que se convierten en los primeros 12 meses tras la PL nos habla de un probable patrón de rápida evolución hacia EA, como viene describiéndose en la literatura reciente^{11,12}, lo que podría aconsejar la realización de esta prueba complementaria no sólo para diagnóstico sino también con fines pronósticos.
- No todos los pacientes incluidos son de reciente diagnóstico. Sin embargo, sabemos que estos biomarcadores, esencialmente la proteína AB₁₋₄₂, se alteran muy pronto en la evolución de EA y no presentan cambios

significativos cuando se hace un control pasados unos años²².

- Se trata de una prueba invasiva. A pesar de ello, no se ha registrado ningún efecto adverso en la población estudiada, lo que concuerda con los datos publicados por otros autores²³, cuando dicha prueba se realiza a estos pacientes en buenas condiciones y, posteriormente, se evitan determinados esfuerzos durante un tiempo limitado.

En resumen, los pacientes DCL que tienen una reducción de los niveles de proteína AB₁₋₄₂ evolucionan rápidamente a demencia, mientras que los que tienen niveles más altos permanecen estables más tiempo.

Conflicto de intereses

Este trabajo ha sido financiado por los laboratorios Novartis España y Grunenthal España.

Agradecimientos

A los Servicios de Anestesia, Urología y Traumatología del Hospital General Universitario de Alicante. A María de los Ángeles Miguelsanz, del laboratorio de Inmunología, por la magnífica gestión de las muestras. A Margarita Ruiz Vegara por su colaboración desinteresada (in memoriam).

Bibliografía

1. Borroni B, Premi E, Di Luca M, Padovani A. Combined biomarkers for early Alzheimer disease diagnosis. *Curr Med Chem*. 2007;14:1171–8.
2. Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol*. 2006;5:228–34.
3. Artero S, Petersen RC, Touchon J, Ritchie K. Revised criteria for mild cognitive impairment: validation within a longitudinal population study. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2006;22:465–70.
4. Zetterberg H, Wahlund L, Blennow K. CSF markers for prediction of Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. 2003;352:67–9.
5. Hampel H, Teipel SJ, Fuchsberger T, Andreasen N, Wiltfang J, Otto M, et al. Value of CSF beta-amyloid1-42 and tau as predictors of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Mol Psychiatry*. 2004;9:705–10.
6. Herukka SK, Hallikainen M, Soininen H, Pirttilä T. CSF Abeta42 and tau or phosphorylated tau and prediction of progressive mild cognitive impairment. *Neurology*. 2005;64:1294–7.
7. Ewers M, Buerger K, Teipel SJ, Scheltens P, Schröder J, Zinkowski RP, et al. Multicenter assessment of CSF-phosphorylated tau for the prediction of conversion of MCI. *Neurology*. 2007;69:2205–12.
8. Diniz BS, Pinto JA, Forlenza OV. Do CSF total tau, phosphorylated tau and beta amyloid 42 help to predict progression of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease? A systematic review and meta-analysis of the literature. *World J Biol Psychiatry*. 2008;9:172–82.
9. Mitchell AJ. CSF phosphorylated tau in the diagnosis and prognosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease:

- a meta-analysis of 51 studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;80:966–75.
10. Monge-Argilés JA, Sánchez-Payá J, Muñoz-Ruiz C, Pampliega-Pérez A, Montoya-Gutiérrez FJ, Leiva-Santana C. Biomarcadores en LCR de pacientes con deterioro cognitivo leve: metaanálisis de su capacidad predictiva para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol*. 2010;50:193–200.
 11. Landau SM, Harvey D, Madison CM, Reiman EM, Foster NL, Aisen PS, et al. Comparing predictors of conversion and decline in mild cognitive impairment. *Neurology*. 2010;75:230–8.
 12. Blom ES, Giedraitis V, Zetterberg H, Fukumoto H, Blennow K, Hyman BT, et al. Rapid progression from mild impairment to Alzheimer's disease in subjects with elevated levels of tau in CSF and APOE $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotype. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2009;27:458–64.
 13. Kester MI, Van der Vlies AE, Blankenstein MA, Pijnenburg YA, Van Elk EJ, Scheltens P, et al. CSF biomarkers predict rate of cognitive decline in Alzheimer disease. *Neurology*. 2009;73:1353–8.
 14. McKhann G, Drachman DA, Folstein M, Katzman R, Price DL, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology*. 1984;34:939–44.
 15. Olsson A, Vanderstichele H, Andreasen N. Simultaneous measurement of β -amyloid₁₋₄₂, total tau and phosphorylated tau in CSF by xMAP technology. *Clin Chem*. 2005;51:336–45.
 16. Shaw LM, Vanderstichele H, Knapik-Czajka M, Clark CM, Aisen PS, Petersen RC, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Ann Neurol*. 2009;65:403–13.
 17. Koopman K, Le Bastard N, Martin JJ, Nagels G, De Deyn PP, Engelborghs S. Improved discrimination of autopsy-confirmed Alzheimer's disease from non-AD dementias using CSF p-tau 181p. *Neurochem Int*. 2009;55:214–8.
 18. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings J, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol*. 2010;9:1118–27.
 19. Hort J, Bartos A, Pirttilä T, Scheltens P. Use of CSF biomarkers in diagnosis of dementia across Europe. *Eur J Neurol*. 2010;17:90–6.
 20. Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Knopman DS, Trojanowski JQ, Shaw LM, et al. Serial MRI and CSF biomarkers in normal aging, MCI and AD. *Neurology*. 2010;75:143–51.
 21. Lewczuk P, Kornhuber J, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Esselmann H, Bibl M, et al. Multiplexed quantification of dementia biomarkers in the CSF of patients with early dementias and MCI: a multicenter study. *Neurobiol Aging*. 2008;29:812–8.
 22. Bouwman FH, Van der Flier WM, Schoonenboom NS, Van Elk EJ, Kok A, Rijmen F, et al. Longitudinal changes of CSF biomarkers in memory clinic patients. *Neurology*. 2007;69:1006–11.
 23. Andreasen N, Minthon L, Davidsson P, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Winblad B, et al. Evaluation of CSF-tau and CSF-A β 42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Arch Neurol*. 2001;58:373–9.