

Posterabstracts

Samenvattingen van de posterpresentaties tijdens het 53^e Congres van de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie op 6 en 7 april 2000 te Lunteren

Lipiden

001. Chylomicron processing in Familial Dysbetalipoproteinemia (FD) and Familial Combined Hyperlipidemia (FCH) studied with vitamin A and E as markers: a new physiological concept with relevance for biomedical research and diagnosis

P.N.M. DEMACKER, M.P.C. HECTORS and A.F.H. STALENHOF

Department of General Internal Medicine, 564 CKCL, University Medical Center St. Radboud, 6500 HB Nijmegen

In previous work we identified a transfer/diffusion process occurring in the post prandial state that more or less contributes to the accumulation of δ -VLDL in FD. Here we present a new theoretical concept underlying chylomicron processing developed on the base of extended quantitative analyses of fat loading experiments with both the vitamins A and E performed in patients with FCH in comparison to patients with FD and control subjects.

Recovery of triglycerides from the fat load in the plasma triglyceride pool was <4%, indicating a very effective lipolysis process with an active remnant generation. Vitamin A from the fat load was, over 48h, quantitatively recovered in the plasma lipoprotein pool; vitamin E was recovered for 22-41%. Nevertheless, transfer/diffusion of both vitamins showed similar patterns. At equilibrium, their contents correlated strongly with the lipoprotein concentrations; the slopes being similar

for control subjects and both groups of patients. Only in those FD patients with the highest lipid values, the vitamin A/lipoprotein mass ratio in the Sf>100 fraction deviated from the total group mean. In the Sf 15-100 fraction, most specific for "remnants", vitamin A/cholesterol ratio's for all subjects were uniform, proving that δ -VLDL formation is a thermodynamic process regulated by concentration gradients and the lipophyllicity of lipoprotein constituents, not a typical feature for patients with FD. In FD, vitamin A in the plasma pool was recovered excessively (276%) in line with recognition in various pools as a result of the transfer/diffusion process in plasma.

In conclusion: this study revealed new insights into the physiology of postprandial lipoprotein metabolism. Remarkably, the law of mass action was valid which makes the results of this study more generally applicable.

002. Dietary supplementation of AA and/or DHA to pregnant mice fed a regular or essential fatty acid deficient diet

M.R. FOKKEMA¹, F. KUIPERS², H.J. VERKADE², E.R. BOERSMA³ and F.A.J. MUSKIET¹

Pathology and Laboratory Medicine¹, Center for Liver, Digestive, and Metabolic Diseases², Obstetrics and Gynecology³, Groningen University Hospital

Introduction: Long chain polyunsaturated fatty acids (LCP), i.e. arachidonic acid [AA (ω 6)] and docosahexaenoic acid [DHA (ω 3)], are important components of brain and retinal tissue. The fetus is unable to synthesize sufficient LCP from the parent essential fatty acids (EFA). AA and DHA should therefore be derived at least partially, from transplacental transfer. AA is notably related to intrauterine growth, whereas early neonatal presence of DHA is associated with cognitive, visual and psychomotor development. We investigated in pregnant mice the possibility to increase EFA-status of mother and fetus by supplementation of AA and/or DHA fed a regular (RD) or an EFA-deficient diet (EFAD).

Methods: 45 mice were divided into 9 diet-groups (A-I) of n=5 (table 1). Conception took place from day -1 to day 0. Four mice served as non-pregnant controls and were RD-fed. All mice were fed their respective experimental diets from day -3 and were terminated at day 15 by heart puncture. Fatty acid compositions of maternal erythrocytes (RBC), maternal brain, whole fetus and fetus-head were determined by capillary GC-FID.

Results and Discussion: Supplementation of AA or DHA to either RD or EFAD decreased LCP ω 3 and LCP ω 6, respectively, in both mother and fetus in all four tissues. AA+DHA supplementation to RD-fed mice slightly increased fetal EFA

status, indicating increased LCP transplacental transport. Supplementation of AA, DHA or AA+DHA to EFAD-fed mice prevented development of biochemical EFA-deficiency in the mother and to a minor extent in the fetuses.

Conclusion: Our study indicates that dietary supplementation of AA+DHA to malnourished pregnant women and to those with poor placental perfusion may augment fetal EFA status and thereby improve intrauterine development.

Table 1.

Group	Diet
A	RD
B	RD + Median Chain Triglycerides
C	RD + AA (+MCT)
D	RD + DHA(+MCT)
E	RD + AA/DHA (1:2)
F	EFAD + MCT
G	EFAD + AA(+MCT)
H	EFAD + DHA(+MCT)
I	EFAD + AA/DHA (1:2)

003. Presence of birefringent Maltese cross appearing lipid spherules in synovial fluid in a case of acute monoarthritis: a case report

C.M. HACKENG¹, L.A.M. de BRUIJN¹, C.M. DOUW² and M.P. van DIEIJEN- VISSER¹

Division of Clinical Chemistry, University hospital Maastricht¹ and Division of Orthopedics, Bosch Medical Centre, 's Hertogenbosch².

A 31 year-old Caucasian presented to our hospital with an acute and painful swelling in the left knee- joint. Two days before, he had been playing a game of soccer and he was referred to our division of orthopaedics by his family doctor on suspicion of meniscus trauma. Aspiration of the knee joint yielded 100 ml clear orange-coloured fluid, containing 8,100 leucocytes/ μ l. Cholesterol and triglyceride concentrations in the synovial fluid were 3.3 mmol/l and 0.7 mmol/l, respectively. The patient's blood contained 9,000 leucocytes/ μ l (normal 3,500-11,000/ μ l) and had an increased ESR of 74 mm/hr. Serum lipid profile was normal, with cholesterol concentrations of 5.0 mmol/l and 1.42 mmol/l of triglycerides.

Given the patient's complaints, the synovial fluid was determined for uric acid crystals by polarised light microscopy. No uric acid crystals or other crystals were observed. However, under polarised light, positively birefringent Maltese cross appearing lipid spherules (10-20/high power field) were observed (figure 1).

In the literature, about ten patients suffering from an acute and unexplained monoarthritis have been described, in whose synovial fluid similar Maltese cross appearing lipid spherules were observed as in our patient. As it is known from animal experiments that injection of autologous fat and synthetic liposomes in the knee joint results in acute arthritis, it is thought

that lipid spherules in synovial fluid are the inducers of the unexplained arthritis. The origin of these spherules remains to be elucidated. It is speculated that they are formed from synovial fat released into the knee joint or from membrane lipids of lysed erythrocytes after a small trauma.

The clinical chemist should be aware of this possibility, thereby supporting the clinician in his diagnosis and preventing the patient from further invasive examinations.



Figure 1. Maltese cross appearing lipid spherules in synovial fluid

004. Determination of LDL susceptibility to in vitro oxidation: a comparison of three methods

P.G. SCHEFFER¹, S.J.L. BAKKER², E.E. MUSCH¹, G.J. van ROOIJ¹, C. POPP-SNIJDERS^{1,2}, R.J. HEINE², and T. TEERLINK¹

Departments of Clinical Chemistry¹ and Endocrinology², Research Institute for Endocrinology, Reproduction and Metabolism, Academic Hospital Vrije Universiteit, Amsterdam.

Background: Oxidation of LDL in the vessel wall is implicated in the development of atherosclerotic lesions. As a surrogate measure of *in vivo* oxidisability, the susceptibility of LDL to *in vitro* oxidation is usually measured by monitoring the formation of conjugated dienes (CD) at 234 nm. During this oxidation process, isolated LDL is exposed to copper-ions, and LDL-associated antioxidants are consumed, thereby sparing LDL-lipids from oxidation. The aim of this study was to compare the conventional CD method with two other methods to measure the resistance of LDL against *in vitro* oxidation.

Methods: Susceptibility of LDL to copper induced *in vitro* oxidation was measured in 98 subjects by three methods that monitor different stages of the oxidation process. These methods measure the lag time (LT) of, (i) conjugated diene production, (ii) fluorescence decay during oxidation of parinaric acid (PA) incorporated in LDL, and (iii) fluorescence development (FD), due to increased auto-fluorescence of LDL during oxidation. The latter two methods were fully automated. In addition, we measured baseline levels of conjugated dienes, LDL particle size, antioxidants, main lipid classes, and

individual fatty acids, and studied their relation with LTs by univariate regression analysis.

Results: The mean CD-LT was 49.0 ± 6.6 min. Corresponding values for PA-LT and FD-LT were 20.4 ± 4.3 and 66.7 ± 8.0 min, respectively. The PA-LT and FD-LT values were highly correlated to CD-LT measurements ($r = 0.78$ and $r = 0.86$, respectively). The particle diameter of LDL, nor the baseline levels of conjugated dienes was significantly related to LTs. Coenzyme Q10 and α -tocopherol were positively correlated with PA-LT ($r = 0.34$ and $r = 0.27$, respectively). Both CD-LT and FD-LT were negatively correlated with the arachidonic acid content of LDL ($r = -0.40$ and $r = -0.47$, respectively). Between-run CVs for the entire procedure, including isolation of LDL, were 7.9%, 10.7%, and 3.6%, for determining the CD-LT, PA-LT and FD-LT, respectively.

Conclusions: Due to its high reproducibility the FD assay is a good alternative for the conventional CD method for measuring LTs. The PA technique seems suitable to study relations between LDL oxidisability and antioxidants.

Enzymen/Eiwitten

005. Enzymstandaardisatie door kalibratie; een uitgebreide pilot

H. BAADENHUIJSEN^{1,5}, P.F.H. FRANCK², A. KUYPERS^{1,5}, C. WEYKAMP^{3,5} en R.T.P. JANSEN^{4,5}

CKCL UMC St Radboud Nijmegen¹, KCL Ziekenhuis Leyenburg Den Haag², KCL Streekiekenhuis Kon. Beatrix Winterswijk³, KCL St Annaziekenhuis Geldrop⁴, SKZL Nijmegen/Winterswijk⁵

In 1998 en 1999 werd door een grote groep laboratoria deelgenomen aan een landelijk serumuitwisselingsexperiment waarbij tezamen met de uitgewisselde patiëntensera ook testpreparaten ("kandidaatkalibratoren") werden bepaald. Eén en

ander met de bedoeling om de commuteerbaarheid van de testpreparaten te beoordelen. Immers, wil er in de toekomst sprake zijn van kalibratoren die inzetbaar kunnen zijn voor de diverse in gebruik zijnde analysetechnieken, dan dienen er

geen methodeafhankelijke verschillen tussen patiëntensera en kalibratoren (commuteerbaarheid) te zijn die een versturende rol spelen bij de onderlinge vergelijkbaarheid van testresultaten afkomstig van verschillende laboratoria. Uit de genoemde experimenten kwam naar voren dat er vooralsnog voor de enzymen slechts het gebruik van preparaten die afkomstig zijn van selectief gepooled patiëntenmateriaal uitzicht biedt op een in voldoende mate terugdringen van de aanwezige tussen-laboratorium variatie. Aangezien dit in de praktijk een niet al te aantrekkelijke aanpak is werd de zoektocht naar alternatieven in het kader van het landelijke project "Kalibratie 2000" voortgezet. In december 1999 werd daartoe het volgende experiment uitgevoerd. Veertig laboratoria werden voorzien van een zestal patiëntensera (poolsera, selectief verzameld op basis van interessante enzymlevels) en tien testpreparaten. De door de individuele laboratoria gerapporteerde patiëntresultaten werden omgerekend op basis van de gevonden waarde voor het betreffende testpreparaat in relatie tot de daaraan toegekende "kalibrator"-waarde. De volgende "kandidaat"-kalibratoren werden gebruikt: 1. een vijftal zelf bereide sera: A: basaal

serum, B t/m E: het basale serum A waaraan enzymen waren toegevoegd die met een recombinant DNA technologie zijn vervaardigd (ASAHI, Tokyo, Japan), B: bevroren (geweest), C: als B + sucrose, D: gevriesdroogd, E: als D + sucrose; 2. een tweetal enzymkalibratoren van de firma Beckman Coulter; 3. een enzymkalibrator van de firma WAKO en tenslotte 4. een tweetal experimentele "enzymverifiers" van de firma Bio-Rad.

Richten we ons op een mogelijke toekomstige gevriesdroogde enzymkalibrator, die ook in eigen SKZL-beheer goed is te bereiden en stabiel is, dan vallen de volgende kengetallen voor de tussen-lab variatie waar te nemen: voor Alkalische Fosfatase CV vóór kalibratie 14% naar een CV ná kalibratie 3%; ASAT: CV vóór 21% naar CV ná 4%; ALAT: CV vóór 15% naar CV ná 5%; LD: CV vóór 26% naar CV ná 4%; gamma-GT: CV vóór 14% naar CV ná 4%; CK: CV vóór 21% naar CV ná 5%; Amylase CV vóór 37% naar CV ná 8%. Deze waarden geven aanleiding om met goede moed aan de afronding te werken van het project "Kalibratie 2000".

006. Monstername voor cryoglobuline: een zaak voor extra aandacht

A.J. BAKKER¹, J. SLOMP¹, T. de VRIES¹, D.A.G. BOYMANS¹, B. VELDHUIS¹, C. HALMA² en P. JOOSTEN².
¹Stichting Klinisch Chemisch Laboratorium en ²Medisch Centrum Leeuwarden, Leeuwarden.

Cryoglobulinen worden gedefinieerd als immunoglobulinen die spontaan, een reversibele neerslag vormen bij temperaturen <37°C. Deze neerslagvorming is het duidelijkst bij 4°C. Echter, vaak slaan cryoglobulinen ook neer bij hogere temperaturen. De hoogte van de neerslagtemperatuur correleert met de klachten van de patiënt.

Voor detectie van cryoglobulinen is het preanalytische traject van essentieel belang.

Naar aanleiding van twee patiënten waarbij geen cryoglobuline was waargenomen, maar waarbij klinisch en histologisch de aanwezigheid van een cryoglobuline evident was, werd het preanalytisch traject onderzocht.

Bij de afnameprocedure werd een op 37°C voorverwarmde stolbuis voor en na afname in een isolerende container vervoerd, 1 uur gesteld in een stoof van 37°C en 5 min gecentrifugeerd in een op 37°C voorverwarmde centrifugebucket in een niet verwarmde centrifuge. Bij simulatie van deze afnameprocedure met een stolbuis gevuld met water bleek, dat de temperatuur na 30 min was gezakt naar 30°C. Bij simulatie van de centrifugatiestap daalde de watertemperatuur na centrifugatie tot 34°C. Na optimalisatie van de afnameprocedure

wordt voorafgaand aan de afname van cryoglobuline een stolbuis in een afgesloten thermosfles met water in een stoof op 40°C voorverwarmd. Deze buis wordt in de thermosfles vervoerd en direct na afname teruggeplaatst in de thermosfles en teruggebracht naar de stoof van 40°C. De buis stolt daar gedurende 1 uur in een op 40°C voorverwarmde en afgesloten centrifugebucket, waarna het geheel 5 min gecentrifugeerd wordt in de niet verwarmde centrifuge. De analyse wordt op de gebruikelijke manier ingezet.

Conform deze afnameprocedure werd bij bovengenoemde patiënten cryoglobuline bepaald. Bij beiden werd een duidelijk waarneembaar cryoglobuline gevonden. Precipitatie trad al op bij temperaturen van tegen de 37°C. Een opmerkelijk bijkomend fenomeen was dat bij één van de patiënten een discrepantie tussen de optische- en de impedantietelling van de trombocyten op de Cell-Dyn 4000 werd waargenomen, waarbij de handtelling een waarde gaf die tussen beide in lag. Met EDTA-bloed afgenomen als een aanvraag voor cryoglobuline, werd deze discrepantie niet waargenomen en correleerden de waarden met de handtelling.

007. De reproduceerbaarheid van de LDH bepaling, gemeten in heparine plasma op de Integra

M.J.M. de GROOT, H. MEMARZADEH, H.A. KLEINVELD en J. ten KATE
Klinisch chemisch laboratorium, Atrium Medisch Centrum Heerlen, Postbus 4446, 6401 CX Heerlen

Probleem: In ons laboratorium worden incidenteel zeer slechte duplo's bij de LDH bepaling in heparine plasma vastgesteld.

Doel: Er werd bestudeerd 1) hoe reproduceerbaar de LDH meting in plasma is, wanneer het wordt gemeten als eerste parameter op de Integra; 2) of LDH activiteit een gradiënt vertoont in de buis; 3) of trombocyten een rol kunnen spelen bij deze variatie.

Methode: Bij 30 patiënten werd bloed afgenomen in een heparine buis met gel als cel separator (Becton and Dickinson). De LDH activiteit werd in triplo gemeten op de Integra 700 (art. no. 07 3742 9, Roche), waarbij pyruvaat wordt omgezet naar lactaat. In 3 monsters werd de LDH activiteit in 30-voud gemeten. Tevens werden trombocyten in verschillende hoeveelheden toegevoegd aan een plasmamonster en vervolgens werden deze trombocyten geactiveerd met collageen en epinephrine.

Resultaat: Wanneer LDH als eerste parameter werd gemeten

op de Integra, dan bedroeg de variatiecoëfficiënt (VC) voor LDH in plasma gemiddeld 5%, met een spreiding van 0,5 tot 25%. 20 monsters hadden een VC < 5%, 4 monsters een VC tussen 5 en 10% en 6 monsters een VC > 10%. De LDH activiteit was voornamelijk verhoogd in de eerste 25 µl en was daarna stabiel. De LDH waarde bleek niet gerelateerd te zijn aan het aantal trombocyten. Voor andere parameters werd een goede reproduceerbaarheid gevonden (gemiddelde VC in %): kalium (0,7), calcium (1,6) cholesterol (2,3), creatinine (1,5), triglyceriden (3,3), ALAT (2,0), ASAT (1,3), eiwit (2,6). Hierbij lag de spreiding tussen 0 en 5%.

Conclusie: De LDH activiteit in een heparine gelbuis vertoont een variatie die gradiënt afhankelijk is. Na ongeveer 25 µl wordt de VC acceptabel. Trombocyten zijn niet verantwoordelijk voor deze variatie. Een verklarende factor is momenteel echter niet voor handen.

008. Evaluation of the Paragon 2000 CZE™ system for the detection and identification of monoclonal components

Y.M.C. HENSKENS¹, C. van de WATER¹, A. LANSER², A. van der MEIJDEN², J. van der KRAAY¹, J. de WINTER¹, H. BEKENES¹ and W. van GELDER².

Medische Laboratoria¹, Reinier de Graaf Groep, Delft and Klinisch Chemisch Laboratorium², Albert Schweitzer Ziekenhuis, Dordrecht

The Paragon CZE™ 2000 system (Beckman Instruments) is a multicapillary instrument designed for the automation of routine serum protein electrophoresis (CE-SPE) and monoclonal component typing by immunosubtraction (CE-IFEs). The aim of this study is to evaluate the performance of this capillary electrophoresis system in two hospital laboratories. The conventional methods that were used in this comparison were agarose gel electrophoresis (AGE) and immunofixation electrophoresis (IFE).

In total, 578 serum samples were analyzed by both laboratories using CE-SPE, AGE and IFE. CE-IFEs was performed on samples that were positive for a MC based on the CE-SPE pattern. Similar results (between methods and hospitals) were found on 558 serum samples which contained 124 monoclonal components. Differences in detection or immunotyping of MCs, which were found in 20 samples, concerned the detec-

tion or immunotyping of very small MCs (< 3.4 g/l) and could be attributed to both the conventional and the capillary electrophoresis method. The protein concentration of the MCs was determined by scanning of the agarose gels and by determination of the relative peak areas on the capillary electropherogram. Comparison of protein concentration by Passing and Bablok regression analysis resulted in the following equations of: $y = 1.06x - 3.24$, $r = 0.95$ (AGE - CZE Delft), $y = 1.12x - 1.41$, $r = 0.96$ (AGE - CZE Dordrecht) and $y = 0.94x - 1.70$, $r = 0.99$ (CZE Delft - CZE Dordrecht).

We conclude that serum protein screening and monoclonal component typing using the Paragon CZE™ 2000 system gives reliable results and can be used to automate serum agarose electrophoresis and immunofixation electrophoresis in routine clinical laboratories.

Elektrolieten

009. Bepaling en interpretatie van totaal CO₂ bij haemodialysepatiënten

M.G.L.M. ELISEN¹, P.P.N.M. DIDERICH² en J.W. JANSSEN¹.

Klinisch Chemisch Haematologisch Laboratorium¹, Afdeling Haemodialyse², St. Franciscus Gasthuis Rotterdam

Bicarbonaat wordt gezien als de *buffer of choice* bij de behandeling van alle haemodialysepatiënten, enerzijds omdat het HCO₃/CO₂ evenwicht een fysiologisch buffersysteem is en anderzijds omdat dit systeem goed kan worden gereguleerd door de pCO₂ te beïnvloeden via veranderingen in de alveolaire ventilatie van de patiënt. Bij het gebruik van bicarbonaat is het belangrijk om post-dialyse een goede balans te vinden ter voorkoming van een metabole acidose of een postdialyse alkalose. Ten aanzien van het monitoren van de bicarbonaatdialyse is onderzocht of de bepaling van totaal CO₂ op een LX20 chemie-analyzer een snel, eenvoudig en betrouwbaar alternatief is voor het meten van HCO₃⁻ op een bloedgas-analyser.

Een tweede punt van onderzoek betrof de negatieve effecten van een metabole acidose ten aanzien van eiwitkatabolisme. De mate van HCO₃⁻-buffering zou indicatief kunnen zijn voor de mate van eiwitkatabolisme. Gekozen is om de HCO₃⁻-buffering te monitoren bij haemodialyse-patiënten, en deze para-

eters te vergelijken met voedingsparameters zoals albumine, kreatinine en de zg. "protein catabolism rate" (PCR) van deze patiëntengroep.

Geen significante verschillen zijn waargenomen tussen het bepaalde totaal CO₂ en de gemeten actuele HCO₃⁻-concentratie, en dus kan totaal CO₂ worden beschouwd als volwaardig alternatief.

Uit het patiëntenonderzoek bleek een omgekeerde evenredigheid tussen zowel HCO₃⁻/tCO₂ ten opzichte van de PCR bij haemodialysepatiënten. Deze resultaten suggereren dat patiënten met lage HCO₃⁻/tCO₂ ratio, hetgeen bij deze groep correleert met een metabole acidose, een verhoogd eiwitkatabolisme hebben. (P<0.005). Correlaties van predialyse HCO₃⁻/tCO₂ ratio met overige voedingsparameters zoals albumine en kreatinine, waren negatief of statistisch niet significant. De resultaten ondersteunen de bewering dat een metabole acidose het eiwitkatabolisme stimuleert en dat het bepalen van tCO₂ een maat geeft voor de ernst hiervan.

010. Plasma bicarbonaat bepaling op de Hitachi 917 bij het vervolgen van hemodialyse behandelingen

F.M.J. ZUIJDERHOUDT¹, J.S. KAMPHUIS¹, W.E. KLUITENBERG¹, Y.H. TROMP² en C.J. DOORENBOS²

Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Afdeling Inwendige Geneeskunde², Deventer Ziekenhuis, Deventer

Voor zover bekend is de Roche plasma bicarbonaatbepaling op de Hitachi 917 in Nederland nog niet eerder gebruikt.

Tot op heden werd in ons laboratorium bicarbonaat steeds in volbloed gemeten op bloedgasapparatuur. Dit is duur en tijdrovend. Met name bij grote controlebeurten voor de afdeling hemodialyse zou meting in plasma op een Hitachi-analyser grote voordelen bieden. Onze ervaring hiermee wordt weergegeven. De variatiecoëfficiënt binnen één dag met BioRad Liquicheck op niveau 20 mmol/l is 2,5 % (n=10); de dag-op-dag variatie is 2,7 % (n=15). Het bewaren van bloed gedurende 2 uur in zowel de spuit (bloedgasmeting) of vacuumbuis (Hitachi 917) had verwaarloosbare invloed. Lineaire regressievergelijkingen van bicarbonaatconcentraties gemeten op de Hitachi (y) en de bloedgasmeter, Radiometer type 520 (x), zijn respectievelijk:

vóór dialyse (n=49) $y = 0,87 x + 1,66$; $r = 0,95$

na dialyse (n=49) $y = 0,81 x + 4,12$; $r = 0,87$

Hoewel deze resultaten geen buitengewoon goede overeenkomst suggereren, is dit in de range van 15 – 30 mmol/l, waarbinnen alle waarden vallen, acceptabel. De verschillen tussen bicarbonaatmetingen op Hitachi en bloedgasapparatuur (n=49) zijn gemiddeld: vóór dialyse 1,1 mmol/l (SD 0,8) en na dialyse 1,0 mmol/l (SD 0,8). Belangrijk is dat de verhouding van individuele patiëntenresultaten vóór en na dialyse op de Hitachi (y) en bloedgasapparatuur (x) een voldoende correlatie laten zien: $y = 0,90 x + 0,06$; $r = 0,91$.

Onze resultaten tonen aan dat de bicarbonaatmeting op de Hitachi 917 gebruikt kan worden ter vervanging van de meting op de bloedgasapparatuur. Een nadeel is echter de beperkte houdbaarheid van een aangebroken testverpakking voor de Hitachi.

Endocrinologie

011. Hyponatremic rhabdomyolysis in a patient with Addison's disease

C. BEIJER¹ and W. J. MOLENDIJK²

Department of Clinical Chemistry¹, Department of Internal Medicine², Rijnland Hospital, The Netherlands

Rhabdomyolysis has rarely been reported in association with hyponatremia. In those patients described hyponatremia was usually caused by water intoxication. Here we present a rare case of rhabdomyolysis caused by hyponatremia in a patient with Addison's disease.

A 43-year old man was hospitalized because of general malaise, anorexia, a worsening fatigue and muscle weakness, nausea and vomiting. On examination a dark tanning of the skin was observed, he weighed 67 kg, supine systolic pressure was 100 mm Hg, and skin turgor was slightly decreased. Initial laboratory results in the patient's serum: potassium, 5.9 mmol/l; sodium, 110 mmol/l; creatinine, 141 µmol/l; calcium, 2,37 mmol/l; glucose, 5.7 mmol/l; albumin, 42 g/l. Additional laboratory results in the patient's serum during the hospitalization period: CK, 17745 U/l (25-200 U/l); TSH, 4.6 mU/l (0,4-4,0 mU/l); cortisol at 9.00 a.m., 0.05 µmol/l (0.18-0.69 µmol/l). The clinical symptoms and laboratory results are characteristic for Addison's disease. The diagnosis in this patient was confirmed by performing an ACTH stimulation test; fasting cortisol, 0.05 µmol/l; fasting ACTH, 953 ng/l

(0-75 ng/l); post ACTH cortisol, 0.06 µmol/l. Adrenal cortex autoantibody, weakly positive; thyroid microsomal autoantibodies, positive. On admission the patient was given an intravenous infusion of normal saline. After obtaining blood for laboratory investigations and performing the ACTH stimulation test a bolus of hydrocortisone (100 mg daily) was given. The patient was discharged from the hospital with conventional cortisonacetate and fludrocortison therapy.

The pathogenic mechanism causing the rhabdomyolysis in hyponatremia remains controversial. Presumably the hyposmolality of the extracellular fluid leads to cell swelling. After reduction of this swelling due to extrusion of intracellular potassium the cellular transmembrane potential is decreased leading to destruction of muscle cells causing rhabdomyolysis. In summary, we present a patient with Addison's disease with a severe hyponatremia. This hyponatremia was further complicated by rhabdomyolysis as creatine kinase levels in the patient's serum were elevated. We emphasize the need to monitor muscle enzymes in hyponatremic patients if muscle weakness or pain develop.

012. Corticosteroid-bindend globuline en de vrije cortisol index: een bifasisch patroon tijdens ernstige sepsis en polytrauma

A. BEISHUIZEN¹, H.A. BONTE² en I. VERMES³,

Afdeling Inwendige Geneeskunde¹ en Klinische Chemie³, Medisch Spectrum Twente, Enschede, Afdeling Klinische Chemie², Streekziekenhuis Midden-Twente, Hengelo.

Er treden gedurende ernstige stress een complexe serie hormonale en metabole reacties op, waaronder een toename in de productie van glucocorticoiden, noodzakelijk voor overleving. Corticosteroid-bindend globuline (CBG) is het specifieke transport eiwit voor serum cortisol, en slechts de vrije fractie van cortisol is biologisch actief. De vrije cortisol index (FCI) is een eenvoudige maat om de hoeveelheid vrij cortisol te schatten en van potentieel belang tijdens ernstige ziekte.

Gedurende 14 dagen werden serieel serum spiegels van cortisol (Immulite) en CBG (TRFIA) gemeten bij patiënten met ernstige sepsis en polytrauma. Daarnaast werd de FCI berekend: $FCI = \text{serum cortisol} / \text{serum CBG} \times 100$. Andere parameters omvatten: berekend ongebonden cortisol, APACHE II, leukocyten, temperatuur en ziekte-uitkomst.

Bij zowel sepsische patiënten (n=28) als trauma patiënten (n=5) vonden we opvallend lage CBG concentraties in de acute fase (dag 1: sepsis 17,5±5; trauma 16,1±3,2; controle 31±20 mg/l). De FCI was hoog in deze vroege fase (sepsis

4,6±2,9; trauma 3,1±0,8; controle 0,49±2). Tijdens follow-up stegen de CBG spiegels significant vanaf baseline en bereikten normale waarden (30-50 mg/l) vanaf dag 7. Het beloop van de FCI vertoonde een tegenovergesteld bifasisch patroon met dalende doch niet normaliserende FCI waarden. Daarentegen vertoonden de berekende ongebonden cortisol waarden geen specifiek patroon. Er bestond geen correlatie tussen CBG of FCI met APACHE II scores, uitkomst of andere parameters.

Concluderend vonden wij extreem lage CBG concentraties in de vroege fase van ernstige sepsis en polytrauma. Dit reflecteerde zich in hoge FCI waarden, hetgeen wijst op hogere ongebonden cortisol spiegels. Een tweede fase, na ca. 7 dagen, toonde stijgende CBG spiegels, en nagenoeg aanwezig in alle patiënten. Waarschijnlijk speelt CBG een actieve rol in de glucocorticoïd respons op ernstige stress, en dient CBG te worden beschouwd als een belangrijke factor in de regulatie van de beschikbaarheid van cortisol aan de weefsels.

013. Een 'time-resolved-fluoro-immunoassay' en de klinische toepassingen ervan

K.C.R. MALMEGRIM, A. BEISHUIZEN, R. OVERBEEKE, G. van der SLUIJS VEER en I. VERMES

Laboratorium Medisch Spectrum Twente, Enschede.

Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is een recent ontdekt pro-inflammatoir cytokine, dat de unieke eigenschap heeft om de anti-inflammatoire werking van glucocorticoiden te blokkeren. De lokalisatie van MIF in centrale (hypofyse) en perifere plaatsen (immuun-cellen) wijst op de centrale rol binnen het immuun- en het endocrien-systeem. Wij hebben een 'time-resolved-fluoro-immunoassay' opgezet (DELFI) voor de bepaling van MIF-concentraties in serum. De test heeft een hoge gevoeligheid, is goed reproduceerbaar en heeft een breed meetgebied. Een uitgebreide analytische evaluatie bewijst dat de opgezette test betrouwbaar is. De MIF-concentraties (ng/ml) werden gemeten in sera van gezonde vrijwilligers (3,5; spreiding 0,3-

9,9), sepsische shock (18,3; spreiding 2-58,5), multitrauma (6,6; spreiding 5,4-7,3), rheumatoïde artritis (8,9; spreiding 0,5-41) en arthrose (10,3; spreiding 1-26,6). Aanvullend zijn er sera van patiënten gemeten die een ACTH-stimulatietest ondergingen, een dexamethason-suppressietest of een cortisol-dagritmetest. Er werd geen correlatie gevonden tussen MIF en cortisol.

Omdat MIF een belangrijke rol speelt als mediator bij inflammatoire of infectieziekten, kan de MIF bepaling in de toekomst als een effectieve laboratorium parameter gebruikt worden om meer inzicht te krijgen in het proces van genoemde ziekten. Daarom kan deze nieuw ontwikkelde test voor veel laboratoria van belang zijn bij kwantificering van MIF levels in serum.

014. Worden discrepanties tussen TSH en vrij thyroxine (vT₄) uitslagen veroorzaakt door HAMA's of reumafactoren?

F. BAKELS en P.P.C.A. MENHEERE

Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Maastricht

TSH en vT₄ zijn discrepant als er normale TSH uitslagen worden gevonden bij licht verhoogde of verlaagde vT₄ uitslagen en omgekeerd. Een eenduidige klinische conclusie lijkt dan onmogelijk. Hoewel discrepante waarnemingen vaak verklaard kunnen worden als een subklinische hypo- of hyperthyreoïdie, moet er toch ook rekening worden gehouden met de mogelijkheid van interacties in de bepalingen door humane anti-muisantilichamen (HAMA's) en/of reumafactoren.

Patiënten: In totaal werden er 77 patiënten jonger dan 80 jaar geselecteerd met discrepantie tussen TSH en vT₄ uitslagen: 50 patiënten met een normaal vT₄ (TSH <0.5 mU/l, N=25; TSH >7.0 mU/l, N=25); 27 patiënten met een normale TSH (vT₄ <8 pmol/l, N=23; vT₄ >18 pmol/l, N =3).

Patiënten met een duidelijk schildklierlijden, lithium-, cordarone- of heparinegebruikers werden uitgesloten.

Daarnaast werden elf patiënten met evident positieve reumafactoren en drie controlevloeistoffen (albumine, water en muizen-serum) onderzocht.

Materiaal en methode: Voor de detectie van HAMA's en/of reumafactoren werd een kwalitatieve strip toegepast. HAMA's positieve patiëntensera werden nogmaals getest met een evaluatie test van dezelfde fabrikant.

TSH en vT₄ werden bepaald op een Autodelfia. PEG precipitatie werd gebruikt als specifieke confirmatietest.

Resultaten: De aflezing bij 70% der monsters werd bemoeilijkt door een intense, diffuse aankleuring op de plaats waar de HAMA-band zichtbaar wordt. Bij de reumafactoren was in 55% van de gevallen de band diffuus.

Tien keer werd een scherpe HAMA-band waargenomen. In de evaluatietest was geen van deze monsters positief; bijgevolg zijn diffuse of zwakke banden als negatief beschouwd. Er is dus geen enkel monster gevonden met positieve HAMA's.

Bij de controlemonsters met sterk positieve reumafactoren was één monster positief voor HAMA's en toonden er negen een diffuse HAMA-band. PEG precipitatie toonde dat geen der controlemonsters positief is.

Tien patiëntenmonsters bleken positief voor reumafactoren. Of hierdoor de discrepantie veroorzaakt wordt, blijft onduidelijk. De sensitiviteit van de reumatest was niet verbijsterend: slechts 7 van de 11 monsters met duidelijk positieve reumafactoren bleken positief. Aan de specificiteit van de test kan getwijfeld worden omdat 2 van 3 controlevloeistoffen een diffuse band gaven.

Conclusie: De HAMA test is vanwege het zeer groot aantal monsters met een diffuse band enerzijds en 11% vals positieve monsters anderzijds niet in de dagelijkse praktijk te gebruiken. De sensitiviteit van de reumatest in de teststrip was onvoldoende; de specificiteit is twijfelachtig.

015. Laboratoriumcontrole van bloedglucosemeters

W. MULLER, M. den OUDEN, R. DOLLAHMOERSID en K. MIEDEMA

Klinisch chemisch laboratorium, locatie Weezenlanden, Isala klinieken, Zwolle.

In de moderne behandeling van patiënten met diabetes mellitus spelen zelfcontrole van het bloedglucosegehalte en zelfbehandeling, meestal met insuline, een steeds belangrijker rol. De frequentie van zelfcontrole is afhankelijk van het type diabetes en de intensiteit van de behandeling en varieert van maandelijks een 4-punts dagcurve tot tweewekelijks een 7-punts dagcurve. Het laboratorium dient verantwoordelijkheid te dragen voor de (kwaliteits)controle van de bloedglucosemeters (BGM's), waarbij niet alleen wordt gelet op de analytische kwaliteit, maar ook aandacht moet worden geschonken aan de pré-analyse, dus de bediening door de patiënt.

Jaarlijks worden op ons laboratorium honderden meters aangeboden ter controle. Bij deze controle wordt de uitslag verkregen met een BGM vergeleken met de uitslag verkregen met de gebruikelijke laboratoriumbepaling. In de afgelopen jaren is er duidelijke verbetering van de kwaliteit van de meters opgetreden gemeten aan het aantal afgekeurde meters (in 1991 10,8% afgekeurd en in 1995 nog 3,9%). Echter, ook is steeds vaker geconstateerd dat initieel afgekeurde meters bij een intensievere controle op het laboratorium (3-, of 10-punts controle met veneus volbloed) toch aan de kwaliteitsnormen (TNO richt-

lijnen) voldeden. Daarom is overgegaan op een meter-specifieke procedure voor de kwaliteitscontrole van BGM's.

Van alle door de diabetespoli van ons ziekenhuis uitgegeven BGM's is een methode vergelijking uitgevoerd met de door ons gebruikte referentiemethode voor glucose in capillair volbloed, de hexokinasemethode met onteiwitten door perchloorzuur. Vanuit deze methodevergelijking is een correlatie berekend ten opzichte van de HemoCue, en de hieruit volgende regressielijn is opgeslagen in een speciaal computerprogramma. Rond de regressielijn is een acceptatiegebied gedefinieerd van +/- 1,0 mmol/l, bij waarden tot 6,5 mmol/l glucose, en +/- 15% bij waarden boven de 6,5 mmol/l glucose. Toepassing van deze criteria op de meters welke in 1999 aan het laboratorium werden aangeboden ter controle (n=716) leerde dat geen van de meters werd afgekeurd, met de traditionele methode zouden dat er 4,3% zijn geweest. Een meter-specifieke beoordeling van de analytische kwaliteit is dus van groot belang voor de periodieke controle van bloedglucosemeters, de aandacht dient voornamelijk gericht te zijn op de technische uitvoering van de meting door de patient.

016. Invloed van gecarbamyleerd hemoglobine op verschillende methoden voor glycohemoglobine

E. LENTERS¹, C. SIEBELDER², T. de HAAN¹ en K. MIEDEMA¹

Klinisch Chemisch laboratorium, Isala klinieken, locatie Weezenlanden, Zwolle¹ en Laboratorium Streekziekenhuis Koningin Beatrix, Winterswijk²

Er bestaat nog steeds onzekerheid over de mate waarin het gecarbamyleerd hemoglobine (carbHb) interfereert in de bepaling van het glycohemoglobine. Van kation-uitwisselingschromatografie (BioRad en Menarini) wordt in het algemeen aangenomen dat interferentie kan optreden, correctie in de Menarini HA 8140 kan plaats vinden door het aftrekken van de zgn. "#C-fractie". De affiniteitchromatografie (Primus) en

immunoturbidimetrische methode (Roche Unimate) daarentegen zouden geen last hebben van eventuele storing door carbHb bij patiënten met een hoog ureumgehalte. Een eenduidig antwoord op de vraag of en zo ja bij welke methode en hoeveel carbHb stoort bij de routinematige bepaling van glycohemoglobine is dus noodzakelijk.

Vanuit EDTA-bloed van een 33 jarige vrouw, niet-diabeet, met

een ureumgehalte van 4,0 mmol/l werden middels in-vitro carbamylering monsters verkregen met oplopend carbHb-gehalte. Met behulp van capillaire electroforese is vervolgens in de negen monsters het correcte carbHb-gehalte bepaald en vastgesteld op 0,00 - 9,85% carbHb. In al deze monsters is vervolgens met diverse methoden het glycohemoglobine gehalte bepaald.

Uit de resultaten kan worden afgeleid dat zowel de Primus affiniteitchromatografie als de Roche Unimate immunoturbidimetrie niet gestoord worden door een verhoogd carbHb-gehalte, terwijl daarentegen de kationuitwisselingschromatografie (BioRad Diamat en de Menarini HA-8140) in toenemende

mate worden gestoord. Reeds vanaf een carbHb-percentage van 1,24% treedt er een significante verhoging (> 0,75%) van het glycohemoglobinegehalte op, waardoor een onjuiste interpretatie van de instelling van de patiënt zal plaats vinden. Door correctie met behulp van de #C-fractie zal verstoring in het Menarini chromatogram pas optreden bij 4,21% carbHb. Deze correctie is echter altijd noodzakelijk.

Bij diabetespatiënten met een verhoogd ureumgehalte dient derhalve aandacht te worden geschonken aan de storende invloed van het gecarbamyleerd hemoglobine op de resultaten van de glycohemoglobine bepaling; het gebruik van methoden welke niet gestoord kunnen worden aan te bevelen.

017. New trends in bedside blood glucose monitoring

J.D.E. van SUIJLEN¹, R.C. EIJKMAN-ROTTEVEEL, G.N. de GROOT, J.P.M.M. JASPERS, J. van PELT, E.H. SLAATS, J.C.J.M. SWAANENBURG and H. van der VUURST

Department of Clinical Chemistry, Lievensberg Hospital¹, Bergen op Zoom, the Netherlands.

The shift towards patient-focused care marks a significant development in the healthcare environment. One of the major effects of this shift on the laboratory is the implementation of point-of-care testing. One of the most important challenges in point-of-care testing is to provide rapid and accurate blood glucose results, both at the point-of-care and in the patients medical record.

The Precision PCx point-of-care system is a portable glucose analyzer which represents a significant advance in near patient glucose testing because the PCx is engineered to provide quick and accurate results, while offering a wide range of data management and security options. The PCx just requires 3.5 microliters of whole blood and provides the results within 20 seconds. The test is based on biosensor technology, using glucose oxidase, ferrocene (as a mediator) and electrochemical detection. The test strip contains three electrodes, including a background compensation electrode that measures and compensates for potentially interfering substances.

The Precision PCx monitor also features a data port and a docking station, which can be used for automatically downloading of the results, via the Precision NET, to the Laboratory Information System (LIS) or the Hospital Information System (HIS). The precision NET interface software and QC management software are running on a central PC, preferably located in the laboratory. Because there is a bi-directional interface between the analysers and the central PC, the instruments (if in the docking stations) are automatically updated when any new information from the central data station in the laboratory is available. Manual data entry is eliminated because operator ID, patient ID and test strip lot are entered using a built-in barcode scanner and no operator intervention is necessary to transfer test results to the central data station and or LIS / HIS.

Security options are available for requiring operator ID and patient ID. In addition, operators may be limited to a list of certified operators and test strips may be limited to laboratory approved lots only. The frequency of QC testing can also be defined, in order to meet the requirements of the institution. Using the management software, reports can be generated to document the meter performance, manage operator certification, track test strip usage and performance, as well as recording patient and QC results. The system also provides electronic documentation of data review, acceptance and corrective action.

After a short validation of the system and training of the users, the PCx analyzers, in one hospital including the Precision NET, were introduced for point-of-care testing. The main target was to provide more service by reduction of the turn-around time (TAT) for glucose measurements, especially the TAT for glucose day curve measurements.

Up to the present, the system is only used by certified lab technicians. They were all able to operate the system according to the operating procedures within 1 hour training. All were stating that the system was easy to operate and user friendly. Especially the step by step menu driven user interface, the barcode data entry and the speed of measurement were appreciated. Until now thousands of patient results have been produced using the PCx and the Precision NET system. There have been no serious problems of any kind while the TAT for glucose measurements is significantly reduced, without offering quality of results.

In conclusion, the PCx system with the Precision NET software enables the hospital to provide point-of-care testing results, appropriately validated to all caregivers in a timely manner and integrated into the patient's medical record.

018. Multicenter evaluation of the PCx-glucose analyzer for point of care testing

J.C.J.M. SWAANENBURG, J.D.E. van SUIJLEN, J. van PELT, J.P.M.M. JASPERS, G.N. de GROOT, E.H. SLAATS, H. van der VUURST and R.C. EIJKMAN-ROTTEVEEL

Correspondence: University Hospital Groningen, Hanzeplein 1, 9713 GZ Groningen, The Netherlands

Introduction: Point of care testing (POCT) of glucose is favorable over central laboratory testing because of shorter turn-around-times and the requirement of less quantity of blood. However, the analytical performance must be similar to that of the central laboratory equipment. In this multicenter study the analytical performance of the PCx-glucose testing device in relation to several central laboratory glucose test methodologies (CGM) is investigated.

Patients and methods: Whole-blood glucose measurements were performed at the same time in blood with a PCx device

and the following CGM's: APEC, Synchron CX4, Vitros 250, ABL715, Rapidlab850, Cobas Fara, and Cobas Mira S. Moreover, a correlation was performed with blood samples with a hematocrit value lower than 0.25, higher than 0.50 (neonatal blood samples) and the imprecision was tested measuring two patient samples ten times each.

Results: The imprecision and the correlations between the PCx and the centralized glucose test methodologies are shown in table 1 (PCx = slope * CGM + intercept).

Table 1. Imprecision of the PCx and correlation with other glucose test methodologies

Location low Ht high Ht	imprecision PCx		CGM	slope	intercept	corr coeff
AZG	3.3%	2.9%	APEC	0.91	0.44	0.980
Lievensberg Z'huis	3.4%	4.4%	SynchronCX4	0.93	0.36	0.986
UMCU loc. WKZ	6.4%	7.4%	Vitros 250	0.93	0.15	0.932
Z'huis Nrd Limburg	2.8%	3.5%	ABL715	1.02	0.05	0.979
OLvG Amsterdam	3.4%	3.2%	Rapidlab850	0.94	0.28	0.988
Spitaal Zutphen	2.8%	2.2%	Cobas Fara	0.92	0.56	0.983
Streekz'huis H'berg	5.2%	2.9%	Cobas MiraS	1.04	0.51	0.965

The correlation for blood samples with a hematocrit value lower than 0.25 showed higher glucose values for the PCx, whereas blood samples with hematocrit values higher than 0.50 showed lower glucose values.

Conclusion: We conclude that the PCx analyzer is a reliable POCT device for glucose measurement in routine patient care.

However, the results are lower for concentrations above 17 mmol/l and in blood samples with a hematocrit value lower than 0.25 the results of the PCx showed to be higher than measured with CGM, whereas, in contrast, blood samples with a hematocrit value higher than 0.50 showed lower PCx glucose values.

Tumordiagnostiek/Maligniteiten

019. Cytotoxicity of cyclopentenyl cytosine (CPEC) towards neuroblastoma cell line cells

J. BIERAU, A.H. van GENNIP and A.B. P. van KUILENBURG

Academic Medical Center, University of Amsterdam, Emma Children's Hospital and Department of Clinical Chemistry, PO Box 22700, 1100 DE Amsterdam, The Netherlands

The activity of the enzyme CTP synthetase (EC 6.3.4.2; UTP:L-glutamine amido ligase), which catalyses the synthesis of CTP from UTP and glutamine, has been shown to be increased in malignant cells. The gene coding for CTP synthetase is located on chromosome 1p34. Neuroblastoma often show loss of heterozygosity in the 1p region. Therefore, CTP synthetase might be a suitable target for chemotherapy.

Objectives: To study the metabolism and cytotoxicity of CPEC, an inhibitor of CTP synthetase, in neuroblastoma cell line cells. The cytotoxicity of CPEC towards neuroblastoma cell line cells bearing a 1p deletion (SK-N-BE(2)c) will be compared to the cytotoxicity of CPEC towards neuroblastoma cell line cells without a 1p deletion (SK-N-SH).

Methods: Intracellular nucleotide levels were essentially determined as described in Clin Chim Acta (1985) 148, 185-96. SK-N-BE(2)c and SK-N-SH neuroblastoma cell line cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagles Medium, supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 I.U./ml penicillin,

50 µg/ml streptomycin, 0.2 mg/ml gentamycin, 0.25 µg/ml fungizone and 10% bovine fetal serum.

Results: The concentrations of CPEC in the culture medium which inhibited cell growth of the SK-N-BE(2)c cell line by 50% (IC50 value) were 750, 100, 20 nM after a 24, 48 and 72 hour period of incubation, respectively. After a 48 hour incubation period the IC50 value of CPEC towards SK-N-SH was 200 nM. In SK-N-BE(2)c, the pool of endogenous CTP was rapidly depleted to 50% in 8 hours when the cells were incubated with 100 nM CPEC.

The depletion was 90% after 48 hours of incubation.

Conclusion: CPEC proved to be very cytotoxic towards neuroblastoma cell line cells. The intracellular CTP pool was rapidly depleted when SK-N-BE(2)c cell line cells were incubated with CPEC. The concentrations that inhibited cell proliferation in vitro by 50 percent was very much lower than the concentration used in a phase I clinical trial.

020. Partial dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: an example of an important pharmacogenetic syndrome

A.H. van GENNIP, P. VREKEN, H. van LENTHE, J. HAASJES and A.B.P. van KUILENBURG

Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands.

Genetic enzyme defects are not only biological curiosities but can have serious clinical consequences in more frequently occurring situations such as medication or environmental challenge. Inherited (partial) dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency is presented as an example. In children, the deficiency of DPD is often accompanied by a neurological disorder but a considerable variation in the clinical presentation among these patients has been reported. DPD is also responsible for the breakdown of the thymine analogue 5-fluorouracil (5FU), thereby limiting the efficacy of the therapy. In addition, a partial DPD deficiency is increasingly recognized as an important pharmacogenetic syndrome. To evaluate the importance of this specific type of inborn error of pyrimidine metabolism in the aetiology of 5FU toxicity we have determined the DPD activity in peripheral blood mononuclear cells

(PBM cells) of 35 cancer patients suffering from severe grade 3 and 4 toxicity after the administration of 5FU. In approximately 50% of the patients a decreased activity of DPD was detected in the PBM cells which was comparable to that observed in obligate heterozygotes. Analysis of the gene encoding DPD for the presence of mutations already identified a number of patients who were heterozygous for the common splice site mutation IVS14(G+1)>A. Thus, our results clearly show that a partial DPD deficiency can cause severe and even lethal toxicity in case these patients are treated with 5FU. Since the occurrence of partial DPD deficiency is apparently less rare than initially assumed it is very important to screen tumor patients for the presence of this particular type of inborn error of pyrimidine metabolism prior to the treatment with 5FU.

021. Clinical use of the IMMULITE® free PSA ratio for the detection of Prostate cancer in a routine hospital setting

F.A.L. van der HORST¹, B.F.L. OUDE GROTEBEVELSBORG², M. de JONGH and N.P.H van ADRICHEM²,
Dept. of Clinical Chemistry¹, Dept. of Urology², Eemland Hospital, Amersfoort, The Netherlands

Objectives: The ratio free/total PSA (fPSAr) has been reported to enhance the utility of PSA in discriminating between prostate cancer (CaP) and benign prostatic diseases (BPH, prostatitis). Here results are reported on the use of the IMMULITE® fPSAr in a routine clinical and laboratory setting.

Methods: Men referred to the Dept. of Urology with prostate related complaints and a total PSA between 2 and 10 ng/mL were included from 1995 to 1998. Serum total PSA and free PSA (IMMULITE®, DPC, Los Angeles, CA, USA) were determined within 8 hours after the blood sample was drawn and digital rectal examination (DRE) and Transrectal ultrasound (TRUS) examination were performed. The type of disease was histologically proven.

Results: In the interval 2<PSA<10 ng/mL the overall pre-test probability of CaP was 19,4%. With a negative (n = 124) and positive (n = 56) DRE the probability of CaP was 12,1% and 64,3%, respectively.

Table I shows that in the DRE negative group no CaP were found in the range fPSAr >20%, which could lead to a reduc-

tion of biopsies of approximately 40%. There is no additional clinical value of the fPSAr in the DRE positive population with respect to the detection of CaP. There was no clear correlation of tumor grading and staging with the fPSAr.

Conclusion: The fPSAr with a cut off value of approximately 20% could be used to select high-risk patients with DRE negative finding and a total PSA 2<PSA<10 ng/mL without loss of sensitivity but with a reduction of 40% of biopsies.

Table 1. Effect of fPSAr on CaP % in DRE negative patients with 2<PSA<10 ng/ml

fPSAr (%)	N (Benign)	N (CaP)	N (total)	% CaP
Overall	109	15	124	12.1
>20	47	0	47	0
15 - 20	27	1	28	3.6
10 - 15	24	4	28	14.3
5 - 10	11	10	21	47.6

022. Het gebruik van de PSA F/T ratio bij de diagnostiek en behandeling van het prostaatacarcinoom

J. ten KATE¹, M. de GROOT¹, K. DELAERE², F. van GILS³, O. BEKERS³ en M.NAP⁴

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Afdeling Urologie², Klinisch Pathologisch Laboratorium⁴, Atrium Medisch Centrum, Radiotherapeutisch Instituut Limburg³, Heerlen

Twee jaren geleden is er binnen ons instituut begonnen met het meten van vrij en gebonden PSA en wordt naast de totale hoeveelheid PSA de ratio F(ree)/T(otaal) gerapporteerd. Er wordt gebruik gemaakt van de Autodelphia (Wallac), waarbij vrij en totaal PSA in één bepaling worden gemeten. Tot nu toe wordt PSA F/T bepaald bij alle patiënten waarbij een PSA bepaling werd aangevraagd, dus niet alleen in het zogenaamde grijze gebied tussen de 4 en 10 ng/ml.

De PSA uitslagen verzameld in deze periode werden gekoppeld aan een database van het klinisch pathologisch laboratorium, waarvan de uitslag (normaal, hyperplastisch of kanker) als gouden standaard gebruikt werd. Op basis van deze gegevens zijn ROC curven gemaakt. Het blijkt dat totaal PSA waarden in het grijze gebied eenzelfde diagnostische waarde hebben als verwacht op basis van kans. De F/T ratio in hetzelfde gebied heeft wel toegevoegde diagnostische waarde om benigne van maligne prostaat te onderscheiden. Op basis hier-

van kan het aantal mannen die een biopsie moeten ondergaan worden gereduceerd. Verder bleek op basis van een ROC curve dat de F/T ratio voor het hele PSA gebied niet te onderscheiden is van de F/T ratio gebruikt in het grijze gebied. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de F/T ratio voor alle patiënten een geschikte parameter is, ook bij patiënten met PSA waarden boven en onder het zogenaamde grijze gebied.

Voor patiënten die bestraald worden is er behoefte aan een goede marker om de effectiviteit van de bestraling te voorspellen. In een kleine pilot studie werd bij 10 patiënten het verloop van totaal PSA en de F/T ratio bepaald gedurende 7 weken therapie. Verschillende patronen laten zich onderscheiden, nl. voor PSA totaal versus F/T resp. dalen versus stijgen, stijgen versus dalen, gelijkblijvend versus gelijkblijvend. Deze resultaten zullen op basis van een klinische follow-up en uitbreiding van de patiëntengroep verder bestudeerd moeten worden om conclusies mogelijk te maken.

023. Telomerase activiteit en hTERT expressie in urine en blaaswassing van patiënten met recidiverende blaastumoren

J. de KOK¹, M. van BALKEN², R. ROELOFS¹, Y. van AARSSSEN³, D. SWINKELS¹ en J. KLEIN GUNNEWIEK³

Afd. Klinische Chemie¹, Academisch Ziekenhuis Nijmegen, afd. Urologie² en Klinische Chemie³ Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis Nijmegen.

De meeste blaastumoren zijn oppervlakkig bij klinische presentatie (80%) en 85% van deze oppervlakkige tumoren keren na behandeling terug. Van de recidiverende tumoren vertoont 10-25% progressie gedurende het verloop van de ziekte. Middels cystoscopie (gouden standaard) worden blaastumorpatiënten veelvuldig gecontroleerd. Als aanvulling op de cystoscopie wordt cytologie uitgevoerd om tumoren die moeilijk detecteerbaar zijn (m.n. CIS) te kunnen traceren. Aangezien cystoscopie belastend is voor de patiënt en de cytologie een lage sensitiviteit kent wordt gezocht naar nieuwe markers. Een potentiële marker is het enzym telomerase, dat in staat is de chromosoomindes te verlengen waardoor cellen oneindig

kunnen blijven delen. Telomerase komt met name voor in tumorcellen en wordt daarom gezien als diagnostische marker voor tumoren. Aanwezigheid van telomerase kan op twee manieren worden aangetoond: 1) bepalen van de enzymactiviteit in de TRAP assay en 2) bepalen van de expressie van het mRNA van de katalytische sub-unit van het telomerase (human telomerase reverse transcriptase: hTERT) in een kwantitatieve RT-PCR.

Blaaswassing en urines zijn verzameld van 23 patiënten met recidiverende tumoren en 14 controles. De aldus verkregen urothelcellen zijn geselecteerd en getest in TRAP assay en RT-PCR.

De sensitiviteit voor tumoren in blaaswassingen en urines bedroeg 55% en 31% voor RT-PCR en 60% en 28% voor de TRAP assay. Deze assays vormen daarom geen vervanging van de cystoscopie bij het diagnosticeren van (recidiverende) blaastumoren. Echter, de hTERT mRNA expressie bleek hoger te zijn naarmate de tumor hoger gestadieerd en/of gegradeerd was. Bovendien is in pilotexperimenten aangetoond dat de

mate van hTERT mRNA expressie mogelijk gecorreleerd is aan tumorprogressie. Deze resultaten geven aan dat de expressie van hTERT mRNA niet alleen een diagnostische marker is, zoals verondersteld, maar bovendien een prognostische marker kan zijn voor het ziekteverloop van blaastumoren. Verder onderzoek moet uitwijzen wat de prognostische waarde van het hTERT mRNA is.

024. Isolatie en kwantificering van humaan DNA in faeces ten behoeve van moleculair biologische screening op dikke darm kanker

R.H.N. van SCHAIK¹, M. SMID², J.B. de KOK³, D.W. SWINKELS³, J. LINDEMANS¹, L.H.J. LOOIJENGA², E.J.J.M. BERNS⁴, J.W. OOSTERHUIS² en L.C.J. DORSSERS²

Afd. Klinische Chemie¹, Afd. Pathologie², Afd. Medische Oncologie⁴, Academisch Ziekenhuis Rotterdam, Afd. Klinische Chemie³, Academisch Ziekenhuis Nijmegen.

Dikke darm kanker neemt de derde plaats in bij de prevalentie van kanker in de Westerse wereld. Verbetering van screeningsmethoden kan leiden tot effectievere vroegdiagnostiek en daarmee een vermindering van sterfte. Het gebruik van de occultbloed test in faeces hiervoor is eenvoudig en goedkoop, maar heeft een beperkte sensitiviteit en geeft een relatief hoog percentage fout-positieve uitslagen.

De ontwikkeling van dikke darm kanker gaat gepaard met accumulatie van genetische mutaties in de neoplastische cellen. Hierbij vindt inactivatie plaats van tumorsuppressor genen (o.a. APC, p53) en activatie van proliferatie bevorderende genen (o.a. k-RAS). Het detecteren van gemuteerd DNA in faeces kan dus in principe worden gebruikt voor de vroege opsporing van dikke darm kanker. Belangrijke vragen die moeten worden beantwoord alvorens dergelijke moleculaire diagnostiek succesvol kan worden toegepast, zijn: hoeveel humaan DNA kan uit faeces worden geïsoleerd (een bepaalde minimum hoeveelheid DNA moet worden geanalyseerd wil een negatieve uitslag enige waarde hebben), wat is de stabiliteit van dit DNA en is dit DNA geschikt voor analyse met behulp van de polymerase ketting reactie of verwante technieken?

In faeces breekt toegevoegd DNA binnen 10 minuten volledig af, terwijl DNA in toegevoegde bloedcellen gedurende enkele uren bij kamertemperatuur intact blijft. Deze waarneming geeft aan dat de nodige voorzichtigheid moet worden betracht

bij het ontdooien van ingevroren faecesmonsters. Een geoptimaliseerd isolatieprotocol werd toegepast op 29 gram faecesmonsters (0,2) van patiënten met dikke darm kanker (verkregen voor operatie) en 76 gram faecesmonsters (0,2) afkomstig van 47 gezonde vrijwilligers. De hoeveelheid geïsoleerd humaan DNA werd bepaald door middel van hybridisatie met een humaan specifieke chromosoom 12 probe, en gecorrigeerd voor verlies tijdens de isolatie aan de hand van de recovery van een toegevoegde spike. De hoeveelheden humaan DNA varieerden van niet detecteerbaar tot 4,5 mg per gram faeces. In 24 kwantificeerbare monsters van patiënten bleek de mediane hoeveelheid humaan DNA significant hoger te liggen dan bij 40 kwantificeerbare monsters van gezonde vrijwilligers (6,9 µg/gram faeces en 2,5 µg/gram faeces, respectievelijk; p=0,04). Amplificatie van k-RAS exon 1 middels 30 cycli PCR kon worden verkregen in 20% van de monsters afkomstig van gezonde vrijwilligers en in 45% van de monsters afkomstig van patiënten, en leek voornamelijk afhankelijk te zijn van de hoeveelheid humaan DNA.

Conclusie: Deze studie toont aan dat faeces in principe gebruikt kan worden voor de isolatie van humaan DNA ten behoeve van moleculair biologische diagnostiek, waaronder screening op dikke darm kanker. Verdere optimalisatie moet leiden tot succesvolle toepassing op elk faecesmonster.

025. hGDF3: een nieuwe potentiële marker voor detectie van testiculaire kiemceltumoren

R.H.N. van SCHAIK¹, H. STOOP², M. NIARAKI¹, A.A.D CARICASOLE³, F.H. de JONG⁴, O. RITVOS⁵, L.H.J. LOOIJENGA² en J. LINDEMANS¹

Afd. Klinische Chemie¹, Afd. Pathologie², Academisch Ziekenhuis Rotterdam, Hubrecht Laboratorium³ Utrecht, Afd. Endocrinologie & Voortplanting⁴, Erasmus Universiteit Rotterdam en Dept. Immunology & Bacteriology⁵, Helsinki University, Finland.

Testiculaire kiemceltumoren (TGCTs) vormen de meest voorkomende maligniteit bij mannen in de leeftijd van 15-45 jaar. Ze worden histologisch en klinisch onderverdeeld in seminomen en non-seminomen. Embryonaal carcinoma (EC) cellen zijn maligne componenten van non-seminomen, waaruit chorioncarcinomen, dooierzaktumoren en teratomen kunnen ontstaan.

Bij het identificeren van genen die mogelijk betrokken zijn bij de proliferatie van testiculaire kiemceltumoren werd een differentiaal display PCR uitgevoerd op de activine gestimuleerde EC cellijn Ntera-2. De mRNAs van de opgereguleerde genen werden omgezet in cDNA, gekloneerd en gesequenced. Een van deze cDNA-produkten werd op basis van vergelijking met nucleotide-sequenties van de muis geïdentificeerd als het humane homoloog van Groei/Differentiatiefactor 3 (hGDF3), een lid van de Transforming Growth Factor β superfamilie. Tot op heden is de biologische activiteit van dit eiwit nog onbekend. De stimulatie van transcriptie door activine in Ntera 2 cellen werd bevestigd door middel van RNase protectie assays. De chromosomale localisatie werd bepaald op 12p13.1; 12p is een

stuk chromosoom dat in 80% van de testiculaire kiemceltumoren is oververtegenwoordigd. RNase protectie assays toonden aan dat hGDF3 specifiek tot expressie komt in EC cel bevattende tumoren, wat werd bevestigd door middel van in situ hybridisaties op TGCT paraffine coupes en door RNase protecties op tien EC-cellijnen. Tegen twee synthetische peptiden uit de hGDF3 sequentie werden in vier konijnen polyklonale antisera opgewekt. Door middel van ELISAs kon worden aangetoond dat de verkregen antisera specifiek reageerden met de peptiden waartegen ze waren opgewekt. Immunohistochemie op vriescoupes van TGCTs gaf specifieke kleuring van de EC cellen bij drie van de vier antisera.

Conclusie: wij hebben een nieuwe potentiële tumormarker gekloneerd voor TGCTs. Drie antisera die werden ontwikkeld tegen dit hGDF3 kunnen worden gebruikt bij het immunohistochemisch aantonen van EC cellen. De mogelijkheden om deze antisera te gebruiken in ELISAs voor het bepalen van hGDF3 in sera van patiënten ten behoeve van de opsporing van non-seminomen wordt verder onderzocht.

026. Bepaling van het aantal kopieën van het c-Myc gen via PCR en capillair elektroforese

J.E. de VRIES, P.A.H.M. WIJNEN, M.P. van DIEIJEN-VISSER en O. BEKERS.

Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch ziekenhuis Maastricht

Hét kenmerk van tumoren is de aanwezigheid van genetische afwijkingen. Amplificatie van het c-Myc gen is hier een voorbeeld van en wordt verondersteld een belangrijke factor te zijn in het ontstaan van een tumor. In klein-cellig long carcinoom is het vaststellen van het aantal kopieën van het c-Myc gen ook diagnostisch relevant, want een verhoogd aantal kopieën van het c-Myc gen heeft een slechte prognose.

Recent is een PCR-methodiek beschreven om het aantal kopieën van het c-Myc gen te bepalen. Hierin worden c-Myc, mangaan superoxide dismutase (SOD2), en β -globine (HBB) geamplificeerd in één PCR. De PCR-produkt ratio c-Myc: (SOD2/HBB) hangt af van het aantal kopieën van het c-Myc gen. Meer kopieën van het c-Myc gen verhogen de opbrengst en daarmee de ratio. Het aantal kopieën van het c-Myc gen is dan te berekenen.

Deze studie test of de methode gebruikt kan worden binnen een setting, bestaande uit een PTC-200 (MJ Research) voor de PCR, en de P/ACE 5500 (Beckman) voor capillair elektroforese (CE) ter kwantificering van de PCR-produkten.

De ratio bij gezonde personen is 1,34 (n = 4; range = 1,30 - 1,38; variatie coëfficiënt (VC) = 3,9%; 25 cycli). De inter-assay variatie heeft een VC van 2,5% (n = 6). De positieve controle is de pro-myeloïde leukemische cellijn HL60. De ratio in HL60 is 4,82 (n = 5; range = 4,63 - 5,11; VC = 4,3%; 25 cycli). Dit betekent dat HL60 $4,82/1,34 = 3,6$ kopieën bevat van het c-Myc gen, wat in overeenstemming is met de litera-

tuur. Een 16-voudige verdunning van HL60 genomisch DNA met normaal DNA heeft een licht verhoogde ratio van 1,50 (25 cycli). Dus een 4-voudige toename moet meetbaar zijn als het percentage tumorcellen ongeveer 10% is.

Het aantal berekende kopieën in HL60 hangt af van het aantal cycli. Bij 20 cycli is de ratio bij gezonde personen 1,20 (VC = 4,6%) en bij HL60 11,5. Bij 30 cycli is de ratio bij gezonde personen 1,51 (VC = 3,0%) en bij HL60 2,82. Dit zou betekenen dat HL60 9,6 kopieën bevat bij 20 cycli en 1,9 bij 30 cycli. Het is echter waarschijnlijker dat een verschil in kinetiek tussen drie verschillende PCR's in één cupje de verklaring is voor de afhankelijkheid van het aantal kopieën van het c-Myc gen met het aantal cycli.

Resumerend, met deze methode kan in de beschreven setting een verhoging van het aantal kopieën van het c-Myc gen worden aangetoond, waarbij het berekende aantal kopieën gerelateerd is aan het aantal PCR cycli.

Methodes: De condities P/ACE 5500 systeem (Beckman) met laserfluorescentie (488 nm/520 nm); 4 min voorspoelen met gelbuffer (1,5 ml 4% polyacrylamide Gel Buffer + 4,5 μ l LI-Fluor™ dsDNA 1000 Enhance) onder hoge druk vervolgens 0,2 min met TBE buffer (89 mM Trisboraat, 0,2 mM EDTA, pH 8,3) onder lage druk; electrokinetische injectie: 10 sec, 10 kV (1 μ l monster + 300 μ l milliQ); scheiding: 8 min, 10,0 kV; na run 0,5 min spoelen met HCl en vervolgens 0,5 min met milliQ. eCAP™ dsDNA 1000.

027. Vier kleuren flow cytometrie voor detectie van apoptose in lymfocyt subsets ex vivo

R.M. WEGHORST¹, H.J. HASPER², D.J. RICHEL², J.H. MEERWALDT³, F.M.F.G. OLTHUIS¹ en C.E.I. SCHENKEVELD¹
Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Afdeling Interne Geneeskunde² en Afdeling Radiotherapie³, Medisch Spectrum Twente, Enschede

Achtergrond: Humane lymfocyten die na isolatie in kweek worden gehouden gaan te gronde door apoptose.

Detectie van apoptose kan eenvoudig, sensitief en specifiek door middels flowcytometrie en met behulp van gelabeld Annexine V verlies van plasmamembraan asymmetrie aan te tonen. Dit klopt voor lymfocyttaire cellijnen wanneer Annexine V-Fluoresceïne isothiocyanaat (FITC) wordt gecombineerd met Propidiumiodide (PI). Deze meting wordt in geïsoleerde humane lymfocyten echter gestoord door aanwezigheid van een variabel percentage erythrocyten in de geïsoleerde lymfocyttaire cel populatie. Om dit probleem op te lossen hebben we een nieuwe vier kleuren flow cytometrische test ontworpen en gevalideerd om apoptose te detecteren in lymfocyt subsets van geïsoleerde gekweekte perifere bloed cellen.

Methodes: Lymfocyten worden geïsoleerd uit perifere bloed door centrifugeren in een dichtheidsgradiënt. Kernhoudende cellen worden geselecteerd met CD45-phycoerythrine (PE).

De gewenste lymfocyt subset wordt geselecteerd met een energy coupled dye (ECD) gelabeld monoclonaal (CD4, CD8 of CD19). Vervolgens vindt detectie van apoptose plaats met Annexine V-FITC en wordt onderscheid tussen vroege en late apoptose gemaakt met 7-amino-actinomycine-D (7-AAD).

Resultaten: We hebben een nieuwe techniek ontwikkeld om apoptose te detecteren in subsets van geïsoleerde perifere humane lymfocyten. De reproduceerbaarheid van deze test is goed met een variatiecoëfficiënt van rond 15%. CD19 positieve lymfocyten blijken het meest gevoelig te zijn voor apoptose. CD4 positieve lymfocyten zijn het minst gevoelig voor apoptose.

Conclusie: We hebben nu een gevalideerde test om apoptose te bestuderen in subsets van geïsoleerde humane lymfocyten om zo meer inzicht te kunnen krijgen in de pathogenese van lymfocyttaire maligniteiten en de werkingsmechanismen van verschillende therapieën.

Hematologie/Allergie

028. Optimization of folate, vitamin B12 and vitamin B6 supplements in pediatric patients with sickle cell disease

F.P.L. van der DIJS¹, M.R. FOKKEMA², D.A.J. BROUWER², B. NIESSINK^{1,2}, T.I.C. van der WAL^{1,2}, J.J. SCHNOG³, A.J. DUITZ³, F.D. MUSKIET³ and F.A.J. MUSKIET²
Public Health Laboratory (Curaçao)¹, Pathology and Laboratory Medicine², Groningen University Hospital (The Netherlands) and St. Elisabeth Hospital (Curaçao)³

We determined optimal folate, vitamin B12 and vitamin B6 dosages in 21 pediatric sickle cell disease (SCD) patients (11 HbSS, 10 HbSC), using homocysteine (Hcy) as functional marker. They received daily 400 μ g (0-3 weeks), 700 μ g (3-6 weeks) and 1000 μ g (6-70 weeks) folate; 1 (0-21 weeks), 3

(21-45 weeks) and 5 Recommended Dietary Allowance (45-70 weeks) vitamin B12; and 1 RDA vitamin B6 (0-70 weeks). Blood was taken at 0, 3, 6, 9, 21, 33, 45, 57 and 70 weeks for measurement of erythrocyte (RBC) and serum folate, plasma vitamin B12, whole blood vitamin B6 and plasma Hcy. Vit-

amin B6 increased from 0-3 and 3-6 weeks; vitamin B12 from 21-70 weeks; serum folate from 0-3 and 3-6 weeks; RBC folate from 0-3, 3-6 and 6-9 weeks. Hcy decreased from 3-6 and 21-45 weeks. Most pronounced Hcy decreases occurred from 0-3 (43% of patients), 3-6 (14%) and 21-33 (24%) weeks. Patients with HbSS had higher RBC folate than HbSC at 3, 6 and 70 weeks. The entire group exhibited inverse relations between RBC folate and hemoglobin at 3, 6, 9, 45, 57

and 70 weeks. We conclude that RBC folate is less valuable for folate status assessment in SCD patients. Optimal daily supplements are 700 µg folate (3.5-7 RDA), 3 RDA vitamin B12 (4.2-6.0 µg) and 1 RDA vitamin B6 (1.4-2.0 mg). This combination causes Hcy levels that do not decrease further upon higher dosages and may reduce by simple and relatively inexpensive means their inherently high risk of endothelial damage.

029. Referentiewaarden voor hemoglobine en ferritine in premenopausale vrouwen

W.E. ELION-GERRITZEN

Lange Kerckdam 58, 2242BX Wassenaar

In de literatuur ontbreekt de bewijsvoering dat het gehele verschil in Hb tussen mannen en vrouwen een hormonale basis heeft. IJzertekort speelt een rol in dit verschil. Vrouwen hebben gemiddeld niet alleen een lager ferritine- en ijzergehalte en een lagere transferrinesaturatie, maar ook een hoger erythrocytenprotoporphyrinegehalte, wijzend op een deficiënte ijzerinbouw. Vigerende referentiewaarden voor vrouwen zijn bepaald in populaties waarin 30% of meer ijzerdeficiënte vrouwen voorkomen. Premenopausale vrouwen zullen gebaat zijn bij een optimalisering van Hb gehalte en ijzervoorraad om de volgende redenen:

- Een meerderheid van vrouwen is wat ijzervoorraad betreft onvoldoende toegerust voor zwangerschap.
- IJzersubstitutie bij - overigens gezonde -premenopausale

vrouwen, mits in voldoende dosering en voldoende lang gegeven, resulteert in Hb waarden >8,0 mmol/l.

- De fysieke conditie t.b.v. arbeid en vrijwillige activiteit is recht evenredig met het Hb gehalte tot in het huidige normale gebied. Er zijn aanwijzingen dat voor dit effect zowel een stijging van het Hb als een aanvulling van de ijzervoorraad nodig is.

De referentiewaarden voor Hb zijn aldus, evenmin als die voor ferritine, optimale waarden.

Referentiewaarden voor Hb en ferritine moeten bepaald worden conform de aanbevelingen van de WHO, dat wil zeggen na opheffen van eventuele voedingsdeficiënties.

030. Mutation in the integral membrane protein band 3 in Southeast Asian Ovalocytosis in a patient with preretinal neovascularization

P.F.H. FRANCK¹, A.A. van de LOOSDRECHT², J.W. SMIT², V.W. RENARDEL de LAVALETTE³, S.M.G.J. DAENEN², C.L. HARTEVELD⁴ and F. KUYPERS⁵

Department of Clinical Chemistry¹, Leyenburg Hospital, The Hague, The Netherlands; Department of Hematology² and Ophthalmology³, University Hospital Groningen, Groningen, The Netherlands; Department of Genetics⁴, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; Children's Hospital Research Institute⁵, Oakland, California, United States of America

A 31 year old Indonesian patient presented with extensive bilateral peripheral preretinal neovascularization. Laboratory investigations revealed a mild compensated hemolysis. A peripheral blood smear showed stomatocytic elliptocytes with one or two transverse ridges characteristic for Southeast Asian Ovalocytosis (SAO). Remarkable for SAO is the increased membrane rigidity, which could be demonstrated in our case by the increased thermal stability of the cells and the resistance to salt-induced echinocytic transformation of their shape. We also observed a markedly decreased osmotic deformability and fragility of the cells as measured by ektacytometry. The underlying molecular defect of this membrane rigidity is defined as a mutation in the integral membrane protein band 3. Ovalocyte ghost membranes treated with trypsin, followed by separation of the protein fragments by SDS-PAGE, indeed showed a different mobility of the digested band 3 peptides as compared to normal RBC membranes. By PCR, a heterozygous mutation of

the band 3 gene could be detected representing two bands of 870 and 843 bp, one being the normal allele and the other containing a deletion of 27 bp. Additional nucleotide sequence analysis of the PCR product confirmed this deletion of nine amino acids of the protein (residues 400 – 408). The increased rigidity due to the mutated band 3 is explained by a conformational change of the protein leading to hindrance and the entanglement in the skeletal network underlying the RBC membrane. This entanglement restricts the membrane skeleton / spectrin to stretch during shear stress, keeping the cell in its rigid shape. We hypothesize that this marked increased rigidity of the ovalocytes might explain retinal vaso-occlusion in SAO. Preretinal neovascularization is a well-known complication of sickle cell disease as a result of arterial and venous autoinfarction caused by occlusion of the bizarre shaped (ir)reversibly sickled cell. To our knowledge this is the first report demonstrating preretinal neovascularization in a patient with SAO.

031. HbK-Ibadan [β-46(CD5) Gly→Glu]: A rare mutant observed during HbA_{1C} monitoring

P. van DELFT¹, W.C.H. van HELDEN², R. PLUG¹, H. WAANDERS², C.L. HARTEVELD¹ en P.C. GIORDANO¹
Dept. of Human and Medical Genetics, Hemoglobinopathies Laboratory¹, Leiden University Medical Centre, The Netherlands. Dept. of Internal Medicine and Clinical Chemistry², t'Lange Land Hospital, The Netherlands

Pathologically silent hemoglobin mutants are often accidentally detected. We report a very rare hemoglobin mutant observed in a North-European male of Dutch ancestry during HbA_{1C} monitoring for diabetes mellitus. The anomalous fraction, estimated at 37.4% had a corresponding glycated fraction of 2.6% which was identified as HbF by the automatic HPLC system. Molecular analysis revealed the single nucleotide sub-

stitution (G →A) at codon 46 of the beta chain, a mutant known as HbK-Ibadan changing the normal Gly to an anomalous Glu residue. This mutant has been previously described in an African Black child, in a South-Italian Caucasian infant and in a Swedish diabetic patient of Finnish descent. Although a moderate instability was previously reported, the mutant is considered non-pathological in the heterozygous

individual. In the present case the hematological parameters were normal but the presence of a borderline haptoglobin sustains a mildly increased hemolysis due to moderate instability. A more pronounced hemolysis could be eventually expected in the homozygous state but the chance of homozygosity for this rare mutant is extremely small. Although no pathology associ-

ated with HbK-Ibadan has been reported thus far, it cannot be excluded that this mutant could generate intermediate anemias in combination with other common mutants (i.e. HbS or HbE) or aggravate the status of semi-dominant beta-thalassemia mutations and red cell membrane defects.

032. Basisprotocol voor laboratorium diagnostiek van hemoglobinopathie dragerschap ten behoeve van preventie

P.C. GIORDANO en C.L. HARTEVELD

Afd. Humane en Klinische Genetica/Hemoglobinopathieën Laboratorium, Leids Universitair Medisch Centrum

Vanwege de doorgaans milde -of het ontbreken van- pathologische kenmerken blijven dragers van hemoglobinopathie (HbP) veelal ongediagnosticeerd. Naast informatieverstrekking is dragerschapanalyse het belangrijkste element van elke strategie die t.b.v. HbP preventie wordt toegepast. Wij beschrijven een simpele analytische benadering t.b.v. centrale laboratoria voor de vaststelling van dragerschap van de meest relevante vormen van HbP-major in de Nederlandse populatie. Het basisprotocol bevat slechts enkele stappen, waarbij gebruik gemaakt wordt van basale hematologie en geautomatiseerde HPLC analyse. De vaststelling van een verhoogde HbA₂ en HbF fractie geschiedt op een geautomatiseerde HPLC en is doorgaans voldoende om de diagnose van β -thalassemie dragerschap vast te stellen. De meest voorkomende structurele mutant die geassocieerd zijn met ernstige pathologie (HbS,

C, E en D), worden met dezelfde standaard HPLC run automatisch geïdentificeerd en gekwantificeerd. Bij een persisterend microcytair bloedbeeld, normale ferritineconcentratie en een verlaagde HbA₂ fractie zou mogelijk sprake kunnen zijn van een α -thalassemie. Bij α -thalassemie of bij complexe casussen en/of combinaties van defecten, is vervolgonderzoek meestal noodzakelijk. Dit kan in samenwerking met een aantal gespecialiseerde laboratoria in Nederland plaatsvinden. Tot slot wordt de toevoeging van een informatieve tekst aan de positieve dragerschapuitslagen aanbevolen, om de onderzoeksaanvragers te informeren over het genetisch risico en over de stappen die t.b.v. preventie dienen te worden ondernomen. Bij gediagnosticeerde risicoparen is verwijzing naar een klinisch genetisch centrum geïndiceerd waarbij indien gewenst prenataal diagnostiek kan worden aangeboden.

033. Evaluation of the analytical performance of the Test-1 analyzer for the assessment of the erythrocyte sedimentation rate (ESR)

N. de JONGE, I. SEWKARANSING, J. SLINGER and J.J.M. RIJSDIJK

Dept. Clinical Chemistry, Leyenburg Hospital, P.O. Box 40551, 2504 LN The Hague, The Netherlands

We evaluated the analytical performance of the Test-1 analyzer for the assessment of the erythrocyte sedimentation rate (ESR). The Test-1 is an automated analyzer (Alifax S.p.A., Padova, Italy). Samples of

150 μ l are aspirated, rotated slowly for two minutes and put into the system measuring the erythrocyte concentration in a capillary through a photometer with a wavelength of 950 nm. For each sample a sedimentation curve is obtained, which is transformed to comparable Westergren values. The method is very fast, the first result is obtained in less than 3 minutes and subsequent results are obtained every 30 seconds.

The Test-1 method was compared with both the manual Westergren reference method, and an automated Westergren method (Starrsed, Charles Goffin Medical Systems, Tiel, The Netherlands). Sodium citrate anticoagulated blood samples were used for both Westergren methods, as this is the current practice in our laboratory. For the Test-1, K₂EDTA anticoagulated blood samples were used. 105 patient samples with a Westergren ESR of 2 - 120 mm/hr were used to compare the three methods. Passing and Bablok regression analysis was used for comparison of the three methods. Student's t-test was

used to test for difference between test results obtained by the three different methods. Reproducibility of the Test-1 method was assessed by measuring 20 samples tenfold. The maximum permissible storage time was assessed by measuring the ESR in 10 samples after 0 hour, 1, 2, 3, 4, 5, 24 and 48 hours. The samples were stored at room temperature up till 5 hours, after which they were stored at 4°C.

A good correlation was found between the Test-1 system and the Westergren reference method: coefficient of correlation was 0.97, intercept -0.15 mm/hr, slope 0.83. Compared with the Starrsed method, coefficient of correlation was 0.92, intercept -0.48 mm/hr, slope 0.91. No statistically significant difference was found between ESR-results obtained with the three ESR-methods studied. The bias between TEST-1 and the reference method was 2.7 mm/hr (agreement limits -8 to 33 mm/hr). Concerning reproducibility, mean coefficient of variation was 7.9%. The maximum permissible storage time was 24 hours.

In conclusion, the TEST-1 offers a fast determination of the ESR with acceptable intra-assay variation and good correlation with traditional Westergren methods.

034. Nieuwe methode voor mutatie screening bij patiënten met hereditaire sferocytose

G. de KORT, S. UITTE de WILLIGE, A. SPAANS, C. POSTMA en P. FRANCK

Afdeling Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Leyenburg Ziekenhuis, Den Haag

Hereditaire sferocytose (HS) is een afwijking aan de membraan van de erythrocyt, die morfologisch vaak wordt gekenmerkt door ronde cellen in het bloeduitstrijkje. Deze sferocytten hebben een relatief fragiel membraan, hetgeen kan leiden tot hemolyse. De patiënten hebben meestal een milde anemie met een reticulocyten aantal tussen de 5 en 20%, in combinatie met splenomegalie. Indien er zich een (Parvo)infectie voordoet, treedt er vaak een snelle verslechtering van de anemie

op. De genetische oorzaken van erfelijke sferocytose zijn divers. Er zijn HS-mutaties beschreven in een aantal verschillende membraaneiwitten van de erythrocyt, waaronder Ankyrine, Spectrine en Band-3. Binnen de genen die coderen voor deze eiwitten, liggen de mutaties ook nog eens zeer verspreid. Dit alles maakt het opsporen van de mutaties die HS veroorzaken zeer gecompliceerd. In deze studie is echter een methode ontwikkeld waarmee op elegante wijze de HS-mutaties gede-

tecteerd kunnen worden. Omdat de meeste van de bekende HS mutaties in het Ankyrine-gen gelegen zijn (63%), zijn de hier beschreven methoden op dit gen getest.

Het project bestaat uit twee onderdelen:

- Detectie van mutaties in het regulator gebied van Ankyrine: In de literatuur zijn een aantal HS mutaties in dit gebied beschreven. Na raadpleging van de DNA- databases, bleek de basenvolgorde van dit gedeelte van het Ankyrine-gen echter nog niet beschikbaar te zijn. Allereerst werd dan ook deze sequentie ontrafeld. Met behulp van hiervan kunnen bij HS patiënten eventuele mutaties in het regulator gebied van Ankyrine via een PCR en vervolgens een SSCP worden opgespoord.
- Detectie van mutaties in het eiwit-coderende domein van het Ankyrine-gen: Bestudering van dit domein, ter grootte van ongeveer 17.000 nucleotiden, en hierin de beschreven HS mutaties leerde ons dat het met de conventionele methoden onmogelijk zou zijn om nieuwe mutaties op te sporen. Verder viel het ons op dat de meeste mutaties ($\pm 75\%$) een stop-codon genereerden. In een aantal gevallen ontstond deze stop di-

rect door de mutatie en in andere gevallen iets downstream van de mutatie door een frameshift.

Door deze stop-codons ontstond het idee om de mutatie-screening uit te voeren op eiwit niveau. Hiervoor werd eerst mRNA geïsoleerd. Vervolgens werd dit gebruikt om overlappende cDNA fragmenten gesynthetiseren, met behulp van het enzym reversed transcriptase. Deze stukken cDNA werden geamplificeerd in een PCR, waarvan het product gebruikt werd om in een kunstmatig systeem (de PTT) eiwit te maken. Indien nu ergens in het Ankyrine-gen een stop-codon ontstaat door een mutatie, dan zal één van de fragmenten in de PTT een verkort eiwit-product te zien geven. De grootte van het ingekorte eiwit geeft een aanwijzing voor de plaats waar de mutatie in het gen zich ongeveer bevindt. Nadere mutatie analyse vindt dan plaats door DNA-sequencing.

Conclusie: Door ontwikkeling van de hier beschreven methoden hebben wij niet alleen een krachtig instrument in handen voor mutatie-screening in het Ankyrine-gen, maar ook de screening van complexe mutatiepatronen in andere omvangrijk genen.

035: The WADiana: a Fully Automatic Analyser of Blood Transfusion Tests in Routine Settings

P.H.M. KUIJPER, A.M.A. OUDE LUTTIKHUIS - SPANJER and G. van der SLUIJS VEER
Medical Spectrum Twente, Hospital Group, Enschede, The Netherlands

Introduction / methods: The WADiana compact (Diamed), which performs blood transfusion tests using the GEL column technology, was evaluated. It consists of a PC, incubator, centrifuge, automatic injector/card-handler, sample/reagent holders and CCD cameras. Analytical performance was compared with the manually performed tube technique for ABO antigen phenotyping and the PolyEthylene Glycol Indirect Antiglobulin Test (PEG-IAGT). Laboratory efficiency parameters were also evaluated.

Results: 1. Analytical results ABO antigen phenotyping and antibody-screening test showed comparable results in venous blood (n=50), neonatal blood (n=30) and umbilical vein blood (n=20). RhesusD phenotyping showed higher sensitivity. In the Direct Antiglobulin Test 1 'false positive' and 1 'false negative' reaction out of 40 samples were detected. positive

samples were examined using the test. As shown by others, the antibody identification test (n=113) showed comparable sensitivity for most antibodies, but was less sensitive for some clinically irrelevant antibodies and Jk(a), C, E.

2. Laboratory parameters Hands-on time decreased greatly for all tests, especially with batches larger than 4 samples. The test throughput time increases for most tests, especially for small batches. No STAT utility or bi-directional coupling to the Laboratory Information System is available.

Conclusions: In conclusion, in a clinical routine setting the studied analyser can help improve laboratory efficiency. Because of the increased test throughput times it is not suitable for STAT-samples. The analytical performance of the automatically performed GEL column tests is essentially similar to the manually performed tube technique.

036. Diagnostiek van hemoglobinopathie in Leyenburg

H.L. HAAK, E. RASP, A.X. de JONG, J.S.M. v.d. LINDEN en W. VEENENDAAL,
Afdeling Hematologie, ziekenhuis Leyenburg, Den Haag

Achtergrond: In Den Haag e.o. wonen naar schatting 10.000 dragers van een vorm van hemoglobinopathie (Hbp). Hieronder worden verstaan:

α - thalassemies, waarbij de synthese van één van de globine ketens verminderd is en

β - structurele varianten, waarvan het HbS (sikkelhemoglobine) het bekendst is.

Over de gehele wereld zijn er honderden verschillende mutaties en deleties bekend, die leiden tot een Hbp. Men schat dat ca 5% van de gehele wereldbevolking drager van een dergelijke eigenschap is. In Nederland is een zeer grote variatie aan Hbp's beschreven. Eenvoudige standaard diagnostiek zal dus niet voldoende zijn. Wij hebben geïnventariseerd welk type Hbp voorkomt bij de onderzoeken van de laatste 3 jaar.

Patiënten en methoden: Sinds medio 1996 wordt de volgende diagnostiek toegepast bij de aanvraag

"Hb diagnostiek": bloedceltelling, bepaling ZPP, ferritine, HPLC-analyse. Hiermee zijn structurele varianten en β -thalassemie goed vast te stellen. Sinds medio 1999 wordt DNA diagnostiek verricht voor bepaalde vormen van α -thalassemie. Hierbij beperken we ons tot PCR op 4 bekende en in

Nederland frequent voorkomende deleties (zie tabel 1). Wij hebben 200 achtereenvolgende monsters hierop onderzocht. Bij bijzondere gevallen wordt materiaal verder onderzocht op het Hb-pathie laboratorium in het LUMC. Het laboratorium onderzoekt ook monsters ingestuurd vanuit het Juliana Kinder Ziekenhuis. Voor dit onderzoek hebben wij de hematologische parameters (fenotype) gecorreleerd met het genotype. Bij de α -thalassemies vonden wij bij 31 patiënten een deletie 3,7; de deleties 4,2, SEA en MED werden ieder in 1 patiënt aangetroffen.

Uitgaande van deze gegevens werden positief en negatief voorspellende waarden berekend van MCV, RDW, ZPP, HbA2 voor α - en β -thalassemie.

Conclusies:

Bij de onderzochte monsters wordt bij ca 40% een hemoglobinopathie gevonden. Bij het beoordelen van de prognose is het van belang de interactie tussen een defect van de β -ketens en dat van de α -ketens in acht te nemen.

Er wordt gemiddeld 1 kind per jaar met sikkelcelziekte geboren, de overige patiënten met sikkelziekte (HbSS,SC en S- β 0) zijn als volwassene naar Nederland gekomen.

Gebruikelijke parameters als MCV en RDW hebben een lage positieve voorspellende waarde bij het onderzoek naar thalassemie. Men moet er dus altijd specifiek naar vragen.

Een negatieve PCR betekent niet dat er geen α -thalassemie (van andere origine) kan bestaan.

Tabel 1. Resultaten hemoglobinopathieën in Leyenburg

Onderzocht	HbAS	HbAC	HbSC	HbSS	HbCC	HbAE	Totaal (%)	
Totaal: 824	37	16	3	11*	1	5	73 (10)	* 3 neonaten
β -thal							103 (12)	Allen heterozygoot
DNA: 198								
α -thal	4	2				1	34 (17)	In 7 patienten combinaties

037. The ABL700 analyser as an alternative for the WBC interfered hemoglobin measurement on a Coulter STKS analyser

J. SWAANENBURG, J. SMIT, J. PALSMA and H. BRUNSTING.

University Hospital Groningen, Hanzplein 1, 9713 GZ Groningen, The Netherlands

Introduction: White Blood Cell (WBC) levels higher than $50 \times 10^9/l$ are known to interfere with hemoglobin concentration measurement on a Coulter STKS analyser. We investigated the performance of an ABL700 analyser as an alternative for the high WBC interfered hemoglobin concentration measurement performed with a Coulter STKS.

Patients and methods: From 21 patients with WBC levels higher than 50 (range 66 - 213) $\times 10^9/l$ the hemoglobin concentration was determined using a Coulter STKS (Beckman Coulter, Mijdrecht, The Netherlands), an ABL700 analyser (Radiometer, Zoetermeer, The Netherlands) and the international approved standardised method performed on a Ciba-

Corning Colorimeter 257 at 546 nm wavelength (calibrated with the haemiglobincyanide standard (Baker, product nr. 3061)).

Results: The correlation between the Coulter STKS and the standardised method was Coulter STKS = $0.935 \times$ standardised method + 0.765, coeff of correlation (r)=0.978, whereas this is for the ABL700: ABL700 = $1.016 \times$ standardised method - 0.099, r =0.988.

Conclusion: We conclude that the hemoglobin measurement on the ABL700 analyser, in contrast to the hemoglobin measurement on the Coulter STKS, is not interfered by high levels of WBC.

038. Cyclopentenyl cytosine (CPEC) inhibits CTP synthetase in pediatric acute non-lymphocytic leukemia

A.C. VERSCHUUR^{1,2}, A.H. van GENNIP¹, R. LEEN¹, P.A. VOÛTE² and A.B.P. van KUILENBURG¹

Academic Medical Center, University of Amsterdam, Dept. of Clinical Chemistry, Laboratory Genetic Metabolic Diseases¹ and Emma Children's Hospital, Dept. of Pediatric Oncology², PO Box 22700, 1100 DE Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Cytidine triphosphate (CTP) synthetase is a key enzyme in the anabolic pathways of cytosine and uracil ribonucleotide metabolism and has a high activity in various malignancies. This has led to the development of inhibitors of CTP synthetase for therapeutic purposes. Cyclopentenyl cytosine (CPEC) is a nucleoside-analogue that is capable of inhibiting CTP synthetase.

Objectives: To determine the CTP synthetase activity and ribonucleotide concentrations in myeloid leukemic cells and to study the in vitro effect of CPEC on leukemic cells.

Patients and methods: We studied the leukemic cells of 12 children suffering from acute nonlymphocytic leukemia (ANLL), in comparison with non-malignant CD34 + bone-marrow cells and granulocytes. The CTP synthetase activity was analyzed by an in vitro assay, in which the substrate and product were separated by anion-exchange HPLC. Ribonucleotide concentrations were measured in neutralized perchloric-acid extracts of ANLL cells by anion-exchange HPLC. Incubation experiments with CPEC concentrations of 0.063-

5 μ M were performed for 18h in DMEM containing 10% FCS.

Results: The specific activity of CTP synthetase in ANLL cells (5.1 ± 2.3 nmol CTP/mg/h) was significantly higher compared to granulocytes of healthy controls (0.64 ± 0.38 nmol CTP/mg/h, $p=0.0002$) but was not different from the activity in non-malignant CD34 + bone-marrow cells (5.6 ± 2.4 nmol CTP/mg/h). Major shifts were observed in the various ribonucleotide concentrations in ANLL cells compared to granulocytes; the absolute amount of ribonucleotides was increased with a substantial rise of the CTP (2.6 vs 0.4 pmol/ μ g protein, $p=0.0007$) and UTP (9.4 vs 1.6 pmol/ μ g protein, $p=0.0008$) concentrations in ANLL cells vs granulocytes. Treating the ANLL cells with CPEC induced a major depletion (76% with 2.5 μ M of CPEC) of the concentration of CTP, while the concentrations of UTP, ATP and GTP remained stable.

Conclusions: The high activity of CTP synthetase in ANLL cells can be inhibited by CPEC and provides a key to a new approach for the combination-regimens used for the treatment of pediatric ANLL.

039. Cyclopentenyl cytosine (CPEC) inhibits cytidine triphosphate (CTP) synthetase and induces a depletion of CTP and dCTP in pediatric ALL cells

A.C. VERSCHUUR, A.B.P. van KUILENBURG, R. LEEN, A.H. van GENNI and P.A. VOÛTE

Academic Medical Centre, Emma Kinderziekenhuis AMC, University of Amsterdam, The Netherlands

Objectives: CTP synthetase catalyzes the conversion of uridine tri-phosphate (UTP) into CTP. We previously reported a high activity of CTP synthetase in pediatric ALL. CPEC is a nucleoside-analogue that inhibits CTP synthetase (inducing a CTP-

and dCTP-depletion) and inhibits DNA- and RNA-synthesis in leukemic cell-lines. The effect of CPEC was studied in vitro in lymphoblasts of 28 patients with ALL.

Methods: Inhibition experiments with CPEC were performed

by cell culture, after which cell viability (trypan blue exclusion test) and (deoxy)ribonucleotide concentrations (HPLC) were determined. The degree of CTP depletion was correlated to the CTP synthetase activity, that was analyzed by an assay based on anion-exchange HPLC.

Results: The lymphoblasts of 28 patients (23 precursor B-ALL and 5 T-ALL) were treated in vitro with increasing doses of CPEC. A CPEC concentration of 1.25 μM (n=23) induced a mean CTP depletion of 44% (\pm 19%). There were no significant differences between the CTP depletion caused by CPEC concentrations of 0.63/1.25/2.5 or 5 μM , inducing a mean

CTP depletion of 41/44/50/54%, respectively. A linear correlation was observed between the activity of CTP synthetase and the degree of CTP depletion ($r=0.87$, $p<0.001$). The mean depletion of dCTP (n=5) was 38% (\pm 18%).

Conclusions: The high CTP synthetase activity that we observed in ALL cells, can be inhibited in vitro by CPEC, inducing a significant reduction of the CTP and dCTP concentration. The linear correlation between the activity of CTP synthetase and the CTP depletion caused by CPEC may have therapeutic implications in the future.

040. Cyclopentenyl cytosine (CPEC) increases the phosphorylation and incorporation into DNA of Ara-C in a T-lymphoblastic cell-line

A.C. VERSCHUUR, A.B.P. van KUILENBURG, R. LEEN, A.H. van GENNIP and P.A. VOÛTE.
Academic Medical Centre, Emma Kinderziekenhuis AMC, University of Amsterdam, The Netherlands.

Objectives: CPEC is a nucleoside analogue that inhibits the enzyme cytidine triphosphate (CTP) synthetase, which catalyzes the conversion of uridine triphosphate (UTP), into CTP. CPEC induces a CTP and deoxyCTP (dCTP) depletion and reduces RNA- and DNA-synthesis in leukemic cell-lines. A low dCTP concentration is known to facilitate the first phosphorylation step of AraC by deoxycytidine kinase and the incorporation of AraCTP into DNA. We therefore studied the effect of CPEC on the metabolism of AraC in a T-lymphoblastic cell-line.

Methods: The in vitro (pre) incubation experiments with CPEC and radiolabeled AraC were performed on a MOLT-3 T-lymphoblastic cell-line. Ribonucleotides and AraC-metabolites were analyzed by anion-exchange HPLC. Incorporation of AraCTP into DNA was related to ^{32}P -incorporation into DNA as a measure of DNA-synthesis.

Results: Using 400 nM of CPEC and 2 μM AraC (n=6) we

observed a CTP-depletion of 88% and a dCTP depletion of 78%. The relative concentrations of AraCMP, AraCDP and AraCTP as compared to the CPEC-untreated samples were $521\pm 64\%$, $93\pm 10\%$ and $105\pm 11\%$, respectively. The AraCTP incorporation into DNA was increased by $33\pm 14\%$ by CPEC. When using lower concentrations of CPEC (100 nM) and AraC (2 nM (1000-fold less AraC)), the relative concentrations in AraC metabolites due to CPEC were 185%, 77% and 86%. The AraCTP incorporation increased by 75%, and an additive effect on the inhibition of DNA-synthesis was observed.

Conclusions: Our experiments prove that CPEC decreases the DNA-synthesis and increases the phosphorylation of AraC and the incorporation of AraCTP into DNA. Therefore, CPEC may have a therapeutic potential by either a direct cytostatic effect in situ, or might increase the cytotoxicity of certain nucleoside analogues, like AraC.

Stolling

041. Is een verkorte APTT een indicatie voor stollingsactivatie?

E. ten BOEKEL en P.C.M. BARTELS
Laboratorium voor Klinische Chemie, Hematologie en Immunologie. Medisch Centrum Alkmaar

In het Laboratorium voor Klinisch Chemie, Hematologie en Immunologie van het Medisch Centrum Alkmaar worden ongeveer 1200 APTT bepalingen (ref. wrd. 27-38 sec.) per maand aangevraagd. In 0.7% van de gevallen wordt een APTT van kleiner dan 26 seconden gemeten. Deze populatie van patiënten is nader gekarakteriseerd aan de hand van uitslagen van de overige aangevraagde laboratoriumonderzoeken en een D-dimeren bepaling als aanvullend onderzoek.

De APTT van de geselecteerde groep patiënten (n=85) bedroeg gemiddeld 23 seconden (spreiding 16-25 sec.); 90% had een normale PT waarde. De meerderheid (60%) van de aanvragen was afkomstig van de Spoed Eisende Hulp- en 20% van de Intensive Care-afdeling. Ongeveer de helft van de patiënten werd bij opname verdacht van een hart- of herseninfarct. Zeven (8%) patiënten overleden binnen 1 tot 3 weken na detectie van de verkorte APTT. Uit vervolgonderzoek bleek dat bij 35% van de patiënten gestart werd met antistollingstherapie. In 45% van de gevallen werd overigens geen enkel vervolgonderzoek op stollingsgebied aangevraagd en bij de overige patiënten (20%) bleek de verkorte APTT reproduceerbaar in 75% van de gevallen.

Als aanvullend onderzoek werd bij 26 willekeurige patiënten de concentratie van D-dimeren bepaald. In 18 (70%) individuen werd een verhoogde D-dimeren concentratie aangetoond hetgeen kan duiden op een toegenomen fibrinolyse activiteit. Echter, bij acht patiënten was de concentratie van D-dimeren niet verhoogd, ondanks het feit dat 4 van deze patiënten een acuut myocard infarct doormaakten. Het is nog onduidelijk of bij de laatste groep patiënten de niet-verhoogde activiteit van het fibrinolytisch systeem inherent is aan de patiënt of veroorzaakt wordt door andere, secundaire, oorzaken.

Bij patiënten met een verhoogde concentratie D-dimeren ligt waarschijnlijk een verhoogde mate van stollingsactivatie ten grondslag aan de verkorte APTT. De klinische interpretatie van een verkorte APTT waarbij geen verhoogde D-dimeren concentratie aantoonbaar is, is minder duidelijk. Hoewel, ongeveer de helft van deze patiënten heeft een infarct hetgeen ook een toegenomen stollingsactivatie suggereert. Een verhoogde concentratie van geactiveerde stollingsfactoren aanwezig in het plasma van de patiënt zou dus ten grondslag kunnen liggen aan een verkorte APTT.

042. Evaluatie van de stollingsautomaat AMGA CS-400

G.A. van den BERG¹, F. POSTEMA², B. REITSMA¹ en A.J. BAKKER¹

Stichting Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Stichting Trombosedienst Friesland Noordwest², Leeuwarden

Inleiding: De capaciteit van de AMAX CS-190 is te beperkt om in 1 tot 1,5 uur circa 250 monsters voor de controle op orale antistolling van de Trombosedienst (middagproductie) te verwerken. Als alternatief is de AMGA CS-400 geëvalueerd.

Resultaten reproduceerbaarheid: De binnen-dag variatie voor de PT en APTT geeft CV's beneden de 3% (PT range 16 – 68 sec) en 5,3 % (APTT range 29 – 120 sec). De CV's voor de dag-tot-dag variatie zijn < 4,5% (PT range 15 – 65 sec) en < 4,0% (APTT range 28 – 93 sec).

Methodenvergelijking: Vergelijking van de AMGA CS-400 met de AMAX CS-190 geeft de volgende karakteristieken voor de correlatie volgens Passing Bablok: PT, AMGA=1,03 AMAX – 0,81, $r=0,996$, $n=154$ en APTT, AMGA=1,04 AMAX – 1,75, $r=0,986$, $n=146$.

Vergelijking tussen de PT, geanalyseerd met de AMGA CS-400, en de TT, geanalyseerd met de LODE van de Trombosedienst, geeft de volgende correlatie karakteristiek: PT AMGA = 1,29 TT – 0,40, $r=0,913$ en $n=209$.

Performance: De gemiddelde verwerkingssnelheid van Trombosedienst-monsters is 235 monsters per uur met de AMGA CS-400. Voorts is de PT in capillair afgenomen monsters zeer reproduceerbaar (CV 1,6%) te analyseren. Echter de AMGA CS-400 laat voor zowel de PT als APTT een reagensverbruik zien dat 1,5 keer zo groot is als met de AMAX CS-190.

Conclusie: De analytische performance van de AMGA CS-400 is uitstekend en komt goed overeen met die van de AMAX CS190. Beide apparaten gebruiken hetzelfde meetprincipe. De verwerkingssnelheid m.b.t. de PT ligt voor de AMGA CS-400 2x hoger dan voor de AMAX CS-190 en maakt de AMGA bij uitstek geschikt om in korte tijd monsters voor de Trombosedienst te analyseren. Dit wordt grotendeels bewerkstelligd door een gescheiden monster- en reagenspipettor en een pompslangensysteem voor het startreagens. Echter de consequentie hiervan is het toegenomen reagensverbruik van AMGA CS-400 t.o.v. de AMAX CS-190.

043. Multi-center validatie van de CA-1500 ter bepaling van stollingsparameters

M.H. BEUNIS¹ en R. OOSTEROM²

Sint Franciscusgasthuis¹, Ikazia Ziekenhuis², Rotterdam

Achtergrond: De klinisch chemici van 5 Ziekenhuizen in de regio Rotterdam (Franciscus Gasthuis, Haven-, Ikazia -, Zuider- en Claraziekenhuis) besloten in 1998 om in principe dezelfde stollingsautomaat te kopen ten einde kosten te besparen, dezelfde referentiewaarden en therapeutische waarden te hanteren en te beschikken over een vergelijkbare back-up in de regio. Door de projectgroep, bestaande uit 2 klinisch chemici en 5 hoofdanalisten, werd een voorkeuze gemaakt voor drie verschillende apparaten. Na een proefplaatsing in 3 ziekenhuizen adviseerde de werkgroep de klinisch chemici tot de CA-6000/CA-1500 (Dade Behring). De CA-1500 werd in juni 1999 geleverd. Dr. van Vliet van het hemostaselaboratorium AZR Dijkzigt voerde de eerste validatie uit op verzoek van de firma. De werkgroep kon vroegtijdig over deze gegevens beschikken. De lokale validatie van PT, APTT en fibrinogeenbepaling werd volgens onderling afgesproken protocol uitgevoerd.

Materiaal en methoden: De PT, APTT en fibrinogeen volgens Claus werden bepaald met Innovin, respectievelijk Actine FS en Trombine (Dade Behring). Voor de validatie werden in alle ziekenhuizen dezelfde lotnummers reagens en controles gebruikt. In elk ziekenhuis werd de tussen-dag reproduceerbaar-

heid bepaald, en de referentiewaarden op basis van 20 normalen. Voor het vaststellen van APTT-richtwaarden bij heparinetherapie werd de heparineconcentratie achteraf gemeten in 100 monsters afkomstig van patiënten die in de verschillende ziekenhuizen met heparine werden behandeld (H. van Vliet, AZR Dijkzigt).

Resultaten: Het gemiddelde van de controlemonsters was onafhankelijk van het apparaat, de reproduceerbaarheid was laag (vc 2%), maar apparaat of laboratorium afhankelijk.

De gepoolde referentiewaarden waren: PTT 10-12 sec, APTT 20-30 sec en fibrinogeen 1,7-4,0 g/l

Gebaseerd op de heparine concentratie van 0,2-0,6 U/l werd de therapeutische range voor de APTT bij heparine therapie vastgesteld op 40-80 sec.

Conclusie: Door te kiezen voor dezelfde reagens-apparatuur combinatie was het betrekkelijk eenvoudig dezelfde referentiewaarden en therapeutische range vast te stellen en is onderlinge back-up mogelijk. Binnen de werkgroep werden ervaringen en kennis uitgewisseld; daardoor is overleg tussen analisten van verschillende laboratoria ook in de toekomst gemakkelijker geworden. De resultaten zullen worden aangevuld met de ervaringen na implementatie in de praktijk.

044. Een patiënt met een ernstig verlaagde Factor X-activiteit

A. CASTEL¹, A. J. KÖNIG¹, R. SOETEKOUW² en R. BIEGER²

Klinisch Chemisch & Hematologisch Laboratorium¹ en Afdeling Interne Geneeskunde², Ziekenhuis Bronovo, Den Haag

In december 1999 werd in ons ziekenhuis een 76-jarige man opgenomen met hematomen in de hals, de handpalm en een tongbloeding. In het verleden had hij tot 1998 onder meer een fisteloperatie, een low anterior resectie + appendectomie en een kiesextractie ondergaan, zonder noemenswaardige problemen. In maart 1999 had hij een oogbloeding en in oktober 1999 werd elders een lobectomie van de rechter onderkwab verricht, in verband met een hematothorax. De APTT en PT bij binnenkomst waren beiden sterk verlengd (98, resp. 46 sec.) en er was geen reactie op het toedienen van vitamine K. De I.N.R. was 6,4, maar coumarine-derivaten waren in serum niet aantoonbaar. De percentages Normotest (Vitamine K-af-

hankelijke factoren) en Factor V waren respectievelijk <5% en 100%. Met behulp van mengproeven werd geen aanwijzing gevonden voor een circulerend anticoagulans. De uitslagen van het overige stollingsonderzoek leverden normale activiteiten op voor de Factoren I, II, VII, VIIIc, VIIIIRag en IX. De activiteit van Factor X bedroeg 1.2%. Aanvullende onderzoek in het CLB te Amsterdam bevestigde deze bevindingen. Echter, de sterk verlaagde Factor X-activiteit werd alleen gevonden in de op de PT gebaseerde Factor X-bepaling. Bij gebruik van een chromogene Factor X-bepaling, waarbij factor X geactiveerd wordt met Russell's viper venom (RVV) werd een activiteit van 184% gevonden. De uitslag van de Factor X-an-

tigebepaling bedroeg 209%. Er bleek derhalve sprake van een verworven, ernstig verlaagde Factor X-activiteit, gebaseerd op een vrijwel volledig gestoorde activatie van het in hoge concentratie aanwezige Factor X-eiwit. Er bestaat hierin dus een essentieel verschil met de eerder door ons beschreven patiënte met een verworven Factor X-deficiëntie op basis van een amyloidose, waarbij Factor X wordt weggevangen (*Castel et al, Ned Tijdschr Klin Chem 1997, vol.22, no 3, p. 130*). Het effect van het toedienen van Factor X werd nagegaan m.b.v. een plasma-infusie experiment. De Factor X-activiteit nam toe tot de berekende maximale waarde, waarna de activiteit afnam

overeenkomstig de normale halfwaardetijd van Factor X. In lijn hiermede had het therapeutisch toedienen van Factor X (Cofact[®]) aan de patiënt een gunstig effect op de bloedingsneiging. Patiënt wordt thans poliklinisch behandeld met in totaal 80 ml (Cofact[®]) per week, verdeeld over drie dagen. DNA-analyse met betrekking tot het Factor X-gen zal moeten uitwijzen of hier wellicht sprake is van een preëxistente structurele variant, die door een nog onbekende stimulus manifest is geworden in een gestoorde activatie van Factor X, leidend tot een ernstige hemorrhagische diathese.

045. Evaluatie van de Protein C pathway test

J.S. KAMPHUIS¹, D. PONGERS¹, S.J.H. EVERS², T. van BUUL² en H.J.M. SALDEN¹

Klinisch chemisch laboratorium, Deventer Ziekenhuis, Deventer¹; Klinisch chemisch laboratorium, Slingeland Ziekenhuis, Doetinchem²

De protein C pathway (PCP) test is een overall-test, die aan geeft of de oorzaak van de verhoogde trombose neiging gelegen is in gereduceerde niveaus van proteïne C en/of S of aanwezigheid van factor V Leiden. De test (APTT) is gebaseerd op het gebruik van verdund Russell Viper Venom met en zonder toevoeging van Proteïne C activator en wordt uitgedrukt in een PCP ratio. Ratio's <2,5 zijn een indicatie voor een verlaagd gehalte aan proteïne C en/of S of aanwezigheid van factor V Leiden of gebruik van orale anticoagulantia (OAC). De resultaten van de PCP test zijn vergeleken met die van de reguliere bepalingen: proteïne C act. (CLB), proteïne S Ag (CLB), en factor V Leiden (Deventer Ziekenhuis).

Uit het onderzoek met 42 patiënten blijkt dat 33% van de patiënten een verlaagde ratio (<2,5) bezit. Oorzaken: factor V Leiden (43%), verlaagde proteïne C act. (14%), OAC (36%) en

onbekend (7%). Ratio's > 2,5 gaven geen afwijkende resultaten te zien. Een PCP-ratio < 1,5 geeft een sterke aanwijzing voor factor V Leiden; dit klopt voor 67% van de factor V Leiden-positieve patiënten. Een ratio van > 2,5 gaf geen afwijkingen te zien. Bij 5 patiënten met een PCP ratio <2,5 is plasma 1:1 verdund met factor V deficiënt plasma, hetgeen geen correctie van de ratio te zien gaf; door middel van DNA-diagnostiek is aanwezigheid van factor V Leiden bevestigd.

Na invoering van de PCP test (Slingeland Ziekenhuis, Doetinchem) is gebleken dat bij 43 patiënten een PCP-ratio werd gevonden van ≤ 1,5, waarvan factor V Leiden de oorzaak was. Patiënten met een PCP-ratio tussen de 1,5 – 2,5 waren negatief voor factor V Leiden.

De PCP-test is een goede screenende test die bij gebruik van de juiste ratio een groot aantal onnodige bepalingen besparen kan.

046. Relatie tussen genetisch polymorfisme van cytochroom P4502C9 en de therapeutische dosis Marcoumar

J. KOERTS¹, M. BON¹, A.M. van OEVEREN-DYBICZ¹, J.B.J.M. VISSCHEDIJK-CHRISTENHUSZ², G.D. KANT³ en I. VERMES¹

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Trombosedienst², en Afdeling Interne Geneeskunde³ Medisch Spectrum Twente, Enschede/Oldenzaal

Het humane cytochroom P4502C9 is het belangrijkste cytochroom P450 isoenzym dat verantwoordelijk is voor de metabole inactivering van de orale anticoagulans Warfarine. In vitro studies is aangetoond dat de hydroxylering van Warfarine door de mutanten CYP2C9*2 en CYP2C9*3 ongeveer 12% respectievelijk <5% is van het wildtype CYP2C9*1. Marcoumar is in Nederland het meest voorgeschreven orale anticoagulans. Daar Marcoumar een structuuranaloog is van Warfarine kan verwacht worden dat het CYP2C9 enzym ook betrokken is bij de metabole afbraak van Marcoumar. Dit zou kunnen betekenen dat mensen die drager zijn van de mutanten CYP2C9*2 en/of *3 een andere onderhoudsdosering Marcoumar nodig hebben dan wildtypes. Om deze hypothese te toetsen werd het volgende onderzoek uitgevoerd.

In een pilot experiment werd het CYP2C9 genotype bepaald van 57 patiënten die bij de Trombosedienst Oldenzaal onder behandeling waren. Patiënten hadden verschillende medische indicaties voor antistollingstherapie en waren stabiel ingesteld op Marcoumar met een streefwaarde van de INR tussen 3 en 4.

Patiënten gebruikten geen medicatie waarvan bekend is dat deze van invloed kan zijn op de beschikbaarheid en/of metabole afbraak van Marcoumar. DNA werd geïsoleerd uit volbloed waarna middels polymerase chain reactie en restrictie-enzym analyse de allelen CYP2C9*1, CYP2C9*2 en CYP2C9*3 gedetecteerd konden worden. Het CYP2C9 genotype van de patiënten werd vergeleken met de onderhoudsdosis Marcoumar (mg/week) die zij gebruikten.

In de onderzochte groep patiënten was de CYP2C9 genotype frequentie: 0,67 *1/*1 (wildtype), 0,17 *1/*2, 0,07 *1/*3, 0,09 *2/*3, 0,00 *2/*2, 0,00 *3/*3. Deze resultaten waren vergelijkbaar met literatuurgegevens. Correlatie tussen genotype CYP2C9 en de gebruikte onderhoudsdosering Marcoumar laat zien dat genetisch polymorfisme van CYP2C9 mogelijk één van de factoren is die verantwoordelijk is voor de interindividuele verschillen in onderhoudsdosering van Marcoumar in de onderzochte patiënten. Een vervolgstudie is gestart om deze resultaten verder te kunnen onderbouwen.

047. No detectable influence on coagulation of acute hyperhomocysteinemia

A. LEYTE¹, V.E.A. GERDES², M.R. Mac GILLAVRY², Y. v.d. HEIDE¹, H. ten CATE² and D.P.M. BRANDJES².
Dept of Clinical Chemistry¹ and Dept of Internal Medicine², Slotervaart Hospital, Amsterdam

Background: Hyperhomocysteinemia has been associated with venous and arterial thrombotic disease. However, the effect of homocysteine (Hcy) on the coagulation system is unclear. Results of in vitro studies suggest a procoagulant influence of Hcy on endothelial cells. A recent study in healthy volunteers suggested that acute hyperhomocysteinemia by oral methionine load (OML) causes enhanced coagulation activity (Nappo et al, JAMA 1999).

Because we considered acute hyperhomocysteinemia by OML an interesting experimental model to study the relationship between hyperhomocysteinemia and coagulation, we planned to confirm whether acute hyperhomocysteinemia by OML leads to enhanced coagulation activity.

Methods: We performed an observer blinded, randomized cross-over study. In 20 healthy volunteers, we determined Hcy, von Willebrand factor (vWF), pro-thrombin fragment F1+2 (F1+2), thrombin-antithrombin complexes (TAT) and d-dimer concentrations before and 4 hours after OML (0.1g/kg) or

before and 4 hours after placebo (Pla). For comparison we used the Wilcoxon signed-ranks test.

Results: The study population consisted of 10 male and 10 female individuals with a mean age of 35 years (range 22-54 years). Hcy levels increased in all patients after OML (median Hcy ($\mu\text{mol/l}$) t=0: 8.9, t=4 Pla: 9.2, t=4 OML: 30.1, $p<0.001$). In contrast, no influence of this increase in Hcy levels on the parameters of coagulation could be detected.

F1+2 (median, nmol/l) t=4 Pla: 0.86 versus (vs) t=4 OML: 0.86, $p=0.22$.

TAT (median, $\mu\text{g/l}$) t=4 Pla: 1.59 vs t=4 OML: 1.85, $p=0.88$.

D-dimer (median, $\mu\text{g/ml}$) t=4 Pla: 153 vs t=4 OML: 151, $p=1.0$.

vWF (median, %) t=4 Pla: 103, t=4 OML: 107, $p=0.79$.

Conclusion: No influence of experimental acute hyperhomocysteinemia on the coagulation system could be detected. However, we can not exclude that acute hyperhomocysteinemia induces subtle changes in the coagulation system which may only be detected in a study with a larger sample size.

048. Circulerende micropartikels in gezonde vrijwilligers zijn stollingsbevorderend

R.J. BERCKMANS¹, R. NIEUWLAND¹, A.N. BÖING¹, F.P.H.T.M. ROMIJN¹, C.E. HACK² en A. STURK¹, *Klinische Chemie¹, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden en Centraal Laboratorium van de Bloedtransfusie & AZVU², Amsterdam*

Verhoogde aantallen micropartikels (MP), afkomstig van bloedplaatjes, komen voor bij diverse patiëntengroepen, waaronder patiënten met hart- en vaatziekten en sepsis. Vrijwel niets is bekend over het voorkomen en de functie van MP in gezonde individuen. In deze studie zijn MP geïsoleerd uit vers citraat-bloed van gezonde vrijwilligers (n=15) met behulp van differentiële centrifugatie, aangekleurd met annexine V en cel-specifieke monoklonale antistoffen (MoAb) en geanalyseerd met flowcytometrie. In alle individuen waren MP aanwezig, voornamelijk afkomstig van bloedplaatjes [$237 \times 10^6/\text{l}$ (mediaan; range 116-565 $\times 10^6/\text{l}$)] en in mindere mate van erythrocyten ($28 \times 10^6/\text{l}$; $13-46 \times 10^6/\text{l}$), granulocyten ($46 \times 10^6/\text{l}$; $16-94 \times 10^6/\text{l}$) en endotheelcellen ($64 \times 10^6/\text{l}$; $16-136 \times 10^6/\text{l}$). Vrijwel alle MP bonden annexine V, wat bindt aan negatief geladen, stollingsbevorderende fosfolipiden. Reconstitutie van

MP in gerecalcificeerd, MP-vrij normaal plasma resulteerde in trombinevorming die niet werd geremd door MoAb gericht tegen weefselfactor of factor VII. MoAb gericht tegen de stollingsfactoren XII, XI, IX of VIII remden wel de trombine generatie met 12% ($P=0,006$), 36% ($P<0,001$), 28% ($P<0,001$) en 32% ($P<0,001$). Het trombine-genererend vermogen van de MP correleerde met de plasma concentratie trombine-antitrombine complexen ($r=0,77$, $p=0,001$), maar niet met de concentratie van het protrombine fragment F_{1+2} ($r=0,002$, $p=0,99$). Samenvattend: bloed van gezonde individuen bevat MP van verschillende cellulaire herkomst. Deze MP zijn stollingsbevorderend, deels via contactactivatie en intrinsieke stolling en deels via nog onbekende mechanismen, en reflecteren de mate van stollingsactivatie in vivo.

049. Circulerende micropartikels en hun stollingsbevorderende eigenschappen in patiënten met ernstige sepsis en meervoudig orgaan falen

K. JOOP¹, R.J. BERCKMANS¹, R. NIEUWLAND¹, H.J. BERCKHOUT², F.P.H.T.M. ROMIJN¹, C.E. HACK³ en A. STURK¹.

Klinische Chemie¹ en Infectieziekten², Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden en Centraal Laboratorium van de Bloedtransfusie & AZVU³, Amsterdam

Recent vonden wij verhoogde aantallen micropartikels (MP), afkomstig van o.a. bloedplaatjes en granulocyten, in de circulatie van patiënten met meningococce sepsis (Blood, in press). In de huidige studie is gekeken naar voorkomen en functie van MP in bloed van patiënten met sepsis en meervoudig orgaanfalen. MP werden geïsoleerd uit bloed van patiënten (n=9) en gezonde vrijwilligers (n=9), aangekleurd met annexine V en cel-specifieke monoklonale antistoffen en geanalyseerd met flow cytometrie. MP werden in normaal plasma gereconstitueerd om hun stollingsbevorderend vermogen te onderzoeken, in aan- en afwezigheid van remmende monoklonale antistoffen (MoAb). Plasma van patiënten bevatte MP, voornamelijk afkomstig van bloedplaatjes (PMP) en in mindere mate van erythrocyten, endotheelcellen (EMP) en granulocyten (GMP). De concentraties PMP en EMP waren verlaagd in patiënten ($p=0,001$ en $p=0,014$), evenals het aantal weefsel-

factor-positieve MP ($p=0,001$). De concentraties GMP daarentegen waren sterk verhoogd ($60 \times 10^6/\text{l}$ (mediaan; range $<5-184 \times 10^6/\text{l}$)) ten opzichte van vrijwilligers ($<5 \times 10^6/\text{l}$; $p<0,001$). MP concentraties van erythrocyten waren gelijk ($p=0,174$). De MP fracties van patiënten genereerden minder trombine dan de vrijwilligers ($p=0,008$). Hierbij was opvallend dat bij 2 patiënten de trombinegeneratie vrijwel volledig werd geremd door anti-factor XII (contactactivatie; controles 12% remming) en dat bij alle patiënten anti-factor XI veel sterker remde dan bij de controles ($p=0,001$). Tenslotte correleerde het aantal circulerende GMP met de elastaseconcentraties ($r=0,67$, $p=0,05$). Elastase is een protease dat door geactiveerde granulocyten wordt gesecreteerd. Concluderend: in patiënten met sepsis en MOF circuleren MP die enerzijds stollingsactief zijn en anderzijds in concentratie correleren met elastase, een marker van granulocytenactivatie.

050. Het gebruik van de CoaguChek™ als capillaire INR-methode door het laboratorium: een methodenvergelijking

J.D. OOSTING, R. GROENEVELT, E. BOLAT en P. van 'T SANT
Klinisch chemische laboratoria, Ziekenhuis Bernhoven, Oss/Veghel

Het CoaguChek™ systeem van Roche kan snel en eenvoudig direct uit een capillaire vingerprik de INR bepalen. De correlatie met gangbare laboratoriummethoden met veneus bloed is bekend. De toepassing van dit nieuwe systeem als capillaire methode in het ziekenhuislaboratorium voor patiënten die moeilijk veneus te prikken zijn, is onderbelicht gebleven. Wij hebben de CoaguChek™ vergeleken met twee andere capillaire methoden om de INR te bepalen. Als referentie zijn veneuze plasma methoden gebruikt.

Van 7 gezonde vrijwilligers en 60 trombosedienstpatiënten is capillair en veneus bloed afgenomen. Van het capillaire bloed is de INR direct in volbloed bepaald met het CoaguChek™ systeem (met vier lotnummers en twee meters). Het bloed van een tweede capillaire afname is ontstold met citraat en de INR is bepaald in volbloed met een coagulometer KC 10 en Thromborel™ S-reagens (Sigma), of in plasma met een ACL-100 (fotometrische detectie) en PT-Fib™-reagens (IL). Het veneuze bloed is afgenomen in citraat. De INR is in het plasma

bepaald met een coagulometer AMAX (Sigma) en Thromborel™ S-reagens en/of met de ACL-100 en PT-Fib™-reagens.

De correlatie tussen INR uitslagen verkregen met CoaguChek™ (CC) en met de referentie methoden waren goed (Lineaire regressie $CC=0,98(\text{Sigma})-0,08$ $r=0,96$ en $CC=0,93(\text{IL})+0,17$ $r=0,95$) en duidelijk beter dan de correlatie tussen de huidig gebruikte capillaire methoden (Cap) en de referentie methoden ($\text{CapSigma}=1,27(\text{Sigma})-0,18$ $r=0,96$ en $\text{CapIL}=0,99(\text{IL})+0,24$ $r=0,82$). De dag tot dag imprecisie van Roche controlemateriaal gemeten met CoaguChek™ was 8,8%. De totale imprecisie (berekend m.b.v. de stoltijd) van CoaguChek™ voor bloed was ongeveer drie keer zo klein (0,5 tot 1,7% bij een INR van 1 tot 5) als die van de twee andere capillaire methoden.

Conclusie: het CoaguChek™ systeem is een betere en snellere methode om de INR te bepalen in capillair bloed dan de twee andere capillaire methoden die hier onderzocht zijn.

Moleculaire Biologie

051. Real-Time PCR genotypering van HLA-B27: een snelle, eenvoudige en betrouwbare methode op de Lightcycler™

M.A.M. BON, A.M. van OEVEREN-DYBICZ en F.A.J.T.M van den BERGH
Laboratorium, Medisch Spectrum Twente, Postbus 50000, 7500 KA Enschede

Het HLA-systeem speelt een belangrijke rol bij de immunrespons en wordt gekenmerkt door een hoge graad van polymorfisme. Het HLA-B27 allel (frekwentie in Nederland 9%) is sterk gekoppeld aan spondylitis ankylopoetica (M.Bechterew), M.Reiter en acute uveitis anterior. De klassieke HLA-typering, gebaseerd op cellulaire en serologische reacties, wordt soms gehinderd door kruisreactiviteit tussen sterk antigeen-gerelateerde structuren. Destijds werd door ons een alternatieve methode ontwikkeld waarbij B27-typering gerealiseerd werd op basis van allel-specifieke PCR met één enkele primerset gevolgd door agarose-elektroforese. Meer dan 2000 monsters zijn de afgelopen 5 jaar op deze wijze ondubbelzinnig en zonder noemenswaardige technische problemen getypeerd. Deze techniek is echter tijdrovend vanwege de noodzakelijke

detectiestappen, zoals gel-elektroforese en, zonodig, bevestiging d.m.v. specifieke hybridisatie. Recent is een nieuwe generatie snelle thermocyclers ontwikkeld op basis van real-time PCR. Met behulp van de Lightcycler™ (Roche Diagnostics Nederland) zijn wij in staat tot real-time allel-specifieke typering van HLA-B27 m.b.v. SYBR Green I fluorescentie detectie, gecombineerd met smeltcurve analyse. Bij 100 DNA-monsters, geïsoleerd uit perifeer bloed, vonden wij volledige overeenstemming met onze conventionele PCR methode. Met de nieuwe techniek is genotypering mogelijk in 40 minuten zonder de noodzaak van enige post-PCR detectiestap. Door toepassing van een gesloten systeem zijn de risico's van contaminatie verder geminimaliseerd.

052. Zeven DNA-isolatiemethoden op een rijtje

P.M.W. JANSSENS, J. PAARDEKOOPEL en M. HENDRIKS
Ziekenhuis Rijnstate, Arnhem

Nu onderzoek van het DNA ten bate van het vaststellen van erfelijke aanleg of ziekten, of om somatische mutaties op te sporen meer en meer routine wordt, is het wenselijk te beschikken over snelle, efficiënte en rendabele werkwijzen die, uiteraard, de vereiste kwaliteit leveren. Een methode om DNA uit leukocyten te isoleren is er daar één van.

Na een voorselectie uit 13 beschikbare methoden hebben wij onze in-huis (zout-)methode en zes door firma's ter beschikking gestelde methoden om DNA uit volbloed te isoleren met elkaar vergeleken wat betreft kosten, praktische uitvoerbaarheid, DNA-opbrengst en -zuiverheid en het resultaat in een Factor V Leiden onderzoek. Drie van de methoden waren zgn. zout-methoden, vier zgn. spin-kolom -methoden. De zout-methoden kosten bij inkoop het minste, doch zijn wel bewer-

kelijker dan de spin-kolom -methoden. Zout-methoden leveren de hoogste DNA-opbrengsten, zodat deze geschikt cq. vereist zijn voor analyses waarbij het DNA niet geamplificeerd wordt (b.v. Southern blotting). Vergeleken hiermee zijn de spin-kolom -methoden handiger en sneller in gebruik. Deze methoden leveren alle ruim voldoende DNA voor een daaropvolgende analyse met behulp van amplificatie-technieken (b.v. PCR). Van alle geteste methoden was de zuiverheid van het verkregen DNA voldoende voor de uit te voeren analyses. Hierbij leek het er overigens op dat voor gebruik in PCR een suboptimale zuiverheid acceptabel is. Een overzicht van de kenmerken van de verschillende DNA-isolatiemethoden, en de bevindingen wordt gepresenteerd.

Neurologie&Psychiatrie

053. Een rekenmethode om de resultaten van spectrofotometrie van de Liquor Cerebrospinalis op een eenvoudige manier te berekenen

H.J. DUISER, F.W.C. ROELANDSE, E.G.W.M. LENTJES, J. van LOON en J.H.M. SOUVERIJN
Afdeling Klinische Chemie, Universitair Medisch Centrum, Leiden

Het is gebleken dat spectrofotometrisch onderzoek van de liquor cerebrospinalis naar het vóórkomen van bloedpigmenten van groot nut is om de aanwezigheid van bloedingen van verschillende aard in de hersenen aan te tonen. De gepresenteerde methode beschrijft een iteratieve rekenmethode, waarbij gecorrigeerd wordt voor troebelheid in het materiaal, en mogelijke afwijkingen in de pH. Als resultaat van de berekening worden quantitative waarden gegeven voor de concentraties oxyhemoglobine, methemoglobine en bilirubine in de liquor

cerebrospinalis. De concentraties worden berekend uit de optische dichtheden die bij de vier golflengten 360, 405, 414 en 455 nm worden gemeten. Na invoer van deze optische dichtheden in het ontwikkelde computerprogramma worden de concentraties gegeven. Het in Microsoft Excel 97 ontwikkelde programma maakt de berekeningen zo eenvoudig dat ze 24 uur per dag kunnen worden uitgevoerd door iedereen zonder aparte kennis van het programma of van de eigenschappen van de liquor cerebrospinalis.

054. Toepassing van een gemodificeerde techniek ter bepaling van sialotransferrine bij liquorlekkage in het hoofd- hals-gebied

R.M.van HAASTERT¹, D.F.P. van DEURZEN¹, J.H.M. SOUVERIJN¹, F.W.C. ROELANDSE² en A.G.L.van der MEY¹
Afdeling KNO¹ en Klinische Chemie², Universitair Medisch Centrum, Leiden

Doel: Vaststellen van de klinische toepasbaarheid van een gemodificeerde elektroforetische techniek ter bepaling van de verschillende vormen van sialotransferrine bij verdenking op oto-/rhinoliquorrhoe. Deze methodiek maakt detectie van kleinere, eventueel met bloed vermengde hoeveelheden liquor mogelijk.

Patiënten en methode: Sedert de invoering in 1995 van een nieuwe test voor het aantonen van de verschillende vormen van sialotransferrine, werden van 57 patiënten met een klinische verdenking op liquorrhoe monsters geanalyseerd. Van deze patientenpopulatie werden de testuitslagen vergeleken met de klinische gegevens, resultaten van beeldvormend onderzoek en bevindingen bij eventuele chirurgische exploratie. Op deze manier werd inzicht verkregen in de voorspellende

waarde van een positieve of negatieve testuitslag en de wijze waarin deze het klinisch handelen beïnvloedt.

Resultaten: Van 57 patiënten werden 89 monsters geanalyseerd. In 22 gevallen was er sprake van minstens 1 positieve testuitslag, waarbij middels beeldvorming in 10 gevallen het bestaan van een liquorlekkage werd geobjectiveerd.

In 12 gevallen werd de liquorrhoe bij chirurgische exploratie bevestigd. Van de patiënten met een negatieve testuitslag, werd in 1 geval later alsnog een liquorlek vastgesteld.

Conclusie: De gehanteerde diagnostische test voor de detectie van de verschillende vormen van sialotransferrine heeft een hoge voorspellende waarde bij het aantonen van een liquorlekkage. De invloed van de testuitslag op het klinisch handelen zal worden besproken.

055. Biochemical diagnosis of Alzheimer's disease

C. MULDER¹, P. SCHELTENS², L-O. WAHLUND³, P. D. BEZEMER⁴, C.E. HACK¹, H.A.M. TWAALFHOVEN¹, M. BLOMBERG³, G.J van KAMP¹ and R.B.H. SCHUTGENS¹

University Hospital Vrije Universiteit, Depts of Clinical Chemistry¹ and Neurology², De Boelelaan 1117, 1081 HV, Amsterdam; Huddinge University Hospital, Karolinska Institute, section of Geriatric Medicine, Sweden³; Vrije Universiteit, Dep of Clinical Epidemiology and Biostatistics⁴, Amsterdam

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by cognitive and physical deterioration. The identification of accurate early diagnostic markers in AD is mandatory for efficient treatment. The aim of the study was to investigate the usefulness of measuring CSF concentrations of amyloid- β_{1-42} peptide

(A β_{1-42}), tau protein, serum amyloid P component (SAP) and complement factor C1q, as biomarkers for AD, and to establish the ApoE genotype as risk factor.

The patients (n=20, 67.3 \pm 7.7 years, M/F=10/10) were recruited from the Memory Clinic at Huddinge University Hospital, Sweden. All fulfilled the DSM-IV criteria for dementia and NINCDS-ADRDA criteria for 'probable' AD. Controls (n=20, 67.3 \pm 10.4 years, M/F=7/13) were recruited from the Swedish Pensioner Society and among relatives of patients with dementia.

The CSF-A β_{1-42} concentrations were determined with the INNOTESTTM β -Amyloid₁₋₄₂ and tau protein with the INNOTESTTM hTAU-Ag (Both ELISA tests from Innogenetics, Gent, Belgium). For ApoE genotyping, DNA was extracted from peripheral white blood cells using standard methods. ApoE genotype was determined using a non-radioactive solid phase micro-sequencing method on microtitre

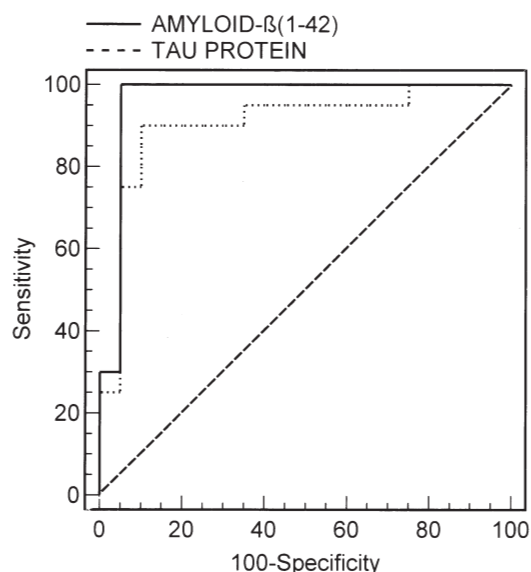


Figure 1. ROC analysis of A β_{1-42} and tau protein

plates (AffiGene APOE, Sangtec Medical, Bromma, Sweden). SAP and C1q were determined with sandwich-type ELISAs using monoclonal antibodies as catching antibodies and biotinylated polyclonal antibodies for detection.

The mean level of A β ₁₋₄₂ in CSF was significantly reduced in patients as compared to controls. With a cut-off value of 716 ng/l, determined by ROC analysis, we achieved a sensitivity of 100% (83%-100%) at a specificity of 95% (73%-100%). For tau protein we found with a cut-off value of 360 ng/l a sensi-

tivity of 90% (67%-98%) at a specificity of 90% (67%-98%). The apoE ϵ ₄ allele was found in 2 controls (specificity=90%; 67%-98%), and 14 AD patients (sensitivity=70%; 46%-87%). For SAP as well as for C1q in CSF we could not show any difference in mean levels between patients and controls.

Conclusions: Our results confirm the usefulness of determination of CSF A β ₁₋₄₂ and tau protein concentrations for early diagnosis of AD. ApoE genotyping may be helpful, but SAP and C1q determinations in CSF don't contribute in diagnosing AD.

Hart- en vaatziekten

056. Oxidative stress in urine and kidney function in off-pump vs. on-pump coronary artery bypass grafting

W.B. GERRITSEN¹, W.-J.P. van BOVEN², L.P. AARTS³ and F.J. HAAS¹

Department of Clinical Chemistry, Thorax Surgery and Anesthesiology, Sint Antonius Hospital, The Netherlands

In off-pump CABG only regional warm ischemia of the heart may occur when there is impaired collateral coronary flow (technique with temporary coronary occlusion), whereas in conventional CABG with ECC global cold ischemia of the whole myocardium occurs. Besides this the ischemic time is much longer in conventional CABG.

Indices for oxidative stress and kidney function were measured in 20 patients undergoing conventional CABG with ECC (group I) and in 20 patients undergoing off-pump CABG (group II). In order to demonstrate the difference in myocardial damage due to ischemia and reperfusion injury in both techniques the following purines: hypoxanthine, xanthine, uric acid and malondialdehyde were measured in urine. Besides this, kidney function was monitored in both groups by mea-

suring uric acid and creatinine in urine and plasma. Statistical analyses was performed using repeated measures ANOVA. It demonstrates a trend over time ($p < 0.05$) for all parameters measured in group I and II except for creatinine and uric acid in urine and plasma of patients belonging to group II.

In contrast to group I, purines are only slightly increased in group II, which suggests less myocardial reperfusion damage in the off-pump group. Besides this, the urinary creatinine excretion remains constant in group II, whereas it is impaired on arrival on intensive care unit in group I.

Overall we can conclude that only mild oxidative stress occurs in patients undergoing off-pump CABG and that the renal function of those patients remains constant.

057. Cardioprotection by C1-inhibitor in dogs with coronary occlusion and in patients with acute myocardial infarction (AMI)

A. KLEINE¹, M. van DIEIJEN-VISSER¹, C. de ZWAAN¹, M. TISSING², J. GLATZ¹, E. HACK² and W. HERMENS¹

University Hospital and Cardiovascular Research Institute Maastricht, Maastricht¹, and Central Laboratory of the Bloodtransfusion Service, Amsterdam²

C1-esterase inhibitor (C1inh) inhibits the classical pathway of complement activation and has recently been shown to reduce acute myocardial ischemia/reperfusion injury in rats, cats and pigs. We studied the long-term effects of C1inh after permanent and temporary coronary occlusion in 44 dogs. In addition, plasma activities of fatty-acid binding protein (FABP) and myoglobin (MYO) were frequently measured in 8 patients who received C1inh after AMI, and in 20 control patients. All patients received thrombolytic therapy between 1 and 2 h after onset of symptoms of AMI.

Dogs with permanent coronary occlusion received two i.v. doses of 1000 U of human C1inh, 2 and 10-12 h after occlusion. After 48 h this treatment improved myocardial flow recovery in the ischemic area from 19% to 43% ($p < 0.0001$) and myocardial alpha-hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH) content from 29% to 42% ($p < 0.0001$). However, these effects were lost after 72 h of permanent occlusion. The loss of effects could be prevented by activation of C1inh with dextran sulfate

(DXS). In the reperfusion model with 90 min of occlusion and 72 h of reperfusion, a single dose of 2000 U C1inh, given 10 min before reperfusion, improved flow recovery from 17% to 30% ($p = 0.019$) and HBDH content from 19% to 29% ($p < 0.001$). DXS had no additional effects. Patients with AMI received an initial bolus of 100 U/kg of C1inh 6 h after onset of symptoms, followed by continuous infusion of 1.25 U/kg/h during 48 h. This regimen was well tolerated. In patients treated with C1inh, plasma concentrations of FABP and MYO, expressed in the pre-treatment values, showed earlier normalization.

The large beneficial effects of C1inh after permanent coronary occlusion in dogs suggest that late administration of C1inh may be more important for cardioprotection than late reperfusion. On the other hand, reperfusion apparently shortens the time of evolving necrosis. This implies that in non-reperfused hearts prolonged administration of C1inh may be required. The presented results in patients warrant further investigation.

058. Evaluatie van de Orion ultrasensitieve CRP op de Hitachi 912

G. BELTMAN en K. MIEDEMA

Klinisch chemisch laboratorium, Isala klinieken, locatie Weezenlanden, Zwolle.

In de cardiologie wordt steeds duidelijker dat het C-Reactive Protein(CRP) een onafhankelijke risicoparameter is voor de stratificatie van patiënten lijdend aan hart- en vaatziekten. Zowel morbiditeit als mortaliteit zijn gecorreleerd met de hoogte van eerder gemeten CRP-spiegels. Echter, de range waarin deze (normale) spiegels liggen zijn aanzienlijk lager dan met

de gebruikelijke CRP-bepalingen haalbaar is, vandaar dat wordt gesproken over een 'gevoelige' CRP-bepaling. In de afgelopen maanden zijn de eerste gevoelige CRP-bepalingen op de markt gekomen. Wij onderzochten de analytische kwaliteiten van een nieuwe, gevoelige, CRP-bepaling van de firma Orion, uitgevoerd als een routine bepaling op een Hitachi 912.

Voor zover er een methodevergelijking kon worden uitgevoerd met de tot nu toe gebruikte methode (Tinaquant CRP van Roche) werd duidelijk dat, ondanks een gelijke primaire calibratie op CRM 470 er sprake is van een significant verschil tussen beide methoden. Er werd nl. een correlatie gevonden van: $y_{\text{Orion}} = 0,6894 x_{\text{Roche}} - 0,712$. Met de Orion ultrasensitieve CRP kon een onderste detectiegrens worden bepaald van 0,10 mg/l, terwijl de bepaling lineair is tot 10 mg/l. De within-run CV is 12,2 % bij een gem. CRP van 0,42 mg/l, terwijl de between-run CV 1,8 % is bij een gem. CRP van 3,96 mg/l en 5,9 % is bij een gem. CRP van 1,94 mg/l. Deze reproduceerbaarheid is redelijk en komt goed overeen met de gegevens in de

documentatie van de firma. Bij een drietal patiënten populaties is vervolgens het CRP-gehalte bepaald, namelijk bij een zgn. niet-cardiologische populatie (spreiding 0,41-3,47 mg/l), bij patiënten opgenomen voor een electieve Dotterprocedure (spreiding 0,23-43,94 mg/l) en bij patiënten opgenomen met een acuut hartinfarct (spreiding 0,16-49,14 mg/l). Geconcludeerd kan worden dat een gevoelige CRP-bepaling op routinematige apparatuur voorhanden is; onderzocht zal echter nog moeten worden wanneer er een initiële CRP-waarde moet worden bepaald en hoe deze ingepast kan worden in de preventie en risicofratificatie van patiënten met hart- en vaatziekten.

059. Unexplained absence of CK-MB_{mass} mainly caused by post-mortem denaturation

M.L. MULLER-BOUMANS¹, J.H.C. DIRIS², G.G.G. LEDOUX², M. NAP³, P.H.H.M. THEUNISSEN³, W.T. HERMENS¹ and M.P. van DIEIJEN-VISSER²
Cardiovascular Research Institute Maastricht University Maastricht¹, Department of Clinical Chemistry, University Hospital, Maastricht², and Department of Pathology, Atrium Medical Center Heerlen, The Netherlands³.

Increased creatine kinase (CK; EC2.7.3.2) isoenzyme MB, determined by activity (CK-MB_{act}) or mass (CK-MB_{mass}) methods, is considered as an important marker for diagnosis of acute myocardial infarction (AMI). CK-MB_{mass} has performed equally well in ruling out AMI or in risk stratification after AMI, compared to the heart-specific markers troponin T or troponin I. However, in myocardial biopsies and autopsies with normal total CK activities, CK-MB activities vary from near zero to about 30% of total CK activity. Comparable variations have been found for CK-MB_{mass} methods. Until now most studies suggest that the large variations found in CK-MB content can be clarified from the so-called fetal shift. This is, a genetic adaptation of the cardiac tissue, controlled by tissue oxygenation, resulting in an isoenzyme shift towards more CK-MB. Because previous reports have given inconsistent results, we examined if inactivation of CK-MB in autolyzing myocardium or the suggested fetal shift could clarify the discrepancies described in the literature. To do so CK-MB_{mass} and CK-MB_{act} were measured in both normal and diseased myocardium obtained at autopsy. CK-MB_{mass}, CK-MB_{act}, HBDH, LDH and LDH-isoenzymes were measured at 20 different locations in 16 human hearts obtained by autopsy (16 samples from the left ventricle, 2 from the right ventricle and 2 atrial appendices samples). Five hearts were classified as normal hearts (no history of heart dis-

ease, n=5) and in the other hearts there was either hypertrophy or a history of ischemic heart disease (AMI). CK-MB_{mass} and HBDH were also measured in 169 heparinized plasma samples from patients with AMI.

A good correlation was found between cumulative CK-MB_{mass} and HBDH release in plasma of 169 AMI patients ($r=0.77$). In all cardiac autopsy samples of the left ventricles, both normal and diseased myocardium, a good correlation was found between total CK and HBDH ($r=0.69$, $n=256$), indicating simultaneous release of the enzymes from the heart after AMI. In these samples no correlation at all was found between HBDH and CK-MB_{mass} ($r=0.02$, $n=256$). Moreover, in the five normal hearts both low and high percentages of CK-MB were found and in the overall group no relation between hypertrophy and CK-MB (%) was found. For some hearts, both normal and diseased, large differences in percentages CK-MB were found at different locations of the left ventricle.

Moreover, in vitro experiments showed that in contrast to HBDH, CK-MB (both mass and activity) is highly susceptible to pH changes in cardiac tissue.

Therefore, we conclude that the large variations in CK-MB content and especially the absence of CK-MB in normal cardiac tissue is mainly caused by post-mortem inactivation of CK-MB.

060. Evaluation of the Triage Cardiac Panel as point of care testing device for cardiac markers

J.C.J.M. SWAANENBURG, S.A. van den BROEK, H. de WIT
University Hospital Groningen, Hanzeplein 1, 9713 GZ Groningen, The Netherlands

Introduction: Recently, the National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) recommended: -the use of troponin I or troponin T as specific marker for myocardial injury instead of CKMB; - target turn around times of cardiac markers of 1 h or less (otherwise point of care testing (POCT) should be considered); - the use of two decision limits (a low abnormal value for establishing myocardial injury, and a higher value suggestive of injury to the extent of qualifying AMI). We investigated the performance of the TriageTM analyser as POCT device versus the central laboratory equipment (AxSYM™).

Patients and methods: From 78 patients 108 measurements of cardiac troponin I, CKMB mass, and myoglobin were performed on the Triage analyser (Biosite Diagnostics, manufactured by Merck, Amsterdam, The Netherlands) and on the AxSYM analyser (Abbott Diagnostic Division, Amstelveen, The Netherlands).

Results: The correlations between both methodologies were for troponin I : Triage = 0.09 * AxSYM + 0.08, coeff. of correlation (r)=0.922; for CKMB mass : Triage = 0.73 * AxSYM + 1.08, $r=0.979$; and for myoglobin : Triage = 1.15 * AxSYM + 29, $r=0.877$.

A cut off value for AMI of troponin I of 0.40 ng/ml correlates better with the established value of the AxSYM of 2.0 ng/ml (efficiency 95.4%) than the recommended value of the manufacturer of 1.0 ng/ml (efficiency 88.9%). The lower cut off value for myocardial injury is for the Triage 0.20 ng/ml, whereas this value for the AxSYM is 0.5 ng/ml (efficiency 92.6%).

Conclusion: The Triage analyser showed moderate correlations with the AxSYM analyser. Furthermore, the recommended cut off value for AMI should be 0.40 ng/ml and the cut off value for myocardial injury should be 0.20 ng/ml.

061. Evaluation of the Stratus CS analyser as point of care testing device for cardiac markers

J.C.J.M. SWAANENBURG, S.A. van den BROEK and H. de WIT
University Hospital Groningen, Hanzeplein 1, 9713 GZ Groningen, The Netherlands

Introduction: Recently, the National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) recommended: -the use of troponin I or troponin T as specific marker for myocardial injury instead of CKMB; - target turn around times of cardiac markers of 1 h or less (otherwise point of care testing (POCT) should be considered); - the use of two decision limits (a low abnormal value for establishing myocardial injury, and a higher value suggestive of injury to the extent of qualifying AMI). We investigated the performance of the Stratus CSTM analyser as POCT device versus the central laboratory equipment (AxSYM™).

Patients and methods: From 136 patients 197 measurements of cardiac troponin I, CKMB mass, and myoglobin were performed on the Stratus analyser (Dade Behring, Leusden, The Netherlands) and on the AxSYM analyser (Abbott Diagnostic Division, Amstelveen, The Netherlands).

Results: The correlations between both methodologies were

for troponin I : Stratus = $0.21 * AxSYM + 0.05$, coeff. of correlation (r)=0.943; for CKMB mass : Stratus = $0.73 * AxSYM - 0.19$, $r=0.993$; and for myoglobin : Stratus = $0.75 * AxSYM + 1.9$, $r=0.988$.

A cut off value for AMI of troponin I of 0.5 ng/ml correlates better with the established value of the AxSYM of 2.0 ng/ml (efficiency 95.9%) than the recommended value of the manufacturer of 1.5 ng/ml (efficiency 87.3%). The lower cut off value for myocardial injury is for the Stratus 0.15 ng/ml, whereas this value for the AxSYM is 0.5 ng/ml (efficiency 92.9%).

Conclusion: The Stratus CS analyser showed for the measured cardiac markers acceptable correlations with the AxSYM analyser. However, the recommended cut off value for AMI should be 0.5 ng/ml and the cut off value for myocardial injury should be 0.15 ng/ml.

062. Patients with systemic vasculitis have increased levels of autoantibodies against oxidized LDL

B.P. SWETS^{1,2}, D.A.J. BROUWER² and J.W. COHEN TERVAERT¹
Department of Internal Medicine, Division of Clinical Immunology¹, Pathology and Laboratory Medicine²; University Hospital Groningen

Oxidation of low density lipoproteins (LDL) is considered to play an important role in atherosclerosis development. Increased levels of autoantibodies against oxidized LDL (Ox-LDL) have been found in patients with various manifestations of atherosclerosis. Since patients with vasculitis are prone to atherosclerosis development and since production of radical oxygen species in these patients may result in increased production of Ox-LDL, we hypothesized that antibodies against Ox-LDL are elevated during lesion development in vasculitis. To study this, we developed an ELISA in which malondialdehyde modified LDL was coated to microtiter plates. Thus, we determined levels of autoantibodies against Ox-LDL in 25 patients with ANCA-associated vasculitis and in 42 healthy

controls. Autoantibody reactivities against Ox-LDL were significantly higher in patients than in controls ($P = 0.0001$). A significant correlation was found between the autoantibody reactivities against Ox-LDL and serum levels of vitamin C ($R = -0.5809$; $P = 0.0072$). The levels of autoantibodies against Ox-LDL were also measured in 11 patients during active disease and in these patients during complete remission. Autoantibody reactivities against Ox-LDL were significantly higher in patients during active disease than during full remission ($P = 0.001$). The data suggest that patients with ANCA-associated vasculitis are more susceptible to oxidation of LDL, which may be related to accelerated atherosclerosis.

063. Plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) increases after oral methionine loading

T. TEERLINK and S. de JONG
Department of Clinical Chemistry, Academic Hospital Vrije Universiteit, Amsterdam

Background: Homocysteine is a risk factor for atherothrombotic disease, although the underlying pathogenic mechanism is not fully understood. An acute increase of plasma homocysteine during methionine loading is accompanied by a transient impairment of vascular function as measured by diminished flow-mediated vasodilatation. This suggests that homocysteine has an acute effect on the vascular endothelium by inhibition of nitric oxide synthase (NOS).

Hypothesis: Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is an endogenous inhibitor of endothelial NOS. ADMA synthesis from arginine requires incorporation of two methylgroups and thus during synthesis of ADMA two equivalents of methionine are consumed. It is therefore conceivable that methionine loading stimulates ADMA synthesis, leading to inhibition of endothelial NOS.

Subjects and methods: Subjects were ten randomly chosen patients, referred to the laboratory for a methionine loading

test. Plasma samples, taken before and 6 hours after oral administration of methionine (0.1 g/kg body weight), were analysed for ADMA and arginine by HPLC.

Results: Plasma levels of ADMA increased from 0.48 ± 0.07 μM pre-load to 0.52 ± 0.07 μM 6h post-load ($P=0.002$; paired t-test). Arginine levels decreased from 91 ± 22 μM pre-load to 87 ± 20 μM at 6h post-load (NS). The Arginine/ADMA ratio dropped from 192 ± 54 pre-load to 170 ± 38 postload ($P=0.04$).

Conclusions: In accordance with our hypothesis, ADMA levels increased after methionine loading, resulting in 11% reduction of the arginine/ADMA ratio. It should be considered that intracellular ADMA levels are an order of magnitude higher than plasma levels. The changes observed in plasma may therefore underestimate the intracellular changes. We conclude that inhibition of endothelial NOS by ADMA may contribute to the acute impairment of vascular function during methionine loading.

064. Analysis of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in biological samples by HPLC

T. TEERLINK and S. de JONG

Department of Clinical Chemistry, Academic Hospital Vrije Universiteit, Amsterdam

Background: Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is an endogenous inhibitor of endothelial nitric oxide synthase (NOS). Increased plasma levels of ADMA are seen in conditions associated with premature atherosclerosis, e.g. renal failure, hypercholesterolemia, and hypertension. To study the role of ADMA in the pathogenesis of atherosclerosis we have developed an HPLC method for the analysis of ADMA in plasma, urine, and tissue extracts.

Methods: After addition of internal standard (monomethylarginine), sample cleanup was performed by solid-phase extraction on small cation-exchange columns (Oasis MCX from Waters). Following removal of neutral and acidic compounds, basic amino acids were eluted with methanol/ammonia. After evaporation under nitrogen, amino acids were derivatized with ortho-phthalaldehyde reagent containing mercaptopropionic acid. The resulting fluorescent derivatives were separated by reversed-phase HPLC using isocratic elution.

Results: Arginine, ADMA and symmetric dimethylarginine (SDMA) were separated within 20 min with baseline resolution. Recovery after solid-phase extraction was $102.6 \pm 0.7\%$ and $100.1 \pm 0.3\%$ using plasma samples ($n=6$) spiked with 1 and 10 μM ADMA, respectively. The between-run CV, determined by analyzing a plasma pool on 13 occasions over a two-month period, was 1.7%. Plasma levels in healthy volunteers ($n=37$) were $0.43 \pm 0.06 \mu\text{M}$ (range 0.32 – 0.55 μM) for ADMA and $0.48 \pm 0.08 \mu\text{M}$ (range 0.34 – 0.78 μM) for SDMA. Using a sample volume of 0.2 ml the detection limit was below 0.05 μM .

Discussion: The HPLC method developed allows the simultaneous analysis of arginine, ADMA and SDMA. Due to its high precision it is suitable for application in clinical studies. In addition, as the sample volume required is small, plasma or tissue obtained from small laboratory animals can be analyzed.

Interne Geneeskunde

065. Pro-calcitonine in de intensive care unit: de oplossing voor een diagnostisch dilemma?

R. BAUMGARTEN¹, A.-C. de PONT², M.J.E. van PUYENBROEK², B. SPEELBERG² en N.C.V. PÉQUÉRIAUX.¹

Centraal Klinisch Chemisch¹ en Hematologisch Laboratorium² & afdeling Intensive Care, St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg.

Bij ernstig zieke patiënten bestaat er behoefte aan een betere parameter dan bijvoorbeeld het CRP, de bezinking of het aantal leukocyten, om inzicht te krijgen in de oorzaak van koorts. Bij deze groep patiënten is het namelijk vaak moeilijk onderscheid te maken tussen een systemische ontsteking of een (bacteriële) infectie (sepsis). Daarbij moet de 'ideale' parameter zowel bij seriële als eenmalige meting de benodigde informatie geven, terwijl de bepaling cito moet kunnen worden uitgevoerd. Er zijn aanwijzingen dat Procalcitonine (PCT), een voorloper van het calcitonine, deze belangrijke additionele diagnostische informatie zou kunnen geven, omdat onder meer in vitro is aangetoond dat het vrijkomen van PCT getriggerd wordt door bacteriële producten (endotoxines).

In een pilot-studie hebben we bij 35 intensive-care patiënten de PCT gemeten (totaal 53 metingen m.b.v. niet-geautomatiseerde immunoluminometrische assay). Als gouden standaard voor de diagnose sepsis werden klinische consensus criteria

(inclusief microbiologische gegevens) gebruikt. Retrospectief werd gekeken naar de diagnostische specificiteit en sensitiviteit van PCT met en zonder CRP. Bij een cut-off waarde $\text{PCT} > 3,0 \text{ ng/ml}$ bedroeg de sensitiviteit 54%, de specificiteit 90%, de positief voorspellende waarde 64% en de negatief voorspellende waarde 86%. De sensitiviteit van $\text{CRP} > 50 \text{ mg/l}$ bedroeg 100%, met een specificiteit van 35%. De combinatie van CRP en PCT gaf een sensitiviteit van 54% en een specificiteit van 10%. De voorspellende waarde t.a.v. mortaliteit bedroeg 46%. Op basis van deze pilotstudie kan geconcludeerd worden dat PCT, al dan niet in combinatie met CRP, niet veel extra diagnostische informatie geeft bij een patiënt met koorts, wanneer klinische consensus criteria worden gebruikt als gouden standaard voor sepsis. Daarbij is de bepaling van PCT bewerkelijk, tijdrovend en lijkt daardoor niet geschikt als cito bepaling.

066. Bepaling albumine/kreatinine ratio in urine met behulp van de Clinitek 50

O. BEKERS, M.P.J. SCHMITZ, M.E.I. ROOX-HUSKENS en M.P. van DIEIJEN-VISSER

Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch ziekenhuis, Maastricht

Inleiding: Microalbuminurie is een risicofactor voor het ontwikkelen van nierschade. Patiënten met bijvoorbeeld diabetes mellitus en hypertensie zijn primaire risicogroepen. In de huidige studie is een nieuwe teststrip waarmee de urine albumine en kreatinine concentratie semi-kwantitatief bepaald kan worden vergeleken met een immuno-nefelometrische methode voor albumine en een chemische methode voor kreatinine.

Methode: Voor de bepaling van de dipstick methode is gebruik gemaakt van de Clinitek[®] 50 (Bayer) met de Clinitek[®] Microalbumine strip. De immuno-nefelometrische albumine bepaling is verricht met een Array[®] 360 System (Beckman Coulter) en de kreatinine concentratie is bepaald met de Jaffé methode op een Synchron[®] CX7 (Beckman Coulter).

Resultaten: De resultaten van de albumine/kreatinine ratio van de Clinitek[®] 50 worden weergegeven in ranges, t.w. $< 3,4 \text{ mg/mmol}$ (normaal), $3,4\text{-}33,9 \text{ mg/mmol}$ (afwijkend) en $> 33,9$

mg/mmol (zeer afwijkend). Tevens geeft de Clinitek[®] 50 de waarden voor albumine als volgt weer: 10; 30; 80 of 150 mg/l en voor kreatinine als: 0,9; 4,4; 8,8; 17,7 of 26,5 mmol/l . De discrete waarden bepaald op de Array[®] en CX7 zijn gebruikt als referentie.

Er zijn 224 patiëntenmonsters vergeleken. De cut-off waarde voor de albumine/kreatinine ratio is gesteld op 3,4 mg/mmol . De gevonden specificiteit bedraagt dan 87% en de sensitiviteit 81%; de positief voorspellende waarde 67% en de negatief voorspellende waarde 93%. Tevens zijn de microalbumine en de kreatinine concentraties afzonderlijk vergeleken, de regressiecoëfficiënten bedragen respectievelijk 0,89 en 0,81.

Conclusie: Gezien bovenstaande lijkt de semi-kwantitatieve microalbumine/kreatinine ratio bepaling met de Clinitek[®] 50 een redelijk alternatief voor de screening op microalbuminurie.

067. De serum-transferrine receptor: Een 'pilot-vervolgstudie' bij 13 chronische hemodialysepatiënten in het Albert Schweitzerziekenhuis

P. BERENDES¹, G.M.T. de JONG² en W. van GELDER¹.

Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Afdeling Interne Geneeskunde², Albert Schweitzerziekenhuis, Dordrecht

In het Albert Schweitzerziekenhuis worden jaarlijks ongeveer 100 chronische hemodialysepatiënten behandeld. Bij de meeste patiënten met een (pre-)terminale nierinsufficiëntie ontstaat na verloop van tijd anemie. Ofschoon deze anemie multifactorieel bepaald is, geldt de verminderde endogene productie van erythropoëtine als belangrijkste oorzaak van de anemie bij chronische hemodialysepatiënten.

Als gevolg van de behandeling met recombinant humaan erythropoëtine (r-HuEPO) ontstaat, door de verhoogde erythrocyten-aanmaak, bij het merendeel van de patiënten ijzergebrek. Het is daarom belangrijk de ijzerstatus nauwkeurig: a) vast te stellen voordat met r-HuEPO begonnen wordt en b) te vervolgen gedurende de therapie met r-HuEPO. Met de gangbare anemieparameters is ijzergebrek bij chronische hemodialysepatiënten echter niet goed vast te stellen. Volgens het huidige behandelprotocol in het Albert Schweitzerziekenhuis wordt ijzergebrek aangenomen bij een ijzersaturatie kleiner dan 20% en/of een ferritineconcentratie kleiner dan 100 µg/l.

Een relatief nieuwe parameter voor ijzergebrek de serumtransferrine receptor (sTfr) weerspiegelt de ijzerbehoefte van het erythropoëtische compartiment (bij ijzergebrek is de sTfr-concentratie verhoogd). Ook de sTfr/log(ferritine)-ratio zou, als

afgeleide parameter, kunnen bijdragen aan de diagnose ijzergebrek.

Gedurende een jaar werden maandelijks sera van de chronische dialysepatiënten verzameld om, na afloop van de studie, de serum-transferrine receptorwaarden te correleren aan de overige anemieparameters. Deze pilotstudie beschrijft de resultaten bij 13 hemodialysepatiënten waarbij de anemie gedurende het onderzoek werd behandeld met ijzersuppletie en/of recombinant humaan erythropoëtine (r-HuEPO).

Uit de voorlopige resultaten van deze studie blijkt, dat bij een verlaagde sTfr/log(ferritine)-ratio, de anemie bij chronische dialysepatiënten doorgaans goed reageert op behandeling met r-HuEPO. Veelal stijgen de sTfr-concentratie en de sTfr/log(ferritine)-ratio na r-HuEPO-toediening. Veranderingen in de sTfr-concentratie en de sTfr/log(ferritine)-ratio treden daarbij doorgaans sneller op dan veranderingen in de overige anemieparameters (m.n. Hb en Ht). De sTfr-bepaling en de sTfr-Log(ferritine)-ratio lijken daarmee goede parameters om het effect van r-HuEPO, alsmede de ijzerbehoefte, te voorspellen.

Voorlopige conclusie: zowel de serum-transferrine receptor als de serum-transferrine receptor/log(ferritine)-ratio lijken bruikbaar bij de diagnostiek van anemie bij chronische hemodialyse.

068. Fulminante lactaatacidose en hyperfosfatemie bij een alcoholicus: denk aan vitamine B1-deficiëntie

J.J.H. HENS¹, J. PRINS², A.K.M. BARTELINK³ en J.P.M. WIELDERS¹

Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en afd. Inwendige Geneeskunde³, Ziekenhuis Eemland, Amersfoort; Laboratorium Algemene Klinische Chemie, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam².

Een 47-jarige, comateuze man werd op de afdeling intensive care opgenomen met een ernstige metabole acidose, hypoglycemie en hyperfosfatemie (tabel 1:T=0). De acidose bleek samen te hangen met een extreme accumulatie van lactaat (22,0 mmol/l) ten gevolge van een tekort aan vitamine B1 (55 nmol/l) bij chronisch overmatig alcoholgebruik (koolhydraat-deficiënt transferrine (CDT) sterk verhoogd). Correctie van de metabole aandoeningen resulteerde aanvankelijk in een klinische verbetering van de patiënt (tabel: T=18). Echter twee weken na opname trad secundair multipel orgaanfalen op waarna de patiënt overleed.

Cardiale beriberi komt in de Westerse landen het frequentst voor bij patiënten met vitamine B1-deficiëntie op basis van overmatig alcoholgebruik. Thiaminepyrofosfaat, de actieve vorm van vitamine B1, is als prosthatische groep belangrijk voor de transketolase-activiteit en decarboxylering van o.a. pyruvaat en α -ketoglutarate in het koolhydraatmetabolisme. Bij onze patiënt waren de voor beriberi beschreven cardiomyopathie en oedemen niet aantoonbaar. Ook de shocktoestand kon grotendeels worden toegeschreven aan hypovolemie ten gevolge van braken en hematemesis. Wel een duidelijk kenmerk bij beriberi is de fulminante lactaatacidose, waarbij zich bij

onze patiënt tevens een mogelijk acuut ontstane hyperfosfatemie voordeed. In Westerse landen dient men derhalve bedacht te blijven op het bestaan van een vitamine B1-deficiëntie bij patiënten die bekend zijn met chronisch overmatig alcoholgebruik en zich presenteren met een ernstige metabole acidose maar waarbij het klassieke klinische beeld van beriberi niet eenduidig is. Dit temeer daar suppletie van thiamine doorgaans in een snelle klinische verbetering resulteert van deze ernstige metabole ontregeling, die onbehandeld een hoge mortaliteit kent.

Tabel 1. Laboratoriumgegevens op T=0 en T=18

Tijdstip (uren)	T=0	T=18
pH arterieel bloed	6,90	7,36
pCO ₂ (kPa)	4,0	6,1
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	6	25
Glucose (mmol/l)	2,8	14,8
Fosfaat (mmol/l)	5,69	0,60
Calcium (mmol/l)	2,12	1,57

069. Determination of creatinine in peritoneal dialysis patients

F.J.M. BERGKAMP¹, J. PRINS², J.C. KOREVAAR³, R.T. KREDIET⁴, F.W. DEKKER³, J.P.M.C. GORGELS¹ and G.T.B. SANDERS²

Dept of Clin. Chem. Kennemer Gasthuis, Haarlem¹; Dept of Clin Chem²; Dept of Clin.Epidemiol & Biostat³; Dept of Nephrology, Academic Medical Center, Amsterdam, the Netherlands⁴

It is well known that non-creatinine Jaffé-reacting chromogens, like acetone, ascorbic acid, glucose, protein and α -keto acids, interfere in the Jaffé reaction for the determination of creatinine in plasma. Enzymatic methods (using e.g. creatinine hydrolase or creatininase) are less sensitive for interference by these compounds and the results obtained with the enzymatic method

closely resemble the results produced by the HPLC reference method. However, many laboratories still use the picrate Jaffé reaction, mainly for economical reasons. The aim of the present study was to compare the various creatinine methods used in a study of uremic patients. This was done in the NECOSAD population.

This Netherlands Cooperative Study on the Adequacy of Dialysis is a prospective cohort study on outcome determinants of hemodialysis and peritoneal dialysis in patients starting chronic dialysis treatment. Thirty-eight dialysis centers participate in this study. Several patient parameters are recorded at the inclusion of the patient, 3 and 6 months after start of the dialysis and subsequently repeated every 6 months. These parameters include demography, comorbidity, blood pressure, drug use, kidney function and quality of life. Creatinine in plasma, urine and peritoneal fluid were determined to calculate renal and peritoneal creatinine clearances for assessment of the adequacy of dialysis. To cope with the interlaboratory variability induced by matrix effects, determinations of creatinine in these materials were performed both at the local laboratory and in a central laboratory (Academic Medical Center Amsterdam). We studied the relationship between the different creatinine methods used by the participating laboratories in these materials and compared them with the results from the centrally performed enzymatic method (creatinine PAP+; Hitachi analyzer Roche Diagnostics) in the Academic Medical Center Amsterdam.

070. Preservatie van CAPD-vloeistof voor een snelle opsporing van peritonitis

W. van der MEER, E. MAASLAND, M.H. de KEIJZER, L.A.H. MONNENS en J.L. WILLEMS
564 Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium en afdeling kinder nefrologie, UMC St Radboud, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen

Eén van de niervervangende therapieën is continue ambulante peritoneale dialyse (CAPD), een vorm van dialyse, die als regel thuis wordt toegepast. Hierbij wordt door middel van een katheter in de buikholte dialysevloeistof gebracht, waarbij het peritoneum als dialysemembraan gebruikt wordt. Tijdens het dialyseren is peritonitis één van de belangrijkste en gevaarlijkste complicaties. Daarnaast kan door de kunststof katheter een allergische reactie ontstaan. Bij verdenking hierop dient de patiënt naar het ziekenhuis te gaan om de CAPD-vloeistof te laten controleren op de aanwezigheid van leukocyten. In dit onderzoek wordt een patiëntvriendelijke methode gezocht en geëvalueerd om CAPD-vloeistof, die na het dialyseproces uit de buik stroomt, gedurende enige dagen te conserveren. Gedurende vier tijdstippen (dag 0, 1, 2 en 3) is het aantal cellen en de morfologie van de cellen bestudeerd bij drie verschillende fixatievloeistoffen (methanol, RPMI en CellFIX™). Hiertoe zijn granulocyten geïsoleerd en aan CAPD-vloeistof toegevoegd, waarna de leukocyten zijn geteld en gedifferentieerd. Ook werden eosinofiele granulocyten geïsoleerd van een patiënt met eosinofilie.

Preliminary results in a sample of over 1100 uremic plasma samples showed an acceptable correlation between the results of creatinine determined at the local laboratories (mostly using Jaffé method) and the centrally performed Roche enzymatic method. The mean differences between both methods was 28.95 $\mu\text{mol/l}$ with a SD of 87.3 $\mu\text{mol/l}$ (range: -712 – 383 $\mu\text{mol/l}$, $R^2=0.91$). An inventory showed that most local centers apply the same Jaffé procedure for peritoneal fluid, despite the presence of high glucose concentrations (ranging from 70 to 210 mmol/l). As could be expected, a large difference in creatinine concentration in this dialysate between both methods was observed: a mean difference of 101.9 $\mu\text{mol/l}$ (SD: 155.5 $\mu\text{mol/l}$; range: -128 – 75 $\mu\text{mol/l}$). The mean dialysate creatinine concentration determined at the local centers was 548 $\mu\text{mol/l}$.

We conclude that the Jaffé picrate method is not the first method of choice for the determination of creatinine in peritoneal fluid. We strongly advise laboratories of dialysis centers to use an enzymatic method for the determination of creatinine in peritoneal fluid.

Deze monsters zijn geteld (automatische celteller) en gedifferentieerd na concentratie met behulp van een cytospin en een May-Grünwald Giemsa-kleuring. Het gebruik van 1 druppel 10x verdunde CellFIX™ (Becton Dickinson) op 2 ml CAPD-vloeistof resulteerde in een recovery na één, twee en drie dagen van respectievelijk 101, 100 en 95%. Ook het aspect van de cellen was nauwelijks veranderd. De test met de eosinofiele granulocyten leverde een nagenoeg gelijk resultaat op. Tot slot zijn tien monsters per post verstuurd om naar het effect van verzending te kijken. Bij zes monsters die na één dag aankwamen was nog 93% van de leukocyten aanwezig, bij de vier monsters die na twee dagen aankwamen bleek 95% aanwezig. Differentiatie van de leukocyten bleef in alle gevallen mogelijk. *Conclusie:* Met verdunde CellFIX™ als fixatiemedium kan CAPD-vloeistof twee dagen worden gepreserveerd, waardoor verzending per post mogelijk wordt. Hierdoor kan op een patiëntvriendelijke wijze bij een verhoogd aantal leukocyten in de dialysevloeistof snel een uitspraak gedaan worden over de aanwezigheid van een peritonitis of een allergische reactie.

071. Pathogene rol van β_3 -adrenerge receptor polymorfisme in het lipodystrofie syndroom geassocieerd met protease remmers

A.M. van OEVEREN-DYBICZ¹, C.H.H ten NAPEL² en I. VERMES¹
Laboratorium¹ en Afdeling Interne Geneeskunde², Medisch Spectrum Twente, Enschede.

HIV-proteaseremmende (PI) therapie wordt geassocieerd met perifere lipodystrofie, zich uitend in viscerale vetophoping in de onderbuik, lagere totale lichaamsvetgehalte, hyperlipidemie, hypercholesterolemie en insuline-resistentie. Meer dan 64% van patiënten met HIV-PI therapie ontwikkelen het lipodystrofie syndroom (LDS), hetgeen kan predisponeren voor het ontstaan van hart- en vaatziekten.

Viscerale vetzucht is geassocieerd met het polymorfisme in de β_3 -adrenerge receptor (β_3 -AR). Deze receptor komt tot expressie in visceraal vet en is betrokken bij door catecholaminen geregelde lipolyse en thermogenese. Het polymorfisme van het β_3 -AR-gen manifesteert zich als substitutie van het aminozuur tryptofaan door arginine op codon 64 (Trp64Arg).

In dit onderzoek is gekeken of er samenhang bestaat tussen β_3 -AR polymorfisme en het HIV lipodystrofie syndroom. Er zijn 239 individuen getest. Naast de controlegroep van 200 HIV-negatieve individuen waren er 22 individuen met LDS en 17

zonder LDS, geselecteerd uit een groep van 95 patiënten met HIV die behandeld zijn met PI-therapie. Het DNA is geïsoleerd uit EDTA-bloed m.b.v. QIAamp blood kit (Qiagen, Chatsworth, CA). Het Trp64Arg polymorfisme in het β_3 -AR gen is vastgesteld m.b.v. de polymerase kettingreactie (PCR), gevolgd door restrictie-fragmentanalyse.

De allelfrequentie van Arg64 was in de HIV-positieve patiëntengroep met LDS hoger (13,6%) ten opzichte van de HIV-positieve patiëntengroep zonder LDS (5,9%) en de controlegroep (5%) ($p<0.005$). De meerderheid van de patiënten met HIV had hyperlipidemie, hypercholesterolemie en een verhoogde bloedsuiker-spiegel, maar er lijkt geen associatie aanwezig te zijn met het polymorfisme van β_3 -AR. De verkregen resultaten suggereren dat de Trp64Arg mutatie in het β_3 -AR gen het ontwikkelen van de PI-geassocieerde lipodystrofie syndroom in HIV patiënten zou kunnen bevorderen.

072. Amadori-Albumin in Type 1 Diabetic Patients Correlates with Markers of Endothelial Function and Associates with Diabetic Nephropathy

C.G. SCHALKWIJK^{1,2}, L. TARNOW³, H-H. PARVING³, V.W.M. van HINSBERGH² and C.D.A. STEHOUWER².
Department of Clinical Chemistry¹ and Institute for Cardiovascular Research² Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands; Steno Diabetes Center³, Gentofte, Denmark

Non-enzymatic glycation is increased in diabetes. The role of early glycation Amadori-modified proteins, which is the predominant form of glycated proteins, has not been systematically investigated in humans. We developed an antiserum against glycated human serum albumin and used this to study the role of early glycation products in vascular complications in type 1 diabetic patients. With a competitive Elisa, Amadori-albumin levels in plasma of type 1 diabetic patients (n=55) were found to be significantly elevated as compared with those of healthy controls (n=60) (39.2±9.9 vs. 20.9±4.0 U/ml, p<0.0005). Amadori-albumin correlated with levels of plasma markers of endothelial function: van Willebrand factor (r=0.29, p<0.05) and vascular cell adhesion molecule-1 (r=0.41, p<0.005), but not sE-selectin. To investigate the role of Amadori-albumin in diabetic nephropathy, plasma levels of Amadori-albumin were determined in a second group of a well characterised type 1 dia-

betic patients with long-standing diabetes with (n=199) or without (n=192) diabetic nephropathy. Patients with nephropathy had higher Amadori-albumin levels than did those without nephropathy (50.9±9.5 vs. 45.1±6.3 U/ml, p<0.0005). Age-, sex-, and diabetes-duration-adjusted analyses showed the presence of nephropathy to be significantly associated with Amadori-albumin with an odds ratio (OR [95% confidence interval]) of 1.11 (1.08-1.15) per U/ml increase. After additional adjustment for levels of creatinine, glycated hemoglobin, cholesterol, triglycerides, blood pressure, pre-existent retinopathy and cardiovascular disease, Amadori-albumin continued to be significantly associated with nephropathy (OR: 1.06[1.01-1.11]) per U/ml increase.

Our results are consistent with a proposed pathophysiological role of Amadori-albumin in micro-vascular complications of type 1 diabetic patients.

073. Correctie voor lichaamsoppervlak bij de kreatinineklaring: zin of onzin?

J. SLOMP, A.J. BAKKER, A.P. ANKER en H. STORM
Stichting Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden

De kreatinineklaring wordt algemeen gebruikt als een indicator voor de glomerulaire filtratiesnelheid van de nier. Bij de integratie van een tweetal laboratoria en de daarbij behorende afstemming van de procedures moest de vraag worden beantwoord of de kreatinineklaring al dan niet gecorrigeerd moest worden voor het lichaamsoppervlak. Een eenduidig antwoord hierop is echter niet snel te geven op basis van de literatuur. Daarom is ter inventarisatie een enquête over de kreatinineklaring gestuurd naar 130 Nederlandse ziekenhuislaboratoria en huisartsenlaboratoria. Deze enquête leverde de onderstaande resultaten op:

Correctie voor lichaamsoppervlak bij volwassenen en kinderen:	29 (36,25 %)
Correctie voor lichaamsoppervlak alleen bij kinderen	13 (16,25 %)
Geen correctie voor lichaamsoppervlak:	28 (35 %)
Correctie alleen op verzoek (bv. voor geneesmiddelspiegels):	1 (1,25 %)

Rapporteert zowel gecorrigeerde als ongecorrigeerde waarde:

Kliniek berekend zelf de klaring:	6 (7,5 %)
Klaring wordt berekend m.b.v. serumformule:	2 (2,5 %)
Totaal aantal reacties:	80

Bovenstaande resultaten en een vergelijking van gecorrigeerde en niet gecorrigeerde waarden zullen besproken worden in samenhang met de methodologische variatie, de op de formulieren vermelde argumentatie en literatuurgegevens. Vooralsnog is onze aanbeveling de kreatinineklaring niet te corrigeren voor lichaamsoppervlak, aangezien het vaak logistieke problemen geeft om gegevens omtrent gewicht en lengte te achterhalen en in de klinische praktijk vrijwel nooit een meerwaarde heeft. Geslachts- en leeftijdsafhankelijke referentiewaarden zouden mogelijk een goede aanvulling zijn voor een juiste interpretatie van de kreatinineklaring.

074. Anti-endomysium-antistoffen: de bepaling van auto-antistoffen tegen weefseltransglutaminase d.m.v. TRFIA

G. van der SLUIJS VEER, S. KOEKOEK en E.G.M. CRISTEN

Inleiding: Bij het stellen van de diagnose coeliakie is het aantonen en meten van IgA-antistoffen tegen endomysium van groot belang, vanwege de specificiteit en sensitiviteit. De klassieke bepaling d.m.v. immunofluorescentiemicroscopie heeft alle nadelen van deze techniek, terwijl het benodigde substraat, apenslokdarm, niet overvloedig beschikbaar is. Onlangs is aangetoond dat de anti-endomysiumantistoffen gericht zijn tegen het antigeen weefseltransglutaminase (tTG). Elisa's gebruikmakend van dit antigeen bleken in de klinische praktijk zeer bruikbaar. Een interessant feit is dat volgens de literatuur bij patiënten met Diabetes type I ook anti-tTG kan voorkomen. Wellicht kan dit de associatie die er bestaat tussen de auto-immunziekten coeliakie en diabetes I verklaren. Opgemerkt dient verder nog te worden dat het anti-tTG een marker zou kunnen zijn van apoptotische processen, die ook weer een relatie kunnen hebben met auto-immunziekten. Dit alles was voor ons aanleiding om een anti-tTG bepaling te ontwikkelen, waarbij gekozen werd voor een TimeResolved FluoroImmuno Assay (TRFIA).

Analytische gegevens: Als antigeen werd tTG (guinea pig) gecoat aan een microtiterplaat. Na incubatie met verdund patiëntenserum werd het gebonden IgA gemerkt met een konijnen-anti-IgA-antistof die gelabeld was met europium. Dat werd kwantitatief gemeten d.m.v. TRFIA. De uitslag werd, bij gebrek aan een internationale standaard, uitgedrukt in Arbitraire Eenheden, waarbij de eenheid zo werd gekozen dat de bovengrens van normale personen op 20 AE/l uitkomt.

Klinische gegevens: De antiglutaminase-antistoffen werden bepaald bij de volgende groepen: normale personen (per definitie < 20 AE/l), patiënten met coeliakie, patiënten met diabetes type I en patiënten met andere auto-immunziekten (m.n. SLE). De bevindingen zullen worden gerapporteerd.

Conclusie: Bij het stellen van de diagnose coeliakie en bij het vervolgen van de behandeling van deze ziekte, is de bepaling van antiweefseltransglutaminase-antistoffen van belang. Wellicht is zij ook nuttig bij het bestuderen van verschijnselen rondom de apoptose in vivo.

Gynecologie/Obstetrie

075. Ontwikkeling van een nieuw middel ten bate van semencapacitatie

P.M.W. JANSSENS, A.A. van SORGE, H. ten BRINKE en L.L.M. ENGELS
Ziekenhuis Rijnstate, Arnhem

Voor toepassing van intra-uterine inseminatie (IUI) en in vitro fertilisatie (IVF) dienen semenmonsters te worden bewerkt. Dit is nodig om een klein volume vloeistof met de meest motiele, morfologisch normale (hypergeactiveerde) spermatozoën te verkrijgen, vrij van seminaal plasma, dat direct in de uterus (IUI) of bij oöcyten (IVF) kan worden gebracht. De methode waarmee deze zgn. capacitatie van spermatozoën in het laboratorium wordt uitgevoerd, is vele jaren lang een dichtheidsgradiënt-centrifugatie geweest, gebruik makend van het middel Percoll® (1). De laatste jaren is er echter discussie ontstaan over de veiligheid van het gebruik van Percoll® voor humane toepassingen. Een belangrijke reden hiervoor is dat Percoll®, dat in de eerste plaats voor industriële doeleinden wordt geproduceerd, niet gegarandeerd vrij is van endotoxine (2). Dit, en een niet nader omschreven incident in de USA, noopt tot omzien naar alternatieve bewerkingsmethoden voor semen. De alternatieven voor Percoll® die op de markt verkrijgbaar zijn, zijn aanmerkelijk duurder. Bovendien zijn onder het microscoop veel van de met deze middelen verkregen preparaten minder 'schoon'. Dit was voor ons reden een poging te onder-

nemen om zelf een middel voor de opwerking van semen te ontwikkelen. Wij zijn uitgegaan van verschillende middelen die reeds humaan worden toegepast, zodat een eventuele nieuwe toepassing geen grote vragen oproept. Met het colloïdale middel D.70-32 konden wij, gemeten met de klassieke semenparameters "aantal", "motiliteit" en "morfologie", preparaten verkrijgen met een kwaliteit die vergelijkbaar is met de preparaten verkregen met Percoll®. Thans willen wij nog vaststellen of ook het bevruchtend vermogen van aldus bewerkte fertiele en subfertiele semina naar tevredenheid is, voordat het middel voor semenopwerking ter beschikking gesteld wordt.

Literatuur

Mortimer, D. Sperm preparation techniques and iatrogenic failures. *Human Reproduction* (1991) 6: 173-76.
Mortimer D. (Sydney, Aus.), Percoll and sperm preps. Gezaghebbend commentaar, gepubliceerd op Internet: androlog@godot.urol.uic.edu (Androlog Mail).

076. Placenta growth factor plasma levels are decreased in pre-symptomatic pre-eclampsia patients

M-L. TJOA, S. GRIFFIOEN, M. MULDER, C. OUDEJANS and I. van WIJK
Molecular Biological Laboratory, Department of Clinical Chemistry, University Hospital "Vrije Universiteit", PO BOX 7057, 1007 MB Amsterdam, The Netherlands

Pre-eclampsia is a pregnancy-induced disease characterized by hypertension, proteinuria and endothelial dysfunction. Multiple factors contribute to the pathogenesis of the disease, of which shallow trophoblast invasion in the placental bed is the primary defect. In normal pregnancy, fetal trophoblast cells invade into the maternal spiral arteries, where they adopt an endothelial phenotype and modify the vessels such that the vessels are continuously widened and remain independent of maternal vasoconstrictive influences. Reduced trophoblast invasion and absence of maternal vessel conversion are thought to culminate in placental bed hypoxia, which in turn leads to endothelial cell dysfunction.

Placenta growth factor (PlGF) belongs to the vascular endothelial growth factor family of angiogenic growth factors and is primarily expressed by trophoblast cells. It has been shown that PlGF is able to modulate apoptotic events and might protect trophoblast cells from apoptosis. Hypoxia down-regulates the expression of PlGF, suggesting that pre-eclampsia, in which placental bed hypoxia occurs, might be associated with aberrant PlGF production. Accordingly, a sig-

nificant decrease in PlGF serum levels was found in pre-eclamptic patients compared to patients with normal pregnancy at gestational age 36 weeks (Torry et al. *AJOG* 1998; 179: 1539)

In our study we examined the potential use of PlGF serum levels as an early prognostic pre-eclampsia marker. Blood samples were obtained after informed consent, plasma samples were collected after density centrifugation on a Percoll gradient and PlGF levels were measured using ELISA kits (R&D Systems Inc). In total, 36 plasma samples were used, from 21 healthy pregnant women and 9 pre-eclampsia patients. Between weeks 14 and 20 of pregnancy, a trend towards lower expression of PlGF in pre-eclampsia patients in contrast to the healthy pregnant women was detected (69 pg/ml and 90 pg/ml, respectively). This early dysregulation of PlGF production, detectable before the onset of overt clinical symptoms, could reflect or contribute to the primary etiological events underlying pre-eclampsia. In addition, if PlGF expression levels can be confirmed to be informative in individual patients as well, PlGF could be used as an early marker for pregnancies at risk.

077. Het kwantificeren van proteïnurie bij zwangere vrouwen met hypertensie

M. TRESKES¹ en D.J. BEKEDAM²
Hematologisch Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en afdeling Gynaecologie², Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam

Proteïnurie in zwangere vrouwen met een hoge bloeddruk is essentieel voor het stellen van de diagnose pre-eclampsie. Bij zwangeren met pre-eclampsie bestaat een verhoogde kans op complicaties en deze neemt toe met de ernst van de proteïnurie (1). In het algemeen wordt de grens voor proteïnurie gesteld op 300 mg/dag. Het verzamelen van 24-uurs urine is omslachtig en maakt een snelle monitoring van het verloop van de proteïnurie onmogelijk. Strip (dipstick) analyse op eiwit is semi-kwantitatief en dus ongeschikt voor een gevoelige detectie en nauwkeurig vervolg van proteïnurie. Recent is er gepleit voor het hantieren van een totaal eiwit/kreatinine ratio in porties urine voor het

detecteren en vervolgen van proteïnurie bij zwangere vrouwen met een hoge bloeddruk (1). Op basis van de fysiologie zou de (micro)albumine uitscheiding een specifiekere en gevoeligere maat voor proteïnurie bij zwangeren met hypertensie kunnen zijn. Met de nieuwe generatie analyse-systemen is het mogelijk, eventueel 24 uur per dag, een (micro)albumine/kreatinine ratio in urine monsters snel te bepalen.

In deze studie is bij zwangeren met hypertensie de totaal eiwit concentratie en de totaal eiwit/kreatinine ratio in 24-uurs urine en in porties urine bepaald alsmede de albumine concentratie en de albumine/kreatinine ratio. Onze data geven aan dat het "nor-

meren" van eiwitgehalte per mmol kreatinine snelle detectie en monitoring van de proteïnurie mogelijk maakt en dat de albumine/kreatinine ratio een extra voordeel oplevert wat betreft de gevoeligheid en specificiteit van de detectie van proteïnurie (albuminurie) bij zwangere vrouwen met een hoge bloeddruk.

078. Failure to adapt to efficient homocysteine metabolism in preeclampsia

F.V. VELZING-AARTS¹, D.A.J. BROUWER¹, F.P.L. van der DIJS², H.J. BLOM³, A.J. DUIJS^{4,5} and F.A.J. MUSKIET¹
Pathology and Laboratory Medicine¹, Groningen University Hospital; Public Health Laboratory, (Curaçao)²; Department of Pediatrics, Laboratory of Pediatrics and Neurology³, University Hospital Nijmegen; Clinical Chemical Laboratory, St. Elisabeth Hospital, (Curaçao)⁴; Red Cross Blood Bank (Curaçao)⁵

Objective: We investigated homocysteine metabolism (plasma homocysteine, plasma folate and vitamin B12), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism, endothelial dysfunction (plasma von Willebrand Factor; vWF), platelet count (parameter of coagulation) and serum uric acid (parameter of disease severity) in preeclampsia.

Methods: The above parameters were investigated in 14 preeclamptic women and 14 gestational age, parity and socio-economic status matched healthy pregnant controls. The study was done in the island of Curaçao (The Netherlands Antilles). Most women were of Afro-Caribbean descent.

Results: Preeclamptic women had higher homocysteine and

Literatuur

1. PJ Saudan et al. Improved Methods of assessing proteinuria in hypertensive pregnancy. *Br J Obstet Gyn* 1997; 104: 1159-1164.

vWF. There were no differences in folate, vitamin B12 and MTHFR C677T genotypes. Homocysteine correlated positively with vWF in the entire group ($r=0.47$, $P=0.012$), inversely with platelet count ($r=-0.62$, $P=0.043$) and positively with serum uric acid ($r=0.66$, $P=0.029$) in preeclamptic women. Preeclamptic women and controls exhibited different relations between homocysteine and folate, with preeclamptic women showing a relation similar to that of non-pregnant subjects.

Conclusion: Abnormal relation between homocysteine and folate suggests that preeclampsia is characterized by failure to adapt to the efficient homocysteine metabolism of pregnancy.

Stoornissen in het intermediair metabolisme

079. Pathobiochemical implications of hyperdopaminuria in patients with aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency

N.G.G.M. ABELING¹, C. BRÄUTIGAM², G.F. HOFFMANN², P.G. BARTH¹, A. FIUMARA³, A. KNUST⁴, R.A. WEVERS⁵ and A.H. van GENNIP¹,
Academic Medical Center, University of Amsterdam¹ and University Hospital Nijmegen⁵; The Netherlands; Children's Hospitals Marburg² and Siegen⁴, Germany; University of Catania³, Italy.

In 1990 the first human case of aromatic amino acid decarboxylase (AADC, EC 4.1.1.28) deficiency was described (1), and since then several new patients have been identified.

The condition is a neurotransmitter synthesis defect, leading to deficiencies of the biogenic amines.

The clinical presentation comprises developmental delay, hypotonia and an extrapyramidal movement disorder with oculogyric crises. Temperature instability, sweating and hyper-salivation are also observed. Diagnosis is based on abnormal metabolite patterns in CSF, plasma and urine and greatly reduced activity of AADC in plasma.

Recently we published (2) a new case of AADC deficiency in a 2 year-old Dutch girl, with mild clinical presentation and unexpected biochemical findings, i.e. a urinary metabolite pattern partly consistent with AADC deficiency, but also with ele-

ments which could not easily be explained from the defect. The most prominent finding was hyperdopaminuria, and later on we also observed the same phenomenon in other AADC deficient patients. Further investigations of metabolite patterns in body fluids of these patients led us to the conclusion that hyperdopaminuria might be explained by normal or at least residual activity of renal tubular AADC in the renal dopamine system. This would be in agreement with our earlier hypothesis that human AADC deficiency is presumably only partial or tissue-specific.

Literature

1. Hyland K, Clayton PT. *J Inher Metab Dis* 1990; 13: 301-304.
2. Abeling N.G. et al. *J Inher Metab Dis* 1998; 21(3): 240-242.

080. Rapid analysis of bile alcohol glucuronides and sulphated steroids using electrospray tandem-mass spectrometry and its application in screening for cerebrotendinous xanthomatosis (CTX) and steroid sulphatase (STS) deficiency

A.H. BOOTSMA¹, P. VREKEN¹, H. OVERMARS¹, R. A. WEVERS², A. VERRIPS², O.P. van DIGGELEN³, R.J.A. WANDERS¹ and A.H. van GENNIP¹
Academic Medical Center, University of Amsterdam, Dept. of Clinical Chemistry and Div. Emma Children's Hospital¹, F0-224, P.O. Box 22700, 1100 DE Amsterdam, The Netherlands, Department of Pediatrics, Radboud Hospital, Nijmegen², Department of Clinical Genetics³, Erasmus University, Rotterdam

CTX is a rare inborn error of bile acid synthesis caused by 26-hydroxylase deficiency. Diagnosis is usually established by showing accumulation of bile alcohols, e.g. $3\alpha,7\alpha,12\alpha,23,25$ -pentahydroxy- 5β cholestane, in urine or plasma using GC/MS. Since GC/MS bile alcohol analysis requires laborious sample preparation including enzymatic and/or chemical deconjugation, we have developed a rapid electrospray tandem-MS method for analyzing sulphated/glucuronidated bile alcohols in a single analysis using multiple reaction monitoring. Analyzing plasma samples of CTX patients before treatment

($n=8$), we found highly elevated concentrations of various bile alcohol glucuronides, in particular tetrols and pentols. The analysis of plasma samples from patients with enzymatically proven STS deficiency ($n=20$) showed highly elevated concentrations of cholesterol sulphate (>20 times the upper reference limit) in all cases. This sensitive and rapid analysis can easily be combined with our regular analysis of bile acids and bile acid precursors accumulating in peroxisomal disorders (Bootsma et al. *J Inher Metab Dis* 1999; 22: 307-310).

081. Peroxisomal fatty acid oxidation disorders and peroxisomal branched-chain β -ketothiolase: activity measurements in liver and fibroblasts using a newly developed method

S. FERDINANDUSSE¹, S. DENIS¹, E. van BERKEL¹, G. DACREMONT² and R.J.A. WANDERS^{1,3}
University of Amsterdam, Depts. Clinical Chemistry¹ and Pediatrics³, Emma Children's Hospital, P.O. Box 22700, 1100 DE Amsterdam, The Netherlands; University of Gent, Dept. of Pediatrics², Gent, Belgium.

We and others recently showed that Sterol Carrier Protein X (SCPX) is responsible for the thiolytic cleavage of the 3-oxoacyl-CoA esters of pristanic acid and the bile acid intermediates di- and trihydroxycholestanic acid (DHCA and THCA). The identification of SCPX as one of the major enzymes involved in peroxisomal branched-chain fatty acid oxidation, is of great importance especially since many patients have been described with a defect in peroxisomal β -oxidation of unknown etiology. Most of these patients show a variety of fatty acid abnormalities in plasma including elevated levels of pristanic acid, DHCA and THCA[1]. These data sug-

gest that the underlying defect in at least some of these patients might be at the level of SCPX. To investigate this, we developed an assay to measure the activity of SCPX in liver as well as in cultured skin fibroblasts. The feasibility of our method was established by the finding of a full deficiency in fibroblasts from SCPX (-/-) mice. SCPX activity measurements in fibroblasts from all candidate patients revealed normal activity, suggesting that SCPX is not deficient in these patients. Additional studies are underway to resolve the true defect. Wanders et al. *J Neuropathol Exp Neurol*.1995; 54: 726-739.

082. The application of HPLC/ESI tandem mass spectrometry on urine for the screening of disorders of purine and pyrimidine metabolism

T. ITO, A.B.P. van KUILENBURG, A.J. HAASNOOT, A.H. BOOTSMAN, A. van CRUCHTEN, Y. WADA and A.H. van GENNIP
Academic Medical Center, University of Amsterdam, Emma Children's Hospital and Dept. of Clinical Chemistry, PO Box 22700, 1100 DE Amsterdam, The Netherlands

Inherited disorders of purine and pyrimidine metabolism have a wide variety of clinical symptoms. Because of this broad clinical spectrum, a rapid and specific screening method is desired for the diagnosis of these disorders. Several methods for urinary screening of purine and pyrimidine disorders by high-performance liquid chromatography (HPLC) have been reported, but so far these methods are time-consuming and aspecific.

Objectives: To develop a rapid and specific method for the screening of inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. **Method:** Electrospray ionization (ESI) tandem mass spectrometry (MS-MS) was connected to HPLC. The HPLC method was only used to separate analytes with the same molecular mass from each other and from interfering substances. Multiple reaction monitoring (MRM), which detects a particular transition of each compound, was used for detection. For quantitative analysis stable isotope labeled reference compounds were used as internal standards. Urine soaked filter-paper strips and liquid urine were compared for analysis of purines and pyrimidines by HPLC/ESI MS-MS to investigate the usefulness of the paper strips instead of liquid urine.

Results: Adequate transitions and instrument settings were established for 16 purines or pyrimidines. HPLC separation was only needed for two pairs of compounds (uridine and pseudo-uridine, adenosine and deoxyguanosine) because of the same molecular mass. The methanol extraction procedure for soaked filter-paper strips took about one hour for 20 samples. Extraction yields for individual compounds varied from 72-94%, except for uric acid being 65%. The running time of the HPLC/ESI MS-MS method was 15 min. compared to 45 min. for the HPLC/UV method. The methods were applied to urine samples from patients with established disorders of purine and pyrimidine metabolism. In all cases the correct diagnosis was easily found.

Conclusions: HPLC/ESI MS-MS of urine allows rapid screening for disorders of purine and pyrimidine metabolism. Moreover, in contrast to UV detection, ESI MS-MS is very specific. Liquid urine as well as urine soaked filter-paper strips can be used, the latter offering the advantage of easy collection, storage and transport of the urine samples.

083. Confirmation of the enzyme defect in the first case of β -alanine synthase deficiency

A.H. van GENNIP¹, H. van LENTHE¹, B. ASSMANN², G. GÖHLICH-RATMANN², G.F. HOFFMANN², C. BRÄUTIGAM², P. VREKEN¹, R.A. WEVERS³ and A.B.P. van KUILENBURG¹
Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands¹; Children's Hospital D-35033 Marburg², Germany; University Hospital Nijmegen³, The Netherlands

In man, the pyrimidine bases uracil and thymine are degraded via a three-step pathway leading to the synthesis of β -alanine and β -aminoisobutyric acid, respectively. A number of patients have been described with defects of the first two enzymes of the pyrimidine degradation pathway presenting with a considerably variable clinical phenotype including neurological problems. Very recently, the first patient with the putative defect of β -alanine synthase, the third enzyme of the pathway has been reported. β -Alanine synthase (EC 3.5.1.6) catalyses the conversion of N-carbamyl- β -alanine or N-carbamyl- β -aminoisobutyric acid into β -alanine or β -aminoisobutyric acid, ammonia and CO₂. This 17 month old girl presented with muscular hypotonia, dystonic movements and severe developmental delay. Analysis of a urine sample revealed strongly ele-

vated levels of N-carbamyl- β -alanine and N-carbamyl- β -aminoisobutyric acid. We had the opportunity to confirm the presumptive β -alanine synthase deficiency by measuring the enzyme directly in liver tissue. The enzyme activity was measured with a radiochemical assay using radiolabeled N-carbamyl- β -alanine. The reaction product ¹⁴C₂O₂ was subsequently measured by liquid scintillation counting. In the patient's liver the β -alanine synthase activity was undetectably low (< 0.05 nmol/mg/h). In 10 control liver samples the β -alanine synthase activities ranged from 36 to 165 nmol/mg/h with a mean activity of 69 ± 37 nmol/mg/h. Our findings confirm for the first time that the affected patient suffers from a complete β -alanine synthase deficiency.

084. Identification and characterization of three novel missense mutations in mevalonate kinase cDNA causing mevalonic aciduria, a disorder of isoprene biosynthesis

S.M. HOUTEN², G.J. ROMEIJN¹, J. KOSTER¹, R.G.F. GRAY³, P. DARBYSHIRE³, G.P.A. SMIT⁴, J.B.C. de KLERK⁵, R. DURAN⁶, K.M. GIBSON⁷, R.J.A. WANDERS^{1,2} and H.R. WATERHAM^{1,2}
Depts of Clinical Chemistry¹ and Pediatrics², Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands; Dept of Clinical Chemistry³, The Birmingham Children's Hospital NHS Trust, UK; Beatrix Children's Hospital⁴, Groningen, The Netherlands; Sophia Children's Hospital⁵, Rotterdam, The Netherlands; Wilhelmina Children's Hospital⁶, Utrecht, The Netherlands; Oregon Health Sciences University, Dept of Biochemical Genetics/Metabolic Lab⁷, Portland, USA.

Mevalonic aciduria (MA) is a rare autosomal recessive metabolic disorder, characterized by psychomotor retardation, failure to thrive, hepatosplenomegaly, anemia and recurrent febrile crises. MA is caused by a deficient activity of mevalonate kinase (MK). Thus far, only two disease-causing mutations in the MK cDNA have been identified. We now report four different missense mutations including three novel ones, which were identified by sequence analysis of MK cDNA of three MA patients. All mutations affect conserved amino

acids. Heterologous expression of the corresponding mutant MKs as fusion proteins with glutathion S-transferase in *E. coli* cells showed a profound effect of each of the mutations on the enzyme activity. In addition, immunoblot analysis of lysates from patients' fibroblasts using specific antibodies against MK revealed virtually no protein. These results demonstrate that the mutations not only affect the activity but also the stability of the mutant proteins.

085. Discovery of the enzymatic and molecular basis of hyperimmunoglobulinemia D/periodic fever syndrome at the level of mevalonate kinase

S.M. HOUTEN¹, W. KUIS², T.J. de KONING³, M. DURAN³, A. van ROYEN-KERKHOF², G.J. ROMEIJN¹, L. DORLAND³, M.M.J. de BAISE³, W.A.R. HUIJBERS⁴, G.T. RIJKERS², T.W. KUIJPERS¹, J. FRENKEL², H.R. WATERHAM¹, R.J.A. WANDERS¹ and B.T. POLL-THE³
Depts of Clinical Chemistry and Pediatrics¹, Academic Medical Center, University of Amsterdam; Depts of Immunology² and Metabolic Disorders³, University Children's Hospital "Het Wilhelmina Kinderziekenhuis", Utrecht; Beatrix Hospital⁴, Gorinchem; the Netherlands

Hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome (HIDS) is an autosomal recessive disorder characterized by recurrent episodes of fever associated with lymphadenopathy, arthralgia, headache, gastrointestinal dismay and skin rash. Diagnostic hallmark of HIDS is a constitutively elevated level of serum IgD. The underlying defect in this syndrome has remained obscure through the years. When we analysed urinary organic acids in a patient, we found elevated levels of mevalonic acid during episodes of fever but not during fever-free periods. This led us to test whether there might be a defect in the metabolism of mevalonate. These studies led to the discovery of a strongly decreased activity of mevalonate kinase in

lymphocytes and skin fibroblasts from such patients. Subsequent molecular studies revealed 4 different mutations of which one was common to all patients. Expression of the mutant cDNAs in *E. coli* showed that all 4 mutations affect the activity of the encoded proteins. Moreover, immunoblot analysis demonstrated a deficiency of MK protein in patients' fibroblasts indicating a protein destabilizing effect of the mutations. The identification of an enzyme defect in isoprenoid biosynthesis in patients with periodic fever and dysregulation of their immune system creates new challenges for the elucidation of the pathogenesis of periodic fever.

086. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: unequivocal identification of SCAD-deficiency using acylcarnitine profiling in fibroblasts and direct enzyme analysis

L. IJLST¹, J.P.N. RUITER¹, D.M. van den BRINK¹, P. VREKEN¹, A. BOOTSMA¹, H. OVERMARS¹, A.H. van GENNIP¹, M.J. CORYDON², N. GREGERSEN², J. VOCKLEY³, P.A. WOOD⁴, and R.J.A. WANDERS¹
University of Amsterdam, Academic Medical Center, Depts Clinical Chemistry and Pediatrics¹, Amsterdam, The Netherlands; Skejby Sygehus², Århus N, Denmark; Mayo Clinic and Foundation, Rochester³, U.S.A., Alabama University⁴, Alabama, U.S.A.

Among the disorders of mitochondrial fatty acid oxidation (FAO) short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency is one of the most puzzling. So far 10 established SCAD-deficient patients have been described in the literature defined as those cases with proven SCAD deficiency in fibroblasts using the ETF-assay (1). In all patients except one, there was ethylmalonic aciduria. In addition to the 10 established SCAD-patients, many cases of ethylmalonic aciduria have been described. In order to identify the true defect in these patients, we have set up methods to study the activity of SCAD in the intact cell and at the enzyme level. Our approach includes the following elements:

Full study in blood and urine including ethylmalonic acid and acylcarnitines;

Acylcarnitine profiling in fibroblasts after loading with palmitate;
SCAD-activity measurements using a new method which does not require ETF.

The feasibility of this procedure was tested in fibroblasts from SCAD-deficient mice and 2 patients with established SCAD-deficiency due to inactivating mutations in both alleles. In all cases SCAD was found to be deficient (<10%) using the new assay and a strongly increased butyrylcarnitine/acylcarnitine ratio was found upon loading with palmitate. We are now studying all patients with ethylmalonic aciduria.

1. Wanders RJA et al. *J Inher Metab Dis* 1999; 22: 442-487.

087. Phytanic acid alpha-oxidation: identification of 2-hydroxy-phytanoyl-CoA lyase in rat liver and its localisation in peroxisomes

G.A. JANSEN¹, N.M. VERHOEVEN², S. DENIS³, G.J. ROMEIJN³, C. JAKOBS², H.J. ten BRINK² and R.J.A. WANDERS^{1,3}

University of Amsterdam, Academic Medical Centre, Departments of Pediatrics¹ (Emma Children's Hospital) and Clinical Chemistry, Laboratory for Genetic Metabolic Diseases³, Amsterdam, The Netherlands; Department of Clinical Chemistry, Metabolic Unit, Free University Hospital², Amsterdam, The Netherlands

Phytanic acid is broken down by alpha-oxidation in three steps finally yielding pristanic acid. The first step occurs in peroxisomes and is catalysed by phytanoyl-CoA hydroxylase. We have studied the second step in the alpha-oxidation pathway, which involves conversion of 2-hydroxyphytanoyl-CoA to pristanal catalysed by 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase. To this end, we have developed a stable isotope dilution

gas chromatography-mass spectrometry assay allowing activity measurements in rat liver homogenates. Cell fractionation studies demonstrate that in rat liver 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase is localised in peroxisomes. This finding may have important implications for inherited diseases in man characterised by impaired phytanic acid alpha-oxidation.

088. Phytanic acid alpha-oxidation: identification of the genomic structure of the phytanoyl-CoA hydroxylase gene

G.A. JANSEN¹, E.M. HOGENHOUT², C. JAKOBS³ and R.J.A. WANDERS^{1,2}

University of Amsterdam, Academic Medical Centre, Departments of Pediatrics¹ (Emma Children's Hospital) and Clinical Chemistry, Laboratory for Genetic Metabolic Diseases², Amsterdam, The Netherlands; ³Department of Clinical Chemistry, Metabolic Unit, Free University Hospital, Amsterdam, The Netherlands

Phytanic acid (3,7,11,15-tetramethylhexadecanoic acid) is a branched chain fatty acid which is present in the human diet. The presence of the methyl group at the third carbon atom prevents degradation via beta-oxidation. Instead, phytanic acid is broken down by alpha-oxidation in three steps to yield pristanic acid. After activation to its CoA ester, phytanic acid is converted to 2-hydroxyphytanoyl-CoA by the action of phytanoyl-CoA hydroxylase (PhyH), a peroxisomal enzyme. Patients with Refsum disease (RD), a rare metabolic disorder, accumulate phytanic acid in body fluids and tissues. In RD, PhyH activity is deficient due to mutations in the PHYH gene.

Mutation analysis at the cDNA level revealed that patients with RD have mutations in the PHYH cDNA, including point mutations, single basepair deletions as well as large deletions, the latter probably caused by incorrect splicing of the mRNA. In this study we have determined the genomic structure of PHYH, which comprises 21.5 kb. The coding sequence of 1014 bp is located on 9 exons. The PhyH gene structure now enables us to study the mutations causing the splice defects. Moreover, the gene structure provides the definitive tool to perform mutation analysis at the genomic level.

89. Parameters van het ijzermetabolisme bij dialysepatiënten: percentage hypochrome erythrocyten vs circulerende transferrine receptor concentratie in serum

A. LEYTE¹, Y. vd HEIDE¹, I. KEUR² en P. STEVENS²,

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Slotervaartziekenhuis¹ en Dianet², Amsterdam

Adequate monitoring van het ijzermetabolisme bij hemodialysepatiënten is van belang voor optimale behandeling van renale anemie met recombinant humaan erythropoëetine (rHuEPO). IJzergebrek (absoluut of functioneel) is een belangrijke oorzaak van rHuEPO resistentie, maar bij deze patiëntengroep moeilijk met zekerheid vast te stellen. Conventionele parameters (serum ferritine concentratie, transferrinesaturatie (TS)) voldoen slechts gedeeltelijk. Het ijzersuppletie protocol van de Dialyse Groep Nederland (DGN) maakt dan ook gebruik van een extra parameter: het percentage hypochrome rode bloedcellen (% hypo RBC), als maat voor de ijzerbeschikbaarheid in de rode bloedcel. Het % hypo RBC is tot op heden uitsluitend met hematologie analyzers van één firma, en daarmee niet in elk laboratorium, vast te stellen. De laatste jaren wordt de concentratie circulerende transferrine receptoren (sTfR) in serum als maat voor de ijzerbeschikbaarheid in de rode cel (en

duis als alternatief voor het % hypo RBC) beschreven. Wij hebben dit in een pilotstudie onderzocht bij 34 volwassen hemodialysepatiënten (15 vrouwen, 19 mannen). Volgens de DGN criteria was er bij 13 patiënten sprake van absoluut ijzergebrek (ferritine < 100 µg/ml), bij 7 patiënten van functioneel ijzergebrek (ferritine ≥ 100 µg/ml, < 500 µg/ml met TS < 20%, % hypo RBC ≥ 10 óf ferritine ≥ 500 µg/ml met TS < 20% en % hypo RBC ≥ 10). Er waren 14 patiënten zonder ijzergebrek. Bij een arbitraire sTfR afkapgrens van 5 mg/l stemden de % hypo RBC en sTfR resultaten van de gehele groep patiënten in 79% van de gevallen overeen. Juist bij de groep patiënten met functioneel ijzergebrek werd echter een hoog percentage discrepanties gezien (43%). Longitudinaal onderzoek van een dergelijke populatie is nodig voor een definitieve beoordeling van de sTfR concentratie in serum als diagnostisch criterium voor ijzersuppletie bij hemodialyse patiënten.

090. Analysis of methylmalonic acid in urine with sequential injection analysis (SIA)-FTIR spectroscopy

A.P.J.A. MARKUS¹, M. HABERKORN², B. LENDEL² and J.L. WILLEMS¹

Department of Clinical Chemistry¹, University Medical Centre St Radboud, Nijmegen, The Netherlands and Institute of Analytical Chemistry², Vienna University of Technology, Vienna, Austria

Fourier Transform infrared (FT-IR) spectroscopy has been used for the quantitative analysis of methylmalonic acid in urine. The main advantages of FT-IR are simple performance, low cost measurements and reduced analysis time. In this pre-

liminary study we measured methylmalonic acid in urine samples with SIA-FTIR according to the method described by Lendl et al (Vibrational Spectrosc., 1999, 19, 1-10). Urine from 5 healthy persons was collected and divided in a

total of 37 samples. The urine samples were adjusted to pH 11.0 and spiked with methylmalonic acid resulting in a concentration range of 10 to 1000 $\mu\text{mol/l}$.

The urine samples were injected to the IR transmission cell with a SIA flow system and spectra were collected in mid-IR region (1600-1000 cm^{-1}) using a Bruker Equinox 55 spectrometer equipped with a narrow band MCT detector.

The concentration of methylmalonic acid in urine was quantitated with partial least-squares regression with full cross validation. The standard error of cross validation (SECV) in the

IR-predicted methylmalonic acid concentration was 89 $\mu\text{mol/l}$ with an R^2 -value of 99.1 %.

In this preliminary study no intra- and inter-assay studies are realised.

The measurement procedure has to be further optimised. Nevertheless these first results show an increase in sensitivity by a factor of 10 compared to our previous study (submitted for publication). With these preliminary results we are optimistic about the use of FTIR in clinical chemical laboratories for the analysis of organic acids in urine.

091. Mitochondrial acyl-CoA intermediates of valproic acid (VPA) analysed by radio-HPLC

M.F.B. SILVA^{1,2}, G.J. ROMEIJN², L. IJLST², C. JAKOBS³, M. DURAN⁴, I. TAVARES de ALMEIDA¹ and R.J.A. WANDERS².

C.P.M.; Fac. de Farmácia da Univ. de Lisboa, Portugal¹; Dept. of Clin. Biochem., Univ. Hosp. Amsterdam²; Dept. of Clin. Chem., Free Univ. Hospital, Amsterdam³; Univ. Children's Hospital, Wilhelmina Kinderziekenhuis, Utrecht⁴, The Netherlands.

The β -oxidation of valproic acid (VPA) was investigated in vitro following the incubation of ³H-labelled-VPA with intact rat liver mitochondria. The metabolism of [4,5-³H]-VPA and [2-³H]-VPA was monitored through the analysis by reverse phase radio-HPLC of the acyl-CoA intermediates: VPA-CoA, $\Delta^{2(E)}$ -VPA-CoA, 3OHVPA-CoA, 3KetoVPA-CoA, produced by the four concerted reactions of the β -oxidation cycle. These four non-labelled intermediates of VPA, were previously synthesised and used as standards. A time course study was undertaken and showed a maximum concentration of labelled intermediates at 10 min and a 60% decrease from the maximum after 20 min followed by a progressive disappearance to

trace levels (up to 2h). The intramitochondrial concentrations of the VPA-acyl-CoA esters were determined in respiratory states 3 and 4. Valproyl-CoA proved to be the mitochondrial acyl-CoA that reaches the highest concentration in the matrix (=0.5 mmol/l when VPA =50 $\mu\text{mol/l}$ in state 4). 3ketoVPA-CoA was detected in trace amounts which agrees with the hypothesis that this intermediate is not easily cleaved by mitochondrial thiolases. We expect from this study that a more clear correlation can now be made between some inhibitory effects of VPA-acyl-CoA derivatives which have been assigned to specific enzymes and their respective concentration range attained within mitochondrial compartment.

092. Case Report: The first Dutch patient(s) diagnosed with Cholesteryl-Ester Storage Disease (CESD)

J.W.J. van der STAPPEN, M.A. ALLEMAN, L.D. DIKKESCHEI, A. PEPPING, J.E.M. GROENER² en R. WEVERS³ *Isala Klinieken¹ (Weezenlanden); LUMC Leiden² en AZN Nijmegen³*

A 34 year-old man of Dutch/Indonesian descent was admitted for hepatosplenomegaly and anal blood loss. Patient history revealed a long existing (>20 years) painful abdomen and abnormal defecation patterns. On physical examination no obvious causes for his complaints were observed. Basic laboratory tests for primary liver disease or malignancy were all normal. To exclude any underlying haematological disorder a bone marrow biopsy was obtained. Bone marrow cytology showed few, but clearly distinguishable, "sea blue histiocytes" and vacuolated macrophages, indicators of a lysosomal storage disease. Subsequent diagnostic efforts were focused on lysosomal enzyme activities in leukocytes and skin fibroblasts but were inconclusive apart from an increased chitotriosidase activity. Additional biochemical tests and cytology of jejunum and liver biopsies revealed very high cholesterol levels and lipid storage in tissue cells, respectively. Next the measurement of human lysosomal acid lipase (hLAL), which is insufficient in a rare metabolic disorder called CESD/Wolman, was

undertaken and showed significantly reduced activities, indicative of CESD/Wolman. Mutational analysis showed a previously described heterozygous mutation in exon 8 (donor splice site substitution; G→A in position -1). In addition, a new mutation in exon 10 (T1107G) resulting in a premature stop of translation and subsequent loss of 43 carboxyterminal aminoacids was found. Analysis of parental DNA confirmed our patient as compound heterozygous for both the exon 8 and exon 10 mutation. RT-PCR of the patient RNA and sequencing of the cDNA product confirmed incorrect splicing of exon 8, resulting in an inactive $\Delta 254-277$ mutant protein. Currently, we are establishing whether the newly described mutation in exon 10 is unique to this family or a common mutation found in the population at large. This case report describes the first CESD patient in the Netherlands. DNA analysis of parents, brothers and sisters of the index patient identified one of his brothers as another CESD patient and several family members as carriers of either the exon 8 or exon 10 mutation.

093. Analysis of plasmalogens using electrospray tandem-mass spectrometry and its application in screening for peroxisomal disorders

F. VALIANPOUR, P. VREKEN, H. OVERMARS, P.G. BARTH, J. SELHORST, R.J.A. WANDERS and A.H. van GENNIP *Academic Medical Center, University of Amsterdam, Dept. of Clinical Chemistry and Div. Emma Children's Hospital, Amsterdam, The Netherlands*

The biosynthesis of ether phospholipids like 1-alk-1'eny-2-acyl-sn-glycero-3-phosphatidyl-ethanolamine (-choline) takes place in peroxisomes and requires the activity of dihydroxyacetone phosphate (DHAP)-acyltransferase and alkyl-DHAP synthetase. In a number of peroxisomal disorders (e.g. biogenesis defects, RCDP/Rhizomelic Chondrodysplasia Punctata)

ether phospholipid biosynthesis is deficient. Using 0.1 μl erythrocyte suspension complete phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC) profiles were obtained using parent-ion- and neutral loss scans. Plasmalogen species in the PE fraction were characterized using daughter ion scans showing a relative high content of polyunsaturated fatty acids

at the sn-2 position. A number of plasmalogen ethanolamines (e.g. C18:0-C20:4, m/z 750; C16:0/C22:4, m/z 750; C16:0/C20:4, m/z 722; C18:0/C22:5, m/z 776) were severely reduced or even absent in erythrocytes or fibroblasts from RCDP patients and patients with Zellweger syndrome. Since no plasmalogen internal standards are available exact quantification of plasmalogens is not possible. Using C14:0/C14:0 -PE as internal standard a relative concentration of plasmalogens can

be calculated. The method presented requires very little material and allows judgement of the plasmalogen status in erythrocytes, fibroblasts and chorionic villous biopsy samples. In addition, the method can be extended to other phospholipid classes (e.g. phosphatidylserine and -inositol, sphingomyelin) or reveal information about sn-2 linked polyunsaturated fatty acids.

094. Prenatal diagnosis of disorders of fatty acid oxidation (FAO) using direct enzyme assays, immunoblot analysis, and mutation analysis (direct villi) and acylcarnitine profiling (cultured chorionic villous cells)

L. IJLST, J.P.N. RUITER, W. OOSTHEIM, S. DENIS, and R.J.A. WANDERS

University of Amsterdam, Academic Medical Center, Depts. Clinical Chemistry & Pediatrics, Amsterdam, The Netherlands

Defects in the mitochondrial oxidation of long-chain fatty acids are usually associated with severe abnormalities including cardiomyopathy with poor prognosis in most but not all patients. In such families prenatal diagnosis is warranted. We have done prenatal diagnosis of most FAO-disorders including CPT1, CPT2, CAC, VLCAD, LCHAD and MTP-deficiency and now report our results. Our general procedure is as follows: sample chorionic villous tissue, select fetal material, split the sample in 2 parts, send one part directly to us in culture medium and use the other part to grow fibroblasts. Send these later as living cells. We then proceed as follows:

1. CPT1 and CACT: direct enzyme analysis in villi not reliable. Therefore: measure activity in digitonin permeabilized cells and do acylcarnitine profiling in intact cells (Ventura F et al. Clin Chim Acta 1999; 281: 1-17).

2. CPT2, VLCAD, LCHAD and MTP: direct enzyme analysis in villi combined with immunoblot-analysis (VLCAD, MTP) and DNA-analysis (all) followed by acylcarnitine profiling in cultured cells if the results in direct villi are not fully reliable. So far we have done prenatal diagnosis of these FAO-disorders in 37 pregnancies at risk. Our results indicated an affected fetus in 9 cases. No mistakes were made.

095. Molecular basis of primary carnitine deficiency: identification of two novel mutations in OCTN2

F.M. VAZ, H.R. SCHOLTE, J. RUITER, L.M. HUSSAARTS-ODIJK, R. RODRIGUES PEREIRA, S. SCHWEITZER, J.B.C. de KLERK, H.R. WATERHAM and R.J.A. WANDERS

Laboratory of Genetic Metabolic Diseases, University of Amsterdam, the Netherlands

Primary systemic carnitine deficiency is a potentially lethal, autosomal recessive disorder characterized by cardiomyopathy, myopathy, recurrent episodes of hypoketotic hypoglycemia, hyperammonemia and failure to thrive (1). This form of carnitine deficiency is caused by a defect in the active cellular uptake of carnitine (2), and it has recently been shown that the gene encoding the high affinity carnitine transporter OCTN2 is mutated in patients suffering from this disorder (3). Here we report the underlying molecular defect in three unrelated patients. Two patients were homozygous for the same 632A>G missense mutation, which results in the substitution of the tyrosine at amino acid position 211 by a cysteine. In a third patient we identified a homozygous C>T substitution at nucleotide 844, which converts the arginine at amino acid

position 282 into a stop codon. Re-introduction of the wild type OCTN2 cDNA in patients' fibroblasts by transient transfection restored carnitine uptake in all three patients' cell lines, confirming that mutations in OCTN2 cause primary systemic carnitine deficiency.

Literature

1. Scholte HR, Rodrigues Pereira R, de Jonge PC et al. J Clin Chem Clin Biochem 1990; 28: 351-357.
2. Tein I, De Vivo DC, Bierman F et al. Pediatr Res 1990; 28: 247-255.
3. Tamai I, Ohashi R, Nezu J et al. J Biol Chem 1998; 273: 20378-20382.

096. Smith-Lemli-Opitz syndrome: mutation analysis of patients identified many different disease-causing mutations in the 7-DHCR gene

H.R. WATERHAM, W. OOSTHEIM, G.J. ROMEIJN and R.J.A. WANDERS

Departments of Clinical Chemistry and Pediatrics, Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands

Smith-Lemli-Opitz (SLO) syndrome is an autosomal recessive developmental disorder characterized by facial dysmorphism, mental retardation and multiple congenital anomalies. The disorder is caused by a deficient activity of 7-dehydrocholesterol reductase (7-DHCR), the enzyme that catalyzes the reduction of the C7-C8 double bond of 7-dehydrocholesterol to produce cholesterol, which is the final step in the cholesterol biosynthesis pathway (Tint et al. (1994), NEJM 330, 107-113). As a consequence, patients have low serum cholesterol levels and elevated concentrations of 7-dehydrocholesterol, a biochemical hallmark used to confirm the initial diagnosis based on clinical signs. Recently, we and others identified the human 7-DHCR cDNA and demonstrated that SLO syndrome is caused

by mutations in the corresponding gene (Waterham et al. AJHG 1998; 63: 329-338; Fitzky et al. PNAS 1998; 95: 8181-8186; Wassif et al. AJHG 1998; 63: 55-62). Based on the genomic structure of the 7-DHCR gene we developed an efficient PCR-based method to perform mutation analysis at the genomic level which is used both for post and prenatal screening of patients with SLO syndrome. Currently, 26 different mutations have been identified after sequence analysis of 54 alleles. Mutations were found in each of a total of seven coding exons of the 7-DHCR gene. Of these mutations only few are recurrent among patients with the exception of one splice acceptor site mutation which has an estimated allele frequency of ~25%.

097. Updated nomenclature for CDG: Congenital Disorders of Glycosylation: Recommendations formulated at the "First International Workshop on CDGS", November 1999 Leuven/Belgium

S. GRÜNEWALD^{1,2}, R. WEVERS³, G. MATTHIJS¹ and J. JAEKEN¹
University Leuven¹, Belgium, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf², Germany, University Nijmegen³, The Netherlands

Congenital Disorders of Glycosylation formerly known as Carbohydrate Deficient Glycoprotein Syndrome represent a rapidly growing group of diseases with gene defects in the synthesis of glycoproteins. Recently, several newly recognised disorders were characterised. It became evident, that the division into subtypes depending on different isoelectric focussing patterns of serum transferrin (commonly used diagnostic test) was misleading. At the "First International Workshop on CDGS" a group of specialists in the field accepted a new

acronym for CDG: Congenital Disorders of Glycosylation. The defects were divided into type I and II, depending on the position of the defective enzyme in the processing of the glycoproteins: CDG-I summarises all initial steps of the N-glycosylation pathways, until the oligosaccharide chain is bound to the nascent protein. CDG-II refers to all defects of the protein-bound glycans. All novel defects are classified as CDG-x as long as they are not completely characterised.

Known defects, update 15.01.2000:

Type	Old Synonym	Defect and localization (cytoplasmatic, Endoplasmatic Reticulum, Golgi Apparatus)	Defective Gene	Updated Synonym
Type I		Defects in the synthesis of the dolichol-pyrophosphate linked oligosaccharide chain and / or its transfer onto the protein		CDG-I
	Type Ia	Phosphomannomutase (c)	PMM2	CDG-Ia
	Type Ib	Phosphomannose Isomerase (c)	PMI	CDG-Ib
	Type Ic and V	alpha 1,3-Glucosyltransferase (ER)	ALG6	CDG-Ic
	Type IV	alpha 1,3-Mannosyltransferase (ER)	ALG3	CDG-Id
		Dolichol-P-Man Synthase 1 (ER)	DPM1	CDG-Ie
Type II		Defects in the modifications of the protein bound oligosaccharide chains		CDG-II
	Type II	N-Acetyl-Glucosaminyltransferase II (GA)	MGAT2	CDG-IIa
Type x		All defects in the synthesis of N-glycoproteins, incompletely characterized		CDG-x

098. The clinical and molecular characteristics of a novel Congenital Disorder of Glycosylation Type Ic (CDG-Ic)

S. GRÜNEWALD^{1,2}, T. IMBACH³, K. HUIJBEN⁴, H. de KLERK⁵, U. WENDEL², G. MATTHIJS¹, J. JAEKEN¹ and R. WEVERS⁴

University of Leuven¹, Belgium, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf², Germany, University of Zürich³, Switzerland, Institute Neurology, University of Nijmegen⁴, The Netherlands, Academic Hospital Rotterdam⁵, The Netherlands

Congenital Disorders of Glycosylation, formerly known as the Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndromes (CDG) are a family of genetic diseases characterized by defects in the synthesis of glycoproteins. So far, six defects in the human N-glycosylation pathway have been characterized. Here we describe the characteristics of eleven cases with CDG-Ic. This is the first described defect of a human endoplasmic reticulum localized enzyme in glycan biosynthesis. We have identified the patients by isoelectric focusing of serum transferrin in a broad screening for N-glycosylation defects in a large pediatric population with mild to severe neurological developmental delay. The accumulation of dolichol-linked Man₉GlcNAc₂ in patient's fibroblasts indicated a defect in the human ortholog of the *Saccharomyces cerevisiae* ALG6 gene. Eight

patients were shown to be homozygous for a A333V mutation. In another child the A333V mutation was found next to an intron splice site defect (IVS3+5G>A). Two novel ALG6 mutations, namely 911T>C and 1432T>C were found in two additional cases.

As in CDG-Ia patients, mental retardation, speech delay and epilepsy were present in the CDG-Ic cases. However, they did not show any of the cardinal symptoms of CDG-Ia as inverted nipples or fat pads. Cerebellar hypoplasia, which is nearly universal in CDG-Ia, was never observed. The neurological impairment of CDG-Ic patients is less severe than in CDG-Ia. In agreement with this clinical observation the hypoglycosylation of the brain derived β -trace protein was less pronounced in CDG-Ic than in CDG-Ia.

Therapeutische geneesmiddelenmonitoring en klinische toxicologie

099. Neutrophil fluorescence in patients using clozapine

J. HOFFMANN¹ and A. LILLHOLM²

Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina Ziekenhuis, Eindhoven¹ and Klinisk Biokemisk Afdeling, Københavns Amtssygehus, Glostrup, Danmark²

During routine use of the CellDyn-4000 haematology analyser (Abbott), several samples were found showing increased FL3-fluorescence in the neutrophil granulocytes. This increased FL3 appeared to be significantly ($P < 0.0001$ by χ^2 test) correlated with the use of clozapine by patients from the psychiatric department. Clozapine is a highly effective anti-schizophrenic drug, which can induce severe, sometimes even fatal agranulocytosis in about 1% of the patients taking the drug.

The CellDyn-4000 analyser makes use of propidium iodide (PI) as a nuclear stain for discriminating viable and non-viable cells. PI is included in the reagent for counting white blood cells (WBC); non-viable cells display increased FL3 fluorescence.

Theoretically, the increased neutrophil FL3 might be caused by clozapine-associated membrane damage, allowing PI binding to the nuclei. Therefore, experiments were designed using PI-free WBC reagent obtained from Abbott. Blood samples from patients taking clozapine and healthy controls were measured using both PI-free and standard reagents. In addition, similar experiments were performed in a regular flow cytometer (FACScan, BD).

Compared with standard WBC reagent, PI-free reagent caused a small decrease in neutrophil FL3 intensity in normal controls from 66.3 ± 3.1 (mean \pm S.D.; channel numbers) to 54.4 ± 2.9 ($P < 0.0001$ by paired T-test). Similarly, in patients taking clozapine, FL3 decreased from 94.5 ± 5.2 with standard reagent to 90.0 ± 6.0 with PI-free reagent ($P = 0.0002$).

Since even without PI, neutrophil FL3 remained significantly higher in patients using clozapine, we hypothesised that clozapine itself or a clozapine metabolite might bind to neutrophils and induce the FL3 signal. Therefore, we measured the serum concentration of clozapine and desmethyl-clozapine, a major metabolite using a HPLC method. Neutrophil FL3 appeared to be significantly correlated with the serum levels of clozapine as well as of desmethyl-clozapine, but the correlation was weak ($r = 0.38$ and $r = 0.43$, respectively).

We conclude that PI entering the cell does not cause increased FL3 in neutrophils. Clozapine or a metabolite induces the increased neutrophil FL3, probably by binding to neutrophils. The causative mechanism is subject of current studies.

100. Bismuth biokinetics and nephrotoxicity after acute colloidal bismuth subcitrate overdose in rats

B.T. LEUSSINK^{1,2}, A. SLIKKERVEER^{1,3}, W.J.J. KRAUWINKEL³, G.B. van der VOET¹, E. de HEER², J.A. BRUIJN² and F.A. de WOLFF¹

Toxicology Laboratory¹ and Department of Pathology², Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; Yamanouchi Europe BV³, Research Laboratories, Leiderdorp, The Netherlands.

Bismuth(Bi)-induced nephrotoxicity has been reported to occur after acute overdoses of Bi-containing therapeutic drugs, used to treat peptic ulcers and *Helicobacter pylori* infections. We studied bismuth biokinetics and development of Bi-induced nephropathy in rats. Bi nephropathy was induced at $t = 0$ hr by feeding 33 ten to twelve weeks old female Wistar rats a single overdose of colloidal bismuth subcitrate containing 3.0 mmol Bi/kg. The control group consisted of seven rats fed the vehicle. Kidney function parameters and Bi concentration in blood and urine were followed until the animal was sacrificed between $t = 1$ and 48 hr to determine kidney histology and Bi content. Plasma creatinine increased during the

whole experimental period. Proximal tubular cells of the S3 segment had vacuolated at $t = 1$ hr and had become necrotic at $t = 3$ hr. Cells of the S1/S2 segment started to vacuolate at $t = 3$ hr to become necrotic at $t = 12$ hr. Biokinetics of bismuth in blood could best be described with a one compartment model characterized by an absorption half-life of 0.32 hour and an elimination half-life of 16 hours. The peak concentration of about 7.0 mg Bi/l was reached at $t = 2$ hr. Conclusion: Of all proximal tubular segments, S3 necrotized first after an oral CBS overdose, followed by the S1/S2 segment. The Bi in blood curve for the first 48 hours was best described by a one compartment model.

101. An in vitro Model to Study the Protective Effect of Bismuth Against Cisplatin Induced Nephrotoxicity

B.T. LEUSSINK, E. de HEER, G.B. van der VOET, A. SLIKKERVEER, J.A. BRUIJN and F.A. de WOLFF

Toxicology Laboratory and Department of Pathology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

Renal impairment due to tubular damage is an important, dose-limiting side effect of the cytostatic agent cisplatin. Animal and clinical studies provided evidence that bismuth salts are able to reduce cisplatin nephrotoxicity without compromising its anti-tumour activity. We developed an *in vitro* model to elucidate the mechanism of this protective effect using NRK-52E cells, a rat kidney cell line of tubular origin, grown to near-confluence on glass slides. The cells were pre-treated with 100 μ M BiCl₃ and 400 μ M citrate in serum free medium for 12 to 48 hours. Subsequently, the cells were incubated in serum free medium for 6 to 24 hours before being treated with 50 μ M cisplatin for 41 hours. Normal, necrotic

and apoptotic cells could be discerned after staining with Hoechst 33258, a DNA-specific dye. Cisplatin treatment caused part of the cells to become apoptotic as detected by the fragmentation of the nuclei. Bismuth pre-treatment significantly lowered the percentage of apoptotic cells when compared to controls which had been pre-treated with citrate only. The largest reduction found was from 77% \pm 15 (SD) to 41% \pm 9 apoptotic cells. Conclusion: This *in vitro* model can serve to investigate the mechanism of the protective effect of bismuth against cisplatin induced nephrotoxicity in order to prevent or reduce this side effect or enabling the use of higher cisplatin doses.

102. Detectie van het CYP3A4-V polymorfisme met PCR-RFLP en de allel-frequentie in 199 Caucasische donoren

R.H.N. van SCHAİK¹, N. van IPEREN², S.N. de WILDT², A.G. UITTERLINDEN³, J.N. van den ANKER² en J. LINDEMANS¹

Afd. Klinische Chemie¹, Afd. Kindergeneeskunde² en Afd. Interne Geneeskunde³, Academisch Ziekenhuis Rotterdam

Cytochroom 3A4 (CYP3A4) is het meest voorkomende cytochroom van het P450 systeem in de lever. Het is betrokken bij de omzetting van endogene substraten (o.a. testosteron, cortisol, progesteron en oestradiol) maar ook bij het metabolisme van een groot aantal medicijnen (o.a. antihistaminica, anti-HIV medicijnen, immunosuppressiva en chemotherapeutica). Er bestaat een grote interindividuele variatie in CYP3A4 activiteit. Standaard doseringen van medicijnen zullen hierdoor resulteren in variabele plasmaspiegels en dus in suboptimale therapie. Het voorspellen van CYP3A4 activiteit op basis van individuele genotypering kan bijdragen aan een verbetering van farmacotherapie.

Een bepaling werd ontwikkeld om de recentelijk gepubliceerde CYP3A4-V mutatie in het nifedipine-responsief element van de promotoregio van CYP3A4 aan te tonen met behulp van PCR en restrictie fragment lengte polymorfisme (RFLP) detectie. Hierbij worden aangepaste primers gebruikt

die een extra restrictieplaats in het PCR product van het CYP3A4-V allel genereren. Digestie van het 334 bp PCR product levert bij wild type sequenties fragmenten op van 220, 81 en 33 bp, terwijl bij de CYP3A4-V sequentie 199, 81, 33 en 21 bp fragmenten verkregen worden. De analyse van de digestie-producten werd uitgevoerd op een 3% agarose gel. De PCR-RFLP assay werd gevalideerd door middel van DNA sequentie analyse.

Toepassing van deze analyse op genomisch DNA verkregen uit bloed van 199 gezonde Caucasische donoren resulteerde in de identificatie van 10% heterozygoten en 0,5% homozygoten voor het CYP3A4-V polymorfisme. De frequentie van het CYP3A4-V allel in de bestudeerde groep komt daarmee op 5,5%. De ontwikkelde assay kan worden gebruikt bij de screening van patiënten die behandeld worden met medicijnen die door CYP3A4 worden gemetaboliseerd, ter voorspelling van het geneesmiddelmetabolisme.

103. Genetisch polymorfisme van cytochroom P450 CYP2C9 en het effect op fenytoïne-metabolisme

J. van der WEIDE¹, L.S.W. STEIJNS¹ en M.J.M. van WEELDEN²

Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Apotheek², Psychiatrisch Ziekenhuis Veldwijk, Ermelo

Het cytochroom P450 enzym CYP2C9, dat betrokken is bij het metabolisme van een aantal veel toegepaste geneesmiddelen, is genetisch polymorf. Naast het wildtype allel *CYP2C9*1* komen twee mutante allelen voor, *CYP2C9*2* en *CYP2C9*3*, die van het wildtype verschillen door een enkele puntmutatie. Beide mutante allelen worden geassocieerd met een verminderde katalytische CYP2C9 activiteit ten opzichte van het wildtype enzym. Naar de klinische relevantie van CYP2C9 polymorfisme is echter nog weinig onderzoek gedaan.

In deze studie is gekeken naar het effect van het *CYP2C9* genotype op het metabolisme van het anti-epilepticum fenytoïne. Bij een groep van 42 reeds ingestelde fenytoïne-gebruikers werd met behulp van PCR, gevolgd door restrictie-enzym analyse, een *CYP2C9* genotypering uitgevoerd. Tevens werd de fenytoïnespiegel en de spiegel van relevante co-medicatie in serum bepaald en gerelateerd aan de benodigde dagdosering. De resultaten van het onderzoek zijn weergegeven in de tabel 1. Bij patiënten heterozygoot voor *CYP2C9*2* of *CYP2C9*3* is de gemiddelde fenytoïne-dagdosering die nodig is om een therapeutische serumspiegel (10-20 mg/l) te bereiken, aanzienlijk lager dan bij patiënten homozygoot voor het wildtype allel. Bij meervoudig heterozygoten met genotype **2/*3* is de gemiddelde dagdosering nog lager, terwijl daarbij een verhoogde fenytoïnespiegel ontstaat. Opvallend is dat de patiënt met genotype **2/*2* bij een "normale" dosis een "normale" spiegel heeft.

Bovenstaande resultaten wijzen erop dat aanwezigheid van tenminste één mutant *CYP2C9* allel leidt tot een vertraagd fenytoïnemetabolisme, hetgeen belangrijke klinische consequenties kan hebben. Wanneer fenytoïnegebruikers, liefst vóór zij worden ingesteld, gescreend zouden worden op *CYP2C9* mutanten, zou bij elke patiënt de dosering van begin af aan op het *CYP2C9* genotype kunnen worden afgestemd. Deze werkwijze zal bijdragen aan de optimalisering van een individuele farmacotherapie.

Op de poster zal tevens worden ingegaan op de invloed van co-medicatie.

Tabel 1. *CYP2C9* genotype en fenytoïnedosis-/spiegel

Genotype	n (%)	gemiddelde dagdosering (mg)	gemiddelde spiegel (mg/l)
totaal	42	247	15,7
<i>*1/*1</i>	24 (57%)	281	15,8
<i>*1/*2</i>	8 (19%)	201	15,2
<i>*1/*3</i>	7 (17%)	199	14,4
<i>*2/*3</i>	2 (5%)	175	20,4
<i>*2/*2</i>	1 (2%)	275	17,6

104. Evaluatie Advia 60 en Pentra 60

C. BANK¹ en J. OVERBOSCH²

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Ziekenhuis Walcheren, Vlissingen; Klinisch Chemisch Laboratorium², Oosterschelde-ziekenhuizen, Goes

In het kader van de vervanging van de huidige back-up bloedcel-telapparatuur werden de Advia 60 (Bayer) en de Pentra 60 (Abx), gedurende een periode van 2 weken vergeleken met de in Vlissingen in gebruik zijnde Advia 120 (Bayer). Voor 200 monsters werden de parameters gecorreleerd met die van de Advia 120, met bijzondere aandacht voor de correlatie voor de neutrofiële granulocyten in de respectievelijke 3-part en 5-part

differentiatie. Daarnaast is gekeken naar de sensitiviteit en specificiteit voor de signalering van een afwijkende differentiatie bij verschillende afkapwaarden, reproduceerbaarheid (binnen de dag en van dag tot dag), houdbaarheid en carry-over. Overige aspecten t.a.v. eigenschappen van de genoemde apparatuur zijn opgenomen in een overzichtstijdschrift.

105. Gestandaardiseerde introductie van een nieuw radiofarmacon voor routine gebruik

R. BAUMGARTEN¹, B.J.A. WIEGERS¹, M.A.B.D. PLAIZIER², A.W. LENDERINK³ en H.M.J. GOLDSCHMIDT¹
Centraal Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹, St. Elisabeth Ziekenhuis, afdeling Nucleaire Geneeskunde², Dr. B. Verbeeten Instituut, Tilburg en Ziekenhuisapotheek³ Midden-Brabant, Tilburg

Binnen de nucleaire geneeskunde worden radiofarmaca gebruikt voor diagnostische en therapeutische doeleinden. Bij de praktische klinische invoering van een nieuw radiofarmacon zijn deelnemers van diverse disciplines betrokken, te weten van de afdeling nucleaire geneeskunde, het B-laboratorium, de stralingbeschermingdienst en de ziekenhuisapotheek. Om de introductie van een nieuw, eventueel nog niet geregistreerd, product soepel in dit multidisciplinaire verband te laten verlopen, werd een gestandaardiseerde procedure ontworpen. Deze bestaat uit:

- de evaluatie van de reeds aanwezige technische en klinische data

- het overleg over de logistiek
- het uitvoeren van in vitro experimenten
- een kleinschalige pilot-studie.

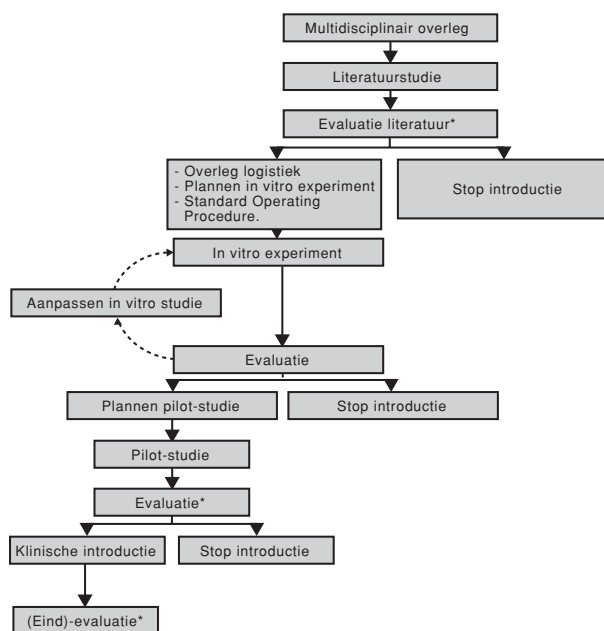
Na het doorlopen van deze vier stadia, kan besloten worden de introductie- en evaluatiefase te verlengen, de introductie van een nieuw radiofarmacon gecontroleerd door te voeren, danwel de invoering af te gelasten. Wij zijn van mening dat het opstellen van een dergelijke "checklist" er toe leidt dat de introductie van een nieuw radiofarmacon gestructureerd verloopt. Dit zal de kwaliteit van deze specifieke tak van de gezondheidszorg ten goede komen.

106. SALLOOK, soft en hardware om barcode gelabelde objecten in logisch genummerde arrays random te archiveren

A.L. HARTMAN en W.M. VERWEIJ
Stichting Artsen Laboratorium Utrecht

Het archiveren en terugzoeken van bijvoorbeeld serumbuizen is een zeer arbeidsintensief proces. Hierbij worden vaak zeer vele eenheden gearchiveerd en slechts enkele eenheden gericht uit het archief teruggehaald. De totale hoeveelheid geïnvesteerde arbeidstijd per eenheid nuttig gebruik (terugzoeken van een buis) kan zo erg hoog oplopen. Als vooraf ruimte is toegewezen is ook het ruimtebeslag van het archief vaak onnodig groot.

Er zijn in het kader van Total Laboratory Automation grote, kostbare systemen op de markt, die dit proces automatiseren. Wij hebben software ontwikkeld, die het mogelijk maakt om barcode (alle typen) gelabelde objecten in random volgorde in een logisch genummerd array (buisenrek) te plaatsen. Later kan/kunnen door het ingeven van het ID van het object (bijv. monsternummer) op de centrale PC de positie(s) van het/de objecten in het array worden bepaald. De barcodes worden decentraal ingescanned met, maximaal 5, draadloos met hun moederstation verbonden (accu gevoede) handscanners. Het moederstation is aangesloten op een in het bedrijfsnetwerk opgenomen PC. Toepassing van dit systeem is onafhankelijkheid van het type array. Het kan zowel worden toegepast op een "monsterbibliotheek", als bijvoorbeeld op een willekeurige verzameling (bestaande) kastruimte met genummerde posities (planken en/of vakken). Onze conclusie is dat met dit systeem, voor geringe investeringskosten, een belangrijke structurele besparing op arbeid gerealiseerd wordt. Zie het flowschema. N.B. het systeem zal werkend getoond worden.



* dient zoveel mogelijk multidisciplinair te geschieden

107. Onderzoeksprojecten bij de Stichting Artsen Laboratorium Utrecht

H.A. HENDRIKS en W.M. VERWEIJ
Stichting Artsen Laboratorium Utrecht

De huisartsenlaboratoria hebben in Nederland het image grote produktielaboratoria te zijn. Naast het verwerken van de grote aantallen aanvragen op een efficiënte en kwalitatief goede manier wordt echter ook nadrukkelijk aandacht geschonken aan het vakinhoudelijke deel. Bij de SAL komt dit onder andere tot uiting in een samenwerkingsverband met het Julius Centrum voor Huisartsgeneeskunde en Patiëntgebonden onderzoek van het UMCU en in de vakinhoudelijke betrokkenheid bij een groot aantal researchprojecten in de eerste lijn, zowel in het verleden als in het heden. Een aantal voorbeelden van deze projecten, die de SAL heeft opgestart of actief aan meewerkt, zijn:

- COPD project. Dit project heeft als doel om longfunctie

onderzoek toegankelijker te maken voor de patiënt uit de eerste lijn.

- Utrechts Diabetes Project (UDP). Monitoring en begeleiding van type 2 diabetes patiënten onder verantwoordelijkheid van de huisarts, waarbij gevraagd en ongevraagd advies wordt gegeven door een internist/diabetoloog alsmede wetenschappelijke evaluatie van de resultaten
- Leidse Rijn Gezondheidsproject (LR-GP). Een groot project in deze nieuwe wijk in Utrecht waarbij de gezondheid van alle instromende personen als cohort nauwkeurig wordt vastgelegd en gevolgd.
- AEOLUS project. Vergelijkend onderzoek naar methode van diagnostiek van Helicobacter Pylorie infectie.

- Glucosemeter project. Project waarbij gekeken wordt of het zinvol is de gebruikte draagbare bloedglucosemeters van de diabetespatiënten structureel te controleren.
- SANDERFEL project. Een monitoringsproject op allergie gebied, waarbij de expositie van allergenen van kat- en huisstofmijtallergische patiënten gemeten wordt in de thuissituatie.

- Haalbaarheidsstudie naar de toepassing van HPV screening (hybride capture) als primaire screening bij bevolkingsonderzoek op baarmoederhals carcinoom.

De doelstelling van de huisartsenlaboratoria, en zeker die van ons laboratorium, is de praktische ondersteuning van eerste lijnsdiagnostiek, inclusief het praktisch wetenschappelijk onderzoek ter verbetering van deze diagnostiek.

108. Biosensoren voor de klinische chemie en medische technologie?

S.W.F.M. van HÖVELL tot WESTERFLIER en B. van der GAAG
Afdeling Sensortechnologie, TNO Voeding, Zeist

Bieden biosensoren een toegevoegde waarde aan de klinisch chemie en medische technologie?

Onder biosensoren wordt veelal verstaan:

Sensoren voor detectie van biologisch relevante meetparameters, en/of sensoren waarbij het selectieve sensorinterface biochemische selectoren bevat. Bij deze biosensoren wordt een specifieke interactie tussen de meetparameter en de selector, met behulp van een fysische transductie-techniek, omgezet in een elektrisch signaal. De afdeling Sensortechnologie van TNO richt zich op de applicatie en ontwikkeling van:

- Biochemische sensorinterfaces met selectoren, zoals antilichamen, receptoren, enzymen en eiwitten
- Optische, elektrochemische en akoestische transductie-technieken
- Biocoatings voor toepassingen in verschillende meetmatrices (bloed, serum en urine)
- Monstervoorbewerking
- Data-aquisitie en -verwerking

Biosensoren leveren vooral een meerwaarde indien de meetwens is gericht op:

- Snelle metingen en diagnoses
- Decentrale testen
- Kostenreductie van de analyses

Een aantal door TNO ontwikkelde biosensoren kunnen na modificatie toegepast worden in de klinische chemie en de medische technologie, namelijk:

Enzym-sensoren:

- Implanteerbare en telemetrisch uitleesbare glucose sensor voor diabetici
- On-line glucose analyser voor meting in bloed- en urine-monsters
- Ureum sensor voor detectie in biologische meetmatrices, zoals melk, serum en urine

Affiniteit-sensoren, gebaseerd op de transductie technieken:

- Surface Plasmon Resonance (SPR)

- Mach Zehnder Interferometrie (MZI), voor meting van progesteron, mycotoxines, antigenen, receptor (ant)agonisten, en hormonen

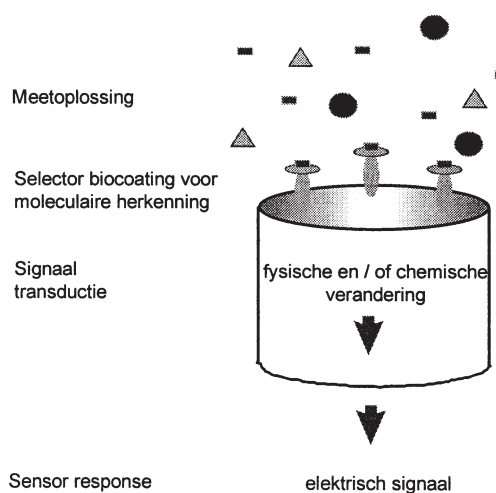
Akoestische sensoren:

- Bulk Acoustic Wave (BAW) voor detectie van bacteriën, virussen en toxines

Opto-chemische sensoren:

- Fluorescentie, chemo-luminescentie, NIR, fiber-optica voor bepaling van de pH, O₂ of CO₂

Andere meetparameters waarvoor applicaties ontwikkeld kunnen worden, zijn: enzymsubstraten zoals: lactaat, alcohol, suikers, triglyceriden, creatinine, en fibrine en enzymen en eiwitten zoals Myoglobine, Troponine I, Troponine T, creatine kinase, ALAT, ASAT, en LDH.



Figuur 1. Biosensor

109. Evaluation of the use of a laboratory information system for quality and efficiency improvement

N. de JONGE, P.F.H. FRANCK and A.J.P.F. LOMBARTS
Department of Clinical Chemistry, Leyenburg Hospital, The Hague, The Netherlands

Laboratory results need post analysis processing. This data processing includes analytical quality control, plausibility checks, checking for clinically relevant test results to be rechecked or communicated to the attending physician without delay, authorisation and reporting. This process used to be time consuming and sensitive to errors. In order to improve both laboratory quality and efficiency, we developed, within the framework of a new laboratory information system, a concept to automate parts of the post analysis data processing.

The concept is based on result-based flaggings and decision rules. Each laboratory result is accompanied by a flagging ('severity') which refers to norms (measuring range, reference range, pathological range, critical values), deltachecks, analyzer flags, or quality control rules. Using decision rules, these severities may trigger e.g. reflex testing, authorisation, and addition of comments on reports.

We evaluated this system by retrospective analysis of labora-

tory results. Criteria were execution of decision rules (e.g. alerting of critical values, correct authorisation), turnaround time, and workload.

Many parts of our laboratory data-processing could be automated using the LIS. The authorisation process was translated to a set of decision rules and is now performed semi-automatically. Exceeding of critical values and stat results are notified by the system. All data are logged and listing of results to be paged are produced automatically.

The execution of decision rules is performed consequently. In addition, the overall turnaround time was reduced considerably, while the workload of the technicians has been slightly reduced. Approximately 85% of the test results are now confirmed and validated automatically. In the near future we will refine the current procedure by extension of decision rules. In addition, we will implement extended quality control by the LIS.

110. Quality improvement through verbal and written interviews of laboratory employees

N.C.V. PÉQUÉRIAUX, J. PUTS en H.M.J. GOLDSCHMIDT

Centralized Department of Clinical Chemistry and Hematology, St. Elisabeth Hospital, Hilvarenbeekseweg 60, 5022 GC Tilburg, The Netherlands

Introduction: During the process to accreditation, next to documentation and regulation, major features are: how to motivate the employees and to give them "the quality edge", and what is the acquired knowledge about quality and about accreditation. Reasons for the written interviews were related to the establishment of shortcomings among the employees during the internal audits effected within the framework of the preparation for an external audit by the CCKL-test and in relation to the relative harmlessness of the method.

Materials and methods: Three months before the external audit we sent a list of 78 questions on about 11 different quality items to everyone. Answers had to be yes or no, response time was 14 days. Results of the survey, including 12 hot items, were presented by a poster and by lectures. Later we held verbal interviews in which we discussed among others 21 questions of the written interviews. 2 months after the external audit we repeated the written and the verbal interviews.

Results: for 38 questions the answer was "yes" in less than

70% of responses in the first round and for 13 questions in the second. The mean increase in positive answers was 16.8% (0-59%) in 5 months.

Discussion: The percentage responses varied between categories of employees (most responses came from technicians). The effect of verbal interviews and lectures was apparent because the items presented reflected a relatively high score on the % difference (respectively 18.7% and 31.6%).

Conclusion: We concluded that a written interview in combination with a personal audit is an efficient tool to activate the employee's quality awareness. These techniques are tools to objectify the quality thinking. For instance the simple question 'does the laboratory deliver quality results?' was answered negatively by 69% before and only 15% after interviewing. This was reached through direct employee discussions resulting in a conversion from the feeling 'nothing is right here' into 'we deliver good quality'!

111. Storage-stability of serum and plasma samples for allergy tests on the Pharmacia & Upjohn® Unicap®100

C.H.H. SCHOENMAKERS, S. van den HEUVEL, J.J. TREPELS, A.J.W.P. WILLEMS and J.L.P. van DUIJNHOFEN

Clinical Laboratory, Elkerliek hospital, PO box 98, 5700 AB Helmond, The Netherlands

The storage-stability at 2-8°C of primary and secondary tube serum and plasma (citrate, EDTA, heparin and heparin/gel) samples was investigated for the Pharmacia & Upjohn® Unicap®100 parameters: total IgE, Phadiatop, rast d1 (house dust mites), rast t3 (birch pollens) and rast g6 (timothy grass pollens).

Procedure: After collection of clot-serum, and citrate-, EDTA, heparin- and heparin/gel-plasma samples by venipuncture, a 200 µl portion was separated and stored at -20°C as a reference for test-stability. Samples in primary and secondary (supernatant was separated from blood-cells after centrifugation) tubes were analyzed in triplicate at two levels after 0, 3 and 7 days of storage at 2-8°C. On day 8 the reference portion was thawed and analyzed in triplicate. Results obtained for citrate-plasma were corrected for dilution by the anticoagulant.

The relative deviation of the results compared to the starting result were plotted against time. The 2x%CV-borders, obtained in routine with standard control material, were used as a cut-off criterion..

Results: For all sample materials the results remained between the 2x%CV-borderlines, table 1.

Conclusions: 1. No significant difference between results of clot-serum or citrate-, EDTA-, heparin- or heparin/gel-plasma samples was detected for all parameters. 2. No significant difference between results of primary or secondary tubes was detected for all parameters. 3. Total IgE and levels of specific IgE against phadiatop antigens, house dust mites, birch pollens and timothy grass pollens in primary tube samples (for heparin with and without gel plasma separator) are stable up to seven days when stored at 2-8°C.

Table 1. Results of measurements on day 1 (t = 0) and 2x%CV-borders

Sample material	Level 1 [kU/l]					Level 2 [kU/l]				
	tot IgE	phadiat	mites	birch	grass	tot IgE	phadiat	mites	birch	grass
Serum	25.4	40.5	4.84	3.43	2.48	2752	57.0	11.0	37.5	20.2
Citrate	24.6	45.9	5.32	3.47	2.66	2557	55.6	11.7	35.2	20.9
EDTA	25.3	45.0	5.51	3.50	2.65	2721	58.4	11.5	34.7	21.1
Heparin	26.8	42.6	5.47	3.45	2.71	2865	60.1	11.2	35.0	22.2
Heparin/gel	25.7	43.4	5.03	3.41	2.61	2928	59.8	11.8	36.0	22.6
2x%CV-borders	20	28	26	26	30	20	28	26	26	30

112. De Integra 400 als back-up systeem voor het modulaire Hitachi chemie-systeem en als platform voor consolidatie van "speciële chemie-bepalingen"

M. TRESKES, C. MOO en E.H. SLAATS.

Hematologisch Klinisch Chemisch Laboratorium, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam

Recent is binnen ons laboratorium de Roche/Hitachi Modular (I900-P800-P800) geïmplementeerd als vervanging van twee Hitachi 717 systemen. Daarnaast bestond de behoefte enkele manuele en semi-geautomatiseerde speciële chemie-bepalingen te consolideren binnen één platform dat eveneens als back-up dienst kan doen voor "de Modular".

De Integra 400 is zeer geschikt als platform voor consolidatie van een breed pakket aan bepalingen met een beperkte capaciteit. De ingezette harmonisatie van reagentia en standaarden uit de "Integra lijn" en "de Hitachi lijn", na het samengaan van Roche en Boehringer-Mannheim, maken deze combinatie extra aantrekkelijk.

De Integra 400 is gedurende enkele weken geëvalueerd volgens gangbare protocollen voor imprecisie, lineariteit, carry-over en methodenvergelijk.

In onze ervaringen is de Integra 400 een robuust en gebruiksvriendelijk analysesysteem. Opvallende voordelen zijn het ge-

bruiksgemak en de overzichtelijke Windows-NT gebaseerde besturing die met recht multi-tasking is. Opvallende nadelen zijn het ontbreken van de mogelijkheid het plasma- of serum-aspect te meten middels een hemolytische, icterische of lipemische index alsmede de (bekende) geslotenheid van het systeem. De CK-MB activiteitsbepaling kent geen mogelijkheid van blanco correctie. Alhoewel de kalibratoren naar keuze kunnen worden gedefinieerd treden er opvallende verschillen op bij gebruik van dezelfde cfas-kalibrator (met toegekende "Hitachi waarden") op de Integra 400 en de Hitachi-Modular P800.

De recent beschikbaar gekomen cfas standaard met toegekende Hitachi- en Integra-waarden lost niet al deze problemen op. Ook bij de speciële eiwitten treden soms grote verschillen op in vergelijking met de Behring 100 nefelometer, ondanks standaardisatie op CRM470! Dit heeft de consolidatie van speciële chemie-bepalingen aanzienlijk vertraagd.

113. No mutations in β_2 -microglobuline genes from patients heterozygous for the HFE G845A mutation with familial hemochromatosis

L.D.DIKKESCHEI, A.H.PEPPING, J.M. KOLK, J.W.J. van der STAPPEN and M.A. ALLEMAN

Isala klinieken, Zwolle, The Netherlands

The homozygous HFE G845A mutation, resulting in disruption of a S-S bridge in the β_2 -microglobulin (β_2 -M) - HFE dimer, is strongly associated with hereditary hemochromatosis (HH). Little is known about carrier status in relation to iron storage. Like compound heterozygosity, one G845A combined

with mutations in the β_2 -M gene could lead to overt HH. From heterozygous members of families evaluated for HH (CRP n, ferritin $\uparrow\uparrow$, one G845A, negative for C187G and A193T) coding DNA sequences for β_2 -M were amplified and sequenced. No mutations were found.

114. Identification of STS gene deletions in X-linked ichthyosis after separation of amplified fragments of exons 1 and 10 by capillary electrophoresis

L.D.DIKKESCHEI, A.PEPPING, J.W.J. van der STAPPEN, J.KOLK¹ and I. KOEDAM

Isala klinieken, Zwolle¹, The Netherlands

X-linked ichthyosis is a genetic skin disease caused by mutations in the steroid sulfatase (STS) gene. In most patients the complete STS gene (and flanking regions) is deleted, but point mutations and smaller deletion are also found. In cases of complete gene deletion quantification of the PCR product is necessary for carrier detection. A multiplex PCR (for exon 1,

exon 10 and a reference gene) is designed and fragments are separated by capillary electrophoresis. Mean relative peak areas are respectively: Exon 1: men 101; women 157; affected men 0; male carriers 106. Exon 10: men 41; women 72; affected men 0; male carriers 51.