

Posterabstracts

Samenvattingen van de posterpresentaties tijdens de wetenschappelijke vergadering van het 47^e NVKC-congres op 27 en 28 april 1995 te Lunteren

Klinische (bio)chemie en methodologie

Lipiden

Method-dependent increase of lipoprotein(a) in insulin dependent diabetes mellitus during pregnancy

H.A. KLEINVELD¹, H.L.M. PEKELHARING¹, N.L. AALDERS², G.H.F.A. VISSER², J.J. van DOORMAAL³, B.N. BOUMA⁴ and H.J.M. van RIJN¹

Departments of Clinical Chemistry¹, Obstetrics² and Haematology⁴, University Hospital Utrecht and Department of Internal Medicine³, University Hospital Groningen, The Netherlands

The current prevalent view is that plasma Lp(a) concentrations are under strong genetic control. However, evidence for a possible regulatory role of hormones are accumulating. During pregnancy for instance, fluctuations of Lp(a) levels have been reported. Also in IDDM patients elevated Lp(a) levels have been reported. In the present longitudinal study plasma lipid concentrations, including Lp(a), were determined in IDDM women prior to pregnancy, during pregnancy and three months post-partum.

In our study population, Lp(a) concentration was not significantly correlated with either glycosylated haemoglobin levels or apo(a) phenotype. The changes in other lipid parameters observed were similar to those reported during normal pregnancy. The Lp(a) concentrations were quantified using two different immunochemical methods which possess different sensitivities and specificities, an immunoradiometric assay (IRMA), using two different anti-apo(a) antibodies and an

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using an anti-apo(a) and an anti-apo B antibody. The median pre-pregnancy Lp(a) concentrations were 118 mg/l (range 15-672) as determined with the IRMA, and 107 mg/l (range 21-451) as determined with the ELISA. The women with IDDM showed, in general, no significant change in Lp(a) concentration during pregnancy when assayed with the IRMA, although a tendency to increased values was observed. When Lp(a) concentrations were determined with the ELISA, a strong and significant increase in Lp(a) from week 17-24 of pregnancy onward, was found.

The results of our study confirm the prevalent view that during pregnancy Lp(a) levels are increased. However, the present results in pregnant IDDM-patients and those of others on Lp(a) in normal pregnancy strongly emphasize the importance of method selection when determining Lp(a) concentrations.

The incidence of double banded Apo(a) phenotypes in a healthy normolipidemic butch population of caucasian descent

H.A. KLEINVELD, P.F.C.C.M. DUIF, F.R. LEUS and H. J. M. van RIJN

Department of Clinical Chemistry, University Hospital Utrecht, The Netherlands

Lipoprotein(a) (Lp(a)) is a genetic variant of low-density lipoprotein (LDL) containing an extra subunit called apolipoprotein(a), (apo(a)). The concentration of Lp(a) is mainly genetically determined with an apparent inverse correlation between the apo(a) and thus the Lp(a) phenotype and the concentration in plasma. Apo(a) shows strong structural resemblance with plasminogen. It contains a variable number of the plasminogen like kringle 4, consequently apo(a) isoforms and Lp(a) vary in size.

In this report we describe the incidence of the various apo(a) isoforms in a healthy normolipidemic population of Caucasian decent (n=185). The geometrical overall mean Lp(a) concentration in the study group was 79 mg/L with a range of 14 mg/L up to 993 mg/l, without a significant difference between women (n=93) and men (n=92). Of the subjects 20% (n=37) had a Lp(a) concentration above 300 mg/L. With SDS-agarose followed by semi-dry immunoblotting the apo(a) isoforms

were characterized. It was found that 62% (n=115) of the study population had a single-banded phenotype. Remarkably, only 25% (n=47) of the subjects had a double-banded phenotype. In 13% (n=23) of the subjects no apo(a) isoform could be detected, without exception all these subjects had Lp(a) concentrations below the detection limit of the Lp(a) assay (<14 mg/l).

It is well established that each individual has two apo(a) alleles, which is generally thought to result in two apo(a) isoforms and thus a double-banded Lp(a) phenotype. However, based on the present results, it is concluded that in the majority of healthy Caucasians only a single apo(a) isoform in plasma is detectably expressed. The number of single- and double-banded phenotypes found and the apparent discrepancy with those reported by others and those predicted by simple genetics are discussed in the context of population and/or methodological related differences.

Influence of ϵ ACA (ϵ -aminocaproic acid) and LDL on Lp(a) and plasminogen binding to desafib-X

J. PRINS, F.R. LEUS and H.J.M. van RIJN

Department of Clinical Chemistry, University Hospital Utrecht, The Netherlands

Elevated plasma levels of lipoprotein (a) [Lp(a)] in humans represent a major inherited risk factor for atherosclerosis. Lp(a) consists of a LDL-like particle and an apo(a)-protein linked to apoB100 which is highly homologous to plasminogen (Pg) as it contains multiple repeats of Pg kringle IV, a fibrin and lysine binding domain. This may link, in a single lipoprotein, both the cholesterol deposition and thrombotic characteristics of the atherosclerotic process. In this study the binding of various [125 I]-labeled Lp(a) preparations and [125 I]-labeled Pg to desafib-X (des-AA-fibrinogen limited digested with plasmin) coated wells in the presence or absence of ϵ ACA (a lysine-analogue) and LDL was analysed.

Lp(a) was purified by ultracentrifugation and subsequent gel-filtration. Lysine-binding (Lp(a)lys⁺)- and non-lysine-binding (Lp(a)lys⁻) Lp(a) were separated by affinity chromatography

on lysine-sepharose. Lp(a)-free LDL was purified by ultracentrifugation followed by chromatofocusing.

The Lp(a)lys⁺ fraction in the four purified Lp(a) preparations was 85 \pm 8%. The observed K_d (nM) of the desafib-X binding of Lp(a), Lp(a)lys⁺, Lp(a)lys⁻, LDL and Pg was respectively 42 \pm 4, 38 \pm 26, 29 \pm 12, 12 \pm 13 and 628 \pm 45. The binding of Lp(a), Lp(a)lys⁺ and Pg to desafib-X is inhibited to a similar degree by 0.2 M ϵ ACA (respectively 34 \pm 13%; 36 \pm 16% and 37 \pm 1%) indicating lysine-specific binding of these preparations. The binding of Lp(a)lys⁻ and LDL can not be inhibited by ϵ ACA. LDL inhibits the binding of all Lp(a) preparations and Pg to desafib-X, which is additional to the binding-inhibition by ϵ ACA. In conclusion, the results suggest a specific binding site for LDL to desafib-X that influences the binding of Lp(a) and Pg.

Tumormarkers

Equimolarity of manual and automated assays for prostate-specific antigen (PSA)

M.A. BLANKENSTEIN and J. van ZON

Utrecht University Hospital, The Netherlands

Standardization of assays for prostate-specific antigen (PSA) remains a major issue in view of the occurrence of both free and complexed PSA. It has been advocated that assays for total PSA should respond equally to free PSA and to PSA-ACT complex. The purpose of the present study was to evaluate the equimolarity of currently available PSA assays. Free PSA and PSA-ACT complex were prepared from a serum sample from a patient with advanced prostatic carcinoma by Sephacryl S-300 chromatography. The two preparations were assayed by Hybritech Tandem-R PSA assay and diluted to 3 ng/ml. Mixtures with free and complex PSA in proportions varying from 100/0 to 0/100 in steps of 10 were assayed with the different methods, each with its own standard. Regression lines were calculated between the assay results and the fraction of free PSA. An equimolar assay would yield a slope of 0.0. The results obtained with assays for total PSA were: Hybritech Tandem-R: -0.20 \pm 0.04; DPC IRMA-count 0.19 \pm 0.06; DPC Coat-A-Count IRMA: 0.22 \pm 0.09; DPC IMMULITE 3rd Generation: 0.36 \pm 0.10; DPC Milenia EIA: 0.49 \pm 0.15; DPC IMMU-

LITE PSA: 1.05 \pm 0.11; Boehringer Mannheim Enzymun Test: 1.73 \pm 0.15; Abbott IMx: 2.95 \pm 0.05; CIBA-Corning ACS-180: 7.32 \pm 0.29. Assuming that the Hybritech Tandem-R assay is indeed equimolar, we conclude that the DPC IMMULITE 3rd Generation, both DPC IRMA's and the Milenia EIA also are equimolar. The other assays show increased preference for free PSA. The extreme slope observed with the CIBA Corning method can be attributed partly to its different calibration. For the DPC IMMULITE Free PSA assay, a slope of 2.62 \pm 0.04 and a correlation coefficient of 0.998 were found. At 0% free PSA the assay read 0.09 \pm 0.04. This indicates that this assay is highly specific for free PSA but that a 12% bias exists as compared to the theoretical free PSA concentration calculated from the Hybritech Tandem-R total PSA assay results. The preference of some PSA assays for free PSA, does not preclude their use since in clinical specimens PSA is predominantly complexed and variation in the bound/total ratio is much less than in the present experiment.

Evaluation of tumormarkers on Immulite

J.L.P. van DUIJNHOFEN^{1,2}, M.P.M. LEERMAKERS², A.J.L. van de WOUW² and N.C.V. PEQUERIAUX^{1,2}

Dept. of Clinical Chemistry and Haematology, St. Elisabeth Hospital¹ and Dr. Bernard Verbeeten Institute², Tilburg, The Netherlands

A preliminary evaluation of AFP, β_2 -microglobuline and GIMA (CA 19.9) included Krouwer-27 multifactor design, between-run imprecision and correlation study (Y = Immulite, X = current method). For PSA, OM-MA (CA-125) and CEA the evaluation was extended with EP-6 linearity, detection limit and longitudinal study.

PSA: The imprecision is good (5-6%). There was a good correlation with IMx (Y = -0.018 + 1.095 X; n=112, 0-185 μ g/l, r=0.845). Linearity is good (range 0.65 μ g/l - 120 μ g/l). The detection limit found is within the claim.

OM-MA: The imprecision ranged from 4-7%. There was a good correlation with IMx (Y = -1.868 + 0.897 X; n=117, 0-500 kU/l, r=0.955). Linearity is good (2 - 225 kU/l). The detection limit found (1 kU/l) is higher than the claim (0.3 kU/l).

There might be a calibration problem resulting in under-estimation (approx. 1 kU/l) of CA-125 levels.

CEA: The imprecision is rather high (8-10%). There is a good correlation with IMx (Y = 0.091 + 1.299 X; n=115, r=0.965, range 0-400 μ g/l). Linearity is good (range 1 μ g/l - 300 μ g/l). The detection limit found (0.5 μ g/l) is higher than the claim (0.2 μ g/l), mainly because of a systematic difference of 0.5 μ g/l.

AFP: The imprecision is good (4%). There is an excellent correlation with IMx (Y = -0.631 + 0.911 X; n=36, 0.5-300 μ g/l, r=0.999). A non-linearity was observed in the Krouwer protocol and concentration-range dependent slopes in the correlation study (Y = 0.329 + 0.420 X; n=23, 0-20 μ g/l, r=0.881), pointing to a linearity problem.

β -2-microglobuline: The imprecision is rather high (6-9%) and shows a drift. There is a good correlation with IMx, but a rather high slope ($Y = -0.184 + 1.372 X$; $n=35$, $r=0.992$, range 1-12 mg/l).

GI-MA: The imprecision is very high at low level (27.6 %) and a negative drift was observed. There is a poor correlation with Abbott-RIA ($Y = -2.423 + 0.859 X$; $n=35$, 2-850 kU/l, $r=0.682$).

Hematologie

Detectie van blasten op de H*1 Technicon® en de Sysmex NE-8000™

W. van der MEER, D.W. SWINKELS en J.L. WILLEMS

Afdeling Klinische Chemie, Academisch Ziekenhuis Nijmegen

De automatische celtellers nemen reeds lange tijd een vaste plaats in op de klinisch-chemische en hematologische laboratoria. Als screenend apparaat voldoen zij prima om vast te stellen of een microscopische dif uitgevoerd dient te worden.

Het doel van deze studie was uit te testen of bij monsters met blasten in het perifeer bloed, de H*1 Technicon® en de Sysmex NE-8000™ een blast-sigitaal gaven of een andere "vlag".

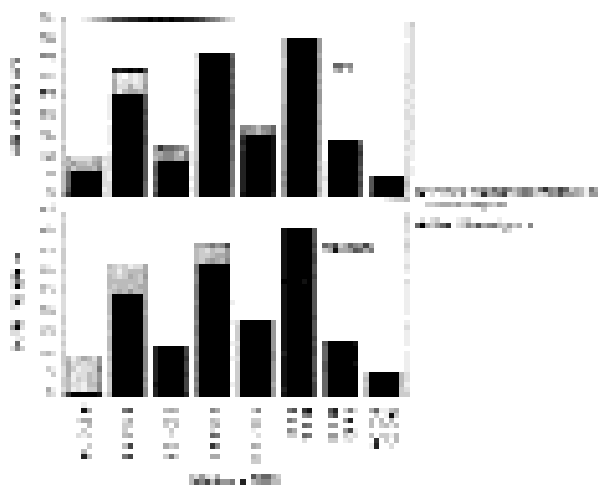
170 Monsters met blasten zijn gemeten op beide apparaten, het blastenaantal lag in de range van $0,02-191,3 \times 10^9/l$ (gemiddelde: $97,5 \times 10^9/l$). 142 Monsters (84%), gaven een positief blast-sigitaal op zowel de H*1 als de NE-8000, 13 monsters (8%) waren op de H*1 blast-positief en op de NE-8000 blast-negatief, 8 monsters (5%) waren op de H*1 blast-negatief en op de NE-8000 blast-positief, 7 monsters (4%) lieten op beide apparaten geen positief blast-sigitaal zien.

De monsters die geen aanleiding gaven tot een direct blast-sigitaal, waren voor de H*1 en de NE-8000 gelegen in de respectievelijke ranges $0,02-9,20 \times 10^9/l$ en $0,02-2,90 \times 10^9/l$.

Van de 15 monsters, die op de H*1 geen direct blast-sigitaal gaven, waren er wel 14 die via andere vlaggen (bijvoorbeeld voor een linksverschuiving) wezen op het voorkomen van blasten. De NE-8000 was in staat bij alle 20 monsters (zonder direct blast-sigitaal) andere vlaggen (bijvoorbeeld voor onrijpe granulocyten) te tonen, die wezen op de mogelijke aanwezigheid van blasten (zie figuur).

Conclusie

Bij het vaststellen van aanwezigheid van blasten in het perifeer bloed dient men zowel voor H*1 als NE-8000 niet alleen op het blast-sigitaal te letten, ook andere vlaggen kunnen een indicatie zijn voor de aanwezigheid van blasten. Beide apparaten zijn aldus in staat het voorkomen van blasten te detecteren in de range van $0,02-191,3 \times 10^9/l$.



Bi-center evaluation of vitamin B12 assay of Bayer-Technicon Immuno 1 system

J. LINDEMANS¹, J.A. van BARNEVELD-LOOG², K. CHAN¹, S.M.E. DERKS², P.G.J. ter HEERDT¹, A.A.J. van LANDEGHEM², J.H.M. TIMMERS², B.D. van ZELST¹ and H.M.J. GOLDSCHMIDT²

Dept. of Clinical Chemistry¹, University Hospital, Dijkzigt/Sophia, Rotterdam and Dept. of Clinical Chemistry and Hematology², St. Elisabeth Hospital, Tilburg, The Netherlands

The vitamin B12 assay on the Immuno 1 is a competitive protein binding method using automated on-board sample pretreatment for release of the vitamin from endogenous binders, magnetic separation of bound and free ligand, and alkaline phosphatase activity as indicator.

During a period of 3 months the performance of this vitamin B12 assay on two instruments in two Dutch laboratories was evaluated on the following aspects: imprecision, specificity, linearity, stability, and comparability with several established analytical methods. The standard deviation varied between 9 and 15 pmol/l (or 2 to 4% CV) over the entire reference range and increased to about 18 pmol/l (14%) at a level of 130 pmol/l which is clinically insignificant. There is no increase in imprecision above the reference interval. These figures compare favorably with competitive systems in particular above a concentration of 300 pmol/l. Within-run imprecision data were within the performance claims of the manufacturer (2.4 % at 200 pmol/l, 0.8% at 550 pmol/l and 1.2% at 880 pmol/l). Interfering substances were evaluated using patient samples with known concentrations of interferants.

In the method comparison the Immuno 1 assay was tested against two other non-isotopic methods, IMX (Abbott) and the ACS-180 (Ciba-Corning) and two radioisotopic methods, the "no-boil" assay from Diagnostic Products Corporation and the "boil" assay Simultrac S from Becton Dickinson 56 samples from normal healthy volunteers and 44 samples from different patient categories were included in the comparison. The results were all plotted against each other in a pseudo 3D-plot as presented: $BD = -.91 + .99 IMx$, $I1 = 35.72 + .85 BD$ and $I1 = 36.65 + .87 IMx$. From the 18 samples with deficient values at least in both radioisotope dilution assays 13 were correctly classified on the basis of the Immuno 1 assay (< 150 pmol/l). In the other 5, 3 of which were anti-Intrinsic Factor positive, the test results were between 150 and 195 pmol/l.

The overall conclusion is that the Immuno 1 vitamin B12 assay system demonstrates excellent analytical performance in comparison with other non-isotopic systems and radioisotopic tests. The Immuno/B12 assay is as clinically reliable as the comparative methods and it could be improved by adjustment of the calibration and reduction of the low level imprecision.

De kwaliteit van de aanvraag voor laboratoriumonderzoek bij verdenking op een cobalamindeficiëntie

J.D.E. van SUIJLEN¹, H.J. BROUWER¹, P.G.J. ter HEERDT¹, J. SCHNEEDE² en J. LINDEMANS¹

Afdeling Klinische Chemie¹, Academisch Ziekenhuis Rotterdam en Department of Clinical Chemistry², University of Bergen, Norway

Het klassieke beeld van een cobalamindeficiëntie (vitamine B12-deficiëntie) is de combinatie van een macrocytaire anemie, hypergesegmenteerde neutrofiële granulocyten, verhoogd totaal bilirubine, verhoogd LDH en (in een later stadium) neuropsychiatrische afwijkingen. Vaak worden de hematologische afwijkingen als primaire indicatie gezien en als selectie criterium voor de aanvraag van vervolgonderzoek gebruikt. Dat vervolgonderzoek bestaat meestal uit de bepaling van cobalamine- en foliumzuurconcentratie. Recente studies hebben echter aangetoond dat neuropsychiatrische afwijkingen veroorzaakt door een cobalamindeficiëntie in 28% van de gevallen niet gepaard gaan met hematologische afwijkingen en dat een cobalamindeficiëntie in een relatief groot aantal gevallen voorkomt zonder aantoonbare hematologische en biochemische afwijkingen. Daar tevens de sensitiviteit en met name specificiteit van de B12-bepaling te wensen overlaat, lijkt de klassieke aanpak bij verdenking op een cobalamindeficiëntie inefficiënt. Aanvullende diagnostiek door bepaling van methylmalonzuur en totaal homocysteïne in serum, met een gecombineerde sensitiviteit van 99,8% lijkt daarom noodzakelijk en kan gebruikt worden om de kwaliteit van de aanvraag via de klassieke route te toetsen.

Wij hebben daartoe bij een 49-tal patiënten met een laag-

normaal of verlaagd vitamine B12-gehalte waarvan naast vitamine B12 alleen foliumzuur was aangevraagd, aanvullend de methylmalonzuur- en totaal homocysteïneconcentratie in serum bepaald, en op basis van dit viertal parameters, aangevuld met hematologische en biochemische parameters (indien aangevraagd) de cobalaminestatus bepaald.

Conclusies

- Hematologische afwijkingen kunnen niet gebruikt worden als selectie criterium voor de aanvraag van een serum vitamine B12-bepaling
- 1 op de 5 patiënten met een laag-normaal vitamine B12-gehalte heeft een metabole B12-deficiëntie en
- meting van methylmalonzuur in combinatie met totaal homocysteïne verhoogt de kwaliteit van de aanvraag bij verdenking op een vitamine B12-deficiëntie.

Ter verhoging van de kwaliteit van diagnostiek bij verdenking op een cobalamindeficiëntie zou daarom bij iedere patiënt met een laag-normaal of verlaagd serum B12, bij iedere patiënt met een onverklaarbare anemie en bij alle patiënten met onverklaarbare neurologische afwijkingen het methylmalonzuur en totaal homocysteïne bepaald moeten worden.

Time dependent increase of differential monocyte count on the Sysmex NE 8000

P.C.M. BARTELS and M. SCHOORL

Laboratory of Clinical Chemistry, Hematology and Immunology, MCA, Alkmaar

If compared with other hematology analysers discrepancies have been published in several papers with respect to the fraction of monocytes as a result of the differential count measured on the Sysmex NE 8000 Hematology Analyser. Deviations may amongst others be due to time dependent alterations in white blood cells.

After venepuncture it is not uncommon that blood samples are stored at strongly different incubation conditions before measurement for a shorter or longer period of time.

In routine determinations slightly to moderately elevated percentages of monocytes can be observed rather frequently, particularly as a result of measurement in samples obtained from subjects in out patient departments. In the latter category of

samples a longer period of time may have been elapsed between venepuncture and measurement.

The effect of various storage conditions has been investigated by incubating blood samples at different temperatures and time intervals. Due to storage results of measurements performed on a Sysmex NE 8000 Hematology Analyser obviously demonstrated a shift from the fraction of granulocytes towards the fraction of monocytes. As a result from additional experiments with respect to immunophenotyping the appropriate classes of white blood cells, it has been shown that increase from the fraction of monocytes is due to granulocyte activation during storage. The phenomenon predominantly occurs at temperatures exaggerating ambient room temperature.

Conditional reference-ranges for Eosinophil Cationic Protein (ECP)

C.J. PRONK-ADMIRAAL and P.C.M. BARTELS

Laboratory of Clinical Chemistry, Haematology and Immunology MCA, Alkmaar

Frequently, increased amounts of eosinophils are found in the blood and tissues of subjects with allergic diseases such as asthma, allergic rhinitis and atopic diseases. Serum levels of eosinophil cationic protein (ECP), are correlated with the severity of clinical symptoms. As a complicating factor, the level of ECP in serum is strongly affected by the pretreatment of the bloodsample before measurement.

Concerning the diagnostic or clinical relevance of ECP concentrations in serum, one should realize that factors such as time of incubation and temperature are of essential importance. At our recommended conditions for pretreatment of the sample reference-ranges are not yet available.

To establish the reference-range we have measured the ECP-concentrations in bloodsamples, taken from 223 healthy subjects (122 men, 101 women). We have detected significantly increased serum ECP-concentrations in donors with increased eosinophil-counts. In previous studies it has been stated that

eosinophils in allergic patients (who often have high eosinophil-counts) would excrete more easily ECP than eosinophils of apparently healthy persons. Within this respect it may be of clinical importance to calculate the ratio of serum ECP-concentration and the eosinophil-concentration. However, when calculating this ratio in our group of healthy blood donors a statistically significant increase is observed in subjects with lower eosinophil-counts. This tendency might be due to a bias caused by the relatively high amount of ECP which has been already secreted 'in vivo'.

If comparing results obtained for men and women, no statistically significant difference could be demonstrated. Therefore, in order to establish reference-ranges for ECP and the ECP/eosinophil ratio in four classes regarding different eosinophil-counts, we have combined the values for both sexes. These values are now going to be used to monitor appropriately the inflammatory state of allergic patients.

CTAD compared with EDTA as an anticoagulant in hemocytometry

O. BEKERS, C. POSTMA, A. SPAANS and A.J.P.F. LOMBARTS

Department of Clinical Chemistry and Hematology, Leyenburg Hospital, The Hague, The Netherlands

Since many decades EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid)-salts have been used and universally accepted as the anticoagulants of choice because they best preserved the cellular components of blood. However, recently a highly sophisticated technical revolution has taken place in hemocytometry, disclosing many deficiencies of EDTA-anticoagulated blood (1,2). In 1983 CTAD (Citrate, Theophylline, Adenosine, Dipyridamole) was especially designed to prevent platelet activation in vitro, thus avoiding the release of platelet products (β -thromboglobulin and platelet-factor 4) that interfere with biological monitoring of heparin therapy (3). To our knowledge CTAD has never been studied for hemocytometric purposes, probably due to the "inherent" disadvantage of occupying a volume and thus diluting the blood.

Hemocytometric measurements in CTAD-blood compared with EDTA-blood on a Coulter STKS show:

- better stability of the 5 main groups of white blood cells

- better stability of platelet (PLT) concentration over time
- a constant mean platelet volume (MPV)
- prevention of pseudothrombocytopenia (4)

The favourable platelet properties in CTAD, in comparison to those in EDTA, are known to be due to cAMP stimulation (adenosine, dipyridamole) and inhibition of cAMP degradation (theophylline).

We are currently exploring the underlying mechanisms in white blood cells and searching for the optimal anticoagulant composition.

1. Reardon DM et al. Med Lab Sci 1991; 48: 72-75.
2. Jackson SR, Carter JM, Blood Reviews 1993; 7: 104-113.
3. Contant G et al. Throm Res 1983; 31: 365-374.
4. Lombarts AJPF, Kieviet W de. Am J Clin Pathol 1988; 89: 634-639.

Houdbaarheid van bloedmonsters voor geautomatiseerde hemocytometrie en vijfpartdifferentiatie

J.M.W.A. van GEND¹, B.M. BAS², P.S.H. KUPPENS³, L. van LEEUWEN³, J.A.B.M. PEETERS⁴ en J. van PELT¹

st. Maartens Gasthuis¹, Venlo; Maasland Ziekenhuis², Sittard; st. Jans Gasthuis³, Weert; st. Elizabeth Ziekenhuis⁴, Venray

In een viertal ziekenhuislaboratoria in de regio werd onderzoek verricht naar de houdbaarheid van bloedmonsters voor geautomatiseerde hemocytometrie en vijfpartdifferentiatie. Hiertoe werden 's morgens bij 10 klinische patiënten en 5 gezonde controlepersonen 4 buizen EDTA-bloed afgenomen, die respectievelijk op t = 0, 6, 24 en 48 uur in duplo geanalyseerd werden. De deelnemende laboratoria en de gebruikte apparaten waren achtereenvolgens Venlo (Coulter STKS), Sittard (Roche Cobas Argos), Weert (Abbott CD 3000) en Venray (Bayer H*1). De uitgevoerde analyses betroffen erythrocyten, leucocyten, trombocyten, MCV, MCH, RDW, Ht en Hb en uit de vijfpartdifferentiatie: neutrofiële, eosinofiele en basofiele granulocyten, monoccyten en lymfocyten. De duplowaarden werden gemiddeld en de waarden op t = 0 uur werden op 100% gesteld. De latere waarden werden ten opzichte van t = 0 uur berekend.

De resultaten zijn schematisch weergegeven in de tabel, waaruit ondermeer blijkt dat de erythrocyten, het Hb en MCH op alle apparaten stabiel zijn. Bij de leucocyten, trombocyten, MCV, RDW en Ht werden wisselende effecten op de verschillende apparaten geconstateerd. De parameters uit de vijfpartdifferentiatie laten de grootste tijdseffecten zien.

Alhoewel het onderzoek beperkt is tot een viertal verschillende apparaten en twee series metingen met 15 monsters kunnen de volgende conclusies getrokken worden: de tijdseffecten van

hemocytometrische analyses variëren per apparaat en per bepaling. Analyse binnen 6 uur is aan te bevelen bij hemocytometrische bepalingen en een noodzaak bij geautomatiseerde vijfpartdifferentiatie. In kwaliteitsbewakingsprogramma's moet aan de beperkte houdbaarheid bijzondere aandacht geschonken worden.

Tabel 1. Verloop van hemocytometrische waarden in de tijd (min - max), bepaald op vier verschillende apparaten (in % t.o.v. t = 0)

	t = 6 uur	t = 24 uur	t = 48 uur
Hb	99-101	99-101	99-101
Ht	100-102	101-106	103-111
Ery's	98-102	98-102	97-102
Leuco's	95-99	91-100	83-99
Trombo's	99-101	98-103	90-102
MCV	100-102	101-106	103-111
MCH	99-101	94-101	99-101
MCHC	98-100	94-100	89-97
RDW	100-105	103-112	103-118
Neutro's	96-103	76-103	83-111
Lymfo's	90-106	94-145	80-155
Mono's	70-110	45-130	30-130
Eo's	95-115	60-140	30-170
Baso's	100-600	120-400	80-300

Protocollering, nomenclatuur en automatisering ter beperking van risicofactoren bij "type" en "screen" (T&S) strategie

A.J. VAN ERVEN en D. VAN RUMPT

Klinisch laboratorium, Ziekenhuis Velp

Het is bekend dat T&S tot efficiënt bloedtransfusiebeleid voert. De sinds 1989 in Nederland geldende CBO-consensus betreffende bloedtransfusiebeleid in ziekenhuizen laat nog veel ruimte over om het eigen beleid aan te passen aan lokale omstandigheden en inzichten. Een tweetal risicofactoren bij T&S, te weten:

- Verkeerde patiënt problematiek (niet alle patiënten komen in aanmerking voor T&S)
- Missen ABO incompatibiliteit indien de kruisproef niet wordt uitgevoerd, zijn hierdoor niet voldoende afgedekt.

Sinds 1992 wordt in ons Ziekenhuis met een strakke T&S strategie gewerkt, waarbij door enerzijds een duidelijk protocol en anderzijds geautomatiseerde controle op exclusie-criteria efficiëntie winst wordt gecombineerd met hoge mate van veiligheid.

Essentieel is de invoering van het begrip en de naam "checkbloed" (controle op ABO compatibiliteit), waarvoor door ons landelijke invoering wordt bepleit.

De Kruisweg. Verwerking van bloedproducten op de hematologie: een Integraal Kwaliteits Management project

L. C. v.d. HOUT¹, C. DUIJNDAM², en G.A.E. PONJEE¹

Stafafdeling Reinier de Graaf Gasthuis²/ Hematologisch laboratoriumDiagnostisch Centrum¹ SSDZ, Delft.

Het hier gepresenteerde onderzoek beschrijft een studie naar diverse kwaliteitsindicatoren op het gebied van logistieke traject van aanvraag en toediening van bloed en bloedproducten. Hiertoe werd een gestandaardiseerde methodiek 'Integraal Kwaliteits Management (IKM)', gehanteerd. Deze methode bestaat uit 4 fasen, die tezamen leiden tot een verbeteringstraject om de kwaliteit van een bestaand proces te optimaliseren. In het 'voorbereidingstraject' wordt het te onderzoeken proces omschreven. Het 'diagnostisch traject' omvat de vaststelling van de kwaliteitsindicatoren. In het 'toetsingstraject' wordt de kwaliteit van sleutelprocessen gemeten. Tenslotte wordt, aan de hand van de resultaten, in een 'verbeteringstraject' actiepunten geformuleerd.

Vier sleutelindicatoren zijn in dit project getoetst:

1. Kwaliteit van bloedproducten bij aanlevering op het laboratorium.

2. Voorraadbeheer van bloedproducten.
 3. Kwaliteit van bloedproducten bij aflevering aan de kliniek.
 4. Kwaliteit van bloedproducten bij toediening aan de patiënt.
- Na toetsing van bovenstaande kwaliteitsindicatoren aan de hand van vooraf gestelde kwaliteitscriteria, zijn de volgende actiepunten geformuleerd:
1. Het voorraadbeheer van de bloedproducten dient volledig geautomatiseerd te worden.
 2. Een goede registratie van het gehele traject van bloedaanvraag tot bloedtoediening, dient middels een transfusiedocument vastgelegd te worden, inclusief tijdstippen van verzending, ontvangst en toediening.
 3. Een werkgroep transfusiebeleid dient ingesteld te worden vanuit de Bloedtransfusiecommissie, met als taak het vastgestelde transfusiebeleid op de werkvloer door middel van kwaliteitsindicatoren door te voeren en te controleren.

Stolling

Analytische karakteristieken van de fibrinogeen-C bepaling van IL met behulp van de ACL-1000

J.D. OOSTING en J.J.M.L. HOFFMANN

Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina ziekenhuis, Eindhoven

De manuele Clauss methode (stoltijd bepaling na trombine toevoeging) wordt beschouwd als referentie voor het bepalen van de fibrinogeen concentratie in plasma. Een veel gebruikte geautomatiseerde manier om fibrinogeen te bepalen berust op een nefelometrische protrombinetijd (PT) bepaling met behulp van de ACL van IL (PT-F). De fibrinogeen concentratie is evenredig met het verschil in lichtverstrooiing op het startpunt van de PT bepaling en het punt waarop zich een stabiel stolstel heeft gevormd. Recent heeft IL een nieuwe fibrinogeen bepaling voor de ACL ontwikkeld die gebaseerd is op het manuele Clauss principe (F-C). Na toevoeging van trombine wordt de stoltijd bepaald door de absorptie bij 405 nm te meten.

Het doel van dit onderzoek was de analytische kwaliteiten van de nieuwe F-C bepaling te bepalen en te vergelijken met de PT-F bepaling en de manuele Clauss methode.

De precisie van de methode is getest met behulp van de "NCCLS evaluation protocols of precision" (EP5 en EP10). De tussen meetserie variatie coëfficiënten verkregen met de F-C bepaling waren op verschillende fibrinogeen concentratie niveaus (1,2; 4,0 en 7,5 g/l) lager (14,1; 3,8 en 4,6%) dan die met de PT-F bepaling (16,1; 7,5 en 10,5% respectievelijk).

De correlatie tussen de bepalingen is onderzocht (volgens Passing en Bablok) in plasma van 40 patiënten tijdens orale anti-stollingstherapie. Hieruit volgde dat $F-C = 0,79(PT-F) + 0,66$ en $F-C = 1,12(Clauss) + 0,143$.

Uit interferentie-studies bleek dat de F-C bepaling niet noemenswaardig werd gestoord door heparine concentraties lager dan 1,5 U/ml, vrij Hb concentraties lager dan 20 $\mu\text{mol/l}$, bilirubine, triglyceriden en een mengsel van lipiden dat gebruikt wordt bij parenterale voeding (Intralipid). Heparine concentraties tussen de 1,5 en 2,0 U/ml veroorzaakten een lichte daling in de gemeten fibrinogeen concentratie van 2,5 naar 2,2 g/l en van 5,0 naar 4,0 g/l. Heparine concentraties tussen de 5 en 10 U/ml lieten de schijnbare fibrinogeen concentratie dalen van 2,5 naar 0,4 g/l. Hemolyse (vrij Hb tussen de 20 en 50 $\mu\text{mol/l}$) had een daling van de fibrinogeen concentratie tot gevolg van 2,9 naar 2,3 g/l. Vroege FDP's (1-5 g/l) veroorzaakten een sterke verhoging van de gemeten fibrinogeen concentratie (van 3,3 naar 9,9 g/l), intermediaire FDP's veroorzaakten een lichte verhoging (van 3,3 naar 5,1 g/l) en late FDP's hadden weinig effect op de fibrinogeen concentratie (van 3,3 naar 2,8 g/l). Deze effecten van FDP's op de F-C bepaling zijn vergelijkbaar met de effecten op de manuele Clauss bepaling. Dit in tegenstelling tot de PT-F bepaling waarin de fibrinogeen concentratie sterk toenam (van 3,4 naar 8,5 g/l). Concluderend kan gesteld worden dat de F-C methode een goede methode lijkt te zijn om fibrinogeen concentraties te meten.

Turbidimetrische fibrinogeen bepaling: een alternatief voor de stollingsmethode?

J.H. SCHADE, A.J. BAKKER, H. STORM, J.H.T. DIJKSTRA, F. REITSMA, A. ZIJLSTRA en H. SIJPERDA

Stichting Klinisch Chemisch Laboratorium Leeuwarden

Fibrinogeen wordt van oudsher bepaald met de stollingsmethode volgens Clauss. Bij de uitvoering van deze bepaling op de door ons uitgeteste stollingsautomaten STA en AMAX CS 190 is een trombineremmer nodig om het effect van carry-over van trombine te elimineren. Gezien de kosten van de trombineremmer en het reagens voor de "Clauss" methode, leek het

aantrekkelijk een andere methode als alternatief uit te proberen. Dit alternatief, de turbidimetrische methode van Macart (Clin Chem 1989; 35: 211-214), is een aantal jaren geleden in ons laboratorium geïntroduceerd ten behoeve van de fibrinogeen correctie van het totaal eiwit in plasma (Clin Chem 1992; 38: 2221-2223).

De methode van Macart, die gebruik maakt van een gefractioneerde uitzoutingsprocedure met behulp van ammoniumsulfaat, is geoptimaliseerd om ook lage fibrinogeenconcentraties goed te kunnen kwantificeren. Plasma wordt hierbij eerst geïncubeerd in 51,75 g/l ammoniumsulfaat; na verhoging tot 116 g/l ammoniumsulfaat precipiteert fibrinogeen. De veroorzaakte troebeling is een maat voor de fibrinogeenconcentratie.

Als standaard is gebruik gemaakt van een plasmapool van zwangeren, waarvan het fibrinogeen gehalte is vastgesteld met de stollingsmethode volgens Clauss. De nul-standaard is een serumpool, waarin geen fibrinogeen aantoonbaar was met de stollingsmethode volgens Clauss. Om bij het maken van de

ijklijn en bij lineariteitstesten stolling en fibrinogenolyse te voorkomen is aan deze nul-standaard citraat (3 mg/l), heparine (0,8 kU/l), ϵ -aminocapronzuur (0,1 g/l) en Desorb (STAGO, 20 μ l/ml) toegevoegd.

De standaardcurve is lineair tot minimaal 4 g/L. De dag-tot-dag variatie is 1,1% bij een gemiddelde concentratie van 2,35 g/l en 1,5% bij 1,46 g/l (n=11). De regressievergelijking van de Hitachi-procedure en de manuele "Clauss"-procedure is: Hitachi = 1,000 x Clauss + 0,0 (r=0,993; n=24).

Conclusie: de beschreven fibrinogeenbepaling is een betrouwbaar, goedkoop, en automatiseerbaar alternatief voor de "stollologische" fibrinogeenbepaling.

Detectie van antifosfolipiden autoantilichamen met gebruik van de Amax CS190 stollingsautomaat.

J.H. SCHADE, A. ZEINSTR, W. KORT, P. JOOSTEN en H. STORM

Stichting Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden.

Het aantonen van Lupus anticoagulans en anticardiolipine is klinisch van belang bij arteriële en veneuze trombose, meervoudige spontane abortus, trombocytopenie, autoimmuun hemolytische anemie en het primaire antifosfolipiden syndroom. Antifosfolipiden autoantilichamen kunnen op meerdere punten aangrijpen: prothrombine, factor X, β 2-glycoproteïne I en mogelijk proteïne C en S. De gebruikelijke (arbeidsintensieve) screeningstechnieken zijn gebaseerd op de APTT, kaoline/cefaline, Russel viper venom en meting van anticardiolipine. Ter verbetering van de screening op Lupus anticoagulans werd door ons vergeleken met een eigen humane cefaline/kaoline methode op de Amax CS190 stollingsautomaat (Amelung):

1. Recombinant humaan thromboplastine Innovin (Baxter), aantrekkelijk vanwege geringe batch tot batch verschillen en een gedefinieerde fosfolipiden-samenstelling en -concentratie;
2. Actin Dade konijn cefaloplastine (Baxter). Tevens werd de Elisa anticardiolipine methode van Cambridge Life Sciences met toevoeging van β 2-glycoproteïne vergeleken met de Elisa

methode van de firma Elias, waarbij foetaal kalfsserum wordt toegevoegd als bron voor β 2-glycoproteïne. Monsters werden onderzocht van patiënten met bewezen diep veneuze trombose of meervoudige spontane abortus, waarbij geen andere biochemische oorzaak, zoals proteïne C-, S- en ATIII-deficiëntie, kon worden aangetoond.

Resultaten: in de tot nu toe met alle methoden onderzochte geselecteerde patiëntenmonsters (n=18) bleken 6 positief met de eigen cefaline methode, 11 positief met Innovin en 14 positief met Actin. Verdere experimenten, waarbij ook Nycoplastine - een thromboplastine van Nycomed- betrokken wordt, worden nu uitgevoerd om de gevoeligheid en specificiteit te bepalen. Een voorstel voor een schema van achtereenvolgens te hantieren geautomatiseerde analyses bij de screening op Lupus anticoagulans zal gepresenteerd worden. Bij de bepaling van anticardiolipine (n=20, waarvan 16 positief) liet de toevoeging van β 2-glycoproteïne geen verbetering zien ten opzichte van de methode met toegevoegd foetaal kalfsserum.

Evaluatie van de AMAX: een random access, walk-away stollingsautomaat

R.F.M. OUDE ELFERINK, T. HOFMAN, G. de JONG en P. BIJSTER

Centrum Klinische Laboratoria, Martini Ziekenhuis, Groningen

Geëvalueerd werd de AMAX CS190 van de firma Amelung. De automaat is uitgerust met vier optische en vier mechanische (kogeltjes principe) meetkanalen en interne en externe barcodereader. Er kan met primaire buizen worden gewerkt. Turbidimetrische-, chromogene- en de tijd- en kostenbesparende mechanische methoden kunnen "at random" worden uitgevoerd. Het systeem is volledig open en reagens onafhankelijk. Er kunnen maximaal 60 monsters en 6 cito's gelijktijdig worden geladen en de doorvoer is 190 PT's per uur. De doorvoer wordt verlaagd door "at random" verschillende bepalingen uit te voeren. Het reagens staat gekoeld op het apparaat (15°C) en kan zodoende de gehele dag hierop blijven staan. Bij de mechanische methode zal een zwak stolsel niet meer "stuk" draaien zoals op de KC(Amelung) mogelijk was, doordat de cuvet door het instellen van een bepaalde tijd met intervallen gaat draaien. Dubbele meettijd en een automatische herhaling van de meting met meer of minder monster behoren tot de mogelijkheden. Het apparaat produceert weinig afval (cuvetten en spoelvoelstof) en lawaai. De besturing vindt geheel plaats via een PC. De software is zeer compleet en toont: de status van het apparaat, reagensoverzicht, actuele monsterlijst, submenu's (metingen, onderhoud, uitslagen, parameter-setting, QC, grafische weergave optische meting).

Van verschillende routinebepalingen zijn de resultaten verkregen met de AMAX vergeleken met die van de ACL 200 (IL). Dit laatste instrument is momenteel in gebruik in ons laboratorium (tabel 1). Daarnaast onderzochten we de precisie, de

monster- en reagens- carry-over, de throughput, de gebruiksvriendelijkheid en de kosten van de AMAX.

Uit de vergelijking van de PT's blijkt dat er een goede correlatie bestaat tussen de verschillende apparaten, methoden en reagentia (tabel 1: nr 1-5). Een verschil in uitkomst (log[s]) wordt vooral bepaald door het reagens en niet door apparaat- of methode-keuze.

De fibrinogeenbepalingen correleren goed (tabel 1: nr. 6-8), waarbij de Clauss methode lagere waarden levert dan de afgeleide methoden. De afgeleide methoden van de AMAX en de ACL leveren vergelijkbare resultaten.

De resultaten van de aPTT bepaling voor het referentiegebied en de therapeutische range zijn van beide apparaten vergelijkbaar (tabel 1: nr. 9).

Ook de ATIII-bepaling geeft gelijklopende resultaten (tabel 1: nr.10). De bovengenoemde resultaten bieden de mogelijkheid om de AMAX en de ACL 200 naast elkaar te gebruiken.

De PT bepaling, mechanisch gemeten op de AMAX met het Nycomed reagens, is mbt de kosten het meest effectief (reagensverbruik: 50 μ l i.p.v. 100 μ l op de ACL).

Precisie: van een ingevroren normaalplasma is gedurende 10 dagen in duplo de PT, aPTT, fibrinogeen en ATIII op de AMAX bepaald. De VC 's van de AMAX waren voor de PT (Nycomed, mechanisch), PT (IL, mechanisch) en PT (IL, optisch) resp. 1,2, 3,0 en 1,7 %. Voor de ACL geldt een VC van 1,9%.

De VC van de AMAX voor de aPTT(ILreagens, mechanisch)

is 2,2%(ACL:3,0%), fibrinogeen(ILreagens, afgeleide) is 7,7% (5,3%), fibrinogeen(Clauss, mechanisch) is 2,5%, ATIII is 2,8%(3,1%).

De AMAX en de ACL hebben een overeenkomende precisie. Door volgens een bepaald schema een aPTT, gespiked met 0,8 U/ml heparine, te laten volgen door een normale aPTT (45 s) kon een monster carry-over worden gemeten van 1,3%, welk resultaat acceptabel is.

Reagens carry-over: Om de noodzaak van een "trombine killer" (Enzyclean) te onderzoeken, werden voorafgaand aan een triplo aPTT, 10 fibrinogeenbepalingen volgens Clauss (trombine !!) uitgevoerd. De gevolgen van het meten van de aPTT

zonder het gebruik van Enzyclean waren voor de uitslag desastreus. Het reagens bleek tevens vervuild. Enzyclean is voorwaarde bij het toepassen van trombine op de AMAX.

Kostenbesparing in onze situatie (46.000 verrichtingen): bij gebruik van Nycomed reagens voor de PT bepaling en volledige overgang van de ACL 200 op de AMAX kan ca.f 60.000,- per jaar bespaard worden op rotoren, cupjes, thermisch papier en reagens.

De AMAX is een degelijk apparaat dat opvalt door gebruiksvriendelijkheid, laag reagensverbruik, onbegrensde vrijheid in reagenskeuze en instellingen en kan daardoor als een grote aanwinst in het stollingslaboratorium worden gezien.

Tabel 1. Regressieanalyse volgens Passing Bablok

Nr. Methode X	Methode Y	Een-heden	N	a	b	r
1 PT amax,opt.,PT-HS	PT amax,mech,PT-HS	log[s]	62	0,976	0,085	0,993
2 PT acl,opt.,PT-HS	PT amax,mech,PT-HS	log[s]	62	1,000	0,069	0,983
3 PT acl,opt.,PT-HS	PT amax,mech,NYCO	log[s]	62	1,373	-0,304	0,982
4 PT acl,opt.,NYCO	PT amax,mech,NYCO	log[s]	35	0,967	0,052	0,990
5 PT acl,opt.,PT-HS	PT amax,opt.,PT-HS	log[s]	62	1,046	-0,043	0,993
6 Fibr.acl,afgel,PT-HS	Fibr. amax,Clauss	g/l	52	0,842	0,195	0,968
7 Fibr.amax,afgel.,PT-HS	Fibr. amax,Clauss	g/l	52	0,850	0,150	0,951
8 Fibr.acl,afgel.,PT-HS	Fibr. amax,afgel.,PT-HS	g/l	52	1,000	-0,050	0,962
9 aPTT acl,opt.,IL	aPTT amax,mech.,IL	s	82	0,922	7,010	0,988
10 AT III acl	AT III amax	%	31	1,070	-8,760	0,988

Inhibition of plasminogen activation by albumin may cause impaired fibrinolysis

H.A.M. VOORBIJ, M.G.M. de SAIN-van der VELDEN and H.J.M. van RIJN

Department of Clinical Chemistry, University Hospital Utrecht, The Netherlands

In patients with a nephrotic syndrome enhanced fibrinolytic capacity can be observed. Fibrinolysis is the process of enzymatic degradation of fibrin clots and plasmin is the sole enzyme responsible for this process. Plasmin circulates in blood in its zymogen form, plasminogen, and is converted to plasmin by tissue plasminogen activator (t-PA). The enhancement of the fibrinolytic activity of t-PA is due to the formation of a ternary complex with fibrin(ogen) (stimulator) and plasminogen. Since low albumin levels may modulate fibrinolysis, the *in vitro* plasminogen activation was studied in the presence and absence of commercially obtained albumin. Three stimulators were tested: fibrinogen, a soluble preparation of Des-AA-fibrinogen and a CNBr digested fibrinogen in combination of three different brands of albumin. A chromogenic substrate

highly selective for plasmin was used to detect the generation of plasmin. The plasmin formation was monitored by continuous measurement of the absorbance at 405 nm. Control experiments were performed to show that albumin itself had no t-PA, plasmin or plasminogen like activity.

This study showed that the plasmin formation was inhibited in the presence of albumin in a dose dependent way, and that the percentage of inhibition was brand dependent. The three different stimulators gave comparable results. In conclusion, these *in vitro* results suggest that albumin itself may hinder the formation of the ternary complex and thereby interfere in the fibrinolytic process. This may have consequences for patients with a nephrotic syndrome, who have low albumin levels.

Diversen

Een nieuwe flowcytometrische bepaling van apoptose: meting van fosfatidylserine met FITC-gelabeld annexine V

H.M. STEFFENS-NAKKEN¹, E. KALSBEK-BATENBURG¹, I. VERMES¹, C. HAANEN¹ en C. REUTELINGSPERGER²

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Medisch Spectrum Twente, Enschede en Afdeling Biochemie², Universiteit Limburg

Een karakteristiek symptoom van apoptose wordt gevormd door een conformatieverandering in de celmembraan, waarbij fosfatidylserine (PS) van de cytosolzijde omklapt naar de buitenzijde van de celmembraan. Een nieuwe gevoelige methode is ontwikkeld om apoptose aan te tonen, berustend op het feit dat annexine V een sterke affiniteit heeft voor PS. Echter het omklappen van PS naar de buitenzijde van de celmembraan is niet uniek voor apoptose maar vindt ook plaats tijdens necrose.

Men kan deze twee vormen van celdood onderscheiden door het feit dat bij apoptose de celmembraan intact blijft terwijl deze bij necrose direct zijn integriteit verliest.

Derhalve is de annexine V-binding aan de cel alleen bewijzend voor apoptose wanneer tegelijkertijd wordt aangetoond dat de celmembraan intact is.

Deze bepaling werd getest op HSB-2 cellen waarbij apoptose werd geïnduceerd door straling. Tevens is er getest op vers geïsoleerde lymfocyten na incubatie met dexamethason.

Het optreden van apoptose werd met de volgende technieken geëvalueerd:

- morfologie
- aanwezigheid van hypodiploïde cellen gemeten met DNA-flowcytometrie (FCM)
- aanwezigheid van de karakteristieke DNA ladder

Annexine V-adhesie en membraanintegriteit werden gemeten met de twee-parameter FCM: FITC gelabeld annexine V adhesie en opname van propidium-iodide (PI). Met deze methode kan men onderscheiden: intacte cellen (annexine V-negatief, PI-negatief), apoptotische cellen (annexine V-positief, PI-ne-

gatief) en necrotische cellen (annexine V-positief, PI-positief). Deze nieuwe bepalingmethode is gevoelig, goed reproduceerbaar en gemakkelijk uit te voeren. Met deze test is het mogelijk reeds vroeg apoptose vast te stellen en de kinetiek van de apoptose te bestuderen m.b.t. allerlei inducerende prikkels.

In vivo effects of 4-amidinoindan-1-one 2'-amidinohydrazone (CGP 48664A) and α -difluoromethylornithine (DFMO) on L1210 growth, cell cycle phase distribution and polyamine contents

B. DORHOUT, R. JAKOB te VELDE, H. FERWERDA, A. W. KINGMA, E. De HOOG and F. A. J. MUSKIET
Central Laboratory for Clinical Chemistry, University Hospital, Groningen, The Netherlands

We studied the *in vivo* effects of 4-amidinoindan-1-one 2'-amidinohydrazone (CGP 48664A), α -difluoromethylornithine (DFMO) and CGP 48664A-DFMO combination on tumor growth, cell cycle phase distribution and polyamine contents. DBA-2 mice were i.p. inoculated with 10^5 L1210 cells day 0, i.p. treated days 1-4 and sacrificed day 5. Relative to control, CGP 48664A, DFMO and CGP 48664A-DFMO combination reduced L1210 cell numbers by 33, 43 and 85%, respectively. CGP 48664A did not affect cell cycle phase distribution. DFMO and CGP 48664A-DFMO combination caused modest and profound accumulation in G_0/G_1 - and G_2/M -phases, respectively. Compared with control, CGP 48664A-DFMO combination reduced putrescine, spermidine and total polyamines,

but did not affect spermine. Compared with CGP 48664A, CGP 48664A-DFMO combination caused lower putrescine and total polyamines, higher spermine, but no change in spermidine. Compared with DFMO, CGP 48664A-DFMO combination caused higher putrescine and spermidine, lower spermine, but no change in total polyamines. We conclude that CGP 48664A potentiates the cystostatic effect of DFMO *in vivo*. The resulting growth inhibition is accompanied by accumulation in G_0/G_1 - and G_2/M -phases and reduction of putrescine and spermidine. The data suggest that perturbed polyamine composition rather than reduced spermidine or total polyamine pool size causes profound growth inhibition.

Effect of MIBG on cell proliferation and several mitochondrial respiration related parameters in Molt 4 cells

J. CORNELISSEN, R.J.A. WANDERS, A.B.P. van KUILENBURG, F.A. WIJBURG, P.A. VOUTE and A.H. VAN GENNIP
Department of Pediatrics and Clinical Chemistry, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands

MIBG (m - iodobenzylguanidine) is a functional analogue of nor - adrenaline and therefore accumulates selectively in chromaffin tissues (1). In its radio iodinated form MIBG is used for diagnosis and treatment of neuroendocrine tumors such as neuroblastoma and pheochromocytoma tumors (2). It has been suggested that the clinical responses with ^{131}I - MIBG are partially due to pharmacological effects which are not related to the radio - emitting properties of the drug (3). MIBG is furthermore known to inhibit cell proliferation of a wide range of cell lines of both tumor and other origin. Recent studies suggested that these anti proliferating effects of MIBG might partially be due to a specific inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain (4).

To demonstrate that MIBG is indeed capable of inhibiting complex I of the respiratory chain in human cells, we studied the effects of MIBG on cell proliferation and several parameters related to mitochondrial respiration in the human lymphoblastic leukemia cell line Molt 4.

MIBG in micro molar concentrations was capable of inhibiting cell proliferation of Molt 4 cells. In intact Molt 4 cells, in-

creasing concentrations of MIBG led to a progressive increase of lactate to pyruvate ratios after incubation with glucose. In Molt 4 cells treated with digitonine, MIBG was capable of inhibiting ATP synthesis with malate as a substrate. Comparable inhibition of ATP synthesis with succinate as a substrate required higher concentrations of MIBG. These results indicated that besides inhibition of complex I, MIBG was capable of inhibiting at least one other complex of the respiratory chain. Measurement of the separate enzyme complexes in the presence of MIBG revealed that complex III was the other enzyme complex susceptible for MIBG.

This study was supported by a grant from the Dutch Foundation for Pediatric Cancer Research S.K.K. no. 92-03.

1. Wieland DM et al. *J Nucl Med* 1980; 21: 349.
2. Hoefnagel CA et al. *Diagn Imag Clin Med* 1985; 54 : 21 - 27.
3. Smets LA et al. *Cancer Chemother Pharmacol* 1988; 21 : 9 -13.
4. Loesberg C et al. *Int J Cancer* 1990; 46: 276 - 281.

Effect of MIBG and HBO on the neuroblastoma cell line SK-N-BE(2c)

J. CORNELISSEN, R.J.A. WANDERS, A.B.P. van KUILENBURG, P.A. VOUTE and A.H. van GENNIP
Department of Pediatrics and Clinical Chemistry, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands

Meta - Iodobenzylguanidine (MIBG) is a structural and functional analogue of the neurotransmitter nor - epinephrine. Due to these properties, MIBG is capable of competing with nor - epinephrine for uptake in tissues of neuroendocrine origin. MIBG is known to have anti - proliferative effects on a large number of cell lines of various origin. It is thought that at least part of the anti - proliferative effect is due to inhibition of mitochondrial ATP synthesis.

In its radio - iodinated form (^{131}I MIBG), MIBG is used as a radiopharmaceutical for the imaging and targeted radiotherapy of neuroblastoma. Although ^{131}I MIBG therapy appears to be a successful selective anti - neuroblastoma strategy in some patients, long term disease free survival of many of the patients with neuroblastoma can still not be achieved. Recently, 30 patients with progressive recurrent stage IV neuroblastoma, participated in a phase II trial, in which they

were exposed to HyperBaric Oxygen (HBO) (four daily 2h sessions, 3ATA, while breathing 100 % O₂), starting four days after [¹³¹I] MIBG administration. Thus far, 8 out of 30 patients are alive for 5 to 52 months, with a stable disease as clinical situation. These results are promising compared to a phase II study with similar patients on treatment with [¹³¹I] MIBG alone.

The aim of this study is to identify the underlying basis for the negative effect of combined [¹³¹I] MIBG and HBO therapy on neuroblastoma survival. As a first step towards this goal, we studied the effect of unlabelled MIBG and HBO on several parameters related to mitochondrial respiration and oxidative stress (a situation to which neuroblastoma are potentially susceptible) in the human neuroblastoma cell line SK-N-BE(2c). HBO has an additional effect on the inhibition by MIBG of mitochondrial ATP synthesis with various substrates and on

parameters related to ATP synthesis such as the lactate to pyruvate production after incubation with glucose and the ATP to ADP ratio. This effect is probably due to the oxidation of essential SH groups of Krebs Cycle enzymes responsible for the production of NADH or FADH₂ (electron sources for oxidative phosphorylation).

Parameters related to oxidative stress (malondialdehyde production, 8-hydroxy-deoxy-guanosine concentrations, glutathion red/ox ratio and NO₃/NO₂ efflux) or the activity of enzymes involved in the catabolism of reactive oxygen species (superoxide dismutase, catalase and glutathion peroxidase), thus far measured were not affected by HBO or MIBG.

This study was supported by grant no. 92-03 from the "Stichting Kindergeneeskundig Kankeronderzoek" (Foundation for Pediatric Cancer Research)

Growth-delaying effect of CPEC for neuroblastoma cells: augmentation with hyperbaric oxygen and MIBG

R.J. SLINGERLAND, A.H. van GENNIP, J.M. BODLAENDER, P.A. VOUTE and A.B.P. van KUILENBURG

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

We have investigated whether a combination of CPEC and hyperbaric oxygen with MIBG can modulate the cytotoxicity of CPEC for neuroblastoma SK-N-BE(2)-C cells. Cyclopentenyl cytosine (CPEC) is a carbocyclic analogue of cytidine. Its main cytotoxic activity in neural crest derived cells is mediated by a depletion of CTP and subsequently of dCTP and by the incorporation of CPE-CTP in RNA. Hyperbaric oxygen induces reactive oxygen metabolites (ROMs), resulting in extensive damage to cellular structures such as membranes and DNA. Meta-iodobenzyl-guanidine (MIBG), a functional

analogue of norepinephrine, accumulates selectively in neural crest derived tissues. MIBG inhibits mitochondrial ATP-synthesis and mono-ADP-ribosyl transferase activity. 30 µM MIBG resulted in 80 percent of the number of control cells after 5 days incubation. Hyperbaric oxygen in combination with MIBG augmented this effect. Combination of CPEC with MIBG (0.5 µM) and hyperbaric oxygen (1.5 hr) decreased the IC₅₀ of CPEC for SK-N-BE(2)-C cells from 100 nM to approximately 10 nM. This result may be of benefit to increase the therapeutic index of CPEC in neuroblastoma patients.

A fast and novel assay method of CTP synthetase: evidence for hysteretic properties of the enzyme from PC-12 cells?

A.B.P. van KUILENBURG, R.J. SLINGERLAND, L. ELZINGA, A.A. van den BERG and A.H. van GENNIP

Academic Medical Centre, Departments of Pediatrics and Clinical Chemistry, Amsterdam

CTP synthetase is the rate-limiting enzyme in the synthesis of CTP from both de novo and uridine salvage pathways. Increased activity of CTP synthetase has been observed in a variety of malignant proliferating disorders. Recently we showed that inhibitors of CTP synthetase such as CPEC are extremely toxic for neuroblastoma cells.

In order to investigate the kinetic properties of CTP synthetase from tumour cells derived from the neural crest, we developed a new and fast assay procedure which is based on the quantification of CTP with anion-exchange HPLC. The essential feature of our procedure is the addition of PEP and pyruvate kinase to the reaction mixture. In this way, all substrates and the product CTP of the reaction catalysed by CTP synthetase

are maintained in their triphosphate state. A complete separation of UTP, CTP, ATP and GTP was achieved in 12 min, with retention times of 3.3, 4.5, 5.8 and 8.1 min, respectively. The formation of CTP proved to be linear with respect to the protein concentration. However, at very low protein concentrations, a slight deviation from linearity was observed. This lag phase or hysteresis might represent the induction of a more active polymeric state of the enzyme. However, the lag phase was much less pronounced in PC-12 cells than in leukemic cell types which suggests that the various polymeric states of CTP synthetase in PC-12 cells do not possess large differences in activity.

De "totale antioxidant status"-bepaling van RANDOX

C.J.A. DOELMAN, T.J. de HAAN en K. MIEDEMA

Laboratorium, Ziekenhuis De Weezenlanden, Zwolle

Reactieve zuurstofdeeltjes (superoxide anionen, waterstofperoxide, hydroxylradicalen, singlet zuurstof en hypochloriet) worden geproduceerd door o.a. geactiveerde granulocyten, tijdens reperfusie na ischemie en door sommige farmaca in de lever. Bovendien worden reactieve zuurstofdeeltjes gevormd door het Amadoriprodukt en middels auto-oxidatie van glucose. Deze reactieve zuurstofdeeltjes spelen een rol bij het ontstaan van "Advancend Glycosylated Endproducts". Deze

AGE-produkten spelen een rol bij het ontstaan van diabetische complicaties als retinopathie, neuropathie en nefropathie. Zowel de verhoogde productie van reactieve zuurstofdeeltjes als mede verminderde endogene protectie tegen deze reactieve zuurstofdeeltjes zijn bij patienten met diabetes mellitus waargenomen (1). Om de endogene bescherming tegen reactieve zuurstofdeeltjes te kunnen bepalen is een test ontworpen, welke door de firma RANDOX op de markt wordt gebracht. Deze

test meet de "radicaal-vangende capaciteit" van het serum (2). De radicaal-vangende capaciteit van het bloed wordt grotendeels bepaald door ascorbine zuur, vitamine E, uraat en de thiolgroepen van eiwitten. De test werd uitgevoerd op een Hitachi 717-analyser. De meting werd geïjkt met behulp van een TROLOX-standaard (2,5 mmol/l). Het reactieverloop van de standaard verschilt van het reactieverloop van serum of heparineplasma.

De standaarddeviatie van deze bepaling is 0,04 mmol/l TROLOX-equivalenten (bereik 1,00 tot 1,60 mmol/l equivalenten). De test kan zowel in serum als in heparineplasma worden uitgevoerd en ook het éénmalig ontdooien en invriezen van de monsters heeft geen invloed op de bepaling.

Bepaling bij 12 patiënten met niet-insuline-afhankelijke diabetes, die voor een verbeterde metabole controle werden overgezet op insuline, had na 16 weken insuline therapie geen effect op de totale antioxidant status.

Conclusie: Deze test dient verder te worden geëvalueerd, ten

aanzien van:

- de juiste standaard
- de correlatie met de bekende endogene antioxidanten, zoals vitamine E, ascorbine zuur, uraat, thiolgroepen
- de klinische relevantie van deze test

Is deze test een juiste weerspiegeling van de antioxidant status?

1. Doelman CJA, Bilo HJG, Dikkeschei LD, Voorst tot Voorst E van, Ballegoie E van en Miedema K. Prognostische factoren bij het ontstaan van diabetische complicaties. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1995; 20: 51-55.
2. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993; 84: 407-412.
3. Penabad CR, Conde IB, Marqui CP. Total free radical-trapping capacity of serum from diabetics. *Clin Chem* 1994; 40: 2116-2117.

Enzyme immunoassays for urinary total NM and M: comparison with an isotope dilution ammonia chemical ionisation mass fragmentographic method

I.P. KEMA¹, B.G. WOLTERS¹, F.A.J. MUSKIET¹, R. WESEMANN², J. WESTERMANN² and B. MANZ²

Central Laboratory for Clinical Chemistry¹, University Hospital Groningen, Groningen, The Netherlands and Repromed GmbH², Hamburg, Germany

Phaeochromocytomas are catecholamine secreting neural crest tumours that can give rise to highly increased levels of circulating catecholamines and their metabolites. For the clinical diagnosis and follow-up of patients with phaeochromocytoma several biochemical tests have been proposed including plasma catecholamines, urinary free catecholamines, urinary acidic catecholamine metabolites, and urinary total metanephrines. Determination of urinary total 3-O-methylated catecholamine metabolites is now generally considered to be the principal test for the clinical chemical diagnosis of phaeochromocytoma. Traditional methods for the determination of urinary metanephrines such as electrophoresis and spectrophotometric methods are gradually being replaced by specific methods such as GLC and HPLC. Recently enzyme immunoassays have been developed for the quantitative determination

of various biogenic amines and metabolites, including 3-methoxytyramine (3-MT), normetanephrine (NM), and metanephrine (M). We compared the results for urinary total NM and M as determined by an ELISA method (Y-axis) with those of our recently developed isotope dilution ammonia chemical ionisation mass fragmentographic method (X-axis). Urine samples were collected from 48 healthy subjects aged 3-27 years (median 8.8). Results (in nmol/24h) revealed the regression equations $Y = 0.74X + 105$ ($r = 0.94$) for NM, and $Y = 0.77X + 127$ ($r = 0.94$) for M. The reason for the observed systematic deviation can not be explained as yet. We conclude that the investigated ELISA methods are applicable in the quantification of urinary metanephrines, and in time may replace non specific or complicated procedures that are presently used.

Agarose zone elektroforese en immunoblotting voor de detectie van oligoclonale IgG banden in liquor cerebrospinalis

P.F.H. FRANCK¹, C. POSTMA¹ en E.T. BACKER²

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Ziekenhuis Leyenburg, Den Haag en Klinisch Chemisch Laboratorium², Diaconessenhuis, Leiden

Multiple sclerose is een ziekte van het centrale zenuwstelsel met een divers klinisch beeld. Bij het vaststellen van de diagnose speelt het bepalen van immunoglobulines in liquor cerebrospinalis met immunochemische technieken een belangrijke rol. Intrathecale synthese van immunoglobuline G (IgG) kan op diverse wijzen geanalyseerd worden. Kwantificeren van IgG met behulp van de IgG-index heeft een matige sensitiviteit (60 tot 90%). In het algemeen wordt de kwalitatieve elektroforetische analyse van oligoclonale IgG banden als betrouwbaar ervaren. Isoelectric Focussing (IF) is een zeer gevoelige techniek om deze oligoclonale IgG banden aan te tonen. Het is echter een bewerkelijke en kostbare techniek, die speciale eisen stelt. Agarose Zone Electroforese (AZE) is daarentegen een betrekkelijk eenvoudige techniek, die in vrijwel ieder klinisch-chemisch laboratorium uit te voeren is. De resolutie van de oligoclonale IgG banden is echter minder dan

verkregen met IF, waardoor de sensitiviteit ter discussie staat. Recente ontwikkelingen op het gebied van agarose bereiding en moderne eiwitdetectie methoden maken het echter mogelijk, om met een zeer geringe hoeveelheid ongeconcentreerd patiënten materiaal een hoge resolutie en gevoeligheid te verkrijgen. Tijdens de hier gepresenteerde studie werd high resolution AZE (SPE II, Beckman) gevolgd door blotting op Immobilon® (Millipore) onderzocht. Totale eiwit kleuring van de blot door middel van colloïdaal goud, peroxidase- en alkalische fosfatase gelabelde antistoffen tegen IgG of kappa en lambda korte ketens (immunoblotting).

Het resultaat is dat high resolution AZE gevolgd door immunoblotting met peroxidase of alkalische fosfatase gelabelde antistoffen tegen IgG een vergelijkbare kwaliteit levert als IF elektroferogrammen. De sensitiviteit ten aanzien van klinische bevindingen is meer dan 95%.

Bepaling van stikstof in feces met nabij-infrarood spectrometrie

O. BEKERS¹, C. POSTMA¹, J.C. FISCHER² en A.J.P.F. LOMBARTS¹

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Ziekenhuis Leyenburg, Den Haag en Klinisch Chemisch Laboratorium², Wilhelmina Kinderziekenhuis, Utrecht

Naast de bepaling van fecaal vet kan bij de diagnostiek van diverse verterings- en resorptiestoornissen, veroorzaakt door bijvoorbeeld cystic fibrose, een stikstof bepaling in feces nuttig zijn met name voor het vaststellen van de energiebalans (1,2). Momenteel bepalen wij stikstof in feces volgens de destructiemethode van Kjeldahl, hierbij worden alle stikstofverbindingen met behulp van sterk zwavelzuur omgezet in ammoniumsulfaat. Dit ammoniumsulfaat wordt volgens de methode van Berthelot spectrofotometrisch gekwantificeerd. Deze methode is bewerkelijk en de kans op fouten aanzienlijk. Reeds eerder beschreven wij de bepaling van vet in feces met behulp van nabij-infrarood spectrometrie (NIRS) (3). Het doel van de huidige studie is om te onderzoeken of stikstof in feces met NIRS bepaald kan worden en wat de verschillen ten opzichte van de "Kjeldahl" methode zijn. Bij NIRS wordt de reflectie aan het te bepalen oppervlak gemeten in het extinctiegebied van 780-2526 nm. De absorptie-overgangen zijn zeer zwak, om dit probleem te ondervangen worden er chemometrische algoritmen toegepast. Er wordt gemeten met een InfraAlyser® Model 400 (Bran & Luebbe).

Met 55 monsters verdeeld over het relevante meetgebied wordt, met een door de firma bijgeleverd programma APC®, een ijklijn opgesteld. Er wordt gemeten bij de volgende golflengten: 2348 nm, 2190 nm, 2100 nm, 1778 nm, 1759 nm en

1680 nm. Vervolgens worden 29 feces monsters zowel volgens de "Kjeldahl" methode als met de InfraAlyser® bepaald en volgens Passing en Bablok vergeleken. Het resultaat hiervan is $y = 0,86x + 13,8$ (x ="Kjeldahl", y =NIRS); $r=0,94$. Gegevens betreffende de precisie staan vermeld in tabel 1. Tevens blijkt dat monsters minimaal vier keer ingevroren en ontdooid kunnen worden zonder dat het gehalte aan stikstof verandert.

Conclusies

Stikstof in feces blijkt met NIRS te bepalen en biedt voordelen ten opzichte van de "Kjeldahl" methode. Enkele voordelen zijn: geen (voor)bewerking, behoudens mengen, geen gebruik van reagentia, eenvoudige werkwijze, korte analysetijd (nadat een ijkcurve vastgesteld is, is een resultaat binnen 1 minuut beschikbaar). De precisie van de NIRS methode is vergelijkbaar met de "Kjeldahl" methode (zie tabel 1). Een nadeel van de NIRS is dat er een kostbaar analyseapparaat aangeschaft dient te worden, het is daarom raadzaam de bepaling centraal te laten plaatsvinden.

1. Peuchant E et al. Clin Chem 1988; 34: 5-8.
2. Murphy JL et al. Arch Dis Child 1991; 66: 495-500.
3. Bekers O et al. J Clin Chem Clin Biochem, accepted.

Tabel 1. Precisie van de bepaling van stikstof in feces volgens de "Kjeldahl" methode en met nabij-infrarood spectrometrie (NIRS)

	"Kjeldahl"		NIRS	
	intra-dag	inter-dag	intra-dag	inter-dag
n	12	13	9	10
$x_{\text{gem.}}$ (mmol/100g)	103	103	94,6	116
SD	2,7	6,1	3,2	4,4
VC (%)	2,6	5,9	3,4	3,8

Evaluatie van een nieuwe pH/bloedgas analyzer: Ciba Corning 248

C.L.M. ARKESTEIJN en K.S. EKEMA

Klinisch chemisch laboratorium, Hofpoort Ziekenhuis Woerden

Recent zijn enkele nieuwe pH/bloedgas analyzers geïntroduceerd in de prijsklasse rond de f 35.000,-. Dit zijn de Ciba Corning 248, de AVL Compact 2, Instrumentation Laboratory 1610 en de ABL 5.

Eén daarvan, de Ciba Corning 248 (CC248), werd door ons geëvalueerd. Bij de evaluatie hebben wij speciaal gelet op de volgende zaken: De gebruiksvriendelijkheid o.a. opbouw menu, hoeveelheid materiaal en mogelijkheid van micromonster, storingsgevoeligheid, vergelijking met de door ons gebruikte AVL 947 en de imprecisie.

Op basis van een door ons opgesteld enquête/evaluatie formulier hebben we de Ciba Corning 248 tevens vergeleken met de Instrumentation Laboratory 1610 (IL1610) en de AVL Compact 2. Bij deze vergelijking lag de nadruk voornamelijk op zaken als onderhoudstijd, exploitatiekosten, aantal monsters per uur en het gemak waarmee eventuele storingen (verstoppingen) verholpen konden worden, kalibratiemogelijkheden en onderhoud elektroden.

De conclusies die wij uit ons onderzoek kunnen trekken zijn:

1. De CC 248 is een zeer gebruiksvriendelijke analyzer met een logisch opgebouwd menu, waar analytische medewerkers snel op ingewerkt zijn.
 2. Er kan met een monster van 30 µl reeds een volledige meting worden gedaan.
 3. Na 3 maanden intensief gebruik blijkt de storingsgevoeligheid zeer gering te zijn.
 4. Een goede correlatie met de AVL 947 werd gevonden voor de pH, pCO₂ en de pO₂. Resp. $r=0,94$ $r=0,96$ en $r=0,97$.
 5. De imprecisie (inter run) voor de pH (7,402, n=42) is 0,14%, voor de pCO₂ (44 mmHg, n=42) is 1,50 % en voor de pO₂ (112 mmHg, n=53) is 1,80%. Deze waarden zijn beter dan de door de fabrikant opgegeven waarden.
- Uit onze vergelijking komt naar voren dat zowel de CC 248 als de AVL Compact 2 veel bieden voor de prijs zoals lage exploitatiekosten o.a. door de onderhoudsarme elektroden en laag verbruik van ijkgasen, goede doorvoersnelheid (>30 monsters per uur) en op eenvoudige wijze kunnen storingen worden opgeheven.

Evaluatie van een commerciële indirecte immunofluorescentie test voor het aantonen van Anti-Neutrofiel Cytoplasmatische Antistoffen (ANCA-test)

A.M. EDELAAR¹, A.J. PIETERS-KOMDUUR¹, M. van der GIESSEN² en L.D. DIKKESCHEI¹

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹, Ziekenhuis De Weezenlanden, Zwolle en Laboratorium voor Klinische Immunologie², Academisch Ziekenhuis Groningen

Anti-neutrofiële cytoplasmatische antistoffen (ANCA) zijn anti-stoffen die zijn gericht tegen antigenen die voorkomen in de granules in het cytoplasma van de polymorfonucleaire leucocyten (PMN's). ANCA's worden gevonden in serum van patiënten met necrotiserende vasculitiden, zoals de ziekte van Wegener (granulomatosis), polyarteriitis nodosa en idiopathische glomerulonefritis. Recentelijk zijn ook ANCA's gevonden in serum van patiënten met inflammatoire bowel disease, primaire ulceratieve colitis en scleroserende cholangitis. Een positieve ANCA test kan met 96% waarschijnlijkheid voorspellen dat een patiënt necrotiserende vasculitis of crescentic glomerulonefritis heeft of ontwikkeld, terwijl een negatieve test met 93% waarschijnlijkheid deze ziektes uitsluit. In dit onderzoek wordt een commerciële immunofluorescentie test (Inova) vergeleken met een home made test (referentie).

Principe van de test

Normale PMN's worden op een objectglaasje gefixeerd met ethanol. Na incubatie met serum van de binden eventueel aanwezige ANCA's aan de antigenen in de PMN's. Een antistof, voorzien van een fluorescentie label, wordt vervolgens gebruikt om de antigeen-antistof complexen te kunnen aantonen met behulp van fluorescentie microscopie.

Interpretatie

Cytoplasmatische fluorescentie (c-ANCA) wordt gevonden bij de ziekte van Wegener. De antistoffen zijn gericht tegen de serine protease-3 (90 %) of tegen het cationic protein en cathepsine (10%). Peri-nucleaire fluorescentie (p-ANCA)

wordt gevonden bij patiënten met necrotiserende vasculitis, glomerulonefritis, colitis ulcerosa, systemische vasculitis en inflammatoire bowel disease (IBD). p-ANCA's zijn veelal gericht tegen myeloperoxidase (90%) en tegen lactoferrine of elastine (10%). Atypische reacties worden gevonden bij colitis ulcerosa en primaire scleroserende cholangitis. De inducerende antigenen zijn nog onbekend.

Resultaten

Van de 63 klinisch geïndiceerde ANCA testen bleek 59% positief.

	ref	Inova	%
c-ANCA	15	15	100
p-ANCA	8	8	100
atypisch	14	4	28
totaal positief	37	33	89
negatief	26	25	96

Van de 10 gemiste atypische patronen zijn er 4 als negatief, 4 als p-ANCA en 2 als c-ANCA beoordeeld. De gemiste negatieve test werd als atypisch beoordeeld.

Conclusie

Ten opzichte van de referentie methode heeft de INOVA-test een positief voorspellende waarde van 89% en een negatief voorspellende waarde van 96%.

De INOVA test is geschikt voor het aantonen van ANCA's.

Evaluatie van twee geautomatiseerde urinestriplezers

M. TRESKES, E. WELTEN, M. JANSSEN en J. de JONGH-LEUVENINK

Centraal Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Tilburg

Twee geautomatiseerde urinestriplezers zijn getest op analytische karakteristieken en gebruikersvriendelijkheid. De Atlas (Ames/Bayer) detecteert de monsterhoeveelheid en pipetteert vervolgens het monster op een urinestrip, geïmmobiliseerd op een kunststof transportrol à 500 strips, en in de optische cel t.b.v. de refractie index (RI) meting. Kalibratie geschiedt m.b.v. drie vloeibare kalibranten. De Supertron (Boehringer-Mannheim) detecteert de monsterhoeveelheid en mengt het monster, selecteert met een bewegende arm een strip uit een voorraadtrommel en doopt deze langs een geleider in de urine. Kalibratie geschiedt m.b.v. een blanco kalibratiestrip. De Atlas kan met 2ml cupjes werken, de Supertron komt binnenkort met een optie voor pediatrie (3 ml) buisjes. Beide urinestriplezers zijn uitgerust met een barcodelezer en hebben een capaciteit van ca. 200 monsters per uur.

Precisie was vergelijkbaar voor beide apparaten. De Atlas en de Supertron correleerden over het algemeen redelijk met de Clinitek 200 (Ames/Bayer) en, indien beschikbaar, een referentie methode (een typisch voorbeeld is gegeven in tabel 1). De soortelijk gewicht stripuitslag van de Clinitek 200 en de Supertron correleerden slecht met elkaar en met de manuele RI-meting. De RI-meting op de Atlas correleerde goed met de manuele RI-meting. De eiwittest van de Supertron gaf te snel positieve uitslagen. Dit is echter corrigeerbaar omdat het aan-

tal gebieden en de grenzen zelf in te stellen zijn voor alle bepalingen.

Voordelen van de Atlas zijn de RI-meting en het gebruik van vloeibare kalibranten. Nadelen van de Atlas zijn de mogelijke problemen bij beschadiging van de pipetteernaald en het nauwgezette positioneren van de barodelabels. Voordelen van de Supertron zijn de robuustheid, gebruikersvriendelijkheid en flexibiliteit van instellingen. Nadelen van de supertron zijn de s.g. stripmeting en de te gevoelige eiwitbepaling met de instellingen van de firma.

Tabel 1. Correlatie van erythrocyten (RBC/ μ l) voor de Supertron (horizontaal) vs. Clinitek (verticaal)

	0	10	25	50	150	250
0	47	11				
10		4	5			
25			1	7		
80			1	2	1	2
200						4

Quantitative review of diagnostic value of lactate dehydrogenase

H. HUIJGEN¹, P. BOSSUYT², A. van de BORNE³, R. KOSTER⁴, J. VREEKEN⁵ en G. SANDERS¹

Depts of Clin Chem¹, Clin Epidemiology², Hematology³, Cardiology⁴, and Int Med⁵, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands

Overutilization of diagnostic tests is a common problem in laboratory medicine. A proper way to reduce them is by establishing in which occasions the requested test really makes sense. As the test of choice to evaluate we took Lactate Dehydrogenase (LD). Four main clinical fields in which LD is requested can be distinguished: cardiology, hepatology, hematology and oncology. For all fields a quantitative review was performed on relevant literature which was obtained by use of computerized bibliographic search systems, applying pre-defined criteria for inclusion. The process included selecting and ranking of publications based on: the tested patient group, diagnostic criteria (gold standard), sample time and sample frequency, and test characteristics like sensitivity (sens) and specificity (spec). We found that LD and LD-isoenzymes only contribute to the diagnosis of AMI which had occurred at least 19-24 hours previously. For liver disease LD was found to be less sensitive than other enzymes such as Alkaline Phosphatase and the Transaminases. In hematological disorders LD

contributes in diagnosing haemolysis (sens. 100%), and pre-treatment high values in acute lymphatic leukemia correlate inversely with the duration of a remission. Sensitivity of LD in case of chronic myeloid leukemia ranged from 33% to 100% and detection of LD₃ resulted in a sensitivity and a specificity of 90 and 72%, respectively. Prognostic value could be attributed to LD for lymphoma survival. In case of a small cell lung cancer and seminoma LD competes as a tumor marker with neuron specific enolase and human choriogonadotrophin, respectively.

In conclusion, reduction of requests can be approached by establishing protocols with either the clinical diagnosis or the laboratory test as a starting-point. We choose for the latter technique and only in late AMI and some hematological disorders the determination of LD is of real value, in all other cases more specific tests are available. When these guidelines are followed a drastic reduction in LD-requests can be obtained.

Kwaliteitscontrole van glucosemeters door huisartsen

J. VAN PELT en J.M.W.A. van GEND

KCHL, st. Maartens Gasthuis, Venlo

Alle huisartsen uit de regio Venlo werden schriftelijk op de hoogte gesteld van de mogelijkheid in de praktijk gebruikte glucosemeter(s) te controleren. Hiertoe werden de huisarts-assistenten gevraagd met de meters en toebehoren naar een gemeenschappelijke bijeenkomst in het ziekenhuis te komen. Voor de metingen werden 3 buizen heparinebloed gebruikt waaraan respectievelijk geen, 5 en 10 mmol/l glucose toegevoegd werd. De assistenten verrichtten de metingen in duplo en achteraf werden de labwaarden verstrekt (hexokinase methode op H717 in plasma). Na enige tijd ontvingen de deelnemers een gedetailleerd overzicht van de resultaten en gebruikte meters. Na ongeveer een half jaar werd de bijeenkomst herhaald, waarbij ook gelegenheid was voor de controle van hemoglobinemeters.

Op beide avonden waren ongeveer 25 assistentes met verschil-

lende meters aanwezig. Een overzicht van de resultaten is weergegeven in tabel 1, waaruit blijkt dat er bij alle monsters grote verschillen onderling en met de lab-waarden optreden. Er dient echter opgemerkt te worden dat de meeste glucosemeters geïkt zijn voor vingerprikbloed van 37 °C en zonder toevoegingen. Gevolgde werkwijze geeft dan ook geen uitsluitel over de juistheid maar geeft wel enige indicatie. De tweede avond gaf voor de glucosemetingen gemiddeld betere resultaten. Een aantal verouderde apparaten was inmiddels vervangen en anderen waren opnieuw afgesteld. Het gemiddelde verschil van de duplo metingen was beide keren ongeveer gelijk.

De conclusie is dat de controlemogelijkheid zonder meer in een behoefte voorziet en dat zodoende een kwaliteitsverbetering bij decentrale metingen bereikt kan worden.

Tabel 1. Samenvatting van de resultaten van de glucosemetingen met ongeveer 25 verschillende glucosemeters bediend door huisartsassistenten

	avond 1			avond 2		
n	41	40	41	42	42	44
X _{gem}	4,15	8,84	13,50	4,80	9,86	14,18
min	3,1	6,8	10,6	3,6	7,6	10,8
max	5,8	10,3	16,0	6,5	11,9	16,6
VC %	14	9	10	18	10	9
Lab	5,9	11,6	17,8	6,6	12,2	17,1
Δ %	30	24	24	27	19	17

Klinische studies

Allergie

Meting van verschillende ontstekingsmarkers tijdens exacerbaties in patiënten met ernstige vormen van astma

M.H. de KEIJZER¹, I. VERMES¹, J.W.G. van GENDT² en L.L.J. van der MAAS²

Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Afdeling Longziekten², Medisch Spectrum Twente, Enschede

Astma is een chronisch obstructieve longziekte welke veroorzaakt wordt door ontstekingen met als gevolg bronchiale hyperreactiviteit. De exacte mechanismen die leiden tot het ontstaan van astma zijn onduidelijk, maar allergie en frequente luchtweginfecties spelen zeker een rol. Om het belang van veranderingen in de concentraties van de ontstekingsmarkers eosinofiel cationisch proteïne (ECP), myeloperoxidase (MPO) en hyaluronan (HA) in relatie met exacerbaties te onderzoeken, werden een aantal patiënten met ernstige vormen van astma regelmatig onderzocht. ECP en MPO worden door geactiveerde eosinofiele granulocyten respectievelijk geactiveerde neutrofiële granulocyten uitgescheiden, terwijl HA door de meeste cellen wordt gesynthetiseerd en een marker is voor het ontstaan van fibrose. De bepalingen van ECP, MPO en HA werden verricht volgens de instructies van de producent (Pharmacia Diagnostics, Woerden). Wij onderzochten gedurende 6 tot 9 maanden 19 astma-patiënten. Twee patiënten vertoonden geen exacerbaties en de ECP concentratie was < 8 µg/l. De

overige 17 patiënten ontwikkelden 24 exacerbaties: 21 tengevolge van ontstekingen (in 14 patiënten) en 3 door infecties. In deze laatste groep bleek de MPO concentratie éénmaal verhoogd (> 400 µg/l) te zijn. Tijdens de 21 ontstekings-exacerbaties werd 7 maal een verhoogde ECP waarde gevonden (> 20 µg/l). Werd echter per patiënt gekeken naar viervoudige verhogingen of meer t.o.v. de basale waarde, dan bleek de ECP concentratie in 12 van de 21 exacerbaties verhoogd te zijn. De HA waarden bleken geen correlatie te vertonen met het al dan niet aanwezig zijn van een exacerbatie. Wij concluderen dat in patiënten met ernstige vormen van astma de ECP concentratie minder gevoelig is om exacerbaties te voorspellen; dit in tegenstelling tot pediatrische astma-patiënten of personen met recent gediagnostiseerde astma. Verder blijkt dat de klinische relevantie van de ECP bepaling verbeterd kan worden als bij longitudinaal onderzoek niet de absolute resultaten geëvalueerd worden, maar per patiënt vergeleken worden met de basale waarden.

Neurologie en psychiatrie

Apolipoproteïne E polymorfisme en de ziekte van Alzheimer

J. van der WEIDE en L.S.W. STEIJNS

Klinisch Chemisch Laboratorium, Psychiatrisch Ziekenhuis Veldwijk, Ermelo

Alzheimer is de meest frequente oorzaak van dementie bij ouderen en wordt neuropathologisch gekarakteriseerd door de aanwezigheid van neuritische plaques in de hersenen. Aan deze plaques, die extracellulaire amyloïdafzettingen bevatten, kan apolipoproteïne E gebonden worden.

Van apoE zijn drie isovormen bekend, te weten apoE2, apoE3 en apoE4, waarvan apoE3 het meest voorkomende type is. De andere twee varianten komen minder vaak voor en verschillen van apoE3 door een cysteïne » arginine substitutie op aminozuurpositie 112 (apoE4) of een arginine » cysteïne substitutie op positie 158 (apoE2).

De eiwitten worden gecodeerd door de drie codominante allelen ε2, ε3 en ε4. ApoE-allel-frequentie-analyse heeft aangetoond dat bij patiënten, die vermoedelijk aan de ziekte van Alzheimer lijden, het apoE4-isotype veel vaker aanwezig is dan bij een controlegroep. ApoE4 blijkt, meer en sneller dan apoE3, complexen te vormen met amyloïd.

Wij hebben van een aantal patiënten, waarvan door middel van microscopisch onderzoek van de hersenschors na obductie definitief was vast komen te staan of zij al dan niet aan de ziekte van Alzheimer leden, het apoE-isotype bepaald. Hiertoe

werd een genotypering uitgevoerd op basis van met PCR vermeerderd DNA, geïsoleerd uit het ingevroren hersenweefsel. Na restrictie met het enzym HhaI, dat het DNA specifiek op de polymorfe plaatsen wel (GCGC, coderend voor arginine) of niet (GTGC, coderend voor cysteïne) knipt, gevolgd door gelelektroforese van het digest, konden aan de hand van het verkregen restrictieprofiel de aanwezige apoE-allelen onderscheiden worden.

Uit de resultaten blijkt dat in de Alzheimer-positieve patiëntengroep het ε4-allel significant vaker voorkomt dan in de Alzheimer-negatieve patiëntengroep (een frequentie van 0.43 versus 0.14), terwijl het ε3-allel minder vaak (0.46 versus 0.86) aanwezig is. Tabel 1 toont de apoE-genotype-frequenties van de twee patiëntengroepen (AD+ en AD-), alsook de literatuurgegevens betreffende een Alzheimer-positieve en een controlegroep.

Opvallend is dat met name het genotype ε3/ε4 veel frequenter voorkomt in de Alzheimer-positieve groep dan in de Alzheimer-negatieve en de controlegroep. Het genotype ε3/ε3 daarentegen is duidelijk in de Alzheimer-negatieve en de controlegroep oververtegenwoordigd.

Tabel 1. ApoE-genotype-frequenties

Genotype	AD+ (n=14)	AD- (n=7)	AD+ (literatuur)	controle (literatuur)
ε2/ε2	0,00	0,00	0,00	0,02
ε2/ε3	0,14	0,00	0,03	0,10
ε3/ε3	0,07	0,71	0,33	0,62
ε3/ε4	0,64	0,29	0,48	0,21
ε4/ε4	0,07	0,00	0,13	0,04
ε2/ε4	0,07	0,00	0,02	0,02

Content of enzymes (LDH, HBDH) and non-enzymatic proteins (myoglobin, FABP and troponin T) in cardiac tissue. Significance for the assessment of tissue injury from data on plasma concentrationsM.P. van DIEIJEN-VISSER¹, J.A. KRAGTEN², J.F.C. GLATZ³, F.A. van NIEUWENHOVEN³, P.H.M.H. THEUNISSEN⁴ en W.TH. HERMENS³*Department of Clinical Chemistry¹, Academic Hospital, Maastricht, Department of Cardiology² and Department of Clinical Pathology⁴, Ziekenhuis De Wever en Gregorius, Heerlen; CARIM³, University of Limburg, Maastricht*

When the extent of myocardial tissue injury is assessed from the total activities of cardiac enzymes or the total amounts of non-enzymatic protein released into plasma, it is assumed that variations in cardiac enzyme and protein content between different sites of the heart and among individuals is small. We checked these assumptions and determined HBDH (LDH), myoglobin and fatty acid-binding protein (FABP) content per gram wet weight of tissue in epi-, mid- and endocardial samples. Cardiac tissue was taken from the left ventricles of 17 patients who died from causes other than acute myocardial infarction. Autopsy was performed within 24 hours after death. Both transmural and inter-individual differences were studied. In addition, troponin T content was determined in transmural samples of the same hearts. Both troponin T bound to myofibrillar structures and the free cytosolic fraction were measured (1). CK was not measured, because it is known from the literature that CK is decreased in samples obtained at autopsy.

Results and discussion

The table presents the enzyme and protein contents per gram wet weight (g ww) in 51 tissue samples obtained from 17 hearts, or troponin T content as estimated from 17 transmural samples.

There was no significant relation between enzyme or protein content and either heart weight, autopsy delay or age of the patient. Epi-, mid- and endocardial differences were not significant (data not shown). Inter-individual differences in enzyme or protein content were significant. The lowest inter-individual variations were found for LDH, HBDH and FABP, which is of great significance for studies on the assessment of tissue damage from data on plasma concentrations.

Very few data are available on troponin T content in cardiac tissue. Katus found a troponin T content of 400 µg/g wet weight and a free cytosolic fraction of 6% in fresh myocardium of three healthy donor organs. In the present study cardiac tissue was obtained at autopsy, which might clarify the lower value and the increase in the free cytosolic troponin T fraction.

Parameter	Mean	CV(%)	Minimum	Maximum	Median
LDH (U / g ww)	385	16.6	239	542	390
HBDH (U / g ww)	156	17.7	86	208	159
Myoglobin (mg / g ww)	2.76	24.0	1.52	4.33	2.72
FABP (mg / g ww)	0.56	16.0	0.36	0.80	0.55
Myoglobin / FABP	5.01	25.0	3.06	9.67	4.8
Troponin T total (µg/g ww)	234	27.6	130	346	223
Troponin T bound (µg/g ww)	192	35.5	93	302	202
Troponin T free (µg/g ww)	42	38.9	21	94	38

1. Katus HA, Remppis A, Scheffold T, Diederich KW and Kuebler W. Am J Cardiol 1991; 67: 1360-1367.

Fatty acid-binding protein and myoglobin as diagnostic plasma markers of acute myocardial infarction in humansK.W.H. WODZIG¹, M.M.A.L. PELTERS¹, J.A. KRAGTEN², M.P. van DIEIJEN-VISSER³, W.TH. HERMENS⁴, G.J. van der VUSSE¹ en J.F.C. GLATZ¹*Department of Physiology¹ and CARIM⁴, University of Limburg, Maastricht, Department of Cardiology², Ziekenhuis De Wever en Gregorius, Heerlen, Department of Clinical Chemistry³, Academic Hospital Maastricht*

Fatty acid-binding protein (FABP, 15 kD) and myoglobin (MYO, 18 kD) are small cytoplasmic proteins abundantly present in heart and muscle cells. Being an intracellular equivalent of plasma albumin, FABP serves as carrier for fatty acids, which are important substrates for cardiac energy metabolism. Damage to myocardial tissue, such as caused by myocardial infarction, will result in the release of both proteins from cardiomyocytes into plasma (1). The ratio of the contents of MYO over FABP in plasma can be used to discriminate between cardiac muscle injury (ratio=5) and skeletal muscle injury (ratio=20-70) (2).

The aims of this study were: (i) to improve an existing immunoassay of the sandwich type by including monoclonal (mAb-ELISA) instead of polyclonal antibodies (pAb-ELISA), (ii) to validate the new developed mAb-ELISA versus the existing

pAb-ELISA, and (iii) to apply the mAb-ELISA for the assay of serial blood samples obtained from patients with acute myocardial infarction (AMI) receiving thrombolytic therapy. With the latter samples we studied the mean plasma concentrations of FABP (mAb-ELISA) and MYO (Behring Turbitimer), the MYO/FABP ratio, and the activity of lactate dehydrogenase (LDH; Cobas Bio System, Hoffmann-La Roche) as a function of time after AMI, and the calculated cumulative release of FABP, MYO, and LDH into plasma.

Results and Discussion

Using two monoclonal antibodies directed against distinct epitopes of human FABP a sandwich ELISA was made, of which the total performance time was only 30 minutes (performance time of pAb-ELISA 5 hours). The intra- and interassay

coefficients of variation were 4.5% and 11%, respectively. The characteristics of the new ELISA were found similar to those of the existing pAb-ELISA. Comparing 20 plasma samples obtained from two patients with AMI, the calculated regression line is $y = 1.04x + 4.3$; $r = 0.98$ ($P < 0.05$).

In a group of patients with AMI (18 males, 5 females; age 62.3 ± 8.9 years, mean \pm S.D., range 49-78 years) treated with thrombolytic therapy (1.5E + 6 U streptokinase in 40 min, 12,500 U heparin every 12 hours) peak plasma concentrations of FABP, MYO, and LDH were reached after 4, 4, and 24 hours, respectively, following treatment. The MYO/FABP ratio in plasma was constant in time up to 20 hours after onset of symptoms and amounted to 6.2 ± 0.4 , which is similar to that found in human heart tissue (MYO/FABP ratio 4.5 ± 0.8).

Quantification of troponin T release in plasma after acute myocardial infarction

M. P. van DIEIJEN-VISSER¹, J.A. KRAGTEN², L.W.J.J.M. WESTERHUIS³ en W. TH. HERMENS⁴

Department of Clinical Chemistry¹, Academic Hospital, Maastricht, Department of Cardiology² and Clinical Chemistry³, Ziekenhuis De Wever en Gregorius, Heerlen; CARIM⁴, University of Limburg, Maastricht

After acute myocardial infarction cardiac enzymes and proteins are released into plasma and are used as biochemical markers of cardiac muscle injury. We studied the completeness of the release of troponin T, a cardiac protein that is largely bound to myofibrillar structures and compared it with the release of cytoplasmic cardiac enzymes in 22 patients with AMI, who were treated with thrombolytic therapy. CK, HBDH, LDH and troponin T were assayed serially in plasma samples obtained frequently and for at least 168 hours after the start of therapy. Cumulative release of enzymes and troponin T in plasma was calculated by using a two-compartment model for circulating enzymes.

In order to express the cumulative plasma release in gram

Cumulative release into plasma of FABP and MYO after 24 hours and of LDH after 72 hours, expressed in gram equivalents of tissue per liter plasma using a total tissue content of 560 μ g FABP, 2,700 μ g MYO, and 385 U LDH per gram wet weight, were for FABP 4.9 ± 0.9 g-eq/l, for MYO 6.4 ± 1.0 g-eq/l, and for LDH 3.9 ± 0.7 g-eq/l (mean \pm SEM, n=23). The cumulatively released quantity of FABP gives an approximately similar estimate of the extent of injury (infarct size), when compared to the established infarct size marker LDH. However, when using the cumulatively released quantity of MYO an overestimation of infarct size is made. These data indicate the suitability of FABP as biochemical marker for the early diagnosis of AMI and estimation of infarct size in humans.

equivalents (g-eq.) healthy myocardium per liter plasma (infarct size), we determined the HBDH, LDH and free, bound and total troponin T contents per gram wet weight of tissue in 17 human hearts obtained post-mortem from patients who died from non-cardiac causes. Mean tissue contents per gram wet weight of respectively 156 ± 25 , 385 ± 59 U/g and 42 ± 16 , 192 ± 68 , 234 ± 65 μ g/g (mean \pm SD) were found.

For CK, HBDH and LDH the mean total release over 72 hours, was respectively 5.9 ± 1.5 , 5.9 ± 1.6 and 6.1 ± 1.7 gram equivalents per litre (mean \pm SEM, n=22), it did not further increase after 72 hours and the differences were not significant. The cumulative troponin T release, expressed in gram equivalents of myocardium per liter of plasma, using a total troponin T content of 234 μ g/g was only 0.30 ± 0.09 g-eq/l after 72 hours and 0.51 ± 0.16 g-eq/l after 168 hours (mean \pm SEM, n=22). After 72 hours the cumulative troponin T release in g-eq/l is only 5% and after 168 hours only 8.5% of the cumulative release of the cytoplasmic cardiac enzymes after 72 hours (see figure 1).

The mean plasma time-concentration curve for troponin T in the patient group is clearly biphasic, which is caused by the early release of the free cytoplasmic and delayed release of the bound troponin T fraction. Assuming simultaneous and quantitatively comparable (g-eq/l) release of the free cytosolic troponin T fraction and of the cytosolic cardiac enzymes during the first 24 hours, a calculated free cytosolic troponin T content of only 10 μ g per gram wet weight of myocardium, which is only 4% of the total troponin T content, was found.

Conclusions

Troponin T release continues for more than 72 hours and is only a small fraction (5%) of cumulative cytoplasmic enzyme release. The extrapolated free cytosolic troponin T fraction *in vivo* is 4% of the total troponin T content per gram wet weight. The free cytosolic troponin T content in tissue obtained at autopsy is much higher, but not related to autopsy delay. Although incomplete, the individual troponin T release after 72 and after 168 hours correlates well with individual infarct size expressed in gram equivalents tissue per liter plasma, estimated from the HBDH release.

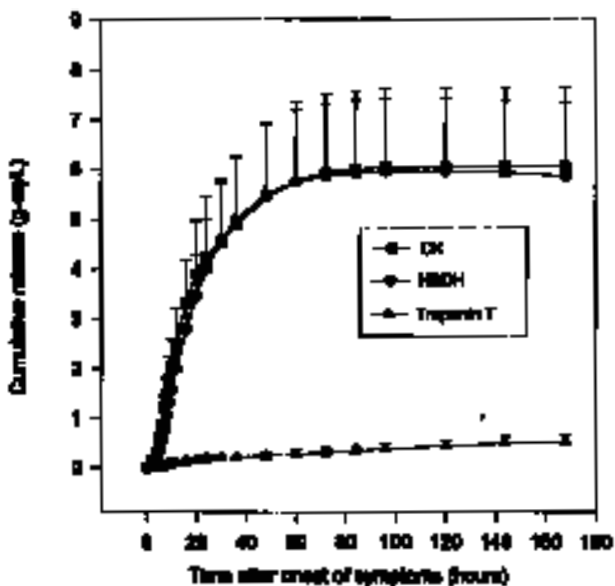


Figure 1. Cumulative release of CK, HBDH and troponin T, expressed in gram equivalents of myocardium per liter of plasma, in 22 patients. Upper SEM is indicated.

Onderzoek van een familie met fish eye disease

E. van VOORST tot VOORST¹, J.A. KUIVENHOVEN², C.J.A. DOELMAN¹, L.D. DIKKESCHEI¹, J.J.P. KASTELEIN², en K. MIEDEMA¹

Laboratorium, Ziekenhuis de Weezenlanden¹, Zwolle en Centrum Hemostase, Thrombose, Atherosclerose en Ontstekingsonderzoek², Academisch Medisch Centrum, Amsterdam

Bij een lid van een grote familie werd onlangs fish eye disease (FED) geconstateerd. Deze troebeling van de cornea door afzetting van lipiden wordt veroorzaakt door (partiële) deficiëntie van het enzym lectine cholesterol acyl transferase (LCAT), welke berust op een mutatie in het LCAT-gen. Enkele mutaties zijn beschreven, waarbij de symptomen variëren van licht tot zeer ernstig. Onduidelijk is o.a. of er een verhoogde kans is op hart en vaatziekten.

Deze patiënt met FED bleek ondermeer een sterk verlaagde waarden van HDL-Cholesterol en LCAT-activiteit en verhoogde waarden van cholesterol (TC) en triglycerides (TG) in bloed te hebben. DNA-analyse toonde een homozygotie (HOMZ) aan in het LCAT-gen voor een GA-punt-mutatie in exon 4 welke resulteert in een vervanging van Asn in Asp op plaats 131 van het LCAT-eiwit.

Het hierop volgend familie-onderzoek richtte zich vnl. op

symptomen van FED c.q. LCAT-deficiëntie, (bloed)onderzoek van DNA, vetstofwisseling, nierfunctie, erythrocytenmembraan, hart- en vaatlijden. De echtgenoten en partners werden als referentiepersonen (N) meegenomen.

In het gezin, waartoe patiënt behoort, blijken nog 3 personen HOMZ voor deze mutatie te zijn, de overige 7 broers en zusters zijn heterozygoot (HETZ). Van deze 11 gezinsleden zijn 27 kinderen HETZ, de overige kinderen hebben deze mutatie niet (N).

Patiënt zelf en een HOMZ-broer lijden aan hart- en vaatziekten resp. in mindere en meerdere mate berustend op atherosclerose. De twee HOMZ-zusters hebben geen klachten dien-aangaande. Een aantal resultaten van het vetstofwisselingsonderzoek staan vermeld in tabel 1.

Genealogisch onderzoek wees uit dat de ouders van de patiënt in de 4^e en 5^e graad aan elkaar verwant zijn.

Tabel 1.

Status	geslacht	n	LCAT-act. nmol/h.ml	TC mmol/l	TG mmol/l	HDL-C mmol/l
HOMZ	2 m, 2 v	4	1,7 ±0,4	7,3 ±1,4	6,3 ±2,8	0,18 ±0,04
HETZ	m	22	17,2 ±2,2	5,1 ±1,0	1,6 ±0,8	0,81 ±0,23
	v	12	18,0 ±2,9	5,2 ±1,2	1,4 ±0,5	1,04 ±0,15
N	m	16	27,0 ±4,0	6,0 ±1,2	1,5 ±1,8	1,29 ±0,44
	v	22	25,5 ±2,9	5,6 ±1,1	1,1 ±0,4	1,54 ±0,40

Zinc concentrations in non-ketotic diabetic patients

A.WOLTHUIS¹, C.TH.B.M. van DEURSEN², W.J.R.R. VENEKAMP², J. ten KATE¹ en L.W.J.J.M. WESTERHUIS¹

Laboratory for Clinical Chemistry¹ and Department of Internal Medicine², De Wever & Gregorius hospital, Heerlen, The Netherlands

The possible atherogenic effect of a low zinc concentration in the blood of ketotic diabetic patients has been emphasized recently. Although the pathogenetic events remain unclear, it is suggested that zinc might interfere with lipid peroxidation (1), e.g. through induction of metallothionein (believed to quench hydroxyl radicals) (2).

In the present study we examined the blood of 140 non-ketotic diabetic patients and 113 non-diabetic patients (fasting blood glucose < 6.0 mmol/l). The blood zinc concentration (ZN) was measured in both groups using AAS. In addition, fructosamine, GlyHb, and the albumin excretion rate (AER) were determined in the diabetic group.

We could not find any significant difference in ZN between the diabetic and control group. To further analyze the ZN within the diabetic group, a subdifferentiation was made with respect to fructosamine (cut off level 350 µmol/l) with each group subdivided by an AER < 30 µg/h or > 30 µg/h. No significant difference in ZN could be detected between these different groups. Another subdifferentiation with respect to GlyHb (cutoff level 9%) subdivided by the AER did also not result in a statistical significant difference in ZN. In addition, a sub-

differentiation within the diabetic group with respect to type I and type II (68 and 72 patients respectively) diabetes was made but did not reveal any significant difference in ZN.

Although several reports have been published suggesting a lowered ZN in severe uncontrolled diabetic patients we did not detect any differences in ZN between non ketotic diabetic patients and a non diabetic control group. In addition, ZN in moderate uncontrolled diabetic patients (defined by a GlyHb > 9% and AER or fructosamine > 350 µmol/l and AER) did not differ significantly. Although a lowered zinc concentration might contribute to the atherogenesis in severe uncontrolled diabetic patients (1), these present observations do not support this concept with respect to controlled and moderately uncontrolled patients.

1. Faure P et al. Lipid peroxidation and trace element status in diabetic ketotic patients: influence of insulin therapy. Clin Chem 1993; 39: 789-793.
2. Sandstead HH. Understanding zinc: recent observations and interpretations. J Lab Clin Med 1994; 124: 322-327.

Intracellulair (vrij) geïoniseerd magnesium in lymfocyten van jonge CAPD patiënten

J. LEMMERS¹, J.L. WILLEMS¹, P.VIS³, R.E. REDDINGIUS², C.H. SCHRODER², L.A.H. MONNENS²

Afdeling Klinische Chemie¹ en Kindergeneeskunde² van het Academisch ziekenhuis, Nijmegen; Afdeling Fysiologie³ van de Faculteit der Medische Wetenschappen

Ten gevolge van de hoge concentratie aan niet eiwit-gebonden Mg^{2+} in de spoelvloeistof van CAPD patiënten is het totale Mg^{2+} gehalte in het bloed bij deze patiënten verhoogd. Deze hoge plasmaconcentratie leidt vervolgens tot een verhoogde Mg^{2+} concentratie in de erythrocyt ontstaan tijdens de erythropoïese (1). Is de concentratie van Mg^{2+} in de lichaamsscel nu ook verhoogd? Om dit na te gaan werd de lymfocyt als representant van de lichaamsscel gekozen.

De intracellulaire magnesium concentratie (Mg^{2+}_i) in lymfocyten wordt bepaald met behulp van de fluorescente magne-

siumchelator mag-fura-2 (2) en vermeldt samen met de Mg^{2+} concentratie in serum, erythrocyten en lymfocyten (3) (zie tabel 1). De resultaten van jonge (4-18 jaar) CAPD patiënten worden vergeleken met controles in dezelfde leeftijdscategorie.

De totale Mg^{2+} (Mg^{2+}_{tot}) concentratie in lymfocyten ($p < 0,1$) is naast de serum ($p < 0,01$) en erythrocyten concentratie ($p < 0,01$) van hetzelfde ion verhoogd, terwijl de Mg^{2+}_i concentratie niet significant ($p = 0,7$) verhoogd is. Wellicht is er bij de lymfocyt een mechanisme actief die ervoor zorgt dat de concentratie aan Mg^{2+}_i , dat nodig is voor de activatie van metabole processen in de lymfocyt constant gehouden wordt ongeacht de extracellulaire concentratie. Verdere transportstudies zijn noodzakelijk om dit op te helderen. Het is wel opmerkelijk dat de SD's van de Mg^{2+}_i - en de Mg^{2+}_{tot} concentratie in lymfocyten groter zijn dan bij controles maar deze SD's komen wel overeen met de resultaten van Morelle (4).

Tabel 1. Mg concentratie in plasma, erythrocyten en lymfocyten in mmol/l \pm 1 x SD (range)

	CAPD-patiënten (n=9)	Controles (n=7)
Mg in plasma	1,24 \pm 0,15 (1,04-1,47)	0,85 \pm 0,13 (0,86-1,08)
Mg in erythrocyten	4,61 \pm 0,61* (4,00-5,73)*	3,45 \pm 0,39* (3,03-4,11)*
Mg (tot) in lymfocyten	27,1 \pm 8,2 (14,8-40,2)	21,1 \pm 3,6 (16,1-25,0)
Mg^{2+}_i in lymfocyten	0,528 \pm 0,213 (0,257-0,775)	0,566 \pm 0,122 (0,465-758)

*: mmol Mg/g erythrocyten

1. Gunther T, Vormann J. Mg^{2+} influx in Mg^{2+} -depleted reticulocytes. *Magnesium and Trace elem* 1992; 10: 17-20.
2. Willems HL, Kruse J, Geven WB, Vis P, Monnens LAH. Defibrination essential in the assay of ionized magnesium in mononuclear cells. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: in press.
3. Geven WB, Vogels-Mentink GM, Willems JL, de Boo Th, Lemmens W, Monnens LAH. Reference values of magnesium and potassium in mononuclear cells and erythrocytes of children. *Clin Chem* 1990; 36: 1323-1327.
4. Morelle B, Salmon JM, Vig J, Viallet P. Measurement of intracellular magnesium concentration in 3T3 fibroblasts with the fluorescent indicator Mag-indo-1. *Anal Chem* 1993; 218: 170-176.

Is de kwantitatieve bepaling van anti-SSA antistoffen klinisch zinvol?

R.W. JANSSEN¹, H.J. BERNELOT MOENS² en G. van der SLUIJS VEER¹

Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Afdeling Reumatologie², Medisch Spectrum Twente, Enschede

Bij patiënten met systemische lupus erythematosus (SLE) en het syndroom van Sjögren (SS), kunnen in respectievelijk $\pm 35\%$ en 45% van de patiënten autoantistoffen tegen het cellulaire antigeen SSA worden aangetoond. Traditioneel worden antinucleaire antistoffen (ANA), zoals het anti-SSA, met een ANA-immunodiffusie (ANA-ID) en een ANA-blot kwalitatief bepaald. Tegenwoordig wordt de markt overspoeld met kostbare kits voor kwantitatieve ANA bepalingen, waarvan, behoudens de anti-dsDNA, de klinische relevantie onzeker is. Uit dit assortiment komt de anti-SSA naar voren als de meest relevante voor de kliniek. Wij hebben daarom besloten een time resolved fluoro immuno assay (TRFIA) voor anti-SSA te ontwikkelen en het klinische nut hiervan te evalueren.

Methoden

Anti-SSA TRFIA (kort): Het 60 kD SSA-eiwit (Immunovision) werd op Maxisorp platen (1 U/well) gecoat, geïncubeerd met patiëntenserum en na incubatie met europium gelabeld rat-anti-humaan-IgG-F(ab)₂ gemeten. Er zijn 3 groepen patiënten gevormd: I) Patiënten met een Sjögren-achtig beeld maar anti-SSA negatief in de ANA-blot en ANA-ID, II) Patiënten die bekend zijn met anti-SSA (blot en/of ID), III) 50 bloedbank donoren en 50 qua leeftijd en geslacht met groep I en II gematchte sera. Bij de groepen I en II werden de ANA-blot, ANA-ID en anti-SSA TRFIA bepaald en gerelateerd aan de klinische verschijnselen van verschillende autoimmuunziekten. Groep III werd gebruikt voor het vaststellen van de referentiewaarden.

Resultaten

Anti-SSA TRFIA: De assay heeft een lineair bereik van 0,1 tot 1000 A(rbitraire) U/l met een binnen-serie VC van 6,3%. De referentiewaarde (971/2 percentiel) was $< 0,3$ AU/l. Patiënten: Groep I) 23 vrouwen en 2 mannen met de volgende diagnoses: 4 mogelijk M. Sjögren, 5 RA met secundaire Sjögren, 1 sarcoïdose en 15 ongedifferentieerde autoimmuunziekten. De anti-SSA was gemiddeld 0,98 AU/l (range 0,1-10). Groep II) 37 vrouwen en 2 mannen met de diagnoses: 7 waarschijnlijke Sjögren, 4 RA, 4 SLE, 1 sarcoïdose, 17 andere autoimmuunziekten en 6 onbekende diagnoses. De anti-SSA was gemiddeld 304 AU/l (range 0,01 - 1468), waarbij de anti-SSA bij een positieve ANA-blot en een negatieve ANA-ID veel lager is dan bij een positieve ANA-ID (gemiddeld resp. 48 AU/l en 344 AU/l). Bij longitudinaal vervolgen bleef de anti-SSA spiegel per patiënt opvallend constant, ondanks variatie van de klinische toestand.

Conclusie

De ANA-blot en ANA-ID voor SSA hebben een zeer beperkte rol in de differentiële diagnostiek van auto-immuunziekten. Invoering van een kwantitatieve anti-SSA bepaling is niet zinvol omdat: 1) De anti-SSA TRFIA geen meerwaarde heeft t.o.v. de ANA-blot en ANA-ID en 2) er geen relatie is tussen de anti-SSA en de klinische toestand van de patiënten. Afgezien van de anti-dsDNA zijn de kwantitatieve ANA bepalingen niet zinvol en moeten dus niet worden ingevoerd op klinische routine laboratoria.

IJzerstatus en metabole controle bij patiënten met niet-insuline afhankelijke diabetes mellitus

C.J.A. DOELMAN¹, M.J. POLITIEK², K. MIEDEMA¹ en H.J.G. BILO²

Laboratorium¹ en Afdeling Interne Geneeskunde², Ziekenhuis De Weezenlanden, Zwolle

Chronische hyperglycaemie doet de kans op diabetische microvasculaire complicaties (retinopathie, neuropathie en nefropathie) en macrovasculaire complicaties toenemen. Verschillende biochemische mechanismen zijn voorgesteld een rol te spelen bij het ontstaan van deze micro- en macrovasculaire afwijkingen. De accumulatie van Advanced Glycosylated Endproducts lijken hierbij een sleutelrol te vervullen. Bij de vorming van Advanced Glycosylated Endproducts speelt oxidatie een rol. Het Amadoriprodukt kan zuurstof reduceren waarbij superoxide anionen ontstaan. Bovendien leidt glucose auto-oxidatie eveneens tot de productie van superoxide anionen. Bij de verdere oxidatiereacties speelt ijzer als katalysator van dit proces, een cruciale rol. Bovendien wordt een verhoogd ferritine geassocieerd met een verhoogde kans op cardiovasculaire afwijkingen (1).

In deze studie werden 12 onregelde patiënten met niet-insuline afhankelijke diabetes mellitus geëvalueerd; 9 vrouwen en 3 mannen; leeftijd van 58 (range 42-70). Patiënten werden be-

handeld met insuline therapie en na 0, 4 en 16 weken werd de volledige ijzerstatus (ijzer, totale ijzer bindingscapaciteit, ferritine, transferrine en ceruloplasmine), naast de parameters voor de diabetesinstelling en lipidenstatus gemeten. Daarbij werden de in tabel 1 aangegeven veranderingen waargenomen.

Conclusie

Insuline therapie bij Niet-Insuline Afhankelijke Diabeten leidt op korte termijn al tot een verlaagd cholesterol en tot een verminderde albumine uitscheiding in de urine. Ferritine in serum is verlaagd na 16 weken insuline therapie. Insuline therapie verlaagt dus reeds op korte termijn het risico op cardiovasculaire afwijkingen.

1. Salonen JT, Nyssönen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppänen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation* 1992; 86: 803-811.

Tabel 1

	voor insuline	na 4 weken	na 16 weken
HbA _{1c} (%)	11,1 (9,4-17,4)	9,0 (8,2-13,9)*	7,3 (4,8-12,0)*
Kreatinine (µmol/l)	79 (67-112)	88 (65-108)	82 (66-120)
Hb (mmol/l)	8,6 (7,9-9,3)	8,5 (7,3-9,0)	8,1 (7,5-9,4)
Albumine (ur.)(mg/l)	16 (4-184)	4 (2-83)*	4 (2-44)*
Cholesterol (mmol/l)	7,0 (4,3-8,0)	6,3 (4,5-7,2)*	5,4 (4,4-6,8)*
HDL-chol. (mmol/l)	1,16 (0,67-1,39)	1,22 (0,71-1,55)	1,19 (0,67-1,58)
IJzer (µmol/l)	13,3 (9,0-24,7)	14,5 (7,0-17,9)	11,8 (8,3-19,8)
TIJBC (µmol/l)	51,0 (42,3-58,5)	49,5 (40,5-58,2)*	51,3 (40,8-61,5)
Transferrine (g/l)	2,3 (1,8-2,4)	2,1 (1,8-2,7)	2,3 (1,6-2,7)
Ferritine (mg/l)	246 (18-580)	224 (9-669)	187 (9-513)*
Ceruloplasmine (g/l)	0,40 (0,30-0,60)	0,40 (0,30-0,50)	0,40 (0,28-0,50)

*: p<0.05, Wilcoxon-rank test.

Endotheline en atriopeptine zijn betrokken bij de bifasische adrenocorticale veranderingen in ernstig zieke patiënten

I. VERMES en R.M. HAMPSINK

Klinisch Chemisch Laboratorium, Medisch Spectrum Twente, Enschede

De adaptatie van de hypothalamus-hypofyse-bijnieras tijdens een ernstige ziekte werd onderzocht bij patiënten met sepsis (n=18) en multiple trauma (n=12) en vergeleken met die van controlepersonen zonder acuut ziektebeeld (n = 15). Hiertoe werden gedurende acht dagen vanaf de opname de concentraties van ACTH (in pmol/l), cortisol (CORT; in µmol/l), endotheline (ENDO; in ng/l) en atriopeptine (ANP; in ng/l) in het bloed gemeten. De resultaten zijn uitgedrukt in gemiddelde ± 2SD.

Bij opname waren CORT en ACTH van sepsispatiënten (1,32 ± 0,21 resp. 130,0 ± 38,2) en traumapatiënten (1,23 ± 0,28 resp. 123,7 ± 41,3) significant hoger dan bij de controlepersonen (0,37 ± 0,08 resp. 15,6 ± 5,8). De CORT-waarden in beide patiëntengroepen bleven verhoogd tijdens de observatieperiode; ACTH was vanaf de vijfde dag na opname significant

lager vergeleken met de controlegroep. In de beide patiëntengroepen waren ENDO en ANP gedurende de acht opeenvolgende dagen significant hoger dan in de controlegroep. De verhoogde ANP- én verhoogde CORT concentraties zullen een remmende werking op de ACTH secretie hebben, waardoor de lage ACTH concentraties vanaf vijf dagen na opname verklaard kan worden. Anderzijds kunnen de hoge ENDO concentraties in de beide patiëntengroepen mogelijk de steroid-secretie stimuleren of hebben een ACTH-achtige werking, waardoor de CORT spiegels verhoogd blijven. Concluderend: de hoge ENDO waarden hebben een positief effect op de bijnierschors; de hoge ANP waarden hebben een remmend effect op de hypothalamus-hypofyse-as. Beide mechanismen spelen dus een rol bij ernstig zieke patiënten.

Detection, differential diagnosis and clinical aspects of thymine-uraciluria

A.H. van GENNIP, N.G.G.M. ABELING, A.E.M. STROOMER, H. van LENTHE, H.D. BAKKER and A.B.P. van KUILENBURG
Academic Medical Center, Depts. of Pediat. and Clin. Chem, Amsterdam, The Netherlands

Thymine-uraciluria exists in three forms: it can be due to the deficiency of one of the enzymes dihydropyrimidine dehydrogenase (DHPD) or dihydropyrimidinase (DHP) or it can result from overload of the pyrimidine degradation pathway, i.e. in case of severely increased tissue-breakdown. Examples of the various types of thymine-uraciluria were studied using the previously described complete set of diagnostic methods (1). In the patients with DHPD or DHP deficiency the thymine-uraciluria occurred persistently, in the 'overflow' patient it occurred only transiently. In the DHPD-deficient patient thymine-uraciluria was prominent (uracil, thymine and 5-hydroxymethyluracil were 683,439 and 54 mmol/mol creat. respectively), but the excretion of dihydro-pyrimidines was very low. In contrast, the DHP-deficient patient showed a moderate thymine-uraciluria (uracil 49, thymine 6 mmol/mol creat. and 5-hydroxymethyluracil not detected) and in addition a prominent dihydropyrimidinuria (dihydrouracil 622, dihydrothymine 406 mmol/mol creat.). The excretion of N-carbamyl- β -alanine, N-carbamyl- β -aminoisobutyric acid and the corresponding decarbamylated β -amino acids was very low in both patients. The patient with 'overflow' thymine-uraciluria had a huge excretion of uracil (1672 mmol/mol creat.) and thymine (165 mmol/mol creat.) and also an elevated excretion of the dihydropyrimidines, N-carbamyl- β -amino acids and decarbamylated β -amino acids. In particular, urinary β -aminoisobutyric acid was strongly elevated. However, on the second day after treatment the excretion of all these compounds had nearly

normalised. The results illustrate that differential diagnosis of thymine-uraciluria can easily be performed. DHPD deficiency was confirmed by determination of enzyme activity in leukocytes and fibroblasts; DHP deficiency can only be proven in liver tissue, but this was not allowed in our patient.

The most frequently occurring symptoms of patients with DHPD or DHP deficiency are convulsions, epileptic conditions, and mental retardation, but the clinical expression is quite variable and even asymptomatic individuals have been reported. Our patient with DHPD deficiency has severe psychomotor retardation, bilateral microphthalmia, iris and choriodea coloboma and nystagmus, but never showed convulsions. The patient with DHP deficiency incidentally had seizures, but he is not mentally retarded. Recent findings such as the detection of 15 patients with DHPD deficiency in The Netherlands alone and 4 patients with DHP deficiency suggest that inherited thymine-uraciluria is more common than generally assumed. Moreover, cancer patients with a deficiency of DHPD have been reported to suffer from severe toxic effects including death following treatment with the widely used anti-neoplastic drug 5-fluorouracil. Therefore, screening for thymine-uraciluria is indicated in patients presenting with any of these symptoms.

1. Van Gennip AH, Busch L, Stroomer AEM, Cruchten A van, Scholten EG and Abeling NGGM. *Clin Chem* 1993;39:380-385.

Combined deficiencies of NADPH- and NADH-dependent dihydropyrimidine dehydrogenases, a new finding in a family with thymine-uraciluria

A.H. van GENNIP, H. van LENTHE, N.G.G.M. ABELING, H.D. BAKKER and A.B.P. van KUILENBURG
Academic Medical Center, Depts. of Pediat. and Clin. Chem., Amsterdam, The Netherlands

Dihydropyrimidine dehydrogenase (DHPD) in human tissues is known to be dependent on NADPH as a co-substrate and shows a circadian rhythm. DHPD deficiency is inherited in an autosomal recessive mode. Carrier detection by analysis of enzyme activity in leukocytes and fibroblasts is reported to be unreliable. We discovered that also an NADH-dependent activity of DHPD can be measured in human fibroblasts and liver. In this study we investigated the activity of DHPD in leukocytes and fibroblasts of a patient with thymine-uraciluria and his family members. Liver biopsies were not taken for ethical reasons. We wondered if the expression of DHPD activity was comparable in both tissues using NADPH or NADH as co-substrate and if the reliability of carrier detection could be improved by taking circadian variation into consideration. In controls NADPH-dependent activity was roughly 8-fold

higher in leukocytes than in fibroblasts, but the NADH-dependent activity in leukocytes appeared to be very low compared to fibroblasts. In either cell type NADPH-dependent activity was undetectably low in the patient, intermediate in the parents and one brother and normal in the other brother. In fibroblasts NADH-dependent activity was undetectably low in the patient, intermediate in the parents and the one brother and normal in the other brother.

The results suggest that the NADPH-dependent DHPD activity is expressed relatively to the same extent in leukocytes and fibroblasts, that NADH-dependent DHPD activity in fibroblasts of the family members showed an analogous expression pattern and that carrier detection is possible when sampling of the tissues is synchronised.

Diagnosis of a new case of trimethylaminuria using direct proton nmr analysis of urine

N.G.G.M. ABELING¹, A.H. van GENNIP¹, H.D. BAKKER¹, A. HEERSCHAP², U. ENGELKE² and R.A. WEVER²
Academic Medical Center, University of Amsterdam, Dept. of Pediat. and Clin. Chem.¹, Amsterdam and University of Nijmegen, Dept. of Pediat.², Nijmegen, The Netherlands

Trimethylaminuria (TMA-uria) is the characteristic biochemical abnormality leading to the so-called fish odour syndrome, a distressing condition of body malodour causing serious psychosocial problems. Elevated excretion of TMA is the result of defective N-oxidation of this amine, which is derived from

bacterial degradation of food components such as choline and carnitine, and is inherited in an autosomal recessive fashion. Three years ago we identified a 3 year old boy, who presented with an intensive odour of rotting fish, as possibly having TMA-uria. Apart from a short stature (<P3), the child was

otherwise healthy. At that time no facilities for the assay of TMA were available in the Dutch Clinical Genetics Centers. Recently we introduced a simple and rapid method for the measurement of urinary TMA using 600 MHz proton NMR. This technique was applied to the patient's urine sample which had

been stored at -25°C. The concentration of free TMA appeared to be strongly elevated and TMA-N-oxide was very low (13% of total TMA as opposed to >80% in normal controls). These findings confirmed a defective N-oxidation of TMA.

A mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene results in exon skipping and thymine-uraciluria

A.H. van GENNIP¹, A.B.P. van KUILENBURG¹, R. MEINSMA¹, P. FERNANDEZ-SALGUERO² and F.J. GONZALEZ²
Academic Medical Center, Dept. of Pediat. and Clin. Chem.¹, Amsterdam, The Netherlands. Lab. of Molecular Carcinogenesis², National Cancer Institute, Bethesda, MD 20892 U.S.A.

Dihydropyrimidine dehydrogenase (DHPD) is the initial and rate-limiting enzyme in the catabolism of the pyrimidine bases thymine and uracil. In children, the deficiency of DHPD is often accompanied by a neurological disorder but a considerable variation in the clinical presentation among these patients has been reported.

In fibroblasts and leukocytes of a patient with no detectable activity of DHPD, no protein could be detected in a Western blot, suggesting a complete lack of the DHPD protein. In the fibroblasts of one brother, an intermediate activity of DHPD was detected as well as intermediate levels of the DHPD protein. In the other brother, a normal protein- and activity level of DHPD was found. Thus, the catalytic pattern correlates with the protein levels of DHPD for the different family members.

Analysis of the cDNA from the patient by RT-PCR revealed the existence of a 165 bp deletion in the mRNA encoding DHPD. The 165 bp deletion in the mRNA encoding DHPD was also found in both parents and one brother who were found to be heterozygous for the deleted and the normal mRNA while the other brother possessed two normal transcripts. Thus, the activities and protein levels of DHPD correlated with the genotype of the family members. PCR analysis of the genomic DNA from this family revealed that the defective mRNA is not due to a deletion of a portion of the gene that contains the exon thus implying that the mutation is the result of an as yet non identified point mutation that causes faulty splicing. Our results provide the first evidence at the molecular level that the thymine-uraciluria in this patient is due to a mutation in the gene encoding DHPD.

Immunoblot analysis of peroxisomal β -oxidation enzyme proteins: a powerful tool in the first trimester prenatal diagnosis of Zellweger Syndrome and Rhizomelic Chondrodysplasia Punctata

R.J.A. WANDERS, R.B.H.SCHUTGENS, C. DEKKER and P. MOOIJER
University Hospital Amsterdam, Dept. Pediatrics and Clinical Chemistry, Amsterdam, The Netherlands

The peroxisomal disorders represent a group of diseases in which there is an impairment in one or more peroxisomal functions. In general the various diseases are classified into 3 groups depending upon whether there is a generalized (A), multiple (B) or single (C) loss of peroxisomal functions. Zellweger syndrome is the main representative of group A which also includes infantile Refsum disease, neonatal adrenoleukodystrophy and some other milder variants. Rhizomelic chondrodysplasia punctata (RCDP) is the main representative of group B.

Both in RCDP as well as in ZS and the other disorders of peroxisome biogenesis abnormalities have been described in the peroxisomal β -oxidation enzyme proteins. Indeed, in RCDP

peroxisomal thiolase occurs in its 44kDa precursor form rather than in its 41kDa mature form as identified by immunoblot-analysis. The same abnormality is also found in ZS, IRD and NALD. Furthermore, the immunoblot patterns of acyl-CoA oxidase and bifunctional protein are also abnormal in case of ZS, IRD and NALD. We now report that thiolase and acyl-CoA oxidase show a high level expression in chorionic villous biopsy specimens. Accordingly, immunoblot analysis of peroxisomal thiolase (in case of ZS, IRD, NALD and RCDP) and acyl-CoA oxidase (in case of ZS, IRD and NALD) in direct villous samples is a powerful tool in the first trimester prenatal diagnosis of these disorders.

Identification of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase in peroxisomes: characterization of the enzyme and comparison with its mitochondrial counterpart.

R.J.A. WANDERS^{1,2} and C.J. DEKKER¹
Depts. Clinical Chemistry¹ and Pediatrics², University Hospital Amsterdam, The Netherlands

3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) is a central metabolite which can either be converted into mevalonate via HMG-CoA reductase to give rise to isoprenoids or into acetoacetate and acetyl-CoA via HMG-CoA lyase. The classical concept holds that HMG-CoA lyase is localized in mitochondria only. Recently, however, the human, mouse and chicken liver HMG-CoA lyase cDNAs were cloned which revealed a peculiar characteristic: all three cDNAs contained a potential peroxisomal targeting motif at the carboxyterminal end. We

therefore re-investigated the subcellular localization of HMG-CoA lyase in rat liver: the enzyme was found to be localized in mitochondria (90-95%) as well as in peroxisomes (5-10%). The two enzymes showed almost identical kinetic properties (pH-optimum, Km, etc.).

In fibroblasts from patients with HMG-CoA lyase deficiency, both peroxisomal and mitochondrial HMG-CoA lyase were deficient suggesting that the two forms are encoded by a single gene.

Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: biochemical heterogeneity, mutation analysis and prenatal diagnosis

R.J.A. WANDERS^{1,2}, L. IJLST¹, J.P.N. RUITER¹, S. USHIKUBO³ and T. HASHIMOTO³

Depts. of Clinical Chemistry¹ and Pediatrics², University Hospital Amsterdam; Dept. of Biochemistry³, Shinshu University of Medicine, Matsumoto, Japan

In the last few years an increasing number of inherited diseases in man have been identified in which mitochondrial β -oxidation is impaired. One of the recently identified disorders is long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LC3HAD) deficiency first described in 1989 (1). Since then at least 10 additional patients with this defect have been published in literature. In our own laboratory we have diagnosed 35 cases of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency sofar.

In the majority of patients there is an isolated deficiency of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase with near normal activities of all other mitochondrial β -oxidation enzymes. So far 2 patients have been described in which there is not only a deficiency of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase but also a long-chain enoyl-CoA hydratase and long-chain 3-oxoacyl-CoA thiolase (2,3). The recent finding that all these 3 enzyme activities are catalyzed by a single enzyme protein called mitochondrial trifunctional protein provides an explanation for this puzzling finding (4).

Using enzyme activity measurements and immunoblot analysis in fibroblasts from LC3HAD-deficient patients it is possible to discriminate two groups of patients: one with an isolated

deficiency of the LC3HAD-component of mitochondrial trifunctional protein (MTP) and the other with a deficiency of all 3 components of MTP.

We have now identified 2 point mutations at positions 1528 (G \rightarrow C; glutamate \rightarrow glutamine) and 219 (T \rightarrow C; leucine \rightarrow proline), respectively, in the dehydrogenase coding part of the α -subunit of multifunctional protein. The first G1528C-mutation is very frequent in LC3HAD-deficient patients (frequency: >90%) whereas the second mutation was found in a single patient only.

We have found that mitochondrial trifunctional protein is also expressed in chorionic villi either cultured or not. Using enzyme activity measurements, immunoblot analysis and mutation analysis at the cDNA level prenatal diagnosis can be done reliably. So far 5 pregnancies at risk have been analyzed which are all still in progress.

1. Wanders RJA et al. Lancet 1989; ii: 52-52.
2. Jackson S et al. J Clin Invest 1992; 90: 1219-1225.
3. Wanders RJA et al. Biochem Biophys Res Commun 1992; 188: 1139-1145.
4. Uchida T et al. J Biol Chem 1992; 267: 1034-1041.

Gynecologie en obstetrie

Screening op zwangerschapsdiabetes

J. van PELT¹, C.H.F. BERGMANS¹ en C.G.M. de ROOY²

KCHL¹ en Afdeling Gynaecologie², st. Maartens Gasthuis, Venlo

In 1994 zijn zwangeren door de verloskundigen in de regio Venlo gescreend op het vóórkomen van zwangerschapsdiabetes. Hiertoe nemen zij in de 24^e en 28^e week van de zwangerschap op een willekeurig tijdstip een oplossing van 50 gram glucose in en wordt na één uur een NaF microvette afgenomen. Als de glucoseconcentratie $\geq 7,8$ mmol/l is, wordt de zwangere opgeroepen voor een Orale Glucose Tolerantie Test met 100 gram glucose. Bij minimaal twee waarden groter of gelijk aan de grenswaarden (nuchter, 1, 2 en 3 uur na inname: 5,8; 10,6; 9,2 en 8,1 mmol/l) wordt de diagnose zwangerschapsdiabetes gesteld en worden de patiënten doorverwezen naar de gynaecoloog en vervolgens diabetespoli.

In 1994 is aldus bij 1420 zwangeren de screeningstest uitgevoerd. Het bereik was hiermede ± 80 %. 273 Zwangeren uit de geteste populatie hadden een glucoseconcentratie $\geq 7,8$ mmol/l (19 %). Bij 215 van hen werd een OGTT uitgevoerd, waarvan er 37 afwijkend bleken te zijn (4 x 4, 7 x 3 en 26 x 2 te hoge waarden; totaal 17 %). Dit geeft een prevalentie van 17 % x 19 % = 3,2 %. Van de 178 niet-afwijkende OGTT's waren er 41 met één te hoge waarde. Er bestonden significante verschillen tussen de glucosescreeningswaarden bij zwangeren met res-

pectievelijk geen, 1, 2, 3 en 4 afwijkende OGTT-waardes (zie tabel 1). Er was evenwel nauwelijks verband waarneembaar tussen de glucosescreeningswaarde met 50 gram glucose inname na 1 uur en de OGTT waarde met 100 gram glucose inname na 1 uur ([Gluc] screen = 7,17 + 0,204 x [Gluc] OGTT; $r^2 = 0,147$).

Tabel 1. Gemiddelde glucosescreeningswaardes in relatie tot het aantal afwijkende OGTT waardes

Afwijkende OGTT-waardes	glucosescreen mmol/l	n
	6,40	1420
0	8,76	137
1	9,35	41
2	9,45	26
3	10,11	7
4	11,43	4

Diversen

Intramucosal pH measurements in critically ill patients

J. ten KATE¹, E.J.A. WESTERMANN², G.J. MARELL¹, A. WOLTHUIS¹, L.W.J.J.M. WESTERHUIS¹ and A. van den DRIES²

Departments of Clinical Chemistry¹, Intensive Care Medicine², De Wever Hospital, Heerlen, The Netherlands

In critically ill patients on the Intensive Care Department the measurement of the gastric intramucosal pH (pHi) may be helpful in the decision making process. The intramucosal pH

is calculated with the equation of Henderson-Hasselbalch on basis of a $p\text{CO}_2$ measured by tonometry and an arterial HCO_3^- . The gastric $p\text{CO}_2$ is measured with a catheter and a balloon

filled with saline (0,9% NaCl). The measured pCO₂ is multiplied by a factor which depends on the period of tonometry (30-60 minutes), resulting in the so called steady state adjusted pH.

The advantages of using the pH_i are: (1) prevention of (multiple) organ failure, (2) prevention of infections by correcting

acidic pH_i's through restoring the splanchnic circulation, (3) reducing costs by lowering the length of stay.

The organisation around the measurement of the pH_i, and two patients in which measurement of the pH_i influenced the management of these patients will be presented in this poster.

Correlatie tussen de botdichtheid en enkele parameters voor de botafbraak tijdens de perimenopausale periode

A.A.M. ERMENS¹, H. WEERDENBURG², V.J.M. POP³, H.A.M. de ROOIJ⁴ en H.L. VADER¹

Klinische Laboratoria¹, Radiodiagnostiek², Huisarts³ en Interne Geneeskunde⁴, Sint Joseph Ziekenhuis Veldhoven

Als gevolg van de toegenomen kennis omtrent het continue proces van botaanmaak en botafbraak zijn een aantal nieuwe klinisch-chemische bepalingen voor de evaluatie van de (pathologische) botstofwisseling beschikbaar gekomen. De toepassing hiervan in de kliniek is nog erg gering. Zo zijn tot op heden slechts een beperkt aantal studies verschenen waarin de botdichtheid gecorreleerd werd met de excretie van deoxy-pyridinoline en galactosylhydroxylysine, beide markers voor de botafbraak.

In deze studie werd bij 100 perimenopausale vrouwen (insluitend criterium: leeftijd 47-53 jaar) ochtendurine verzameld en een botdichtheidsmeting (BMD) verricht. In de ochtendurine werden de concentraties deoxypyridinoline (ELISA, Metra Biosystems) en galactosyl-hydroxylysine (HPLC) bepaald. De uiteindelijke excretie van zowel deoxypyridinoline als galactosyl-hydroxylysine werd uitgedrukt als ratio van de kreatinineconcentratie in het onderzochte urinemonster. Vervolgens werden de ratio's gecorreleerd (Spearman rank correlation test) met de BMD, die uitgedrukt wordt in grammen calciumhy-

droxyapatiet per cm². Er blijkt een negatieve correlatie te bestaan tussen de excretie van deoxypyridinoline en de vastgestelde botdichtheid ($r_s = -0,362$, 95%-betrouwbaarheidsinterval: -0,178 tot -0,521, $p < 0,001$, $n = 100$). Van een significante correlatie tussen de galactosyl-hydroxylysine excretie en de botdichtheid is geen sprake ($r_s = -0,061$, 95%-betrouwbaarheidsinterval: -0,254 tot 0,137, $p > 0,1$, $n = 100$). De correlatie tussen de twee klinisch-chemische parameters onderling is eveneens statistisch significant ($r_s = 0,319$, 95%-betrouwbaarheidsinterval: 0,131 tot 0,485, $p < 0,001$, $n = 100$).

De resultaten van de studie tonen aan, dat ondanks de heterogeniteit van de onderzoekspopulatie er toch een duidelijk negatieve correlatie bestaat tussen de botdichtheid en de excretie van deoxypyridinoline in de urine. De in de literatuur gepropageerde bruikbaarheid van deze parameter als maat voor de botresorptie wordt hiermee ondersteund. De waarde van galactosyl-hydroxylysine bij de evaluatie van de botstofwisseling blijft onduidelijk.

De introductie van een uitgebreid pakket laboratoriumbepalingen voor beademde intensieve zorg (IC) patiënten

J.L.P. van DUIJNHOFEN¹, M. TRESKES¹, B. SPEELBERG², M.J.E. van PUYENBROEK², J. de JONGH-LEUVENINK¹

CKCHL¹ en ICU², St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg

De IC van het St. Elisabeth Ziekenhuis biedt zorg aan maximaal 10 beademingspatiënten. Dagelijks wordt om 06:00 laboratoriumdiagnostiek aangevraagd m.b.v. voorgedrukte formulieren, bestaande uit bloedgasen, natrium, kalium, ureum, kreatinine, Hb, MCV, Ht, leucocyten, trombocyten, glucose en urine analyse. Door de intensivisten is een uitgebreider pakket (zie tabel 1) samengesteld dat maandag en donderdag wordt aangevraagd. Ter evaluatie en begeleiding is gedurende 2 maanden dagelijks de IC-visite bijgewoond en werden 118 aanvragen van 54 patiënten geëvalueerd. Hoofdvraag was of deze uitbreiding diagnostische en/of therapeutische consequenties had. Verder is o.a. aandacht besteed aan logistiek en doorlooptijden.

Aan de hand van het gebruik van de uitslagen zijn suggesties gedaan betreffende de inhoud van het pakket. Na overleg zijn totaal eiwit, triglyceride en alkalische fosfatase verwijderd en wordt urine-onderzoek niet meer dagelijks aangevraagd, omdat de opbrengst diagnostisch en therapeutisch te gering was.

Verder bleek er een verlenging van de gemiddelde doorlooptijden op te treden. Dit was deels te wijten aan het laboratorium-informatie systeem (LABZIS 1), wat betreft maximaal aantal aanvragen op één formulier. Deze verlenging werd verholpen door wijziging van de inlees-procedure, gebruik van een apart formulier voor extra bepalingen en vervroegen van

de afnames. Toch bleken COD en urine (chemie) uitslagen herhaaldelijk niet voor de IC-visite (11:00) beschikbaar te zijn. Dit werd opgelost door (geplande) vervanging van apparatuur (COD) en gewijzigde prioriteiten (urine-chemie). Deze evaluatie heeft bovendien geleid tot het beter invullen van de aanvraagformulieren en directer contact tussen de IC en het CK-CHL.

Tabel 1.

extra aanvraag	afwijkend	(eventuele) actie
geïon. Calcium	42%	suppletie
Fosfaat	11%	suppletie
Magnesium	6%	suppletie
Alb./Eiwit/COD	>90%	plasma expanders toedienen
Leverenzymen	52%	echo bovenbuik, virusserologie
Bilirubine	56%	vervolg hematoomresorptie
CPK	31%	vochtbeleid sepsis, CK-MB & ECG
Triglyceriden	8%	geen
	19%	geen
Leuco-diff	>90%	antibiotica beleid
Protrombinetijd	45%	DIS aanvraag, vit K suppletie