

Posterabstracts

Samenvattingen van de posterpresentaties tijdens het 51e Congres van de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie 8 en 9 april 1998 te Lunteren

Klinische (bio)chemie en methodologie

Lipiden

1. Bepaling van vet in faeces met behulp van mid-infraroodspectroscopie

B.S. JAKOBS¹, D.W. SWINKELS¹, M. VOLMER², B.G. WOLTHERS², M.J. van LOON³ en H.A.M. VOORBIJ³
CKCL, AZ Nijmegen, St. Radboud¹, CKCL, AZ Groningen² en ASL, AZ Utrecht³

De bepaling van vet in faeces wordt tot nu toe binnen onze laboratoria uitgevoerd volgens de 'van de Kamer methode'. Deze methode is zeer bewerkelijk, tijdrovend en een kwaliteitscontrole ontbreekt. In samenwerking met twee andere academische centra (Groningen en Utrecht) hebben we een nieuwe vet in faecesbepaling ontwikkeld die gebruik maakt van mid-infraroodspectroscopie. Deze techniek wordt binnen de klinische chemie al gebruikt voor de niersteenanalyse. Na een korte en eenvoudige voorbereiding van de faecesmonsters, waarbij de vetzuren geïsoleerd worden uit de faeces m.b.v. een aangezuurd mengsel van petroleumether en ethanol, werd een transmissiespectrum opgenomen in het

mid-infraroodgebied (400 - 4000 cm⁻¹). Met behulp van 'Partial Least Square' en multicomponentanalyses van de golflengten, gemeten bij diverse faecesmonsters met een bekende vetconcentratie, werd een model gegenereerd. Tevens werd stearinezuur gebruikt als standaard voor de ijklijn. Er bleek een goede correlatie te zijn tussen de vetconcentraties bepaald met infrarood en gemeten met de 'van de Kamer methode' (n=35, r² > 0,95). Conclusie: de bepaling van vet in faeces met behulp van mid-infraroodspectroscopie biedt, in zijn eenvoud en standaardisatiemogelijkheden, een goed alternatief voor de conventionele 'van de Kamer methode'.

2. γ -Linolenic acid does not augment long chain polyunsaturated fatty acid ω -3 status

D.A.J. BROUWER¹, Y. HETTEMA¹, J.J. van DOORMAAL² and F.A.J. MUSKIET¹
Central Laboratory for Clinical Chemistry¹ and Atherosclerosis Lipid Outpatient Clinic², University Hospital Groningen

Long chain polyunsaturated fatty acids of the ω 3 and ω 6 series (LCPUFA ω 3, LCPUFA ω 6; chain length (20) are structural components of membrane phospholipids and precursors of eicosanoids. LCPUFA are synthesized from the essential fatty acids linoleic (LA; 18:2 ω 6) and α -linolenic (ALA; 18:3 ω 3) acids by alternating chain elongation and desaturation. The initial, and rate limiting, step in LCPUFA synthesis is by Δ -6 desaturation. LA and ALA compete for conversion by Δ -6 desaturase. Important metabolites of LA are γ -linolenic (GLA; 18:3 ω 6), dihomogamma-linolenic (20:3 ω 6) and arachidonic (20:4 ω 6) acids, whereas those of ALA are eicosapentaenoic (EPA; 20:5 ω 3) and docosahexaenoic (DHA; 22:6 ω 3) acids. Augmentation of LCPUFA ω 3 status decreases the risk for coronary artery disease. It can be reached by consumption of LCPUFA ω 3-rich fish oils or improvement of the conversion of ALA to LCPUFA ω 3. Since it has been suggested that GLA activates Δ -6 desaturase, we investigated whether GLA augments LCPUFA ω 3 status. Seven apparently healthy adults (23-47 years; female/male=3/4) received a daily oral dose of 4 g linseed oil (2.2 g ALA) for 4 weeks, and subsequently a combination of 4 g linseed oil and 6 g borage oil (2.2 g

ALA+1.5 g GLA) daily for another 4 weeks. A second group of eight adults (22-49 years; female/male=3/5) received 6 g borage oil for 4 weeks, and subsequently the same combination during the second 4 weeks. EDTA-blood was collected in the fasting state at -1, 0, 4 and 8 weeks. Erythrocytes, platelets, plasma cholesterol esters and plasma triglycerides were isolated. Their fatty acid compositions were determined by capillary gas chromatography/flame ionization detection. ALA and GLA administration augmented their contents in each of the investigated compartments. GLA, either alone or as GLA+ALA combination, increased 20:3 ω 6, but did not change arachidonic acid, 22:4 ω 6, or 22:5 ω 6. ALA, either alone or as ALA+GLA combination, did not significantly augment EPA and DHA contents. We conclude that the LCPUFA ω 3 status can not be improved by supplementation with 4 g linseed oil, and that cosupplementation of 6 g borage oil does not augment LCPUFA ω 3 status either. Poor conversion of ALA to LCPUFA ω 3 may be caused by negative feedback of the background intake of arachidonic acid from the carnivorous diet and/or by the remaining high dietary LA/ALA ratio.

3. Analysis of fecal fat with Fourier Transform Infrared spectroscopy with horizontal Attenuated Total Reflection

M. VOLMER, I.P. KEMA, A. KINGMA and B.G. WOLTHERS

University Hospital Groningen, department CKCL, Groningen, The Netherlands

Quantitative fecal fat excretion analysis is a test that is frequently used for the detection of steatorrhea in patients with gastrointestinal problems. Traditionally this test is performed by a titrimetric method described by Van de Kamer et al. Other analytical techniques like gravimetry and gaschromatography (GC) are possible. These tests, however, are time consuming and cumbersome. We are developing a quick and direct quantitative fecal fat analysis method using Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. A small portion of a homogenized stool is spread on a horizontal Total Attenuated Reflection (h-ATR) assembly that is placed in the FTIR instrument. Mid-infrared spectra are recorded from 650-4000 cm^{-1} . From 20 stool samples (range: 16-144 g/kg wet weight) the fat contents were analyzed with GC as a secondary reference method. From these 20 samples a FTIR spectrum was recorded. Partial Least Squares (PLS) regression was used

for calibration. For this calibration a spectral region from 650-1800 cm^{-1} was used. To prevent overoptimistic calibration results, cross validation was used, taking out every calibration sample once and predicting this on the remaining 19 calibration samples. The regression equation of the cross validation samples had a slope of 1.009 and an intercept of 1.193. The correlation coefficient was 0.9556. The root mean square error of prediction (RMSEP) was 9.989 g/kg. From the results of these 20 stool samples we conclude that this method gives very promising results. The FTIR method is very fast and easy to perform. A maximum error of 20 g/kg ($2 * 9.989$ RMSEP) seems to be sufficient for clinical practice. However, a more extensive study with more calibration and independent validation samples is needed to implement such a FTIR method, instead of the presently used Van de Kamer method.

In cooperation with the AZN and AZU.

4. Effects of malnutrition on erythrocyte fatty acids of Pakistani children

E.N. SMIT¹, R.R. BAKKER¹, J.M. DIJKSTRA¹, T.A. SCHNATER¹, F.A.J. MUSKIET² and E.R. BOERSMA¹

Department of Obstetrics and Gynecology¹ and Central Laboratory for Clinical Chemistry², University and University Hospital, Groningen

In the Punjab area in Pakistan, 5% of infant mortality is caused by malnutrition and diarrhea, and only 46% of the children is, according to WHO standards, adequately nourished. Lipid metabolism is disturbed in malnutrition. Malnourished children may have reduced dietary intake, and poor digestion and absorption of lipids, which could cause essential fatty acid (EFA) deficiency. In addition, changes in the hepatic chain elongation and desaturation enzyme systems may lead to shortage of long chain polyunsaturated fatty acids. We investigated the EFA status of 47 grade 2 and 21 grade 3 malnourished Pakistani children (ages 4-56 months). Erythrocyte fatty acids were determined as their methyl esters by capillary gas chromatography. Data were compared with those of 26 age and sex matched apparently healthy controls and evaluated

with three statistical approaches (i.e. Mann Whitney-U test, stepwise logistic regression and odds-ratios). Taken together they revealed that both grade 2 and grade 3 malnourished children had decreased erythrocyte $\omega 6$ fatty acids and to a lesser extent decreased $\omega 3$ fatty acids. These decreases were compensated for by increased $\omega 9$ fatty acids. We conclude that malnourished Pakistani children have low EFA status, notably those of the $\omega 6$ series. It may be related to low dietary intake of fats and EFAs. The combination of low erythrocyte 22:6 $\omega 3$ and a low 22:5 $\omega 6$ /22:4 $\omega 6$ ratio in grade 2 patients suggests low $\Delta 4$ -desaturation activity, which may be due to impaired peroxisomal β -oxidation, since no changes in parameters of $\Delta 6$ -desaturation and elongation were found.

5. Apolipoprotein E genotype distribution and its relation with plasma lipid indices in consecutive Trinidadian newborns of African and Indian descent

D.A.J. BROUWER¹, D.D. RAMDATH², H. MULDER¹, B. FOKKENS¹, S. RAMSEWAK³ and F.A.J. MUSKIET¹

Central Laboratory for Clinical Chemistry, Groningen University Hospital¹; University of the West Indies, Faculty of Medical Sciences, Biochemistry Unit, PreClinical Department² (Trinidad & Tobago); University of the West Indies, Faculty of Medical Sciences, Obstetrics & Gynaecology, Dept of Medical Specialities³ (Trinidad & Tobago)

Trinidadians of East Indian and African ancestry have different CAD incidences, which remain largely unexplained. We therefore determined apolipoprotein-E (apo-E) genotypes, and umbilical plasma cholesterol, triglycerides, apo-A I, apo-B and lipoprotein (a) [Lp (a)] in 294 consecutive newborns in Trinidad. Samples of 234 Curaçao newborns were included to compare apo-E genotype distributions and plasma lipid indices. We calculated the apo-B/apo-A I ratio and an adapted 'lipid tetrad index' (i.e. cholesterol*triglycerides*Lp (a)/apo-A I). Apo-E genotype distributions of Trinidadians of African (allele frequencies: apo-e2:e3:e4 = 10.4:66.4:23.2 %) and Indian (e2:e3:e4 = 3.5:83.1:13.4 %) descent were different ($p < 0.001$). The Mixed group had apo-E genotype frequencies in between those of the Indian and the African population (e2:e3:e4 = 7:76:17 %). Umbilical plasma lipid indices of Trinidadian appropriate for gestational age and term newborns

of African and Indian descent were comparable, except for lower Lp (a) (Indians: 29 ± 4 , Africans 46 ± 5 mg/l; $p = 0.0004$) and adapted lipid tetrad index in Indians (Indians 29.4 ± 4.8 , Africans 41.9 ± 5.4 ; $p = 0.02$). Correlations between apo-E genotypes and umbilical lipid indices revealed an apo-B increasing effect of apo-E4 and an apo-B decreasing effect of apo-E2 in both Trinidadian African ($R = 0.192$, $p = 0.003$) and Curaçao ($R = 0.212$, $p = 0.006$) newborns. Apo-E polymorphism in Trinidadian and Curaçao newborns of African descent exerts similar effects on plasma lipoprotein metabolism as previously established for Caucasians. Apo-E polymorphism may especially contribute to coronary artery disease risk in Trinidadian Africans, but not in Trinidadian Indians. We conclude that apo-E polymorphism and umbilical plasma lipid indices do not explain the high coronary artery disease risk of Trinidadian Indians.

6. Erythrocyte fatty acids of malnourished Pakistani children: Influence of breastmilk composition and effect of fish oil supplementation

E.N. SMIT¹, R.R. BAKKER¹, E. OELEN¹, E. SEERAT², F.A.J. MUSKIET³ and E.R. BOERSMA¹

Department of Obstetrics and Gynecology¹, Federal Government Services Hospital, Department of Pediatrics, Nutrition Rehabilitation Center², Islamabad (Pakistan), and Central Laboratory for Clinical Chemistry, University and University Hospital³, Groningen

We determined fatty acids in mature milk of 10 North Pakistani mothers of malnourished children. During nutritional rehabilitation of the malnourished children we also investigated the effect of fish oil (FO) supplementation on their long chain polyunsaturated fatty acid- ω 3 (LCPUFA ω 3) status. Ten children (ages 8-30 months) received 500 mg FO (305 mg LCPUFA ω 3) daily during 9 weeks. Seven FO-unsupplemented children served as controls. Erythrocytes (RBC) were isolated at baseline and at the study end. Fatty acids were determined by capillary gas chromatography. The breastmilk

contained low percentages of α -linolenic acid and LCP-UFA ω 3, compared with data of 25 Dutch mothers. FO-supplementation of the children augmented their RBC LCPUFA ω 3. We conclude that the marginal LCPUFA ω 3 status of the mother is an important cause of the low neonatal LCPUFA ω 3 status. FO-supplementation of the children may have favourable effects on their central nervous system development. In terms of prevention, FO-supplementation of the mother during both pregnancy and lactation seems, however, a more efficient approach.

7. Influence of the number of kringle IV repeats in apolipoprotein (a) on Lipoprotein (a) quantification by four commercial available assays

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

Department of Clinical Chemistry, University Hospital Utrecht

Lipoprotein (a) [Lp(a)] levels may vary among individuals from less than 1 mg/l to over 1000 mg/l and a Lp(a) level in the upper quartile of the population represents an independent risk factor for the development of atherosclerosis. In this study plasma obtained from 201 healthy Caucasian subjects was used to determine the pathological threshold of four commercially available assays. In addition the influence of the apo(a) isoform size (determined by SDS-agarose gel electrophoresis) on the obtained Lp(a) concentration was considered. The applied assays were the Apo-Tek (Organon Teknika), Innotest (Innogenetics), Vidas (BioMerieux) and N-Latex (Behring) Lp(a) assay. The assays differ in method, antibodies used, degree of automation and suitability for large as well as small analytical series.

With linear regression analysis satisfactory correlations were

observed (R 0.943 - 0.981; Spearman test) for all assays. However, the Lp(a) concentrations obtained in the Apo-Tek assay differ significantly from those obtained in the Innotest and N-Latex assays ($p < 0.001$; t-test Bonferroni corrected). This results in assay dependent pathological threshold values ranging from 166 - 241 mg/l. The instruction leaflets of all four assays suggest a threshold of 300 mg/l. In an earlier study at our laboratory the Apo-Tek assay demonstrated to detect all apo(a) isoforms on an equivalent molar basis and this assay was used to evaluate the influence of the isoform size in the other three assays. For the N-Latex assay a significant underestimation of apo(a) isoforms with up to 22 kringle IV repeats was observed, while the Vidas assay demonstrated an underestimation of apo(a) isoforms with 10 kringle IV repeats.

8. High performance gel chromatography (HPGC) for the analysis of lipoprotein associated endotoxin

J.H.M. LEVELS, P.R. ABRAHAM¹, S.J.H. van DEVENTER¹ and A. van den ENDE

Dept. of Hemostasis, Thrombosis, Atherosclerosis and Inflammation; Dept. Experimental Internal Medicine¹, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

Endotoxin or lipopolysaccharide (LPS), a major component of the gram-negative bacterial cell wall, is responsible for the pathophysiological symptoms such as fever, disseminated intravascular coagulation and cardiovascular shock following infection. Since endotoxin in the circulation is primarily associated with all of the lipoprotein (LP) classes: Chylomicrons, VLDL, LDL and HDL, it has been proposed that this complexation may be part of a humoral LPS detoxification system. Despite numerous studies, the mechanism of interaction between endotoxin and LP's, as well as the biological role and consequence of this interaction remain poorly understood and controversial. Previous studies which employed differential centrifugation for the analysis of the distribution of ¹²⁵I-labeled LPS among LP classes showed that LDL had the highest apparent capacity for endotoxin. In view of the serious limitations of this technique for the separation of intact LP's, we have re-examined the LP distribution and saturation kinetics of fluorescently labeled LPS with the use of high performance gel permeation chromatography. BODIPY or

NBD labeled LPS (E. coli 0111:B4 or J5) in the concentration range of 5 to 35 mg/ml was added to heparinized or citrated whole blood from healthy volunteers, incubated for up to 1h at 37°C and the fluorescence distribution and concentration of the LP classes determined by separation on a Superose 6 HR 10/30 column with on-line fluorescence and post-column cholesterol detection, respectively. Results showed that 52% of both types of added LPS was associated with HDL, 30% with LDL, 12% with VLDL and 6% with the plasma protein fraction. Saturation analysis showed that the binding capacity of LP's for 0111:B4 LPS is in excess of 50 mg/ml whole blood and 200 mg LPS/ml for J5 LPS. A time-course analysis showed that binding of LPS to LP's is essentially complete within 10 min and that a redistribution of LPS occurs during the subsequent 50 min incubation. We conclude that HDL has the highest binding capacity for endotoxin, the saturation capacity of LP's far exceeds the LPS concentrations seen in clinical situations and that binding of LPS to LP's is a reversible process.

9. Leukocyturie bij hoge amylase in urine

O. BEKERS¹, M.H.L. CHRISTIAANS², J.P. van HOOFF² en M.P. van DIEIJEN-VISSER¹
Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Afdeling Nefrologie², Academisch Ziekenhuis Maastricht

Medio 1997 hebben wij, om het aantal microscopische urine-sedimentonderzoekingen te verminderen, de 'sediment-screening' ingevoerd. Dit betekent dat leukocyten en erythrocyten uitsluitend met een teststrook en niet meer microscopisch beoordeeld worden. Het microscopisch sediment is alleen nog geïndiceerd bij onderzoek naar aanwezigheid van cilinders, kristallen, epitheelcellen of slijmdraden. De screening wordt uitgevoerd op een Clinitek[®] Atlas[®] (Bayer BV, Mijdrecht, Nederland) met de Multistix 9 (Bayer BV).

Na de introductie van deze werkwijze viel het de nefrologen van ons ziekenhuis op dat patiënten die een pancreastransplantatie hadden ondergaan altijd leukocyturie hadden. Dit was voor de introductie van de screening niet het geval. Er zijn twee redenen waardoor dit veroorzaakt zou kunnen worden: de hoge pH of de hoge amylase in de urine. Experimenteel bleek dat de pH in het gebied van 5 tot 8.5 geen invloed had op de leukocyten uitslag, echter de leukocyten uitslag werd hoger bij toenemende amylase activiteit. In de tabel staat een voorbeeld vermeld, het betreft hier een urine van een patiënt met een negatieve leukocyten uitslag waaraan in toenemende mate amylase is gevoegd:

Amylase uitslag (U/l)	leukocyten (cellen/µl)
0	negatief
1312	negatief
2229	15
5204	70
13317	125
26259	125

Conclusie: De leukocyten in urine worden met de Clinitek[®] Atlas[®] bepaald met behulp van een teststrip. Het bepaling-principe is gebaseerd op de leukocyten-esterase activiteit. De constatering dat een hoge amylase activiteit leidt tot een vals verhoogde leukocyten uitslag doet vermoeden dat er mogelijk kruisreactiviteit optreedt. Momenteel doen wij hier nader onderzoek naar. Het is in ieder geval van belang bij patiënten na een pancreastransplantatie of met een pancreatitis rekening te houden met vals verhoogde leukocyten in urine uitslag, er dient dan in geval van twijfel een microscopisch sediment te worden verricht.

10. Comparative values of fecal elastase-1 concentrations and urine PABA/PAS ratios for the evaluation of exocrine pancreatic function

C. POSTMA¹, D.M. van den BOOMGAARD², J.J. NICOLAI² and A.J.P.F. LOMBARTS¹
Departments of Clinical Chemistry¹ and Gastroenterology², Leyenburg Hospital, The Hague, The Netherlands

Pancreatic function tests allow to assess the severity of exocrine pancreatic malfunction. Direct function tests are cumbersome, expensive and rather uncomfortable to the patient. The same holds true for the fecal fatty acid test.

The simultaneous oral administration of para-aminosalicylic acid (PAS) and Bentriomide-para-aminobenzoic acid (BT-PABA) to the patient and subsequent (HPLC)-assays of PAS and PABA, allow for appropriate interpretation of the PABA/PAS ratio as an indication for exocrine (chymotrypsin) pancreatic function. However, disadvantages to the method are:

1. The administration of BT-PABA is compromised, as it is no longer an officially registered drug.
2. The procedure and the assay are time-consuming and hence expensive.

Quite recently, a relatively inexpensive immunoreactive elastase-1 test in spot stools was recommended as a somewhat less cumbersome, accurate, non-invasive and patient friendly test for exocrine pancreatic function. Moreover, elastase-1 is

pancreas specific and highly stable along the intestinal tract and during storage in the laboratory. Furthermore, it is hardly influenced by extra pancreatic disorders or therapy with exogenous enzymes.

In this study we compared the diagnostic values of the two tests for pancreatic function in some 40 patients. In general, there is a good agreement between the tests. The discrepancies will be discussed.

References

1. Stein J, Jung M, Sziegoleit A, Zeuzem St, Caspary WF, Lembecke B. Immunoreactive Elastase-1 clinical evaluation of a new non-invasive test of pancreatic function. *Clin Chem* 1996; 42: 222-226.
2. Löser C, Möllgaard A, Fölsch UR. Faecal elastase I; a novel, highly sensitive, and specific tubeless pancreatic function test. *Gut* 1996; 39: 580-586.
3. Stein J, Caspary WF. Fecal tests in the Diagnosis of Exocrine Pancreatic Insufficiency. *Clin Lab* 1997; 43: 361-368.

11. Multicenter harmonization of common enzyme results by fresh patient-pool sera

P.F.H. FRANCK¹, G. STEEN², A.J.P.F. LOMBARTS¹, J.H.M. SOUVERIJN³ and R.K.A. van WERMESKERKEN⁴
Leyenburg Hospital¹, The Hague, Rijnland Hospital², Leiderdorp, Leiden University Hospital³ Leiden, Bronovo Hospital⁴, The Hague

A region consisting of 19 clinical laboratories harmonized their calibration of seven common enzymes by using fresh patient-pool sera. Before harmonization the interlaboratory CVs varied from 16.9 % to 61.6 %. After harmonization CVs decreased to between 5.0 % and 9.5 %. These results proved to be reproducible over a period of more than two years. Using internationally accepted inaccuracy and imprecision criteria (EGE-lab), the achieved interlaboratory CVs permit the use of one set of reference ranges by all participating laboratories.

After harmonization the commutability of sera in use for quality control (CRM, SKZL, Liquid control sera of Bio-Rad and Ortho) was studied. The Certified Reference Materials (CRM) showed interlaboratory CVs as low as those achieved with patient-pool sera. These materials can act as commutable reference preparations, except for creatine kinase. In general, the SKZL (Combi scheme 95.3) and both liquid control sera studied, are not commutable to patient sera.

We conclude that the calibration of enzymes can be harmo-

nized by making use of patient-pool sera. Even the analysis of α -amylase, carried out with a great variety of methods, could be harmonized. The same holds true for dry chemistry methodology, which is particularly sensitive to matrix effects.

The results confirm our opinion, that the lack of good calibration standards rather than differences in methodology is the major reason for discrepancies in the measurements of enzymes.

12. Commercially available enzyme calibrators, an overview

B.E.P.B. BALLIEUX¹, S.C. ENDENBURG², Y.Y. van der HOEK³, Y.B. de RIJKE⁴, A. WOLTHUIS⁵ and C. van der HEIDEN⁶
Working group of the Enzyme Committee of the Netherlands Society for Clinical Chemistry. University Hospital Rotterdam¹, Twenteborg Hospital, Almelo², Sint Antonius Hospital, Nieuwegein³, Bosch Medicenter, Den Bosch⁴, De Wever/Gregorius Hospital, Heerlen⁵, BCO Analytical Services B.V., Breda⁶

The role of enzyme calibrators in the reduction of interlaboratory variation of enzyme activity measurements has recently gained more interest. The properties of such a calibrator have been defined and include commutability with patient sera over the various methods, stability over a prolonged period and traceability of the target values to reference methods. Generally, calibration sera and control sera consist of a pool of human serum spiked with purified enzymes of either human or animal origin. Information on the exact composition of such sera is usually not provided. In our view such information, including the source and purity of the added enzymes, the degree of commutability of the enzymes with human serum enzymes and the exact procedures of target value assessment, should be available to the customer.

In this article we have summarized the information that was provided upon request by the manufacturers of enzyme cali-

brators and control sera with assigned values (CSAV) on the composition of the sera and the procedures of target value assessment. Only three commercially available sera are intended to be used as calibrators. One of them fulfils almost all criteria, while the others are not yet available on a large scale or lack information on the traceability of the target values. The second calibrator contains only human enzymes partly derived from cell-cultures.

Generally, information on the composition of CSAV was also available, but with one exception target values were not traceable to reference methods and no information on the commutability with human sera was available.

Several manufacturers are now working on the production of calibration sera containing only human enzymes. The need for commutability and the value of all-human enzyme calibrators is further discussed.

Eiwitten

13. Plasma-expanders kunnen storen bij de bepaling van eiwit in urine

M.H. de KEIJZER en I.S. KLASSEN

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, AZN St Radboud, Nijmegen

Recent werden wij geconfronteerd met een patiënt in wiens urine elders een verhoogde hoeveelheid eiwit was gemeten. De organen van de patiënt zouden gedoneerd worden. Na enig spuurwerk werd duidelijk dat de geïnfundeerde plasma-expander de hyperproteïnurische urine veroorzaakte. Wij hebben daarop onderzoek gedaan naar de verschillende plasma-expanders in relatie tot verschillende bepalingsmethoden voor eiwit in urine. Onderzocht zijn Gelofusine[®] (een gemodificeerde gelatine), Haemaccel[®] (een polypeptide met ureum crosslinks) en EloHAES[®] (plantaardig zetmeel gelijkend op glycogeen), alle drie in een concentratie van 5 g/l in urine. Voor de bepaling van eiwit in urine is gebruik gemaakt van de Coomassie Brilliant Blue (CBB) methode, de Pyrogallol Rood Molybdaat (PRM) methode met en zonder toevoeging van natrium dodecylsulfate (SDS), de Ponceau-S (PON-S) methode, de biureet (BIU) methode en de trichloorazijnzuur (TCA) en benzethonium (BENZ) troebelingsmethodes.

Uit de tabel valt af te leiden dat er verschillen in zowel het soort plasma-expander als in de bepalingsmethode bestaan. Het plant-

aardige zetmeel EloHaes[®] blijkt bij geen enkele methode als eiwit meegemeten te worden; dit in tegenstelling tot Gelofusine[®] en Haemaccel[®], dat met de methodes gebaseerd op kleurontwikkeling tot positieve resultaten leidt. Een uitzondering hierop is de CBB methode. De beide eiwitbepalingen gebaseerd op een troebelingsreactie meten geen plasma-expanders.

De vraag blijft of een bepalingsmethode wel of niet plasma-expanders als eiwit moet meten. In het onderhavige geval waren bijna twee goed-functionerende nieren niet ter donatie aangeboden. Anderzijds is in geval van Gelofusine[®] en Haemaccel[®] wel degelijk sprake van eiwitachtige verbindingen, zodat meting hiervan in urine niet als foutief beschouwd kan worden.

Concluderend: bij de bepaling van eiwit in urine kunnen geïnfundeerde plasma-expanders storen. Kennis van de gebruikte bepalingsmethode voorkomt foutieve interpretatie van de gemeten proteinurie. Een alternatieve methode voor het bepalen van eiwit in urine kan dan uitsluitend bieden.

Eiwitbepaling in urine (concentratie in g/l)

	TCA	PRM	PRM/SDS	PON-S	BENZ	CBB	BIU
Urine met:							
Gelofusine [®]	NTD	3,9	3,1	NTD	NTD	NTD	4,7
Haemaccel [®]	NTD	3,8	3,3	NTD	NTD	NTD	4,7
EloHAES [®]	NTD	NTD	NTD	NTD	NTD	NTD	NTD

NTD: niet te detecteren

14. Determination of monoclonal IgD by means of ELISA, agarose gel electrophoresis and capillary electrophoresis

J. BROUWER and J. de WINTER

Department of Clinical Chemistry, Diagnostic Centre SSDZ, Delft

The single most important abnormality that is disclosed by serum protein electrophoresis is that of a monoclonal gammopathy. Scanning densitometry provides an acceptable means of quantitating monoclonal Ig and is unaffected by the antigenicity of the protein. In practice this is only a problem when a minor monoclonal Ig is superimposed on an appreciable background of polyclonal Ig. Analyses of sera with monoclonal IgD offer the opportunity to study the contribution of polyclonal Ig to the protein concentration in the monoclonal peak after electrophoretic separation. The actual concentration of a minor monoclonal IgD component can be measured by means of an ELISA for IgD, because in that assay the presence of other Ig classes does not affect the results.

We analysed 14 sera from 3 patients with IgD myeloma by means of ELISA, agarose gel electrophoresis (AGE) and capillary electrophoresis (CE). After CE, results were calcu-

lated from peak area percent (CE 1) and from corrected peak area percent (CE 2). IgD concentrations in the sera varied between 2.2 and 14.4 g/l, as measured by ELISA. Polyclonal Ig was between 6 and 8 g/l.

Differences between the methods were assessed by means of the 95% CI for the mean differences, showing that IgD (CE 2) > IgD (ELISA) = IgD (AGE) = IgD (CE 1).

The difference between IgD (CE 2) and IgD (CE 1) is determined to a large extent by the difference for albumin (ALB) in CE 1 and CE 2: ALB (CE 1) = ALB (CE 2) + 4.0.

ALB was also determined on a Paramax analyser (PMX) and a Behring nephelometer analyser (BNA). Correlations were ALB (CE 1) > ALB (PMX) > ALB (BNA) = ALB (CE 2).

For the concentrations of minor IgD components (< 3 g/l) it was found that IgD (CE 2) = IgD (AGE) > IgD (CE 1) > IgD (ELISA).

15. A comparison of ELISA assays as routine diagnostic test for detection of autoantibodies against extractable nuclear antigens

J.L.P. van DUIJNHOFEN¹, F.J.M. van de WARENBURG¹, A.J.W.P. WILLEMS¹ and A.A.M. ERMENS²

Clinical Laboratory¹, Elkerliek Hospital, Helmond, The Netherlands and Clinical Laboratory², Diaconessenhuis, Eindhoven, The Netherlands

In an analytical evaluation, commercially available ELISA test kits for detection of antibodies directed against extractable nuclear antigens (ENA) were compared with a combination of counterimmunoelectrophoresis and immunoblotting. Three screening ELISAs (Relisa®ENA (Immunoconcepts, Bio-Medical Diagnostics, Brugge, Belgium (BMD)); ENA-LISAÔ Polyvalent (BMD) and Milenia ENA screen (Diagnostic Product Corporation Nederland bv, Apeldoorn, The Netherlands (DPC))) and two typing ELISAs (ENA-LISAÔ (BMD) and Milenia ENA combi (DPC) were tested. Sera from 180 antinuclear antigens positive patients were evaluated for the presence of antibodies directed against SS-A, SS-B, Sm and RNP. Besides samples with CIE/IB proven ENA antibodies, samples with negative ENA results were included to check for cross-reactivity and purity. Additionally, 14 samples from patients suspected for scleroderma were selected for Scl-70 antibody detection. Finally, 5 Jo-1-positive and 6 Jo-1-negative samples were included in the study. All ELISAs were fairly simple, easy to perform and very "user friendly", since most of the reagents were ready to use. The agreement with the current methods was good, but the screening as well as typing ELISAs proved to be more sensitive, especially with regard to detection of SS-A auto-antibodies. The Relisa®ENA showed a rather poor agreement and specificity, especially in case borderline reactivity was considered positive and selected for typing. The cut-off range of this assay was not well established. The DPC Milenia ENA combi ELISA method is designed for screening and typing, since the first two wells of the microtiter-strip should contain an ENA-mix. This was clearly not the case, since only Sm antibodies could be detected. This kit also suffered from problems of purity of antigen and standardisation of reactivity between lots (possibly caused by differences in amount of coated antigen). The other three ELISAs were reliable and sensitive assays for detection of ENA auto-antibodies in clinical specimens, without substantial false negatives. However, the clinical value of enhanced sensitivity and specificity needs to be assessed in a clinical management study.

Sensitivity and specificity (%) with confidence intervals in comparison to CIE/IB

A. screening assays

	Sensitivity		Specificity	
Relisa®ENA	100		86	(80-92)
ENA-LISAÔ polyvalent:	91	(87-95)	96	(93-99)
Milenia ENA screen	100		90	(86-94)

B. typing assays

	Sensitivity		Specificity	
ENA-LISAÔ:				
SS-A	100		79	(70- 88)
SS-B	100		97	(93-100)
RNP	69	(59-79)	99	(97-100)
Sm	71	(61-81)	100	
Scl-70	86	(78-94)	86	(80- 92)
Jo-1	100		83	(61-100)
Milenia ENA combi:				
SS-A	100		80	(71- 89)
SS-B	100		89	(82- 96)
RNP	46	(35-57)	94	(89- 99)
Sm	100		67	(57- 77)
Scl-70	100		76	(69- 84)
Jo-1	100		80	(55-100)

16. Method for the detection of Bence Jones proteins by capillary electrophoresis

Y.M.C. HENSKENS and G.A.E. PONJEE

Laboratory for Clinical Chemistry and Hematology, Diagnostic Centre SSDZ, Reinier de Graaf Groep, Delft

The technique of capillary electrophoresis (CE) is based on separating molecules on molecular size, electric charge and hydrophobicity. Our laboratory already described CE as a useful and rapid alternative for conventional agarose gel electrophoresis (AGE) in detecting and identifying monoclonal gammopathies (NVKC 1997, 22:117). Detection of fragments of monoclonal immunoglobulins in urine, Bence Jones proteins, by CE has not been reported yet. Therefore, the aim of this study was to develop a CE method to detect Bence Jones proteins. The major problem that could be expected by analysis of urine for protein detection on CE is the interference of other urinary components as electrolytes, organic acids and other metabolites. The standard method for detection and quantitation of Bence Jones proteins in our laboratory is AGE using home-made gels (after urine concentration, 200 times), coomassie brilliant blue staining and densitometric scanning. The CE analysis was performed on a Beckman P/ACE system 5000 using UV detection and untreated fused-silica capillaries (27 cm, 50 μ m ID). First, ten urine samples of healthy subjects were concentrated 200 times and analysed on CE using boric acid running buffer (150 mM, pH 9.65). All

the normal urine samples showed different electropherograms on CE which was probably caused by a different salt concentration in each sample. Therefore we developed a rapid and easy method to desalt these urine samples using equilibrated sephadex G-25 beads in a 1 ml syringe which was centrifugated (1.5 min., 1500 rpm) after the concentrated urine sample was added on top. The desalted normal urine samples were collected and injected on CE. CE electropherograms of desalted normal urine samples showed no spikes. Next, ten different samples of urine which contained Bence Jones proteins according to our standard method (kappa or lambda light chains in high or low concentrations) were analysed by CE after concentration (200 times) and desalting. In all these samples the Bence Jones proteins were clearly visible in the gamma region (large or small spikes) of the CE electropherogram. We conclude that CE can be used, next to the detection of serum paraproteins, for detection of Bence Jones proteins. Future studies will focus on the quantitation of Bence Jones proteins using CE and the identification of the light chains (lambda or kappa) using immunosubtraction capillary electrophoresis.

Elektrolyten

17. Serum magnesium during pre-eclampsia and uncomplicated pregnancy

R. SANDERS¹, A. KONIJNENBERG², H.J. HUIJGEN¹ and G.T. SANDERS¹

Academic Medical Center, University of Amsterdam, Department of Clinical Chemistry¹ and Gynecology and Obstetrics², Amsterdam, The Netherlands

Objective: In order to evaluate a relation between magnesium (Mg) and calcium (Ca) concentrations and the occurrence of pre-eclampsia we measured Mg and Ca in women with pre-eclampsia (PE), uncomplicated pregnancy and non-pregnant women.

Introduction: PE occurs during the last part of the pregnancy and is the most important cause for maternal mortality and morbidity in Europe. The main expression of PE is a diastolic blood pressure of at least 90 mm Hg; most probably caused by a dysfunctional endothelium.

Mg and Ca are both cations involved in the regulation of blood pressure. Therefore a change in Mg or Ca concentrations could affect the blood pressure during PE, resulting in vasoconstriction and thus hypertension.

Subjects: Total and ionized serum Mg, ionized serum Ca, total and ionized intracellular Mg concentrations were measured in non-pregnant women (n=24), women with severe PE (n=15) and uncomplicated pregnancy (n=34).

Main outcome: Ionized Ca was similar in women with PE or

uncomplicated pregnancy and non-pregnant women, while both ionized and total Mg decrease during pregnancy. However, elevated total and ionized serum Mg concentrations were found in women with PE compared with uncomplicated pregnant women (total Mg=0.85 vs. 0.72 mmol/l, p=0.02; ionized Mg=0.61 vs. 0.53 mmol/l, p=0.04). In addition, it could be demonstrated that the ionized serum Mg level was related to birth weight and gestational age at delivery. The total Mg concentration was similar in women with PE and non-pregnant women (p=0.24).

Furthermore, intracellular Mg concentrations in mononuclear blood cells (ionized and total Mg) and erythrocytes (total Mg) were identical in women with PE and uncomplicated pregnancy.

Conclusions: Serum Mg concentrations are elevated in women with severe pre-eclampsia compared with uncomplicated pregnant women. A causative relation is hypothesized since Mg is involved in blood pressure regulation through an intracellular process in endothelial cells.

18. Comparison of Three Commercially Available Ion-Selective Electrodes for Ionized Magnesium Determination in Serum: a Two-Center Study

H.J. HUIJGEN¹, R. SANDERS¹, S.A. CECCO², N.N. REHAK², G.T.B. SANDERS¹ and R.J. ELIN³

Department of Clinical Chemistry, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands¹, Clinical Chemistry Service, Clinical Pathology Department, National Institutes of Health, Bethesda, USA², Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Louisville, Louisville, USA³.

In a two-center study we compared all three currently available magnesium ion-selective electrodes (Mg-ISE): AVL 988/4, KONE Microlyte 6, and NOVA CRT. Serum samples obtained from both healthy volunteers (n=142) and patients

(n=95) were collected and measured at the Academic Medical Center on the AVL and KONE, and at the National Institutes of Health on the NOVA. Each sample collected at the AMC was measured fresh, one aliquot was stored (-20°C) and one

aliquot was shipped to the NIH, and vice versa. The measurements of frozen aliquots were coordinated so that each day the same samples were analyzed by both institutes. Besides comparison of the analyzers, imprecision and reference ranges were established.

In patient samples the best correlation was found between the KONE and AVL analyzers: slope 0,964, intercept -0,01 mmol/l. In samples from healthy volunteers all analyzers reported significantly different ($p < 0,05$) ionized magnesium concentrations (iMg^{2+}). Using pH corrected iMg^{2+} values, KONE and NOVA results in samples from healthy volunteers were not significantly different ($p > 0,05$): slope 1,000, intercept -0,04 mmol/l, $n=88$. Best precision was found using the NOVA analyzer, CV's established at three iMg^{2+} levels (0,21,

0,53, 1,03 mmol/l) were all $< 4,0\%$. CV's for the AVL and KONE analyzers were $< 5,0\%$ at normal and high iMg^{2+} , but 10,7 and 9,4% at $iMg^{2+} \approx 0,30$ mmol/l. All analyzers gave different reference intervals (mean \pm sd): AVL 0,44-0,60, KONE 0,49-0,69, and NOVA 0,35-0,55 mmol/l, respectively.

This study shows that iMg^{2+} measured in sera depends on which Mg-ISE is used. The AVL and KONE correspond relatively well. On the average the NOVA iMg^{2+} results are lower than the AVL or KONE. Results in control sera as well as reference intervals were different for each analyzer. Therefore, we conclude that Mg-ISEs can only be used for patient care if accessory reference intervals are established. We recommend improvement of the technique, research on interference, and standardization of calibrators and control material.

Endocrinologie

19. A new mutation (C1356i) in the thyroid hormone receptor beta gene in a patient with resistance to thyroid hormone

Y.Y. van der HOEK¹, M.W.F. MUL-STEINBUSCH¹ and P.H.T.J. SLEE²

Department of Clinical Chemistry¹ and Internal Medicine², St. Antonius Hospital, Nieuwegein

Generalized thyroid hormone resistance (GTHR) is a syndrome characterized by tissue nonresponsiveness to thyroid hormone and by variable clinical phenotype manifestations. GTHR results from single mutations in the gene encoding the thyroid hormone receptor. These mutations are clustered in two major sites surrounding the ligand binding domain. Up to 80 mutations in this gene have been identified, mostly located in exon 9 and exon 10.

We describe a new mutation in exon 10, which was identified as an insertion of a C at position 1356. This mutation was identified in a 26 year old woman who presented with symptoms and signs suggestive of both hyperthyroidism and hypothyroidism. She had a normal TSH with high T4 and T3 values, which is characteristic for the syndrome of generalized thyroid hormone resistance.

20. Analyse van sex-steroiden: een vergelijkende studie

A. WOLTHUIS, H. JANSSENS, J. ten KATE en L.W.J.J.M. WESTERHUIS

Afdeling klinische chemie. Het Atrium Medisch Centrum, Heerlen (voorheen de Weverziekenhuis)

De geautomatiseerde testosteron, estradiol en progesteron bepalingen op de ACS:180 (Chiron diagnostics) en de AutoDELFLIA (Wallac) werden vergeleken met de manuele DPC RIA bepalingen.

Alle geautomatiseerde assays correleerden goed met de DPC RIA. Echter, hormonale preparaten, in de sera van postmenopausale vrouwen die hormoon vervangende therapie ontvingen, vertoonden kruisreactie in de RIA maar niet in de geautomatiseerde bepalingen. De recoveries van zowel de bepalingen op de ACS:180 als op de AutoDELFLIA waren vergelijkbaar met de RIA.

Monsters verdund met serum of met buffer bleken op beide apparaten in sterke mate lineair. Op beide analysers echter,

bleek de progesteron bepaling gevoelig voor matrix effecten. De intra- en interrun variaties van de assays bleven bij de AutoDELFLIA bij al de drie geteste levels onder de 7% (range:2%-7%). De variatie op de ACS:180 vertoonde een grotere variatie afhankelijk van het geteste level (intra-run: range 3%-12%; inter-run: range 2%-14%).

De conclusie van deze studie moet zijn dat de prestaties van de geautomatiseerde sex-steroïde bepalingen ten minste acceptabel zijn in vergelijking met de DPC RIA. Hoewel de AutoDELFLIA superieur is wat betreft de analytische prestaties, lijkt de ACS:180 als patiënt-geörienteerde analyser meer te passen binnen het concept van laboratorium automatisering en patiënt gekoppelde uitslag profielen.

21. Grote verschillen bij immunochemische bepaling van intact humaan parathyroid hormoon

J. van PELT¹, M.H. VELMANS¹, W. HERMANS², J. FRANCKEN³ en H. JANSSEN⁴

Ziekenhuizen Noord-Limburg, Venlo¹; Maasland Ziekenhuis, Sittard²; Academisch Ziekenhuis, Maastricht³ en De Wever Ziekenhuis, Heerlen⁴

PTH (parathyroid hormoon) is één van de belangrijkste regulatoren van de calcium-homeostase. Na een tweetal proteolytische stappen ontstaat het fysiologisch actieve intacte 1-84 molecuul, met een halfwaardetijd van enkele minuten. Aangenomen wordt dat de meting van dit intacte molecuul de beste parameter is, maar deze wordt helaas bemoeilijkt door het aanwezig zijn van wisselende hoeveelheden heterogene, C-terminale peptiden.

De verschillende gepraktiseerde meetmethoden voor intact PTH gaan uit van hetzelfde sandwich-principe met twee polyclonale antilichamen voor respectievelijk het C- en N-terminale gedeelte. En alhoewel de methoden vrijwel dezelfde referentiewaarden (1,3 - 7,6 pmol/l) kennen, blijken de resultaten bij landelijke en regionale kwaliteitscontroles ongeveer een factor twee uiteen te lopen. Om deze discrepantie nader te onderzoeken, werd een serie van tien sera samengesteld, verrijkt

met een wisselende hoeveelheid toegevoegd intact, humaan PTH (firma; 1-84). Deze series werden gemeten met respectievelijk de N-tact PTH SP kit van Incstar (IRMA; Venlo), de intact PTH kit van Nichols (IRMA; Heerlen en Maastricht) en de Immulite Intact PTH van DPC (FIEMA, Sittard). Alle drie methoden vertoonden goede lineariteit (parallisme), goede reproduceerbaarheid van van duplo's (gemiddeld 1,9%) en prima correlaties met elkaar ($r > 0,99$). Echter de meetwaarden en de recovery's van toegevoegd PTH waren volstrekt niet met elkaar in overeenstemming. Met de methodes van Incstar (tweemaal) en DPC werd respectievelijk 32,0; 44,5; 46,2 en 65,8 pmol/l gevonden in poolserum (gemiddeld gemeten concentratie 2,5 pmol/l met daaraan toegevoegd 31,3 pmol/l).

22. Sensitivity and linearity of hCG assays for nicked hCG: a comparative study

H. E. van INGEN

Department of Clinical Chemistry, AZR Daniel den Hoed Cancer Centre, Rotterdam, The Netherlands

Recent data show that proteolytic cleavage of the β subunit of hCG (nicking) is relevant in both analytical and biological respect. To study the sensitivity and linearity of hCG assays for intact hCG (hCG) and nicked hCG (n-hCG) we performed a comparative study. hCG was obtained from a commercial source; n-hCG was prepared as described by Birken et al (Endocrinology 199; 129: 1551-8). Intact and n-hCG were added separately to pooled human serum samples in identical mass concentrations. Dilutions were made according to the NCCLS EP6 protocol for evaluation of linearity (within the linear range as claimed by the manufacturers) and analysed for hCG with the following assays: IMMULITE One hCG *, IMx total beta hCG *, IMx hCG, MAIAclone hCG *, ACS:180 total hCG +B *, and Elecsys hCG (assays marked with a * measure both intact hCG and free β hCG; unmarked assays measure only intact hCG). Deviations from linearity were not detected for either hCG or n-hCG; all measured concentrations were within plus or minus 5% of the calculated concentrations. The sensitivity of the assays for hCG and n-hCG was

Ook de recovery's van de andere sera vertoonden hetzelfde beeld en gaven gemiddeld 96% (Incstar), 138% (Nichols) en 198% (Immulite, DPC). De oorzaak van de klaarblijkelijk te hoge meting bij Immulite en in iets mindere mate bij Nichols is moeilijk te geven. Aangezien niet-verrijkte LWBA-monsters en het in de regio Limburg gebruikte poolserum hetzelfde beeld vertonen en het toegevoegde PTH intact is en chromatografisch gecontroleerd, lijkt het niet aan de toevoeging te liggen. Ook gezien de lineariteit van de waarnemingen lijkt het eerder een kwestie van onjuiste afijking van standaarden of verkeerde responsfactoren. Hoe dan ook is het onwenselijk als de meting van een relevant hormoon afhankelijk van de gebruikte methode tot een factor twee kan verschillen.

calculated relative to the sensitivity of the IMMULITE One hCG assay for hCG (=100%) and is shown in the table.

Assay	Immulite One hCG	IMx tbhCG	IMx hCG	MAIA clone hCG+ β	ACS:180 total hCG+B	Elecsys hCG
hCG	100	113	79.6	91.6	74.5	87.1
n-hCG	129	55.7	11.7	4.48	12.9	3.1

In a further experiment, samples containing identical concentrations of hCG and n-hCG were distributed in a proficiency scheme for hCG analysis to 98 laboratories in the Netherlands using 15 hCG methods. Results confirmed the results obtained in the internal study: differing sensitivities for hCG and n-hCG are seen, while especially assays measuring intact hCG show a low response to n-hCG. This information is relevant in view of the recent standardisation efforts in the hCG field.

Tumordiagnostiek

23. P53: een nieuwe prognostische marker voor oppervlakkige blaastumoren?

J.M.T. KLEIN GUNNEWIEK¹, J.D. OOSTING¹ en W.W. van SOLINGE²

Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen¹ en Algemeen Christelijk Ziekenhuis Eemland, Amersfoort²

De meeste blaastumoren zijn oppervlakkig als ze ontdekt worden (70-75%) en 85% van deze oppervlakkige tumoren keren weer terug na behandeling. Van deze terugkerende tumoren zal ongeveer 10-15% in de spierlaag ingroeien en uiteindelijk metastaseren (1). Het is daarom zeer belangrijk te weten welke oppervlakkige blaastumoren de potentie hebben te metastaseren. Prognostische markers die tot op heden met name gebruikt worden om deze risicogroep te identificeren zijn het voorkomen van recidieven, het klinische beeld carcinoma in situ (CIS), stadium, graad en grootte van de tumor (2). Onlangs is aangetoond dat mutaties in het p53 gen bij patiënten die behoren tot de risicogroep een positief voorspellende waarde van 86% hebben voor de progressie van de ziekte. Hierbij werden de mutaties voorafgaande aan de progressie aangetroffen. Een negatief voorspellende waarde (geen mutatie en geen progressie) van 63% werd gevonden (3). Het p53 eiwit wordt ook wel de beschermer van ons genoom genoemd. Expressie van p53 vindt normaliter plaats naar aanleiding van DNA schade. Het p53 stagneert de celcyclus om DNA reparatie mogelijk te maken of apoptose (geprogrammeerde celdood) te initiëren (4).

Om de waarde van een p53 mutatiebepaling bij patiënten met oppervlakkige blaastumoren te evalueren worden in drie verschillende ziekenhuizen (Eemland Ziekenhuis, Amersfoort; Academisch Ziekenhuis Nijmegen (prof. dr. J. Schalken); Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen) patiënten getest op aanwezigheid van p53 mutaties. De patiënten zijn geselecteerd op basis van de aanwezigheid van meerdere snel terugkerende pT1 tumoren of een graad 2b/3 tumor of behoren tot de high risk groep in de zogenaamde kwantificatie bepaling (kwantitatieve cytologie gebaseerd op de vorm en de DNA inhoud van de celkern). Voor de mutatiebepaling wordt DNA, geïsoleerd uit blaaswassing en/of tumormateriaal, geamplificeerd met behulp van PCR, geanalyseerd middels SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) gevolgd door sequentie-analyse.

1. Torti M and Lum BL. Cancer 1987; 59: 613.
2. Kiemeny LALM, Witjes JA, Heijbroek RP, Verbeek ALM and Debruyne FMJ. J Urol 1993; 150: 60-64.
3. Vet JAM, Witjes JA, Marras SAE, Hessels D, Poel HG van der, Debruyne FMJ and Schalken JA. Clin Cancer Res 1996; 2: 1055-1061.
4. Lane DP. Nature 1992; 358: 15-16.

24. Trombocyten serotonine gehalte is de meest sensitieve marker voor biochemische diagnose van carcinoïd tumoren

I.P. KEMA¹, W.G. MEIER², P.H.B. WILLEMSE², M. VOLMER¹ en E.G.E. de VRIES¹

Centraal Klinisch Chemisch laboratorium¹ en Afdeling Interne Oncologie², Academisch Ziekenhuis Groningen

Carcinoïd tumoren kunnen, afhankelijk van hun primaire lokalisatie in voor-, midden- of eind-darm, wisselende hoeveelheden serotonine en 5-hydroxytryptofaan (5-HTP) produceren. Naast de productie van indolen, kunnen deze tumoren een verhoogde uitscheiding veroorzaken van andere biogene aminen en peptides. Carcinoïd patiënten worden gewoonlijk biochemisch gediagnosticeerd op basis van een verhoogde uitscheiding van 5-hydroxyindolazijnzuur (5-HIAA) in urine. De gehalten aan serotonine van plaatjes en urine kunnen bijdragen aan deze diagnose.

Wij hebben, in een groep van 92 patiënten met histologisch bewezen carcinoïd tumoren, met als primaire lokalisatie voordarm (n=31), middendarm (n=54) of einddarm (7), de klinische bruikbaarheid geëvalueerd van 5-HIAA in urine en serotonine in urine en trombocyten. Referentiewaarden zijn vastgesteld in 50 in geslacht- en leeftijd overeenkomende gezonde volwassenen. Bij de analyses hebben we gebruik

gemaakt van HPLC met fluormetrische detectie. Uitkomsten van berekening van ROC karakteristieken zijn weergegeven in onderstaande tabel.

	Urine 5-HIAA	Plt. 5-HT	Urine 5-HT
	AUC	AUC	AUC
Voordarm (31)	0,53	0,75	0,68
Middendarm (54)	0,87	0,93	0,84
Einddarm (7)	0,59	0,57	0,86

Plt. 5-HT: plaatjes serotonine; AUC: Area under the curve

Omdat een hoge AUC een hoge diagnostische waarde aangeeft, kan geconcludeerd worden dat voor alle type carcinoïd tumoren plaatjes serotonine een betere marker is dan urine 5-HIAA.

25. Analytical and clinical evaluation of the IMMULITE One monoclonal/monoclonal and monoclonal/polyclonal assays for determination of CA125

P. HOEFKENS¹, H.W.A. de BRUYN² and H.E. van INGEN¹

Department of Clinical Chemistry, AZR Daniel den Hoed Cancer Centre, Rotterdam¹, The Netherlands and Laboratory of Obstetrics and Gynaecology, University Hospital Groningen², The Netherlands

DPC has recently developed a modified version of the IMMULITE One assay for the determination of CA125. The new assay (OMMA-P/M) uses a polyclonal tracer antibody, instead of the monoclonal tracer antibody used in the OMMA-M/M assay. An analytical and clinical evaluation of both assay versions was performed. Within-run and total precision were determined following the NCCLS EP5 guidelines at 3 different concentration levels:

	conc. kU/l	CV % within-run	CV % total
OMMA-M/M	9	7.6	12.9
	53	7.0	7.8
	407	8.2	8.2
OMMA-M/P	10	8.4	14.1
	60	6.5	9.0
	400	7.7	8.8

Linearity (NCCLS EP6) was confirmed up to 500 kU/l for both assays. A high dose hook effect could not be demonstrated for concentrations up to 35000 kU/l. Both assays were

free from interference from hemoglobin (up to 196 Fmol/l), bilirubin (up to 519 Fmol/l) or an artificial triglyceride solution (up to 12.7 mmol/l). Reference values were measured in 100, apparently healthy female blood-donors. For the OMMA-M/M assay results ranged from 1.1-25.6 kU/l and 0.5-13.3 kU/l for women under 40 years (n=50) and over 50 years (n=50) of age respectively.

For the OMMA-M/P results were respectively 0.5-26.6 kU/l and 0.5-6.5 kU/l.

Method comparisons (in the range 0-500 kU/l) between the laboratories reference method (CIS ELSA IRMA, using OC125/M11 antibodies), DPC OMMA-M/M and OMMA-P/M resulted in the following Bablok-Passing regression equations: OMMA-M/M=0.74 CIS ELSA - 7.1, r=0.934, n=185; OMMA-P/M=0.66 CIS ELSA - 3.0, r=0.963, n=185; OMMA-P/M=0.90 OMMA-M/M +3.5, r=0.972, n=185. By analysing samples from women with benign gynaecological diseases, patients with ovarian carcinoma, and patients with other malignancies it was shown that the OMMA-M/M and OMMA-P/M are comparable in clinical performance. Although in some samples from individual patients being treated for ovarian carcinoma minor discrepancies were detected between OMMA-M/M and OMMA-P/M, in general both methods are comparable and can be used in the diagnosis and follow-up of ovarian carcinoma.

26. Detection of tumour DNA in serum of colorectal cancer patients

J.B. de KOK¹, W.W. van SOLINGE^{1,4}, T.J.M. RUERS², R.W.H.M. ROELOFS¹, G.N.P. van MUIJEN³, J.L. WILLEMS¹ en D.W. SWINKELS¹

Depts. of Clin. Chemistry¹, Surgery² and Pathology³, University Hospital Nijmegen, Dept. of Clin. Chemistry⁴, Eemland Hospital, Amersfoort

Circulating tumour DNA has previously been detected in serum and plasma of patients with lung cancer and head and neck cancer. These observations could potentially lead to new, specific and non-invasive tools for diagnosis, prognosis and follow-up in neoplastic disease, if found to be a more general

phenomenon. To test if tumour DNA is also present in serum of patients with colorectal cancer, we selected fourteen colorectal cancer patients with advanced disease. Analyses were based on the detection of mutations of the K-ras gene in serum by mutant allele specific amplification (MASA).

In seven patients, K-ras mutations were detected in the primary tumour, using MASA primers for point mutations in codon 12 or 13 of the K-ras gene. All 14 patients were analysed for mutant DNA in serum. K-ras mutations were detected in serum of six patients, all corresponding to the mutations found in the primary tumour. No mutant K-ras could be detected in serum of one patient with a mutation in the primary tumour and in all seven patients without K-ras mutations in the primary tumour.

At present, these results may be useful in assessing tumour burden in patients with neoplastic disease. Moreover, the results encourage further investigations to determine whether circulating tumour DNA is present in early stages of neoplastic disease or may prove to be a reliable indicator of systemic disease at the time of surgery for the colorectal primary tumour.

Hematologie

27. Elevated plasma homocysteine indicates suboptimal folate status in pediatric sickle cell patients

F.P.L. van der DIJS¹, J.J.B. SCHNOG^{2,3}, D.A.J. BROUWER⁴, H.J.R. VELVIS¹, G.A. van den BERG⁵, A.J. BAKKER⁵, A.J. DUITZ³, F.D. MUSKIET⁶ and F.A.J. MUSKIET²

Departement of Clinical Chemistry and Hematology, Public Health Laboratory, Curaçao¹; Departement of Internal Medicine, St. Elisabeth Hospital, Curaçao²; Red Cross Bloodbank, Curaçao³; Central Laboratory for Clinical Chemistry, University Hospital Groningen⁴; Departement of Clinical Chemistry, Clinical Chemical Laboratories, Leeuwarden⁵; Departement of Pediatrics, St. Elisabeth Hospital, Curaçao⁶

We investigated whether pediatric patients with sickle cell disease (9±4 years; 27 HbSS; 19 HbSC) have different folate status compared with age, sex and race matched HbAA controls (n=20), and whether their folate status can be improved by folate supplementation. The patients were supplemented with vitamins B6 and B12 during one week and with folate during the next week. Circulating folate, homocysteine, vitamin B6 and vitamin B12 levels were measured at baseline (patients and controls), after 1 and after 2 weeks (patients). The patients had similar folate, vitamin B6 and vitamin B12,

but higher homocysteine levels, compared with HbAA controls (12.7±4.5 vs 10.9±3.5 mmol/l; p=0.04). Vitamin B6 and B12 supplementation did not change their homocysteine levels, but folate supplementation caused a 53% reduction (to 5.7±1.6). We conclude that patients with sickle cell disease have adequate vitamin B6 and B12 status, but suboptimal folate status, leading to elevated plasma homocysteine levels. They may therefore benefit from folate supplementation to reduce their high risk for endothelial damage.

28. De oudere rode bloedcel verliest de anti-complement eiwitten CD55 en CD59: een factor bij de verwijdering van de rode bloedcel?

F.L.A. WILLEKENS¹, H.J. BOS², B. ROERDINKHOLDER-STOELWINDER², Y.A.M. GROENEN-DOPP¹, G.C. v.d. PLAS² en J.M. WERRE²

Klinische Chemie¹, Ziekenhuis Rijnstate en Bloedbank Arnhem e.o.², Arnhem

Achtergrond: In oude rode bloedcellen (RBC) treden veranderingen op in band 3, waardoor een autoantistof zich daaraan kan binden. Deze sensibilisatie kan een rol spelen bij de verwijdering van de oude rode bloedcel uit de circulatie. Dit proces wordt waarschijnlijk versterkt door complementactivatie. De afwezigheid van de anti-complement eiwitten CD55 en CD59 in PNH of van CD59 in aangeboren CD59-deficiëntie leiden tot complement hemolyse. Rode bloedcellen zouden deze eiwitten kunnen verliezen door vesikelvorming.

Methode: Rode bloedcellen van zes gezonde vrijwilligers worden gescheiden in vijf fracties van oplopende leeftijd (I-V) door een combinatie van counterflowcentrifugatie en dichtheidsscheiding. Met behulp van flowcytometrie is de gemiddelde fluorescentieintensiteit (MFI) van de binding van anti-CD55, anti-CD59 en anti-glycophorine A (anti-GPA; specifieke RBC-marker) aan rode bloedcellen gemeten. Als maat voor de gemiddelde leeftijd van de fracties I - V is het percentage HbA1c gebruikt.

Resultaten: 1) In fracties I tot V wordt een oplopend percentage HbA1c gevonden. 2) Voor glycophorine A wordt geen verandering in de MFI gevonden. 3) De MFI's van CD55 en CD59 dalen met 11%, respectievelijk 8%.

Conclusie: Het aantal moleculen CD55 en CD59 per cel nemen af met het ouder worden van de rode bloedcel. Dit verlies van anti-complement eiwitten speelt mogelijk een rol bij het verdwijnen van de rode bloedcel.

Rode bloedcel fractie	HbA1c % (% + SD, n=6)	MFI (% + SD, n=6)		
		GPA	CD55	CD59
I	3,7 + 0,54	100	100	100
II	4,5 + 0,34	102 + 4,2	96 + 3,7	96 + 2,3
III	5,3 + 0,54	101 + 3,1	95 + 2,7	96 + 3,0
IV	6,2 + 0,64	102 + 2,5	93 + 3,6	96 + 2,5
V	6,7 + 0,59	102 + 3,6	89 + 1,8	92 + 2,8

29. Enhanced sVCAM-1 levels in pediatric patients with sickle cell disease

J.B. SCHNOG¹, C. de VRIES¹, F.P.L. van der DIJS², F.D. MUSKIET³, F.A.J. MUSKIET⁴ and A.J. DUIT¹

Red Cross Bloodbank Curaçao¹; Department of Clinical Chemistry and Hematology, Public Health Laboratory, Curaçao²; Department of Pediatrics, St. Elisabeth Hospital, Curaçao³; Central Laboratory for Clinical Chemistry, University Hospital Groningen⁴

Intricate adhesive interactions between sickle (red) blood cells and activated endothelium play a crucial role in the pathophysiology of sickle cell vasocclusion. Erythrocytes and leukocytes are thought to adhere to the vascular endothelium, thereby impeding the microcirculation and increasing the transit-time of (sickled) erythrocytes, which ultimately results in vasoocclusion. We measured serum concentrations of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) and soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in steady state pediatric sickle cell patients. Serum levels of tissue necrosis factor- α (TNF- α), an endothelial activating cytokine, were also measured. The study population consisted of 28 pediatric patients with sickle cell disease (15 HbSS, 13 HbSC; mean \pm SD age 7.0 ± 3.7 years) and 16 healthy age, sex and race matched HbAA controls (5.6 ± 1.4 years). Serum sVCAM-1 levels were dramatically increased in sickle cell patients ($n=28$; mean \pm SD= 1468 ± 875 $\mu\text{g/l}$), as compared to

controls ($n=16$; 731 ± 162 $\mu\text{g/l}$; $p=0.002$), whereas sICAM-1 levels did not differ to a significant extent (24 patients: 574 ± 149 ; 10 controls: 407 ± 31 $\mu\text{g/l}$; $p>0.05$). Patients also had significantly elevated serum TNF- α ($n=9$; 65 ± 46 ng/l), compared with controls ($n=10$; 20 ± 13 ng/l ; $p=0.01$). The increased sVCAM-1 levels shown here are also reported for adult sickle cell patients, and indicate endothelial activation in clinically asymptomatics. As is the case in adult patients this increment was specific, since sICAM-1 levels were comparable to controls. Several studies have shown VCAM-1 to be an important adhesion molecule involved in the pathological adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. Our results therefore indicate that endothelial activation, and perhaps vasoocclusion, already occurs at a very young age even when a patient is clinically pain-free. This activation is, at least in part, due to endothelial activating cytokines, such as TNF- α .

30. A new parameter for screening on platelet dysfunction in subjects treated with haemodialysis

P.C.M. BARTELS¹, S.F. HEINE¹, M. SCHOORL¹ and M.J. NUBE²

Department of Clinical Chemistry, Hematology & Immunology¹ and Department of Nephrology², Medical Centre Alkmaar, The Netherlands

The Platelet Function Analyzer (PFA-100TM) has been designed for rapid in vitro evaluation of abnormal platelet function. The PFA-100TM system is able to simulate conditions to which platelets are exposed in injured blood vessels. In this study Closure Times (CT) were measured in order to estimate the degree and variability of platelet aggregation in 10 chronic haemodialysis (HD) patients. Blood samples were taken from the afferent line at $t=0$, $t=60$ and $t=150$ minutes after the start of HD, respectively. At $t=0$ CT values (mean 178 ± 35 sec.) were significantly increased ($p=0.0004$), if compared with a reference group of apparently healthy donors (123 ± 15 sec.). Measurements

performed at $t=60$ and $t=150$ showed no further obvious deviations, if compared with $t=0$.

Prolonged CT at $t=0$ in HD patients may result from poor platelet function due to uremic toxins, a decreased amount of GPIIb- and GPIIb/IIIa receptors on the platelet membranes or late effects from previous anticoagulation treatment.

In conclusion, screening with the PFA-100TM system demonstrated impaired platelet function in most subjects already before starting HD. As significant changes were not observed during HD, the treatment itself is not considered to contribute to further aggravation or improvement of platelet dysfunction.

31. Pseudotrombocytopenie nader bekeken I: Herkenning

P.C.M. BARTELS¹, A.J.P.F. LOMBARTS² en M. SCHOORL¹

Laboratoria van Medisch Centrum Alkmaar¹ en Leyenburg Ziekenhuis, Den Haag²

Pseudotrombocytopenie (PTCP) kan behalve door slechte antistolling ook veroorzaakt worden door anticoagulansgeïnduceerde trombocytanagregatie. Het niet herkennen van PTCP als oorzaak van verlaagde trombocytconcentraties kan onnodig nader onderzoek en therapie ten gevolge hebben, zelfs splenectomie is in het verleden beschreven! Ook kan wegens vermeende trombocytopenie noodzakelijke therapie onthouden of gestaakt worden.

Het optreden van samenklontering (aggregatie) van trombocytan wordt in bloedcelltellers doorgaans automatisch gesignaleerd. De mate waarin samenklontering van trombocytan optreedt is bepalend voor de omvang van de gevormde aggregaten. De omvang is uiteraard van invloed op de posities in de histogrammen waar het fenomeen tot uiting kan komen. De algoritmen die gebruikt worden voor bewerking van meetgegevens alsmede de criteria waarop de discriminantfunctie gebaseerd is, zijn echter onbekend. Dientengevolge kunnen er afwijkingen bestaan in de gevoeligheid en de betrouwbaarheid van diverse apparaten. Aan de hand van voorbeelden zal

worden getoond hoe PTCP gedetecteerd kan worden in 3 generaties Coulter Counters (SPLUS IV, STKS en Gen S) en in de Sysmex NE 8000 (1-4).

1. Lombarts AJPF, de Kieviet W. Recognition and Prevention of Pseudothrombocytopenia and Concomitant Pseudoleukocytosis. *Am J Clin Path* 1988; 89: 634-639.
2. Lombarts AJPF, de Kieviet W, Franck PFH, Baars JD. Recognition and Prevention of Two Cases of Erroneous Haemocytometry Counts Due to Platelet and White Blood Cell Aggregation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30: 429-432.
3. Cárcamo C, Ferriz C, Martín P, Fernández-Castro M. Improvement in the diagnostic performance of the Coulter STKS. *Lab Hematol* 1997; 3: 264-270.
4. Bartels PCM, Schoorl M, Lombarts AJPF. Screening for EDTA-dependent deviations in platelet counts and abnormalities in platelet distribution histograms in pseudothrombocytopenia. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57: 629-636.

32. Pseudotrombocytopenie nader bekeken II: Kinetiek, voorkomen en voorkómen

A.J.P.F. LOMBARTS¹, P.C.M. BARTELS², M. SCHOORL² en W. de KIEVIET³

Laboratoria van Leyenburg Ziekenhuis Den Haag¹, Medisch Centrum Alkmaar² en St. Lucas/Andreas Ziekenhuis Amsterdam³

Kinetiek. Pseudotrombocytopenie (PTCP) is een "in vitro" fenomeen dat optreedt ten gevolge van anticoagulans-geïnduceerde aggregatie van trombocyten (PLT). Een belangrijk aspect van de aggregatie is de tijdsafhankelijkheid. Afhankelijk van het individuele monster en het gebruikte anticoagulans voltrekt de aggregatie zich geleidelijk in een periode van 5 - 90 minuten (1-3). Hiervan dient men zich bij evaluatie van de resultaten van vergelijkende studies (inclusief microscopie) steeds terdege bewust te zijn.

Vóórkomen. PTCP komt voor bij een grote variëteit aan ziekten zonder enige specificiteit of klinische relevantie. Het verschijnsel kan plotseling optreden (4) en weken tot maanden aanhouden (1). De beschreven incidentie varieert van 0,1% - 2% (3). De grote variatie wordt mede veroorzaakt door de wisselende mate van herkenning, het tijdsgebonden karakter van het verschijnsel en het ontbreken van een eensluitende definitie.

Voorkómen. In een vergelijkende studie (1) werd door ons aangetoond dat EDTA-geïnduceerde PTCP het best voorkómen kan worden door bloedafname in ACD (zure citraat-dextrose) te doen plaatsvinden. Citraat is minder effectief,

terwijl heparine het minst geschikt is. De getoonde herkenningseigenenschappen bieden mogelijkheden aan de gebruiker om te beoordelen "of" en zo ja in welke mate, PTCP door alternatieve anticoagulantia voorkómen kan worden en in welke gevallen alsnog een betrouwbare PLT-concentratie gemeten kan worden (1).

1. Lombarts AJPF, de Kieviet W. Recognition and Prevention of Pseudothrombocytopenia and Concomitant Pseudoleukocytosis. *Am J Clin Path* 1988; 89: 634-639.
2. Lombarts AJPF, de Kieviet W, Franck PFH, Baars JD. Recognition and Prevention of Two Cases of Erroneous Haemocytometry Counts Due to Platelet and White Blood Cell Aggregation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30: 429-432.
3. Bartels PCM, Schoorl M, Lombarts AJPF. Screening for EDTA-dependent deviations in platelet counts and abnormalities in platelet distribution histograms in pseudothrombocytopenia. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57: 629-636.
4. Gschwandner ME, Siostrzonek P, Bodinger C, Neunteufl T, Zauner C, Heinz G, Maurer G, Panzer S. Documented Sudden onset of pseudothrombocytopenia. *Ann Hematol* 1997; 74: 283-285.

33. Iron saturation of serum ferritin in haemochromatosis patients during therapy

J. ten KATE¹, K. MARELL¹, R. HUIZENGA³, H. KREEFTENBERG³ and C. van DEURSEN²

Depts. of Clinical Chemistry¹ and Internal Medicine², De Wever & Gregorius Hospital, Heerlen and Brunssum, Dept. of Internal Medicine³, University Hospital, Groningen, the Netherlands

In a recent paper (ten Kate et al., *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 53-6) we presented a new method to measure the iron content of ferritin and speculated on the usefulness of this method to establish the iron status in patients suffering from anaemia of inflammation or haemochromatosis. This abstract deals with the last group of patients.

Hereditary haemochromatosis is an autosomal recessive disease. This condition is diagnosed on the basis of transferrin saturation, serum ferritin and liver iron concentration. More recently the diagnosis can be made on basis of mutation detection (Feder et al., *Nature Genet* 1996; 13: 399-408). Haemochromatosis is treated with regular phlebotomies. On basis of the ferritin concentrations and the iron saturation of transferrin the therapy is followed.

Serial serum samples from 8 haemochromatosis patients during therapy were collected and stored in a freezer. These samples were used in this study after establishing the fact that the iron saturation of ferritin did not change during storage.

As could be expected the serum ferritin concentrations decreased in all patients during the treatment. Surprisingly the iron saturation of ferritin remained fairly constant and appears to be more a characteristic of a given patient, than a measure of the succes of therapy.

From these data we have to conclude that the measurement of the iron saturation of ferritin can not be used to follow therapy.

34. Coating in vitro of erythrocytes with tamm horsfall-protein

P.M.W. JANSSENS¹, S. KUIPER¹, I.H. de VRIES¹, J.L. WILLEMS², I. KLASSEN², M. van OOSTERWIJK¹ and J. PAARDEKOOPE¹

Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Rijnstate, Arnhem¹ en Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, AZN-St.Radboud, Nijmegen²

A method is described to coat isolated peripheral blood erythrocytes in vitro with Tamm-Horsfall Protein (THP, Uromodulin). Coating of erythrocytes with THP was accomplished by incubation of the cells in the presence of THP, made monomeric by incubation in a high urea concentration. THP-coating of erythrocytes was dependent on the THP-concentration, maximal coating being obtained at a protein concentration ≥ 250 mg/mL. The best coating-results were obtained if during the coincubation of erythrocytes with THP urea was removed, while the sodium chloride concentration was increased up to a physiologic concentration by means of

dialysis. This alteration in chemical conditions promotes THP-polymerisation. Erythrocytes coated in this way could be preserved for at least 5 weeks in preserving solution, making them an interesting source of testing and control material. Coating of erythrocytes with THP could also be accomplished under conditions in which THP was preserved in a monomeric form, which suggests that peripheral blood erythrocytes have bindingsites for THP.

Ref. Janssens et al. *Clin Chim Acta* 1997; 258: 179-192.

35. Verschuivingen in het bloedtransfusiebeleid in de ziekenhuizen in Noord Holland (exclusief het Gooi) en Almere

J.P.M.C. GORGELS¹ en M.H. HERRUER²
Kennemer Gasthuis¹ en Spaarne Ziekenhuis², Haarlem

Sinds 1983 bestaan er richtlijnen voor bloedtransfusie in ons land.

In een enquête naar het in de ziekenhuizen gevoerde beleid is in 1995 -ondanks de bestaande richtlijnen- een grote variatie in beleid geconstateerd (Buiting en Dinkelaar, NTvG, 1998). In oktober 1995 is een rapport over de organisatorische aspecten van het "Bloedtransfusiebeleid in Ziekenhuizen" gepubliceerd door het College voor de Bloedtransfusie. In juni 1996 is onder auspiciën van het CBO een consensusbijeenkomst georganiseerd waarvan het resultaat is vastgelegd in het rapport "Tweede Herziening Consensus Bloedtransfusiebeleid (in het bijzonder van erythrocyten)" (van Aken, Dinkelaar, Gorgels, Knape, van Everdingen, NTvG 1998).

Om na te gaan in hoeverre na de consensusbijeenkomst en het verschijnen van de beide genoemde rapporten het bloedtransfusiebeleid in de ziekenhuizen is veranderd hebben wij de in 1995 gehouden enquête in december 1997 herhaald in de provincie Noord-Holland, exclusief het Gooi, en inclusief Almere. In 1995 namen 16 van 18 aangeschreven ziekenhuizen deel aan de enquête. In 1997 waren dat er 16 van 17. De meest in het oog springende resultaten waren de volgende. In 1995 had 80% van de ziekenhuizen in onze regio een bloedtransfusiecommissie (landelijk 83%), in 1997 was dat 100%. De vergaderfrequentie daarvan lijkt overigens afgenomen te zijn: in 1995 vergaderde slechts 8% <2x per jaar (landelijk 26%), en in 1997 was dat toegenomen tot 31%. De populariteit van bloedtransfusie als toetsingsonderwerp ligt onveranderd ongeveer op 25%, overeenkomstig het landelijk beeld. Autologe predeposit wordt evenals in 1995 weinig aangemoedigd. Het aantal ziekenhuizen dat de patiënt schriftelijke

informatie over bloedtransfusie aanreikt, is van 0% in 1995 (landelijk 10%) gestegen tot bijna 40% in 1997. Het aantal ziekenhuizen dat werkt met een chirurgische bloedbestellijst ligt onveranderd rond 80% (landelijk 72% in 1995). Er is daarentegen wel een verschuiving te zien in de verantwoordelijkheid voor bestelling voor de OK: in 1995 gaf 67% de anesthesioloog als verantwoordelijke op, terwijl dat in 1997 nog maar 38% was (verschuiving naar snijdend specialist). Het aantal ziekenhuizen dat tweemaal onafhankelijk bloed afneemt voor de bloedgroepen bepaling steeg van 60 naar 80% (was in 1995 landelijk 87%). Het aantal laboratoria dat voor de antistofscreening gebruik maakt van een 3 cel panel steeg van 75 naar 100% (was landelijk 73%). Toepassing van Type en Sereen beleid nam toe van 33% (landelijk 36%) naar 56%. Het aantal laboratoria dat de bloedgroep en rhesus van door de bloedbank geleverde producten zelf controleren bleef onveranderd rond 33% (landelijk 44%). Het aantal laboratoria dat zelf compatibel bloed selekteert in geval van irregulaire antistoffen blijft beperkt: rond 10% (landelijk 27%). Transfusie compatibel voor c, E en K bij vrouwen tot 45 jaar nam toe van 47% tot ca 63% van de laboratoria (landelijk 17 tot 30%).

Controle op feitelijke toediening van het uitgegeven bloed nam enigszins af: van 60 naar 50%. Daarentegen was de centrale registratie van transfusiereacties licht toegenomen: van 60 naar 70%.

Onze conclusie uit deze resultaten is, dat de implementatie van richtlijnen en consensusstukken is toegenomen. De aandacht voor het bloedtransfusiebeleid lijkt een effectief middel bij het realiseren van lokale verbeteringen van het beleid op het gebied van de bloedtransfusie.

36. Korte evaluatie van de Cobas-Vega hematologische analyser in een kinderkliniek

B.E.P.B. BALLIEUX, J.M. van COLLENBURG en J. LINDEMANS
Afdeling Klinische Chemie, Sophia Kinderziekenhuis Rotterdam, AZR

De eisen waaraan een hematologie analyser moet voldoen voor de analyse van bloedmonsters van pasgeborenen en zuigelingen, verschillen op een aantal punten van die voor de analyse van bloedmonsters van andere kinderen en volwassenen. Recentelijk werd door ons de Cobas-Vega hematologische analyser van ABX kort geëvalueerd ten aanzien van deze "pediatrische" kwaliteiten. Daarbij zijn de volgende aspecten bestudeerd:

- Een monstervolume van maximaal 120 ml voor de analyse van CBC, leukocyten-differentiatie en reticulocyten-telling.
- Relatieve ongevoeligheid voor geaggregeerde trombocyten, die als gevolg van capillaire afname ontstaan.
- Efficiënte lysis van neonatale erythrocyten en een betrouwbare WBC bij onvolledig gelyseerde erythrocyten.
- Eenvoudige ergonomische aanbieder van kleine volumina bloed (" 250 ml) in open microtainers.

Daarnaast werd gekeken naar vergelijkbaarheid met ons huidige systeem (Technicon H*1) en algemene kwaliteitseisen als gebruiksvriendelijkheid van hard- en software, geluid en warmte productie etc. Een uitgebreide evaluatie van juistheid, precisie en lineariteit was in het korte bestek niet haalbaar. Ook de Reticulocyten analyse moet nog nader geëvalueerd worden.

Het monstervolume van de Vega was middels verkleining van het dode volume en verwijdering van de "closed tube sampler" teruggebracht tot "85 ml voor een CBC/Diff. Hieruit kunnen in principe ook de reticulocyten bepaald worden.

Uitstekende correlaties werden gevonden tussen de H*1 en de Vega:

Correlatie	r
Leuko's	0,992
Ery's	0,964
Hb	0,992
Ht	0,970
MCV	0,974
Plaatjes	0,988
Neutro's	0,980
Lymfo's	0,973
Mono's	0,820
Eo's	0,909
Baso's	0,811

De Vega had weinig last van lysisresistentie van neonatale erythrocyten en indien hiervan sprake was, werd een betrouwbare WBC geleverd middels het Baso-kanaal. Het apparaat had geen problemen met het aanbieden van de kleine monster-volumina, eenvoudig te bedienen en was geluidsarm.

Discrepancies in de leukocyten differentiatie werden gevonden bij een aantal premature baby's met septicaemie. Een deel van de granulocyten werd in deze patiëntjes abusievelijk als monocytogen gemeten, mogelijk als gevolg van vergaande degranulatie en verminderde kleuring dientengevolge. Dit effect was sterker in de Vega als in de H*1. Deze monsters zouden in de praktijk wel aanleiding moeten geven voor microscopische differentiatie als gevolg van "flags" en uitslagen voor de differentiatie buiten het referentiewaardengebied.

37. Evaluation of Dade-Behring coagulation analyser BCS

P.C.M. BARTELS and M. SCHOORL

Department of Clinical Chemistry, Hematology & Immunology, Medical Centre Alkmaar, The Netherlands

Analytical performance characteristics concerning accuracy, precision and carry over were established for the Behring Coagulation Analyser (BCS). Results from analyses performed in a routine setting were compared with those obtained by the Coagulation Analyser ACL-3000.

Samples from 200 subjects treated with anticoagulant therapy were selected for comparison purposes. If compared with ACL-3000 results increased BCS results for PTT are measured for samples in the range exceeding 20 seconds. The same consideration is valid for higher INR values. No bias is demonstrated after comparison results obtained for APTT and derived fibrinogen analyses on both analysers.

Carry over was estimated to be insignificant for PT and APTT

test methodologies. Experiments concerning reproducibility yielded appropriate results for PT, APTT and fibrinogen according to the manufacturer's specifications.

With regard to stability it is an advantage that reagents are stored refrigerated on the analyser. If compared with manual test procedures main advantages from automation combined with 'random access' facilities are rapidity and precision, less sample volume requirement and labor saving benefits. In particular when dealing with frequent batches comprising only few analyses substantial savings with regard to reagents and reference materials can be realized in practice. After a thorough instruction period reduction of operator's time needed for processing of analyses amounting to 50% can be performed.

38. Het effect van NSAID's op de trombocytenfunctie gemeten met de PFA-100 bij gezonde vrijwilligers

M. de METZ¹, A. de MEIJER², H. VOLLAARD³ en B. VERBRUGGEN⁴

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Afdeling Interne Geneeskunde² en Klinische Farmacie³, Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Centraal Hematologisch Laboratorium⁴, Academisch Ziekenhuis Nijmegen

In de PFA-100 analyzer van de firma Dade wordt citraat gebufferd volbloed door een gaatje in een membraan gezogen, die geïmpregneerd is met collageen en adrenaline of collageen en ADP. De geactiveerde trombocyten zullen het gaatje na verloop van tijd dichten en deze sluitingsstijd wordt geregistreerd. Wij hebben het effect van indomethacine en meloxicam op de sluitingsstijd onderzocht. Meloxicam remt de prostacycline synthese in ontstekingsgebieden (cyclo-oxygenase-2). Indomethacine remt ook de cyclo-oxygenase-1 in trombocyten en dus de aggregatie.

Het betrof een gerandomiseerde cross-over studie bij 15 gezonde vrijwilligers die begonnen met meloxicam (15 mg per dag gedurende 7 dagen) of indomethacine (3 x 25 mg per dag gedurende 3 dagen). Hierna volgde een periode van 14 dagen zonder medicatie en vervolgens werd de andere NSAID ingenomen. Uitgangswaarden werden verkregen op dag 1 en dag 14. Bloed werd verder 2 uur na de laatste inname van meloxicam of indomethacine afgenomen. Aggregatie in volbloed met 0,35 mMol/l arachidonzuur gaf bij alle proefpersonen een

volledige remming na indomethacine, terwijl meloxicam geen effect had op de aggregatie.

De uitgangswaarden voor de sluitingsstijd bedroegen 89 - 180 sec (gem 127, sd 26) en 73 - 110 sec (gem 94, sd 11) na activatie met respectievelijk collageen/adrenaline en collageen/ADP. Er was geen verschil tussen dag 1 en 14. De SD van de duplo voor de meting op dag 1 en 14 bedroeg 11 %. Na indomethacine lag de sluitingsstijd met collageen/adrenaline buiten het meetgebied voor 14 personen (>300 sec) en bij 1 persoon steeg de waarde van 112 naar 251 sec. Na meloxicam was de sluitingsstijd met collageen/adrenaline 98 - 204 sec (gem 141, sd 33), waarbij net geen significante verandering was waar te nemen t.o.v. de uitgangswaarde (tweezijdig gepaarde T-toets, P = 0,07). De activatie met collageen/ADP werd niet beïnvloed door de NSAID's, evenmin als door acetylsalicylzuur. Bij gebruik van collageen/adrenaline is de PFA-100 een gevoelige methode om de remming van cyclo-oxygenase-1 door NSAID's in trombocyten te meten.

Toxicologie

39. Degradation of neurofilaments after incubation with 2,5-hexanedione

E. HEIJINK¹, S.W. SCHOLTEN¹, P.A. BOLHUIS² and F.A. de WOLFF^{1,3}

Coronel Institute, Div. of Human Toxicology¹ and Dept of Experimental Neurology, Academic Medical Center², Amsterdam and Toxicology Laboratory, Leiden University Medical Centre³, Leiden

n-Hexane may cause peripheral neuropathy via the metabolite 2,5-hexanedione (2,5-HD). The most characterizing morphological features are swellings of the preterminal axon containing aggregates of neurofilaments (NFs). It has been proposed that direct binding of 2,5-HD to the NF proteins, followed by covalent crosslinking of the NF proteins, are implicated in the pathomechanism of 2,5-HD-induced neurotoxicity. How these molecular interactions eventually cause accumulation of NFs is unclear as yet. In this study we investigated whether 2,5-HD affects calpain-mediated degradation of NF proteins. Neuroblastoma cells SK-N-SH were exposed to 10 mM 2,5-HD for 3 days, a concentration shown to induce

NF accumulation in the cells. Subsequently, NF were isolated and degraded in vitro by calpain. SDS-PAGE and immunoblotting revealed crosslinked NF proteins. The degradation rates of NF and crosslinked NF from exposed cells were identical to the rates of NF from control cells. Pulse-chase studies were set up to further examine intracellular NF-metabolism. The results suggest that 72 hrs after pulse-labeling of cells with [³⁵S]-methionine, labeled NF proteins had disappeared from 5 mM 2,5-HD-exposed cells in a similar rate as from non-exposed cells. Together, these results indicate that 2,5-HD does not interfere with the degradation of NF proteins.

40. Snel geneesmiddelmetabolisme : detectie van CYP2D6 gen duplicatie

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

Klinisch Chemisch Laboratorium, Psychiatrisch Ziekenhuis Veldwijk, Ermelo

Het enzym CYP2D6 is betrokken bij het oxidatief metabolisme van een groot aantal geneesmiddelen, waaronder vele psychofarmaca. De activiteit van het enzym is vanwege een genetisch polymorfisme individueel bepaald. Dit leidt tot interindividuele variatie in metabole capaciteit: er kan onderscheid gemaakt worden tussen trage, normale en snelle metaboliseerders.

Bij 5 tot 10% van de Kaukasische populatie verloopt het CYP2D6-afhankelijke geneesmiddelmetabolisme als gevolg van deficiëntie-veroorzakende mutaties op het CYP2D6 gen uiterst traag. Hierdoor kan de serumconcentratie van psychofarmaca bij standaarddosering hoog oplopen, waardoor het risico op bijwerkingen sterk toeneemt en de compliance afneemt. Extreem snel metabolisme komt voor bij 2 tot 7% van de Kaukasiërs. Dit wordt veroorzaakt door een CYP2D6 gen duplicatie, waardoor de enzymexpressie verhoogd is. Bij deze snelle metaboliseerders blijft bij standaarddosering de serumconcentratie over het algemeen subtherapeutisch. Hierdoor slaat de therapie niet aan en wordt een patiënt van non-compliance verdacht.

Door trage en snelle metaboliseerders vòòr aanvang van farmacotherapie te identificeren, kunnen de keuze van psychofarmaca en de dosering van begin af aan zodanig worden aangepast, dat de kans op een positief klinisch effect maximaal is. Op PCR gebaseerde tests voor het opsporen van traag geneesmiddelmetabolisme worden in ons ziekenhuis sinds 1½ jaar routinematig toegepast. PCR-assays voor de detectie van snel metabolisme als gevolg van CYP2D6 genduplicatie zijn recentelijk ontwikkeld. Hierbij wordt gescreend op PCR fragmenten die alleen bestaan als er sprake is van meer dan één CYP2D6 gen per allel. De methode is betrouwbaar. Positieve en negatieve controles zijn ingebouwd en bij heterozygoten wordt nagegaan of de duplicatie zich op het wildtype dan wel op het mutant allel bevindt. De test is relatief eenvoudig en snel uitvoerbaar. Bij screening in ons ziekenhuis in een groep van 202 psychiatrische patiënten bleek de prevalentie van snel geneesmiddelmetabolisme als gevolg van CYP2D6 genduplicatie 3,5% te zijn.

Op de poster zal de methode worden besproken en zullen de resultaten worden bediscussieerd.

41. Plasma folic acid cut-off value, as derived from its relation with homocysteine

D.A.J. BROUWER¹, H.T.M.E. WELTEN¹, D.-J. REIJNGOUD², J.J. van DOORMAAL³ and F.A.J. MUSKIET¹

Central Laboratory for Clinical Chemistry¹, Laboratory for Metabolic Disorders², Atherosclerosis & Lipid Outpatient Clinics³, Groningen University Hospital

We established the cut-off value for plasma folic acid, using plasma homocysteine as functional marker. For this we investigated the relations of the plasma folic acid of 103 apparently healthy adults with their fasting plasma homocysteine, and with their plasma homocysteine 6 h after a standard oral gift of methionine (100 mg/kg). We also studied the relation of their plasma folic acid with the decline of fasting plasma homocysteine, following 7 days folic acid supplementation (5 mg/day).

The three approaches suggested a cut-off value of 10 nmol/l. The 10 nmol/l cut-off value was objectified by defining the plasma folic acid cut-off value as the concentration at, or below, which an individual has a significantly higher chance to lower its plasma homocysteine following folic acid supplementation, compared with the chance to exhibit such a decrease when the plasma folic acid concentration exceeds this level (odds ratio: 5.02; 95% CI 1.87-13.73).

42. Moet de aanbevolen dagelijkse hoeveelheid van foliumzuur worden verhoogd?

D.A.J. BROUWER¹, H.T.M.E. WELTEN¹, J.J. van DOORMAAL², D.-J. REIJNGOUD³ and F.A.J. MUSKIET¹

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Atherosclerose Lipiden Polikliniek², Laboratorium voor Metabole Ziekten³, Universiteit en Academisch Ziekenhuis Groningen

Hyperhomocysteinemie is een onafhankelijk risicofactor voor premature atherosclerose. Plasma homocysteïne spiegels zijn afhankelijk van genetische- en voedingsfactoren. Wij onderzochten het effect van een kort-durende suppletie van vitamine B6 (1 mg/kg/dag; 7 dagen) en aansluitend foliumzuur (5 mg/dag; 7 dagen) op het nuchtere plasma homocysteïne van 103 ogenschijnlijk gezonde Nederlanders van 20-75 jaar. Bij de aanvang van de studie lagen de foliumzuurconcentraties van alle deelnemers boven de ondergrens van het referentie gebied. De vitamine B6 en vitamine B12 concentraties waren verlaagd bij respectievelijk 8 en 2 van hen. Op dat moment bleek het plasma homocysteïne invers gerelateerd te zijn aan de plasma spiegels van foliumzuur en vitamine B12. Het gemiddelde plasma homocysteïne veranderde niet vanwege de vitamine B6 suppletie. Slechts één deelnemer vertoonde in

die periode een significante plasma homocysteïne daling. Na foliumzuur suppletie daalde het plasma homocysteïne van 11,7±5,6 naar 9,1±3,4 µmol/l (gemiddelde±SD; p<0,0001). Veertig deelnemers (40%) vertoonden in die periode een significante plasma homocysteïne daling. Aan het eind van de studie was het plasma homocysteïne nog steeds gerelateerd aan het plasma vitamine B12. Wij concluderen dat bij aanvang van de studie de foliumzuur status van de deelnemers niet leidde tot de laagst mogelijke plasma homocysteïne spiegels. Vanwege het wellicht continu stijgende atherosclerose risico met een toenemend plasma homocysteïne is het mogelijk verstandig om laatstgenoemde zo laag mogelijk te houden. Hiertoe zou de aanbevolen dagelijkse hoeveelheid van foliumzuur dienen te worden verhoogd.

43. Kwantificeren van Vascular Endothelial Growth Factor mRNA

P.T.J. MARX, A.B. MULDER, C. HAANEN en I. VERMES

Klinisch Chemisch Laboratorium, Medisch Spectrum Twente, Enschede

Het kwantificeren van mRNA middels een RT-PCR is een bekend methodisch probleem. In het kader van het onderzoek "Endotheelfunctie bij Diabetes mellitus" werd een methode ontwikkeld voor het kwantitatief bepalen van Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mRNA met behulp van een competitieve RT-PCR.

In het kort wordt de methode als volgt uitgevoerd. Het RNA wordt met behulp van een Reverse Transcriptase (RT) omgezet tot cDNA. Vervolgens wordt het cDNA geamplificeerd met behulp van TAQ-polymerase. Een nadeel van deze amplificatiestap is het feit dat uit de hoeveelheid geproduceerd DNA niet af te leiden is hoeveel DNA er oorspronkelijk aanwezig was. Om deze tekortkoming te omzeilen, wordt er aan het RNA een interne standaard toegevoegd. De basevolgorde van de RNA-standaard komt overeen met die van het te bepalen VEGF mRNA, afgezien van een deletie van 100 baseparen. De standaard wordt in een bekende concentratie reeks aan de monsters toegevoegd. De hoeveelheid PCR product van

standaard en van monster worden na elektroforese bepaald m.b.v. een CCD-camera en software.

Het verband tussen de hoeveelheid toegevoegde standaard en de verhoudingen van de hoeveelheid PCR-product van de standaard en het monster vormt een ijklijn, waaruit m.b.v. logaritmische regressie de oorspronkelijke hoeveelheid mRNA is te herleiden.

Er zijn maatregelen genomen om veel voorkomende fouten te vermijden. De RNA-standaard werd vóór de RT-reactie aan het monster toegevoegd, waardoor latere pipeteerfouten of inefficiënte enzymreacties geen invloed op de verhouding tussen de hoeveelheid monster en standaard kunnen hebben. De ijklijn heeft een richtingscoëfficiënt gelijk aan één, alleen dan geldt dat de reactie-omstandigheden voor standaard en monster overeenkomen. En een cruciale stap bij de detectie is het maken van opnames die in het lineaire gebied van de camera liggen.

De methode bleek na validatie betrouwbaar en reproduceerbaar.

44. Opzetten van kwantitatieve RT-PCR voor de meting van mucine-1 gen expressie m.b.v. homologe interne standaard

M.A.M. BON, F.A.J.T.M. van den BERGH en I. VERMES

Klinisch Chemisch Laboratorium, Medisch Spectrum Twente, Enschede

Uit eigen, eerdere resultaten en ook uit de literatuur is gebleken dat ieder individu een lage Muc-1 achtergrond gen expressie bij zich draagt als de detectie techniek maar gevoelig genoeg is. Dit impliceert dat de RT-PCR reacties gekwantificeerd dienen te worden.

In een kwantitatieve RT-PCR dient gebruik gemaakt te worden van een exogene interne homologe controle. Dit houdt in dat er gewerkt moet worden met een controle die toegevoegd wordt aan het template (exogeen, intern) in een bekende hoeveelheid. Vervolgens dient deze controle homologe te zijn aan het template, d.w.z. dat er in de PCR gebruik gemaakt kan worden van dezelfde primers. De reactie is dan verzekerd van dezelfde thermodynamica en dus dezelfde amplificatie-efficiëntie. Deze homologe interne standaard wordt als volgt bereid: na RNA-isolatie wordt er cDNA gesynthetiseerd m.b.v. de specifieke priming methode. Deze eerste specifieke primer heeft een modificatie ondergaan, er wordt n.l. een 'loop' gecreëerd doordat 25 basen complementair zijn aan het RNA, vervolgens worden er 80 basen overgeslagen (loop) en hierna zijn weer 20 basen complementair aan het RNA. In de PCR bevat de tweede primer een T7-sequentie. Het fragment dat nu ontstaat is 80 basen korter dan het doelwit-fragment en bevat een T7-sequentie. Dit product wordt opgezuiverd en vervol-

gens m.b.v. een T7-RNA-polymerase getranscribeerd tot RNA. Het uiteindelijke product is een RNA-competitieve referentie standaard (RNACRS). Van deze RNACRS wordt de opbrengst en zuiverheid gemeten en vervolgens in verdunningsreeks toegevoegd aan het patiënten-RNA. De detectie van de twee producten kan op twee manieren geschieden:

- Het scannen van de ontstane producten na elektroforese. Uit de verhouding tussen de RNACRS en patiënten-RNA kan vervolgens m.b.v. densitometrie de aanwezige hoeveelheid patiënten-RNA semi-kwantitatief berekend worden.
- M.b.v. een PCR-ELISA. De PCR wordt uitgevoerd m.b.v. digoxigenine gelabelde nucleotides. Het PCR-product wordt random gelabeld. Vervolgens wordt er onderscheid gemaakt m.b.v. een hybridisatie met twee biotine-gelabelde probes tussen 100% (RNACRS + patiënten-RNA) en patiënten-RNA. De probes samen met het specifieke target worden weggevangen op een vaste fase (microtiterplaat gecoat met streptavidine) en via anti-DIG-horse-POD wordt het specifieke product gekleurd en kan de extinctie gemeten worden in een ELISA-reader. Vervolgens 100% - patiënten-RNA = RNACRS. Deze standaard is in een bekende hoeveelheid toegevoegd en nu kan middels berekening de hoeveelheid patiënten-RNA vastgesteld worden.

45. A simple PCR screening method for the presence of the alpha-spectrin low-expression allele α^{LELY}

M.M.M. SALIMANS, G. de KORT, J. POSTMA, A. SPAANS and P.F.H. FRANCK

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

Hereditary elliptocytosis (HE) and its aggravated form hereditary pyropoikilocytosis (HPP) are congenital hemolytic anaemias. The responsible mutations lie in several genes encoding proteins of the red cell membrane skeleton. In particular, they involve the SPTA1 gene, that encodes the ery-

throid protein α -spectrin, a major protein of the membrane skeleton.

One of these mutations in the SPTA1 gene, allele α^{LELY} (LELY: Low Expression LYon) is widespread, representing approximately one third of all α -alleles, and remains asympto-

matic both in the heterozygous and the homozygous state. The presence of allele α^{LELY} allows the expanded expression of any mutated HE α -allele located in trans and results in severe HE or in HPP.

Allele α^{LELY} contains three mutations in exon 40, intron 45 and intron 46 respectively, the latter change is not specific. These mutations result in the skipping of 50% of α^{LELY} transcripts and thus protein products, which explains the designation "Low Expression". However, since a combination

of α^{LELY} with a HE- α allele can cause severe HE or HPP, the detection of the presence of the α^{LELY} allele is important in studying these disorders.

A simple diagnostic PCR assay is presented, using a modified primer that generates a restriction site in the presence of the α^{LELY} mutation in exon 40 of the α -spectrin gene. This assay demonstrates the presence of the α^{LELY} allele in approximately 40% of the caucasian population, confirming former findings.

46. Apolipoprotein E genotype discrepancy leads to discovery of apo-E3 Groningen: G-insertion in codons 95-96 resulting in a premature stop codon

D.A.J. BROUWER¹, L.D. DIKESCHEI², J. PRINS³, A.M. BRUGMAN¹, A.W. KINGMA¹, I.P. KEMA¹, J.J. van DOORMAAL⁴, P. TERPSTRA⁵ and F.A.J. MUSKIET¹

Central Laboratory for Clinical Chemistry, Groningen University Hospital¹, Central Laboratory, De Weezenlanden Hospital, Zwolle², Central Laboratory for Clinical Chemistry, Utrecht University Hospital³, Atherosclerosis Lipid Outpatient Clinic, Groningen University Hospital⁴, Biomedical Technology Centre, Groningen University⁵

Apolipoprotein E (apo-E) plays a central role in the clearance of lipoprotein remnants, by serving as a ligand for the LDL- and apo-E receptors. Three common alleles (apo-e2, e3 and e4) give rise to 6 phenotypes. Apo-E3 is the ancestral form. The apo-E2 and apo-E4 isoforms are associated with increased CAD risk: 1-10% of subjects with apo-E2/E2 develop familial dysbetalipoproteinaemia, whereas apo-E4 is associated with increased LDL-cholesterol. We observed a persistent, unexplained, discrepancy between the outcomes of two different apo-E genotyping methods, in a sample from a patient with clinical and laboratory features of familial dysbetalipoproteinaemia. PCR, followed by restriction isotyping according to Hixson and Vernier, resulted in the apo-E2/E2 genotype. A commercially available kit (Sangtec, Bromma, Sweden), based on a minisequence method, indicated the apo-E2/E3 genotype. We hypothesised that the discrepancy resulted either from an altered restriction site or a mutation at the annealing site of one of the primers that are used in the restriction isotyping method. A new primer set for subsequent sequencing was designed to amplify a 629 bp DNA fragment

that included both these restriction sites and the primer annealing sites. Sequencing demonstrated a G-insertion in codons 95 or 96 (⁹⁵AAG-⁹⁶GAG→AAG-GGA-G). The ensuing frameshift gives rise to a premature stop at codon 146 (AAG→TAA). This codon is located in the receptor binding domain. The discrepancy between the two apo-E genotype methods is conceivable, since the G-insertion causes a mismatch at the 3' end of one of the restriction isotyping primers (sequence: 5'TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA3') and consequently the inability of this primer to become extended. The G-insertion is likely to be located on the apo-E3 allele, since this allele was not amplified with the apo-E restriction isotyping method. The prevalence, and the phenotypic and functional consequences of this G-insertion are currently under investigation.

Hixson JE and Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I. *J Lipid Res* 1990; 31: 545-548.

47. Ontwikkeling van moleculaire diagnostiek op faeces voor vroegdetectie colonkanker

R.H.N. van SCHAIK¹, M. SMID², D. SWINKELS³, J. LINDEMANS¹, J.W. OOSTERHUIS⁴ en L.C.J. DORSSERS²

Afd. Klinische Chemie¹, Afd. Moleculaire Biologie², Laboratorium voor Experimentele Patho-Oncologie⁴, Academisch Ziekenhuis Rotterdam en Afd. Klinische Chemie³, Academisch Ziekenhuis Radboud Nijmegen

Colorectale tumoren treden met een hoge frequentie op, waarbij de incidentie toeneemt met de leeftijd. Prognose van de patiënt hangt af van het tumorstadium waarin de ziekte wordt ontdekt. Er bestaat derhalve een grote behoefte aan screening. De huidige detectie-technieken (occult bloed test en colonoscopie) zijn hiervoor niet geschikt. De ontwikkeling van colonkanker gaat gepaard met het optreden van specifieke mutaties in het DNA van de tumorcellen, waaronder het k-ras gen. Het aantonen van k-ras gemuteerd DNA in faeces zou mogelijk gebruikt kunnen worden als screeningsmethode. Voorwaarden bij de ontwikkeling van moleculaire diagnostiek betreffen de kwaliteit en kwantiteit van humaan DNA in faeces, en sensitiviteit en specificiteit van de mutant k-ras gen detectiemethode.

Uit faeces van 30 colonkanker patiënten werd met de XT-RAX-methode DNA geïsoleerd. Middels hybridisatie met een humaan specifieke probe werd <0.5 tot >300 µg humaan DNA/gram faeces aangetoond. De kwetsbaarheid van DNA in faeces is onderzocht met betrekking tot invriezen, koelkast-op-

slag en incubatie bij kamertemperatuur. PCR (30-cycli) voor k-ras op minimaal 20 ng DNA geïsoleerd uit faeces, bleek in alle gevallen een EtBr-zichtbare band op te leveren. Voor de k-ras mutatie-detectie wordt een GAP-LCR methode gebruikt, waarmee momenteel een gevoeligheid van 1 mutant k-ras gen op een achtergrond van 1.000-10.000 wild-type k-ras genen wordt bereikt.

We concluderen dat we een relatief simpele procedure voor de isolatie van DNA uit faeces hebben, wat DNA oplevert dat geschikt is voor PCR. De hoeveelheid humaan DNA gevonden in faeces van colontumor patiënten varieert sterk, en is bij een aantal patiënten niet detecteerbaar. Dit heeft grote consequenties voor eventuele moleculaire diagnostiek die gericht is op het aantonen van gemuteerde genen middels amplificatie-technieken. Immers, een negatieve uitkomst heeft alleen waarde wanneer is geverifieerd dat een minimale hoeveelheid humaan DNA is onderzocht. De manier van verzamelen en opslag van faeces kan grote invloed hebben op de uiteindelijke DNA opbrengst.

48. Evaluatie Advia 120 van Bayer

C. BANK, J. de BLAHEY, Y. SENTURK en M. van der WELLE
Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Walcheren, Vlissingen

In het kader van de vervanging van de huidige celtel-apparaat werd de Advia 120 van de firma Bayer, in een periode van 2 weken, vergeleken met de in gebruik zijnde H1 systemen van Bayer. Voor $n=200$ monsters werden de parameters gecorreleerd met die van de H1 systemen. Goede correlatiecoëfficiënten ($r=0.9956$ tot $r=0.9598$) werden gevonden voor celparameters, met uitzondering van de vergelijking van de MCHC.

Voor de signalering afwijkende differentiaties (afkapwaarde >

3 staven of 1 atypisch lymfocyt) is voor de Advia 120 een sensitiviteit van 78% en een specificiteit van 60% bepaald.

Reproduceerbaarheid (binnen de dag en van dag tot dag) is goed. De houdbaarheid tot tenminste 24 uur na afname vertoonde geen afwijkingen. Geen aanwijzingen voor carry-over. Verbeterde meettechniek, verbeterde signalering en moderne software (Windows NT) met een uitgebreide help-functie maken de Advia 120 een geschikte opvolger van de, binnen ons laboratorium in gebruik zijnde, H1 systemen.

49. The influence of blood collection site on reference values for clinical chemical and hematological parameters

N. de JONGE, A. STEENKS, A. E. M. BALLERING, Y. V. WILDENBERG-KROON and A. J. P. F. LOMBARTS
Department of Clinical Chemistry, Leyenburg Hospital, The Hague, The Netherlands

The preferred site for collecting venous blood in adults is the median cubital vein in the antecubital fossa, since this vein is both large and close to the surface of the skin. Reference values of clinical laboratory analytes are usually based on blood collection from this site. However, this vein may not be used under certain circumstances (e.g. patients with uni- or bilateral paresis, patients with a cannula or arteriovenous fistula in the arm, after mastectomy, etc.). Veins at the ankle or foot offer a practical alternative. Diminished circulation, hemodilution with extravascular fluid or lymph, increased hydrostatic pressure, and metabolism, however, may influence the concentration of analytes found in blood samples obtained from different blood collection sites.

We studied the influence of blood collection site on reference values for 40 clinical chemical and haematological parameters, including electrolytes, enzymes, proteins, lipids, blood cell counts, and erythrocyte sedimentation rate (ESR). Blood was collected from 64 apparently healthy volunteers from both the arm and foot or ankle and analyzed according to standard

operating procedures. Results were analyzed by the paired t-test, with a p-value 0.05 for statistical significance.

Unsignificant differences were found for ALAT, calcium, creatinin, protein spectrum, sodium, TSH, urea, uric acid, erythrocytes, hemoglobin, hematocrite, MCV, MCH, platelets, RDW, and ESR.

Significantly lower results for blood obtained from ankle or foot compared to the arm were found for bicarbonate (-6.2%), glucose (-2.6%), and potassium (-2.1%).

Higher results were found for albumin (1.9%), alkaline phosphatase (1.8%), inorganic phosphate (2.5%), ASAT (2.4%), total bilirubin (2.5%), direct bilirubin (8.3%), chloride (0.8%), CK (1.0%), CK-MB (14.1%), cholesterol (1.5%), γ GT (1.7%), iron (4.6%), LD (4.1%), total protein (1.9%), triglycerides (3.5%) and leukocytes (1.9%).

Although statistical significant differences were found, these differences do not seem to be of clinical importance, implicating that the ankle or foot veins are good alternatives for the collection of blood samples.

50. First experiences with the Axis homocysteine EIA; a comparison with HPLC

F.J. HOEK¹ and J. van PELT²
Academic Medical Center, Clinical Chemistry Department, Amsterdam¹, St Maartens Gasthuis, Clinical Chemistry and Hematology Laboratory, Venlo²

Homocysteine is a parameter of increasing importance. So far, only HPLC methods were available for its quantification. Recently, however, an alternative method was introduced: the Axis homocysteine enzyme immunoassay.

Here the total homocysteine content of a sample is measured after reduction, followed by enzymatic conversion using bovine S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) hydrolase. The measurement is then performed by competitive immunoassay with a mouse antiSAH antibody.

The costs of the EIA kit are a serious obstacle for an evaluation of the method in the individual laboratory. Therefore, during the introductory period, exchange of results obtained may be of additional interest to the field. Here we report the combined experiences of a comparison of the Axis homocysteine EIA with HPLC in two Dutch hospital laboratories. In addition, the results of the comparison performed in Bergen (Norway) are added.

In this way a total of 100 results was available for analysis.

In a third of the samples the results were compared to the HPLC method of Ubbink, in the other monobromobimane was used as the fluorophore. No internal standardization was used. In 11 of the samples the HPLC result was in the range of 50 to 70 $\mu\text{mol/l}$, which is higher than the upper limit of 50 $\mu\text{mol/l}$ recommended for the Axis EIA, which corresponds to the highest standard.

The correlations between the methods were excellent with coefficients of 0.96 or better. Also the x-coefficients obtained in the separate laboratories were not significantly different from 1.00, between 0.945 and 1.116 (Passing and Bablok).

In 71 samples the average homocysteine concentration obtained with the two methods was below 30 $\mu\text{mol/l}$. In only 4 of those the difference between the methods was more than 5 $\mu\text{mol/l}$. This is of course still a substantial difference in or around the reference range (5-15 $\mu\text{mol/l}$). We observed a trend to lower results with the EIA than with HPLC in this range.

Above 30 $\mu\text{mol/l}$, 15 of 29 cases showed differences of more

than 5 µmol/l, but there were only 2 outliers with a difference larger than 10 µmol/l.

In our laboratories for three levels of controls the coefficients of variation were calculated. For each control nine values were available, after exclusion of outliers. Mean homocysteine levels of the controls were 6.0, 10.1 and 21.9 µmol/l. The CV's found were 7.6%, 11.1% and 7.3% respectively.

Analysis of samples in 1:1 dilution with assay buffer gave good recoveries.

Conclusions: Even without a familiarization period the results for the Axis homocysteine EIA are good. The test is easy to perform and gives results with good interlaboratory comparability. The variability of the results is higher than with HPLC.

51. Evaluation of the Immulite 2000 automated immunoanalyzer

J.L.P. van DUIJNHOF, J.J. TREPPELS, and A.J.W.P. WILLEMS
Clinical Laboratory, Elkerliek Hospital, Helmond, The Netherlands

The Immulite 2000 (Diagnostic Product Corporation, Apeldoorn, The Netherlands (y)) was evaluated and recently introduced into our laboratory. We studied seven immunoassays (free T4, total T3, LH, FSH, prolactin, ferritin and 3rd generation TSH), and compared the results with our former system (ES-607, Boehringer Mannheim, Almere, The Netherlands (x)). We estimated between run imprecision (patient sera and commercially available QC samples, 3 levels each, n=12), drift, adjustment-stability, linearity (EP-6), correlation with our current method (Passing and Bablok statistics, $y = a + b \cdot x$,

n=70), and the 27 sample Krouwer multifactor design protocol, to simultaneously estimate slope and intercept, drift, linearity, sample carryover and within run imprecision. Additionally, we assessed the random-access capabilities and ease of use in routine operation. Results: Adjustments didn't cause any shifts and drift was not observed. Imprecision results (CV) of patient pools and commercial controls (presented in the table below) were comparable. The following specifics were noted (table):

Assay:	Units:	Between-run CV%						P&B regression			Linearity (N=not)	
		Conc	CV%	Conc	CV%	Conc	CV%	b	a	r	Krouwer	EP-6
Free T4	pmol/l	7.0	9.7	21.7	9.6	58.5	3.8	1.34	-0.83	0.961	NA	NA
TSH	mIU/l	2.8	4.2	10.2	6.4	34.3	7.2	0.89	0.02	0.996	Linear	Linear
Total T3	nmol/l	0.7	14.5	2.1	6.7	3.8	6.7	1.10	-0.45	0.919	N-linear	Linear
LH	IU/l	4.4	7.4	23.2	5.8	68.3	5.2	0.97	-1.18	0.983	Linear	Linear
FSH	IU/l	10.0	4.5	14.1	4.8	40.2	5.8	0.93	-0.18	0.992	N-linear	Linear
Prolactin	mIU/l	234	5.3	358	3.9	1088	4.1	0.84	-40.4	0.990	Linear	N-Linear
Ferritin	µg/l	27	11.4	147	2.8	428	4.0	1.07	-0.5	0.994	Linear	Linear

The Immulite 2000 is linked to our laboratory information system by a bi-directional interface (host-query). For thyroid testing, we use an automated reflexive testing protocol. Conclusion: the modern layout of the instrument, easy of use, long

walk-away time, minimal maintenance, reliability, as well as the analytical performance make this instrument highly suitable for implementation in an automated clinical laboratory.

52. Evaluatie van een volbloed kreatinine-meting met de NOVA 16 CRT analyser

T. BRUIN¹, M. NIERS² en G.T. SANDERS¹

Afdeling Klinische Chemie, Academisch Medisch Centrum¹, Amsterdam en Menarini Benelux, Valkenswaard²

Het bepalen van kreatinine bij behandeling van patiënten met een nierfunctiestoornis gebeurt tot op heden in bloedplasma. De uitslag is echter niet direct bekend. Wij hebben een kreatinine bepaling geevalueerd waarbij in volbloed kreatinine m.b.v. een biospecifieke elektrode wordt gemeten. Hierdoor kan de uitslag veel sneller bekend zijn, hetgeen grote voordelen geeft wat betreft diagnose en behandeling van de patiënt. Het doel van de evaluatie van de volbloed kreatinine meting op de NOVA 16 CRT analyser is om na te gaan of deze methode voldoet aan de eisen die aan een kreatinine bepaling worden gesteld.

De evaluatie van de NOVA 16 CRT is gedaan m.b.v. de EP-5 (precisie), EP-6 (lineariteit) en Krouwer-27 (drift en carry-over) protocollen. De methodenvergelijking met de enzymatische plasma kreatininemeting (Boehringer) op de Hitachi 747 is gedaan volgens Passing & Bablok. De totale imprecisie van

de kreatinine bepaling is 7.6% bij 303 µmol/l, 7.0 % bij 90.6 µmol/l en 17.8 % bij 40.2 µmol/l. Monster carry-over was niet aanwezig, echter er was wel drift aantoonbaar. De lineariteit is gemeten tussen 0 en 1000 µmol/l en is goed. De correlatie tussen beide methoden is goed ($r = 0.97$). De helling van de regressielijn (slope = 0.90) was afwijkend maar de asafsnijding niet (intercept = -1.400 (n = 111)).

Concluderend: de kreatinine meting met een biospecifieke elektrode op de NOVA 16 CRT voldoet niet aan de criteria voor een analytische CV onder de 2.4%, zoals aanbevolen op basis van intra-individuele variatie voor een kreatinine bepaling. Echter, als citobepaling in een decentrale setting, bijv. op een intensive care, kan het zeker van dienst zijn. De vraag die dan echter gesteld moet worden is waar de prioriteiten liggen; een snelle kreatinine maar iets minder betrouwbare uitslag, of een meer exacte uitslag na 45 minuten.

53. Heeft frequent prikken van capillair bloed invloed op de pre-analytische fase van laboratorium bepalingen?

T. BRUIN¹, J.C. de GRAAFF², G.J. HEMMES³, D.TH. UBBINK², R.P.J. MICHELS³ en G.T. SANDERS¹

Afdeling Klinische Chemie¹, Chirurgie² en Inwendige Geneeskunde³ van het Academisch Medisch Centrum, Amsterdam

Diabetes patiënten bepalen hun eigen bloed glucose gehalte uit een vingerprik. Als dit gedurende langere tijd gebeurt, ontwikkelt zich mogelijk littekenweefsel op de vingertoppen. De microcirculatie in de vingertop kan hierdoor veranderen, met een mogelijke invloed op de lokale samenstelling van het bloed en dus ook op de pre-analytische fase van laboratoriumbepalingen. In deze studie is onderzocht of frequent prikken in de vinger invloed heeft op de microcirculatie van de huid, gemeten m.b.v. een laser Doppler perfusie monitor, en of er verschillen zijn in laboratorium uitslagen van een cholesterol- en een glucose bepaling in vergelijking met een vinger waarin niet geprikt wordt.

De patiënten in deze studie met type I diabetes mellitus (23 mannen en 27 vrouwen) hebben zich gedurende gemiddeld 13 jaar in de vingers geprikt. De huiddoorbloeding gemeten m.b.v. een fluxtoename na arteriele occlusie is $0,98 \pm 0,72$

Volt voor de "prik"vinger en $1,04 \pm 0,79$ Volt voor de "controle"vinger, en dus niet significant verschillend. De gemiddelde cholesterolconcentratie in capillair bloed van de prikvinger is $5,15 \pm 1,07$ mmol/l en in de controlevinger $5,17 \pm 1,03$ mmol/l. Voor de capillaire glucose concentraties zijn deze resultaten respectievelijk $10,1 \pm 4,7$ mmol/l en $10,2 \pm 4,4$ mmol/l. Er waren ook geen significante verschillen tussen de laboratorium bepalingen aantoonbaar.

Uit de resultaten blijkt dat het gedurende lange tijd herhaald prikken in de vingertoppen geen significante invloed heeft op de huiddoorbloeding van de vingers. Bovendien blijkt dat er geen significant verschillen optreden bij de cholesterol- en glucose bepaling uit capillair bloed. Er kan dan ook geconcludeerd worden dat frequent prikken van capillair bloed geen invloed heeft op de pre analytische fase van deze laboratorium bepalingen.

54. Vergelijking van vier flowcytometrische technieken voor de detectie van apoptose

R. OVERBEEKE, I. VERMES, C. REUTELINGSPERGER² en C. HAANEN

Klinisch Chemisch Laboratorium, Medisch Spectrum Twente, Enschede, Universiteit Maastricht²

Vier veel gebruikte flowcytometrische apoptose-detectietechnieken werden onderzocht op sensitiviteit, specificiteit en reproduceerbaarheid.

Apoptose, ofwel geprogrammeerde celdood, werd geïnduceerd door middel van bestraling in twee T-lymfoblastaire cellijnen, HSB en Jurkat.

HSB- en Jurkatcel monsters werden gemeten voor bestraling en op de tijdstippen 0, 2, 4, 6, 8 en 24 uur na bestraling met respectievelijk 6 en 10 Gy en 10 en 14 Gy. De volgende vier flowcytometrische detectietechnieken werden getest: 1) de annexine V/propidiumjodide bepaling, deze techniek toont de translocatie van fosfatidylserine aan naar de buitenkant van de celmembraan. Tegelijkertijd wordt er gekeken naar de integriteit van de membraan. 2) Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) Uridin Triphosphate (UTP) Nick End Labeling (TUNEL), met deze techniek worden specifieke ds DNA-

breuken die tijdens apoptose ontstaan aangetoond. 3) DNA-flowcytometrie, waarmee de hoeveelheid DNA in de celkern wordt gemeten. 4) Phycoerythrine (PE)-gelabelde APO2.7 test, een monoclonaal antilichaam tegen het 7A6 antigeen, een eiwit dat tijdens celdood tot expressie komt op het mitochondriaal membraan.

Als gouden standaard voor apoptose werd de DNA elektroforese meegenomen om het voor apoptose specifieke ladderpatroon zichtbaar te maken. Tevens werden de cellen morfologisch beoordeeld met behulp van microscopie.

Uit het onderzoek bleek dat de expressie van het 7A6 antigeen op het mitochondriale membraan niet specifiek is voor apoptotische celdood. De fluoresceïne isothiocyanaat (FITC)-gelabeld annexine V/propidiumjodide bepaling bleek de minst tijdrovende en de meest gevoelige en specifieke flowcytometrische methode te zijn voor de detectie van apoptose in celsuspensies.

55. Soluble Fas: een indicator voor apoptose ex vivo?

R. OVERBEEKE en I. VERMES

Klinisch Chemisch Laboratorium, Medisch Spectrum Twente, Enschede

Fas/Apo-1 (CD95) is een glycosylerd transmembraan-eiwit dat familie is van de TNF receptor. Ligatie van Fas resulteert in een snelle inductie van apoptose.

Nu is aangetoond dat bij sommige ziekten een oplosbaar Fas molecuul (sFas) aanwezig is in het perifere bloed. Door aanwezigheid van sFas zou apoptose van de cel geremd worden doordat het Fas-ligand bindt aan de oplosbare moleculen. De sFas ELISA is een techniek voor de kwantitatieve detectie van oplosbaar humaan Fas (Apo-1) in cultuur-supernatant, humaan serum, plasma of andere lichaamsvloeistoffen.

Het doel van dit onderzoek was om te testen of het mogelijk is m.b.v. de sFas ELISA methode apoptose ex vivo aan te tonen en om de betrouwbaarheid van deze methode te testen.

Voor de meting werd gebruik gemaakt van een met anti-sFas gecoate microtiterplaat. Het sFas, dat aanwezig is in het monster, bindt aan het monoclonale antilichaam. Daarna wordt er biotine-geconjugeerd anti-sFas toegevoegd dat bindt aan het

sFas. Streptavidine-HRP bindt vervolgens aan het biotine en er ontstaat een gekleurd product na toevoegen van TMB-substraat. Een sFas positief monster en de te onderzoeken monsters werden gemeten bij een golflengte van 450 nm. Over de reproduceerbaarheid kan gezegd worden dat de techniek betrouwbaar is. De berekende variatiecoëfficiënt is: 2,2 %.

De volgende monsters werden onderzocht: 10 normale sera, 9 sera van SLE patiënten, 20 sera van sepsis-patiënten, 10 normale liquoren en 20 liquoren van Alzheimerpatiënten.

Uit het onderzoek bleek dat de normale monsters, zowel liquoren als sera, en de liquoren van Alzheimerpatiënten beneden de detectiegrens van 1,5 ng/ml sFas liggen. De sera van SLE patiënten bleken alle positief. Uit het onderzoek bleek dat de concentratie sFas in sera van sepsispatiënten correleert met de ernst van het ziektebeeld.

De sFas ELISA geeft bij sommige ziekten aanwijzing voor het bestaan van een apoptose fenomeen in het bloed.

56. Precisie en juistheid van een HPLC methode voor het meten van concentraties van porfyrynes in urine

F.M.J. ZUIJDERHOUDT, J. DORRESTEIJN-de BOK en S.G.A. KOEHORST

Afdeling Klinische Chemie, Deventer Ziekenhuis, Deventer

Er is in de literatuur niet veel te vinden omtrent precisie en juistheid bij de bepaling van individuele porfyrynecomponenten in urine zoals gemeten met HPLC.

Kwaliteitscontroleprogramma's van de SKZL en het Yorkshire Regional Analytical Committee geven sterk wisselende resultaten waarbij interlab variatiecoëfficiënten vaak vele tientallen procenten bedragen.

Hoewel waarschijnlijk kalibratieverschillen of het ontbreken van kalibratie een rol spelen, vroegen wij ons tevens af hoe groot de bijdrage van variatie in de precisie kan zijn. Voor deze studie kozen wij urinemonsters van patienten met leverziekte zonder porfyrie, porfyria cutanea tarda, acute intermitterende porfyrie, porfyria variegata en hereditaire coproporfyrie. Tevens werd een controle urine meegenomen. De totale porfyryne gehalten van de urines waren licht tot matig verhoogd (300 - 1200 nmol/l; referentiewaarde < 285 nmol/l).

Elk urinemonster werd in porties verdeeld, afgeschermd van licht en diepgevroren bewaard. In opeenvolgende weken werden de porfyrynes in elk monster één keer per week gemeten

(n=6 weken) waarbij de HPLC methode gekalibreerd werd met speciale kalibratie- mengsels (Sigma) of werd uitgevoerd (n=4 weken) met een niet gekalibreerde oplossing (S) met opgegeven concentraties (Sigma). In beide reeksen werden deze oplossingen (S) als standaard gebruikt.

Gemeten werden de uro-, hepta-, hexa-, penta-, en coproporfyrynes (I en II).

Variatiecoëfficiënten varieerden meestal tussen 2% en 10% doch waren zoals te verwachten hoger bij erg lage concentraties van sommige porfyrynes.

De resultaten van bepalingen waarbij niet gekalibreerd was weken alleen voor de uro- en heptaporfyryneconcentraties sterk af van de resultaten verkregen na kalibratie (resp. 27% en 21%).

De resultaten tonen dat de precisie goed in de hand te houden is doch dat grote verschillen vooral bij de uro- en heptaporfyryneconcentraties kunnen optreden als geen gebruik gemaakt wordt van speciale kalibratiematerialen.

57. Drug use on raves; some laboratory and demographic data

L.J. MOSTERT¹, D.E. de BRUIN², N.J.M. MAALSTE² and G.F. van de WIJNGAART²

Deltalab, Delta Psychiatric Hospital, Poortugaal¹, CVO Addiction Research Institute², Utrecht University

Use of XTC (MDMA) and XTC-analogues is popular among youth visiting raves. Until now few reliable data are available from XTC users which were interviewed and tested on site at the raves.

In a large study in the Netherlands, which was initiated by the Ministry of Health, drugs use on raves was investigated by means of a structured questionnaire. On 10 different raves 1121 visitors were interviewed and on 3 raves 312 visitors were also asked to deliver 2 urine samples; one at the beginning of the party and one at the end. Drugscreening on cannabinoids, opiates, amphetamines, cocaine and alcohol was performed by EMIT[®]. Analysis of MDMA (XTC) and analogues was performed by GC/MS.

From the interviews the following data were obtained; most of the visitors are Dutch (88%), male (70%), have an age of 18-24 (65%), live with their parents (68%), have a (full time) job 44% or go to school (51%), are visiting parties regularly (13-52/year, (53%)) and like hardcore raves most (73%).

Of the urine samples 68% were positive on MDMA or analogues, 37% on amphetamine, 11% on cocaine metabolite and 41% on cannabinoids. The overall agreement between the analytical results and the self reported data of the questionnaire was more than 90% which means that questionnaires are considered to be a valid instrument to investigate drug use of youth visiting raves.

58. Bepaling van totaal lichaamswater met een "contineous flow" isotoop ratio massaspectrometer (GC/CF-IRMS)

B.K. van KREEL

Afdeling klinische chemie, Academisch Ziekenhuis Maastricht

Het bepalen van de voedingstoestand (nutritional assessment) van patiënten komt in de praktijk neer op het vaststellen van de cel massa c.q. het intracellulaire water (ICV).

Dit wordt verkregen door het totaal lichaamswater (TBW) en het extra cellulaire water (ECV) te bepalen en deze van elkaar af te trekken. $ICV = TBW - ECV$.

De gangbare methode voor de TBW bepaling berust op het bepalen van de verdunning van een dosis D₂O. Indien men de beschikking heeft over een GC/CF-IRMS waar Helium als drager gas wordt gebruikt, ontstaan problemen indien men bij massa 3 en 4 wil meten. Reductie van D₂O tot D₂ voorafgaande aan de meting is dan ook niet de aangewezen weg.

In ons laboratorium werd een methode ontwikkeld om water om te zetten in acetyleen. Hiertoe wordt 350 mg CaC₂ (carbide) in een vacuütkamer gedaan; de buizen worden geëvacueerd

en 25 µl monster (urine, speeksel of serum) op het carbide gespoten. Vervolgens worden de buizen op een monsterwisselaar geplaatst en wordt de 27/26 massa ratio gemeten. De verdunning wordt bepaald door de 27/26 ratio te vergelijken met een verdunningsreeks van het D₂O dat is toegediend. De methode werd vergeleken met een methode die gebruik maakt van de omzetting van H₂O in H₂ in een reductie oven (geen continuous flow!) met behulp van een "dedicated instrument", de Aqua-Sira. De voordelen van de hier beschreven methode zijn o.a. geen monstervoorbereiding, geen "memory" effecten zoals aanwezig bij het gebruik van een reductie oven, patiëntvriendelijk, urine of speeksel monsters geven dezelfde verrijking als serum. Een nadeel is dat bij het gebruik van een isotoop ratio MS één Faraday cup moet worden gerepositieerd.

59. Langere bewaartijd van urine monsters bij kamertemperatuur met behulp van StabilurR tabletten

W. van GELDER en C. PRONK

Klinisch Chemisch laboratorium, Drechtsteden Ziekenhuis Dordrecht

Inleiding: Het basale urineonderzoek biedt de mogelijkheid om snel en betrouwbaar de klinische conditie van nieren en urinewegen te beoordelen. Een groot nadeel is echter dat de samenstelling van urine niet stabiel is. Binnen enkele uren na lozing zal - zonder de juiste voorzorgsmaatregelen - de concentratie van een aantal componenten in de urine (bijv. leukocyten) snel afnemen. Daarnaast is de samenstelling van de urine sterk afhankelijk van het tijdstip van lozing.

In dit onderzoek wordt een eenvoudige techniek beschreven om urinemonsters gedurende langere tijd (24-48 uur) stabiel te houden voor basaal urine onderzoek.

Materialen en methoden: Aan 205 urinemonsters werd binnen 1 uur na lozing een Stabilur^R tablet (Instruchemie, Nederland) toegevoegd en de monsters werden gedurende 5 dagen bij kamertemperatuur bewaard. Dagelijks werd de samenstelling van de monsters beoordeeld met behulp van Multistix reagens strips afgelezen op een Clinitek 200+. De resultaten werden geanalyseerd met de Friedman parameter vrije test voor k-gerelateerde samples.

Resultaten: Bij analyse van verse urine monsters (< 2 uur na lozing) werd geen verschil gevonden tussen monsters met en

zonder Stabilur^R. Leukocyten, eiwit, glucose, ketonen, pH, en nitriet resultaten vertoonden geen statistisch significante verschillen gedurende de eerste 5 dagen. De erythrocyten concentratie daalde significant vanaf dag 2 ($p < 0,05$), maar dit verschil verdween nagenoeg wanneer de monsters met een initiële erythrocyten score "spoor" buiten beschouwing werden gelaten. Deze gegevens werden bevestigd met behulp van microscopische sediment analyse.

Inmiddels is in het Drechtsteden Ziekenhuis al een aantal maanden ervaring opgedaan met deze techniek.

Conclusies:

- Met behulp van Stabilur^R tabletten kan men urinemonsters gedurende langere tijd (24 - 48 uur) stabiliseren bij kamertemperatuur.
- De techniek kan eenvoudig worden geïntroduceerd op klinische afdelingen van ziekenhuizen en vergt geen speciale apparatuur (bijv. koelkast).
- Op deze wijze wordt een meer efficiënte verwerking van routine urine onderzoeken buiten kantooruren bewerkstelligd.

60. Meting van ¹⁵NH₃ verrijking voor de bepaling van totaal eiwit turnover, met behulp van de ¹⁵NGlycine methode

B.K. van KREEL

Afdeling klinische chemie, Academisch Ziekenhuis Maastricht

Alhoewel de exacte bepaling van de turnover van een specifiek eiwit slechts mogelijk is indien de verrijking van de precursor (m-RNA-AZ) bekend is, wordt al sinds 1949 de ¹⁵NGlycine methode gebruikt om een indruk te krijgen over de gemiddelde eiwit turnover.

In de kliniek wordt deze methode veel gebruikt omdat ze niet invasief is, weinig tijd kost en poliklinisch of zelfs buiten het ziekenhuis kan plaatsvinden. De methode komt er op neer, dat de patiënt op tijdstip nul een dosis ¹⁵NGlycine drinkt en vervolgens gedurende 9 uur zijn urine verzamelt. Aan de hand van o.a. de ¹⁵NH₃ verrijking in de urine kunnen de turnover, afbraak en opbouw worden berekend. Voor het bepalen van de ¹⁵NH₃ verrijking is een eenvoudige methode ontwikkeld. Urine wordt eventueel drooggevroren ter concentratie van de NH₃ (in de vorm van NH₄Cl), vervolgens wordt dit in een klein volume opgelost. Er wordt nu één "diffusie vaatje" geassembleerd, bestaande uit een 100 cc flesje waarin 10 µl HCl

op de bodem wordt gepipetteerd. Aan een kleiner flesje (2 cc) wordt 400 mg CaO gedaan en dit wordt in het grote flesje geschoven. Het grote flesje wordt nu met een rubber dop afgesloten. Vervolgens wordt 100 µl geconcentreerde urine door middel van een injectie op de ongebluste kalk gespoten. Het water wordt chemisch gebonden en het resulterende NH₃ gas diffundeert in de HCl waarbij het als NH₄Cl wordt geïmmobiliseerd. Na 15' is het diffusie proces ten einde. Het NH₃ kan met behulp van hypobromide in N₂ worden omgezet en gemeten in een isotoop ratio massa spectrometer (IRMS). De tijd nodig voor de eigenlijke meting is 2 minuten; dit is voordelig. De methode is eenvoudig snel (de vriesdroog stop is vaak overbodig), terwijl alle handelingen door de onderzoeker zelf kunnen worden uitgevoerd tot op het moment waarop de hypobromide wordt toegevoegd. Op dit moment wordt de methode in Maastricht o.a. gebruikt om het effect van dieet op kinderen met groeistoornissen te bestuderen.

61. Dielectrische spectroscopie

B.K. van KREEL

Afdeling klinische chemie, Academisch Ziekenhuis Maastricht

Dielectrische spectroscopie is een fysische methode die wordt toegepast in o.a. de polymeer chemie. Een techniek die hieraan verwant is, is de multi frequency-bio-impedance (MFBIA). In principe berust de methode op het feit dat de impedantie die gemeten wordt als gelijkstroom door het lichaam wordt gestuurd, wordt bepaald door het extracellulaire volume (ECV). De impedantie bij hoge frequentie (waar de cellen ook geleiden) is een maat voor het totaal lichaamswater (TBW). Indirect is het dus mogelijk het totale cel volume te bepalen (ICV). De benodigde apparatuur is relatief goedkoop, makkelijk verplaatsbaar en de meetmethode niet invasief. Het ICV is de belangrijkste parameter voor het vaststellen van de voedings-toestand ("Nutritional assessment"). Indirect kan hiermee ook

de hoeveelheid vet worden bepaald. Binnen de klinische chemie zou het ICV de plaats moeten innemen van het gewicht bij de grootheden die worden uitgedrukt per kg. zoals bij 24-uurs creatinine uitscheiding per kg., totale eiwit turnover etc. Ook biedt de MFBIA in principe de mogelijkheid plaatselijk vocht-ophoping te kwantificeren.

Teneinde na te gaan in hoeverre deze methode betrouwbare resultaten oplevert, werd een model opgesteld dat de impedantie van het menselijk lichaam weergeeft. Dit fysisch model bevat alle fysische parameters zoals lengte, gewicht, specifiek geleidingsvermogen etc., en geen grootheden waaraan geen fysische betekenis kan worden toegekend zoals geslacht, leeftijd etc. Een dergelijk model bevat minstens één onbekende

onevenredigheidsconstante, die moet worden bepaald door de door het model voorspelde TBW en ECV, verkregen door impedantie metingen te vergelijken met TBW en ECV, die werden bepaald met een verdunningsmethode. Voor deze vergelijking werd een heterogene groep van patiënten genomen waarbij het TBW door D₂O verdunning werd bepaald en het TBW werd bepaald door impedantie meting. De correlatie, uitgevoerd tussen deze twee metingen, verschaft ons de onbekende constante. De regressie coëfficiënt ($R^2 = 0.96$) is een maat voor het succes van het model. In het ideale geval zal de asafsneede nul zijn. De verkregen evenredigheidsfactor wordt nu aan het model toegevoegd. Men is nu in staat TBW te bere-

kenen met behulp van impedantie metingen. Bij een nieuwe groep patiënten werd nu TBW bepaald door middel van MFBIA en tevens door D₂O dilutie. De resultaten werden vergeleken door middel van de methode van Altman, met als resultaat dat twee keer de SD van de grootte $TBW_{D2O} - TBW_{BIA}$ kleiner is dan 3 l. Dit resultaat stemt optimistisch. Echter, de mogelijkheden van de impedantie metingen zijn hierbij niet uitgeput. Indien in de toekomst door verder onderzoek blijkt dat TBW op deze manier betrouwbaar bij iedere individuele patiënt gebruikt kan worden, heeft het de voorkeur boven D₂O verdunning, mede omdat de resultaten binnen de 5 minuten (inclusief rekenen) beschikbaar zijn.

62. Adsorptie aan glas: een valkuil bij de kwantificering van organische zuren in urine

A.A.J. van LANDEGHEM¹, Y. SOMERS-PIJNENBURG¹, W. SOMERS¹, C. STOKWIELDER¹, W. de BRUYN¹ en G. van den BERG²

Centraal Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg¹ en De Hondsborg, Oisterwijk²

Uit resultaten van externe kwaliteitscontroleprogramma's voor kwantificering van organische zuren blijkt dat de gebruikte methoden voor verbetering vatbaar zijn. Reproduceerbaarheid en recovery zijn in het algemeen matig en de spreiding tussen laboratoria is groot. Een aantal zaken kunnen hieraan ten grondslag liggen: voorbereiding, keuze van interne standaard, de manier waarop responsfactoren worden bepaald, calibratie van de massadetector etc.

Wij constateerden herhaaldelijk een verschil in regressielijnen van m.n. kleine hydroxy-zuren v.w.b. lineariteit en spreiding rond de lijn wanneer in de voorbereiding al of niet een ethoximeringsstap werd ingebouwd en ook wanneer bij kwantificering een interne danwel externe standaardmethode werd gebruikt. Vermoedelijk speelde adsorptie aan glas hierbij een rol. Dit fenomeen werd nader onderzocht.

- 1 Een mengstandaard van een negental organische zuren (hydroxy- en niet hydroxy-zuren) in methanol werd in vijfvoud in glasbuizen (regelmatig gebruikt en o.a. met zuur gereinigd), gesilyleerde glasbuizen en teflonbuizen gepipetteerd, drooggedampt en gesilyleerd.
- 2 Dezelfde mengstandaard, opgelost in gestripte urine, werd in verschillende concentraties in twee-voud in glasbuizen

en teflonbuizen gepipetteerd, geëthoximeerd, aangezuurd, verzadigd met NaCl, geëxtraheerd, drooggedampt en gesilyleerd.

De monsters werden pulse-splitless geïnjecteerd op een HP 5890 gaschromatograaf, gekoppeld aan een HP 5971 A massa-selectieve detector.

De respons (recovery) van hydroxy-zuren en in mindere mate van 3-phenyl-boterzuur (interne standaard) is nagenoeg gehalveerd t.o.v. teflon en gesilyleerd glas wanneer in gewoon glas wordt gewerkt. Voor niet-hydroxy-zuren wordt dit verschil niet gevonden. Tussen gesilyleerd glas en teflon bestaat geen verschil.

Variatiecoëfficiënten van respons van hydroxy-zuren en 3-phenyl-boterzuur zijn dramatisch hoger wanneer in glas wordt gewerkt en variëren van 15 tot 35%. In gesilyleerd glas en teflon blijven die voor zowel hydroxy- als niet-hydroxy-zuren onder de 7%.

De regressielijnen van kleine hydroxy-zuren, voorbereid in glas, gaan niet door nul, i.t.t. die in teflon. Pas bij hogere concentraties wordt de respons lineair.

Voor betrouwbare kwantificering van organische zuren is het gebruik van teflon of gesilyleerd glaswerk aan te bevelen.

63. De ABL™ SYSTEM 625 glucose biosensor: levensduur en betrouwbaarheid

H. M. BAKKER en P. BIJSTER

Centrum Klinische Laboratoria, Martini Ziekenhuis, Groningen

De belangstelling voor betrouwbare glucose metingen in volbloed met korte 'turn around time' is de laatste jaren toegenomen. We hebben de performance van de RADIOMETER ABL 625 glucose biosensor membraan over een periode van 12 weken getest. De door de fabrikant gegarandeerde levensduur is 1 maand. Dit is gedaan door dagelijks vier levels van RADIOMETER QUALICHECK™ 4 Metabolite te meten in enkelvoud. De streefwaarden voor de 4 kwaliteitscontroles waren respectievelijk $13,2 \pm 1,5$; $5,6 \pm 0,8$; $2,4 \pm 0,5$ en $-0,1 \pm 0,4$ mM glucose (gemiddelde \pm controle grenzen). Gevonden over de hele periode werd respectievelijk $13,1 \pm 0,37$; $5,6 \pm 0,14$; $2,3 \pm 0,08$ en $-0,1 \pm 0,10$ mM glucose (gemiddelde \pm SD). Over de totale periode bezien was er alleen in de QC met hoge glucose (level 1) een geringe dalende trend zichtbaar.

Dagelijks werden ook drie plasma pools gemeten, aan twee pools was extra glucose toegevoegd. De pools werden 'at random' in triplo gemeten. De gemiddelde glucose concentraties in de pools waren respectievelijk: pool A 6,0 mM, pool B 10,1 mM en pool C 25,0 mM glucose. De berekende variatie coëfficiënten voor de drie pools over de 12 weeks periode zijn (weergegeven als % VC):

	within run	day-to-day	totaal
pool A	1,6	1,5	2,2
pool B	1,3	1,3	1,8
pool C	1,2	2,0	2,3

Van een aantal monsters (N=18) werd de resultaten verkregen met de ABL 625 vergeleken met de BECKMAN SYNCHRON CX-7. Uit een heparine-gelbuis met bloed werd, na afkoeling op ijswater, met een injectiespuit een monster getrokken en in duplo gemeten op de ABL 625. Tegelijkertijd werd de gelbuis koud afgedraaid. Uit de plasmafase werd glucose op de CX-7 bepaald. De correlatie volgens Passing-Bablok geeft de lijn: $ABL = -0,325 + 0,987 * CX-7$; r (lineaire regressie) = 0,998.

Conclusie: De glucose meting op de ABL625 is betrouwbaar en de levensduur van de membranen is aanzienlijk langer dan de gespecificeerde maand. Vergelijking met SYNCHRON CX-7 levert een goede correlatie op.

64. De ABL™ SYSTEM 625 lactaat biosensor, levensduur en betrouwbaarheid

H. M. BAKKER en P. BIJSTER

Centrum Klinische Laboratoria, Martini Ziekenhuis, Groningen

De laatste jaren is de belangstelling voor lactaat metingen in volbloed toegenomen. Lactaat concentraties kunnen dienen als een prognostische index en geven een indicatie van metabole ontregeling bij ernstig zieke patienten.

We hebben de performance van de RADIOMETER ABL 625 lactaat biosensor membraan over een periode van 12 weken getest. De door de fabrikant gegarandeerde levensduur is 1 maand. Dit is gedaan door dagelijks vier levels van RADIOMETER QUALICHECK™ 4 Metabolite te meten in enkelvoud. De streefwaarden voor de 4 kwaliteits controles waren respectievelijk $9,0 \pm 1,2$; $4,5 \pm 0,7$; $1,3 \pm 0,4$ en $-0,1 \pm 0,4$ mM lactaat (gemiddelde \pm controle grenzen). Gevonden over de hele periode werd respectievelijk $8,9 \pm 0,14$; $4,4 \pm 0,08$; $1,3 \pm 0,02$ en $0,0 \pm 0,05$ mM lactaat (gemiddelde \pm SD). Over de totale periode bezien was er geen stijgend of dalende trend zichtbaar.

Dagelijks werden ook drie plasma pools gemeten, aan twee pools was extra lactaat toegevoegd. De pools werden 'at random' in triplo gemeten. De gemiddelde lactaat concentraties in de pools waren respectievelijk: pool A 1,8 mM, pool B 9,2 mM en pool C 4,6 mM lactaat. De berekende variatie coëfficiënten voor de drie pools over de 12 weeks periode zijn (weergegeven als % VC):

	within run	day-to-day	totaal
pool A	3,1	2,0	3,7
pool B	1,5	1,9	2,4
pool C	1,7	1,6	2,3

Van een aantal monsters (N=18) werd de resultaten verkregen met de ABL 625 vergeleken met de op lactaatdehydrogenase gebaseerde methode van Sigma. Uit een heparine-gelbuis met bloed werd, na afkoeling op ijswater, met een injectiespuit een monster getrokken en in duplo gemeten op de ABL 625. Tegelijkertijd werd de gelbuis koud afgedraaid. Van de plasmafase werd 0,5 ml overgebracht in 1,0 ml koude perchloorzuur. Uit het supernatant werd in duplo lactaat bepaald volgens de Sigma methode. De correlatie volgens Passing-Bablok geeft de lijn: $ABL=0,102 + 0,961*Sigma$; r (lineaire regressie) = 0,999.

Conclusie: De lactaat meting op de ABL625 is betrouwbaar en de levensduur van de membranen is aanzienlijk langer dan de gespecificeerde maand. Vergelijking met de bewerkelijke Sigma methode levert een goede correlatie op.

Klinische studies

Allergie

65. Aspergillus fumigatus – specific IgG and IgE in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis

J. BROUWER

Diagnostic Centre SSDZ Delft, The Netherlands

Patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) contain increased concentrations of both A.fumigatus-specific IgG (IgG-Af) and A.fumigatus-specific IgE (IgE-Af). Because the concentration of IgG-Af is more than 100 times higher than the concentration of IgE-Af, IgG-Af will compete for the binding of IgE-Af to Af-antigens as measured by means of RASTs.

In order to study the effect of IgG-Af in the RASTs for IgE-Af (M3), I determined IgE-Af in sera from patients with ABPA in different ways: in neat serum (a), in diluted serum (b), and in diluted serum after adsorption of IgG on protein A-Sepharose (c).

Results for IgE-Af, in U/ml, were as follows.

a: 1.2 – 80 (mean 23)

b: 4 – 320 (mean 74)

c: 5 – 350 (mean 80).

Conclusions:

- When neat serum from patients with ABPA is used in the RAST for IgE-Af (M3), the measured concentration is underestimated by a factor 1.4 – 7.5 (mean 3.2).
- When IgE-Af is reported in RAST classes (0 to 5 +) the results obtained with diluted sera differ from the results obtained with undiluted sera with 0 (n=5), 1 (n=9) or 2 (n=1) class(es). Results in U/ml should only be reported after analyses of diluted sera.
- IgE-Af can be determined in diluted sera without the need to remove IgG

Neurologie en psychiatrie

66. Pretherapeutisch genotyperen van cytochroom P450 2D6

M.A.M. BON¹, F.A.J.T.M van den BERGH¹, C. NEEF², E. NOORTHOORN³, E. ZIJLSTRA³, H. KRAAN³ en I. VERMES¹

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Klinische Farmacie², Medisch Spectrum Twente, Twents Psychiatrisch Ziekenhuis³, Enschede

Veel psychotrope geneesmiddelen worden gemetaboliseerd door het cytochroom P450 2D6 (CYP2D6) enzym systeem. Individuen met een bepaald CYP2D6 genotype hebben een verhoogde kans op bijwerkingen bij normdosering, anderen

hebben juist een verlaagde gevoeligheid voor het geneesmiddel. Er zijn drie typen metaboliseerders:

- Extensive metabolisers (EM): individuen met een normale dosis-respons-curve.

- Poor metabolisers (PM): individuen met een verlengde dosis-respons-curve. Het geneesmiddel wordt langzamer omgezet en dus meer kans op bijwerkingen.
- Ultra-extensive metabolisers (UEM): te snelle dosis-respons-curve.

Het anti-depressivum nortriptyline (NT) wordt alleen door het CYP2D6 enzymstelsel gemetaboliseerd. Dit houdt in dat het een zeer goed te gebruiken substraat is voor studies naar fenomen genotypering. De studie is gericht op het vaststellen van de specificiteit van de genotypering van CYP2D6 als voorspeller van de relatie tussen bloedspiegel en dosering van het geneesmiddel NT. De veronderstelling is dat als de genotypering de relatie tussen bovengenoemde eenduidig voorspelt, de genotypering hulpmiddel zou moeten zijn bij het instellen van het geneesmiddel.

Retrospectief worden bij patiënten die NT gebruiken het genotype van CYP2D6 mutatie *3 en mutatie *4 bepaald. Hierbij kunnen van elke mutatie drie genotypes worden onderscheiden: de wildtype (normaal), heterozygote en homozygote vorm. DNA wordt geïsoleerd uit volbloed (QIAamp blood kit,

Westburg). Vervolgens worden de specifieke CYP2D6*3 en CYP2D6*4 sequenties geamplificeerd met de PCR. Na restrictie-analyse worden de ontstane producten gedetecteerd m.b.v gelelektroforese. De fenotypering van NT wordt uitgevoerd door meting van de spiegel (NT) en metaboliet (E-10-OH-NT). Vervolgens kan de metabole ratio berekend worden. Patiënten behandeld met NT (n=57) werden bestudeerd a.d.h.v genotype en metabole ratio. De volgende resultaten zijn verkregen: 3/57 heterozygoot CYP2D6*3; 54/57 wildtype CYP2D6*3; 9/57 heterozygoot CYP2D6*4; 3/57 homozygoot CYP2D6*4 en 45/57 wildtype CYP2D6*4. De metabole ratio voor PM (homozygote patiënten) is 3,8, voor heterozygote patiënten 2,7 en voor normale (EM) 1,7. Omdat niet bekend is welk percentage van de patiënten met bijwerkingen die NT gebruiken tot de genetische PM behoren, wordt er doorsampeld tot een aantal van 20 PM'ers (in normale populatie ligt dit percentage op 10 %). In eventueel vervolgonderzoek worden de gegevens uit dit eerste onderzoek afgezet tegen die van de vermoedelijke EM.

Hart- en vaatziekten

67. Troponin I and troponin T values in patients after minimal invasive coronary artery bypass surgery versus conventional coronary artery bypass grafting

J.C.J.M. SWAANENBURG, B.G. LOEF, A.H. EPEMA, J.G. GRANDJEAN, M.A. MARIANI and M. VOLMER
University Hospital Groningen, Hanzeplein 1, 9713 GZ Groningen, The Netherlands

Introduction: Troponin I and -T are new specific markers for myocardial tissue damage. Recently, a new surgical technic called minimal invasive coronary artery bypass grafting (MICABG) has been developed. In this type of procedure, surgery is performed on the beating heart without the use of the cardiopulmonary bypass (CPB). The aim of this study is to evaluate the influence of CPB on myocardial tissue damage by comparing troponin I and -T in patients treated with MICABG or conventional coronary artery bypass grafting.

Patients and methods: Ten patients scheduled for cardiac surgery were included. Five patients received conventional treatment using CPB, the other five were treated according to the MICABG protocol without CPB. Blood specimens were obtained at 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18 and 24 hours after opening of the graft. In these sera troponin I and -T were measured.

Troponin I (TnI-Ac) was measured with an Access analyzer (Beckman Instruments, Mijdrecht, The Netherlands) and with an AxSym analyzer (TnI-Ax) (Abbott, Amstelveen, The Netherlands). Troponin T was determined with an Elecsys 2010 analyzer (Boehringer Mannheim, Almere, The Netherlands).

Troponin I and -T concentrations are expressed as mean \pm standard deviation (sd) and tested using Student t-test. P values <0.05 were considered to be statistically significant.

Results: Maximum concentrations of troponin I and -T appeared at 6 hours after grafting. Levels in the MICABG patients were significantly lower than in the conventional CABG group (table).

parameter	Unity	Without CPB Mean (sd)	With CPB Mean (sd)
TnI-Ac	($\mu\text{g/l}$)	0.02 (0.01)	0.25 (0.11)*
TnI-Ax	($\mu\text{g/l}$)	1.20 (1.39)	7.24 (3.99)*
TnT	($\mu\text{g/l}$)	0.03 (0.02)	0.29 (0.15)*

*p value <0.05.

Conclusions:

- The values of troponin I and -T reached their maximum at 6 hours after grafting
- Patients treated with MICABG have considerably less myocardial tissue damage than patients operated with the use of CPB
- Troponin I and -T seem to be a promising tool to evaluate further improvements of the MICABG procedure.

68. Distribution and content of troponin I, troponin T, HBDH and myoglobin in the myocardium

J.C.J.M. SWAANENBURG, A.T.M.G. TIEBOSCH, P.J. VISSER-van BRUMMEN en M. VOLMER
University Hospital Groningen, The Netherlands

Introduction: For a long time, measurements of HBDH in serum have been used to indicate the quantity of myocardial tissue damage. However, this parameter is not cardiac-specific. Recently, more cardiac specific parameters (troponin I and troponin T) have become available.

The aim of this pilot-study was to determine the intra- and inter-individual variety of these specific cardiac markers in the myocardium in relation to the more non-specific markers HBDH and myoglobin.

Patients and methods: From 11 autopsy patients tissue was collected from 7 different locations in the myocardium (RV, LV posterior wall, LV lateral wall, LV anterior wall, LV septum, atrium R, atrium L). The tissues were destructed in liquified nitrogen by using a Mikro-dismembrator U (Braun Biotech International, distributed by Salm and Kipp, The Netherlands) at 2000 rpm for 1 minute. After destruction 5 ml modified PBS buffer (pH = 7.0) was added and these solutions were frozen at -20°C until analysis of troponin I, troponin T, HBDH and myoglobin.

Troponin I (TnI-Ac) measurements were carried out with an Access analyzer (Beckman Instruments, Mijdrecht, The Netherlands) and with an AxSym analyzer (TnI-Ax) (Abbott, Amstelveen, The Netherlands). Troponin T (TnT) was measured with an Elecsys 2010 analyzer (Boehringer Mannheim, Almere, The Netherlands). Myoglobin was analyzed with a Behring Nephelometer (Behring Diagnostics, Rijswijk, The Netherlands) and HBDH activities were measured with a Mega analyzer (Merck, Amsterdam, The Netherlands). For statistical analysis ANOVA was used.

Results: Intra-individual: for TnI-Ac, TnI-Ax, TnT no significant differences could be detected between the 7 locations in

the myocardium, it seems that there is a tendency for lower values in the atria. Both HBDH and myoglobin are lower in atrium R and in atrium L compared to the other myocardial locations.

Inter-individual: for TnI-Ax, TnT, HBDH and myoglobin no relevant differences could be detected; the TnI-Ac content was in one patient lower than in the other patients.

Conclusions: It seems that TnI-Ac, TnI-Ax and TnT are homogeneous distributed in the myocardium, and that HBDH and myoglobin in the atria are lower than in the ventricles.

A larger study should be carried out to investigate the significance and relevance of the intra- and inter-individual findings.

69. Thrombolytic therapy does not influence the ratios of released myocardial marker proteins

K.W.H. WODZIG¹, J.A. KRAGTEN², W. MODRZEJEWSKI³, J. GORSKI⁴, M.P. van DIEIJEN-VISSER¹, J.F.C. GLATZ⁵ and W.Th. HERMENS⁵

Department of Clinical Chemistry¹, Academic Hospital Maastricht, Maastricht, Department of Cardiology², Hospital De Wever en Gregorius, Heerlen, The Netherlands, Department of Cardiology³ and Physiology⁴, Medical School of Bialystok, Bialystok, Poland and Cardiovascular Research Institute Maastricht⁵, University, Maastricht, The Netherlands

Introduction: Measurements of cardiac marker proteins in plasma from patients with acute myocardial infarction (AMI) have become important in the evaluation of recanalization therapy. The validity of this approach has however been questioned, because it was claimed that coronary reperfusion may increase the recovery in plasma of cardiac enzymes, such as creatine kinase (CK).

Aim: In the present study, possible effects of thrombolytic therapy on the release of enzymatic and non-enzymatic marker proteins were investigated.

Methods: Activities of creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH), and concentrations of myoglobin (Mb) and fatty acid binding protein (FABP) were determined in serial plasma samples obtained frequently (and for at least 72 hours for CK and LDH or 24 hours for FABP and Mb) after admission to the hospital in 50 patients with confirmed AMI.

Thirty-six patients received thrombolytic therapy (1.5 million units of streptokinase (SK), infused in 40-80 minutes, or a bolus of 10 million units recombinant tissue-type plasminogen activator (tPA)), and 14 patients did not. Cumulative release (Q), i.e. infarct size (mean \pm SEM), of the different cardiac markers was calculated by using a two compartment model for circulating proteins and was expressed in gram-equivalents of healthy myocardium per liter of plasma (g-eq/l) for all 4 marker proteins. Altered recovery in plasma of marker proteins was estimated from the release ratios (-CK/LDH, FABP/LDH, Mb/LDH, CK/Mb, CK/FABP, Mb/FABP).

Results: Hospital delays were 2.8 ± 1.6 (mean \pm SD) hours and 2.7 ± 1.8 hours in treated and untreated patients, respectively. In patients treated with thrombolytic therapy, average infarct size varied between 5.5 and 7.2 g-eq/l for the 4 marker proteins, and in untreated patients between 4.6 and 6.4 g-eq/l, with a tendency to larger infarct sizes for Mb and FABP than for CK and LDH. Thrombolytic therapy, although signifi-

cantly accelerating protein release rates, did not influence the release ratios (see table 1).

Table 1. Patient Characteristics

	Thrombolytic treatment	No thrombolytic treatment
Number of patients	36	14
Age (mean \pm SD, years)	57.7 \pm 9.2*	66.0 \pm 11.0
Thrombolytic treatment	SK / tPA (27 / 9)	no
Treatment delay or time to admission (hours)	2.8 \pm 1.6	2.7 \pm 1.8
Infarct size (g-eq/l)	mean \pm SEM	mean \pm SEM
LDH (Q72)	5.5 \pm 0.7	4.8 \pm 1.0
CK (Q72)	5.2 \pm 0.8	4.6 \pm 1.3
FABP (Q24)	7.2 \pm 1.0	6.4 \pm 1.7
Mb (Q24)	6.5 \pm 0.9	6.0 \pm 2.0
Ratio of infarct sizes	mean \pm SEM	mean \pm SEM
CK/LDH	0.92 \pm 0.05	0.93 \pm 0.12
FABP/LDH	1.38 \pm 0.12	1.37 \pm 0.17
Mb/LDH	1.19 \pm 0.09	1.12 \pm 0.18
CK/Mb	0.84 \pm 0.05	0.84 \pm 0.16
CK/FABP	0.75 \pm 0.05	0.80 \pm 0.15
Mb/FABP	0.92 \pm 0.06	0.89 \pm 0.08

*: p < 0.01 vs no thrombolytic treatment

Conclusion: These results indicate that thrombolytic therapy has no significant effects on the recovery of cardiac marker proteins in plasma.

70. Influence of mammary artery as a bypass vessel on the results of seven biochemical assays after coronary artery bypass surgery

G.A. HARFF¹, M.J.A. van den BOSCH¹ and J.P.A.M. SCHONBERGER²

Departments of Clinical Laboratories¹ and Cardiopulmonary Surgery², Catharina Hospital, Eindhoven

The aim of this study is to assess the influence of the various cardiac grafting methods on the results of troponin T, CK-MB mass and the enzyme activities of CK-MB, CK, HBD, LD and AST after coronary artery bypass graft (CABG) surgery. There is evidence that patients having received one or two internal mammary artery grafts have improved long term sur-

vival. However, compared to the use of solely vein grafts, the use of internal mammary arteries may induce a large surgical trauma which may cause higher levels of biochemical assays after surgery.

Seventy three patients undergoing CABG surgery were followed pre- and post operatively by performing the assays in

consideration. Of the 73 patients, 17 underwent coronary artery bypass grafting using autologous saphenous vein grafts (SVG), 32 patients received saphenous vein grafts in addition to a single internal mammary artery as a bypass vessel (IMA), whereas 24 patients received saphenous vein grafts in addition to bilateral internal mammary arteries (BIMA). After surgery almost all patients showed elevated levels for all the assays. The two specific assays, troponin T and CK-MB mass differed much in release pattern: troponin T results were

still elevated at 70 h while CK-MB mass results had returned to almost preoperative levels.

Surprisingly, the median values for troponin T at all five sampling times after surgery are lower for the patient groups who received one or two internal mammary artery(ies) in comparison to the patient group who received only saphenous vein grafts. The median CK values after surgery were considerably higher for the IMA and the BIMA patient groups rather than the SVG patient group.

Interne geneeskunde

71. Faecal leucocyte esterase in inflammatory bowel disease

A. van der SLUYS VEER, J. BROUWER¹, I. BIEMOND, G.E. BOHBOUT, H.W. VERSPAGET and C.B.H.W. LAMERS
Dept of Gastroenterology and Hepatology, Leiden University Medical Centre and Dept of Clinical Chemistry¹, Diagnostic Centre SSDZ, Delft

Several markers have been studied in the disease assessment of inflammatory bowel disease (IBD), but they have not become widely integrated in daily routine practice, because of complexity and costs.

Our objective was to determine whether measurement of faecal leucocyte esterase (FLE) provides a simple, rapid and inexpensive test for disease assessment of IBD. FLE was determined semi-quantitatively in stool extracts of 104 patients with Crohn's disease (CD), 41 patients with colitis ulcerosa (CU) and 35 controls, using Multistix 2 strips (Bayer). Results were compared with the Crohn's disease activity index (CDAI) in CD and Truelove-Witts grading in CU.

FLE titers were significantly higher in CD and CU than in controls. There was a significant correlation between FLE titers

and CDAI ($r = 0.34$; $p < 0.005$; $n = 86$) in patients with CD and with Truelove-Witts grading ($r = 0.53$; $p < 0.0005$; $n = 41$) in CU.

When a CDAI of 150 or more was used as standard for activity of CD, FLE was elevated in 50 percent of active disease. In CU FLE was increased in 65 percent of grade II and 87 percent of grade III compared to 22 percent of grade I patients.

The PV + and PV - were 88% and 20% in CD, and 92% and 47% in CU.

Interpretation of the results is hampered by the absence of a gold standard for activity of IBD. Theoretically, the results might be better or worse if such a standard would be available. The simplicity, the low costs and the wide availability support the application of the FLE test in clinical practice.

72. Spectrophotometric determination and evaluation of hydrogen peroxide in expired breath condensates

W.B.M. GERRITSEN, D. van LOON and F.J.L.M. HAAS
Department of Clinical Chemistry, Sint Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands

Well over 90% of respired oxygen undergoes tetravalent reduction via multiple electron-carrying enzymes present in mitochondria, producing water without discharging any harmful intermediates. Of the toxic reactive intermediates produced, superoxide, hydrogen peroxide and the hydroxyl radicals are the species most extensively studied. Hydrogen peroxide is potentially one of the most harmful species of oxygen metabolism. A clear association between lung injury and hydrogen peroxide in expired breath has been demonstrated. In several types of acute lung disease, especially Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS) and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), polymorphonuclear leucocytes in the alveolar infiltrates release toxic oxygen metabolites. Many investigators studied hydrogen peroxide in expired breath condensates using different techniques to determine the concentration of hydrogen peroxide.

Thereby we measured hydrogen peroxide in expired breath condensate from apparently healthy persons of which 15 were non-smokers and 15 were smokers (more than 10 cigarettes per day) and compared this group with elective thoracic surgery - and COPD patients using the spectrophotometric method described by Gallati and Pracht (1).

Patients undergoing elective thoracic surgery showed hydrogen

peroxide levels near or below the detection limit before surgery. After surgery an increase of hydrogen peroxide was observed especially in patients undergoing a lobectomy. Patients suffering unstable COPD showed an increase of hydrogen peroxide concentration in their expired breath condensate when compared to the stable COPD patients. It is likely that this result is caused by pulmonary infiltrates. During treatment hydrogen peroxide levels decrease within 10 days.

We calculated the reference intervals in apparently healthy persons by dividing this group in smokers and non-smokers. The hydrogen peroxide level in non-smokers was below the detection limit. The hydrogen peroxide level found for smokers was in the range of stable COPD patients.

We showed that the spectrophotometric assay of Gallati and Pracht is able to distinguish between different patient groups based on the hydrogen peroxide concentration measured in expired breath condensate.

1. Gallati H, Pracht I. Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985; 23:453-60.

73. Oxidative stress after lung resection therapy; a pilot study

E.C. LASES¹, V.A.M. DUURKENS², W.B.M. GERRITSEN¹ and F.J.L.M. HAAS¹

Departments of Clinical Chemistry¹ and Pulmonary Diseases², St. Antonius Hospital, Nieuwegein (Utrecht), The Netherlands

The prediction of postoperative morbidity and mortality after lung resection therapy is still a clinical problem. The parameters which are used at present, like bloodgas analysis, FEV1, splitfunction tests, and VO₂ max measurement do not correlate with the development of postoperative complications. In this pilot study, we examined the possible predictive value of the concentration of hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA) as a measure of oxidative stress in patients undergoing lobectomy or pneumonectomy. 18 Patients who underwent thoracotomy participated in this study, which included measurements of exhaled H₂O₂ in breath condensate and MDA levels in 24-h urine, expressed as ratio of the

urinary creatinine. Our results show increased H₂O₂ and MDA levels in patients, who underwent lobectomy, compared with patients, who underwent pneumonectomy. One patient, who developed Postpneumonectomy Pulmonary Edema (PPE) 6 days after pneumonectomy, developed a significant increase in the levels of H₂O₂ and MDA in comparison to other patients with pneumonectomy. A significant correlation was found between the levels of H₂O₂ and MDA in this group of patients. The present data suggest a strong relationship between a major complication like PPE and the phenomenon of oxidative stress expressed by exhaled H₂O₂ and urinary MDA.

74. Type 2 diabetes in Sudan related to socio-economic class

M.M. ISMAIL¹, M.E. IDRIS², E.M.A EL MAHDI³, O. BEKERS⁴, B.H.R. WOLFFENBUTTEL⁵ and M.P. van DIEIJEN-VISSER⁴

Clinical Biochemistry, Ahfad University¹, Clinical Biochemistry², Medicine³ University of Khartoum, Sudan; Clinical Chemistry⁴, Internal Medicine⁵, Academic Hospital, Maastricht

Prevalence of diabetes is low or absent in several African populations, but progressive modernisation has been found to be associated with an increased prevalence of non-insulin dependent diabetes mellitus (type 2). In Sudan most patients are poorly controlled and exhibit a high prevalence of acute and chronic complications, chronic renal failure is present in almost one third of the patients (Elmahadi, 1991).

For the present pilot study forty Sudanese type 2 diabetes patients, considered to be under proper medical care, good metabolic control and under different therapeutic regimen, were randomly included. Their mean age was 52 ± 8.9 (mean ± SD) years, 14 females and 26 males with mean duration of diabetes of 8.4 ± 6.0 (mean ± SD) years. In Sudan regular control was performed by measuring, fasting blood glucose (FBG), dipstick screening for protein in urine and cholesterol. Other control parameters are not available.

After transportation of the samples, FBG, fructosamine, glycated haemoglobin (HbA1c), serum creatinine, total protein in urine and micro albumin/creatinine ratio were measured in the Laboratory of Clinical Chemistry in Maastricht. Lipid profile was assessed by measuring cholesterol, HDL and LDL-cholesterol, LDL/HDL ratio and cholesterol/HDL-cholesterol ratio, apo-A, apo-B and apo-B/apo-A ratio.

Aim of this pilot study was to relate parameters of glycaemic control like FBG, HbA1c, fructosamine, kidney-related parameters and lipid profile to socio-economic status of the patients and to age, sex and duration of diabetes.

For neither of the parameters a relation was found between socio-economic class and diabetic control or between socio-economic status and presence of nephropathy (Table 1).

The lipid parameters were within or below (especially cholesterol, LDL-cholesterol and apo-B) the normal reference ranges for Western societies.

Conclusions:

- Patients were more poorly regulated as expected, caused by lack of the required control parameters and proper follow-up.
- Prevalence of renal insufficiency is extremely high in this population (39 of the 40 patients).
- In spite of the poor control, lipids are within normal or even low compared to type 2 diabetes patients in Western Societies. This is not so for the cholesterol/HDL-cholesterol ratio.
- In this pilot study glycaemic control seems not related to socio-economic status, but further study is required.

Table 1. Glycaemic control, renal function and lipid profile in NIDDM, related to socio-economic class

Parameters	Referencevalue	Social Class High (n=11)		Social Class Medium (n=8)		Social Class Low (n=21)	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
HbA1c (%)	3.49 - 9.0	8.82	1.86	11.20	3.50	9.79	2.35
Fructosamine	0.62 - 1.22	1.62	0.36	1.87	0.72	1.72	0.37
FBG (mmol/l)	3.10 - 6.7	11.70	2.88	13.00	5.70	10.74	3.12
Micro albumin/creat.	2.5	2.53	1.37	7.14	4.95	3.46	3.36
Total protein, urine	negative	0.25	0.42	0.29	0.20	0.21	0.22
S-Creatinine (mmol/l)	53 - 97	73.70	54.94	73.14	21.16	72.90	44.06
Cholesterol (mmol/l)	4.1 - 6.4	4.36	0.97	3.41*	0.89	4.10	1.08
Chol-HDL (mmol/l)	0.6 - 1.9	0.83	0.25	0.65	0.48	0.75	0.21
Chol-LDL (mmol/l)	3.0 - 5.2	2.86	0.68	2.31	0.53	2.78	0.95
LDL/HDL		4.44	1.85	3.97**	2.93	3.85	1.27
Cholesterol/HDL	<5	5.41	1.18	5.57	2.25	5.85	2.12
Triglyceride (mmol/l)	0.8 - 1.94	1.46	0.61	1.63	1.42	1.28	0.58
Apo-A (g/l)	1.12 - 1.63	1.09	0.24	0.87	0.33	1.01	0.18
Apo-B (g/l)	0.88 - 1.17	0.96	0.21	0.79	0.18	0.92	0.28

*: p < 0.05 compared to high social class; **: p < 0.04 compared to high social class

75. Vals-positieve CDTest-uitslagen bij patiënten met lage ferritine waarden

J. van PELT en H. AZIMI

KCHL, Ziekenhuizen Noord-Limburg, Venlo

Het voornaamste voordeel van CDTest (P&U) voor de detectie van chronisch alcohol-misbruik ligt in de hoge specificiteit. In de literatuur wordt algemeen uitgegaan van ongeveer 95%. Voor de 5% vals-positieven worden een aantal oorzaken aangegeven als primaire biliëre cirrose, D-variant van transferrine en (dragerschap?) van het Koolhydraat Deficiënt Glycoproteïne Syndroom.

Wij onderzochten een groep patiënten met chronische anemie (n = 99) teneinde te bepalen of een toegenomen transferrine synthese gevolgen heeft voor de CDTest hoeveelheid. De anemie patiënten hadden langer dan drie maanden een Hb < 7,0 mmol/l. De ijzer en ferritine concentraties varieerden enorm door al dan niet ijzersubstitutie.

Er bleek een positieve correlatie tussen CDTest en transferrine (r = 0,66) en negatieve correlaties van respectievelijk CDTest (r = - 0,70) en transferrine (r = - 0,71) met de logaritme van de ferritine concentratie (range 8 - 14904 µg/l). In het subnormale gebied van de ferritine concentratie (< 25 µg/l) werd een toegenomen aantal uitslagen boven de referentiewaarden gevonden (mannen: < 20 U/l; vrouwen: < 26 U/l). Vervolgens werd van een groep willekeurige patiënten met lage ferritine

concentraties eveneens de CDTest hoeveelheid bepaald (n = 21). Ook in deze groep kwam een toegenomen aantal uitslagen boven de grenswaarden voor. In totaal hadden bij een ferritine concentratie < 25 µg/l, 5 van de 11 mannen een CDTest van 20 U/l en 8 van de 18 vrouwen een CDTest van 26 U/l. Geen van deze patiënten bleek retrospectief bekend te zijn als chronische alcoholmisbruiker. Aangezien de verhouding CDTest ten opzichte van transferrine constant is over de gehele ferritine range, kan geconcludeerd worden dat een grotere transferrine synthese, bijvoorbeeld door ijzeregebrek, een grotere koolhydraat-deficiënte transferrine hoeveelheid met zich mee brengt. Recentelijk vonden wij ook een afhankelijkheid van de CDTest hoeveelheid met de mate van bloedverlies en met de menopausale status van peri-menopausale vrouwen.

In conclusie, een status met een toegenomen ijzerbehoefte en lage ferritine concentraties veroorzaakt verhoogde transferrine synthese met daaraan gepaard gaand grotere Koolhydraat Deficiënt Transferrine hoeveelheden. Bij onverklaard hoge CDTest uitslagen moet daarom ook gedacht worden aan ijzerdeficiëntie of chronisch bloedverlies.

76. De intracellulaire cytokinenproductie in lymfocyten bij behandeling van HIV+

A.M.T. van LEEUWEN¹, Chr.H.H. ten NAPEL², F.M.F.G. OLTHUIS¹ en C.G. FIGDOR³

Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Interne Geneeskunde, Medisch Spectrum Twente, Enschede², Tumor Immunologie Universiteit Nijmegen³

Cytokinen zijn polypeptiden die door leukocyten geproduceerd worden en fungeren als autonoom signaal bij cel-cel communicatie, door specifieke receptoren te activeren. Cytokinen spelen een belangrijke rol bij o.a. het immuuniteitsverloop tijdens HIV-infectie en AIDS.

Bij een voortschrijdende HIV-infectie vermindert het aantal CD4+ cellen en het immuunapparaat verandert. Bij de behandeling van HIV+ en AIDS met een combinatietherapie (een virus-specifieke proteaseremmer en een reverse transcriptase remmer) vermindert de viral load (= hoeveelheid HIV-RNA kopiën per ml bloed) en is een duidelijk immunologisch herstel te zien (stijging van CD4+). Over de duur van dit herstel en de kwaliteit is nog niet veel bekend.

De CD4+ populatie kan onderverdeeld worden in Th0, Th1 en Th2, door te kijken naar de cytokinenproductie. De dominante

Th1 populatie stimuleert voornamelijk immuunfuncties en produceert gIFN, IL2 aTNF. De Th2 populatie stimuleert de humorale functie en produceert IL4 en IL10.

Mogelijkerwijs kan de bepaling van Th1 en Th2 meer inzicht geven in het herstel van de CD4+ populatie en bij de beoordeling van het verloop van een HIV-infectie en het effect van een retro-virale behandeling.

Inmiddels zijn van een aantal vrijwilligers: gezond, HIV+ en AIDS de intracellulaire cytokinenproductie gemeten. De hoeveelheden intracellulaire cytokinenproductie na stimulatie is erg variabel. Er zijn geen significante verschillen gevonden tussen gezond en HIV+ en AIDS. Bij de geselecteerde patiënten worden vier metingen gedaan vóór behandeling en na aanvang van de behandeling zal de cytokinenproductie 16 weken gevolgd worden.

77. Eosinofilie bij intensive care patiënten als maat voor een relative bijnierschors insufficiëntie

A. BEISHUIZEN, I. VERMES, K. WU en B.S. HYLKEMA

Medisch Spectrum Twente, Enschede

Het voorkomen van een relatieve bijnierschorsinsufficiëntie bij ernstig zieke patiënten is een nieuw concept. Helaas beschikken wij niet over een betrouwbare meetmethode om de bijnierschorsfunctie bij deze patiënten betrouwbaar te beoordelen. De basale cortisolspiegel geeft bij deze patiënten geen uitsluitsel aangezien deze, als gevolg van de stress, bijna altijd verhoogd wordt gevonden. De standaard ACTH test (250 µg) heeft geen diagnostische waarde omdat de hypofysebijnierschors bij intensive care (IC) patiënten altijd al maximaal is gestimuleerd. De sensitieve ACTH test (1 µg) is bij IC patiënten moeilijk standaardiseerbaar vanwege de grote variatie van de basale waarden. Om deze reden hebben wij de waarde van het meten van het aantal eosinofiele granulocyten in het perifere bloed, bekend als de "proef van Thorn", bij IC patiënten opnieuw geëvalueerd.

Bij 261 IC patiënten werden de uitslagen vergeleken van de au-

tomatische celtellingen en differentiatie (H1Bayer/Technicon). In 21 gevallen werd een aantal eosinofielen van >3% gevonden. Bij deze groep werd tijdens het verblijf op de IC dagelijks het aantal eosinofielen en het basale cortisolgehalte bepaald terwijl eenmalig de ACTH test werd verricht. Vijf patiënten toonden klinisch aanwijzingen voor bijnierschorsinsufficiëntie. Alle vijf toonden eosinofilie en reageerden gunstig op behandeling met glucocorticosteroiden. Bij 19 van de 21 patiënten bestond een duidelijke relatie tussen het aantal eosinofielen en het klinisch beloop.

Een hoog of stijgend aantal eosinofielen bij ernstig zieke patiënten is een alarmsignaal voor een falende bijnierschorsfunctie. De moderne celtelapparatuur heeft een nieuwe dimensie gegeven aan de betekenis van het aantal eosinofielen in relatie tot de bijnierschorsfunctie, zoals reeds 50 jaar geleden door Thorn (1948) werd beschreven.

78. Chylothorax of TPV-lekkage, een analytische casus

A.WOLTHUIS¹, R.B.M. LANDEWE², P.H.M.H. THEUNISSEN³ en L.W.J.J.M. WESTERHUIS¹

Afdeling klinische chemie¹, afdeling reumatologie² en afdeling klinische pathologie³, Het Atrium Medisch Centrum, Heerlen (voorheen de Weverziekenhuis)

De Casus: Een 83 jarige vrouw werd aangeboden voor obductie. Haar ziektegeschiedenis vermeldt mammacarcinoom, erosieve reumafactor positieve reumatoïde artritis (RA), status na Billroth II, maagresectie, onverklaarde cholestatische leverfunctiestoornissen en koorts. Zij had een vena subclavia catheter links, die overigens bij obductie niet meer in situ was. Middels deze lijn ontving zij totale parenterale voeding (TPV). De klinische diagnose: Pericarditis met effusie bij RA, chronische idiopathische decompensatio cordis (DC) en cholestatische leverafwijkingen eci. Directe doodsoorzaak: Respiratoire insufficiëntie bij DC.

Tijdens de obductie werd er een globale pericarditis gevonden, deels adhesief en deels exsudatief, zeer waarschijnlijk in het kader van RA. Verder werd in de rechter pleuraholte 1,5 en in de linker pleuraholte 0,2 liter melkachtige vloeistof gevonden. Differentiaal diagnostisch betreft het hier ofwel een chylothorax ofwel lekkage van de TPV. De differentiatie wordt gemaakt op basis van de chemische constitutie: een 10 x hogere triglyceride concentratie tov de waarden in serum en de aantoonbaarheid van chylomicronen in het lipogram wijzen op een chylothorax (1,2). Intrapulmonaal waren geen afwijkingen herkenbaar. Het overliden is zeer waarschijnlijk toe te schrijven aan de cardiale pathologie.

Resultaten: Triglyceriden: 20,85 mmol/l (0,80-2,00); lipogram: 100% chylomicronen

Conclusie: Deze resultaten zouden kunnen passen bij chylothorax. Nadere analyse echter toonde oa. een glucose van 127,3 mmol/l (ref waarde < 7,0 mmol/l) en een kalium van 11,4 (ref. waarde 3,5-5,0 mmol/l): extreme waarden die niet passen bij de biologische compositie van lymfe (chylus). Gezien de concentratie van glucose en kalium in de TPV, respectievelijk 944 mmol/l en 31 mmol/l, en het feit dat er zonder twijfel post-mortem weefsel equilibratie heeft plaats gevonden past deze chemische analyse bij de conclusie: TPV lekkage door "fausse route".

Discussie: Deze casus laat zien dat de diagnose chylothorax op basis van de beschreven analyses in (uitzonderlijke) gevallen tot verkeerde resultaten kan leiden. Bij het onderscheid chylothorax versus TPV zou derhalve een glucose en kalium bepaling een duidelijker beeld kunnen geven. Zeker als deze waarden geïnterpreteerd worden in het licht van de TPV samenstelling.

1. Keijzer MH de en Doelman CJA. Tijdschr NVKC 1993; 18: 317-321.
2. Hillerdal G. Eur Respir J 1997; 10: 1157-1162.

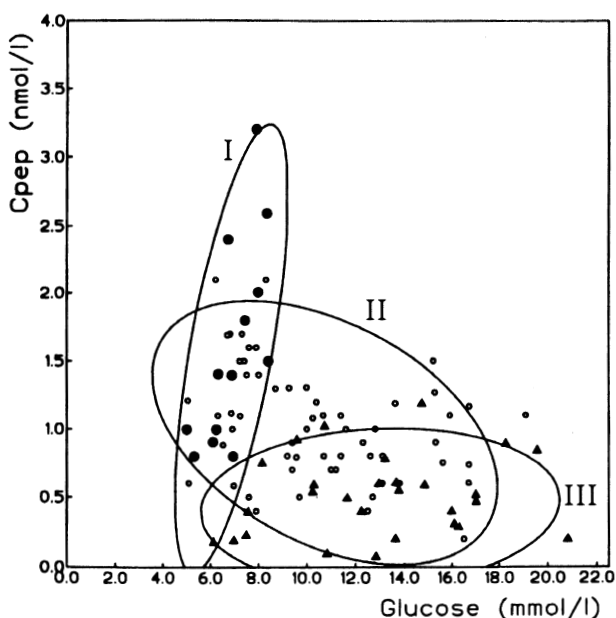
79. Evaluation of β -cell function at the time of clinical diagnosis of type 2 diabetes mellitus

R.N.M. WEIJERS¹, H.M.J. GOLDSCHMIDT³ and J.SILBERBUSCH²

Departments of Clinical Chemistry and Hematology¹, and Internal Medicine², Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam; Department of Clinical Chemistry and Hematology³, St. Elisabeth Hospital, Tilburg

The objective was to evaluate the secretory capacity of pancreatic β -cells at the time of clinical diagnosis of type 2 diabetes mellitus. We examined a well-characterized group of 106 newly diagnosed patients who underwent a provocation test with glucagon at diagnosis. The patients, who started treatment at diagnosis with diet alone (group I; n = 13), with oral antidiabetic drugs (group II; n = 64), or with insulin (group III; n = 29), were referred between January 1993 and December 1996. Fasting serum C-peptide (SCP) levels were markedly higher in patients receiving diet therapy alone than in those receiving oral hypoglycemic agent therapy (1.6 ± 0.7 vs. 1.0 ± 0.4 nmol L⁻¹, p < 0.0005). In contrast, fasting SCP levels were markedly lower in patients receiving insulin therapy than in those receiving oral hypoglycemic agent therapy (0.5 ± 0.2 vs. 1.0 ± 0.4 nmol L⁻¹, p < 0.0001). Linear regression analysis showed a significant inverse correlation among the three treatment groups between their fasting SCP and concomitant glucose levels (r = -0.999; p < 0.0001). Bivariate statistical analysis of both parameters resulted in 90% isodensity ellipses for the diet only and insulin treatment group that showed only minimal overlapping whereas the ellipse for patients using oral hypoglycemic agents takes up a middle position (see figuur 1). The response on glucagon expressed as the ratio of SCP measured 6 min after glucagon injection over SCP measured immediately before injection was not statistically different among the three treatment-groups. This indicates that the secretory capacity of pancreatic β -cells enormously differs between individuals at diagnosis of

type 2 diabetes, and that the treatment policy at diagnosis can be facilitated by the outcome of the tandem assay of a fasting glucose and a C-peptide.



80. The prevalence of type 2 diabetes and gestational diabetes mellitus in an inner city multi-ethnic population

R.N.M. WEIJERS¹, D.J. BEKEDAM² en H. OOSTING³

Departments of Clinical Chemistry and Hematology¹, and Obstetrics and Gynecology², Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam. Department of Clinical Epidemiology and Biostatistics³, Academic Medical Centre, University of Amsterdam

"Zeeburg", a multiethnic town borough in the Amsterdam-East region, has one of the city's highest rates of immigrants. In the total population of 19,825 Surinam (mainly Creole), Turkish, Moroccan, and Dutch adults the prevalence of known type 2 diabetes in 1994 and of gestational diabetes mellitus (GDM) between January 1992 and January 1997 was investigated. Based on World Health Organization (WHO) criteria of 1985, the age-standardized prevalence of type 2 diabetes was similar in men (6.4%, 95% confidence interval [CI] 5.6-7.2) and women (6.4, CI 5.8-7.0) for all ethnic groups combined. However, the age- and sex-standardized prevalence of type 2 diabetes was significantly greater in the non-Dutch inhabitants than in the Dutch inhabitants (17.3% [CI 12.9-21.6] in Surinam inhabitants, 10.9% [CI 9.7-12.2] in Turkish inhabi-

tants, 12.4% [CI 9.7-15.0] in Moroccan inhabitants, and 3.6% [CI 3.2-3.9] in Dutch inhabitants. The odds ratios for type 2 diabetes for the separate immigrant groups relative to the Dutch group were 5.88 (CI 4.54-7.69) for Surinam inhabitants, 4.00 (CI 2.86-5.55) for Turkish inhabitants, and 4.17 (CI 3.03-5.55) for Moroccan inhabitants. GDM was present in 2.59% of women of non-Dutch origin compared with 0.62% of women of Dutch origin. A significant positive association was found between the non-Dutch origin and the occurrence of GDM ($\chi^2 = 6.7$; $p < 0.01$). The study highlights a high prevalence of known type 2 diabetes and GDM in the immigrant inhabitants and emphasizes that appropriate interventions are necessarily with implications for health targets and capitation based budgets.

81. Serum eosinophil cationic protein in active and quiescent ulcerative colitis

C.J. PRONK-ADMIRAAL¹, R.K. LINSKENS², A.A. van BODEGRAVEN², H.A.R.E. TUYNMAN² and P.C.M. BARTELS¹
Departments of Clinical Chemistry¹ and Gastroenterology², Medical Center Alkmaar, The Netherlands

Background: In the pathogenesis of ulcerative colitis (UC) many proinflammatory cytokines activate eosinophils, thereby releasing eosinophil cationic protein (ECP). ECP is a pivotal cytotoxic mediator, causing mucosal damage. Data of serum ECP (sECP) concentration in the course of UC are sparse.

Aim: To measure sECP concentration in the course of UC using a previously described standardized analytic method.

Methods: In 6 patients with active UC, 5 patients with quiescent UC (established by clinical and endoscopic findings), 8 IBS-subjects (Manning criteria positive, lactose tolerant) and 21 apparently healthy controls, sECP and eosinophil count were measured at baseline and at 12 weeks. In patients with active UC, samples were also drawn at 2, 4, and 8 weeks. The preanalytic phase of ECP determination was standardized by spontaneous clotting of blood for two hours at 37°C. After incubation samples were centrifuged during 10 minutes at 1350g.

Results: At baseline, mean sECP was significantly higher in active UC (110.3 µg/l) compared with both quiescent UC (33.7 µg/l), IBS-subjects (23.9 µg/l) and apparently healthy controls (43.5 µg/l). In both active and quiescent UC also the eosinophil count is significantly raised when compared with IBS-subjects and apparently healthy controls. However, there is no statistically significant difference of eosinophil count between active and quiescent UC patients. During reconvalescence of UC, sECP significantly decreased to 22.8 µg/l after 2 weeks.

Conclusions: With this standardized method of sECP determination and the measurement of eosinophil count, we found elevated levels in all patients with UC when compared with IBS-subjects and apparently healthy controls. Measuring the sECP helps to distinguish active from quiescent UC patients. sECP is correlated with disease activity. ECP may play a significant role in the pathophysiology of UC.

82. Plasma glutamine in ernstig zieke intensive care patiënten: correlatie met mortaliteit en verlies tijdens hoog-volume hemofiltratie

M. TRESKES¹, M.G.D. ROOD¹ en H.M. OUDEMANS-van STRAATEN²

Hematologisch en Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en afdeling Intensive Care², Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam

Glutamine is een essentieel aminozuur dat in vrij hoge concentratie in plasma voorkomt en een belangrijke rol speelt bij de functie van o.a. darmmucosa en immuniteit. Katabole processen bij ernstig zieke patiënten hebben een grote invloed op de glutamine homeostase. Een verhoogd gebruik moet gecompenseerd worden door o.a. verhoogde glutamine levering uit skeletspierweefsel. Ernstige depletie van glutamine wordt weerspiegeld in een verlaagde concentratie in plasma(1).

In ernstig zieke Intensive Care patiënten is gekeken naar de plasma glutamineconcentratie, het effect van hoog-volume hemofiltratie en de relatie met de voorspelde mortaliteit o.b.v. klinische scores en de waargenomen mortaliteit.

Plasma en ultrafiltraat werd direct na afname voorbehandeld en ingevroren bij -20°C. Langdurige opslag (> 1 maand) vond plaats bij -70°C. Glutamine en glutaminezuur werden in een 2-staps colorimetrische reactie bepaald. (Boehringer Mannheim NL).

De gemiddelde concentratie van glutamine in plasma bedroeg

0,50 mmol/l (SD 0,16 mmol/l). Volgens verwachting passeert glutamine het hemofiltratiefilter. De gemiddelde "sieving coëfficiënt" bedroeg 1,01 (n=44). Het mediane verlies aan glutamine tijdens de gehele hemofiltratie behandeling bedroeg 9,6 gram glutamine (spreiding 1,4 - 60 gram).

Plasma glutamine concentraties binnen 24 uur na opname correleerden zwak met de diverse mortaliteitscores (APACHE II, SAPS II MPM 0 & MPM 24). De gemiddelde plasma glutamine concentratie binnen 24 uur na opname lagen gemiddeld lager in patiënten die op de ICU overleden dan in patiënten die overleefden (0,44 vs 0,52 mmol/l, p=0,08).

Deze data zijn een indicatie dat lage glutamine concentraties in plasma mogelijk geassocieerd zijn met een verhoogde kans op mortaliteit. Indien dit verband causaal is, zou suppletie van glutamine in deze patiënten zinvol zijn.

1. Van der Hulst RRWJ. Glutamine, an essential nutrient for the gut. Thesis 1996, Universitaire Pers Maastricht, ISBN 90-900-9518-7.

83. Hereditaire Hemochromatose als oorzaak van Diabetes Mellitus type II

L.D. DIKKESCHEI¹, A. PEPPING¹, J. KOLK¹, W. de VISSER² en H. BILO³
Laboratorium¹ en Interne Afdeling³ Ziekenhuis De Weezenlanden, Zwolle en Huisartsen Maatschap Urk²

Introductie: Hereditaire hemochromatose (HH) is een primaire erfelijke ijzeraccumulatie die geassocieerd is met de overerving van de mutatie Cys282Tyr in het HLA-H gen. In homozygote vorm wordt de ziekte gekenmerkt door afwijkingen in de serum ijzer parameters (een hoge ijzerverzadiging (>50%), hoge serum ijzer concentratie) en afwijkingen in de functie van organen waarin ijzerstapeling heeft plaats gevonden. Meest frequent aangedane organen zijn lever, pancreas, hartspier en testikels.

De therapie is erop gericht de ijzerstapeling te voorkomen door jonge leeftijd te starten met aderlatingen, waardoor orgaanfunctieverlies kan worden voorkomen.

Gelet op de frequentie van de mutatie wordt de ziekte ondergediagnostiseerd, mogelijk doordat het secundaire ziektebeeld (levercirrose, hepatitis, diabetes mellitus, cardiomyopathie, mannelijke infertiliteit) op de voorgrond staat waardoor beoordeling van de ijzerstatus niet plaatsvindt.

Indien Diabetes Mellitus type II (DM II) door HH kan worden veroorzaakt dient de homozygote mutatie met een hogere frequentie in deze patientenpopulatie voor te komen. Hoewel heterozygoten zelden een afwijkende serum ijzerstatus hebben is desondanks ijzerstapeling niet uitgesloten.

Doel van het onderzoek: Toetsen of de prevalentie van de

Cys282Tyr mutatie bij DM II hoger is dan bij een controle groep.
Methode: Bij 100 diabeten (DM II)(50 via huisartsen, 50 via internisten verkregen) en 50 controle personen wordt na amplificatie (PCR) van een deel van het HH gen de mutatie na digestie met RsaI al dan niet aangetoond op basis van RFLP.

Resultaten:

	Wild type	Heterozygoot	Homozygoot	N
DM (eerstelij)	45	4	1	50
DM (poli)	47	6	0	50
Controle groep	42	8	0	50

De homozygoot is met sequentie analyse bewezen, maar heeft geen afwijkende ijzerstatus.

Conclusie: De Cys282Tyr mutatie heeft zeker geen hogere prevalentie in de DM type II groep en is dus zelden de genetische oorzaak van DM Type II. De enige homozygote mutatie in deze "risico"-groep gaat gepaard met een normaal ijzermetabolisme waardoor HH als oorzaak van DM type II, zeer onwaarschijnlijk is.

84. Synthese en detectie van AGE-achtige verbindingen

C.J.A.L. MENTINK¹, P.P.C.A. MENHEERE¹ en B.H.R. WOLFFENBUTTEL²
Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en afdeling Interne Geneeskunde², Academisch Ziekenhuis Maastricht

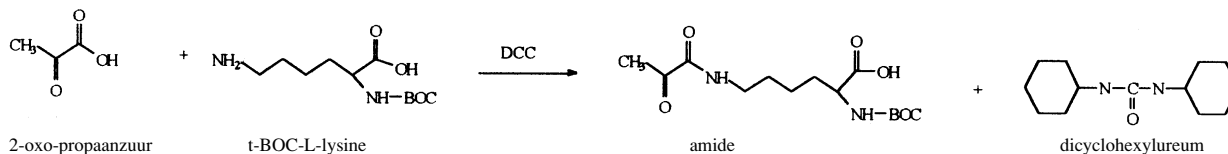
Glucose en andere reducerende suikers reageren met eiwitten via een non-enzymatische irreversibele reactie. De carbonyl groep van de suiker bindt aan een vrije amine groep aanwezig in het eiwit. Het betreft een langzaam verlopende reactie die leidt tot het ontstaan van Advanced Glycosylation Endproducten (AGE). Deze producten ontstaan vooral uit langlevende macro-moleculen en blijven hieraan irreversibel gebonden. Crosslinking met andere amine groepen kan optreden, hetgeen leidt tot stijfheid van de macrostructuren waarin de macro-moleculen voorkomen (vaatwand, netvlies, membranen). De vorming van AGE producten uit macromoleculen is de oorzaak van de lange termijn complicaties bij diabetes mellitus en spelen waarschijnlijk ook een grote rol bij de fysiologische veroudering.

De detectie van deze AGE's zorgt nog voor de nodige problemen, vooral omdat AGE's zeer heterogeen van samenstelling

zijn. Karakteristiek in de vorming van AGE producten is de vorming van dicarbonyl bevattende verbindingen. Ons onderzoek is gericht op het aantonen van de dicarbonyl groep middels een competitieve (radio)immunoassay. Om de problemen in de calibratie van een degelijke assay te kunnen omzeilen is in vitro een eenvoudige dicarbonyl verbinding gemaakt die gebruikt kan worden als standaard en als label in toekomstige AGE verbindingen.

Een simpele verbinding met een dicarbonyl binding is het amide gevormd uit 2-oxo-propaan-zuur en N_α-t-BOC-L-lysine volgens het mechanisme in figuur 1.

Ter controle van de zuiverheid van het product zijn een ¹H-NMR en een IR-spectrum gemaakt. Uit deze spectra blijkt dat er een amide gevormd is en dat de dicarbonyl verbinding aanwezig is. Deze methode is veelbelovend voor de opzet van een competitieve assay van AGE's.



Figuur 1. Reactiemechanisme bereiding dicarbonyl-verbinding

85. Immunochemische detectie van AGE-albumine

C.G. SCHALKWIJK¹, N. LIGTVOET¹, H. TWAALFHOVEN¹, R.B.H. SCHUTGENS¹, C.D.A. STEHOUWER², en V.W.M. van HINSBERGH³

Centraal Chemisch Laboratorium¹ en Interne Geneeskunde², Academisch Ziekenhuis Vrije Universiteit Amsterdam en Gaubius Laboratorium³ TNO-PG

Patiënten met diabetes mellitus hebben een verhoogd risico voor het optreden van vasculaire complicaties. Het pathofysiologisch mechanisme dat leidt tot het slecht functioneren van de vaatwand is niet precies bekend. Er zijn sterke aanwijzingen

dat niet-enzymatische geglycolyseerde eiwitten (AGEs) hierbij een belangrijke rol spelen. Deze AGEs worden in toenemende mate gevormd bij diabetes patiënten. Er zijn slechts een beperkt aantal technieken beschreven om AGE te detecteren.

Teneinde met behulp van antilichamen AGEs te kunnen detecteren, werden polyclonale antilichamen tegen AGE-albumine opgewekt. De antilichamen werden gekarakteriseerd met als doel het herkenningsepitop op AGEs te kunnen vaststellen. Bekende AGEs zoals pentosinine en carboxymethyllysine, maar ook belangrijke intermediaren als methylglyoxal- en 3-deoxyglucosone-gemodificeerde eiwitten worden niet herkend door de antilichamen. Het epitop is vooralsnog niet bekend. Met deze AGE-antilichamen werd een competitieve Elisa opgezet. In een groep van insuline-afhankelijke diabeten (n=55)

werd een verhoging aangetoond van een factor 2 van AGE-albumine t.o.v. een controle groep (n=60) (39.2 ± 10.0 U/ml vs 20.9 ± 4.0 U/ml, $p < 0.0005$). In de diabeten groep werd een correlatie gevonden van AGE-albumine met von Willebrand factor (vWf) ($r = 0.29$, $p = 0.05$) en de oplosbare vorm van het adhesie eiwit VCAM-1 ($r = 0.41$, $p < 0.003$); zowel vWf als sVCAM-1 zijn markers die het (dis)functioneren van het endotheel weergeven. Deze resultaten wijzen op een belangrijke rol van AGE-albumine in het disfunctioneren van de vaatwand en het ontstaan van vasculaire complicaties bij diabetes mellitus.

86. Prospectieve management studie naar het gebruik van D-dimeren en een klinische beslislijst bij het stellen van de diagnose longembolie

J. de JONGH-LEUVENINK¹, C. van der HEUL¹, G.J. den HEETEN¹, W.J.J. van ROOIJ¹, F.M.L.G. PALMEN¹, J.H.E.M. SCHIJEN¹, J.A. ROUKEMA¹, P. ZIJNEN¹, M.J. SLOB¹, M.J.H.A. KRUIP¹, H.R. BÜLLER² en J.W. ten CATE². *St. Elisabeth Ziekenhuis Tilburg¹, Academisch Medisch Centrum Amsterdam²*

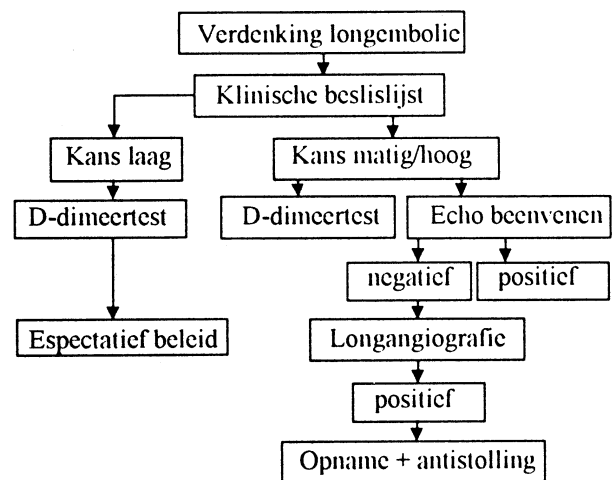
In een prospectieve studie, die onlangs is afgerond, werd onderzocht of digitale pulmonale subtractie en echografie van de beenvenen als diagnostische methode bij het beleid van patiënten met verdenking longembolie voldeed. Resultaten van 131 patiënten zijn geëvalueerd. Van deze populatie had 25% een longembolie, dit is een normale verdeling. De D-dimeer concentratie werd middels de Simpli-red test (Chromogenix) en ELISA methode op de Vidas (bioMérieux) bepaald. Eén patiënt bleek een longembolie te hebben met een D-dimeer (Vidas) (< 500 ng/ml), wat resulteert in een negatief voorspellende waarden (NPV) van 96,6%.

Bij de Simpli-red test was dit aanmerkelijk minder (9 valse negatieve monsters; NPV 93%).

In de tweede fase wordt volgens bijgaande figuur en een klinische beslislijst de diagnostiek uitgevoerd. Met de klinische beslislijst wordt gescoord op risicofactoren en op symptomen. Bij een lage kans op longembolie en een negatieve D-dimeer (< 500 ng/ml) wordt de patiënt zonder verder onderzoek naar huis gestuurd. Bij een hoge of matige kans wordt patiënt verder onderzocht en D-dimeer bepaald in het kader van het onderzoek.

Deze studie heeft naast het evalueren van bovenstaand diagnostisch traject ook als doel de kosten te evalueren en ervaring op te doen met het gebruik van laag moleculair gewicht

heparine therapie als behandeling van een longembolie. De resultaten zullen worden gepresenteerd in het eerste kwartaal van 1998.



Figuur 1. Werkschema longembolie diagnostiek studie

Stoornissen in het intermediaire metabolisme

87. Underestimation of the a-, mono- and diasialotransferrin isoforms using the Pharmacia Cdtect kit does not lead to misdiagnosing carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type I

R.A. WEVERS², H. RUSCH¹, K. HUYBEN² and P. VREKEN¹
Academic Medical Center, University of Amsterdam, Dept. of Clinical Chemistry and Div. Emma Children's Hospital¹, Amsterdam, The Netherlands and Academic Hospital Nijmegen, Department of Pediatrics², Nijmegen, The Netherlands

Carbohydrate deficient glycoprotein (CDG) syndrome is a neurologic syndrome with cerebellar hypoplasia and peripheral demyelination associated with abnormalities of multiple secretory glycoproteins. All serum glycoproteins are partially deficient in sialic acid, galactose, and N-acetylglucosamine. Isoelectric focussing (IEF) of transferrin in CDG syndrome type I typically shows a marked decrease of the tetrasialo fraction and an increase in di- and asialofractions. We evaluated the use of the CDtEct EIA kit of Pharmacia for detection of CDG syndrome type I and compared the results with the classic transferrin IEF. CDT values (113 U/l- 358 U/l, reference < 25 U/l) and CDT/total transferrin ratios (3.7% - 11.2% , reference $< 2.1\%$) were strongly elevated in all cases of CDG syndrome type I

in agreement with the abnormal transferrin IEF. However, quantification of the IEF transferrin isoforms yielded significantly higher percentages of the cumulative a-, mono- and diasialoforms (40% - 48%) suggesting that only a small portion of the latter fractions are detected with the CDtEct method. Modifications to the CDT sample preparation in all cases led to loss of specificity since increasing amounts of tri- and tetrasialotransferrin coeluted in the CDT fraction. In conclusion, despite the fact that the Pharmacia CDtEct kit underestimates the relative amounts of a-, mono- and diasialo transferrins, the diagnosis CDG syndrome cannot easily be missed using this method.

88. Phytanic acid α -oxidation in peroxisomal disorders: studies in cultured human fibroblasts

N.M. VERHOEVEN¹, D.S.M. SCHOR¹, C.R. ROE², R.J.A. WANDERS³ and C. JAKOBS¹

Department of Clinical Chemistry¹, Metabolic Unit, Free University Hospital, Amsterdam, Institute for Metabolic Disease², Baylor University Medical Center, Dallas, USA, Departments of Clinical Chemistry and Pediatrics³, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands

Phytanic acid is a branched-chain fatty acid in the human diet that, under normal circumstances, is rapidly degraded. The mechanism of this degradation remained unknown for a long time. Recently, however, it was discovered that phytanic acid is first activated to phytanoyl-CoA, after which 2-hydroxyphytanoyl-CoA is formed. 2-Hydroxyphytanoyl-CoA is converted into pristanal, a process by which formyl-CoA is released. Pristanal is converted into pristanic acid, a fatty acid that can be degraded by normal β -oxidation.

In several genetic peroxisomal disorders, phytanic acid degradation is impaired. This results in accumulation of phytanic acid in blood and tissues. We studied α -oxidation of phytanic acid in fibroblasts from controls and patients affected with classical Refsum disease, rhizomelic chondrodysplasia punctata, generalized peroxisomal defects and peroxisomal bifunctional protein deficiency.

Human cultured fibroblasts were incubated with phytanic acid, after which medium and cells were collected separately.

2-Hydroxyphytanic acid and pristanic acid were measured in the medium by stable isotope dilution gas chromatography mass spectrometry.

In controls, 2-hydroxyphytanic acid and pristanic acid could be detected in the medium after incubation with phytanic acid, proving that the α -oxidation of phytanic acid via 2-hydroxyphytanoyl-CoA to pristanic acid was active and intermediates were excreted into the medium.

In medium from cells with an α -oxidation defect (obtained from patients with Refsum disease, rhizomelic chondrodysplasia punctata and generalized peroxisomal defects) 2-hydroxyphytanic acid and pristanic acid were low or not detectable, showing that in these disorders the hydroxylation of phytanoyl-CoA to 2-hydroxyphytanoyl-CoA is deficient.

In medium from cells with a peroxisomal β -oxidation defect, 2-hydroxyphytanic acid and pristanic acid were formed in amounts comparable to those in the controls.

89. Human dihydroxyacetonephosphate acyltransferase (DHAPAT): cloning of the DHAPAT cDNA and molecular basis of rhizomelic chondrodysplasia punctata type 2

R. OFMAN¹, E.H. HETTEMA^{1,2}, E. HOGENHOUT¹, A.O. MUIJSERS² and R.J.A. WANDERS^{1,3}

University of Amsterdam, Academic Medical Centre, Departments of Clinical Chemistry¹, Biochemistry² and Pediatrics, Emma Children's Hospital³, Amsterdam, The Netherlands

Rhizomelic chondrodysplasia punctata (RCDP) belongs to the group of peroxisomal disorders and is clinically characterized by a disproportionately short stature, cataract, mental retardation a.o. Biochemically, 3 distinct forms can be distinguished. In RCDP type 1, four peroxisomal abnormalities involving deficiencies of:

1. dihydroxyacetonephosphate acyltransferase (DHAPAT)
2. alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase (alkyl DHAP synthase)
3. phytanoyl-CoA hydroxylase
4. peroxisomal 41 kDa thiolase I have been described.

We recently identified the primary defect in RCDP type 1 at the level of the PEX7-gene coding for the PTS2 receptor involving in peroxisome biogenesis (Motley et al. *Nature*

Genetics 1997; 15: 377-380). RCDP types 2 and 3 are due to isolated deficiencies of DHAPAT and alkylDHAP synthase, respectively.

We have purified DHAPAT from human placenta, performed N-terminal amino acid sequencing and used this information to search for EST-clones. This led to the identification of a full-length cDNA which was found to encode DHAPAT after expression in yeast. In all RCDP type 2 patients we found mutations in the DHAPAT cDNAs. In conclusion, we have resolved the molecular basis of RCDP type 2 which is of central importance for carrier detection and prenatal diagnosis. Construction of a mouse DHAPAT knock-out is underway to study the in vivo function of etherphospholipids and potential therapeutic measures.

90. Cholesterol biosynthesis in man, peroxisomes and peroxisomal disorders: differential deficiency of mevalonate kinase and phosphomevalonate kinase in Zellweger syndrome and rhizomelic chondrodysplasia punctata

R.J.A. WANDERS^{1,2} and G.J. ROMEIJN¹

University of Amsterdam, Academic Medical Centre, Departments of Clinical Chemistry¹ and Pediatrics, Emma Children's Hospital², Amsterdam, The Netherlands

Biosynthesis of cholesterol is a vital function of virtually all kinds of cells and involves the complicated interaction between a large variety of enzymes in different subcellular compartments. Synthesis starts with the condensation of 2 acetyl-CoA molecules followed by addition of another one, subsequently producing 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) which is converted into mevalonate by HMG-CoA reductase. Two subsequent phosphorylations catalyzed by mevalonate kinase (MK) and phosphomevalonate kinase (PMK) produce mevalonatepyrophosphate. There are reports in literature suggesting the involvement of peroxisomes in cholesterol synthesis. We have now measured the activity of MK and PMK in livers from Zellweger patients in which

peroxisome biogenesis is fully defective and patients affected by rhizomelic chondrodysplasia punctata (RCDP) type I resulting from a defective PTS2-receptor. MK and PMK were both found to be deficient in liver from Zellweger patients whereas in RCDP type I there was deficient activity of MK but not PMK, suggesting that MK belongs to the group of peroxisomal proteins with a peroxisome-targeting-signal 2 (PTS2). Inspection of the amino acid sequence indeed shows the presence of such a signal.

Taken together, our data provide convincing independent evidence for a crucial role of peroxisomes in cholesterol synthesis. This is now under detailed study.

91. Snelle diagnostiek: basis voor een goede afloop bij een patiëntje met MTHFR deficiëntie

N.G.G.M. ABELING¹, A.H. van GENNIP¹, H. BLOM², R.A. WEVERS², P. VREKEN¹, H.L.G. van TINTEREN³ en H.D. BAKKER¹

Laboratorium Genetische Metabole Ziekten, Afdeling Klinische Chemie en Divisie Emma Kinderziekenhuis¹, AMC, Universiteit van Amsterdam, Amsterdam; Laboratorium Kindergeneeskunde & Neurologie², Academisch Ziekenhuis Nijmegen en Afd. Kindergeneeskunde³, Ziekenhuis Hilversum

B.K., een meisje van consanguine Turkse ouders, werd na een premature geboorte in de tweede levensweek opgenomen met braken, voedselweigerings, recidiverende bradycardie en icterus. Gedacht werd aan sepsis, maar dit kon niet worden bevestigd, waardoor de verdenking op een stofwisselingsziekte rees.

In de hiervoor ingezonden urine werd bij de aminozuur-analyse een fors verhoogde excretie van (vrij) homocystine gemeten (73 µmol/mmol kreat.; ref. <1). Ook in plasma werd een hoge concentratie homocystine (19 µM; ref <1) aangetoond. Het ontbreken van methylmalonacidurie en een zeer lage methioninespiegel in plasma (<5 µM; ref. > 14) wees al snel op een remethyleringsdefect, en de afwezigheid van een megaloblastaire anemie deed vermoeden dat er sprake was van een deficiëntie van 5,10-methyleentetrahydrofolaat reductase (MTHFR).

Omdat het klinische beeld inmiddels ernstig was verslechterd: in korte tijd ontwikkelde zich een ernstig neurologisch beeld met toenemende convulsies, die niet op anti-epileptische medicatie reageerden, werd besloten de patiënt onmiddellijk te behandelen op basis van het vermoede defect. Gezien de zeer lage methioninespiegels, met name ook in de liquor gemeten, werd aan de inmiddels al gestarte proefbehandeling met vitamine B12, vitamine B6, foliumzuur en betaïne, in hoge dosering (250 mg/dag) methionine toegevoegd, waarop binnen 24 uur een spectaculaire klinische verbetering werd gezien, met volledige verdwijning van de convulsies.

De deficiëntie van MTHFR kon snel worden bevestigd door

meting van de enzymactiviteit in leukocyten, waarna de behandeling werd beperkt tot foliumzuur, betaïne en methionine. De methioninesuppletie kon sterk worden gereduceerd tot een onderhoudsdosering van 50 mg/dag, waarop normale methioninespiegels in plasma konden worden gehandhaafd.

De patiënt verkeert thans, 10 maanden sinds diagnose, klinisch in goede toestand en ontwikkelt zich bevredigend.

Het uitzonderlijk gunstige klinische beloop van deze aandoening na de aanvankelijk ernstige neurologische problemen doet vermoeden dat het cerebrale homocysteinemetabolisme een belangrijker rol speelt dan tot dusver werd aangenomen, en dat bij MTHFR deficiëntie onder bepaalde omstandigheden een intracerebraal tekort aan methionine kan ontstaan, dat zonder uitstel moet worden gecorrigeerd door toediening van methionine.

Over de rol van betaïne bij MTHFR deficiëntie bestaat nog geen duidelijkheid. Voor aanvang van de behandeling werden normale concentraties in urine en liquor van B.K. gemeten.

Bij andere patiënten met MTHFR deficiëntie werd echter een gunstig ondersteunend effect van betaïne-suppletie gerapporteerd. Derhalve moet worden betwijfeld of de door betaïne: homocysteïne methyltransferase gekatalyseerde alternatieve remethyleringsroute onder omstandigheden van metabole stress voldoende compensatie biedt voor het wegvallen van de route via 5-methyltetrahydrofolaat: homocysteïne methyltransferase.

92. Rapid diagnosis of organic acidemias and fatty acid oxidation defects by quantitative Electrospray Tandem-MS acylcarnitine analysis in plasma

P. VREKEN, A.E.M. van LINT, A.H. BOOTSMA, H. OVERMARS, R.J.A. WANDERS and A.H. van GENNIP

Academic Medical Center, University of Amsterdam, Dept. of Clinical Chemistry and Div. Emma Children's Hospital, Amsterdam, The Netherlands

Organic acidemias caused by mitochondrial enzyme defects in the catabolism of branched-chain amino acids and defects in mitochondrial fatty acid oxidation comprise a group of greater than 20 distinct disorders. In all these disorders there is an accumulation of, potentially toxic, acyl-CoA esters in mitochondria which are converted into acylcarnitine esters, releasing coenzyme A. This results in an increased concentration of circulating acylcarnitines, increased excretion of acylcarnitines in urine and secondary carnitine deficiency. Therefore the analysis of circulating free carnitine and acylcarnitines provides a powerful selective screening tool for these disorders.

Electrospray Tandem-MS (ESI/MS/MS) analysis has provided a significantly technological advance for the rapid and accurate analysis of acylcarnitines with high sensitivity and specificity, allowing the analysis of large numbers of samples. Moreover, ESI/MS/MS analysis of acylcarnitines does not require time-consuming separation techniques like GC or HPLC before mass-spectrometry because separation occurs during MS/MS analysis allowing high specificity even with complex mixtures like plasma and urine.

In this study, to plasma samples (50 µl) isotopically labeled 2H3-free, 2H3 -C2, 2H3 -C8 and 2H3 -C16 carnitine were

added as internal standards and samples were subsequently treated with butanolic HCL in order to butylate the acylcarnitines. Free carnitine and acylcarnitines were measured using scanning for precursor ions of mass 85 from 200-550 Da during 2 minutes on a VG Quattro triple quadrupole mass spectrometer.

Reproducibility was acceptable with a day-day-coefficient of variation of 5% for free carnitine and 4-9 % for the different acylcarnitines.

Analysis of plasma samples from patients suffering from fatty acid oxidation defects or organic acidemias (n >100) showed abnormal acylcarnitine profiles in all cases when the samples were taken under stress (e.g. hypoglycemic episodes). In clinically stable episodes an essentially normal acylcarnitine profile was obtained only for one patient with a mild form of glutaric aciduria type II. For all other defects abnormal profiles were observed under a wide variety of clinical conditions illustrating the high sensitivity of the method.

In conclusion, ESI/MS/MS of plasma samples is a suitable and rapid technique for detecting defects in the catabolism of branched chain amino acids and defects in mitochondrial fatty acid oxidation with a high sensitivity and accuracy.

93. Phytanoyl-CoA hydroxylase (PhyH): enzyme purification, identification of the PhyH cDNA and the molecular basis of classical Refsum diseases

G.A. JANSEN¹, S. FERDINANDUSSE¹, R. OFMAN¹, L. IJLST¹, T.O. MUIJSERS², O.H. SKJELDAL³, O. STOKKE³, C. JAKOBS⁴, G.T.N. BESLEY⁵, J.E. WRAITH⁵ and R.J.A. WANDERS^{1,6}

University of Amsterdam, Academic Medical Centre, Department of Clinical Chemistry¹, Biochemistry² and Pediatrics⁶, Amsterdam, The Netherlands and Rikshospitalet, Oslo, Norway³, Free University of Amsterdam⁴, Manchester Children's Hospital, Manchester, United Kingdom⁵

Phytanic acid (3, 7, 11, 15-tetramethylhexadecanoic acid) is a branched-chain fatty acid which is solely derived from dietary sources. The methylgroup at the 3-position prohibits immediate β -oxidation, requiring removal of the terminal carboxylgroup by α -oxidation. The mechanism of α -oxidation has long remained obscure but recent studies have led to the identification of phytanoyl-CoA hydroxylase, a remarkable type of enzyme catalyzing the 2-ketoglutarate, Fe²⁺ and ascorbate dependent hydroxylation of phytanoyl-CoA to 2-hydroxyphytanoyl-CoA. The enzyme turned out to be located in peroxisomes and deficient in 3 different types of peroxisomal disorders:

1. Zellweger syndrome

2. Rhizomelic chondrodysplasia punctata

3. Classical Refsum disease.

We have purified the enzyme from rat liver peroxisomes to homogeneity and performed N-terminal sequencing which led the way to the putative PhyH cDNA. Expression in the yeast *S. cerevisiae* indeed proved the identity of the PhyH cDNA. The cDNA appeared to code for a protein with a PTS2-sequence explaining the deficiency in RCDP. Mutation analysis in classical Refsum patients revealed a series of different mutations in all patients thus identifying the molecular basis of Refsum disease. We have also identified the murine PhyH cDNA, resolved part of the gene structure which will form the basis for the construction of a mouse model.

94. Mitochondrial fatty acid β -oxidation disorders: resolution of the molecular basis of hepatic CPT I deficiency in a patient

L. IJLST¹, H. MANDEL³, W. OOSTHEIM¹, J.P.N. RUITER¹ and R.J.A. WANDERS^{1,2}

Academic Medical Centre, Univ. of Amsterdam, Dept. of Clinical Chemistry¹ and Paediatrics², Amsterdam, The Netherlands; Rambam Medical Centre, Dept. of Pediatrics³, Haifa, Israel

The mitochondrial β -oxidation of long-chain fatty acids is the major source of energy production in man. Prior to its catabolism long-chain fatty acids are activated to its CoA ester and transported across the mitochondrial membrane. Three different gene products are involved in this carnitine dependent transport shuttle: carnitine palmitoyl-CoA transferase I (CPT I), carnitine acyl-carnitine carrier (CAC) and carnitine palmitoyl-CoA transferase II (CPT II). The first enzyme (CPT I) converts the fatty acid-CoA ester to its carnitine ester which is then transported across the mitochondrial inner-membrane by CAC. Once inside the mitochondrial lumen CPT II reconverts the carnitine ester back to the CoA ester which can then serve as a substrate for the β -oxidation spiral.

At least 10 patients with CPT I deficiency have been described presenting with coma, seizures, hepatomegaly and hypoketotic hypoglycaemia, usually associated with fasting after diarrhoea or a viral infection.

Two different isoforms of CPT I are identified: a hepatic form

(CPT IA) and a muscle form (CPT IB) both encoded by different genes located on chromosome 11q and 22q respectively (1). Since the cloning of the human CPT IA gene (hepatic form) in 1995 (2) no mutations are described so far in patients. The hepatic isoform is expressed in different tissues including fibroblasts. The patient presented here showed no CPT I activity (<0.01 nmol/min/mg, control: 0.60 ± 0.25 nmol/min/mg) in fibroblasts when measured in the physiologic direction using palmitoyl-CoA as substrate. We sequenced the complete cDNA in 3 overlapping PCR fragments and found a A1361G missense mutation, changing the codon for ASP to GLY. This aminoacid is conserved through 10 different acyl-transferase species and is located near a histidine residue which probably plays a crucial role in the catalytic mechanism (3).

1 Britton CH et al. Genomics 1997; 40: 209-211.

2 Britton CH et al. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 1984-1988.

3 Schmalix W, Bandlow W. J Biol Chem 1993; 268: 27428-27439.

95. Mitochondrial fatty acid β -oxidation disorders: identification of mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier deficiency using a simple assay plus successful prenatal diagnosis

R.J.A. WANDERS^{1,2}, J.P.N. RUITER¹, L. IJLST¹, W. ROSCHINGER³ and A. MUNTAU³

University of Amsterdam, Academic Medical Center, Depts. Clinical Chemistry, Laboratory for Genetic Metabolic Disease¹ and Pediatrics², Amsterdam, The Netherlands; University Children's Hospital Munich, Germany³

The index patient was born after an uneventful pregnancy and normal delivery but showed a generalized seizure plus respiratory distress with tachycard arrhythmia at 18 hours which required extensive resuscitation. Upon treatment with intravenous glucose a.o. the clinical condition gradually improved and the patient was discharged from the intensive care unit. Initial laboratory evaluation showed severe hypoketotic hypoglycaemia, metabolic acidosis, increased transaminases, strongly elevated CPK, hyperammonemia but normal lactate. Urinary dicarboxylic acids were mildly abnormal. Free carnitine was extremely low which led us to initiate treatment with L-carnitine (100 mg/kg/day). Analysis of long-chain acylcar-

nitines showed high C16:0, C16:1, C18:1 and C18:2 acylcarnitine levels. Detailed studies in fibroblasts showed normal values for all enzymes involved in long-chain fatty acid oxidation (CPT 1 and 2, VLCAD, MTP) which led us to determine the activity of the mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier (CAC) using a newly devised method. A complete deficiency was found. Subsequently, we performed prenatal diagnosis in this family by measuring CAC-activity in cultured chorionic villous cells. Activity was found to be normal suggesting a normal fetus. A healthy child has recently been born. The index patient died at 9 months from pneumonia and cardiorespiratory arrest.

96. Elevated serum IL-8, IL-6 and TNF- α in women with preeclampsia

F.V. VELZING-AARTS¹, F.P.L. van der DIJS² and A.J. DUITSS^{3,4}

Central Laboratory for Clinical Chemistry, University Hospital Groningen¹, Department Clinical Chemistry Public Health Laboratory Curaçao², Clinical Laboratory St Elisabeth Hospital Curaçao³ and Red Cross Bloodbank Curaçao⁴

Endothelial damage plays a major role in the pathogenesis of preeclampsia. The mechanisms leading to this damage remain to be elucidated. Recent data suggest an important role of cytokines in this process; high levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) have been reported. However, due to the complex and pleiotropic nature of the immune system a well matched group of control patients is required to critically analyze the role of cytokines in preeclampsia. We conducted a study in which 14 preeclamptic women were matched for gestational age, parity, maternal age and socio-economical status to 14 healthy pregnant women. Preeclampsia was defined as a diastolic blood pressure of ≥ 90 mm Hg in combination with proteinuria of ≥ 0.3 g/l. Control women were normotensive and nonproteinuric at the time of blood sampling. Mean serum levels of IL-8, IL-6 and TNF- α

in both groups were determined using an Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay technique. Between group differences of serum cytokine levels were analyzed using a two-tailed Wilcoxon matched pairs signed rank test at $p < 0.05$. Preeclamptic women showed significantly higher mean serum IL-8 levels compared to controls ($p = 0.0022$). As IL-8 is a strong activator of neutrophils this could imply an important role for these cells in endothelial activation and damage. Consistent with findings of others, serum IL-6 and TNF- α levels were also found to be significantly higher in the preeclamptic group ($p = 0.0029$ and $p = 0.0087$, respectively). We conclude that endothelial cell damage might be a process in which, next to the direct effect of cytokines, also neutrophil activation might play a role.

97. PCB levels in adipose tissue, liver and brain from nine stillborns of varying gestational ages

C.I. LANTING¹, F.A.J. MUSKIET², and E.R. BOERSMA¹

Department of Obstetrics and Gynaecology, Perinatal Nutrition & Development Unit¹ and Central Laboratory for Clinical Chemistry², University and University Hospital Groningen

We analyzed polychlorinated biphenyls (PCBs) in brain, liver and subcutaneous adipose tissue of nine fetuses that died in utero. Their median (range) gestational ages and birthweights were 34 (17-40) weeks and 2050 (162-3,225) g. The levels of the PCB congeners nos. 118, 138, 153 and 180, and the sum of the levels of these congeners (Σ PCB) was calculated in terms of tissue total fat content. The median (range) Σ PCB (in ng/g fat) was 235 (97-768) in adipose tissue, 198 (67-362) in liver, and 50 (22-122) in brain. Median (range) Σ PCB in liver and brain were, respectively, 0.8 (0.4-0.9) and 0.2 (0.1-0.3) times as high as the Σ PCB in adipose tissue. There were strong correlations between the Σ PCB in adipose tissue and liver ($r = 0.98$; $p < 0.01$), and between the Σ PCB in adipose tissue and

brain ($r = 0.91$; $p < 0.01$). The congeneric distribution patterns of PCBs in adipose tissue, liver and brain proved similar. The levels of the individual PCB congeners and the Σ PCB were not associated with gestational age in neither fetal compartment (r varied between 0.22 and 0.47). Levels in adipose tissue are in the same range as levels previously established in breast milk obtained from Dutch mothers in their second week after delivery. The PCB congeneric distribution pattern of fetal adipose tissue was not different from that of breast milk. We conclude that maternal PCBs have a tendency to accumulate in fetal tissue with high triglyceride contents. They are easily transferred across the placenta and seem to be equilibrated among the apolar parts of maternal and fetal lipids.

98. Lamellar body count als eenvoudige screeningsmethode voor de foetale longrijpheid

H.A.M. VOORBIJ¹, K.P. TIMMERMANS², A.J. HUISJES², M. van LOON¹ en E.K.A. WINCKERS¹

Klinische Chemie¹, Gynaecologie², Academisch Ziekenhuis Utrecht

In het AZU worden jaarlijks ongeveer 70 vruchtwaterpuncties verricht om de foetale longrijping te onderzoeken bij gecompliceerde zwangerschappen. Hiervoor werd tot voor kort alleen de L/S ratio gebruikt volgens de methode die door Gluck is geïntroduceerd en als gouden standaard wordt gebruikt. Deze bepaling heeft een acceptabele sensitiviteit en specificiteit, maar is zeer arbeidsintensief. Wij hebben het gebruik van de 'lamellar body count (LBC)' onderzocht in ons laboratorium met het doel een snelle en goedkope methode te vinden voor de screening op foetale longrijping. Lamellar bodies zijn laminair gelaagde bolletjes met een doorsnede van ongeveer 2,3 μ m en een inhoud van $\pm 6,3$ fL. Zij bevatten Lecithine en Sphingomyeline en worden door alveolaire cellen uitgescheiden in het vruchtwater. In de periode van maart 1996 tot en met juni 1997 werden 51 vruchtwaterpuncties onderzocht op de concentratie van lamellar bodies en de L/S ratio. Na centri-

fugatie (450g) werden de lamellar bodies gemeten in het supernatant op een hematologie analyzer (Celldyn 1600) in het trombocyten-kanaal. De uitslagen werden vergeleken met de L/S ratio. Er bleek een matige correlatie te bestaan met de L/S ratio ($r^2: 0,4633$). De sensitiviteit, specificiteit, PV+ en PV- werden onderzocht voor verschillende lamellar body concentraties. Op basis van deze resultaten hebben we een strategische beslissing gemaakt. Indien de LBC lager is dan $8 \times 10^9/l$ dan is er zeker geen goede longrijping en is een L/S bepaling niet nodig. Indien de LBC hoger is dan $30 \times 10^9/l$ dan is er zeker sprake van voldoende longrijpheid. In het tusseliggende gebied is een L/S bepaling zinvol om een goede inschatting te kunnen geven van de longrijpheid. De LBC is een snelle, eenvoudige en goedkope bepaling die op elk klinisch-chemisch laboratorium kan worden uitgevoerd als screeningsmethode voor de foetale longrijpheid.

99. Umbilical vessels in preeclamptic pregnancies have low contents of both $\omega 3$ and $\omega 6$ long chain polyunsaturated fatty acids

F.V. VELZING-AARTS¹, F.R.M. van der KLIS², F.P.L. van der DIJS² and F.A.J. MUSKIET¹
Central Laboratory for Clinical Chemistry, University Hospital Groningen¹ and Public Health Laboratory, Curaçao²

We determined the fatty acid compositions of maternal and umbilical platelets (PLT), and of the umbilical arteries (UA) and veins (UV) of 27 preeclamptic pregnancies and 24 normotensive controls, mostly of Afro-Caribbean descent. Between-group differences were analyzed with the Kruskal-Wallis test or with analysis of covariance with gestational age as covariate. PLT of preeclamptic women contained lower 20:5 $\omega 3$, and a higher 20:4 $\omega 6$ /20:5 $\omega 3$ ratio. Linear discriminant analysis revealed higher 20:4 $\omega 6$. Major differences were found in UV and especially UA fatty acid compositions. UA and UV of preeclamptic pregnancies contained lower

long chain polyunsaturated fatty acids of the $\omega 3$ -series (LCPUFA $\omega 3$), LCPUFA $\omega 6$ and 20:3 $\omega 6$. UA had lower 20:4 $\omega 6$, higher 20:3 $\omega 9$ and 20:3 $\omega 9$ /20:4 $\omega 6$. We conclude that the low LCPUFA $\omega 3$ and LCPUFA $\omega 6$ levels in umbilical vessels of preeclamptic women with adequate $\omega 6$ status may indicate insufficient LCPUFA transplacental transfer. The low 20:4 $\omega 6$, high 20:3 $\omega 9$ and high 20:3 $\omega 9$ /20:4 $\omega 6$ ratio in UA may unfavorably affect local prostacyclin production and cause other 20:3 $\omega 9$ related adverse effects. Low 20:3 $\omega 6$ in UV and UA, and low 20:5 $\omega 3$ in maternal PLT, may contribute to the dominance of 20:4 $\omega 6$ derived eicosanoids.

100. Laboratorium diagnostiek van ovariële reserve

G.J.E. OOSTERHUIS¹, C.B. LAMBALK², H.W.B. MICHGELSEN¹, J. SCHOEMAKER² en I. VERMES¹
Medisch Spectrum Twente, Enschede¹ en Academisch Ziekenhuis Vrije Universiteit, afdeling Gynaecologie en Obstetrie, Amsterdam²

Het toenemend gebruik van geassisteerde voortplantingstechnieken roept de vraag op om adequate diagnostiek van ovarieel capaciteit. Een ideale test voor het vaststellen van de ovarieel capaciteit is non-invasief, analytisch betrouwbaar, geschikt voor routine diagnostiek en goedkoop. De gebruikelijke bepaling van FSH in serum op de derde cyclusdag hebben wij gedaan naast seriële serumbevestigingen van FSH, bepaling van FSH in urine, IGF-I en IGFBP-3 bepalingen in folliculair vocht en bepaling van apoptose in granulosa cellen.

Bij 40 perimenopauzale vrouwen hebben wij een seriële meting van serum FSH op dezelfde dag vergeleken met FSH in een ochtendurine, een willekeurig urinemonster en een 24-uurs urinemonster. De bepalingen zijn gedaan in ongeextraheerde urinemonsters met een AxSYM random access immunoassay analyzer (Abbott Laboratories).

De correlatie tussen FSH in geextraheerde en ongeextraheerde urinemonster was goed. Volgens onze resultaten is de optimale bewaarconditie op 4°C zonder additiva. De correlatiecoëfficiënt tussen de gemiddelde serum FSH-waarden van de seriële meting en de FSH in urine is 0,904 in ochtendurine, 0,915 in een willekeurig urinemonster en 0,857 in 24-uurs urine.

Wij bepaalden IGF-I en IGFBP-3 in folliculair vocht na ovarieel hyperstimulatie in een IVF-programma. IGF-I in folliculair vocht was significant gecorreleert met het aantal follikels, een maat voor de respons op de behandeling. IGFBP-3 was niet gecorreleerd met de klinische en biochemische variabelen van de ovariumfunctie.

Ook hebben wij apoptose gemeten met behulp van de TUNEL techniek op de flowcytometer in granulosa cellen, geïsoleerd uit folliculair vocht na een IVF-punctie. In een groep patienten met normale basale FSH, significant meer granulosa cellen waren apoptotisch bij vrouwen die niet zwanger werden tijdens de behandeling in vergelijking met vrouwen die wel zwanger zijn geworden ($p=0,021$).

Hoewel nieuwe technieken als IGF-I in folliculair vocht en apoptosemetingen in granulosa cellen veel informatie verschaffen betreffende de folliculogenese, FSH op de derde cyclusdag blijft de gouden standaard. Volgens onze resultaten met urinair FSH is het bepalen van FSH in ongeextraheerde monsters voor de routine laboratoriumdiagnostiek het meest geschikt als maat voor ovarieel reserve.

101. Lipoprotein(a) concentrations in patients with a history of severe preeclampsia; a case control study

A. van den ENDE, M.G. van PAMPUS¹, M.M.W. KOOPMAN, H. WOLF¹, H.R. BULLER and M.H. PRINS².
Dept. of Haemostasis, Thrombosis, Atherosclerosis and Inflammation; Dept. of Gynaecology and Obstetrics¹; Dept. of Clinical Epidemiology and Biostatistics²; Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

Objective: High concentration of lipoprotein(a), Lp(a), is associated with atherosclerotic disease. Atheroma may develop in spiral arteries that have been invaded by endovascular trophoblast in both preeclamptic and normal pregnancies, although in preeclampsia it is much more common, especially in the decidual segments. We hypothesized that a high concentration of Lp(a) is associated with the development of preeclampsia. In cases of spontaneous abortion the mechanism of physiological changes in spiral arteries is often defective and seems to be associated with a reduction in trophoblast invasion. We therefore also investigated whether high concentrations of Lp(a) are also associated with spontaneous abortion.

Study design: Seventy-six patients with a history of severe preeclampsia and sixty-seven age-matched controls with a history of normal pregnancies only were investigated for raised Lp(a) levels at least 10 weeks postpartum in the second

half of a normal menstrual cycle. None of the controls or patients were pregnant or using oral contraceptives. Lp(a) > 420 mg/l was defined as "abnormal" corresponding to the 90th percentile of the Lp(a) distribution of our control group.

Results: There was no significant difference between the prevalence of abnormal levels of Lp(a) in the patient group (21%) and in the control group (10.4%). Seven patients had at least one spontaneous abortion, 5 of these had abnormal concentrations of Lp(a). Two patients experienced recurrent abortion and both had abnormal Lp(a) levels.

Conclusions: A history of severe preeclampsia alone is not associated with high Lp(a) concentrations. A history of severe preeclampsia and spontaneous abortion, however, is significantly associated with elevated Lp(a). (Whether spontaneous abortion or recurrent abortion and high concentration of Lp(a) are causal, has yet to be demonstrated.)

102. Screening op irregulaire antistoffen bij zwangeren in de 12de week: resultaten van 1,5 jaar onderzoek

E. van VOORST tot VOORST, M. FOKKERT, J. KOLKMAN-de VROOMEN, S. KOEKKOEK-MEIJER en M. WESTERVOORDE

Laboratorium Ziekenhuis De Weezenlanden, Zwolle

Inleiding: Naar aanleiding van de aanbeveling van het College voor de Bloedtransfusie (januari 1994) om vrouwen jonger dan 45 jaar, uitsluitend erythrocyten toe te dienen die compatibel zijn m.b.t. de antigenen c, E en K, wordt door ons laboratorium sinds enige tijd ook de screening op irregulaire antistoffen (IRRA's) gedaan bij zwangeren in de twaalfde week van hun zwangerschap in het bloed dat afgenomen wordt voor de bloedgroep- en rhesus(D) antigeenbepaling.

Resultaten: De resultaten van 18 maanden (augustus 1996 tot en met januari 1998) onderzoek worden hieronder weergegeven. Totaal aantal IRRA's: 1348, waarvan 25 positief (1,85%)

Van deze 25:

- 4 niet van belang voor zwangerschap of transfusie
- 12 niet van belang voor zwangerschap (wel voor het vinden van compatibel bloed)
- 9 van belang voor zwangerschap: 1x anti-D, 1x anti-C, 2x anti-Cw, 1x anti-c, 1x anti-E, 2x anti-K, 1x anti-S

Verzoek om het betreffende antigeen bij de vader te onderzoeken werd tot nu toe 4x gehonoreerd: 2x negatief (1x Cw, 1x K), 1x heterozygoot (Ss) en 1x homozygoot (cc). Het tweede kind van de moeder met de anti-D is evenals het eerste rhesus(D) positief.

Constatering:

- Er dient nader onderzoek te worden verricht betreffende de antigenen op de erythrocyten van 4 vaders (ofwel van de babies). Tevens is het gewenst het verloop van de zwangerschap na te gaan, te volgen en /of te bewaken (zeker bij de klinisch belangrijke antistoffen).
- Tot nu toe zijn er minstens 3 antistoffen (anti-c, anti-D en anti-S) gevonden (aantal kan 7 worden), die hemolytische ziekte van de pasgeborene kunnen veroorzaken (2,2 (5,2) pro mille).
- In minstens 1 geval (anti-K, vader K-antigeen negatief) is in het verleden niet-compatibel bloed getransfundeerd, echter niet schadelijk voor deze zwangerschap.
- Er zijn 1 anti-D en 5 andere rhesus-antistoffen in deze populatie van 1348 zwangeren gevonden.

Conclusie: De in ons ziekenhuis geldende aanbeveling lijkt een juiste: alle zwangere vrouwen dienen tijdens hun zwangerschap (12de week, tegelijk met bloedgroep / rhesus én 7-8ste maand) onderzocht te worden op irregulaire antistoffen tegen erythrocyten antigenen.

Kwaliteitsbewaking, data handling, referentiewaarden en statistiek

103. Bevordering van kwaliteitsbewustzijn in de laboratoriumorganisatie

P.C.M. BARTELS en M. SCHOORL

Laboratorium voor Klinische Chemie, Hematologie & Immunologie, Medisch Centrum Alkmaar

Sinds het behalen van het CCKL test certificaat is inmiddels 2^{1/2} jaar verstreken. De uitreiking van het certificaat was een belangrijke mijlpaal ter afsluiting van een periode van ruim 2 jaar waarin het accent van kwaliteitsdenken hoofdzakelijk gericht was op het eenduidig beschrijven van criteria en richtlijnen voor processen en procedures. Van meet af aan is aan de beïnvloeding van mentaliteit en attitude van de individuele medewerker echter evenzeer ruimschoots aandacht besteed. Instructies en richtlijnen komen immers pas optimaal tot hun recht bij intrinsiek gemotiveerde medewerkers. Na accreditatie is het daarom zaak om de individuele medewerker frequent te stimuleren en uit te nodigen om te participeren in verbetercycli.

Verscheidene instrumenten kunnen hiervoor worden toege-

past. Met behulp van interne audits worden sterkere en zwakkere schakels van het kwaliteitssysteem geïnventariseerd. Externe audits hebben bovendien als voordeel dat 'vreemde ogen dwingen'. Implementatie van een systeem voor integrale kwaliteitszorg biedt aanknopingspunten voor aanpassing van de bedrijfscultuur. Een belangrijke component van het opleiding- en nascholingsplan behelst beïnvloeding van mentaliteit en attitude. Consequente melding van ideeën, klachten en onvolkomenheden is essentieel om de doelmatigheid van het kwaliteitssysteem te optimaliseren. Het patroon van klachten wordt nader geëvalueerd naar omvang en verscheidenheid. Door toepassing van bench marking kunnen organisaties elkaar systematisch feed back geven en stimuleren bij het bewerkstelligen van creatieve oplossingen voor weerbarstige knelpunten.

104. Systematische reviews van diagnostische trials

W.P. OOSTERHUIS¹ en S. SANDBERG²

Ziekenhuis de Heel, Zaandam¹ en Haukeland University Hospital, Bergen, Noorwegen²

Recent heeft de IFCC een nieuwe commissie ingesteld die zich bezighoudt met systematisch literatuuronderzoek: de 'Committee on Systematic Reviewing in Laboratory Medicine' (commissie-SRLM). Het uitvoeren van een systematisch review van diagnostische tests kan worden beschouwd als een nieuwe wetenschappelijke discipline. Deze kent zijn eigen methoden: vooral wat betreft het valideren van de originele (primaire) studies, maar ook de statistische methodes die toegepast worden om de gegevens te analyseren en samen te vatten. Een werkgroep binnen de Cochrane Collaboration heeft aanbevelingen gedaan hoe een systematisch review moet

worden uitgevoerd (Cochrane Methods Working Group on Systematic Review of Screening and Diagnostic Tests). Deze richtlijnen staan op internet ([http:// som.flinders.edu.au/FUSA/cochrane/cochrane/crgs.htm](http://som.flinders.edu.au/FUSA/cochrane/cochrane/crgs.htm))

De IFCC ondersteunt systematische onderzoeken van diagnostische trials en beschouwt het als de basis van de rationele toepassing van laboratoriumdiagnostiek. De nieuw gevormde commissie-SRLM, onderdeel van de Management and Education divisie van de IFCC, heeft de taak gekregen dit onderzoek binnen het vakgebied te stimuleren.

De commissie is zelf begonnen met een review van de litera-

tuur betreffende de diagnostische waarde van testen op het gebied van vitamine B12-deficiëntie. De National Health Service Research Centre for Reviews and Dissemination in the UK (<http://www.york.ac.uk/inst/crd/search.htm>) geven voorbeelden van gestructureerde zoekstrategieën voor Medline. De verzamelde literatuur wordt op kwaliteit getoetst door toepassing van validatieregels waaraan de onderzoeksresultaten moeten voldoen. De resultaten worden gecodeerd en samengevat, waar mogelijk resulterend in een soort ROC-curve (de Summary Receiver Operating Characteristic, SROC-curve).

De correlatie en aanvullende waarde van verschillende testen vormt een onderwerp dat speciale aandacht vraagt. De ervaring die door de commissie SRLM hiermee opdoet, zal onder andere worden gebruikt in workshops. De Cochrane Collaboration accepteert nog geen review van diagnostisch onderzoek in de Cochrane database, hoewel daar toenemend vraag naar is.

Sandberg S, Oosterhuis WP, Freedman D, Kawai F. Systematic reviewing in laboratory medicine. *JIFCC* 1997; 9: 154-5.

105. Medisch onderbouwde analytische nauwkeurigheid voor HbA1c bepaling

K. MIEDEMA, E. LENTERS, R. KEMNA en T. de HAAN
Laboratorium Ziekenhuis De Weezenlanden, Zwolle

HbA1c is algemeen geaccepteerd als de parameter ter controle van de glycemische instelling bij patiënten met diabetes mellitus. De HbA1c bepaling dient gemiddeld 2-4 maal per jaar bij elke diabetespatiënt te worden uitgevoerd. Standaardisatie van deze bepaling was een probleem, echter de introductie van SKZL-kalibratoren hebben harmonisatie op de DCCT-getallen mogelijk gemaakt, waardoor de klinische bruikbaarheid van de resultaten sterk is verbeterd.

Echter, zowel een te grote bias als een te grote imprecisie kan dramatische invloed hebben op de medische significantie van de resultaten. Met de publicatie van de DCCT-resultaten en de toenemende internationale standaardisatie is een zeer kleine analytische imprecisie nodig om de patiënt in het eigen laboratorium te volgen. Immers, de significantie van twee opeenvolgende HbA1c resultaten wordt in grote mate bepaald door de analytische imprecisie van de gebruikte bepaling.

Teneinde de klinische significantie te berekenen zijn in een drietal populaties de individuele, biologische VC's berekend van het HbA1c. De lange-termijn VC bij niet-diabeten (lab-personeel, 8-10 jaar follow-up) was 3,0%, de mediumtermijn VC bij diabetespatiënten (stabiel ingesteld, gemiddeld HbA1c

8%, periode 1-3 jaar) is ook 3,0%, terwijl de korte-termijn VC (diabeten en niet-diabeten, 10-14 dagen follow-up) afhankelijk van het HbA1c nivo 2-3% bedraagt.

Uitgaande van de stelregel dat de analytische VC kleiner moet zijn dan de helft van de individuele VC, dient als doelstelling voor de analytische nauwkeurigheid van de HbA1c-bepaling een VC van <1,5% te worden gehanteerd.

Blijkens een gehouden telefonische enquête onder vooraanstaande Nederlandse diabetologen dient een verschil van 0,5-0,75% HbA1c als klinisch significant te worden beoordeeld. Hieruit zou dan op het nivo van 8 % HbA1c een analytische nauwkeurigheid (VC) van 2,3% volgen.

In ogenschouw nemend dat de tot nu toe gehanteerde analytische criteria van het National Glycohemoglobin Standardisation Program een VC <3,0% voor referentielaboratoria en <5,0% voor gecertificeerde industriële methoden bedragen, dient te worden geconcludeerd dat verreweg de meeste in gebruik zijnde HbA1c methoden niet voldoende nauwkeurig zijn om te voldoen aan de, op medisch gebruik gebaseerde grenzen.