

Posterabstracts

Samenvattingen van de posterpresentaties tijdens het 55^e Congres van de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie op 25 en 26 april 2002 te Lunteren

Lipiden

1. Docosahexaenoic acid (DHA) formation in fibroblasts: definitive evidence for the essential role of peroxisomes in DHA formation and identification of the peroxisomal enzymes involved

S. FERDINANDUSSE¹, S. DENIS¹, A.A. SPECTOR² and R.J.A. WANDERS¹

University of Amsterdam, Academic Medical Centre, Lab for Genetic Metabolic Diseases¹, Amsterdam, The Netherlands; University of Iowa, Dept. Biochemistry², Iowa, USA

Introduction: Docosahexaenoic acid (C22:6n-3) is an important fatty acid implicated in a number of (patho)physiological processes. The exact mechanism of C22:6n-3 formation has long remained mysterious but it is now clear that it involves formation of C24:6n-3 from C18:3n-3 via a series of elongations and desaturations followed by beta-oxidation of C24:6n-3 to C22:6n-3 (DHA). Although DHA is deficient in patients lacking peroxisomes, the role of peroxisomes in DHA formation has remained controversial. Making use of fibroblasts from patients with defined defects in the mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation system, respectively, we now show that peroxisomes and not mitochondria are involved in C22:6n-3 formation by catalyzing the beta-oxidation of C24:6 to C22:6.

Methods: Control and mutant fibroblasts were incubated with

radiolabeled C18:3n-3 and C24:6n-3 and the production of C22:6n-3 was measured by radio HPLC.

Results and discussion: In fibroblasts from XALD and RCDP Type 1 patients C22:6n-3 formation was found to be normal whereas a marked deficiency was found in cells from patients with acyl-CoA oxidase 1 and D-bifunctional protein deficiency indicating that the latter two enzymes, but not ALDP and peroxisomal thiolase 1, play a major role in C22:6 formation.

Conclusion: The results obtained show that peroxisomes play a major role in C22:6 formation and that acyl-CoA oxidase 1 and D-bifunctional protein are the predominant enzymes involved in C22:6 formation. These findings are of importance for the treatment of patients suffering from a deficiency in peroxisomal beta-oxidation.

2. LDL particle size is related to circulating oxidised LDL, but not to *in vitro* oxidisability

P. G. SCHEFFER¹, G. BOS², J.M. DEKKER², R.J. HEINE^{2,3} and T. TEERLINK¹

Metabolic Laboratory, department of Clinical Chemistry¹, department of Endocrinology³, Research Institute for Endocrinology Reproduction and Metabolism^{1,3}, and Institute for Research in Extramural Medicine², VU University Medical Center, Amsterdam

Introduction: Oxidative modification of LDL is a key step in the genesis of the atherosclerotic lesion. Presence of small, dense LDL is associated with accelerated atherosclerosis and is common in diabetic patients. The aim of this study was to investigate how circulating *in vivo* oxidised LDL and *in vitro* LDL oxidisability are related to LDL size in type 2 diabetic patients and healthy control subjects.

Methods: The study group consisted of 29 elderly well controlled type 2 diabetic patients and 29 control subjects. LDL particle size was measured by high performance gel-filtration chromatography (Clin. Chem. 1997;43:1904-12). Plasma levels of oxidised LDL were determined by ELISA (Merckodia, Sweden). *In vitro* oxidisability of LDL was measured by monitoring conjugated diene formation.

Results: *In vitro* susceptibility of LDL to oxidation (i.e. lag

time) and plasma levels of oxidised LDL were not correlated ($r = 0.04$, $P = 0.75$), and did not differ significantly between the diabetic and control subjects. The LDL particle size of the diabetic patients was significantly smaller than that of the control subjects (21.2 and 21.5 nm, respectively). LDL size was not related to *in vitro* oxidisability ($r = -0.11$, $P = 0.43$), but a highly significant inverse relation between size and circulating *in vivo* oxidised LDL was observed ($r = -0.55$, $P < 0.001$).

Conclusion: In agreement with the generally accepted hypothesis that small, dense LDL accelerates atherosclerosis, a smaller LDL particle size is associated with increased levels of circulating oxidised LDL in both type II diabetic patients and healthy control subjects. In addition, our results show that *in vitro* oxidisability of LDL may not be a suitable surrogate measure for *in vivo* oxidation.

3. Assessment of essential fatty acid and w3-fatty acid status by measurement of erythrocyte 20:3w9 (Mead acid), 22:5w6/22:6w3 and 22:5w6/22:4w6

E.N. SMIT¹, M.R. FOKKEMA², I.A. MARTINI³, H.A. WOLTIL⁴, E.R. BOERSMA¹ and F.A.J. MUSKIET²

Obstetrics/Pediatrics, Perinatal Nutrition and Development Unit¹, Pathology & Laboratory Medicine², Laboratory Center³, Groningen University and University Hospital and Pediatrics⁴, Groningen Martini Hospital

Introduction: Early suspicion of essential fatty acid deficiency (EFAD) or w3-deficiency may rather focus on polyunsaturated fatty acid (PUFA) or long-chain PUFA (LCP) analyses than clinical symptoms. We determined cut-off values for biochemi-

cal EFAD and w3-deficiency by measurement of erythrocyte 20:3w9 (Mead acid), 22:5w6/22:6w3 and 22:5w6/22:4w6.

Methods: Cut-off values, based on 97.5 percentiles, derived from an apparently healthy omnivorous group (6 Dominica breast-fed

newborns, 32 breast-fed and 27 formula+LCP-fed Dutch low-birth weight infants, 31 Jerusalem infants, 33 Dutch 3.5-years old infants, 69 omnivorous Dutch adults and 7 Dominica mothers) and an apparently healthy group with low dietary LCP intake (81 formula-fed Dutch low-birth weight infants, 12 Dutch vegans). They were validated by their application in an EFAD suspected group of 108, mostly malnourished, Pakistani children, three pediatric patients with chronic fat-malabsorption (abetalipoproteinemia, congenital jejunal and biliary atresia) and one patient with a peroxisomal disorder.

Results: Erythrocyte 20:3 ω 9, 22:5 ω 6/22:6 ω 3 and 22:5 ω 6/22:4 ω 6 proved age-dependent up to 0.2 years. Cut-off values for ages above 0.2 years were: 0.46 mol% 20:3 ω 9 for EFAD, 0.22

mol/mol 22:5 ω 6/22:6 ω 3 for ω 3-marginality, 0.48 mol/mol 22:5 ω 6/22:6 ω 3 for ω 3-deficiency and 0.33 mol/mol 22:5 ω 6/22:4 ω 6 for low 22:6 ω 3 precursor status. Increases beyond the 20:3 ω 9 and 22:5 ω 6/22:6 ω 3 cut-off values identified EFAD in 33.3% Pakistani children and 3 pediatric patients, ω 3-deficiency in 35.2% Pakistani children and all 4 pediatric patients, and ω 3-marginality in 60.2% Pakistani children. Increased 22:5 ω 6/22:4 ω 6 might be useful to detect a low status of 22:6 ω 3-precursors.

Discussion and Conclusion: Present cut-off values may serve for PUFA supplement intervention until better concepts have emerged.

4. Fatty acids in infant formulas. Compliance of present recommendations with the actual human milk fatty acid composition

E.N. SMIT¹, I.A. MARTINI², R.F.J. KEMPERMAN³, A.SCHAAFSMA⁴, E.R. BOERSMA¹ and F.A.J. MUSKIET³
Obstetrics/Pediatrics, Perinatal Nutrition and Development¹, Laboratory Center², Pathology & Laboratory Medicine³, Groningen University and University Hospital; and Research & Development⁴, Friesland Nutrition, Leeuwarden

Introduction: We investigated whether current recommendations for formula fatty acids (FA) for term infants comply with the actual FA composition of human milk.

Methods: Recommendations were projected on data of 455 breastmilk samples that we collected from different countries over the past 25 years.

Results: Many samples from non-western communities did not meet the recommendations for lauric (12:0), myristic (14:0) and linoleic (18:2 ω 6) acids. Recommendations for formula α -linolenic acid (18:3 ω 3) and 18:2 ω 6/18:3 ω 3 were not met by many human milk samples either. The most striking discrepancies between recommendations and breastmilk contents were observed for arachidonic (20:4 ω 6) and docosahexaenoic (22:6 ω 3) acids. A selection of investigated human milk FA

(i.e. 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 18:2 ω 6, 20:4 ω 6, 18:3 ω 3 and 22:6 ω 3) were either positively or negatively related in a predictable manner.

Discussion and Conclusions: The encountered discrepancies are caused by derivation of recommendations from breastmilk of western mothers (i.e. 12:0, 14:0 and 18:2 ω 6), addition of FA precursors (i.e. 18:3 ω 3) to compensate for the lack of long chain polyunsaturated FA (LCP) and the as yet poorly developed recommendations regarding addition of LCP. Future recommendations based on human milk as the gold standard may derive from FA interrelationships. A humanized formula FA composition would in this sense be any composition that can not be distinguished from that of human milk by techniques such as principal component analysis.

Enzymen/eiwitten

5. Measurement of biochemical and genetic factors in sarcoidosis

Y. de RIJKE^{1,3}, J. BERNSEN¹, F. BEAUMONT², W. HOP⁴, H. KREUTZER¹
Depts. of Clinical Chemistry and Hematology¹ and Respiratory Medicine², Bosch Medicentre; Depts. of Clinical Chemistry³ and Epidemiology and Biostatistics, Erasmus MC, Rotterdam⁴

Introduction: Because of its low sensitivity, serum angiotensin converting enzyme activity (sACE) has no diagnostic value in sarcoidosis. The ACE I/D gene polymorphism accounts for half of the variance of sACE. There are no concurrent publications on the influence of genetic factors on the prognosis and clinical expression of the disease.

Methods: In both a retrospective and prospective study we discuss the concomitant determination of ACE (I/D) and angiotensin II type 1 receptor (AGTR1) gene polymorphism together with the HLA-DR17 haplotype in 107 patients with sarcoidosis. The diagnosis of the patients has been established by clinical, radiological and intervention features (chest X-ray and CT scanning, bronchoscopy with lavage and peripheral/central biopsies). The clinical expression of the disease was divided into 2 groups: an acute and an insidious onset. Prognosis of the patients was determined after follow-up for 1,2 or > 5 yr. If possible, sACE, determined at presentation, was interpreted

with and without ACE I/D genotype corrected reference ranges. In 25 recently diagnosed patients the soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) level was determined at presentation.

Results and discussion: Neither the difference in prognosis nor the onset of the disease between sarcoidosis patients was found to be associated with the ACE I/D or AGTR1 gene polymorphism. The HLA-DR17 haplotype correlated with both an acute onset and a good prognosis of the disease (p<0.005). The sensitivity of sACE in sarcoidosis is greatly increased (60% vs. 31%) when taken the locally determined ACE I/D genotype corrected reference ranges into account.

Conclusion: Determination of HLA-DR17 may be a valuable tool for the physician in the longitudinal surveillance and therapeutic intervention of sarcoidosis. The determination of the ACE gene polymorphism allows a better interpretation of the sACE levels. In contrast to sACE, sIL-2R levels may be a valuable tool in the diagnosis of sarcoidosis.

6. Borging van laboratoriumuitslagen na de regionale enzymenkalibratie

J.W. JANSSEN, L.A.J. BUIJS-CUPEDO en J.P. PATTINAMA
Sint Franciscus Gasthuis, KCHL, Rotterdam

Inleiding: In de regio Rijnmond is in het voorjaar 2001 besloten om voor de enzymbepalingen dezelfde referentiewaarden te hanteren. Hieraan is een uitgebreid standaardisatieonderzoek voorafgegaan, waarbij het AKL van het Erasmus UMC als referentiewaarden

laboratorium heeft gefungeerd. **Vraagstelling:** Hoe borg ik de reproduceerbaarheid en de juistheid van deze enzymbepaling?

Methoden: Een zestal verschillende borgingsmethoden zijn toegepast en op bruikbaarheid beoordeeld voor de enzymen ASAT,

alkalische fosfatase. 1. Controlesera (intern). 2. Referentie methoden. 3. Uitwisseling patiëntensera. 4. SKZL combi-enquête. 5. Gemiddelde van patiëntenuitslagen. 6. Enzymkalibrator. *Resultaten:* Controle sera (intern) blijken goed te voldoen om de reproduceerbaarheid van de bepaling te borgen. Referentiemethoden zijn recent gepubliceerd, maar worden (nog) niet toegepast. Uitwisseling van patiëntsera wordt incidenteel toegepast. SKZL combi-enquête wordt in alle laboratoria gebruikt, maar de juistheid van de consensus waarde blijft ter

discussie. Gemiddelde van patiëntenuitslagen geeft over langere termijn (5-10 jaar) een goede indruk van de stabiliteit van de bepaling. Enzymkalibrator is een belangrijke aanwinst. De target values zijn echter consensuswaarden en zijn niet via een referentiemethode bepaald.

Conclusie: Een combinatie van de combi-enquête, gemiddelde patiëntenuitslagen en de enzymkalibrator geeft een goede borging voor de stabiliteit van enzymbepalingen en is praktische uitvoerbaar.

7. A multi-center study to establish the accuracy of detecting low concentrations of monoclonal components from serum by interpretation of CZE protein spectra.

I.M.L.W. KEULARTS, M.H. BEUNIS, J.van OORD, J.W. JANSSEN

Klinisch Chemisch Haematologisch Laboratorium, St. Franciscus Gasthuis Rotterdam

Introduction: Capillary zone electrophoresis (CZE) is an automated technique to detect monoclonal components (M-components) from serum protein spectra. We investigated the lowest concentration of M-component that could be discriminated from a normal pattern by interpretation of the protein spectrum.

Methods: We sent 61 CZE protein spectra from sera containing normal Ig concentrations and critical concentrations (0.4, 1 or 4 g/L) of one of the 6 common immunophenotypes of M-components (48, 2 patients per immunophenotype) along with spectra from sera with an oligoclonal (2), polyclonal (3) immunoglobulin increase, light chain disease (4) or control sera (4) to 22 participants from 12 Dutch clinical chemistry laboratories. Spectra could be classified as "normal" or "suspect".

The percentage well-classified plots was scored for all 22 participants for every abnormality. *Results:* A significant number of plots was judged as normal (21/61). Especially lower concentrations of M-components were hard to detect. 0.4 g/L M-component was detected in <5% of all plots with the exception of IgGk/1 (75%/50%) and IgMl (25%). For 1 g/L M-component, detection improved: IgGk/1 and IgMl (>90%), IgAk (75%), IgAl (50%), IgMk (30%). The chance of recognition of M-components depended on its location in the spectrum. For all immunophenotypes, 4 g/L M-component was recognized in >95%, oligoclonal abnormalities in >90% and polyclonal changes in 75%. Normal spectra were always judged correctly. *Conclusions:* In our study design, the detection limit is around 1 g/L M-component.

8. Immunosubtraction plots: a contribution to an accurate and certain qualification of low concentrations of monoclonal components from serum?

I.M.L.W. KEULARTS, M.H. BEUNIS, J.van OORD, J.W. JANSSEN

Klinisch Chemisch Haematologisch Laboratorium, St. Franciscus Gasthuis Rotterdam

Introduction: Serum immunofixation by subtraction (IFE/s) is an automated technique to immunophenotype M(monoclonal)-components in serum. We studied the accuracy of detection and qualification of low concentrations of M-component (0.4-4 g/L) from IFE/s plots. *Methods:* We sent 61 capillary zone electrophoresis protein spectra with corresponding IFE/s plots from sera containing normal I(mmu)g(lobine) concentrations plus critical concentrations (0.4, 1 or 4 g/L) of each of the 6 common immunophenotypes of M-components (48, 2 patients per immunophenotype) along with sera from patients with oligoclonal (2), polyclonal (3) Ig-increase, light chain disease (4) or control sera (4) to 22 participants from 12 Dutch clinical chemistry laboratories. The participants judged the spectra and gave an indication of the certainty of their judgement.

Results: Correct qualification was achieved in > 95% of all cases for 4 g/L M-component and decreased to 45-60% for IgA and IgMk at 1 g/L. 0.4 g/L M-component was often judged as "normal", except for IgG. The chance of correct qualification of M-components depended on the location in the spectrum. Certainty of the judgment was high (>90%) for plots with either a high (>85%) or low (<25%) correct qualification percentage and decreased to 70% for plots with a correct qualification percentage of 30-75%. *Conclusions:* In our study, IFE/s did not contribute significantly to a better detection of low concentrations of M-components. The majority of the abnormalities, detected by protein spectra, were well-qualified by IFE/s plots. Only for IgG and IgMl, 1 g/L was the lowest concentration correctly detected and qualified by immunosubtraction plots.

9. CDT confirmation and transferrin fractionation by anion-exchange HPLC

J.P.M. WIELDERS, M. FRASA, R. van LOO and R. te STROET

Department of Clinical Chemistry, Eemland Hospital, Amersfoort, The Netherlands

Introduction: Carbohydrate deficient transferrin (CDT) is considered as the best laboratory diagnostic parameter for alcohol abuse available today, CDT is the sum of the asialo, mono- and disialotransferrin isoforms and its determination by the Axis kit can be disturbed by several factors. HPLC has been proposed as a conformation method.

Methods: The anion-exchange HPLC method of Jeppson was tested, using a reference population (25 women, 20 man) drinking at most one alcoholic consumption per day(1). A group of 85 samples, send to us for measuring %CDT by the Axis method, was used for correlation purposes.

Results: Pathological samples e.g. one type 1B CDG syndrome and three BC genetic variants were easily recognised.

The average transferrin isoform distribution in our reference group was: asialo 0.1%, monosialo 0.3%, disialo 1.1%, trisialo 3.9%, tetrasialo 74.4%, pentasialo 18.4%, hexasialotransferrin 1.8%. Calculated as %CDT we found a reference range of 0.8 - 1.9% from our HPLC data. The HPLC method showed a good correlation $r^2 = 0,88$ with the %CDT Axis method, $HPLC = 1.35 \%CDT - 1.75$.

Conclusion: The HPLC method was found very useful for identification of genetic variants and confirmation of %CDT results.

Literature

1. Jeppson JO et al. Clin Chem 1993; 39: 2115 - 2120.

10. Een cryofibrinogeen van voorbijgaande aard bij een patiënt met Raynaud-fenomeen

P.M.W. JANSSENS¹, T.L.Th.A. JANSEN^{2,3}, M. JANSSEN² en J. PAARDEKOPER¹

Rijnstate ziekenhuis, Arnhem. Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Afdeling Reumatologie². Huidig adres: Medisch Centrum Leeuwarden³, Leeuwarden

Inleiding: Bij Raynaud fenomeen aan de extremiteiten dient gezocht te worden naar eiwitten in serum/plasma die bij kou precipiteren (cryoproteïnen). De meest voorkomende cryoproteïnen zijn de cryoglobulines, complexen van polyclonale of monoclonale antistoffen. Incidenteel komen er ook andere soorten cryoproteïnen voor.

Methoden: Bij een 51-jarige dame met polyartritis, Raynaud fenomeen en necrose aan de vingertoppen namen wij bloed af bij 37 °C, in buizen met en zonder anticoagulantia. Na verwijdering van de cellen incubeerden we de monsters bij 4 °C en 37 °C gedurende 48-72 uur. Hierna centrifugeerden we de monsters en maten (na solubilisatie van de sedimenten in fysiologisch zout bij 37 °C) in supernatanten en sedimenten totaal eiwit, immunoglobulines, fibrinogeen en we maakten eiwitspectra.

Resultaten: De patiënt bleek een cryoproteïne te bezitten bestaande uit cryofibrinogeen. Het cryofibrinogeen werd aangetoond in alle plasmamonsters, waarbij de grootste hoeveelheid gevonden werd in met heparine ontstold bloed. Minder grote hoeveelheden cryoproteïne werden gevonden in EDTA- en citraat-plasma. Cryofibrinogeen kon niet worden aangetoond in serum (dat als gevolg van de voorafgaande stolling uiteraard geen fibrinogeen bevatte). De aanwezigheid van het cryofibrinogeen zowel als de klinische problemen waren van voorbijgaande aard en genezing vond ogenschijnlijk spontaan plaats.

Conclusie: het is aanbevelenswaardig bij onderzoek van cryoprecipiteerbare eiwitten ook plasma te onderzoeken dat met verschillende anticoagulantia ontstold is.

Elektrolyten

11. Kwaliteitscontrole op de bloedgasanalyzer: een wolf in schaapskleren

V. SCHARNHORST, W. SCHUURMAN, F. v.d. GRAAF, H.L. VADER

Máxima Medisch Centrum, Klinische Laboratoria, Veldhoven

Introductie: De Radiometer ABL 700 serie beschikt over elektrolyt-elektroden die onder andere de natriumconcentratie in een bloedgasmonster bepalen. De elektrolytuitslagen van de ABL zijn met die van een Ortho Vitros 250 vergeleken.

Methoden: Venus bloed werd afgenomen en een deel ervan afgedraaid. Gelijktijdig werd de natriumactiviteit (directe methode) gemeten in heparinebloed op de ABL en in heparineplasma op de Vitros en/of de ABL.

Resultaten: De natriumbepaling op de ABL uit heparinebloed vertoont een in de tijd toenemende negatieve bias t.o.v. de Vitros. Er wordt geen verschil gevonden tussen de metingen in heparineplasma. Geen van de systemen laat aan de hand van hun kwaliteitscontroles een drift zien. Vervanging van de membraan van de referentie-elektrode van de ABL leidt gedurende een maand tot overeenkomstige natrium resultaten. Daarna begint het verschil in patiëntensera bij stabiele kwaliteitscontroles tussen ABL en Vitros op te lopen tot het membraan uiteindelijk weer wordt vervangen.

Conclusies: Het membraan van de referentie-elektrode blijkt door een wijziging in het productieproces niet voor de opgegeven 3 maanden maar slechts 1 maand stabiel. Na enige aarzeling is dit door de firma Radiometer onderkent.

De waterige kwaliteitscontroles op de ABL zijn gedurende de hele periode stabiel gebleven. Ook plasmanatriumwaarden verschilden nooit tussen Vitros en ABL. Corpusculaire deeltjes uit bloed die in de referentie-elektrode terecht komen lijken de natriummetering op de ABL te verstoren. Dit onderstreept de noodzaak van kwaliteitscontroles met een 'monster-typische' matrix en heeft op ons laboratorium tot een regelmatige vergelijking van patiëntenmonsters tussen ABL en Vitros geleid.

Endocrinologie

12. Bepaling van HbA1c bij patiënten met Hb-varianten

E. LENTERS¹, C. SIEBELDER², C.WEYKAMP² en K. MIEDEMA¹

Klinisch chemisch laboratorium¹, Isala klinieken, locatie Weezenlanden, Zwolle en klinisch chemisch laboratorium², Streekliekenhuis Koningin Beatrix, Winterswijk

Inleiding: De bepaling van HbA1c gehalte bij diabeten is van groot belang alsonafhankelijke parameter voor de bereikte metabole controle en voor de risico inschatting op het ontwikkelen van diabetische complicaties. Bij patiënten met Hb-varianten is het bepalen van HbA1c vaak onbetrouwbaar.

Methoden: Van 22 geselecteerde diabeten met HbAS en HbAC is het HbA1c gehalte bepaald mbv cation uitwisselingschromatografie (Diamat Variant, Tosoh G7 en Menarini HA 8160), affiniteitschromatografie (Primus CLC 385) en immunoturbidimetrie (Roche Unimate, Modular).

Resultaten: De correlatie volgens Passing en Bablok van de resultaten verkregen met de Primus (x) en de andere methoden is als volgt:

Diamat Variant:	$y = 1,13x - 1,84$
Tosoh G7:	$y = 1,05x - 0,32$
Menarini HA 8160	$y = 0,93x + 0,12$
Roche Unimate	$y = 1,26x - 0,19$

Conclusie: Voor patiënten met (het relatief vaak voorkomende) HbAS of HbAC is de affiniteitschromatografische methode nog steeds de 'gouden standaard'. Echter, de nieuwste generatie ionuitwisselings HPLC's zijn steeds beter in staat een Hb-variant te detecteren en er in de bepaling voor HbA1c rekening mee te houden: de Tosoh G7 wordt niet gestoord door HbAs en/of HbAc, terwijl met de Menarini HA 8160 de HbAs-varianten nog iets te lage waarden geeft. De Diamat Variant kan niet gebruikt worden (te lage waarden), terwijl de Roche Unimate in tegenstelling tot andere methoden een te hoge waarde geeft (1).

Literatuur

1. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. Clin Chem 2001; 47: 153-163.

13. Profiling of tryptophan-related plasma indoles in carcinoid patients by automated, on-line, solid-phase extraction and HPLC with fluorescence detection

I.P. KEMA¹, W.G. MEIJER, G. MEIBORG, B. OOMS, P.H.B. WILLEMSE and E.G.E. de VRIES
Departments of Pathology and Laboratory Medicine¹, and Medical Oncology², University Hospital Groningen, and Spark Holland B.V.³, Emmen, the Netherlands

Introduction: Profiling of the plasma indoles tryptophan (TRP), 5-hydroxytryptophan (5-HTP), serotonin and 5-hydroxy-indoleacetic acid (5-HIAA) is useful in the diagnosis and follow-up of carcinoid patients. We describe an automated method for the profiling of these indoles in protein-containing matrices, and the plasma indole concentrations in healthy controls and carcinoid patients.

Methods: Plasma samples were prepurified by automated on-line solid-phase extraction (SPE) on strong hydrophobic polystyrene resin containing cartridges. Separation and detection were performed by reversed phase HPLC combined with fluorimetric detection. We obtained samples from 14 healthy controls and 17 patients with metastasized midgut carcinoid tumors for plasma indole analysis.

Results: Within and between series coefficients of variation for indoles in platelet-rich plasma ranged between 0.6-5.1% and 3.7-12.2%, respectively. Plasma 5-HIAA, but not 5-HTP was detectable in 8 of 17 carcinoid patients. In the patient group platelet-rich plasma total tryptophan correlated negatively with platelet-rich plasma serotonin ($p = 0.021$, $r = -0.56$), urinary 5-HIAA ($p = 0.003$, $r = -0.68$) and urinary serotonin ($p < 0.0001$, $r = -0.80$).

Conclusions: The present chromatographic approach reduces analytical variation and time needed for analysis and gives more detailed information about metabolic deviations in indole metabolism than does manual single component analysis.

14. On-line koppeling van decentrale glucosemeters

H.P. van BERKEL, A. HUISMAN en K. MIEDEMA
Klinisch chemisch laboratorium, Isala klinieken, locatie Weezenlanden, Zwolle

Inleiding: met de introductie van steeds meer decentraal geplaatste analysers (glucose, stolling, bloedgasen) neemt het belang van goede registratie van de geproduceerde uitslagen en bewaking van de kwaliteit van de analyses toe.

Methoden: Vijf decentraal geplaatste glucosemeters (Accu-Check-Inform) zijn via de Roche DataCare server on-line gekoppeld aan Labosys. Het meegeleverde softwarepakket is getoetst op functionaliteit en kwaliteit.

Resultaten: De resultaten van meer dan 500 decentrale glucosemetingen zijn via DataCare in Labosys gedownload. Presentatie op de DataCare Server vanuit de database was foutloos, via de printfunctie werden alle opmerkingen bij de verkeerde patiënt weergegeven. Ook de eenheid kon niet goed worden

weergegeven. Daarnaast bleek de software nodeloos ingewikkeld en was wijzigen van eenmaal ingestelde parameters vaak moeilijk.

Conclusie: Het instellen van de software bleek veel werk en soms nodeloos ingewikkeld, de koppeling aan Labosys via het HL7 protocol verliep echter probleemloos. De integratie van decentrale glucosebepalingen in LIS via het DataCare systeem verliep foutloos, echter in de rapport generator werden enkele fouten ontdekt. Validatie via het LIS/ZIS verliep vele malen sneller dan via DataCare. Algemeen biedt het DataCare systeem grote mogelijkheden omdat het systeem zeer compleet en volledig is en universele koppeling van meerdere decentrale analyse apparaten mogelijk maakt.

15. Implementatie van het Roche ACCU-CHEK Inform systeem voor decentrale glucosemeting.

M. VAN WIJNEN¹, J.S. KAMPHUIS¹, W.E. KLUITENBERG¹, M.N. GERDING², E.M. LOGMAN³, J.M. BOSGOED³ en F.M.J. ZUIJDERHOUDT¹
Deventer Ziekenhuis, Deventer, Vakgroep klinische chemie¹, Vakgroep inwendige geneeskunde², Afdeling kliniek³, F2

Introductie: Het ACCU-CHEK Inform systeem is een geavanceerd glucose-meet en elektronisch communicatiesysteem voor decentrale meting op klinische afdelingen. De meters kunnen vanuit het lab elektronisch gecontroleerd en vrijgegeven worden. De opgeslagen gegevens in de meters worden via een basiseenheid en PC op de klinische afdeling via het ziekenhuisnetwerk doorgegeven aan de labcomputer.

Methode: In deze pilot-implementatie maakt het lab barcodes aan welke op de klinische afdeling gebruikt worden voor patiëntenidentificatie bij vooraf aangemelde patiënten.

Glucosemetingen bij patiënten met twee stripmeters zijn onderling, met de resultaten op de Hitachi 917, vergeleken. De werking van het communicatiesysteem is in het lab getest. Het functioneren op de klinische afdeling is gaande.

Resultaten: Strips met verschillend lotnummer ($n = 2$) werden gebruikt en de in-vitro plasma resultaten vergeleken met die van de Hitachi 917 over de range van 2 tot 25 mmol/l ($n = 25$).

De regressievergelijkingen waren (ACCU-CHEK meter = AC, Hitachi 917 = Hi): $AC = 1,00 Hi - 0,7$ respectievelijk $AC = 1,06 Hi - 0,7$. Glucosemetingen bij elke patiënt werden met twee meters verricht en uit dezelfde vingerprik werd tevens bloed verkregen voor meting op de Hitachi 917. Regressievergelijkingen waren respectievelijk $AC = 0,90 Hi - 0,2$ ($N = 26$) en $AC = 0,87 Hi + 0,2$ ($n = 26$); range 5 - 25 mmol/l. De regressie voor de meters onderling was $AC_1 = 1,05 AC_2 - 0,6$. Alle gewenste informatie, gegevens van de metingen net als de beïnvloeding van de meter vanuit het datacare programma kwamen zonder haperen over. De resultaten van de klinische glucosemetingen in vergelijking met de resultaten gemeten in het lab worden gepresenteerd.

Conclusie: De meters functioneren goed. Onze eerste ervaringen met de implementatie van het ACCU-CHEK Inform systeem zijn positief.

Tumordiagnostiek/Maligniteiten

16. Clinical performance of two urinary bladder tumor markers

R. BAUMGARTEN^{1*}, D. PAANS¹, B. WIEGERS¹, P.J.M. KIL², G.J. MONTAGNE², J. SCHROEDER² and H.M.J. GOLDSCHMIDT¹.

Centralized Laboratory for Clinical Chemistry & Hematology¹ and Department of Urology², St. Elisabeth Hospital, Tilburg, The Netherlands

Introduction: Initial diagnosis and follow-up of patients with urinary bladder cancer is currently performed by cystoscopy with or without a biopsy. In order to prevent such invasive and costly procedures other methods are being explored for diagnosis of (recurrent) urinary bladder cancer. Recently, two methods have been developed to measure Cytokeratins 8/18 (UBC[®]-test ELISA-based, IDL-Biotech) and Fibronectine (BTF[®]-test, Immulite[®]-based sandwich assay, DPC).

Methods: After analytical evaluation, during which the performance of both tests was found to be satisfactory, clinical evaluation was performed on urine samples from patients (n=107) seen for initial evaluation of hematuria or follow-up after treated bladder cancer. The macroscopic findings on cystoscopy were used as golden standard. Reference intervals for

UBC and BTF were determined on control samples (n=40; 20F, 20M) and were expressed as µg/ mmol creatinine. **Results:** The sensitivity of UBC and BTF was 45.2% resp. 23.8%, while specificity was found to be 67.2% and 93.1%. Positive predictive values of UBC and BTF were determined at 50.0% resp. 75.0%. Negative predictive values were 62.9% for UBC and 62.5% for BTF. The limited usefulness of these tests is furthermore illustrated by the Likelihood Ratios (LR) of a positive test result (1.38 for UBC, 3.45 for BTF) and negative outcome (0.82 for both tests).

Conclusion: Application of the BTF and UBC tests for diagnosis of urinary bladder cancer is not warranted. Whether these tests are useful for monitoring of patients with bladder cancer remains to be established.

17. Difference between free circulating plasma and serum DNA in patients with colorectal liver metastases

J.B. de KOK, M.A.M.A. THIJSEN, T.J.M. RUERS, D.W. SWINKELS
UMC Nijmegen

Introduction: Previous studies suggest that the amount of circulating DNA in plasma or serum may be a promising marker for diagnosis and prediction of prognosis in patients with tumours. However, it is unclear whether DNA from plasma or from serum better reflects clinical status.

Methods: To investigate the possible difference between serum DNA and plasma DNA levels blood was collected from 26 patients with liver metastases and 28 age-matched healthy donors. Patients had clinical follow-up after surgery (median 23 months). DNA was quantified with two independent methods; real-time quantitative PCR (TaqMan[™]) and fluorimetric DNA quantitation (Picogreen[™] reagent).

Results: Serum DNA and plasma DNA levels did not correlate and each had a different relationship with diagnosis and prognosis. Only serum DNA was significantly associated with the presence of liver metastases, whereas only plasma DNA was predictive for recurrences. Typically, serum DNA amounts were higher than plasma in 24 out of 26 patients.

Conclusions: Differences between plasma and serum reflect an in vitro process that occurs during clotting. High DNA increase in serum represents an indirect, yet tumor-related process. Plasma DNA levels better represent in vivo levels of circulating DNA. This has implications for future studies.

18. Quantitative RT-PCR measurement of HASH1 (ASCL1), a marker for Small Cell Lung Carcinomas with neuroendocrine features

B.A. WESTERMAN, S. NEIJENHUIS, A. POUTSMA, R.D.M. STEENBERGEN¹, R.H.J. BREUER², M. EGGING¹, I.J. van WIJK, C.B.M. OUDEJANS

Molecular Biology Laboratory, Department of Clinical Chemistry; Department of Pathology¹, Department of Pulmonology², VU University Medical Center, de Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam, the Netherlands

Introduction: The Human Achaete-Scute Homolog 1 (HASH1, ASCL1), a lineage specific basic helix-loop-helix member of the Achaete-Scute family, is essential for the generation of pulmonary neuroendocrine cells during lung development. In Small Cell Lung Cancer (SCLC), the most lethal form of lung cancer, the gene is highly expressed and the expression of HASH1 correlates with neuroendocrine (NE) features found in SCLCs. Here we describe a highly sensitive reverse transcriptase PCR (RT-PCR) method for quantifying HASH1 mRNA in clinical samples, using real time Light Cycler FRET technology.

Methods: The HASH1 positive NE cell line NCI-H187 was compared with the non-NE cell line NCI-N417 by quantitative RT-PCR. Signals were normalized using the housekeeping gene porphobilinogen deaminase (PBGD), which is pseudogene free. Subsequently, HASH1 expression in RNA isolated from biopsies from SCLC patients (n=4) was compared to

biopsies from Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC) patients (n=2) or normal bronchus (n=2).

Results: The HASH1 positive NE cell line NCI-H187 showed a 50,000 higher normalized expression of HASH1 than the non-NE cell line NCI-N417, indicating that the method is applicable over a wide dynamic range. Normalized average mRNA expression levels in SCLC clinical samples were found to be a 1,000 fold higher when compared to the NSCLC. Expression in normal bronchus was comparable to the expression levels in the NSCLC.

Conclusions: These results show that marked and measurable differences exist between SCLCs and other lung tissues (either NSCLC or normal bronchus). We show that the method is applicable to small biopsy samples and can discriminate SCLC from NSCLC. This method could contribute to diagnosis based on molecular profiling of tumors.

19. Detectie van recidief blaascarcinoom met NMP-22 in urine

J.W.A. OOSTERHUIS¹, J. van PELT², J.M. VELMANS², R.P.E. PAUWELS¹, R.F.M. SCHAPERS³
St. Ziekenhuizen Noord-Limburg, Venlo, Afdelingen Urologie¹, Klinische Chemie² en Pathologie³

Introductie: Na transurethrale resectie van oppervlakkig blaascarcinoom (Ta en T1) is de follow-up met name gericht op detectie van recidief carcinoom middels regelmatig cytologisch en cystoscopisch onderzoek. Vanwege lage sensitiviteit van cytologie enerzijds en kosten en belasting voor de patiënt van cystoscopie anderzijds werd de waarde van kwantitatieve bepaling met ELISA van Nuclear Matrix Protein 22 (NMP-22), een onderdeel van de celkernmatrix dat vooral in kankercellen aanwezig is, in urine onderzocht.

Patiënten en methoden: Bij 196 patiënten (149 mannen en 47 vrouwen, gem. leeftijd 65,4 jaar, SD 2,8 jaar) werd tijdens 431 controlebezoeken NMP-22 in de urine bepaald (gemiddeld 2,2 tests per patiënt, spreiding 1-10). De uitslag van NMP-22 werd vergeleken met de bevindingen van cystoscopie (gouden standaard) en het pathologisch onderzoek van de gevonden recidieven waarna de sensitiviteit en specificiteit van de test berekend werd voor het vaststellen van recidief blaascarcinoom. Met een ROC-curve werd een drempelwaarde voor NMP-22 van 10 E/ml vastgesteld.

Resultaten: Tijdens een gemiddelde follow-up periode van 33 maanden werden 63 recidiefcarcinomen vastgesteld bij 42 patiënten. Het stadium van het recidief, de aantallen en de sensitiviteit van NMP-22 staan vermeld in de tabel. De sensitiviteit van NMP-22 bleek ook gerelateerd aan de histologische

graad van het recidief (sensitiviteit voor laaggradig recidief = 22%, hooggradig recidief = 88%). De specificiteit bleek 69%, de negatief voorspellende waarde 89% en de positief voorspellende waarde was 22%.

Stadium recidief	aantal	sensitiviteit (%)
0	1	
a	36	30
1	18	83
≥ 2	2	100
cis	3	66
onbekend	2	
ureter	1	
Totaal	63	51

Conclusies: De sensitiviteit van NMP-22 om recidief blaascarcinoom vast te stellen is afhankelijk van het stadium en histologische graad van het recidief. Voor detectie van het meest voorkomende stadium Ta is NMP-22 onvoldoende sensitief, zodat het vooralsnog cystoscopie niet zal vervangen als controlemiddel.

20. Steroïdeffect op de proliferatie en apoptotische celdood van humane borstkankercellen in vitro

S. KOLE¹, Z. ÇIFTÇI¹, H.R. FRANKE², I. VERMES¹;
Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Gynaecologie, Medisch Spectrum Twente², Enschede

Inleiding: Studies laten zien dat oestrogenen proliferatie en progestagenen de apoptose (geprogrammeerde celdood) bevorderen in humane borstkankercellen. De tumorgroeisnelheid is gedefinieerd als de balans tussen apoptose en celproliferatie en elke verandering tussen deze twee factoren kan een element zijn voor ongecontroleerde expansie van kwaadaardige tumoren.

Methoden: 17β-Oestradiol en dihydroxydydrogesteron werden in concentraties van 10⁻⁹-10⁻⁶ M geïncubeerd gedurende 4, 24, 48 en 144 uren met MCF-7 en MDA-MB-231 cellen, respectievelijk een oestrogeen receptor positieve en negatieve humane borstkankercellijn. Tevens werden combinaties van deze steroïden in gelijke verhoudingen met een concentratie van 10⁻⁶ M uitgevoerd. Apoptose werd bepaald met flowcytometrie d.m.v. een DNA-

fragmentatie assay. Proliferatie werd gemeten met RT-PCR door expressie van mRNA van mucine1 en cyclineD1 en met flowcytometrie door expressie van Ki-67.

Resultaten: Bij toevoeging van 17β-oestradiol en dihydroxydydrogesteron gedurende 4, 24 en 48 uren in de concentratie 10⁻⁹ en 10⁻⁸ M worden geen significante verschillen gemeten in de apoptose en de proliferatie. De ratio apoptose/ mucine1-proliferatie is na 144 uren voor MCF-7 cellen met 10⁻⁶ M 17β-oestradiol 1,6 en gecombineerd 6,7. Voor de cyclineD1-ratio zijn deze waarden respectievelijk 1,6 en 3,1. Een ratio > 1 betekent een toename van de apoptose.

Conclusie: Incubatie van de combinatie 17β-oestradiol en dihydroxydydrogesteron demonstreert na 144 uren een significante vermindering van de proliferatie en verhoging van de apoptose van humane borstkankercellen (MCF-7) in vitro.

21. Humaan kallikreïne 2 (hK2) als tumormerkstof

B.G. BLIJENBERG¹, G. YURDAKUL², C.H. BANGMA², M.F. WILDHAGEN², J.A. FINLAY³ en F.H. SCHRÖDER²
Academisch Ziekenhuis Rotterdam, Afdeling Klinische Chemie¹ en Afdeling Urologie², Nederland en Beckman-Coulter Research Laboratories San Diego, Verenigde Staten³

Inleiding: Recente studies hebben aangetoond dat humaan kallikreïne 2 (hK2) verhoogd is in bloed van prostaatkankerpatiënten (PCa) en tevens kan bijdragen aan het onderscheid tussen benigne prostaathyperplasie (BPH) en PCa. Voorafgegaan door een beperkte analytische evaluatie van de hK2-bepaling, hebben wij een klinische studie uitgevoerd met biopsiegekaracteriseerde serummonsters ter vaststelling van het "best case scenario" om BPH van PCa te onderscheiden.

Methoden: Gebruik gemaakt werd van een Beckman-Coulter Access analyse-apparaat waarop hK2 (research-methode), vrij PSA en totaal PSA werden bepaald. Het patiëntenmateriaal werd in 3 groepen verdeeld. Groep 1: "normaal", n = 142,

PSA 1,0-10,0 µg/l, prostaatvolume < 40 ml; groep 2: BPH, n = 137, PSA 3,0-10,0 µg/l, prostaatvolume > 40 ml; groep 3: PCa, n = 146, PSA 1,0-10,2 µg/l, prostaatvolume 15-122 ml. Tumourkarakteristieken bekend van 48 patiënten na radicale prostatectomie. Statistiek: Mann-Whitney U-test en ROC-analyse.

Resultaten: Alle analysemethoden gaven significante verschillen te zien tussen de groepen 1 en 2 en tussen 1 en 3 (p < 0,05). Geen onderscheidende verschillen tussen de groepen 2 en 3 werden gevonden voor totaal PSA en hK2 in tegenstelling tot de combinaties vrij/totaal PSA, hK2/vrij PSA en hK2 x totaal PSA/vrij PSA. Vergelijking van de groepen 2 en 3 gaf

bij ROC-analyse voor vrij PSA de hoogste AUC-waarde (= 0,754), terwijl voor hK2 0,547 gevonden werd. Analyse van het bestand "radicalen" gaf aan dat geen enkele parameter bruikbaar was ter onderscheiding van lokaal versus extracapsulair PCa. Echter, als enige parameter bleek hK2 te dis-

crimineren tussen goed en slecht gedifferentieerde tumoren ($p < 0,042$).

Conclusie: Bepaling van hK2 is mogelijk van belang in het differentiaaldiagnostisch traject bij PCa-patiënten.

Hematologie/Allergie

22. Apoptotische celfragmenten en micropartikels: overlap in morfologie en ontstaansmechanisme

P.H.M. KUIJPER¹, M. SPEKLE¹ and I. VERMES¹
Laboratorium¹, Medisch Spectrum Twente, Enschede

Inleiding: Micropartikels van leukocyten en bloedplaatjes zijn detecteerbaar bij patiënten met systemische aandoeningen (sepsis) en auto-immuunziekten (SLE). Algemeen wordt aangenomen dat deze celdeeltjes ontstaan als gevolg van activatie van bloedplaatjes, endotheelcellen en leukocyten. Ons onderzoek richtte zich op de hypothese dat micropartikels ook door een apoptotisch proces kunnen ontstaan en dat in vitro gegenereerde micropartikels en apoptotische celfragmenten moeilijk te onderscheiden zijn.

Methode: Endotheelcellen (HUVEC) en de T-lymfocytair cellijn (HSB-2) werden blootgesteld aan verschillende apoptose-inducerende stimuli. Met verschillende assays werd apoptose gemeten (lichtmicroscopie en Annexine V) en werden cel- en membraanfragmenten gemeten (met flowcytometrie en een ³H-labeled membrane release-assay). Tevens werd de aanwezigheid van DNA onderzocht met PCR en de morfologie met elektronen microscopie.

Resultaten: De assay voor het meten van micropartikels op een

routine flowcytometer van Coulter Epics werd opgezet, evenals de andere bovengenoemde assays. HSB-2 cellen maken micropartikels na verschillende apoptotische stimuli, zoals calciumionofoor A23187, camptotecine en bestraling. Deze zijn Annexine-V positief. Dit gebeurt met name na 6-8 uur, als er sterk toegenomen apoptose, maar geen toegenomen necrose kan worden gedetecteerd. Het proces kan worden geremd m.b.v. een caspase-3-remmer, een specifieke remmer van apoptose. Deze bevindingen konden niet worden gereproduceerd bij adherente endotheelcellen door tekortkomingen van de genoemde assays en de invloed van adhesie op het apoptotisch proces.

Conclusie: De meeste technieken die worden gebruikt voor het meten van activatie-gerelateerde micropartikels detecteren ook apoptotische celfragmenten. Onderzoeken naar deze celdeeltjes in vitro of in vivo, zou zich dus altijd moeten richten op beide complexe processen met soortgelijke deeltjes als resultaat.

23. Chédiak-Steinbrinck-Higashi Anomaly?

S.C. ENDENBURG¹, I. GERHARDUS¹ en M.A.M. JACOBS²
Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹, Kindergeneeskunde², Slingeland Ziekenhuis, Doetinchem

Inleiding: In april van 2001 vonden wij bij een meisje van drie weken oud bij de manuele leukocytendifferentiatie zeer grote opvallende granulæ met name in de neutrofiële en eosinofiele granulocyten maar ook in de lymfocyten. Dit kindje werd door de huisarts voor laboratoriumonderzoek ingestuurd in verband met een onvoldoende gewichtstoename en een bleke kleur.

Methoden: Hematologisch laboratorium onderzoek werd uitgevoerd op de Sysmex XE-2100. Voor de manuele leukocytendifferentiatie werd er gebruik gemaakt van de May-Grünwald Giemsa kleuring. Nader onderzoek werd uitgevoerd bij de Stichting Klinisch-Genetisch Centrum Nijmegen.

Resultaten: De voedingsproblemen van dit kindje waren passagère omdat na aanpassing van de voeding herstel optrad. Aanvullende diagnostiek naar een mogelijke Alder-Reilly Anomaly toonde geen aanknopingspunten voor een lysos-

somale stapelingsziekte. In verband met onvoldoende volgreacties werd oogheelkundig onderzoek verricht. Hierbij werd een oculo-cutaan albinisme vastgesteld.

Conclusie: Een kritische beoordeling door onze analisten van het perifere bloeditstrijkje heeft bij onze patiënt geleid tot het uitvoeren van vervolgonderzoek naar mogelijke oorzaken van deze grote opvallende granulæ in de leukocyten. Differentiaal diagnostisch moet nu gedacht worden aan de volgende ziektebeelden: het Chédiak-Steinbrinck-Higashi, het Hermansky-Pudlak dan wel het Griscelli syndroom. Genetische diagnostiek is niet voorhanden. De kliniek zal daarom meer duidelijkheid moeten brengen. Zie Winthrobe's Clinical Hematology, 10th edition, Lippincott Williams & Wilkins, G. Richard Lee et al, editors, 1999; 1891-1895.

24. AML-M3: grote oplettendheid van doktersassistente

S.C. ENDENBURG¹, A.C. van BENNEKOM-van de GRAAF¹, H. EVERS¹ en F. de VRIES²
Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹, Interne Geneeskunde², Slingeland Ziekenhuis, Doetinchem

Inleiding: In augustus van 2001 kwam een 43-jarige vrouwelijke patiënt op onze Poli Afname voor het laten prikken van TSH en een RA-test. Bij het prikken van de patiënt viel het onze doktersassistente meteen op dat de patiënt op de (ontblote) arm kleine blauwe puntvormige bloedinkjes had. Dit was de patiënt zelf nog niet opgevallen waardoor ze het ook niet aan de huisarts had laten zien. Op eigen initiatief nam de doktersassistente een EDTA-bloedje af voor nader hematologisch onderzoek. Na de bloedafname ging de patiënt vervolgens naar huis.

Methoden: Hematologisch laboratorium onderzoek werd uitgevoerd op de Sysmex XE-2100. Voor de manuele leukocyten differentiatie werd er gebruik gemaakt van de May-Grünwald Giemsa kleuring.

Resultaten: Het hematologisch laboratoriumonderzoek liet een pancytopenie zien. Deze uitslagen werden vervolgens diezelfde dag nog door het laboratorium doorgebeld aan de huisarts. De dag daarop werd de patiënt gezien door internist-hematoloog. Deze besloot de patiënt eerst te transfunderen alvorens een beenmergonderzoek uit te voeren. Na vier dagen

werd het beenmerg onderzocht op de vraagstelling MDS of AA. Bij de morfologische beoordeling van het beenmerg werden Auerse staven gevonden in promyelocyten, waaruit geconcludeerd werd dat er sprake was van een AML-M3.

Conclusie: Grote oplettenheid van de doktersassistente van de Poli Afname van ons laboratorium heeft er bij deze patiënt toe geleid dat de patiënt snel onder behandeling kwam van de internist-hematoloog.

25. Consensuscriteria microscopische differentiatie ADVIA 120: grenzen voor neutrofiële granulocyten en large unstained cells (LUC)

J.G. BOONSTRA¹, W. GRAVELAND² en G. BIKKER¹

Academisch Ziekenhuis Rotterdam, Daniel den Hoed kliniek. Afdeling Klinische Chemie¹ en ADdIFVIA-werkgroep en Statistiek²

Introductie: Door gebruikers van ADVIA 120 hematologie analyzers en met ondersteuning van de firma Bayer is in maart 2001 de ADdIFVIA werkgroep opgericht. Deze werkgroep stelt zich onder andere als doel om te komen tot een consensus over criteria voor microscopische differentiatie. Met name de bovengrenzen voor neutrofiële granulocyten (80 of 90%) en LUC (5,0 of 7,4%) stonden hierbij ter discussie.

Methode: 10 laboratoria hebben gedurende 1 maand uitslagen van automatische en eventuele microscopische differentiaties vergaard. Alle data werden centraal verwerkt.

Resultaten: Het databestand bevatte 15.226 automatische-, met 15% microscopische differentiaties (6 tot 25% per laboratorium). De ADVIA rapporteerde bij 159 monsters neutrofielen tussen 80 en 90%, zonder een andere vlag/alarm. Hiervan

werden 46 monsters (29%) beoordeeld als toxisch en/of hypersegmentatie. Bij 30 samples (19%) werden 1 of 2% (meta-) myelocyten gezien, en/of >3% staven. De ADVIA rapporteerde bij 96 samples LUC tussen 4,5 en 7,4%, zonder een andere vlag/alarm. Hier werden microscopisch geen blasten of andere significante afwijkingen geconstateerd.

Conclusies: Het percentage LUC waarboven een microscopische differentiatie gegenereerd wordt, kan op de ADVIA worden bijgesteld naar 7,4%. Dit levert een besparing op van 4% microscopische differentiaties. Het optrekken van de grens van de neutrofielen levert een extra besparing van 7%, echter in een aantal gevallen zal toxische korreling, hypersegmentatie en een enkele voorlopercel gemist worden.

26. Kan met hematologische parameters voorspeld worden of de respons op pre-operatief toegediend erythropoëtine aan reumapatiënten suboptimaal is?

M. de METZ¹, M.H. de KEIJZER² en R. SLAPPENDEL³

St. Maartenskliniek¹, afdeling klinische chemie³ en anesthesiologie², UMC St Radboud, Nijmegen

Inleiding: Aan patiënten zonder ijzertekort met een hemoglobine concentratie van 6,2 tot 8,1 mmol/l, die een grote orthopedische operatie moeten ondergaan en een grote kans lopen op een homologe bloedtransfusie, wordt preoperatief erythropoëtine (epo) gegeven en 200 mg elementair ijzer per dag. Ondanks deze suppletie is de Hb respons soms laag, met name bij patiënten met actieve reumatoïde artritis (RA). Zijn hematologische parameters, die bij dialyse patiënten de Hb respons op epo kunnen voorspellen, ook bij deze orthopedische groep nuttig?

Methoden: Van 17 patiënten met actieve RA en 22 zonder RA is bloed voor aanvang van de epo therapie en vlak voor de operatie geanalyseerd met een Bayer ADVIA 120 en Sysmex XE 2100 hematologie automaat.

Resultaten: In de controlegroep en de RA groep steeg het ge-

middelde Hb gehalte respectievelijk van 7,9 naar 9,1 mmol/l ($p=0,0004$) en van 7,5 naar 8,3 ($p=0,0008$), het aantal reticulocyten van 1,21 naar 4,18 % ($p<0,0001$) en van 1,06 naar 2,54 % ($p=0,009$). Verschillende andere parameters veranderden tijdens therapie. De waarden voor de epo therapie waren echter niet gerelateerd aan de Hb respons, waaronder CHR (Hb content in reticulocyten) en % hypochrome ery's, die wel bij dialyse patiënten nuttig bleken. De correlatie tussen de CHR (ADVIA 120) en de ret y, een vergelijkbare parameter op de XE 2100, was goed (lineaire regressie $ret\ y = 571\ CHR + 722$, $r^2=0,82$, $n=86$).

Conclusie: De Hb respons in reuma patiënten was kleiner dan in de controlegroep. De Hb respons kon niet voorspeld worden met de hematologische parameters van de ADVIA 120 of Sysmex XE 2100.

27. Surface Plasmon Resonance (SPR) analyses van cellen in apoptose

P. BUIJTENHUIJS, C. SEPHAT, A.A. POOT, I. VERMES, J. FEIJEN

Laboratorium, Medisch Spectrum Twente, Enschede

Inleiding: Apoptotische cellen geven expressie van fosfatidylserine (PS) aan de buitenkant van hun celmembranen. Annexine-V heeft in aanwezigheid van Ca^{2+} een sterke affiniteit voor PS. Dit verschijnsel wordt gebruikt voor het aantonen van cellen die in apoptose zijn door het meten van de mate van annexine-V binding aan het celmembranen van cellen in suspensie. Moleculaire interacties kunnen zeer gevoelig geanalyseerd worden met de 'Instrument for Biomolecular Interaction Sensing' (IBIS). Er wordt hierbij gebruik gemaakt van een goudoppervlak en een optische 'surface plasmon resonance' (SPR) biosensor dat veranderingen van de brekingsindex op het oppervlak registreert. Op deze manier wordt de interactie van annexine-V, dat gebonden is aan het oppervlak, met de expressie van PS op de celmembranen van een celsuspensie gemeten.

Methoden: Het sensor oppervlak van goud is gecoat met 0.44 mg/ml annexine-V. Er wordt gemeten aan HL-60 cellen in HEPES buffer, die al dan niet 24 uur zijn geïncubeerd met 0,20 μM camptothecine.

Resultaten en Discussie: Annexine-V werd goed gebonden aan het goudoppervlak. Zowel controle cellen als de camptothecine geïnduceerde cellen gaven een verandering in het SPR-signaal, waarbij het verschil bij de apoptotische cellen het grootst was. Er werd in een HEPES buffer gemeten, wat geleid kan hebben tot spontaan geïnduceerde apoptose in de controle cellen.

Conclusie: De metingen van de veranderingen van het SPR-signaal m.b.v. de IBIS voor het aantonen van apoptotische cellen is een veelbelovende methode om apoptose te meten.

28. Comparison of three antibody-identification programs

A.M.J. BUITING, W. van GELDER and R.B. DINKELAAR
Albert Schweitzer Hospital, Dordrecht, Dept. of Clinical Chemistry, The Netherlands

Introduction: The detection and identification of antibodies against red blood cells is an important aspect of transfusion medicine, requiring considerable practical experience. Each antibody results in a characteristic pattern (antigram) in a screening panel and throughout the years a number of computer programs has been developed to assist in the interpretation. However, the performance of these programs has – to our knowledge – never been compared. In this study three programs are compared: PeliPIP (CLB), Resolvigen 2.0 (Ortho) and V.I.P. (Diamed).

Materials and methods: Each program was tested using 24 different antigrams: 15 single antibody patterns and 9 patterns with different combinations of antibodies as seen most frequently in our database. The patterns were obtained using a combination of Diamed, ID-DiaPanel and ID-DiaPanel (a 11 and 3 cell-panel respectively). In addition, a number of complex patterns were tested (incomplete antigrams, additional

positive cells). Results were compared to the results acquired by hand-interpretation. Furthermore a questionnaire to get background information from the different programs was sent to and filled in by the different companies.

Results: Preliminary results show that each program correctly interpreted the single antibody patterns. However, the three programs showed considerable differences in their suggestion of possible other (or not excluded) antibodies. These differences were also seen when interpreting other - more complex - antibody patterns. Furthermore, programs differed in the possibility to register levels of reaction strength, automated suggestions for further investigation, coupling to a file and costs.

Conclusions: There are considerable differences in performance of the three programs in the interpretation of more complex patterns, the exclusion of additional antibodies as well as in additional features of the programs.

29. Loss of lipid asymmetry in red blood cell-derived vesicles and their fate in circulation

F.L.A. WILLEKENS¹, Y.A.M. GROENEN-DÖPP¹, B. ROERDINKHOLDER-STOELWINDER², K. KRUYT⁴, T.J.C. van BERKEL⁴, G.J.C.G.M. BOSMAN³, A.G. van den BOS², J.M. WERRE²
Dept. of Clinical Chemistry¹, Rijnstate Hospital, Arnhem. Dept. for Blood Transfusion and Transplantation Immunology² and Dept. of Biochemistry³, University Medical Center, Nijmegen. Division of Biopharmaceutics⁴, Leiden University Medical Center

Introduction: Expression of phosphatidylserine (PS) at the outer layer of the plasma membrane gives rise to a binding place for a PS dependent scavenger receptor on Kupfercells and could lead to phagocytosis. Red blood cells (RBC) lose during their live 16% of their surface area by vesiculation. Details about the PS-expression are largely unknown. Moreover, it was shown that rat RBC can be used as a model for age-dependent changes in human RBC. So it was tempting to study also the fate of the rat vesicles in circulation.

Methods: Vesicles from man (n=5) and rat (n=2) were prepared from plasma by differential centrifugation. Anti-GPA-PE and Annexin-V-FITC were used to characterise human vesicles by flowcytometry. Rat vesicles were labelled with

⁵¹Cr and injected in rats. Plasma disappearance and liver uptake were measured.

Results: 45% (± 3.7) of vesicles were RBC-derived and 25% (± 6) expressed both GPA and PS. The remainder were mostly platelet derived vesicles, which expressed PS for more than 80%. Rat vesicles were very rapidly cleared from circulation and for about 50% taken up by the liver.

Conclusions: About half the RBC-derived vesicles express PS. This can be the result both of partial loss of lipid asymmetry as well of the simultaneous occurrence of inside-out- and right-side-out-vesicles. Vesicles are rapidly cleared from circulation, for a significant part by the liver.

30. Een protocol voor flowcytometrisch onderzoek naar de lymfocytensubpopulaties bij kinderen met het syndroom van Down

Y. C. M. de HINGH¹, E. F. A. GEMEN¹, P. W. van der VOSSSEN², A. B. MULDER¹, E. de VRIES²
Jeroen Bosch Ziekenhuis, locatie Groot Ziekengasthuis, Laboratorium Klinisch Chemie en Hematologie¹ en Afdeling Kinderneeskunde², Postbus 90153, 5200 ME 's-Hertogenbosch

Introductie: Kinderen met Down syndroom maken meer infecties door en hebben een verhoogde kans op autoimmuunziekten en hematologische maligniteiten, passend bij een afwijkende functie van het immuunsysteem. In de literatuur zijn inderdaad verschillen beschreven tussen het immuunsysteem van kinderen met en kinderen zonder Down syndroom. Dit betreft echter voor het merendeel oudere studies, verricht met inmiddels verouderde technieken. De huidige studie heeft als doel het verder in kaart brengen van het immuunsysteem door de lymfocytensubpopulaties te karakteriseren, gebruikmakend van flowcytometrie.

Methoden: Met behulp van drievoudige labelingen volgens de volbloedmethode worden B- en T-lymfocyten (resp. CD19⁺ en CD3⁺), NK-cellen (CD3⁻/CD16⁺56⁺), granulocyten (CD15⁺) en monocyt (CD14⁺) onderscheiden. Binnen de B- en T-lymfocyten wordt onderscheid gemaakt in helper- en cyto-

toxische cellen (resp. CD4 en CD8), in geheugen, naïeve en geactiveerde cellen (CD45RO, CD45RA, CD27), en in enkele specifieke subpopulaties (CD57, CD21).

Resultaten: Tot op heden zijn bij 11 kinderen met het syndroom van Down de leucocyten geanalyseerd. Hierbij werden een aantal belangrijke verschillen met normale kinderen van dezelfde leeftijd gevonden: het aantal circulerende lymfocyten is laag (< p10), wat vooral wordt veroorzaakt door een verlaagd aantal circulerende B-lymfocyten. Daarnaast zijn ook het aantal T-lymfocyten en ook de T-helper cellen laag-normaal.

Conclusie: In een groep kinderen met het syndroom van Down hebben we duidelijke verschillen in de lymfocytensubpopulaties in vergelijking met normale kinderen kunnen aantonen. Verder onderzoek in een grotere groep kinderen is nodig om hieraan conclusies te kunnen verbinden.

31. Volume and haemoglobin loss from circulating red blood cells in the rat: similarity to the human condition

J.M. WERRE², Y.A.M. GROENEN-DÖPP¹, B. ROERDINKHOLDER-STOELWINDER², K. KRUYT⁴, T.J.C. van BERKEL⁴, G.J.C.G.M. BOSMAN³, A.G. van den BOS², F.L.A. WILLEKENS¹

Dept. of Clinical Chemistry¹, Rijnstate Hospital, Arnhem. Dept. for Blood Transfusion and Transplantation Immunology², Dept. of Biochemistry³, University Medical Center, Nijmegen. Division of Biopharmaceutics⁴, Leiden University Medical Center

Introduction: Human red blood cells (RBC) lose volume and haemoglobin during their stay in the circulation shown by fractions obtained by counterflow centrifugation. To assess the usability of a rat model, age-dependent changes in rat RBC were studied.

Methods: Glycated rat haemoglobin components were identified by *in vitro* glycation. RBC of rat (n=2) and man (n=5) were separated by counterflow centrifugation. Glycated haemoglobin was determined by HPLC, RBC-indices were measured on an ADVIA haematology analyser.

Results: Two major glycated haemoglobin components were

found (peak 5 and peak 7). From youngest to oldest fractions the following changes were found: Glycated haemoglobin: increased 45% (HbA1c) in men, and 42% (peak 5) and 49% (peak 7) in rats. MCV: decreased 20% in men and 16% in rats. MCH: decreased 20% in men and 24% in rats.

Conclusions: As in man, rat RBC lose relatively as much volume as haemoglobin while in circulation. The rat model can be used in studies concerning the aetiology of cell age dependent changes of RBC-indices as well as in studies concerning the therapeutic benefit of removal of old RBC e.g. to decrease the malignant hyperbilirubinaemia of Crigler Najjar's disease.

32. Optimisation of the white blood cell flagging criteria of the Sysmex XE-2100

J.H. KLINKSPOOR, J. B. LOKHOFF, M. SPAANS, G.A.E. PONJEE

Diagnostisch Centrum SSDZ, Reinier de Graaf Groep, Delft, the Netherlands

Introduction: Recently, the Sysmex XE-2100 was introduced in our laboratory as the routine blood cell analyser. In this analyser the morphology flagging triggers are expressed as Q-flag values (arbitrary units: 0-300). Using the Q-flag settings recommended by the manufacturer (100 each parameter), an increased number of specimens flagged as 'suspect' was observed, compared to our previous analyser. This study was designed to reduce the amount of false positive flags by adjusting the WBC Q-flag limits.

Methods: Two hundred blood specimens were analysed (complete blood count and WBC differential) on the Sysmex XE-2100. Microscopic differentiation, based on the examination of 100 WBC, was performed on May-Grünwald-Giemsa stained blood smears.

Results: Hundred routine blood samples were sorted according to their suspect-flag(s) and ranked in order of increasing Q-flag value. Samples were classified as normal or abnormal,

depending on the absence or presence of microscopic abnormalities. New limits for the Q-flags were then set (150 atypical lymphocytes, 120 abnormal lymphocytes/lympho blasts, 200 Left Shift, 180 Immature Granules, 100 Blasts). The proposed adjustments were evaluated by checking the Q-flag values of another 100 samples, classified as abnormal after microscopic examination. After adjustment, 1 of the 100 abnormal samples would have been missed, this sample contained atypical (viral) lymphocytes (+2). The automated blood count showed 50% lymphocytes, the upper limit of the reference interval (15-50%). Therefore, this sample could only be detected as being abnormal based on the 'suspect' flag.

Conclusions: Adjusting morphology flagging threshold values resulted in a significant reduction in the false-positive flagging of WBC differentials, without essentially affecting the amount of true positives. Furthermore, the routine microscopy workload was significantly reduced.

33. Primary sensitization to sweet bell pepper pollen in greenhouse workers with occupational allergy

A.W. van TOORENBERGEN¹, A.M. VERMEULEN¹, G.C.M. GROENEWOUD², N.W. de JONG², H. de GROOT² and R. GERTH van WIJK²

Department of Clinical Chemistry¹ and Department of Allergology², University Hospital Rotterdam, Rotterdam, the Netherlands

Background: A high prevalence of allergy to sweet bell pepper pollen was recently found among exposed horticulture workers (1). Allergy to plant-derived food is often the consequence of primary sensitization to common pollen allergens. We therefore investigated if there was cross-reactivity between sweet bell pepper pollen and pollen from grass, birch or mugwort.

Method: we selected 10 sera from greenhouse workers who had, had besides specific IgE against sweet bell pepper pollen, also IgE to grass-, birch- or mugwort pollen. Cross-reactivity was tested by inhibition of IgE-binding to solid-phase coupled sweet bell pepper pollen extract. The 10 sera were also analyzed for IgE binding to sweet bell pepper pollen by immunoblotting.

Results: With these sera, no or small inhibition of IgE-binding to sweet bell pepper pollen-extract was observed with grass, birch and mugwort pollen. With immunoblotting major

IgE-binding structures were seen at 14, 29 and 69 kDa in sweet bell pepper pollen extract.

Conclusion: The results of our study demonstrate that sweet bell pepper pollen contain allergens that have no or limited cross-reactivity with common pollen allergens. With sera from the 10 patients tested, sensitization to sweet bell pepper pollen was not the consequence of primary sensitization to common pollen allergens.

Literature

1. Groenewoud GCM, de Jong NW, van Oorschot-Nes AJ, Vermeulen AM, van Toorenbergen AW, Mulder PGH, Burdorf A, de Groot H, Gerth van Wijk R. Prevalence of occupational allergy to sweet bell pepper in greenhouses in the Netherlands. Clin Exp Allergy, in press.

34. New software QC-module for microscopic differentiation of blood cells

H.P. van BERKEL, E. van der HORST-JAKET, A. HUISMAN, A. de VRIES-EDELAAR and R.J. SLINGERLAND
Dept. of Clinical Chemistry & Haematology, Isala Klinieken (Weezenlanden), Zwolle, The Netherlands

Introduction: In order to proof the quality of microscopic differentiation of blood cells performed by technicians, it is essential to all certified laboratories to monitor the quality of this analysis.

Methods: A home-made software module within our laboratory information system, Labosys was written in a dedicated software language, Massachusetts general hospital Utility Multi-programming System (MUMPS). The quality of the blood cell differentiation is compared with a "gold standard", the mean of three technicians specialised in blood-cell differentiation. Prior to the analysis of daily-routine bloodsmear samples, technicians must always (controlled and checked by the software) microscopically analyse selected quality-control

bloodsmear samples of patients with known pathology.

Results: This software module allows similar handling for the microscopic differentiation of quality-control samples as for the routine samples. The quality of microscopic differentiation of blood cells is easily monitored. Individual and group feedback is given to the technicians with respect to their performances as part of a permanent education process resulting in a more standardised way of differentiation of blood cells.

Conclusion: a home-made QC-software module for the differentiation of blood cells can be used to monitor the quality of this analysis as performed by all involved technicians and results in a better standardised way of differentiation of blood cells.

35. Allergy testing on the Immulite 2000 random access immunoanalyser

E.M.van WIJK, E.J.M. de JONG, C.C.W. ENDSCHOT and C.M. COBBAERT
Laboratory of Clinical Chemistry and Hematology, Amphia Hospital Breda, The Netherlands

Background: Recently DPC (Diagnostic Products Corporation) added an allergy testmenu for specific IgE's to the Immulite 2000 immunoanalyser. In our laboratory we compared the Immulite 2000 with Unicap (Pharmacia) and with skin prick tests (SPT), using pre-released reagents for Immulite.

Methods: Within-day CV was established from the average of the daily mean of quadruplicate tests over 18 days using a positive control (E1) at 2 levels. Day-to-day CV was established by testing 18 consecutive days, twice a day in duplicate. Selected samples of 76 patients from the allergology dept. were assayed for 5 representative allergens and 1 panel on the Immulite 2000, and compared to results from Unicap and SPT. Total agreement (TA) between methods is defined as: [(Total number - Number of discrepancies)/Total number], where discrepancy means positive with one test and negative with the other.

Results: Within-day CV was $\pm 5.0\%$ at both levels of IgE, day-to-day CV was 6.7% at a level of 3.7 kU/L and 8.4% at 39 kU/L. TA of the Immulite test with SPT was found to be >80% for D1, T3, G3 and GP1, but only 57 and 34% for E1 and E5, respectively.

TA between Unicap and Immulite for the 5 allergens was >90% for D1, E1, T3 and G3, and 84% for E5; more than 80% was within 1 class difference, Immulite IgE absolute values being systematically higher.

Conclusions: Specific IgE tests can be assayed on the Immulite 2000 in a fast and easy way in a random access mode together with endocrinology and virology tests. TA with SPT was good, except for E1 and E5, which are known to show limited agreement with SPT. A good agreement in classes for specific IgE's was found between the Immulite 2000 and Unicap for the allergens tested.

36. Comparison of a Quantitative Latex and a Quantitative ELISA Plasma D-Dimer Assay in the Exclusion of Segmental and Subsegmental Pulmonary Embolism

P.E. SIJENS¹, M. OUDKERK¹, A. BERGHOUT², H.E. van INGEN³ and H. KEMPERMAN^{3,4}
Department of Radiology¹, State University and Academic Hospital Groningen, Groningen, The Netherlands; Department of Internal Medicine² Zuyderlandziekenhuis, Rotterdam, The Netherlands, and Department of Clinical Chemistry³, University Hospital Rotterdam / Daniel, Rotterdam, The Netherlands, present address: University Medical Center Utrecht, Department of Clinical Chemistry⁴, Utrecht The Netherlands

Introduction: The diagnosis and management of pulmonary embolism (PE) remains a difficult topic in clinical practice. The need for an easy, fast and non-invasive test to exclude PE is emphasized by the fact that only 30-40% of all initially suspected patients actually have PE.

Methods: In a period of four years 342 patients with suspicion of PE were subjected to pulmonary angiography. Citrate plasma's were taken just before starting angiography and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. D-dimer concentrations were determined using the VIDAS (Biomerieux, Marcy L'Etoile, France) ELISA and the Tinaquant (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) fully automated latex agglutination assay.

Results and discussion: The plasma D-dimer concentrations obtained with both tests were highly correlated ($r=0.91$; $P<<0.00001$). Levels were increased in all 78 patients with angiographic evidence of PE (Tinaquant: 2487 ± 329 vs. $1150\pm$

92 ; VIDAS: 2084 ± 279 vs. 1037 ± 84 ng/ml, $P<0.0001$ for both). D-dimer concentrations were higher in segmental PE than in subsegmental PE (Tinaquant: 3012 ± 481 vs. 1599 ± 292 ; VIDAS: 2510 ± 409 vs. 1365 ± 246 ng/ml; $P<0.0001$ for both) and in subsegmental PE not significantly different from the patients without PE (Tinaquant: $P=0.10$; VIDAS, $P=0.23$). The sensitivities of Tinaquant and VIDAS D-dimer tests for the presence of PE were identical: overall 90% ($n=78$), segmental PE 98% ($n=49$) and subsegmental PE 76% ($n=29$) ($p<0.01$). Furthermore, the negative predictive values were the same: 93-94% for subsegmental PE and 99% for segmental PE.

Conclusion: The performances of both D-dimer assays are similar and are useful for the exclusion of segmental PE, whereas they are not sufficiently accurate for the exclusion of subsegmental PE.

Stolling

37. Protrombinetijd en INR: kan plastic glas vervangen?

J. PRINS, Y.M.C. HENSKENS, E.J. van den DOOL, E. MILTENBURG-van der NEUT, B. VISSER, B. BAKKER, J. PONIT

Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam, Laboratorium Algemene Klinische Chemie

Inleiding: Binnen de klinisch chemische laboratoria wordt steeds meer gebruik gemaakt van plastic bloedafname buizen. Met name plastic serum (gel-)buizen en Lithium-heparine (gel-)buizen kennen reeds een brede toepassing. Gedurende de evaluatie van de STA-R stollings analyzer (Roche Diagnostics), ter vervanging van de Electra 1600CTM analyzer (Instrumentation Laboratory), is de toepasbaarheid van de plastic VacutainerTM Plus 2,7 ml (0,109 M) natrium citraat buizen (BD) vergeleken met de gebruikelijke glazen VacutainerTM 4,5 ml (0,105 M) natrium citraat buizen (BD).

Methoden: Om de toepasbaarheid van de plastic 2,7 ml natrium citraat buizen te kunnen vergelijken met de gebruikelijke glazen 4,5 ml natrium citraat buizen werd bij elke patiënt waarbij stollingsonderzoek was aangevraagd de twee genoemde natrium citraat buizen afgenomen, in een gerandomiseerde volgorde. In het verkregen plasma werd onmiddellijk de protrombinetijd (PT) en INR bepaald op een Electra 1600CTM analyzer met TromborelTMS-reagens (Dade Behring) en op een STA-R analyzer met STA-NeoplastineTMPlus (PT) en STA-

Hepato-Quick(INR)-reagens (Roche Diagnostics).

Resultaten: De regressie analyse van de patiëntenvergelijkingen laten de volgende resultaten zien (Passing en Bablok):

PT STA-R glas versus plastic: $y = 1,009x - 0,249$
($r = 1,000$)

PT Electra glas versus STA-R plastic: $y = 1,011x + 1,055$
($r = 0,977$)

INR STA-R glas versus plastic: $y = 1,000x + 0,000$
($r = 0,997$)

INR Electra glas versus STA-R plastic: $y = 1,069x - 0,058$
($r = 0,893$)

Conclusie: Op basis van de verkregen resultaten is het gebruik van plastic citraat buizen voor de bepaling van de PT of INR zeker te overwegen. Voordelen van het gebruik van deze plastic buizen is hun relatieve onbreekbaarheid, en dus grotere veiligheid. Daarbij zijn de geëvalueerde buizen patiëntvriendelijker aangezien per buis een kleiner volume bloed wordt afgenomen (2,7 ml in plaats van 4,5 ml) zonder het vergroten van de luchtkolom boven het afgenomen bloedmonster.

38. Identification of endothelial cell-derived microparticles

M. ABIDHUSSEIN, R. NIEUWLAND and A. STURK

Clinical Chemistry, Academic Medical Center, University of Amsterdam, the Netherlands

Introduction: Microparticles (MP) from various blood cells occur in the circulation. Recently, also MP originating from endothelial cells (EMP) were reported. The antibodies used for the detection of EMP by flow cytometry, however, were all directed against antigens not exclusively restricted to endothelial cells. **Aim:** To establish a reliable marker for the detection of EMP in plasma by flow cytometry.

Methods: EMP, isolated from culture supernatant of resting and interleukin-1 α activated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC; n=3; 0-72 hr), were stained with annexin V plus antibodies against CD31 (PECAM-1), CD51 (α_V), CD61 (β_3), CD62E (E-selectin) or CD142 (Tissue Factor [TF]), and analyzed by flow cytometry. Their expression was also determined on resting and stimulated HUVEC.

Results: HUVEC constitutively expressed CD31, CD51, and CD61. Both E-selectin and TF were inducible on >80% of the cells. All culture supernatants contained EMP, but less than 15% of the EMP stained for either CD51 or CD61, whereas CD31 was exposed on (maximal) 50%. Approximately 50% of the EMP strongly stained for E-selectin, albeit only after activation of the HUVEC, and TF was virtually absent.

Conclusions: HUVEC and EMP showed remarkably differences in their antigenic composition. CD31, CD51 and CD61 were almost completely absent (CD51, CD61) or only exposed on a subpopulation of EMP (CD31). In contrast, E-selectin, which is only expressed by endothelial cells, is the only antigen that may specifically detect (part of the) EMP ex vivo.

39. Desmopressin administration can permit von Willebrand disease, type 2N (Normandy) to be distinguished from mild haemophilia A

Y.C.M. de HINGH¹, M.A. KARIMAN¹, H.A.M. SINNIGE², J.F.M. PRUIJT² and A.B. MULDER¹

Department of Clinical Chemistry and Haematology¹ and Department of Internal Medicine², Jeroen Bosch Hospital, 's-Hertogenbosch, The Netherlands

Introduction In von Willebrand disease (VWD), type 2N (Normandy variant), the factor VIII (FVIII) binding capacity is impaired by gene mutations of the von Willebrand factor (VWF).

Sometimes, VWD, type 2N mimics mild haemophilia A, because Factor VIII (FVIII) levels are low, but VWF antigen, ristocetin cofactor activity (RiCoF) and multimeric profile may all be normal.

Desmopressin transiently increases FVIII and VWF, when administered to patients with mild hemophilia A and VWD and in general, high FVIII/VWF concentrations are maintained in plasma for at least 8 to 10 hours. In line with the knowledge that Desmopressin-infusions are unsuitable for treatment of VWD, type 2N because the half-life of the released FVIII is very short, we tested whether the response to a test dose of

Desmopressin may be useful to distinguish between mild hemophilia A and VWD, type 2N.

Methods A test dose of Desmopressin was administered intravenously to two patients with type O blood group and normal VWF antigen (63% and 66%, respectively) and RiCoF (60% and 65%, respectively), but decreased FVIII activity (22% and 37%, respectively) and the responses were measured one and four hours after the infusion.

Results In both patients, VWF, RiCoF and FVIII reached levels above 100% within one hour post-Desmopressin. However, after four hours, although VWF and RiCoF maintained above 100%, FVIII was reduced to nearly baseline levels.

Conclusions In the present study we demonstrate that the response to a test dose of Desmopressin may help to distinguish VWD, type 2N from mild haemophilia A.

40. Red wine and wine polyphenols but not alcohol alone inhibit ADP-induced platelet aggregation in vitro

D.W. de LANGE¹, R.J. KRAAIJENHAGEN² and A. van de WIEL¹

Departments of Internal Medicine¹ and Clinical Chemistry², Eemland Hospital, Amersfoort

Introduction: In 1992 the French Paradox was introduced; the French have a discordantly low incidence of cardiovascular deaths. Numerous studies have shown that prolonged moderate alcohol consumption and especially red wine consumption influence amongst others platelet aggregation.

Red wine consists of alcohol, sugars, and amongst others polyphenols. These have been implicated in numerous cardioprotective effects from radical scavenging, direct vasodilating properties, nitric oxide agonists to inhibitors of platelet aggregation.

Objective: Analyse whether alcohol, red wine or red wine polyphenolic compounds exert an immediate inhibitory effect upon ADP-initiated platelet aggregation in vitro.

Materials and methods: Alcohol, unfractionated red wine and red wine polyphenolic extract were added in different concen-

trations to standardised platelet concentration 2 minutes before aggregation was started by different concentrations of ADP.

Results: Polyphenolic red wine extract inhibits aggregation dose-dependently and significantly from concentrations exceeding 45 mg/l ($p < 0.05$). Red wine inhibited platelet aggregation significantly at supraphysiological alcohol concentrations only (0.24 percent and 0.48 percent $P < 0.05$). Alcohol alone did not inhibit platelet aggregation initiated with ADP.

Conclusions: Red wine and especially red wine polyphenolic extracts significantly and immediately (< 2 minutes) inhibit platelet aggregation. Possibly through a direct receptor mediated or second messenger pathway inhibition. Further research is in progress to elucidate the mechanism behind this direct inhibition.

41. Invloed van acetylsalicylzuur op de reproduceerbaarheid PFA-100 resultaten

J. KLEIN GUNNEWIEK¹, A. HOVESTAD-WITTERLAND², M. de METZ¹ en H. VOLLAARD²

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Klinische Farmacie², Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Postbus 9015, 6500 GS Nijmegen

Inleiding: Acetylsalicylzuur (ASA, aspirine) remt de trombocytenfunctie irreversibel, wat te meten is middels een verlengde PFA-100-sluitingstijd. In het verleden is aangetoond dat PFA-100 resultaten onder andere beïnvloed worden door het gebruikte bloedafnamesysteem. In deze studie is onderzocht in hoeverre ASA-medicatie de PFA-100-resultaten beïnvloeden.

Methode: Bij 12 gezonde vrijwilligers zijn voor ASA-gebruik en 2 uur na het slikken van 160 mg ASA drie verschillende citraatbuizen afgenomen: 0,129 M full draw, 0,129 M partial draw en 0,109 M full draw. De PFA-100-sluitingstijd (in duplo) en het trombocytengetal zijn bepaald. Dezelfde bepalingen zijn uitgevoerd bij 12 neurologische patiënten, die chronisch ASA slikken.

Resultaten: Het trombocytenaantal, maar niet de sluitingstijd, gemeten in de partial draw buis was aanzienlijk lager in verge-

lijking tot beide full draw buizen. De PFA-100-waarden bij gezonde vrijwilligers vertoonden voor ASA-gebruik slechts 1 slechte duplo (meer dan 20% afwijking) bij beide 0,129 M citraatbuizen en 3 slechte duplo's bij 0,109 M citraat. Echter, na éénmalige inname van 160 mg ASA lag het aantal afwijkende duplo's aanzienlijk hoger (5 voor 0,129 M full draw, 6 voor 0,129 M partial draw en 7 voor 0,109 M full draw). Bij de neurologische patiënten vertoonden de 3 citraatbuizen 4 afwijkende duplo's.

Conclusie: Bloed verzameld in een partial draw citraatbuis wordt gekenmerkt door een sterke trombocytenaggregatie, wat niet resulteert in een verkorte PFA-100-sluitingstijd. ASA-gebruik beïnvloedt de reproduceerbaarheid van PFA-100-resultaten aanzienlijk: éénmalige inname van ASA en gebruik van 0,109 M full draw citraatbuis geeft het hoogste aantal afwijkende duplo's.

42. Nieuw doseeralgoritme trombosedienst op basis van resultaten CoaguChek-project

M.J.BEINEMA¹, H.J.M.SALDEN², F.M.J.ZUIJDERHOUDT²

Deventer Ziekenhuis, Vakgroep Klinische Chemie, ¹Arts trombosedienst, ²Klinisch Chemicus

Introductie: In 1999 is het CoaguChek-project begonnen. Hierin werden 47 patiënten opgeleid om zelf de INR te bepalen. Een doel was om te kijken naar een andere methode van doseren van trombosedienstpatiënten.

Methode: Patiënten kregen een dosering van 13 weken (standaard: 2 tot 6 weken) met de opdracht iedere week te meten, maar alleen contact op te nemen bij een INR buiten de individuele streefgrenzen. De trombosedienst bleef doseren.

Resultaten: We vonden dat deze methode een verbeterd inzicht gaf in het doseren: een doseerschema leidt niet tot een enkele INR, maar tot een range van uitslagen. Verandering van de dosering leidt tot een hogere of lagere range. De dosering wordt alleen structureel aangepast bij een INR buiten de range. Op

basis hiervan is het doseeralgoritme van TROMIS, het trombosedienstprogramma van Philips (de berekeningsmethode) aangepast.

In Deventer is het aantal patiënten dat automatisch gedoseerd wordt toegenomen tot 70% (landelijk is dat 30-50%); het systeem doet bij 80% van de patiënten een voorstel, waarvan 92% geaccepteerd wordt. De resultaten in de zin van kwaliteit (longterm patiënten binnen de streefgrenzen) is hoger dan het landelijk gemiddelde.

Conclusie: Deze doseermethode voldoet goed. Het computerprogramma is in staat om een groter percentage van de normale trombosedienstpopulatie automatisch te doseren, met ten minste instandhouding van de kwaliteit.

Moleculaire Biologie

43. CYP3A4-variant-allelen in de Nederlandse bevolking

R.H.N. van SCHAIK¹, S. DORRESTEIN¹, I. van der HEIDEN¹, M. van der WERF¹, S.N. de WILDT², J. van den ANKER², J. LINDEMANS¹

Afd. Klinische Chemie¹ en Afd. Neonatologie², Sophia Kinderziekenhuis, Academisch Ziekenhuis Rotterdam

Inleiding: Interindividuele variatie in geneesmiddelmetabolisme vormt een belangrijk probleem in de geneeskunde, met als mogelijk resultaat het optreden van gevaarlijke toxische bijwerkingen. Meer dan 50% van de voorgeschreven geneesmiddelen worden in de lever gemetaboliseerd door de cytochroom P450 3A-familie, waarvan CYP3A4 het belangrijkste enzym is. Genetische polymorfismen in CYP3A4 kunnen verantwoordelijk zijn voor interindividuele variatie in geneesmiddelmetabolisme. Nu steeds meer polymorfismen worden gevonden, is het van belang eenvoudige en snelle assays te hebben om deze mutaties te detecteren, alsmede om de de allel-frequentie in diverse etnische groeperingen te kennen.

Methoden: Op basis van de DNA sequentie werden specifieke PCR-RFLPs opgezet en gevalideerd voor 12 variante allelen van CYP3A4. De PCR-producten werden gesequenced ter controle op specificiteit van de PCR. Van 500 Caucasische

donoren werd genomisch DNA verzameld en geanalyseerd met behulp van de opgezette assays. De met PCR-RFLP gedetecteerde mutaties werden bevestigd middels sequenzen.

Resultaten: PCR-RFLP-assays werden opgezet voor 12 CYP3A4 variant-allelen. In de groep van Caucasische donoren werd het promotor-polymorfisme CYP3A4*1B het meest frequent aangetroffen (5,3%), gevolgd door de variant-allelen CYP3A4*3 (1,1%), *7 (0,1%) en *8 (0,1%). De allelen CYP3A4*2, *4, *5, *6, *9, *11, *12 en *13 werden niet gevonden.

Conclusie: Detectie van 12 genetische polymorfismen van CYP3A4 is nu mogelijk middels PCR-RFLP. Voor het screenen van de Caucasische bevolking lijken op dit moment voornamelijk de variant-allelen CYP3A4*1B en CYP3A4*3 van belang.

44. Effect van het genetisch polymorfisme C3425T in MDR-1 op cyclosporinespiegel in niertransplantatiepatiënten

R.H.N. van SCHAIK¹, I. van der HEIDEN¹, C. BAAN², J. LINDEMANS¹, T. van GELDER²

Afd. Klinische Chemie¹ en Afd. Interne Geneeskunde², Academisch Ziekenhuis Rotterdam

Inleiding: Voor cyclosporine wordt een substantiële interindividuele variatie in farmacokinetiek gevonden. Het volgen van cyclosporineconcentraties is van belang omdat het middel een beperkte therapeutische breedte heeft. Cyclosporine is een substraat voor het P-glycoproteïne, dat gecodeerd wordt door het MDR-1-gen. Hiervoor is recent een genetisch polymorfisme beschreven dat gecorreleerd is met verminderde P-glycoproteïne-expressie en -activiteit: C3435T (PNAS 97, 3473-3478). Het effect van deze mutatie op dosisgecorrigeerde cyclosporinespiegels werd onderzocht bij 52 niertransplantatiepatiënten.

Methoden: Op basis van de DNA-sequentie werd een specifieke PCR-RFLP opgezet en gevalideerd voor de detectie van de C3435T-mutatie van MDR-1. Van 500 Caucasische donoren werd genomisch DNA verzameld en geanalyseerd met behulp van de opgezette assay. De met PCR-RFLP gedetecteerde mutaties werden bevestigd middels sequenzen. Van 52 niertransplantatie-patiënten werd DNA geïsoleerd uit EDTA-

bloed. Het gewicht van de patiënt, de cyclosporine-dosering en de cyclosporine dalspiegels werden genoteerd op 3 en 12 maanden na transplantatie. Patiënten met co-medicatie, waarvan bekend is dat het de farmacokinetiek van cyclosporine beïnvloedt, werden niet opgenomen in de studie.

Resultaten: In een groep van Caucasische donoren werd een allel-frequentie van 53% gevonden: 52% heterozygoten en 27% homozygoten voor het C3435T-allel. Onder de niertransplantatie-patiënten werden 52% heterozygoten en 29% homozygoten gevonden. De gemiddelde, voor gewicht en dosering gecorrigeerde cyclosporinespiegels bleken niet significant te verschillen tussen de groep wild typen (46 ± 2 ng/ml), heterozygoten (43 ± 2 ng/ml) en homozygoten (41 ± 3 ng/ml) (gemiddelden op 3 mnd \pm s.e.m.).

Conclusie: Bij de interindividuele variatie in de farmacokinetiek van cyclosporine speelt het C3435T polymorfisme in MDR-1 geen belangrijke rol en is screenen op dit polymorfisme ter verbetering van farmacotherapie niet relevant.

45. Detectie van genetische polymorfismen in CYP3A5

R.H.N. van SCHAIK¹, I. van der HEIDEN¹, S.N. de WILDT², J.N. van den ANKER², J. LINDEMANS¹

Afd. Klinische Chemie¹ en Afd. Neonatologie², Sophia Kinderziekenhuis, Academisch Ziekenhuis Rotterdam

Inleiding: Cytochroom P450 3A5 (CYP3A5) is na CYP3A4 het belangrijkste enzym van de cytochroom P450 3A familie. Deze familie van enzymen is verantwoordelijk voor het metabolisme van 45-60% van alle gebruikte geneesmiddelen. CYP3A5 vertoont een grote overlap in substraatspecificiteit met CYP3A4. De geconstateerde variatie in geneesmiddelmetabolisme van CYP3A4-substraten wordt dan ook wellicht niet door CYP3A4, maar door CYP3A5 veroorzaakt. Er zijn twee genetische polymorfismen van CYP3A5 beschreven: CYP3A5*3 en *6. Beide polymorfismen geven aanleiding tot alternatieve splicing en een incompleet eiwit, resulterend in de afwezigheid van CYP3A5 in de weefsels van diverse individuen.

Methoden: Op basis van de DNA-sequentie werden specifieke PCR-RFLPs opgezet en gevalideerd voor de detectie van CYP3A5*3 en *6. De PCR-producten werden "gesequenced"

ter controle op specificiteit van de PCR. Van 500 Caucasische donoren werd genomisch DNA verzameld en geanalyseerd met behulp van de opgezette assays. De met PCR-RFLP gedetecteerde mutaties werden bevestigd middels "sequenzen".

Resultaten: In een groep van 491 Caucasische donoren werd een allelfrequentie van 8,5% voor CYP3A5*3 (81 heterozygoten en 1 homozygoot) en 0,1% voor CYP3A5*6 (1 heterozygoot) gevonden. "Sequenzen" bevestigde de specificiteit van de PCR en de aanwezigheid van de mutatie.

Conclusie: Een snelle en eenvoudige assay is opgezet voor de detectie van de variant-allelen CYP3A5*3 en *6. Het CYP3A5*3-allel, coderend voor een inactief CYP3A5, heeft een relatief hoge frequentie in de Caucasische populatie en dient derhalve bij screening op afwijkend geneesmiddelmetabolisme voor CYP3A-substraten meegenomen te worden.

46. Identification of Hb Agenogi, a rare hemoglobin variant by the combination of capillary isoelectric focusing and molecular biology

B.B. van der MEIJDEN¹, J. van der WEIDE², E.A.W. BLOKLAND¹, J.P.M. WIELDERS¹, R.J. KRAAIJENHAGEN¹
Department of Clinical Chemistry¹, Eemland Hospital, Amersfoort, The Netherlands; Department of Clinical Chemistry², St Jansdal Hospital, Harderwijk, The Netherlands

Introduction: Blood of a 2-year-old boy with microcytic anaemia was sent to this hospital for hemoglobin electrophoresis.

Methods: Hemoglobin was analysed by capillary isoelectric focusing. DNA was amplified by PCR and sequenced using an ABI Prism Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Results: Capillary isoelectric focusing showed a Hb variant, migrating at the pI point of HbC and HbE, indicating a hemoglobinopathy. Specific digestion for HbC and HbE demonstrated no abnormalities. Sequencing the β globin gene detected a heterozygous mutation β 90(F6)Glu->Lys, previously reported as Hb Agenogi.

Conclusions and discussion: Hb Agenogi is a rare variant, so far detected in unrelated racial and ethnic groups. It is characterised by slightly reduced oxygen affinity and not associated with any appreciable clinical manifestation, in contrast to HbC and HbE.

The combination of both powerful techniques, electrophoresis at the protein and sequencing at the DNA level, is mandatory in detecting hemoglobin variants demonstrated by this rare case of Hb Agenogi.

47. Use of cell lysates in real-time PCR applications

J.E. de VRIES, P.A.H.M. WIJNEN, R.A.M. op den BUIJSCH, M.P. van DIEIJEN-VISSER and O. BEKERS
Academic Hospital Maastricht, Dept. Of Clinical Chemistry, Maastricht

Introduction: Cell lysates have been described as an alternative for genomic DNA in PCR (1). As yet, real-time PCR applications that use cell lysates instead of genomic DNA have not been reported. In this study it has been evaluated whether cell lysates can be utilized in real-time PCR.

Methods: A commercial TaqMan assay (EuroGenTech) for quantitative measurement of beta-actin was analyzed with the Smart Cycler (Cepheid) with 1 μ l cell lysate in 25 μ l endvolume. A commercial FRET assay for ApoE was analyzed on the Light Cycler (Roche Diagnostics) applying manufacturers conditions with 0.25 μ l cell lysate in 10 μ l endvolume.

Results: Quantitative measurements could be performed for beta-actin with cell lysates. ApoE genotyping on cell lysates

with the FRET assay matched with the results obtained before by restriction-enzyme digestion after PCR (1, 2).

Conclusion: Cell lysates can be used in quantitative (TaqMan) and polymorphism discrimination (FRET) real-time PCR assays.

Literature

1. De Vries JE, Wijnen PAHM, Hamulyak K, Van Diejen-Visser MP and Bekers O. PCR on cell lysates obtained from whole blood circumvents DNA isolation. *Clin Chem* 2001; 47: 1701-1702.
2. Hixson JE and Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *HhaI*. *J Lip Res* 1990; 31: 545-548.

48. Evaluation of HLA genotyping in a peripheral hospital

H.M. DIJSTELBLOEM, B.B. van der MEIJDEN and R.J. KRAAIJENHAGEN
Department of Clinical Chemistry, Eemland Hospital, Amersfoort, The Netherlands

Introduction: The cell-surface glycoproteins encoded by the Human Leukocyte Antigen (HLA) system are a major genetic barrier to transplantation and transfusion, as the strong immune response to foreign HLA molecules causes graft rejection. The HLA system is highly polymorphic, and analysis of this polymorphism is essential to match graft donors with recipients. To accomplish reliable genotyping of HLA in our hospital, we have adapted a commercially available diagnostic procedure to characterize HLA-A, HLA-B and HLA-DR genes by DNA analysis.

Methods: Genomic DNA was isolated from peripheral leukocytes. HLA-A and HLA-B genes were characterized by PCR amplification and direct sequencing. In contrast, HLA-DR genes were characterized by sequence-specific-primer PCR followed by sequencing.

Results: We found the commercially available diagnostic procedure to be an easy and reliable method for characterizing HLA genotypes. This procedure has enabled us to identify potential donors amongst relatives of patients that require (bone marrow) transplantation. Comparison of our HLA genotyping results with the results obtained from transplantation centers demonstrated a 100% correlation in 14 potential donors so far, and showed to be cost-effective. In addition, this procedure has enabled us to provide for HLA-matched trombocytes in patients refractory to trombocyte transfusions.

Conclusions: HLA genotyping can easily and reliably be adapted in a peripheral hospital with molecular diagnostic facilities, is cost-effective and contributes significantly to diagnostic and therapeutic procedures in the clinic.

49. Endothelial dysfunction and hyperhomocysteinemia in cardiovascular disease: a genetic approach

S.G. HEIL¹, L.A.J. KLUIJTMANS¹, A.S. de VRIESE³, H. DIJKMAN², O. LABUDOVA⁴, J.M.F. TRIJBELS¹ and H.J. BLOM¹

Department of Pediatrics; Laboratory of Pediatrics and Neurology¹, Department of Pathology², University Medical Center Nijmegen, The Netherlands; Renal Unit and Laboratory of Physiology³, University Hospital Gent, Belgium; Department of Molecular Radiology⁴, University of Bonn, Germany

Introduction: An early and important phase in the development of atherosclerosis is endothelial dysfunction. Different studies, both in humans and in animal models, have shown

that hyperhomocysteinemia (HHcy) is associated with an impaired endothelium-dependent vasodilation. The exact mechanism by which elevated homocysteine levels could lead to

atherosclerosis is largely unknown, but likely effects regulation at the level of gene expression in the endothelial cell. The aim of this project is to study gene-expression differences between HHcy-rats and control rats to study the mechanism, which is involved in HHcy.

Methods: Female wistar rats were fed a methionine-enriched diet to induce HHcy. Endothelial cells can be isolated from specific rat kidney arterioles using laser microdissection (LMD). RNA of endothelial cells will be linearly amplified

using T7 RNA polymerase, and will be used for subtractive hybridisation and/or micro-arrays.

Results and discussion: Endothelial cells were isolated with 'navigated LMD' using an anti-rat CD31 monoclonal for visualisation of the endothelium. Subsequently, endothelial cells were dissected from a tissue section, which was stained with haematoxylin. Linear RNA amplification using T7 RNA polymerase is effective on standard RNA quantities (1 µg total RNA) and is at the moment being optimised for less starting material (1-100 cells).

50. Rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms using novel minor groove binding DNA oligonucleotides (MGB probes)

J.B. de KOK, E.T.G. WIEGERINCK, B.A.J. GIESENDORF, D.W. SWINKELS
University Medical Centre Nijmegen

Introduction: Novel fluorescent oligonucleotides that contain a 3' minor groove binding group (MGB) hybridize to single-stranded DNA targets with increased sequence-specificity compared to ordinary DNA probes. This reduces non-specific probe hybridization and results in low background fluorescence during the 5' nuclease PCR assay (TaqMan).

Methods: We developed a method for closed-tube genotyping using two allele-specific MGB probes labeled with different fluorescent dyes in one reaction. After PCR, tubes were transported to a fluorescence plate-reader for analysis of fluorescence. Common spreadsheet software was used for genotype

assignment. As an example, DNA samples from 172 hemochromatosis patients were selected and tested for molecular defects in the HFE gene, i.e. mutations in codon 63 and 282.

Results: Tight genotype clusters were observed for both codons and results with MGB probes were similar to conventional genotyping (PCR-RFLP).

Conclusion: We show that this fast and easy method can be used for large-scale (high throughput) genetic studies but also for routine molecular diagnostics without post-PCR manipulation of amplicons or the need for real-time quantitative PCR machines.

51. Bepaling van de cycline-D1 overexpressie met behulp van competitieve kwantitatieve RT-PCR

B. van den HOVEN, M.A.M. BON, F.A.J.T.M van den BERGH
Klinisch Chemisch Laboratorium, Medisch Spectrum Twente, Enschede, Nederland

Inleiding: De overexpressie van cycline-D1 kan onder andere gebruikt worden voor de diagnostiek van mantelcellymfomen (MCL). Van alle MCL vertoont 50-70% een specifieke translocatie tussen chromosoom 11 en 14, t(11;14)(q13;q32). Deze veroorzaakt overexpressie van het PRAD-1 gen dat codeert voor cycline-D1. De specificiteit is laag omdat ook in andere B- en T-cel lymfomen cycline-D1 expressie aantoonbaar is. In dit onderzoek is getracht de specificiteit te verbeteren door de overexpressie te kwantiteren m.b.v competitieve RT-PCR.

Methoden: De cellijn JVM-2 is positief voor cycline-D1. Deze cellijn is gebruikt voor de bereiding van een z.g. interne homologe exogene RNA standaard. Deze standaard gaat een competitie aan met het target RNA. Om onderscheid te maken tussen standaard en target wordt de RNA-competitieve referentie standaard (RNA-CRS) gesynthetiseerd met een deletie van 80 bp. Een bekende hoeveelheid RNA-CRS wordt in verdunningsreeks aan een constante hoeveelheid target toegevoegd waarna standaard en target in dezelfde reactie geamplificeerd worden, waarbij competitie ontstaat. De mRNA expressie van cycline-D1 kan m.b.v. een ijklijn van RNA-CRS kwantitatief bepaald worden.

Resultaten en Conclusie: De RNA-CRS is gecreëerd met een productgrootte van 403 bp. De hoeveelheid mRNA expressie van cycline-D1 kan m.b.v. deze standaard bepaald worden door competitieve RT-PCR. Door kwantitering van cycline-D1 overexpressie lijkt de diagnostiek van mantelcellymfoom aan betrouwbaarheid sterk te winnen. Zie: Uchimaru et al. Blood 1997; 89: 965-974.

52. Recidiverende meningococceninfecties t.g.v. familiale complementfactor-I-deficiëntie

C. KLOMP¹, A.P. ABBES¹, E.J.M. BRUGGEMAN¹, J.F. van GILS² en H. ENGEL¹
Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Kindergeneeskunde² Isala klinieken, locatie Sophia te Zwolle

Inleiding: Op de afdeling kindergeneeskunde zijn twee families bekend met een recidiverende meningococcensepsis. Dit kan het gevolg zijn van een immuundeficiëntie, waarbij het bekend is dat zeldzame complement deficiënties uit de klassieke en alternatieve route van het complement systeem resulteren in een verhoogde kans op het krijgen van recidiverende infecties.

Methoden: Met behulp van moleculair biologische technieken, zoals de PCR en sequentieanalyse, is getracht de genetische oorzaak van complement factor I deficiëntie bij twee Nederlandse families, met een bewezen complement factor I deficiëntie, op te sporen.

Resultaten: In het IF-gen, dat gelegen is op chromosoom 4q25, is in exon 4 een G?C mutatie gevonden, waardoor in codon 188 van dit gen het aminozuur glycine wordt vervangen door

het aminozuur alanine (Gly188Ala). De mutatie bevindt zich in het CD5 domein van het factor I molecuul. Het effect van de mutatie op de driedimensionale structuur of werking van het factor I molecuul is nog niet bekend.

Conclusie: De diagnose is in een eerder stadium reeds vastgesteld aan de hand van kwantitatieve bepaling van factor I, factor B, C1q, C3, C4 en C5, door het CLB. De door ons m.b.v. mutatieanalyse verkregen resultaten zijn volledig in overeenstemming met de resultaten van het CLB. De Gly188Ala mutatie in het IF-gen is de eerste mutatie die in Nederland gevonden is, wereldwijd is dit de derde mutatie. De Gly188Ala mutatie biedt de mogelijkheid om binnen deze beide families familieonderzoek te verrichten en pré-symptomatisch te gaan testen.

53. C-kit Asp-816-Val-mutatie-analyse bij patiënten met mastocytose

R.H.N. van SCHAİK¹, A. VERZIJL², H. LANGEVELD², R. HEIDE², A.W. van TOORENENBERGEN¹, J. LINDEMANS¹, A.P. ORANJE²

Afd. Klinische Chemie¹, Afd. Dermatologie², Academisch Ziekenhuis Rotterdam

Inleiding: Mastocytose is een heterozygote groep van aandoeningen, gekenmerkt door accumulatie van mestcellen. De huid is het orgaan dat het meest is aangedaan. Recente studies beschrijven dat mutaties in het proto-oncogen c-kit betrokken zijn bij een aantal vormen van mastocytose. De Asp-816-Val-mutatie leidt tot ligand-onafhankelijke activering van de tyrosinekinase c-kit. De aanwezigheid van deze mutatie lijkt gerelateerd aan de prognose en de gevoeligheid voor therapie. In een nieuw classificatie-systeem voor mastocytose is de moleculaire diagnostiek van de Asp-816-Val-mutatie opgenomen (BJ Longley and DD Metcalfe, *Hematol Oncol Clin North Am* 2000; 14: 697-701).

Methoden: Van 23 patiënten met mastocytose (11 volwassenen en 12 kinderen) en 1 gezonde tweelingzus van een patiënt wer-

den huidbiopten genomen en ingevroren. Een assay werd opgezet voor de detectie van c-kitmutaties middels RT-PCR, gebaseerd op coupes van huidbiopten. Vijf coupes van 20 micrometers werden gebruikt voor mRNA-isolatie. Na RT-PCR met c-kitspecifieke primers werd het 346 bp PCR-product gedigesteerd met HinfI en HaeIII, en op agarosegel geanalyseerd.

Resultaten: Bij 5 van de 23 patiënten (22%) kon de Asp-816-Val-mutatie worden aangetoond. Van de tweeling in de studie was de Asp-816-Val-mutatie wel aantoonbaar bij de mastocytose-patiënte maar niet bij haar (gezonde) zus.

Conclusie: De opgezette assay is bruikbaar voor de analyse van de c-kit Asp-816-Val-mutaties in huidbiopten, ter ondersteuning van de classificatie en de therapie van patiënten met mastocytose.

Neurologie/Psychiatrie

54. D3-dopaminereceptor-mRNA-expressie in lymfocyten: een perifere marker voor schizofrenie?

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

Klinisch Chemisch Laboratorium, St Jansdal Ziekenhuis, Harderwijk

Inleiding: De diagnose schizofrenie wordt op grond van klinisch beeld gesteld. Een perifere marker, die de diagnostiek sneller, eenvoudiger en meer accuraat zou kunnen maken, ontbreekt tot op heden. Er wordt verondersteld dat schizofrenie het resultaat is van veranderingen in het dopaminerge systeem en in recente literatuur is bij schizofreniepatiënten een verhoogde expressie beschreven van D3-dopaminereceptor mRNA in lymfocyten. In deze studie is onderzocht in hoeverre deze D3-dopaminereceptoren als perifere marker voor schizofrenie geschikt zijn.

Methode: Bij 8 patiënten met een DSM IV diagnose schizofrenie en evenzoveel "gematchte" controles werd met 2 ml EDTA-bloed op een Ficoll-Paque-gradiënt een lymfocytenisotatie uitgevoerd, waarna totaal-RNA geïsoleerd werd. Vervolgens werd een semi-kwantitatieve RT-PCR uitgevoerd met primers specifiek voor de D3-dopaminereceptor en voor β -actine als interne controle. Na elektroforese in een agarosegel

konden de PCR-producten van patiënten en controles aan de hand van de intensiteit van de specifieke banden met elkaar vergeleken worden.

Resultaten: Bij alle schizofreniepatiënten was de D3-dopaminereceptorband op de agarosegel, gerelateerd aan de β -actine band, van gelijke intensiteit als bij de controles.

Conclusie: Een toename van D3-dopamine mRNA-expressie in perifere lymfocyten bij schizofrenie kon niet worden aangetoond. Mogelijk was de optische kwantificering van PCR-producten niet nauwkeurig genoeg. Belangrijker: wellicht heeft antipsychotische medicatie, die aan alle onderzochte schizofrenen wordt voorgeschreven, een regulerend effect op dopaminereceptoren. De D3-dopaminereceptor op lymfocyten blijkt dus, althans in ons ziekenhuis waar bijna alle schizofreniepatiënten antipsychotica krijgen, niet geschikt als perifere marker voor schizofrenie.

55. Alzheimer's disease is not associated with asymmetric dimethylarginine (ADMA) in cerebrospinal fluid

C. MULDER¹, L.-O. WAHLUND², M. BLOMBERG², S. de JONG¹, G.J. van KAMP¹, Ph. SCHELTENS³ and T. TEERLINK¹

VU University Medical Center, Departments of Clinical Chemistry¹, and Neurology³, Amsterdam, The Netherlands and Huddinge University Hospital, Karolinska Institute, Department of Clinical Neuroscience², Section of Geriatric Medicine, Huddinge, Sweden

Introduction: Nitric oxide (NO) may play a role in the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD). Asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous inhibitor of NO synthase (NOS), is involved in regulation of NO production. Recently it has been shown that in AD dimethylarginine dimethylaminohydrolase, an enzyme that hydrolyses ADMA into citrulline and dimethylamine, is specifically elevated in neurons displaying cytoskeletal abnormalities. We hypothesized that this could lead to altered cerebrospinal fluid (CSF) levels of ADMA in AD.

Methods: Twenty patients who fulfilled the DSM-IV criteria for dementia and NINCDS-ADRDA criteria for 'probable' AD and twenty age-matched controls were recruited. The lower limit of MMSE for the controls was set at 26 points. Patients and controls went through an extensive dementia investigation including physical examination, MRI, SPECT,

neuropsychological test and laboratory tests. The final clinical diagnosis was confirmed after 6 month follow-up.

CSF was obtained by lumbar puncture and after centrifugation at 1000 rpm for 10 min, the samples were stored at -70 °C until assayed. Arginine, ADMA, and dimethylamine in CSF were measured by HPLC with fluorescence detection. **Results:** We found no differences between AD patients and controls with respect to CSF levels of arginine, ADMA, and dimethylamine.

Conclusions: CSF levels of ADMA and its hydrolysis product dimethylamine as well as arginine, the substrate of NOS, did not differ between AD patients and age-matched controls. Therefore, our results suggest that in AD there are no alterations of NOS activity on the level of either substrate or the endogenous inhibitor ADMA.

56. Tau in postmortem cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease (AD)

S.N.M. SCHOONENBOOM^{1,2}, E.M. HOL³, C. MULDER¹, R. RAVID⁴, G.J. van KAMP¹, F.W. van LEEUWEN³, and Ph. SCHELTENS²

VU University Medical Center, Departments of Clinical Chemistry¹ and Neurology²; Netherlands Institute for Brain Research³, Research Team 'Molecular Misreading'; The Netherlands Brain Bank⁴, Amsterdam

Introduction: Several studies have confirmed that tau is increased in cerebrospinal fluid (CSF) of AD-patients compared to non-demented controls. This protein appears to reflect the neurofibrillary tangles, one of the neuropathological hallmarks of AD. We investigated *antemortem* and *postmortem* levels of this marker to prove its validity in reflecting the pathological process in AD.

Patients and methods: Antemortem, 22 patients with 'probable' AD and 14 non-demented controls were studied; postmortem, 19 patients with 'definite' AD and 13 non-demented controls. In living AD-patients and controls CSF was obtained by lumbar puncture, and processed according to a standard protocol. Postmortem CSF was obtained by ventricular puncture. Tau-levels were measured by ELISA (Innogenetics, Gent, Belgium). Postmortem delay (PMD) ranged from 175 to 645 minutes.

Results: Levels of antemortem CSF-tau were significantly increased in AD-patients compared to controls (median: 688 pg/ml, range 257-2,487 pg/ml and 202 pg/ml, range 119-351 pg/ml, respectively). Tau-levels in postmortem CSF were 8-60-fold higher than in antemortem CSF, but no significant difference was demonstrated between postmortem tau-levels of AD-patients and controls (median: 5,223 pg/ml, range 570-14,455 pg/ml versus 11,520 pg/ml, range 465-15,115 pg/ml, respectively). There was no correlation of CSF-tau with PMD.

Conclusion: Levels of tau in postmortem CSF are completely different from those of antemortem CSF. Since there was no correlation with PMD, this phenomenon could be due to biological processes that start immediately after death, or to the place of collecting CSF. These findings indicate that caution is warranted to use postmortem CSF for analysis of potential biomarkers.

Hart- en vaatziekten

57. Evaluation of four automated methods for high-sensitivity c-reactive protein

J.M.W. van den OUWELAND, G. BELTMAN and K. MIEDEMA

Department of Clinical Chemistry, Isala klinieken, loc. Weezenlanden, Zwolle, The Netherlands

Introduction: Measurement of C-reactive protein (CRP) concentrations within the conventional reference interval may add to the predictive value of other markers used to assess the risk of future cardiovascular events. This application requires higher sensitivity methods for CRP than have traditionally been available.

Methods: We have compared the performance of four automated high-sensitivity CRP methods from Roche Diagnostics, Orion Diagnostica (both immunoturbidimetric assays), Dade Behring (immunonephelometric assay) and Diagnostic Product Corporation (DPC) (immunoluminometric assay), respectively. Precision, linearity, and comparability with samples from apparently healthy individuals were evaluated.

Results: Total percentage coefficients of variation regarding within-run and between-day precision using pooled sera ranged from 1.3 to 4.5% for the Roche, 2.8 to 18.5% for the Orion, 1.4 to 3.3% for the Dade, and 5.5 to 8.9% for the DPC

method. The Roche, Orion, Dade and DPC methods were linear down to at least 0.50, 0.07, 0.24, and 0.14 mg/L, respectively. Comparability with samples from apparently healthy individuals (n=31) revealed the following regression lines: Dade (x) versus Roche (y): $y=1.09x + 0.40$ ($r=0.996$); Dade (x) versus Orion (y): $y=0.73x - 0.10$ ($r=0.992$); and Dade (x) versus DPC (y): $y=0.85x - 0.01$ ($r=0.998$).

Conclusion: Despite the fact that the high-sensitivity CRP methods were standardized either against the reference preparation CRM470 (Roche, Orion and Dade) or against the older WHO 1st IS 85/506 (DPC), they revealed differences in results for a healthy population. This outcome illustrates that further effort is required for the standardization of high-sensitivity CRP assays at concentrations comparable to those seen in healthy subjects, because an individual patient's results will be interpreted using population-based cutoff points.

58. Myocardial ischemia and oxidative stress measurements by means of coronary sinus sampling in on- versus off pump Coronary Artery Bypass Grafting

W.B. GERRITSEN¹, W.J.P. van BOVEN², H.A. van SWIETEN², L.P. AARTS³, F.J. HAAS¹

Department of Clinical Chemistry¹, Thorax Surgery², Anaesthesiology³, Sint Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands

Introduction: It is known that coronary surgery performed with extra corporeal circulation is associated with oxidative stress. Ischemia, systemic inflammatory response and emboli are known to be important causative factors. The use of cardioplegia can augment this effect as its use may lead to impaired myocardial performance.

Methods: To investigate the myocardial components of oxidative stress in on-pump (group A) vs. off-pump (group B) CABG, two groups of 5 patients were prospectively enrolled in this study. Radial artery and coronary sinus samples were taken and analysed for hypoxanthine, xanthine, uric acid, and malondialdehyde.

Results: In both groups there was a strong increase in concentrations of hypoxanthine and xanthine after reperfusion mea-

sured in coronary sinus samples however in favour of group B. The increase in concentrations for malondialdehyde was identical to the profile of hypoxanthine and xanthine. The radial artery samples showed the same profile however the concentrations of the ischemia and oxidative stress parameters were not as high as compared to the coronary sinus samples.

Conclusions: The results show significantly higher levels of ischemia and oxidative stress parameters for group A, measured in coronary sinus samples early after coronary revascularisation as compared to group B. These results suggest that exposure to ischemia and oxidative stress for the myocardial tissue in the on-pump group is more pronounced than in the off-pump group.

59. Pharmacokinetics of C1-inhibitor in patients with acute myocardial infarction

J.H.C. DIRIS¹, W.Th. HERMENS², P.W. HEMKER³, W.K. LAGRANDE⁴, C.E. HACK⁵, M.P. van DIEIJEN-VISSER¹
Department of Clinical Chemistry, University Hospital Maastricht¹; Cardiovascular Research Institute Maastricht, University of Maastricht²; National Research Institute for Mathematics and Computer Science, Amsterdam³; Department of Cardiology, VU Medical Center, Amsterdam; ⁵Sanquin Research, Amsterdam⁴

Introduction: C1-inhibitor (C1-INH) is used for the treatment of patients with hereditary angioedema. Recently, beneficial effects of high-dose C1-INH treatment on myocardial ischemia have been reported in animal models and in man. We investigated the pharmacokinetic behavior of C1-INH in patients with acute myocardial infarction (AMI) to calculate the amount of C1-INH required for optimal efficacy.

Methods: Twenty-two patients received an intravenous loading dose followed by 48 hours of continuous infusion of C1-INH. Changes in the endogenous production of C1-INH were checked in sixteen control patients with AMI. A two-compartment model was used to estimate the Fractional Catabolic Rate (FCR), the Transcapillary Escape Rate (TER) and the Extravascular Return Rate (ERR) constants of C1-INH. Software that was specially designed for solving a system of dynamic

differential and algebraic equations was used to fit the experimental data against the three-parameter model.

Results: With fixed values for TER and ERR (0.014 and 0.018 h⁻¹ respectively), 20 of the 22 cases gave well-determined values for FCR, and simultaneous fitting resulted in an FCR of 0.011 ± 0.001 h⁻¹ (median ± 95% confidence interval) versus 0.025 h⁻¹ as reported in healthy controls. Simultaneous estimation of all three parameters resulted in ill-defined values of TER and ERR, but left the median value of FCR unchanged.

Conclusion: Dose calculation of C1-INH in patients treated with massive doses of C1-INH requires turnover parameters different from those found in healthy subjects, possibly due to suppression of continuous C1-INH consumption by target proteases.

60. Evaluation of a new routine hs-CRP method on the Synchron LX[®]20

S. ROTHKRANTZ-KOS¹, O. BEKERS¹, A. GUBBELS¹, M. DRENT², M.P.J. SCHMITZ¹ and M.P. van DIEIJEN-VISSER¹
Department of Clinical Chemistry, University Hospital Maastricht¹, The Netherlands, Department of Pulmonology, University Hospital Maastricht², The Netherlands

Background: High sensitivity CRP (hs-CRP) is considered as an important risk factor for coronary heart disease and introduction, as a routine laboratory parameter is obvious. To report reliable CRP results regardless of the clinical context, it is of course most practical if one CRP method is used for the complete measuring range. We report here the evaluation of a hs-CRP method for the Beckman Synchron LX[®]20 (measuring range 0.2-380 mg/l).

Methods: Routine C-reactive protein (CRP) and hs-CRP were both measured on the Beckman Synchron LX[®]20. A special measuring device Synchron LX[®]20 PRO, was implemented to allow analysis of the hs-CRP method. The hs-CRP method was compared (521 samples) with the BNA from Dade Behring and the IMMAGE from Beckman Coulter. The influ-

ence of sample turbidity, a known major problem of the present Synchron LX[®]20 CRP method, was also examined.

Results. Total imprecision (CV) remained less than 8% over the whole measuring range. In the low range (0-10 mg/l) very good agreement was found between the different hs-CRP methods based on Deming regression analysis and Bland-Altman plots, whereas in the high range (above 100 mg/l) large discrepancies between the methods were seen. The Synchron LX[®]20 PRO hs-CRP method was not influenced by sample turbidity.

Conclusions. Based on its performance in the low range, the Synchron LX[®]20 PRO hs-CRP method appears suitable for cardiovascular risk stratification. However, to allow the use of one CRP method for the complete measuring range, standardisation should be improved, especially in the high range.

61. Determination of the antioxidant capacity of polyphenols in red wine

A. HUISMAN¹, A. van de WIEL², E.S.G. STROES³ and E.E. van FAASSEN⁴
University Medical Center, Department of Clinical Chemistry¹, Utrecht, The Netherlands, Eemland Hospital, Department of Internal Medicine², Amersfoort, The Netherlands, Academic Medical Center, Department of Internal Medicine³, Amsterdam, The Netherlands, Debye Institute, section Interface Physics⁴, Utrecht University, The Netherlands

Introduction: Epidemiological studies have shown that moderate intake of red wine reduces the risk of coronary heart disease. It has been proposed that the antithrombotic effects are due to the antioxidant effect of polyphenols and ethanol. We have determined the reaction rates of superoxide with four different polyphenols and ethanol.

Methods: The superoxide reaction rates were determined at 37°C and pH 7.4 using competitive spin trapping and Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy.

Results and discussion: Ethanol did not scavenge superoxide. For the polyphenols we do find significant superoxide scavenging. For Catechine, Epicatechine, Gallic Acid and Quercetine we find rate constants of respectively 2.3 10⁴, 2.2 10⁴, 2.3 10³ and 1.7 10⁴ (M.s.)⁻¹. In order to estimate the capacity of

the polyphenols to exert an antioxidant effect in vivo, it is necessary to see them in perspective of their respective plasma concentrations and a known antioxidant, e.g. vitamin C. The plasma concentration of the polyphenols is reported to be in the low nM range. In comparison: Vitamin C has a rate constant of 2.7 10⁵ (M.s.)⁻¹ and a plasma concentration of approximately 10 - 100 µmol/l. Therefore, the in vivo antioxidant effect of red wine polyphenols and ethanol is negligible in comparison to vitamin C.

Conclusions: At concentrations found in vivo, the antioxidant effect of red wine polyphenols and ethanol is negligible. The antiatherogenic effects must be caused by a mechanism other than direct scavenging of superoxide.

Interne geneeskunde

62. Het beloop van lipopolysaccharide-binding protein (LBP) concentraties bij patiënten met septische shock en multitrauma

A. BEISHUIZEN en I. VERMES

Afdeling Klinische Chemie en Intensive Care, Medisch Spectrum Twente, Enschede.

Inleiding: Bacterieel endotoxine (LPS) is de primaire trigger van gram-negatieve septische shock en leidt tot een systemische ontstekingsreactie. Circulerend LPS wordt gebonden door LBP, dat de binding van LPS aan de belangrijkste cellulaire receptor, het CD14-molecuul faciliteert. De binding van LPS-LBP aan CD14 leidt tot de productie van cytokines door monocytten. De klinische betekenis van LBP bij ernstig zieke patiënten is nog onduidelijk.

Methode: Gedurende 14 dagen of tot overlijden werden bij 32 patiënten met septische shock, 8 met multitrauma en 41 controles dagelijks LBP-concentraties gemeten, tesamen met TNF-alfa, IL-6, cortisol, ACTH, procalcitonine, CRP, bloedbeeld en klinische parameters zoals hemodynamica, koorts/infectie, ziekte-ernst en sterfte.

Resultaten: Patiënten met septische shock hadden sterk verhoogde LBP-spiegels ($41,7 \pm 17,6$ mg/l) versus multitrauma ($9,1 \pm 4,1$ mg/l) en controles ($7,2 \pm 4,2$ mg/l). Survivors van sepsis hadden hogere LBP-concentraties dan nonsurvivors ($46,3$ vs. $32,1$; $p < 0,01$). Het tijdsbeloop van LBP toonde een geleidelijk dalend patroon bij vrijwel alle patiënten met septische shock. Er was geen duidelijke correlatie van LBP met klinische parameters, zoals koorts, ARDS, nierfalen en ander orgaanfalen. LBP correleerde significant met andere markers van de acute fase respons zoals CRP en procalcitonine. Geen relatie werd gevonden met cortisol, ACTH, IL-6 en TNF-alfa. **Conclusie:** De LBP-spiegel lijkt een prognostische marker voornamelijk tijdens de acute fase van de sepsis.

63. Procalcitonin as a marker of sepsis and septic shock

A.M.J. BUITING¹, I. AHMED², L. TE VELDE² and W. van GELDER¹

Albert Schweitzer Hospital, Dordrecht, Depts. of Clinical Chemistry¹ and Intensive Care Medicine², The Netherlands

Introduction: It has previously been found, that serum Procalcitonin (PCT) levels are high in patients with a systemic response to severe infection. PCT is usually not detectable or slightly elevated in healthy controls and patients with non-septic inflammatory diseases or localized infections.

Methods: Before introducing the PCT assay in our hospital we studied its clinical usefulness. In a pilot study, 17 consecutively admitted patients were included in three groups: (i) 5 patients with pneumonia but without shock, (ii) 4 patients with an intestinal perforation without shock and (iii) 8 patients with septic shock according to the American College of Chest Physicians (ACCP) guidelines. Daily blood samples were taken for cultures, measurements of PCT using the LUMI-test (Brahms diagnostica), CRP, Lactate, Hb, total trombocyte and leucocyte count (+ differentiation).

Results: In all groups there was a fluctuation in the PCT results ((i): mean 1,4 ng/ml, sem 0,3 ng/ml; (ii): mean 11,6 ng/ml, sem 2,6 ng/ml; (iii): mean 110,8 ng/ml, sem 17,5 ng/ml). In groups (i) and (ii) three patients were identified with PCT-levels (6,8 ng/ml in group (i) and 68,8 ng/ml and 11,5 ng/ml in group (ii)) above the reference interval (<4 ng/ml, based on literature). Using the ACCP-criteria for septic shock these patients could not be classified in the group of septic shock. In group (iii) one patient was found to have low PCT-levels in the presence of a septic shock.

Conclusion: in this mixed group of patients we found high mean PCT levels (110,8 ng/ml) during septic shock. During admission however PCT levels could not reliably discriminate between SIRS, sepsis or septic shock.

64. Tetrahydrobiopterin reduces inflammatory effects in early rejection of renal allografts: modulation of inducible nitric oxide synthase

A. HUISMAN¹, I. VOS², E.E. van FAASSEN³, J.A. JOLES², H.J. GROENE⁴, P. MARTASEK⁵, A.J. van ZONNEVELD⁶, A.F. VANIN⁷ and T.J. RABELINK⁶

University Medical Center, Department of Clinical Chemistry¹, Utrecht, The Netherlands, University Medical Center, Department of Nephrology and Hypertension², Utrecht, The Netherlands, Debye Institute, section Interface Physics³, Utrecht University, The Netherlands, German Cancer Institute, Department of Cellular and Molecular Pathology⁴, Heidelberg, Germany, Charles University, Faculty of Medicine F⁵, Department of Pediatrics, Prague, Czech Republic, University Medical Center, Department of Vascular Medicine⁶, Utrecht, The Netherlands, Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences⁷, Moscow, Russia

Introduction: Oxidative stress contributes to the development of early transplant failure. As nitric oxide synthases (NOS) can act as sources of superoxide (O_2^-) we investigated the effects of the NOS cofactor tetrahydrobiopterin (BH_4) on oxyradical production and early rejection in a rat kidney transplantation model.

Methods: O_2^- activity (lucigenin enhanced chemiluminescence), NO production (Fe-(DETC)₂ spintrap) and monocyte (ED-1⁺) influx in vessel walls were measured in the graft 24h after syngenic (Lewis x Lewis) and allogenic (BrownNorway x Lewis) transplantation. We subsequently tested whether O_2^- activity could be decreased and NO production increased by the BH_4 precursor sepiapterin (3 mg/kg). We also investigated the effects of BH_4 on production of O_2^- and NO by BH_4 free inducible NOS (iNOS).

Results and discussion: Allograft transplantation showed higher renal O_2^- levels and monocyte infiltration when compared to isografts. Administration of sepiapterin had no effect on O_2^- levels in the isografts (51 ± 10 vs. 69 ± 17 cps/10 mg protein) but led to a marked decrease in O_2^- levels in the allografts (116 ± 11 vs. 60 ± 6 cps/10 mg protein; $P < 0.05$) and was accompanied by a reduction in periarterial macrophage infiltration (3.3 ± 0.7 vs. 1.3 ± 0.3 cells/vessel; $P < 0.05$) and an increase in NO levels (78 ± 22 vs. 173 ± 12 AU/g kidney) ($P < 0.01$). *In vitro* experiments confirm that iNOS can produce O_2^- while BH_4 administration can reverse this O_2^- production in presence of adequate anti-oxidant defense.

Conclusion: BH_4 can be used to modulate the function of the inflammatory iNOS isoform and suggests a potential therapeutic role for sepiapterin in early allograft rejection.

65. Effects of GnRHa treatment on the local estrogen milieu in myometrium and leiomyoma tissue

J. van de VEN^{1,2}, M. SPRONG¹, G.H. DONKER¹, T.M. van HIMBERGEN¹, M.A. BLANKENSTEIN^{1,3} and J.H.H. THIJSSSEN^{1,2}

Dept. of Endocrinology¹, University Medical Center, Utrecht, The Netherlands. Dept. of Biomedical Analysis², Faculty of Pharmacy, Utrecht University, Dept. of Clinical Chemistry³, VU University Medical Center, Amsterdam

Introduction: GnRH agonists are used in the treatment of uterine leiomyoma (LM) as they induce partial shrinkage of LM and normal myometrium (MM). This study was designed to investigate effects of GnRHa on the local estrogen milieu in LM and MM.

Methods: Multicenter clinical study in which 34 patients were randomized to receive either GnRHa (triptorelin or goserelin) or no GnRHa for 4 months. LM and MM (collected at surgery) were assayed for estrogen- and progesterone- receptor (ER, PR) levels by LBA, for tissue estrogens by RIA, and for estrone sulfatase and aromatase activity by radiometric methods. Aromatase was measured in LM obtained in a separate study. Results were tested non-parametrically and, if appropriate, paired.

Results and discussion: In MM, levels of estrone, estradiol and sulfatase activities were significantly lower in the treated group (to median values of 46%, 21% and 61%, respectively).

In LM of treated patients, the reduction in median estrone level (to 65% of untreated value) was comparable to that in MM. The reduction in estradiol level in LM, however, was significantly less ($p < 0.01$) than in MM (median to 58% vs. 21%) and no significantly lower sulfatase activity was found. Aromatase activity was detectable in LM and not significantly different in GnRHa treated patients. GnRHa significantly increased ER in both MM and LM but the increase was significantly higher in LM than in MM (5 vs. 2.5 fold, $p < 0.001$). PR was significantly lower in MM (2.3 fold) but not in LM and also this difference was significant ($p < 0.05$).

Conclusion: The effects of GnRHa treatment differ between LM and MM, suggesting a continuing estrogenic stimulus in LM despite treatment. Aromatase likely is the estrogen source and GnRHa might be more effective when combined with aromatase inhibition.

66. Maternal *trans* fatty acid intake may negatively affect fetal LCP status

D.A.J. DIJCK-BROUWER¹, T. DECSI², G. BOEHM³, H.M. TJOONK⁴, S. MOLNÁR², M. HADDERS-ALGRA⁵, I.A. MARTINI⁶, F.A.J. MUSKIET¹ and E.R. BOERSMA⁴

Pathology and Laboratory Medicine, Groningen University Hospital¹; Pediatrics, University of Pécs, Hungary²; NUMICO Research, Friedrichsdorf, Germany³; Perinatal Nutrition & Development Unit, Pediatrics/Obstetrics, Groningen University⁴; Neurology, Groningen University⁵; Laboratory Center, Groningen University Hospital⁶

Introduction: *Trans* fatty acids derive mainly from industrial hydrogenation of unsaturated oils and fats. *Trans* fatty acids in human tissues are considered to derive exclusively from the diet. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCP) are structural components and eicosanoid precursors. LCP play an important role in fetal growth and development. *Trans* fatty acids and LCP correlate inversely in plasma lipids of preterm infants and children aged 1-15 years, as well as in venous cord blood lipids of term infants with an atopic trait. We investigated the relation between the sum of 18-carbon *trans* fatty acids (Σ C18 *trans*) and LCP in umbilical arteries (UA) and veins (UV) of Dutch infants.

Methods: Fatty acid compositions of UA and UV of 308 healthy full-term infants (gestational age: 39.7 ± 1.2 weeks,

birth weight: 3528 ± 429 g; mean \pm SD) were determined by capillary gas chromatography. Non-parametric correlation analyses were performed with SPSS.

Results: The median (interquartile range) of Σ C18 *trans* was 0.22 (0.13) g% in UA and 0.16 (0.10) g% in UV. There were significant inverse correlations between Σ C18 *trans* and arachidonic acid (UA: $r = -0.38$, $P < 0.01$; UV: $r = -0.20$, $P < 0.01$), and Σ C18 *trans* and docosahexaenoic acid (UA: $r = -0.36$, $P < 0.01$; UV: $r = -0.17$, $P < 0.01$). Σ C18 *trans* correlated positively with Mead acid (an indicator of essential fatty acid deficiency) in both UA ($r = +0.35$, $P < 0.01$) and UV ($r = +0.31$, $P < 0.01$).

Conclusion: Maternal *trans* fatty acid intake may negatively affect fetal LCP status.

67. Is S-100b expression only mediated by nervous tissue in newborns?

W.B.M. GERRITSEN¹, J.W. WIRDS², N. BLÜMER², J.A.A.M. van DIEMEN-STEENVOORDE³, J.H. SCHAGEN van LEEUWEN⁴, J.A. LEUSINK², F.J.L.M. HAAS¹

Departments of the Clinical Laboratory¹, Anaesthesiology², Gynecology and Obstetrics³, Pediatrics⁴ St. Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands

Introduction: A biochemical marker for actual brain damage is the S-100 protein especially the S-100a and S-100b proteins. In an early study we measured S-100 protein levels in arterial and venous umbilical blood of healthy newborns.

The primary aim of this study was to detect the origin of the S-100b protein besides the glial cells of the central nervous system especially the placenta and the umbilical cord. The second purpose of the study was to determine whether the S-100 levels in umbilical blood are related to the mode of delivery, normal delivery or birth by caesarian section.

Methods: 29 newborns and their mothers, 14 births by caesarian section and 15 by normal delivery, were included in the study.

S-100b protein content was measured in arterial and venous umbilical blood. Coupes of placenta and umbilical cord were studied by immunohistochemical staining.

Results: The results show that S-100 can be determined in umbilical artery and vein blood as well in maternal venous blood. Immunohistochemical analysis of the placenta as well as the umbilical cord showed negative results for S-100b protein.

Conclusion: The S-100b protein had to come from tissue in newborns as a result of the high concentrations S-100b protein found in umbilical artery blood. The low S-100 levels in the maternal blood can be possible explained as a washout effect of the umbilical artery in the placenta.

68. Neurological optimality at birth. Negative associations with *trans* fatty acids and linoleic acid and positive associations with parameters of essential fatty acid and docosahexaenoic acid status in umbilical arteries and veins

D.A.J. DIJCK-BROUWER¹, H.M. TJOONK², J. WILDEMAN², T. DECSI³, M. HADDERS-ALGRA⁴, I.A. MARTIN⁵, E.R. BOERSMA² and F.A.J. MUSKIET¹

Pathology and Laboratory Medicine, Groningen University Hospital¹; Perinatal Nutrition & Development, Pediatrics/Obstetrics, Groningen University²; Pediatrics, University of Pécs, Hungary³; Neurology, Groningen University⁴; Laboratory Center, Groningen University Hospital⁵

Introduction: Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCP), notably arachidonic (20:4 ω 6; from linoleic acid, 18:2 ω 6) and docosahexaenoic (22:6 ω 3) acids, are abundant in brain. The fetus and newborn have high LCP requirements, because of rapid (brain) development. *Trans* fatty acids derive mainly from industrial hydrogenation of unsaturated oils and fats. They are negatively associated with LCP status. We investigated the relation between fatty acid status parameters of umbilical arteries (UA) and veins (UV) and neurological condition of the newborn. Mead acid (20:3 ω 9; parameter of essential fatty acid (EFA) deficiency), EFA sufficiency index [EFAs; (ω 3+ ω 6)/(ω 7+ ω 9)] and DHA sufficiency index (DHAs; 22:6 ω 3/22:5 ω 6) served as parameters of EFA and LCP status.

Methods: Fatty acid compositions of UA and UV of 310 healthy full-term infants (gestational age: 39.7 \pm 1.2 weeks,

birth weight: 3520 \pm 429 g; mean \pm SD) were determined by capillary gas chromatography. Neurological condition was measured as the 'neurological optimality score' (NOS) and was determined at postnatal day 10-14. SPSS was used for non-parametric univariate correlation analyses and the construction of a multivariate linear regression model.

Results: NOS correlated positively with 20:4 ω 6 (UV), DHAs (UV and UA) and EFAs (UV), and negatively with 18:2 ω 6 (UV), sum of 18-carbon *trans* fatty acids (Σ C18 *trans*; UV and UA) and 20:3 ω 9 (UV and UA). LC ω 3+LC ω 6 (UV and UA), LCSAFA, EFAs, 18:2 ω 6 and DHAs (UV), and Σ C18 *trans* (in UA) explained 21.5 % of the variance of NOS.

Conclusion: Our data suggest that the neurological condition of the newborn is positively influenced by fetal LCP status, and negatively with linoleic and *trans* fatty acids.

69. S-100 content in arterial and venous umbilical cord blood in newborns

W.B.M. GERRITSEN¹, J.W. WIRDS², E. PREIJER², J.A.A.M. van DIEMEN-STEENVOORDE³, J.H. SCHAGEN van LEEUWEN⁴, J.A. LEUSINK², F.J.L.M. HAAS¹

Departments of the Clinical Laboratory¹, Anaesthesiology², Gynecology and Obstetrics³, Pediatrics⁴ St. Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands

Introduction: It is important to be able to detect, predict and monitor the development of damage to the brain in neonatal asphyxia. A possible marker for brain damage is the S-100 group of proteins especially the S-100a and S-100b proteins. In adults, cerebrospinal fluid (CSF) S-100 concentrations reflect the severity of tissue damage in patients suffering from intracerebral haematoma, subarachnoid hemorrhage and head injury.

The primary aim of this study was to measure S-100 protein content in umbilical artery or vein blood of newborns. The second purpose of the study was to determine whether the S-100 level in umbilical blood is related to the mode of delivery.

Methods: 81 newborns were included in the study over a period of five months. Informed consent was obtained from the

parents of the subjects. The ethical committee of our hospital approved the study protocol. Newborns with signs of asphyxia (pH < 7.0, an APGAR score < 4 and an abnormal heart rate 5 minutes after birth) or infection were excluded. These subgroups were selected according to the mode of delivery.

Results: The results show that S-100 can be determined in umbilical artery as well as in vein blood. There is a significant difference in cord blood S-100 content between selected subgroups. S-100 protein levels are higher in normal delivery compared to birth by caesarian section.

Conclusion: Despite different S-100 protein content, according to the mode of delivery, more extensive research and follow-up is necessary to determine what the clinical consequences are of these findings for the newborns.

70. FSH in urine gemeten tijdens een complete menstruele cyclus is sterk gecorreleerd met FSH in urine op cyclusdag 3 en met de leeftijd

G.J.E. OOSTERHUIS², I. VERMES¹, H.W.B. MICHGELSEN¹, C.B. LAMBALK²

Medisch Spectrum Twente, Enschede¹. Vrije Universiteit Medisch Centrum, Amsterdam²

Inleiding: Teneinde de ovariële reserve of de postmenopauze te bepalen wordt follikel stimulerend hormoon (FSH) gemeten. In het verleden hebben we een methode beschreven om FSH in ongeëxtraheerde urine te meten. Deze studie is opgezet om het verloop van FSH in urine gedurende de menstruele cyclus te bepalen.

Methoden: Bij 14 regelmatig menstruerende vrouwen tussen de 23 en 39 jaar is gedurende een menstruele cyclus dagelijks een urinemonster afgenomen om FSH in te bepalen m.b.v een AxSYM immuno-assay-analyser. De gemiddelde FSH-spiegel gedurende de gehele cyclus werd gezien als de gouden standaard voor FSH-niveau.

Resultaten: Bij iedere vrouw correleerde de gemiddelde FSH-spiegel gedurende de gehele cyclus significant met de FSH-

spiegel op cyclusdag 3 ($r = 0,75$, $p = 0,002$), met de FSH-spiegel 9 dagen voor de pre-ovulatoire FSH-piek ($r = 0,87$, $p = 0,0001$), en met de hoogste waarde gedurende de folliculaire fase van de cyclus ($r = 0,91$, $p = 0,0001$). Leeftijd correleerde significant met de gemiddelde FSH-spiegel over de gehele cyclus ($r = 0,67$, $p = 0,009$), met de hoogste FSH-waarde in de folliculaire fase van de cyclus ($r = 0,60$, $p = 0,024$), FSH op cyclusdag 3 ($r = 0,80$, $p = 0,0006$), en FSH 9 dagen voor de pre-ovulatoire FSH-piek ($r = 0,65$, $p = 0,0016$).

Conclusie: FSH gemeten in urine op cyclusdag 3 is een goede weergave van het gemiddelde FSH gedurende de complete menstruele cyclus en er is een sterke correlatie tussen FSH gemeten in urine en leeftijd.

71. FSH in ongeëxtraheerde urine is een maat voor ovariële reserve bij IVF-patiënten

G.J.E. OOSTERHUIS², I. VERMES¹, H.W.B. MICHGELSEN¹ C.B. LAMBALK²
Medisch Spectrum Twente, Enschede¹; Vrije Universiteit Medisch Centrum, Amsterdam²

Inleiding: Follikel stimulerend hormoon (FSH) wordt gemeten in serum bij patiënten die in aanmerking komen voor in vitro fertilisatie (IVF) teneinde de kans op succes van de behandeling in te schatten. In het verleden hebben wij een methode beschreven voor het meten van FSH in ongeëxtraheerde urine. In deze studie hebben we FSH gemeten in urine bij 104 vrouwen voorafgaand aan een IVF-behandeling.

Methoden: Bij 104 patiënten die in aanmerking kwamen voor een IVF-behandeling, is op de derde cyclusdag in de laatste normale menstruele cyclus voorafgaand aan de IVF-behandeling, FSH gemeten in ongeëxtraheerde urine m.b.v. een AXSYM immunoassay analyser.

Resultaten: De gemiddelde FSH-spiegel op cyclusdag 3 was

$1,15 \pm 0,58$ IU/mol kreatinine. Gemiddeld werden $9,8 \pm 6,4$ follikels gevonden, en $7,1 \pm 4,7$ oöcyten werden gevonden per patiënt. Zwanger werden 32 patiënten (31%) en 24 hadden een doorgaande zwangerschap > 12 weken amenorrhoe of de geboorte van een levend kind. FSH gemeten in urine op cyclusdag 3 correleerde significant met het aantal follikels ($r = -0,23$, $p = 0,02$) en met het aantal oöcyten ($r = -0,22$, $p = 0,024$). FSH correleerde ook niet met het optreden van zwangerschap.

Conclusie: FSH gemeten in ongeëxtraheerde urine op cyclusdag 3 in een praktische klinische situatie correleert significant met de belangrijkste parameters van ovariële reserve bij een IVF-behandeling. Urinair FSH is een non-invasieve maat voor ovariële reserve bij een IVF-populatie.

Stoornissen in het intermediair metabolisme

72. Genetic heterogeneity within Refsum Disease: Discovery of its underlying basis through the identification of mutations in the PEX7 gene which is also mutated in Rhizomelic Chondrodysplasia Punctata Type I

D.M. van den BRINK¹, H.R. WATERHAM¹, E. HOOGENHOUT¹, G.A. JANSEN¹, P.A.W. MOOIJER¹, F.B. GIBBERD², M.D. FEHER², A.S. WIERZBICKI³, O. KJELDAHL⁴ and R.J.A. WANDERS¹

University of Amsterdam, Academic Medical Centre, Depts. Clinical Chemistry and Pediatrics¹, Emma Children's Hospital, Amsterdam, The Netherlands, Chelsea and Westminster², 3St. Thomas Hospital, London, UK and 4Barnekliviken Riskhospitalet, Oslo, Norway

Introduction: The identification of the enzyme defect in classic Refsum disease (CRD) in 1997 by our group soon followed by cloning of the phytanoyl-CoA hydroxylase cDNA and resolution of its genomic structure, allowed studies on the molecular basis of CRD. These studies revealed that most but not all patients with CRD carry mutations in the PhyH gene suggesting genetic heterogeneity. Further proof came from gene mapping studies pointing to a second locus. We have now studied these patients in detail using a combined approach involving enzymatic, cell-biological and genetic studies.

Methods: Fibroblasts from control subjects and Refsum patients in which no mutations were identified in the PhyH gene, were grown followed by measurement of a variety of peroxi-

somal enzymes. Furthermore, DNA was prepared followed by genomic analysis of the PEX7 gene.

Results and discussion: Studies in fibroblasts of these patients revealed a series of peroxisomal abnormalities which closely resembled those observed in RCDP Type 1 patients in which the PEX7 gene coding for the PTS2 receptor is mutated although the abnormalities observed were less severe. Subsequent molecular studies have now shown distinct mutations in the PEX7 gene in this subgroup of Refsum patients thus resolving the genetic heterogeneity of Refsum disease.

Conclusion: Our findings described in this poster, have resolved the enigma of genetic heterogeneity in Refsum disease by the identification of mutations in the PEX7 gene.

73. Novel mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene interpreted in a three-dimensional framework

A.B.P. van KUILENBURG¹, D. DOBRITZSCH², R. MEINSMA¹, J. HAASJES¹, H.R. WATERHAM¹, Y. LINDQVIST² and A. H. van GENNIP¹

¹Academic Medical Center, University of Amsterdam, Emma Children's Hospital and Department of Clinical Chemistry, PO Box 22700, 1100 DE Amsterdam, The Netherlands. ²Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

Introduction: Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency is an autosomal recessive disease characterized by thymine-uraciluria in homozygous deficient patients. Cancer patients with a partial deficiency of DPD are at risk from developing severe life-threatening toxicities after administration of 5-fluorouracil. Thus, identification of novel disease-causing mutations is of utmost importance to allow screening of patients at risk.

Materials and Methods: PCR amplification and sequencing of all 23 coding exons of the DPYD gene and flanking intronic regions was carried out using the primer sets, as described before (1).

Results and Discussion: In 8 patients presenting with a complete DPD deficiency, a considerable variation in the clinical presentation was noted. Whereas motor retardation was observed in all patients, no patients presented with convulsive disorders. In this group of patients, 9 novel mutations were identified including 1 deletion of two nucleotides [1039-1042delTG] and 8 missense mutations. Analysis of the crystal

structure of pig DPD showed that five out of eight amino acid exchanges present in these patients with a complete DPD deficiency, P86L, S201R, S492L, D949V and H978R, interfered directly or indirectly with cofactor binding or electron transport. Furthermore, the mutations I560S and Y211C most likely destabilized the DPD protein. Only the effect of the I370V and a previously identified C29R mutation could not be easily explained by analysis of the three dimensional structure of the DPD enzyme, suggesting that at least the latter might be a common polymorphism.

Conclusion: The identification of novel disease-causing mutations in patients with a DPD deficiency will not only augment our knowledge about structure-function relationships, but also provide an important and reliable tool for carrier detection of patients at risk.

Literature

1. Van Kuilenburg, ABP, et al. Clin Cancer Res. 2000; 6: 4705-4712.

74. Rapid diagnosis of mitochondrial fatty acid oxidation disorders using a combined approach involving acylcarnitine analysis followed by enzyme activity measurements in lymphocytes

R.J.A. WANDERS, J.P.N. RUITER and L. IJLST

Academic Medical Center, University of Amsterdam, Laboratory Genetic Metabolic Diseases, Departments of Pediatrics/Emma Children's Hospital and Clinical Chemistry, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Human diseases caused by a defect in mitochondrial fatty acid beta-oxidation represent an expanding group of genetic diseases with severe clinical consequences if not identified in time. Acylcarnitine analysis by tandem-MS has turned out to be extremely important for the detection of fatty acid beta-oxidation (FAO) deficient patients. The purpose of this study was to develop specific enzymatic methods to identify the precise defect in patients in whom a FAO-disorder is suspected based on an abnormal acylcarnitine profile.

Methods: Spectrophotometric and radiometric methods were used for the quantitative determination of the various mitochondrial beta-oxidation enzymes in isolated lymphocytes.

Results and discussion: Studies in control lymphocytes have shown that all mitochondrial beta-oxidation enzymes includ-

ing carnitine palmitoyltransferase (CPT) 1 and 2, carnitine/acylcarnitine translocase (CACT), short-(SCAD), medium-(MCAD) and very-long-chain (VLCAD) acyl-CoA dehydrogenase, short- and long-chain enoyl-CoA hydratase as well as short-(SCHAD) and long-(LCHAD)-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and thiolase are expressed in lymphocytes. Studies in lymphocytes from patients with established defects in each of the individual enzymes, have shown the feasibility of using lymphocytes for the identification of the enzyme defect in patients.

Conclusion: Our studies show that patients with a presumed defect in fatty acid oxidation can be identified rapidly through studies in lymphocytes.

75. Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil. Frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency

A.B.P. van KUILENBURG¹, E.K.W. MULLER², J. HAASJES¹, R. MEINSMA¹, L. ZOETEKOUW¹, H. R. WATERHAM¹, F. BAAS¹, D. J. RICHEL¹ and A. H. van GENNIP¹

Academic Medical Center¹, University of Amsterdam, Emma Children's Hospital and Department of Clinical Chemistry, PO Box 22700, 1100 DE Amsterdam, The Netherlands. Slingeland ziekenhuis², Kruisbergseweg 25, 7009 BL Doetinchem, The Netherlands

Introduction: Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) is the initial and rate-limiting enzyme in the catabolism of 5-fluorouracil (5FU) and it is suggested that patients with a partial deficiency of this enzyme are at risk from developing a severe 5FU associated toxicity. In this study, we demonstrated that a lethal toxicity following a treatment with 5FU was due to a complete deficiency of DPD.

Materials and Methods: The activity of DPD in peripheral blood mononuclear (PBM) cells was determined with a radiochemical assay using [4-¹⁴C]thymine. Screening for the IVS14+1G>A mutation was performed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of exon 14.

Results and discussion: The patient received palliative chemotherapy consisting of 5FU (900 mg) and leucovorin (200 mg). After 5 days following the first treatment, the patient developed stomatitis. Six days after the second injection with 5FU the patient developed a severe pancytopenia.

Despite intensive medical care, the patient died 8 days later due to infectious complications. Analysis of the DPD gene for the presence of mutations, showed that the patient was homozygous for a G to A mutation in the invariant GT splice donor site, flanking exon 14 [IVS14+1G>A]. As a consequence, no significant residual activity of DPD was detected in peripheral blood mononuclear cells. To determine the frequency of the IVS14+1G>A mutation in the Dutch population, we developed a novel PCR-based method, allowing the rapid analysis of the IVS14+1G>A mutation by RFLP. Screening for the presence of this mutation in 1357 Caucasians showed an allele frequency of 0.91 %.

Conclusion: In our view, the apparently high prevalence of the IVS14+1G>A mutation in the normal population, with 1.8 % heterozygotes, warrants genetic screening for the presence of this mutation in cancer patients prior to the administration of 5FU.

76. Mutation analysis and an internet accessible database for X-linked adrenoleukodystrophy

S. KEMP¹, H.R. WATERHAM¹, G. CUTTING², G.V. RAYMOND³, R.J.A. WANDERS¹ and H.W. MOSER³

Academic Medical Center, Emma Children's Hospital, Amsterdam, The Netherlands, Institute of Genetic Medicine¹, Johns Hopkins University² and Kennedy Krieger Institute³, Baltimore, USA

Introduction: X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD), one of the most frequent peroxisomal disorders is characterized by a striking and unpredictable variation in phenotypic expression and caused by mutations in the ABCD1 gene which encodes the peroxisomal membrane-located ATP-binding cassette transporter (ALDP). It is not possible to predict the clinical course of an asymptomatic patient. In July 1999, the Peroxisomal Diseases Laboratory at the Kennedy Krieger Institute, and the Genetic Metabolic Diseases Laboratory at the Academic Medical Center initiated the construction of a mutation database for X-ALD. Some of the primary aims of the database were to facilitate X-ALD mutation analysis, collect mutations in the ABCD1 gene, improve analysis of X-ALD mutations, and make this information readily accessible and provide an easy way for reporting new X-ALD mutations and polymorphisms. The first release of the database was in November

1999 and its original format primarily contained tables with mutations.

Results and discussion: During the last year, the database has been expanded and it now also includes sections focussed on the ABCD1 gene and ALDP, as well as background information for laymen regarding X-ALD biochemistry and diagnosis. The database is freely available through the world wide web, at <http://www.x-ald.nl> Between september 2000 and April 2001, there have been over 12,000 page visits with an average of 400 per week, from more than 70 countries world wide. We present 93 new mutations and a detailed analysis of the 390 X-ALD mutations that are currently in the database.

Conclusion: The release of a database specifically devoted to X-linked ALD has turned out to be very important not only for clinicians and scientists in the field but also for patients and their families.

77. Functional SCAD deficiency in a patient and his mother both with ethylmalonic aciduria

M. DURAN¹, H.D. BAKKER², T. YILMAZER², P.D. MAASWINKEL-MOOY³, W. ONKENHOUT³, H.R. WATERHAM¹ and R.J.A. WANDERS¹

Academic Medical Center, Univ. of Amsterdam, Dept of Clinical Chemistry¹, and Depts of Pediatrics², Emma Children's Hospital, ³Dept of Pediatrics, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

Introduction: Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (SCAD) affects the terminal part of the mitochondrial fatty acid beta-oxidation pathway. It results in the accumulation of butyryl-CoA, which is converted by propionyl-CoA carboxylase to ethylmalonate (urine) and by carnitine acetyltransferase to butyrylcarnitine (plasma). There is a high frequency of two polymorphisms, but also numerous inactivating mutations occur (Corydon et al. - *Pediatr. Res.* 49:2001; 18-23). All reported patients had severe clinical symptoms including psychomotor retardation, hypotonia, and/or ketotic hypoglycemia. **Methods:** A 7-year-old boy (fourth child of healthy parents) with hypotonia, psychomotor retardation, and convulsions was studied. Urine organic acids were analyzed by GC/MS of the trimethylsilyl esters, and plasma acylcarnitines by electrospray tandem MS of the butyl esters. The SCAD gene was sequenced by standard techniques.

Results and discussion: Urine ethylmalonate was increased (160 mmol/mol creatinine, controls <18) as was plasma butyrylcarnitine (1.25 micromol/l, controls <0.58). His mother's urine ethylmalonate was 19 mmol/mol creat, her plasma butyrylcarnitine was 0.64 and 1.0 micromol/l on two occasions. Both mother and child carried the same mutations, i.e. homozygous for the polymorphism 625 G>A and heterozygous for the inactivating mutation 136 C>T. The father was heterozygous 625 G>A. A fasting test in the boy led to ketotic hypoglycemia. **Conclusion:** The severity of the clinical symptoms of SCAD does not solely depend on the type of mutations: additional contributing factors (environmental?) must exist. Family investigations are needed for establishing the genotype / phenotype relationship. Even minimal biochemical changes - exemplified by the mother - may be associated with distinct genetic abnormalities. SCAD may be benign in a number of cases.

78. Progressive neonatal sepsis: CPS deficiency

N.G.G.M. ABELING¹, H.D. BAKKER², P.G. VALERIO², B. WERMUTH³ and R.J.A. WANDERS¹

Academic Medical Center, University of Amsterdam, Laboratory Genetic Metabolic Diseases¹, Depts of Clinical Chemistry¹ and Pediatrics/Emma Children's Hospital^{1,2}, PO Box 22700, 1100 DE Amsterdam, The Netherlands, Dept of Clinical Chemistry³, University of Bern, Switzerland

Introduction: After an uncomplicated pregnancy a full term neonate was born with a birth weight of 2895 g and with a good start. 48 hours post partum he was admitted because of moaning, fever and ill and irritable impression. A late onset neonatal infection was suspected. He had an increasing respiratory insufficiency and became convulsive. In the following days he deteriorated rapidly and became more and more hypotonic and unresponsive. Blood and CSF cultures remained negative. A cerebral ultrasound showed cerebral edema with small ventricles and flattening of the cerebral gyri and an intracranial haemorrhage. Laboratory investigation: ASAT 393 U/l (ref < 35), ALAT 113 (ref < 35) and NH₃ 4352 (ref < 60). Metabolic investigation: strongly elevated plasma glutamine, alanine and glycine, but decreased citrulline; in urine no orotic acid detectable. These findings are suggestive for a carbamoyl

phosphate synthetase deficiency (CPS) or a N-cetylglutamate synthetase deficiency (NAGS). Six days post partum the child died in a severe physical and neurological state. Post mortem a liver biopsy was taken.

Methods: standard chromatographic and spectrophotometric techniques were used for the metabolite and enzyme analyses.

Results and discussion: In the liver biopsy a normal NAGS activity was measured, while CPS activity was undetectable, confirming the diagnosis of CPS deficiency, in agreement with the metabolite patterns in plasma and urine. The clinical presentation is also typical for a neonatal urea cycle defect.

Conclusion: This case illustrates the importance of awareness of the possibility that a metabolic disorder can underly a condition mimicking a neonatal infection.

79. Identification of pristanal dehydrogenase activity in peroxisomes: conclusive evidence that the complete phytanic acid alpha-oxidation pathway is peroxisomal

G.A. JANSEN¹, D.M. van den BRINK¹, R. OFMAN¹, O. DRAGHICI¹, G. DACREMONT² and R.J.A. WANDERS^{1,3}

Academic Medical Center, University of Amsterdam, ¹Laboratory Genetic Metabolic Diseases, ³Department of Pediatrics/Emma Children's Hospital and Clinical Chemistry, Amsterdam, The Netherlands, and ²University of Ghent, Belgium

Introduction: Phytanic acid (3,7,11,15-tetramethylhexadecanoic acid) is a branched-chain fatty acid which, due to the methyl-group at the 3-position, can not undergo beta-oxidation unless the terminal carboxyl-group is removed by alpha-oxidation. The structure of the phytanic acid alpha-oxidation machinery in terms of the reactions involved, has been resolved in recent years and includes a series of four reactions: 1) activation of phytanic acid to phytanoyl-CoA, 2) hydroxylation of phytanoyl-CoA to 2-hydroxyphytanoyl-CoA, 3) cleavage of 2-hydroxyphytanoyl-CoA to pristanal and formyl-CoA, and 4) oxidation of pristanal to pristanic acid. The subcellular localization of the enzymes involved has remained enigmatic. Indeed, the oxidation of pristanal to pristanic acid has been claimed to be catalysed by the microsomal aldehyde dehydrogenase FALDH encoded by the ALDH10 -gene. In this study we have reinvestigated the issue of the subcellular localization of pristanal dehydrogenase.

Methods: Fibroblasts from control subjects and ALDH10 deficient patients (SLS) were grown and used to study phytanic acid alpha-oxidation and pristanal dehydrogenase using standard methods.

Results and discussion: Making use of mutant fibroblasts deficient in FALDH activity, we show that phytanic acid alpha-oxidation is completely normal in these cells. Furthermore, we show that pristanal dehydrogenase activity is not fully deficient in FALDH-deficient cells, implying the existence of one or more additional aldehyde dehydrogenases reacting with pristanal. Using subcellular localization studies, we now show that peroxisomes contain pristanal dehydrogenase activity which leads us to conclude that the complete phytanic acid alpha-oxidation pathway is localized in peroxisomes.

Conclusion: Our data show that peroxisomes contain pristanal dehydrogenase activity and that peroxisomes catalyze formation of pristanic acid from phytanic acid.

80. Synthesis of carnitine in full-term newborns from exogenous ϵ -trimethyllysine as determined by a novel method using HPLC-electrospray tandem mass spectrometry

F.M. VAZ¹, B. MELEGH², J. BENE², D.A. GAGE³, A.H. BOOTSMA¹, P. VREKEN¹, A.H. van GENNIP¹, L.L. BIEBER⁴ and R.J.A. WANDERS¹

Laboratory for Genetic Metabolic Diseases¹, Departments of Clinical Chemistry and Pediatrics, Emma Children's Hospital, Academic Medical Center, University of Amsterdam, PO Box 22700, 1100 DE Amsterdam, The Netherlands. ²Clinical Genetics Working Group of Hungarian Academy of Sciences at University of Pécs, Department of Medical Genetics and Child Development, Pécs, Hungary. ³MSU-NIH Mass Spectral Facility, Michigan State University, ⁴Department of Biochemistry, 48824 East Lansing, MI, USA

Introduction: Carnitine (3-hydroxy-4-N-trimethylaminobutyrate) is a vital compound, which plays an indispensable role in the transport of activated fatty acids across the inner mitochondrial membrane into the matrix, where beta-oxidation takes place. Apart from the dietary intake of carnitine, most eukaryotes are able to synthesize this compound from epsilon-N-trimethyllysine (TML), via beta-hydroxy-epsilon-N-trimethyllysine, gamma-trimethylaminobutyraldehyde and gamma-butyrobetaine. To investigate the carnitine biosynthesis pathway and its regulation, determination of the concentration of the metabolites of this pathway in body fluids is of crucial importance. We have developed a new method which enables fast and easy determination of the concentration of the carnitine biosynthesis metabolites in urine and applied the method to the study of the de novo carnitine biosynthesis in newborns.

Methods: The method uses derivatization with methyl chloro-

formate, separation of the analytes by ion-pair high performance liquid chromatography and detection by electrospray tandem mass spectrometry. To investigate carnitine biosynthesis in newborns, we performed a five day loading test with deuterium-labeled TML on 7 newborns.

Results and discussion: We used our newly developed method to analyze the urines, before and after loading, to investigate whether newborns have the capacity to use exogenous TML as precursor for carnitine synthesis. After loading with deuterium-labeled TML, the downstream carnitine biosynthesis metabolites could be readily detected in urine.

Conclusion: We developed a sensitive assay to determine the concentration of urinary carnitine biosynthesis metabolites by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry. The results of the TML-loading study show that newborn do have a limited capacity to use exogenous TML as a precursor for carnitine synthesis.

81. Biochemical and molecular diagnosis of inherited disorders of cholesterol biosynthesis

H.R. WATERHAM¹, G.J. ROMELJN², J. KOSTER², W. OOSTHEIM², P. VREKEN¹, M. DURAN¹ and R.J.A. WANDERS^{1,2}
Lab. Genetic Metabolic Diseases, Dept. of Pediatrics¹ & Clinical Chemistry², Emma Children's Hospital, Academic Medical Center, PO Box 22700, 1100 DE Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS) is an autosomal recessive developmental disorder characterized by multiple congenital anomalies, facial dysmorphism and mental retardation. The disorder is caused by a deficient activity of 7-dehydrocholesterol reductase (7-DHCR), which converts 7-dehydrocholesterol (7-DHC) into cholesterol. Consequently, most SLOS patients have low serum cholesterol and elevated 7-DHC levels. X-linked dominant chondrodysplasia punctata (CDPX2 or Conradi-Hünermann-Happle syndrome) is a male-lethal disorder characterized by asymmetric rhizomelic shortening of limbs, ichthyosis and hyperkeratosis. CDPX2 is caused by a deficient activity of sterol delta8-delta7 isomerase, which converts cholest-8(9)-en-3beta-ol into lathosterol. Consequently, abnormal amounts of cholest-8(9)-en-3beta-ol can be detected in plasma and cultured skin fibroblasts of patients.

Methods: Post- and prenatal diagnosis of SLOS patients in our laboratory includes sterol analysis in serum and/or skin fibroblasts by GC-MS, direct measurement of 7-DHCR activity in lysates of skin fibroblasts or chorionic villi, and mutation analysis of the DHCR7 gene. Diagnosis for CDPX2 involves sterol analysis in serum and/or skin fibroblasts of patients by GC-MS and mutation analysis of the EBP gene encoding sterol delta8-delta7 isomerase.

Results and discussion: For SLOS, we so far analyzed >40 patients (post-natal), performed 6 prenatal analyses and identified 35 different mutations in the DHCR7 gene.

For CDPX2, we analyzed 11 patients both at the biochemical and the molecular level and identified 8 different mutations in the EBP gene.

82. 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase: purification of the enzyme, cloning of the cDNA and resolution of the molecular basis of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency

R. OFMAN¹, M. FEENSTRA¹, J.P.N. RUITER¹, J. ZSCHOCKE² and R.J.A. WANDERS¹
University of Amsterdam¹, Academic Medical Centre, Depts. Clinical Chemistry & Pediatrics, Emma Children's Hospital, Amsterdam, The Netherlands and Universität Kinderklinik², Heidelberg, Germany

Introduction: We recently identified a new defect in the breakdown pathway of isoleucine at the level of the enzyme 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (MHBD/SCHMAD) in a boy showing progressive infantile neurodegeneration. The normal activity of other 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenases including short-(SCHAD) and long-chain (LCHAD) 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in fibroblasts from this patient, suggested that MHBD/SCHMAD is a distinct enzyme, not identified previously. This study was aimed to purify the enzyme, clone the corresponding cDNA and gene in order to resolve the molecular basis of this newly identified defect.

Methods: Using a specific enzyme assay set up by us, classical column chromatography was used to purify the enzyme to

apparent homogeneity as judged by SDS-PAGE analysis followed by amino acid sequencing using MALDI-TOF mass spectrometry.

Results and discussion: We purified the MHBD/SCHMAD from bovine liver, excised the candidate protein band from SDS-PAGE, performed MALDI-TOF analysis after in gel digestion with trypsin and identified the putative cDNA via database screening. The authenticity of the cDNA was established via expression studies in E.Coli. Molecular studies in MHBD/SCHMAD deficient patients revealed clear-cut mutations

Conclusion: we have cloned the MHBD/SCHMAD cDNA and gene and used this to resolve the molecular basis of MHBD/SCHMAD deficiency.

83. Detection of thymidine phosphorylase deficiency by HPLC/ESI Tandem-MS analysis of thymidine in plasma, urine or urine soaked filter paper

A.H. van GENNIP¹, H. van LENTHE¹, A.G. van CRUCHTEN¹, A.H. BOOTSMA¹, M. HIRANO² and A.B.P. van KUILENBURG¹

Academic Medical Center¹, University of Amsterdam, Emma Children's Hospital and Dept. of Clinical Chemistry, F0-224, P.O. Box 22700, 1100 DE Amsterdam, The Netherlands and Department of Neurology², Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, USA

Introduction: Deficiency of thymidine phosphorylase is thought to be the cause of mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy (MNGIE). MNGIE is an autosomal recessive disorder, which is clinically characterized by peripheral neuropathy, ophthalmoparesis, leukoencephalopathy, gastrointestinal problems including intestinal dysmotility, and mitochondrial abnormalities. Patients with the enzyme defect can easily be detected by the strongly increased concentrations of thymidine in their body fluids.

Methods: Plasma samples were deproteinized with acetonitrile, urine was only centrifuged, and urine soaked filter paper strips were extracted with water/methanol. ESI tandem-MS was connected to HPLC to separate thymidine from interfering compounds. Separation was performed on a Phenomenex (Torrance, USA) Aqua column (250x4.6 mm, particle size 5µm) using an elution gradient of ammoniumacetate (0.05 mol/L, pH 4.0) and methanol. Multiple reaction monitoring was used in electropositive mode and [methyl 13C]-thymidine

was used as internal standard. The transition, cone voltage and collision energy for thymidine were 243>127, 30V and 10 eV respectively.

Results and discussion: Recoveries (%) for spiked (1 and 10µM) plasma were 83 ± 9 and 69 ± 6, for spiked (5 and 100 µM) urine 99 ± 5 and 100 ± 4, for filter paper strips of these spiked urines 97 ± 5 and 101 ± 3 (n=10). Reproducibility (CV%, n=10) ranged from 2.0-10 for the plasma and urine applications. Total analysis time is 15 min. Analysis of plasma (n=7) and urine (n=2) samples from patients with MNGIE and leukocyte thymidine phosphorylase deficiency revealed elevated thymidine concentrations in plasma ranging from 3.9-10.1 µM (controls <0.05 µM, n=13) and in urine 152 and 370 µM (controls <3 µM, n=10).

Conclusion: HPLC/ESI tandem-MS of plasma, urine or urine soaked filter paper strips allows rapid, specific and quantitative analysis of thymidine, which can be used for the detection of thymidine phosphorylase deficiency in patients.

84. Polymorphisms in the transcobalamin gene, hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease risk

K.J.A. LIEVERS¹, L.A. AFMAN¹, L.A.J. KLUIJTMANS¹, G.H.J. BOERS², P. VERHOEF³, M. den HEIJER⁴, J.M.F. TRIJBELS¹ and H.J. BLOM¹

Departments of Pediatrics¹ and Internal Medicine², Division of Endocrinology⁴ University Medical Center Nijmegen, The Netherlands. Wageningen Center for Food Sciences and Division of Human Nutrition and Epidemiology³, Wageningen University, The Netherlands

Introduction Molecular defects in genes encoding enzymes involved in homocysteine metabolism may account for mild hyperhomocysteinemia. Methionine synthase requires vitamin B12 as a cofactor. Intracellular B12 deficiency may therefore lead to increased tHcy and may be the result of a low B12 intake, a disturbance in the absorption, transport, or cellular uptake of this vitamin. Transcobalamin facilitates the transport of B12 in blood to the various tissues. Genetic variation of the transcobalamin gene may be associated with an increased or decreased risk of hyperhomocysteinemia.

Methods Using an exon-based DNA sequencing strategy we examined the TC gene for possible genetic variants and five were found, i.e. I23V, G94S, P259R, S348F and R399Q. We examined these sequence variants in the TC gene as possible determinants of plasma homocysteine concentration and, con-

cordantly, as possible genetic risk factors for CVD in 190 vascular disease patients and in 601 apparently healthy subjects.

Results Homozygous 23VV individuals (n=6) had lower fasting homocysteine concentrations compared with their 23IV (n=153) and 23II (n=507) peers ($P=0.05$ and $P=0.07$, respectively). These 23VV individuals had even lower homocysteine concentrations when they also carried the P259R variant in heterozygous state. However, in case of high vitamin B₁₂ levels the individuals carrying the R allele of the P259R variant showed increased homocysteine concentrations compared with the 259PP individuals.

Conclusions Individuals with these genotypes may be predisposed to an increased or decreased risk of cardiovascular diseases.

85. A 31 bp VNTR in the cystathionine b-synthase (CBS) gene is associated with reduced CBS activity and elevated post-load homocysteine levels

K.J.A. LIEVERS¹, L.A.J. KLUIJTMANS¹, S.G. HEIL¹, G.H.J. BOERS², P. VERHOEF³, D. van OPPENRAAY-EMMERZAAL¹, M. den HEIJER⁴, J.M.F. TRIJBELS¹ and H.J. BLOM¹

Departments of Pediatrics¹ and Internal Medicine², Division of Endocrinology⁴ University Medical Center Nijmegen, The Netherlands and Wageningen Center for Food Sciences and Division of Human Nutrition and Epidemiology³, Wageningen University, The Netherlands

Introduction: Molecular defects in genes encoding enzymes involved in homocysteine metabolism may account for mild hyperhomocysteinemia, an independent and graded risk factor for cardiovascular disease (CVD). Although heterozygosity for CBS deficiency has been excluded as a major genetic cause of mild hyperhomocysteinemia in vascular disease, mutations in (non-)coding DNA sequences may lead to a mildly decreased CBS expression and, consequently, to elevated plasma homocysteine levels. Methods We assessed

the association between a 31 bp VNTR and fasting, post-methionine load and increase upon methionine load homocysteine in 190 patients with arterial occlusive disease, and in 381 controls.

Results: The 31 bp VNTR consists of 16, 17, 18, 19 or 21 repeat units and shows a significant increase in plasma homocysteine concentrations with an increasing number of repeat elements, in particular after methionine loading. In 26 vascular disease patients the relationship between this 31 bp VNTR and

CBS enzyme activity was studied. The CBS enzyme activity decreased with increasing number of repeat units of the 31 bp VNTR. RT-PCR experiments showed evidence of alternative splicing of intron 13, in which the VNTR is located.

Conclusions: The 31 bp VNTR in the CBS gene is associated with post-methionine load hyperhomocysteinemia that may predispose individuals to an increased risk of cardiovascular diseases.

86. Reversal of clinical symptoms and clinical effects of a low protein diet in alkaptonuria

E. MORAVA¹, G. KOSZTOLÁNYI¹ and R.A. WEVERS²

University of Pécs, Department of Medical Genetics and Child Development¹, Pécs, Hungary; Laboratory for Pediatrics and Neurology², UMC Nijmegen, The Netherlands

Introduction: Alkaptonuria (OMIM 203500) is a disorder of tyrosine metabolism characterised by accumulation of homogentisic acid (HGA). It is due to the congenital deficiency of the enzyme homogentisic acid oxidase (HGO). Characteristic clinical features are darkening of the urine, ochronosis, osteoarthritis and painful attacks of the large joints resembling acute inflammatory episodes. There is no definite therapeutic protocol for patients (1).

Case report: The patient was diagnosed to have alkaptonuria shortly after birth. He was treated with ascorbic acid (0,5-1 g/day) since the age of 5 years. Severe recurrent joint pain without arthrosis presented at age 9,5 years. He had painful restriction in movements of the large joints. Irregularities of the articular surface in both knees were detected on X-ray. He was unable to do sports.

Treatment results: The patient started with a protein-restricted diet (1,3 g/kg/day), resulting in a significant decrease in urinary excretion of homogentisic acid. The complaints have fully disappeared. The patient keeps the diet now for over two years due to the rewarding absence of pain. The radiological evidence of "moth bite" irregularities at the articular surface has fully disappeared. The patient is in nitrogen balance and is thriving well. He is able to participate in regular sport activities.

Conclusion: Our data suggest that protein restriction is effective in prepubertal patients with alkaptonuria. It may actually reverse clinical signs and symptoms of the disease.

Literature

1. La Du BN Jr. Are we ready to try to cure alkaptonuria? *Am J Hum Genet* 1998; 62: 765-767.

87. Homocysteine interference in neurulation: a chick embryo model

L.A. AFMAN¹, N.M.J van der PUT¹, F.J.M. TRIJBELS¹, H.J. BLOM¹, H. van STRAATEN²

Department of Pediatrics¹, University Medical Center Nijmegen, The Netherlands and Department of Embryology and Anatomy², Maastricht University, The Netherlands

Introduction: Periconceptional folic acid supplementation reduces the occurrence and recurrence risk of neural tube defects (NTD). Mothers of a children with NTD have elevated plasma homocysteine levels. Administering homocysteine to chick embryos can cause 27% NTD. The aim of this study was to obtain a chick embryo model to explore the interference of homocysteine in neural tube closure.

Methods Chick embryos in ovo were administered homocysteine or saline at 3 hour (prestreak stage), 30 hours (1 somite stage) and 60 hours (19 somite stage) and harvested at 74 hours. Embryos were evaluated NTD and 'other defects'. Chick embryos were cultured in vitro on a substrate in a Petri

dish at 37°C. Images were made before administering homocysteine, cysteine or saline and every hour thereafter up to 6 hours. Images were used to count number of somites before and after 6 hours and measuring the width of the anterior neuropore (ANP).

Results: Homocysteine administered to chick embryos in ovo resulted in malformations but no increased number of NTD's were found. Chick embryos in vitro showed a homocysteine induced grow delay and a widening of the ANP.

Conclusions: The in vitro chick embryo model appears to be a good model to study the proces of homocysteine interference in neurulation

Diversen

88. Investigation of the applicability of a mid-infrared spectroscopic method using an Attenuated Total Reflection accessory and a new near-infrared transmission method for the determination of faecal fat

M. VOLMER¹, A.W. KINGMA¹, P.C.F. BORSBOOM², B.G. WOLTHERS¹ and I. P. KEMA¹

Department Pathology and Laboratory Medicine, University Hospital Groningen, PO Box 30001, 9700 RB Groningen¹, The Netherlands, and PB Sensortechnology & Consultancy bv, Westeremden, The Netherlands²

Introduction: In many laboratories, the titrimetric method of Van de Kamer is used for the analysis of faecal fat content of patients suspected of steatorrhoea. We investigated the applicability of a mid-infrared (MIR) spectroscopic method using an Attenuated Total Reflection (ATR) accessory and a new near-infrared (NIR) spectroscopic method.

Methods: For the NIR method sealed plastic bags, containing the stool samples, were used as transmission cells. Standardization was obtained using a previously described MIR method, with a NaCl flow-cell, as reference method. Partial least-squares regression was used for the calibration of each method. Full cross-validation of the calibration set was used for internal validation of each method.

Results and discussion: Unfortunately, the faecal fat content of

fifteen per cent of the stool samples could not be estimated with the ATR method within reasonable accuracy limits, compared with the reference results. The NIR method did not show this limitation. After removing these outlier samples from the analysis with the ATR method, the standard error of prediction of the ATR, and the NIR methods were 1.1 g/dL, when compared with the reference results.

Conclusion: Based on our findings we do not recommend to use the ATR method for analysis of faecal fat. We conclude that the new NIR method is a promising technique for routine use. However, some further experiments need to be done with triplicate measurements of each sample and the use of an external validation set.

89. Verdunnen routine chemie monsters bij interferentie door hemolyse, lipemie of icterie

C.H.H. SCHOENMAKERS en J.L.P. van DUIJNHOFEN
Algemeen Klinisch Laboratorium, Elkerliek ziekenhuis, Helmond

Inleiding: Bij ieder routine-chemie monster wordt door de Beckman LX20 de eventuele aanwezigheid van hemolyse, lipemie en/of icterie kwantitatief bepaald met de index-test. Voor iedere test is vastgesteld bij welke index de concentratie van de storende component zo hoog is dat geen analytisch verantwoord resultaat meer kan worden verkregen. In dit geval wordt de opmerking 'onbetrouwbaar door interferentie' gerapporteerd. In een aantal gevallen kan de concentratie van de storende component, door een vaste verdunning met 0,9% NaCl, beneden de kritische grens gebracht worden.

Werkwijze: Per test wordt door het Laboratorium Informatiserings Systeem beoordeeld of de maximaal toelaatbare indexen worden overschreden. Dan wordt, als verdunning mogelijk is, automatisch een aanvraag voor de verdunde test toegevoegd. De vaste verdunningsfactor is twee of drie en wordt bepaald door de verhouding van de normaal haalbare imprecisie ten opzichte van de intra-individuele biologische variatie van de test. De verdunde test wordt apart gerapporteerd onder een naam met de toevoeging (V2) of (V3), afhankelijk van de verdunning.

Resultaten: Hieronder staan voor een drietal testen de grenswaarden (GWx) waarop of waarboven 'onbetrouwbaar door interferentie' gerapporteerd wordt, de toegepaste verdunningsfactor (x verd), de normale analytische imprecisie (CV%_{nor}), de imprecisie na verdunning (CV%_{verd}) en de intra-individuele biologische variatie (%_{intraindiv}).

Test	Whemo	G Wbili	G Wlipi	verd x	CV% nor	CV% verd	% _{intraindiv}
ALAT	8	13	5	3	3,	11,4	23
Calcium	10	14	11	-	1,3	-	2
Creatinine	10	14	11	2	1,8	3,6	5

Conclusie: Bij aanwezigheid van ernstige hemolyse, lipemie en/of icterie kan vaak alsnog een klinisch bruikbaar resultaat verkregen worden door verdunning.

90. Registratie doorlooptijden cito-onderzoek per werkplek

C.H.H. SCHOENMAKERS, J.M. JANSEN, W.C.T.M. DONKERS, P.M.P. VIJFEIJKEN, J.L.P. van DUIJNHOFEN
Algemeen Klinisch Laboratorium, Elkerliek ziekenhuis, Helmond

Doel: De doorlooptijden van cito-onderzoek per werkplek vastleggen. Voor het optimaliseren en bewaken van de workflow binnen het Algemeen Klinisch Laboratorium bestaat een structurele behoefte aan kerngetallen over cito-aanvragen en de verwerking van dit type onderzoek.

Werkwijze: Elke dag tijdens de dagafsluiting van het Laboratorium Informatiserings Systeem Labosys wordt het volgende geteld:

Totaal aantal aanvragen, aantal cito's, aantal cito's per werkplek en de doorlooptijd van de cito's per werkplek. Labosys-programmatuur: In de routine LF103 (resultaat invoer) wordt een eigen routine aangeroepen. Deze routine bouwt een voortgangsbestand op met: cito-aanvragen, aanvraag-datum-tijd, resultaatinvoer-datum-tijd en doorbel-datum-tijd. In de routine LSC16 wordt tijdens de dagafsluiting een eigen routine aangeroepen, deze leest het voortgangsbestand en bouwt een overzichtstabel op. Deze wordt samen met het voortgangsbestand dagelijks automatisch uitgeprint via routine SBJB.

Resultaat:

datum: 07-09-01
totaal aantal aanvragen: 471
aantal cito-aanvragen: 40 (8.49 %)

Werkplek	bepalingstijd	aantal	aantal (%)
ABL	<5 min.	2	33,3
	5-10 min.	1	16,6
	>10 min.	3	50
ADVIA	<15 min.	15	48,3
	15-30 min.	10	32,2
	>30 min.	6	19,3
LX20	<45 min.	24	77,4
	45-60 min.	2	6,45
	>60 min.	5	16,1

Conclusie: De overzichtstabel en de doorlooptijden lijst van het cito-onderzoek bieden zeer bruikbare managementinformatie voor het optimaliseren en bewaken van de workflow.

91. Evaluatie van het functioneren van zelfsturende teams op een klinisch-chemisch laboratorium

J.G. BOONSTRA, M.H.A. EMAN en J. LINDEMANS
Academisch Ziekenhuis Rotterdam, Afdeling Klinische Chemie

Introductie: Ruim 3 jaar geleden is op onze afdeling een nieuwe organisatievorm geïmplementeerd waarbij gewerkt wordt met zelfsturende teams. Uitgangspunten voor ontwerp van dit organisatie-model waren onder andere het bekorten van lijnen, daar waar mogelijk eigen verantwoordelijkheid geven, integere personele aandacht mogelijk maken en doelmatiger werken. Een zelfsturend team werd omschreven als een groep medewerkers die gezamenlijk verantwoordelijk zijn voor het totale proces waarin diensten tot stand komen en de voortgang bewaken zonder voortdurend een beroep te doen op de leiding. Deze studie is een evaluatie van de door analisten ervaren taak-, en relatieaspecten van het werken in zelfsturende teams.

Methode: Er is gebruik gemaakt van een enquête, gebaseerd

op het 'Job Characteristics Model' van Hackman en Oldman en op een door van Nistelrooy et al. ontwikkelde survey.

Resultaten: Door de teamleden werd positief gescoord op de (taak-) aspecten: zelfstandigheid, taakverrijking, resultaatverantwoordelijkheid en taakverbreding. De score echter op (relatie-) aspecten als conflicthantering, vertrouwen in collega's en communicatie was matig. Alhoewel het gemiddelde rapportcijfer van het eigen team slechts een 6 was, geeft ruim 85% van de respondenten aan zich te zullen blijven inzetten voor de verdere ontwikkeling van hun team.

Conclusies: Met de invoering van zelfsturende teams wordt grotendeels voldaan aan de uitgangspunten van de reorganisatie, echter met name de ontwikkeling van relatieaspecten binnen het team behoeven aandacht.

92. Evaluation of two methods to assess interferences caused by hemoglobin

R. de JONGE, Y.B. de RIJKE, B.G. BLIJENBERG

Clinical Chemistry, University Hospital Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands

Introduction: Hemolysis is a well known and frequent source of interference in clinical chemistry photometric assays. Most laboratories assess hemolytic interference by overloading a pool of human serum or plasma with increasing amounts of an hemolysate (CERMAB procedure¹). A major disadvantage of this methods is that it assumes that interference effects are independent of analyte concentration. We compared the CERMAB procedure with a new method to evaluate hemoglobin interferences in selected Hitachi 917 assays.

Methods: A patient database was constructed including chemical analyses and hemolytic indices from routine patient serum samples gathered during one quarter of a year ($n \gg 30.000$). Since the hemolytic index on the Hitachi 917 accurately reflected true hemoglobin values (hemolytic index = $0.99 \cdot [\text{hemoglobin}] - 3.8$, where [hemoglobin] is in $\mu\text{mol/l}$), slopes of the regression between measured analyte concentration and

hemoglobin concentration could be directly compared for both methods (CERMAB and database).

Results: A moderate degree of hemolysis (10-100 $\mu\text{mol/l}$) was observed in ca. 7% of the samples from adults. Lactate dehydrogenase was most sensitive to hemolysis and slopes amounted to 3.2 (CERMAB) and 1.9 (database). Lower positive interferences were observed for aspartate aminotransferase (slope = 0.2 for both methods), potassium (slope: CERMAB = 0.004 and database=0.009), and iron (slope: CERMAB = 0.01 and database = 0.01).

Conclusion: Interferences observed in patient specimens not always reflect those determined in experimental setting by overloading a pool of human serum with hemolysate. **Literature:** 1. Vassault A, Grafmeyer D, Naudin C, *et al.* Commission for the validation of methods of the Société Française de Biologie Clinique. Protocol for the validation of methods. *Ann Biol Clin* 1986; 44; 686-745.

93. Hemolysecondities beïnvloeden de spectrofotometrische bepaling van glucose in hemolysaat

F.P.W. TEGELAERS¹, A. KUIPER, M.A. RIDDER, S. TUINENBREIJER en D.J. VERDUIN

Laboratorium voor Klinische Chemie, Hematologie en Immunologie, Medisch Centrum Alkmaar¹

Inleiding: De firma Eppendorf (Hamburg, BRD) levert t.b.v. de elektrochemische bepaling van glucose (Esat, Ebio) reactievaatjes met hemolysevloeistof (catnr. 6660140008). Deze oplossing heeft een osmolaliteit van 90 mosm/kg en bevat detergentia. Bij het gebruik van deze hemolysevloeistof in spectrofotometrische assays treden in de dagelijkse praktijk specifieke problemen op, die nader geanalyseerd zijn.

Methoden: 20 μl volbloed werd gehemolyseerd in 1 ml hemolysevloeistof met wisselende tijden. Vervolgens werd 25 μl hemolysaat gemeten in 200 μl reagens met glucose-dehydrogenase (Granutest 250[®], Merck Darmstadt BRD, cat.nr. 112194) op een Beckman Synchron[®] CX5 analyser. Ter vergelijking werd als 'gouden standaard' de meting in plasma gehanteerd.

Resultaten en discussie: De hemolysetijd na het toevoegen van het bloed aan de hemolysevloeistof blijkt van grote invloed op het meetresultaat. Pas na 15 minuten hemolyseren zijn de

variatioecoefficiënten van de bepaling acceptabel. Bij neonaten bedraagt de hemolysetijd 30 minuten, door het matige hemolyseren van foetale erythrocyten. De aanwezigheid van normoblasten kan resulteren in vals verlaagde glucosewaarden, zelfs na 30 minuten hemolyseren: spoortjes onoplosbaar materiaal, waarschijnlijk DNA, blijven aanwezig. Centrifugeren (2 minuten, tafelcentrifuge) is dan noodzakelijk. Overigens resulteert centrifugeren bij alle metingen in een additionele verbetering van de variatioecoefficiënt en van de correlatie met de plasma-methode.

Conclusie: De hemolysevloeistof van de firma Eppendorf is niet bedoeld voor en ook niet zonder meer geschikt voor spectrofotometrische bepaling van glucose. Met name bij neonaten is de kans op vals verlaagde waarden groot. De aanpassingen, die nodig zijn om betrouwbaar te kunnen meten, doen de logistieke voordelen van de hemolysaatmethode teniet.

94. De introductie van Point Of Care Testing in het Wilhelmina Kinderziekenhuis van het UMC Utrecht: Easy does it

H. van der VUURST, I.A.J. JANSEN en W.W. van SOLINGE

Centraal Diagnostisch Laboratorium (CDL), Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht

Inleiding: De kwaliteit en de beheersaspecten van de huidige generatie Point Of Care (POC) analysers maakt introductie in een Academisch Centrum mogelijk. Zeer bewust houdt het laboratorium controle op elke vorm van POC in het UMC Utrecht. Er is gekozen voor één analyser (I-STAT[®]1, Abbott) waarbij diverse analysepakketten kunnen worden aangeboden door gebruik te maken van verschillende cartridges. Op deze wijze kunnen ook de OK en SEH POC metingen uitvoeren. Introductie van POC is gestart in het Wilhelmina Kinderziekenhuis (WKZ) in nauw overleg met artsen en verpleging.

Methoden: Na bepaling van analytische precisie en koppeling van de I-STAT[®]1 downloaders aan het ZIS is een pilot uitgevoerd op een grote kinder-IC. Een team van analisten onder aanvoering van de POC-coördinator beheert het management-programma dat het ZIS aanstuurt, draagt zorg voor bevoor-

rading van cartridges en faciliteert onderhoud van apparatuur. Alle gebruikers krijgen pas na instructie een toegangsnummer waarmee metingen kunnen worden uitgevoerd.

Resultaten en discussie: Artsen en verpleging zijn tevreden over het bedieningsgemak, snelheid waarmee resultaten worden verkregen en ondersteuning door het laboratorium. Fouten in de patiëntnummerinvoer werden gereduceerd tot nul na introductie van patiëntenbarcodes. Uitbreiding van het POC met de neonatale IC, HC en MC is aanstaande. Een deel van de reguliere laboratoriumbepalingen van deze afdelingen wordt door de analisten van het CDL middels POC gemeten. Uitgebreide resultaten zullen op de poster worden gepresenteerd.

Conclusie: Continue monitoring en terugkoppeling helpt bij de succesvolle introductie van POC in het UMC Utrecht.

95. Toepassing van automatische validatie met het programma LabRespond: praktijkervaring

E.M.L. SMETS, W.P. OOSTERHUIS

St. Elisabethziekenhuis, Centraal Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Tilburg

Inleiding: Fouten gebeuren veelal in de pre- en postanalytische fase. Daarom is traditionele kwaliteitscontrole niet toereikend en zouden alle resultaten gecontroleerd moeten worden. LabRespond biedt hiervoor een efficiënte oplossing. Om hiervan een bruikbaar instrument te maken, moet een protocol opgesteld worden over het omgaan met niet-gevalideerde resultaten. We gingen na hoeveel, en waarom, resultaten niet automatisch gevalideerd werden.

Methoden: 44 bepalingen van een halve dagproductie (N=2723) werden door LabRespond gecontroleerd.

Resultaten: 96.6% van de uitslagen werden automatisch gevalideerd. 98 uitslagen werden niet gevalideerd: 79 door een lage waarschijnlijkheid in combinatie met andere monsterresultaten, 19 waren extreemwaarden. Op 31 niet-gevalideerde resultaten volgde geen actie omdat andere monstergegevens het

resultaat waarschijnlijk maakten. In 26 gevallen werd gezocht naar bijkomende gegevens, hetgeen in 18 gevallen volstond om het resultaat te valideren. Bij 7 monsters werden een of meerdere parameters opnieuw gemeten na twijfel over de analytische kwaliteit; dit leverde echter geen andere waarden op. In 10 gevallen werd de arts gecontacteerd, die slechts voor vier een verklaring had.

Conclusie: Het omgaan met niet-gevalideerde resultaten, bij voorkeur met een protocol, is bepalend voor de kwaliteit van automatische validatie. Omdat dit tijdrovend is en best gebeurt door iemand met pathofysiologische kennis, moet het aantal onterecht verworpen resultaten minimaal zijn. LabRespond zal daartoe in de toekomst verder verfijnd worden, maar ook de integratie van informatie vanuit de kliniek zal hiertoe bijdragen. Zie: Oosterhuis WP *et al.* Clin Chem 2000; 46: 1811-1817.

96. Evaluatie en introductie van een cito HIV-test

A.K. STROOBANTS¹, S. JURRIAANS², J. PRINS¹, G.T.B. SANDERS¹.

Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam. Afdeling algemene klinische chemie¹, afdeling humane retrovirologie²

Inleiding: Vanuit de afdeling Inwendige geneeskunde van ons ziekenhuis kwam het verzoek een 24 uren HIV-test service te realiseren. Het doel hiervan was om bij prik/snij-accidenten het bloed waarmee het slachtoffer in contact is geweest zo snel mogelijk te testen op de aanwezigheid van HIV-antistoffen. Zodoende kan, onafhankelijk van het tijdstip van het accident, snel beslist worden of het slachtoffer een reële kans op besmetting heeft en behandeld dient te worden met een post-exposure profylaxe.

Aangezien de afdeling humane retrovirologie binnen 2 uur een zeer betrouwbare uitslag kan leveren voor monsters die tijdens werkdagen van 9.00 tot 15.00 uur ingeleverd worden, werd gezocht naar een test die tijdens de daluren, in weekenden en op feestdagen snel en makkelijk door de afdeling klinische chemie uitgevoerd kan worden.

Methoden: De Determine HIV-1/2 test van Abbott werd ge-

ëvalueerd met 92 monsters (55 HIV negatief, 35 HIV-1 en 2 HIV-2 positief). Eerder waren deze monsters getest met de HIV-1/HIV-2 3rd generation plus EIA of de IMx HIV-1/HIV-2 III plus MEIA (Abbott) en de VIDAS HIV duo (Biomérieux).

Resultaten: De sensitiviteit van de test bleek 100% (zowel HIV-1 als HIV-2 werden aangetoond). De specificiteit was 84 %: er werden geen vals negatieve uitslagen maar wel enkele vals positieve uitslagen gevonden.

Conclusie: Op basis van de evaluatie is de test in gebruik genomen. Een enkele vals positieve uitslag betekent dat een slachtoffer voor niets profylaxe zal krijgen, hetgeen in de praktijk betekent dat minder mensen dan voorheen onterecht behandeld worden. Gezien de privacygevoeligheid van de uitslag van HIV-testen hebben we een procedure opgesteld waarbij de uitslag niet in het Ziekenhuis Informatie Systeem gerapporteerd wordt.

97. Gebruik van high-bicarbonaat versus low-bicarbonaatbuffers bij hemodialysepatiënten

M.G.L.M. ELISEN¹, L. KAHLMANN², L. BUYS-CUPEDO¹, Ph. N.M. DIDERICH² en J.W. JANSSEN¹

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

Inleiding: Het maandelijks meten van bicarbonaat voor/na dialyse wordt door de Kommisje Kwaliteitsbewaking van de Dialysegroep Nederland geadviseerd als therapiecontrole. Dialyse corrigeert o.a. de zure patiënt tijdelijk door toediening van bicarbonaat waarna langzame verzuring (Bicarbonaatsdaling) zal optreden tot de volgende dialyseronde.

Vraagstelling: Als eenvoudig alternatief voor de HCO₃-meting (bloedgasanalyse), is totaal CO₂ (chemie-analyser) aangeboden en geïntroduceerd. De bruikbaarheid van de tCO₂-bepaling als therapiecontrole is onderzocht.

Methode: De tCO₂ waarden van chronische dialyse-patiënten zijn gedurende een jaar in kaart gebracht en vergeleken.

Resultaten: Van de onderzochte patiëntengroep blijkt het interval tCO₂ na-voor dialyse per patiënt een constante grootte te zijn. Naarmate de initiële tCO₂ van de patiënt voor dialyse lager is zal de tCO₂ stijging tgv de dialyse groter zijn.

Bij enkele patiënten werd bicarbonaat onvoldoende gecorri-

geerd tijdens dialyse. Streefwaarde [tCO₂] tussen de 25-30 mmol/l na dialyse, (34 mmol/l bicarbonaat-dialysebuffer). De tCO₂ waarden schommelden tussen 17-20 mmol/l (voor dialyse) en 22-25 mmol/l (na dialyse). Deze groep is gedurende 6 maanden gedialyseerd met een 38 mmol/l bicarbonaatbuffer en vergeleken. Bij gebruik van een 34 mmol/l bicarbonaatbuffer was de tCO₂-toename tijdens dialyse 3-5 mmol/l, en 6-9 mmol/l bij de 38 mmol/l buffer. Het tCO₂-verval blijft na dialyse gelijk aan de toename door dialyse, ongeacht de bufferkeuze. De basale tCO₂-spiegel steeg niet significant door de sterkere buffer.

Conclusie: tCO₂ is een eenvoudig bruikbaar alternatief voor het monitoren van de bicarbonaatstatus bij haemodialysepatiënten. Het verhogen van de dialysebuffersterkte bij dialysepatiënten leidt wel tot een grotere tCO₂-toename tijdens dialyse maar niet tot een stabiel ingestelde patiënt.

98. Vergelijking van de dupliceerbaarheid tussen de ADVIA 1650 en Hitachi 911

G.A. HARFF, M.J.A. van den BOSCH en Y.J.C.L. van VUGT
Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina ziekenhuis, Eindhoven

Inleiding: De Advia 1650 (Bayer) chemie analyzer maakt van ieder patiëntmonster een voorverdunding in een voorverdundingstray. Vervolgens wordt voor iedere bepaling een monster genomen uit deze voorverdundingstray en gepipetteerd in een cuvet waarin de bepaling wordt uitgevoerd. De voorverdundingstray elimineert het gewoonlijk handmatig verdunnen van monsters met hoge uitslagen. Door het uitvoeren van een extra monster-pipeteerstap wordt wellicht aan de dupliceerbaarheid afbreuk gedaan.

Methode: Een 100 tal gehepariniseerde patiëntmonsters werden in duplo zowel op een ADVIA 1650 als een Hitachi 911 analyzer voor 23 testen geanalyseerd volgens NCCLS protocol EP-9. Uit de meetgegevens werd voor iedere test de dupliceerbaarheid voor zowel de ADVIA 1650 als de Hitachi 911 berekend.

Resultaten: De volgende testen gaven een betere dupliceerbaarheid op de ADVIA 1650 t.o.v. de Hitachi 911: amylase, CK, bilirubine, calcium, CRP, fosfaat, glucose, magnesium en natrium. De volgende testen gaven een slechtere dupliceerbaarheid op de ADVIA 1650: AF, ALAT, ASAT, CK-MB, GGT, LD, albumine, cholesterol, kalium, kreatinine (Jaffe), totaal eiwit, triglyceride en uraat. De dupliceerbaarheid voor ureum bleek op de twee analyzers gelijk te zijn.

Conclusie: Het merendeel van de bepalingen vertoonde een slechtere dupliceerbaarheid op de ADVIA 1650. Aangezien een aantal testen op de ADVIA 1650 een betere dupliceerbaarheid dan op de Hitachi 911 heeft spelen wellicht andere factoren dan de voorverdunding tevens een rol.

99. De WVO-vergunning: meten aan het klinisch-chemisch laboratorium

A.P. van ZANTEN¹, J. van VEEN¹, H.SCHRIEL², G.T.M. VOORBIJ³
Slotervaartziekenhuis. Klinisch Chemisch Laboratorium¹. Afdeling Milieu, Energie en Vervoer². Bouwbureau³

Inleiding: Het Slotervaartziekenhuis beschikt over een intern bedrijfs milieu zorgsysteem dat is gecertificeerd volgens ISO 14001. Ketenbeheer speelt in dit systeem een belangrijke rol. Verontreiniging van het milieu wordt zoveel mogelijk beperkt door afvalscheiding en opvang van milieu verontreinigende stoffen aan de bron.

Methoden: In de WVO vergunning van het ziekenhuis wordt onderscheid gemaakt tussen drie afvalstromen: huishoudelijk afvalwater, bedrijfsafvalwater (koelwater en ketelspui etc.), en laboratorium afvalwater. Het laboratorium afvalwater wordt direct aan de uitgang van het laboratorium bemonsterd (Cyanide, Cu, Zn, Mo, Hg, As, benzeen, vluchtige organo-halogenverbindingen en extraheerbare organo-halogenverbindingen). Hierbij wordt er voor gezorgd dat uit de meetpunten representatieve en volume proportionele monsters genomen worden.

Resultaten: In 1999 en 2000 werd 14 maal een analyse van het

afvalwater uitgevoerd. Incidenteel werden overschrijdingen van de lozingsnorm vastgesteld van cyanide, Cu, Mo en vluchtige organo-halogenverbindingen. Deze overschrijdingen konden teruggevoerd worden op het op onjuiste wijze afvoeren van reagentia(resten). Regelmatig werd vastgesteld dat de lozingsnorm van Hg ruimschoots werd overschreden. Aanvankelijk was de oorzaak van deze overschrijding niet te achterhalen. Raadpleging van de safety data sheets en consultatie van Cycle Systems leidde niet tot identificatie van het vervuilende proces. Bemonstering van de afvalstromen binnen het laboratorium wezen uiteindelijk thiomersal, aanwezig als conserveermiddel in elektroforese-gels, als boosdoener aan.

Conclusie: Een klinisch-chemisch laboratorium kan voldoen aan de eisen van een moderne WVO vergunning, zoals die zijn opgesteld op basis van de hiervoor geldende richtlijnen (commissie integraal waterbeheer). Oplettendheid blijft echter geboden.

100. Multicenter kwaliteitscontrole op de Architect (Abbott)

M. DOESBURG - van KLEFFENS, J.M. VELMANS en J. van PELT
KCHL, Stichting Ziekenhuizen Noord-Limburg, Venlo

Introductie: N.a.v. problemen met o.a. testosteron en estradiol werd vanuit de Architect-gebruikersgroep de behoefte gevoeld aan een gerichte multicenter kwaliteitscontrole. Er was op dat moment binnen de LWBA rondzending nog geen aparte Architect subgroep gedefinieerd. Verder was deze controle gericht op het verkrijgen van gegevens over metingen verspreid over een langere tijd t.b.v. de stabiliteit.

Methode: De negen deelnemende laboratoria maten gedurende 10 weken, wekelijks 13 bepalingen (fT4, TSH, TT3, Estradiol, LH, FSH, Progesteron, Prolactine, Testosteron, vit B12, ferritine, PSA en CEA) op 2 levels uit drooggevroren humaan materiaal. De gegevens werden centraal verwerkt. Per deelnemer, per bepaling en per level werd het gemiddelde, de standaarddeviatie en de variatie-coëfficiënt bepaald (interrun gegevens per automaat). Vervolgens werden van alle meetpunten per bepaling en per level het gemiddelde, de SD en de VC berekend (multicenter-gegevens).

Resultaten: De verkregen resultaten per analyse-automat wa-

ren in het algemeen goed en conform wat van een nieuwe generatie immunochemie-analyser verwacht mag worden (d.w.z. VC<10%). Uitzonderingen hierop waren de resultaten voor CEA, estradiol (1 level), en progesteron (1 level), waarvoor VC's van >10% werden gevonden. De multicenter-gegevens kwamen overeen met het gemiddelde van de interrun resultaten. In vergelijking met de LWBA resultaten van alle methoden waren de VC's van onze rondzending beduidend lager en vergelijkbaar met bijvoorbeeld die van de Abbott AxSYM subgroep. Bovendien bleek dat de resultaten per apparaat geen drift laten zien in de tijd.

Conclusie: Het analysepakket op de Architect vertoont goede variatie-coëfficiënten, ook over de tijd gemeten. De multicenter VC's verschillen niet van de interrun resultaten per automaat, waaruit geconcludeerd kan worden dat de resultaten van deze immunochemie-bepaling geen verdere afstemming of landelijke ijking behoeven.

101. Evaluation of the analytical performance of the Abbott PCx point of care blood glucose analyzer

N. de JONGE, J. SLINGER, S. KANDAI and P.F.H. FRANCK,
Dept. Clinical Chemistry, Leyenburg Hospital, P.O. Box 40551, 2504 LN The Hague, The Netherlands

Introduction: Point of Care Testing (POCT) has a number of potential benefits over traditional laboratory testing: short turn around time, small volume requirement, bed side testing, and the perspective of non-invasive testing. However, a number of problems still needs to be solved before POCT can be implemented successfully. The most important challenges include analytical quality, integration of test results in the (electronic) cumulative patient file, work load, reagent costs and reimbursement issues.

Method: We evaluated the analytical performance of the PCx portable blood glucose analyzer (Abbott).

Results: Patient samples were tested in duplicate on the PCx and the reference analyzer (YSI 2300 stat glucose analyzer, YSI). There was a good correlation between the two methods (slope 1.02; 95% confidence interval 0.91-1.14, n=37), al-

though the PCx showed an intercept of 0.7 mmol/l. The residual plot did not show a shift in test difference towards higher glucose values. Two levels of quality control (2 and 15 mmol/l) material were tested in duplicate for 20 days on both analyzers. The coefficient of variation was 5.5% and 3.1% respectively for the PCx and 3.2% and 2.6% for the reference method.

Conclusion: Although the analytical performance of the PCx analyzer was lower than the performance obtained by apparatus on the central laboratory, we conclude that the analyzer could possibly be used in situations where the advantages of POCT outweigh its disadvantages. Examples of such situations may be the emergency department, paediatric care and testing at long distance from the central laboratory (e.g. nursing homes).

102. Precisie van een HPLC-methode voor het meten van concentraties van porfyrynes in faeces

J.S. KAMPHUIS, J. DORRESTEIJN-DE BOK en F.M.J. ZUIJDERHOUDT
Deventer Ziekenhuis, Deventer, afdeling klinische chemie

Introductie: Er is in de literatuur nauwelijks iets te vinden over de precisie van bepalingen voor individuele porfyrynecomponenten in faeces. Recent onderzochten we dit voor urinebepalingen. Hier presenteren we zulke gegevens voor faeces.

Methode: Voor deze studie kozen we faecesmonsters van patiënten met respectievelijk porfyria cutanea tarda, erythro-poëtische protoporfyrie, acute intermitterende porfyrie, porfyria variegata, hereditaire coproporfyrie en van een patiënt zonder porfyrie. We kozen monsters met matig verhoogde waarden (<350 nmol/g natte faeces; bovengrens van de referentiewaarde is <45 nmol/g). Van elk faecesmonster zijn 6 porties afgewogen voor de intrarunvariatie en 6 voor de interrunkvariatie. Alle monsters werden apart opgewerkt. De interrunkvariatie werd op zes verschillende dagen gemeten, de intrarun per faeces type op steeds een dag. Calibratie van de

HPLC methode geschiedde zoals indertijd is beschreven. We maten coproporfyryne I, coproporfyryne III, protoporfyryne en indien aanwezig uroporfyryne.

Resultaten: De intrarun variatiecoëfficiënten (VC) varieerden tussen 2% en 13%; de hoogste VC's vonden we bij de lage, niet verhoogde waarden. De interrunk VC's lagen zoals te verwachten was hoger en wel tussen de 4% en 25%.

Voor recovery van coproporfyryne in één faecesmonster dat in zes porties verdeeld was vonden we 90%, VC = 7%.

De intra- en interrunk VC van endogeen protoporfyryne in faeces was goed, VC respectievelijk 2 en 7%. Recovery van protoporfyryne is nu nog in bewerking en wordt gepresenteerd.

Conclusie: De precisie is redelijk in de hand te houden, recovery van coproporfyryne is goed.

103. FESCC Survey of the Management of the Clinical Laboratory in Europe

W. de KIEVIET¹, V. BLATON², G. KOVACS³, V. PALICKA⁴ and K. PULKKI⁵
Sint Lucas Andreas Hospital¹, Amsterdam, The Netherlands; AZ Sint Jan Hospital², Brugge, Belgium; Markusovsky Hospital³, Hungary; University Hospital⁴, Hradec Kralové, Czech Republic; Helsinki University Central Hospital⁵, Helsinki, Finland

Introduction: The Forum of the European Societies of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (FESCC; IFCC Europe) promotes a high scientific and professional level of specialists in the field of Clinical Chemistry in the European countries. Recently a FESCC survey by Rossier et.al. has been published about the accreditation and postgraduate training in Clinical Chemistry in Europe (1). FESCC has set up a new study about the managerial situation of the academic graduated specialists in Clinical Chemistry.

Method: A questionnaire has been sent to all the national societies with questions about the managerial position of the specialists in Clinical Chemistry in the different fields of laboratory medicine, the position in the medical staff, the responsibilities for the managerial part of the laboratory, the advisory tasks, and the managerial education during the postgraduate training.

Results: The preliminary results of the survey give a good overview of the position of the Clinical Chemical specialists in

the different countries of Europe. It shows that in some countries only half of the Clinical Chemical laboratories have a specialist in Clinical Chemistry as head of the Clinical Chemical laboratory, whereas in other countries all of the Clinical Chemical laboratories are managed by a specialist in Clinical Chemistry. Also the managerial postgraduate education differs from country to country.

Conclusions: The situation differs from country to country. Knowledge of the managerial position and education of specialists in Clinical Chemistry in Europe can be used to improve the local situation.

Literature

1. Rossier M, Blaton V, Franzini C, Queralto JM, Palicka V. FESCC survey on accreditation and post-graduate training in Clinical Chemistry in European countries. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 371-376.

104. Properties of fluorescent cheletropic traps for the detection of NO in biological systems

A. HUISMAN¹, P. MEINEKE², R. SUSTMANN², H.G. KORTH², P. BOER³, H. de GROOT⁴ and E.E. van FAASSEN⁵
University Medical Center, Department of Clinical Chemistry¹, Utrecht, The Netherlands, Institut für Organische Chemie², Universität Essen, Germany, University Medical Center, Department of Nephrology and Hypertension³, Utrecht The Netherlands, Institut für Physiologische Chemie⁴, Universitätsklinikum Essen, Germany, Debye Institute, section Interface Physics⁵, Utrecht University, The Netherlands

Introduction: Fluorescent Nitric Oxide Cheletropic Traps (FNOCT) have been proposed as efficient and highly selective fluorescent spin traps for the detection of NO in biological systems(1). We evaluated the influence of FNOCTs towards reactive oxygen species and influence on Nitric Oxide Synthases (NOS).

Methods: The FNOCT trapping rate for superoxide was determined at 37°C and pH 7.4 using competitive spin trapping and Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy. The influence of FNOCT on NO production by NOS was evaluated by quantifying the NOS mediated conversion of [³H]arginine into [³H]citrulline.

Results and discussion: FNOCT has no significant scavenging capacity for superoxide. Therefore, administration of FNOCT to a biological system will not introduce an artificial defence against oxidative stress. FNOCT inhibited both endothelial

NOS and inducible NOS isoform in a dose dependent manner with an IC₅₀ of respectively 86µM and 163µM. However addition of albumin (10mg/ml) abolished the inhibiting effect. As the concentration of protein in biological systems is very high, FNOCT will not inhibit NOS under physiological conditions.

Conclusion: FNOCTs do not change oxyradical stress and the NOS functioning under physiological conditions. Therefore, FNOCTs are well suited to determine NO levels in biological systems.

Literature

1. Korth H-G, Sustmann, R. Nitric oxide detection and visualization in biological systems. Applications of the FNOCT method. *Biol Chem* 2000; 381: 575-582.

105. Celtellingen in natieve urine; een vergelijking met sedimentanalyse.

R.G.H.J. MAATMAN, W. JANSSEN en A. SCHELLEKENS
Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina Ziekenhuis, Eindhoven

Inleiding: De huidige routinematige analyse van urine in klinisch chemische laboratoria bestaat uit een screening van een aantal chemische en cytologische componenten met behulp van een dipstick en bij afwijkingen de microscopische beoordeling van een urinesediment. Het urinesediment is een bewerkelijke methode met een lage sensitiviteit. Flowcytometrische urineanalyse vraagt veel minder tijd per monster, heeft een veel lagere variatiecoëfficiënt en de cellen worden geanalyseerd in natieve urine. In de literatuur blijkt de overeenstemming tussen de resultaten van flowcytometrische analyse in natieve urine en van telling in een urinesediment vaak matig te zijn, mogelijk door verlies van gevormde componenten in de pre-analytische fase. Om een indruk te krijgen van de kwantitatieve verschillen tussen microscopische beoordeling van sediment en natieve urine zijn 120 urines geanalyseerd.

Methoden: Voor analyse van het sediment werd urine gecentri-

fugeerd en het pellet voorzichtig geresuspendeerd in 1 ml urine. De samenstelling van sediment en natieve urine werd bekeken in een Uriglass® telkamer met behulp van een microscoop. De twee methoden werden vergeleken via Passing-Bablok regressie analyse.

Resultaten: De regressievergelijkingen van de erythrocyten, leukocyten en epitheelcellen voor beide methoden toonden richtingscoëfficiënten (a) van respectievelijk, 1,38, 1,20 en 0,94. Voor 36 monsters met cylinders werd a=2,11 gevonden. Analyse van de turn around time per monster voor beide methoden leverde een voordeel van 7 min(65%) per monster op met natieve urine.

Conclusie: Analyse van de hoeveelheden erythrocyten, leukocyten, epitheelcellen en cylinders in natieve urine betekent kwalitatief een verbetering. Bovendien betekent analyse in natieve urine een aanzienlijke tijds winst per monster.

106. Fasting is not necessary for plasma-homocysteine measurement

M.R. FOKKEMA, M.F. GILISSEN, F.A.J. MUSKIET
Pathology and Laboratory Medicine, Groningen University Hospital

Introduction: It is recommended to measure plasma homocysteine (tHcy) in the fasting state. We determined tHcy within-person (CV_{wp}) and between-person (CV_{bp}) variation in apparently healthy adults during a 3 weeks study protocol.

Methods: Samples for within-day variation were taken from 16 adults at 8:00 (after 10 h fast), 10:00, 12:00, 14:00, 16:00, 18:30. Standardized breakfast and lunch were taken at 8:15 and 12:15. Within-day variation was studied again in 10 of them after 3 weeks daily supplementation with pharmacological doses folic acid, vitamin B₁₂ and vitamin B₆. Between-day variation was studied in the remaining 6 adults by additional sampling in week 1 (day 3, 14:00; day 5, 12:00), week 2 (day 1, 12:00; day 3, 8:00; day 5, 14:00) and week 3 (day 1, 14:00; day 3, 12:00; day 5, 8:00). Samples at 8:00 and 12:00 were taken after a 10 h fast and before lunch. There were no dietary restrictions.

Results and discussion: Between-day, clock-time specific, CV_{bp} at 8:00 (28.1%), 12:00 (27.2%) and 14:00 (23.0%) were not statistically different. Our between-day overall CV_{bp} compares well with fasting or otherwise standardized CV_{bp} as reported by others (23.9-33.5%). tHcy decreased from 8:00 to 12:00, and increased from 14:00 to 18:30 (both before and after vitamin supplementation). Subjects in the lowest quartile of protein intake after 17:00 at the preceding day had lower relative tHcy changes from 8:00 to 12:00 compared with the other quartiles. Vitamin supplementation lowered within-day CV_{bp} (20.7% to 14.8%).

Conclusion: tHcy measurement in the fasting state is not necessary. Protein intake in the preceding evening determines tHcy changes after breakfast. CV_{bp} is lowest after vitamin supplementation.