

Posterabstracts

Samenvattingen van de posterpresentaties tijdens het 57^e Congres van de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde op 22 en 23 april 2004 te Lunteren

Categorie 1: Analytisch

Fotometrie, electrochemie, sensortechnologie

1. A multicenter analytical evaluation of an enzymatic method for the measurement of plasma homocysteine and comparison with HPLC and immunochemistry

H.J. HUIJGEN¹, F.P.W. TEGELAERS², C.H.H. SCHOENMAKERS³, C.J. PRONK-ADMIRAAL⁴, S. EKEMA⁵
Department of Clinical Chemistry¹, BovenIJ Hospital, Amsterdam; Department of Clinical Chemistry², Medical Centre Alkmaar, Alkmaar; Department of Clinical Chemistry³, Elkerliek Hospital, Helmond; Department of Clinical Chemistry⁴, Gemini Hospital, Den Helder; Beckman Coulter Netherlands B.V.⁵, Mijdrecht, The Netherlands

Introduction: Increased plasma homocysteine (Hcy) has been associated with cardiovascular, cerebrovascular and peripheral vascular diseases. Increasingly laboratories offer a plasma Hcy assay and the two most widely used techniques are HPLC and immunochemistry.

Methods: In this multicenter study we evaluated a new automated enzymatic method for the measurement of plasma Hcy, implemented on both Synchron LX-20 and CX-5 analyzers, and compared this assay with the HPLC technique and an immunoassay.

Results: The enzymatic assay showed a good linearity over the concentration range 1.5 to 90.0 $\mu\text{mol/l}$. The detection limit on the LX-20 and CX-5 analyzer was 0.21 and 0.41 $\mu\text{mol/l}$, respectively. The within run imprecision varied from 1.0% (87.7 $\mu\text{mol/l}$) to 4.1% (6.7 $\mu\text{mol/l}$) and total imprecision varied from 2.5% (53.9 $\mu\text{mol/l}$) to 7.0% (6.4 $\mu\text{mol/l}$). Interference studies showed that haemoglobin, bilirubin and triglycerides

up to a concentration of 0.97 mmol/l, 267 $\mu\text{mol/l}$ and 9.7 mmol/l, respectively, did not interfere. Comparison with HPLC based on 100 plasma samples (range 5.2 to 110.7 $\mu\text{mol/l}$) showed a good correlation. The AxSYM immunoassay measures tHcy concentrations which are about 3% lower and the enzymatic test measures tHcy concentrations which are about 2-6% higher compared to HPLC.

Conclusion: This new enzymatic method for measuring tHcy in plasma performs well in a routine setting. Imprecision is acceptable in view of other assays used nowadays, especially HPLC, although the theoretical criterium of desirable performance of 4.3% is not met fully. The difference in measured concentrations between this method and other techniques is small; calibration of the test with samples provided by Institutes for External Quality Control can correct this minor point easily.

2. Lab-in-a-Cell: a microfluidic chip to study a single living cell

F. WOLBERS^{1,2}, A. VALERO¹, J. EMMELKAMP¹, W. ENGEL¹, H. ANDERSSON¹, A. van den BERG¹, I. VERMES²
MESA+ Research Institute¹, University of Twente, Enschede; Department of Clinical Chemistry², Medisch Spectrum Twente, Enschede, The Netherlands

Introduction: The application of microchip techniques has really entered life science and has started to serve as a driving force for discovery in cell biology, neurobiology, pharmacology and tissue engineering. As the field of cellomics is expected to become a very important one, a chip to perform single cell analysis will be developed. Therefore, the chip has to consist of a sorting unit, sampling unit and a connection to an analysing unit.

Methods: The research is divided in autofluorescence (AF) cell detection, electroporation, needle puncture and picosampling. AF cell detection and localization has been performed on a microfluidic glass chip using granulocytes and red blood cells. For electroporation, cells are trapped and electrodes generating a high electrical field create pores in the cell membrane. Further, silicon nitride microneedles (260nm thick) have

been made to analyse needle puncture through a cell membrane.

Results: With confocal microscopy, it is possible to sort red blood cells from granulocytes on a microfluidic glass chip on the basis of their intrinsic AF. Further, non-viable cells were distinguished from viable cells due to a lower AF intensity. For the sampling unit, an electroporation device and sharp needles have been made to be able to manipulate a cell. Extraction of cell fluid from oocytes has been performed.

Conclusion: Our results show the possibility to manipulate and analyse single living cells on chip. All units have to be organised on one fluidic-chip to be able to perform single cell analysis. Precise control of biochemical cellular environment and analysis of the composition of single cells will lead to Lab-in-a-Cell.

Hemocytometrie, flowcytometrie, hemostase

3. 'Less is more'; voordelen van vijfkleurenflowcytometrie

H. EIDHOF, W. te GREFTE, J. DANNEBERG, A. MARTENS

Klinisch Laboratorium, locatie Twenteborg Ziekenhuis, ZiekenhuisGroep Twente, Almelo

Inleiding: I.v.m. de aanschaf van een nieuwe flowcytometer (FC 500, Beckman Coulter) hebben wij een vijfkleurenpanel samengesteld voor onderzoek naar lymfocyten(sub)populaties in perifere bloed. Dit panel hebben wij vergeleken met een gebruikelijk driekleuren panel.

Methode: Voor het driekleurenpanel werd gebruik gemaakt van de labels Fitc, PE en PerCp. De combinaties van monoclonalen in het driekleurenpanel; buis 1: CD3,HLA Dr,CD45; buis 2: CD3,CD4,CD45; buis 3: CD3,CD8, CD45; buis 4: CD3,CD16/56,CD45; buis 5: CD5,CD19,CD45. In het vijfkleurenpanel werden de onderstaande combinaties gebruikt; buis 1: CD4, CD8, HLA Dr, CD45, CD3;buis 2: CD5, CD16/56, CD19, CD45, CD3.De labels die werden gebruikt waren resp. Fitc, PE, ECD, PerCp en PC7.

Resultaat: Voor gating van de lymfocyten werd gebruik gemaakt van CD45 en de zijwaartse lichtverstrooiing (SSC). Er

waren geen verschillen in het drie- en vijfkleurenpanel wat betreft de absolute aantallen c.q. percentages van de gemeten subpopulaties. In het vijfkleurenpanel waren nog 5 extra subpopulatie aantoonbaar zoals b.v. geactiveerde CD8 positieve lymfocyten. Ook waren er enkele LGL subpopulaties aantoonbaar waarvan de klinische betekenis (nog) niet geheel duidelijk is.

Conclusie: Vijfkleuren flowcytometrie is (t.o.v. driekleuren flowcytometrie) sneller en goedkoper. Tevens wordt meer informatie verkregen met gebruik van minder monoklonale antistof en monstermateriaal. Ook is een betere interne kwaliteitscontrole mogelijk. Voordelen vijfkleurenflowcytometrie: minder buisjes (2 i.p.v. 5), sneller werken, minder μL monoclonalen nodig (50 μL i.p.v. 75 μL = €13,50 i.p.v. €20,-), minder monstermateriaal nodig, meer discrete subpopulaties aantoonbaar (15 i.p.v. 10).

4. Nieuwe methode voor het bepalen van mitochondriële membraanpotentiaal in lymfocyten met flowcytometrie

J. HESSELS¹, M. van WIJNEN¹, R. WENSINK², H.H.M. EIDHOF²

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Deventer Ziekenhuis, Deventer; Klinisch Laboratorium², Twenteborg Ziekenhuis, Almelo

Inleiding: Mitochondriën zijn de energiecentrales in elke cel, waarin o.a. de citroenzuurcyclus en beta-oxidatie van vetzuren plaatsvindt en uiteindelijk de vorming van ATP. Bij deze processen komen electronen vrij die langs de verschillende complexen van de ademhalingsketen worden getransporteerd en komen protonen vrij die over de mitochondriële binnenmembraan worden getransporteerd. Het transport van deze electronen en protonen zorgt voor een hoog electrochemisch gradient (mitochondriële membraan potentiaal; MMP) van -190 mV. Bepaling van dit MMP kan inzicht geven in het cellulair metabolisme en apoptose.

Methode: We maken gebruik van lymfocyten uit gelyseerd EDTA bloed en JC-1 als fluorescerende probe. JC-1 vertoont een MMP afhankelijke accumulatie in mitochondriën. Door de hoge JC-1 concentratie ontstaat er door conformatie verandering (J-aggregaten) een verschuiving van de emissie fluorescentie van 540 nm naar 595 nm. De rood-oranje fluorescentie wordt gebruikt als maat voor MMP.

Resultaat: De invloed van JC-1 concentratie en oplosbaarheid in waterig milieu zijn bestudeerd. Evenals het effect van P-glycoproteïne, leucocyten aantal en invloed van medium. De compensatiefactoren en type emissie filters zijn beschreven. Reproduceerbaarheid en referentiewaarden zijn vastgesteld. Ter validatie zijn specifieke remmers van de ademhalingsketen gebruikt voor manipulatie van de MMP; een concentratie afhankelijke inhibitie is aangetoond van complex I (met rotenon), complex III (met antimycine A), complex IV (met cyanide en azide) en complex V (met dinitrofenol).

Conclusie: De geoptimaliseerde flowcytometrische bepaling is een robuuste en gevoelige methode om MMP te meten voor metabole studies.

Literatuur: Cossarizza A, et al. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophylic cation JC-1. *Biochem Biophys Res Comm* 1993; 197: 40-45.

5. Mathematical correction of the in-vitro storage related increase in erythrocyte mean cell volume (MCV) of an automated hematology analyzer- the CELL-DYN 4000

A. HUISMAN¹, R. STOKWIELDER¹, W.W. van SOLINGE¹, R. KENDALL²

Department of Clinical Chemistry & Laboratory Medicine¹, University Medical Centre Utrecht, The Netherlands; Abbott Diagnostics², Santa Clara, USA

Introduction: The erythrocyte-mean-cell-volume (MCV) increases during in-vitro storage. In aged specimens, this phenomenon can result in misclassification of erythrocyte size.

Methods: The MCV is closely correlated with the mean cell hemoglobin (MCH) which does not suffer the same degree of storage related change. This offers the opportunity to perform a mathematical prediction of the MCV in aged specimens. The mathematical correction proposed in this study uses the relationship $MCV = MCHC / MCH$. However, instead of using a constant value for MCHC, our approach has been further refined to take account of the weak, but direct relationship between MCH and MCHC. The slope and y intercept of this relationship was derived by linear regression and then used to predict an idealized MCHC, which in combination with the MCH was used to derive a predicted MCV. This method was

tested in 209 hospital patients using the CELL-DYN-4000 hematology analyzer

Results: The observed MCV after 24 and 48 hours of room temperature storage were on average 6.7 and 11.6 fL higher than the MCV values of the samples when processed fresh. In contrast, the mean bias of the predicted MCV values after 24 and 48 hours was -0.1 and 0.9 fL respectively. Our study also examined the use of the white cell viability fraction (WVF) as a means of predicting when to apply the mathematical correction. A WVF threshold of 0.95 successfully separated the fresh samples from those stored for 24 and 48 hours.

Conclusion: For those laboratories who process aged specimens, this offers the opportunity to report the MCV in fresh samples, whilst predicting and mathematically correcting the MCV in samples that are impacted by age related storage changes.

6. A simple algorithm using ZPP in the diagnosis of hemoglobinopathies in patients with microcytic anaemia

M.H. HERRUER, F.J.M. BERGKAMP, J.P.M.C. GORGELS

Medial, Medical Diagnostic Laboratories, Haarlem, The Netherlands

Introduction: In this prospective pilot study we investigated the efficacy of the simultaneous assay of mean cellular volume (MCV) and erythrocyte zinc protoporphyrin (ZPP) as a discriminator in diagnosing hemoglobinopathies and iron deficiency in anaemic patients.

Methods: The number of newly diagnosed hemoglobinopathies in the Netherlands is low compared to other European countries. Therefore we chose for a simple screening procedure using only EDTA-blood, as general practitioners and internists referring to our laboratory initially request only routine haematological analysis from patients with symptoms of fatigue. A combination of MCV and ZPP is very useful in the diagnosis of thalassemia syndromes since ZPP is elevated in iron deficiency anaemia and normal or slightly raised in thalassemia syndromes.

Results: In 500 subsequent patients with a $MCV < 70$ fl, ZPP was determined. 220 patients (44%) had a $ZPP < 150$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ haemoglobin. From these patients HPLC analysis of Hb was performed on a Variant 2 analyser (Bio-Rad, The Netherlands). We found 87 new beta-thalassemia minor (49%), 5 H₂PFH's, 3 HbS heterozygotes, 3 HbE heterozygotes, 2 delta-beta-thalassemia, 1 HbC heterozygote and 7 possible alpha-thalassemia minor (DNA analysis not performed).

Conclusion: Our pilot shows that a 50% increase in finding a thalassemia syndrome or another hemoglobinopathy can be achieved using a simple logistic algorithm and the ZPP assay. Patients with an $MCV > 70$ and/or $ZPP > 150$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Hb are only further investigated after a specific request from the physician.

7. Evaluation of a new automated latex particle immunoassay for D-dimer: D-Dimer PLUS

H.J. VERMEER^{1,2}, A.A. MURADIN¹, W. van SPRONSEN-HATZMANN¹, P.YPMA¹, K.C. van de NOORT³, W.B.J. GERRITS¹, P.W. WIJERMANS¹

Department of Hematology¹, Department of Clinical Chemistry², Emergency Department³, Leyenburg Hospital, The Hague, The Netherlands

Introduction: Quantitative measurement of D-dimer is a highly useful tool in the assessment of acute deep venous thrombosis (DVT) or pulmonary embolism (PE). However, it is well-known from literature that D-dimer can only be used for the exclusion of PE and DVT if the D-dimer level is below the cut-off value and the clinical probability not high. The diagnostic performance of a new rapid D-dimer assay (D-Dimer PLUS, Dade Behring) on a coagulation analyzer (Sysmex CA-1500) was evaluated in a prospective study in our hospital during a 6-month follow-up for the exclusion of PE and DVT. Until now, only a few studies are published using this assay.

Methods: The study was performed in out-patients (n = 149) referred to the emergency department clinically suspected for venous thromboembolism (VTE). As reference standard helical CT scanning was used for patients suspected of PE, and

duplex ultrasonography examination for DVT. Coefficients of variation were between 7.3 and 8.9%. A standard plasma D-dimer cut-off value of 130 ng/ml was used.

Results: Thrombosis was detected in 20 patients (PE in 18 patients and DVT in 2 patients). One patient with PE had a D-dimer < 130 ng/ml and was thus missed by the assay. However, re-examination of the CT-scan showed the presence of an old pulmonary embolism. The sensitivity and specificity of the D-Dimer PLUS assay in this study was (95%) and (32%), respectively. The negative predictive value was 98%.

Conclusion: In our hospital, we will further evaluate the usefulness of this assay for patients with suspected PE or DVT submitted to a diagnostic strategy combining pretest clinical probability score, D-dimer and lung scan.

8. Routinematig gebruik van de DiffMaster Octavia voor de leukocytdifferentiatie

R.H. TRIEPELS, I. HUISKES-BLOEMEN, C.J.A. DOELMAN

Klinisch Chemisch Laboratorium, Medisch Spectrum Twente, Enschede

Inleiding: De ontwikkeling van kwalitatief hoogwaardige computer- en camera-systemen opent mogelijkheden tot automatisering van de microscopische celdifferentiatie. De DiffMaster is een geautomatiseerde digitale microscoop waarmee via geavanceerde computersoftware op grond van optische eigenschappen preclassificatie van leukocyten mogelijk wordt gemaakt. De preclassificatie van de verkregen digitale leukocytenafbeeldingen kan via een eenvoudige beeldopmaak met snelle handelingen worden gecorrigeerd en geautoriseerd door de gebruiker. De kwaliteit en bruikbaarheid van de DiffMaster zijn getoetst in vergelijking met de manuele microscopische beoordeling van bloedpreparaten.

Methode: Door 10 gespecialiseerde analisten zijn ruim 700 bloedpreparaten, die op grond van uiteenlopende pathologie door de Sysmex-9500-apparatuur zijn geselecteerd uit de dagelijkse routine, met de DiffMaster geanalyseerd. Een adequate arbeidstijdsanalyse in relatie tot de manuele differentiatie en voor- en nadelen zijn nauwkeurig geregistreerd.

Resultaat: Voor de totale leukocytenpopulatie classificeert de

DiffMaster 90% van de cellen juist. Wanneer de preparaten worden geclassificeerd op het jongste type voorlopercel die in het preparaat is waargenomen, wordt een percentage van 88% behaald in preparaten waarbij de promyelocyt als jongste voorloper voorkomt. In de populatie uitstrijkpreparaten waarbij de blast als jongste voorloper voorkomt daalt de juistheid tot 70%. In de betreffende korte periode waarin van de DiffMaster is getest, is geen tijdswinst ten opzicht van de manuele differentiatiebeoordeling waargenomen.

Conclusie: De DiffMaster is een geautomatiseerde digitale microscoop die alleen optimaal inzetbaar is in combinatie met geautomatiseerde uitstrijkapparatuur. De mate van voorkomende pathologie in de te analyseren patiëntenpopulatie is bepalend voor juistheid van de DiffMaster. De digitale beeldbeoordeling alsmede het gemis van de basale microscoopfuncties vereist enige gewinning van de gebruiker. Meer ervaring van de operator zal de voordelen van digitale beeldverwerking van cellen uiteindelijk zwaarder laten wegen dan de nadelen.

9. Flowcytometrische leukocytentelling; een (interne) referentie- en alternatieve methode voor de hemocytometrische leukocytentelling

M.H. BEUNIS, W. de VRIES, M. van der BOOR, J.G. PEGELS

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Sint Franciscus Gasthuis, Rotterdam

Inleiding: Voor de validatie van de leukocytentelling op de LH (Beckman-Coulter) zochten we naar een betrouwbare interne referentie methode. Deze methode moest tevens te gebruiken zijn als controle bij storende elementen zoals normoblasten, trombocytenuitstapelingen en celresten en ingezet kunnen worden voor het bepalen van lage concentraties leukocyten in volbloed en andere lichaamsvochten. We onderzochten of het aantal leukocyten relatief eenvoudig en betrouwbaar bepaald kon worden met de flowcytometer.

Methode: 20 µl EDTA bloed wordt 10 min geïncubeerd met 5 µl CD45-ECD (leukocyten antigeen), 5 µl CD14-PE en 5 µl CD15-FITC. Vervolgens wordt 1 ml lysisbuffer toegevoegd. Na 10 min incuberen wordt 20 µl latexbolletjes (Beckman-Coulter, flowcount) toegevoegd. Het aantal leukocyten wordt berekend uit het aantal CD45+ events ten opzichte van de bolletjes standaard.

Resultaat: Variatie in de lysistijd beïnvloedde weliswaar de plaats van de cellen in het FS-SS plot maar het aantal leukocyten bleef constant. Het leukocytenaantal kon nog bepaald worden in een 7 dagen oud EDTA volbloed monster. We vonden geen verschil tussen twee batches flowcount. De reproduceerbaarheid (n=10) was 3% voor een leukocyten concentratie van $1,1-16,0 \times 10^9 /l$. De detectiegrens was $0,3 \times 10^9 /l$. In vergelijking met de LH werden 10% lagere waarden gevonden ($Y = 0,7 + 0,83 X$).

Conclusie: De flowcytometrische leukocytentelling is een betrouwbare methode om leukocyten te tellen, een goed alternatief voor monsters waarin de hemocytometrische methode beïnvloed kan worden door storende elementen en tevens een basis voor een kwantitatieve leukocytendifferentiatie. In vergelijking met de LH en met de gemiddelde waarden in de SKZL enquête worden lagere concentraties gemeten.

10. Kwantitatieve flowcytometrische leukocytendifferentiatie

M.H. BEUNIS, W. de VRIES, M. van der BOOR, J.G. PEGELS

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Sint Franciscus Gasthuis, Rotterdam

Inleiding: Bij een leukocytenconcentratie $< 1,0 \times 10^9 /l$, zowel in volbloed als in andere lichaamsvochten is de leukocytendifferentiatie van de LH niet gevalideerd (differentiatie wordt met een waarschuwingscode gegeven). De meeste differentiatie aanvragen bij een leukocytenaantal $< 1,0 \times 10^9 /l$ zijn afkomstig van cytostatica patiënten waarbij de behandelend arts met name het aantal neutrofielen wil weten. Ook bij een dif aanvraag in andere lichaamsvochten (liquor, dialysaat, synoviaal vocht) is de arts vooral geïnteresseerd in de verhouding neutrofielen, monocyt en lymfocyten. De microscopische differentiatie is tijdrovend en arbeidsintensief. We onderzochten of de methode om flowcytometrisch leukocyten te differentiëren in deze gevallen een bruikbaar alternatief is.

Methode: 20 µl EDTA bloed wordt 10 min geïncubeerd met 5 µl CD45-ECD, 5 µl CD14-PE en 5 µl CD15-FITC. Vervolgens wordt 1 ml lysisbuffer toegevoegd. Na 10 min incuberen

wordt 20 µl latexbolletjes (flowcount, Beckman-Coulter,) toegevoegd. Voor de leukocytendifferentiatie is het aantal neutrofielen gedefinieerd als het aantal CD45+/CD15+ cellen, het aantal monocyt en als CD45+/CD14+ cellen en het aantal lymfocyten als SSlow/CD45+ cellen.

Resultaat: De resultaten van de kwantitatieve monocyt en lymfocytenpopulaties verkregen met de flow zijn goed vergelijkbaar met de kwantitatieve LH subpopulaties. Door verlenging van meettijd kan de leukocytendifferentiatie ook worden bepaald bij lage leukocytenconcentraties.

Conclusie: De flowcytometrische leukocytendifferentiatie is een gemakkelijke methode om in een klein volume (20 µl) en bij een lage leukocytenconcentratie het aantal neutrofielen en lymfocyten te bepalen. De leukocytendifferentiatie van de LH lijkt ook bij lage leukocytenaantallen betrouwbaar.

11. Flowcytometrisch onderzoek naar de biochemische modulatie van de mitochondriële membraanpotential in lymfocyten

J. HESSELS¹, R. WENSINK², M. van WIJNEN¹, H. EIDHOF²

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Deventer ziekenhuis, Deventer; Klinisch Laboratorium², Twenteborg Ziekenhuis, Almelo

Inleiding: Het verlies van de mitochondriële membraanpotential (MMP) wordt gezien als één van de eerste stappen tot apoptose van cellen. De MMP in lymfocyten kan gemeten worden met behulp van flowcytometrie en JC-1 als fluorescerende marker. In dit onderzoek hebben we het effect bestudeerd van diverse substraten en intermediaire metabolieten op het behoud van de MMP tijdens (oxidatieve) stress.

Methode: Lymfocyten zijn in verschillende media geïncubeerd met glucose, galactose, fructose, pyruvaat, citraat, capronzuur, octaanzuur, alanine of geen energiesubstraat. Tijdens de incubatie zijn verschillende vormen van stress toegepast: substraat depletie, verandering van redoxpotential met zwavelhoudende aminozuren of phorbolmyristezuur(PMA). Na incubatie zijn cellen behandeld met JC-1 en het percentage rode fluorescentie als maat voor de MMP in de lymfocyten.

Resultaat: Bij langdurige incubatie zonder substraat (substraat-

depletie) verliezen nagenoeg alle mitochondriën in de lymfocyten hun MMP. Octaanzuur, capronzuur en citroenzuur zijn niet in staat dit te voorkomen. Glucose, galactose en alanine zijn in staat dit voor ca. 80 % te voorkomen en pyruvaat voor bijna 100%. Van de zwavelhoudende aminozuren hebben alleen cysteïne en glutathion een dramatisch effect op de MMP. Van alle substraten is alleen pyruvaat (5 mM) in staat dit effect volledig teniet te doen. Zeer lage dosis van PMA (2 nM) geven een daling in MMP van 80 - 90 %. Ook hier is alleen pyruvaat in staat om het effect van PMA op de MMP te voorkomen.

Conclusie: Het effect van intermediaire metabolieten en oxidatieve stress op de membraanpotential van mitochondriën kan eenvoudig met flowcytometrie worden bestudeerd. De resultaten suggeren dat pyruvaat niet alleen als substraat functioneert, maar ook een sterke anti-oxidatieve werking heeft.

12. Evaluation of the CSF mode of the Advia 120 Hemocytometer

K. VROONHOF¹, R. STOKWIELDER¹, C. van ROOIJEN², M. KUHBAUCH², J. van de BOOGAART², A. HUISMAN¹
Central Diagnostic Laboratory¹, University Medical Centre, Utrecht; Division Health Care², Bayer BV, The Netherlands

Introduction: The Bayer Advia 120 hemocytometer is equipped with a cerebrospinal fluid (CSF) mode which is not currently used in the Netherlands. During five months we evaluated this CSF mode.

Methods: Routine CSF samples were measured on the Advia 120. Results were compared to a manual counting and manual differential method. Samples that did not fulfill the Advia criteria (specified in the manual) and samples with a large difference in manual duplicate were not included.

Results: To evaluate the erythrocyte and leucocyte counts, 67 samples were used. For the erythrocytes this resulted in a regression line $y = 1.044x + 3.202$ and a correlation of 0.959. A disadvantage is the fact that samples containing over 1500 erythrocytes need to be diluted, with a maximum of 10 times. This means that samples containing over 15.000 erythrocytes

cannot be counted with the CSF mode. This is a rare event. For the leucocyte count comparison resulted in a regression line $y = 1.024x + 3.133$ and a correlation of 0.957. The customer bulletin states that the Advia can differentiate leucocytes from 20 WBC/ml. 19 samples fulfilled this criterion and Advia results were compared with the manual differentiation. The following correlation coefficients were obtained for the absolute count: neutrophils $r^2 = 0.897$, lymphocytes $r^2 = 0.901$, monocytes + macrophages + siderocytes $r^2 = 0.918$. A disadvantage is the fact that the Advia 120 cannot specify macrophages and siderocytes, they are counted as monocytes.
Conclusion: The CSF mode on the Advia 120 is useful for the counting of cells in CSF. The differentiation gives good results. The disadvantages need to be reviewed in each laboratory setting.

Immunoassay, (bloedgroepen-)serologie

13. Quantitative analysis of anti-endomysium IgA antibodies by a novel ELISA compared to qualitative analysis by immunofluorescence

D.C.W. POLAND, C. BEIJER

Department of Clinical Chemistry, Diaconessenhuis, Leiden, The Netherlands

Introduction: Coeliac disease is associated with gastrointestinal damage. A biopsy from the proximal small intestine is essential for diagnosis. The number of biopsies can be dramatically reduced by an objective, reliable, and easy to perform serologic screening. Antibodies most commonly detected in clinical routine are anti-tissue transglutaminase (anti-tTGA) IgA and anti-endomysium (anti-EMA) IgA. Anti-tTGA antibody detection is based on an ELISA. Anti-EMA antibody detection is performed by immunofluorescence (IF). Disadvantages of IF are the high costs, the need for extensively trained personnel and the time-consuming procedure.

Methods: In this study we evaluated a new commercially available anti-EMA ELISA and compared these data with anti-EMA results obtained by IF. The study population consisted of 158 patients with gastrointestinal symptoms and suspected malabsorption. The diagnosis coeliac disease was based on clinical and histological findings.

Results: Of the 158 samples tested for anti-EMA antibodies by IF, 18 were positive, 38 were dubious and 102 were negative. All samples tested positive by IF were also tested positive by ELISA and coeliac disease could be confirmed in only 16 patients. In the group of 38 samples with dubious IF results, 3 patients were tested positive by ELISA. Coeliac disease was proven in these 3 patients. 2 out of 102 samples tested negative by IF were found positive by ELISA, only one had proven coeliac disease.

Conclusion: With a sensitivity and specificity of 100% and 97% we conclude that this ELISA could replace the IF method for detection of anti-EMA antibodies in the absence of IgA deficiency. Advantages of the EMA-ELISA are quantitative results that are easy to interpret in contrast to IF that is hampered by dubious results.

14. Chlamydia trachomatis-serodiagnostiek bij subfertiliteit

M.E.P SLOBBE-van DRUNEN¹, J.E. den HARTOG², G. GRAULS³, J.A. LAND², C.A. BRUGGEMAN²

Afdeling Klinische Chemie¹, Maasland Ziekenhuis, Sittard; Afdeling Obstetrie en Gynaecologie², Academisch Ziekenhuis, Maastricht; Afdeling Medische Microbiologie³, Academisch Ziekenhuis, Maastricht

Inleiding: *C. trachomatis* is een obligate intracellulaire gram negatieve bacterie met zeer diverse klinische manifestaties zoals zelf limiterende oog en genitale infecties tot chronische ontstekingen die kunnen leiden tot blindheid, artritis of subfertiliteit. *C. trachomatis* infecties worden vooral opgelopen tijdens de adolescentieperiode. Van deze infecties verloopt ongeveer 80% asymptomatisch. Deze onopgemerkte en derhalve niet gediagnosticeerde infecties kunnen bij een vrouw leiden tot subfertiliteit. Om de oorzaak te achterhalen voor de subfertiliteit bij deze vrouwen is het diagnostisch verantwoord om ze te screenen op *C. trachomatis*-IgG-antilichamen. Deze studie is opgezet om na te gaan welke serologische IgG-test voor *C. trachomatis* de beste predictieve waarde voor het aantonen van *C. trachomatis* geassocieerde tubopathologie.

Methode: Voor dit onderzoek hebben 315 patiënten laparoscopie ondergaan en is het serum van deze vrouwen geanalyseerd met 5 verschillende *C. trachomatis*-IgG-testen. Twee micro

immuofluorescentie(MIF)-testen (Biomerieux en Labsystems) en drie ELISA's (Labsystems, Medac en Savyon).

Resultaat: De MIF van Labsystems heeft de beste 'odds ratio' (15,7). Van de verschillende ELISA's heeft Medac de hoogste 'odds ratio' (8,2). Dat de positief voorspellende waarde van al deze testen laag ligt (tussen 28-58%) wordt veroorzaakt door het feit dat allerlei andere factoren tubopathologie kunnen induceren. De negatief voorspellende waarde van deze testen ligt tussen de 88-92%.

Conclusie: In deze studie blijkt dat de MIF-test van Labsystem en de pELISA van Medac de beste associatie weergeeft tussen *C. trachomatis*-IgG en tubopathologie. De MIF heeft als nadeel dat het arbeidsintensief en subjectief is. Door vooraf te screenen op *C. trachomatis* met de MIF van Labsystems of met de pELISA van Medac kan al een goede selectie gemaakt worden voor patiënten die vroegtijdig in aanmerking komen voor laparoscopisch onderzoek. Hierdoor wordt tijd en geld bespaard.

15. An ELISA for the determination of lipoprotein(a) with careful accuracy targeting

E. BOLAT, H. TOENHAKÉ-DIJKSTRA, L.J.H. van TITS, P.N.M. DEMACKER
Laboratory General Internal Medicine, University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

Introduction: High concentrations of lipoprotein(a) or Lp(a) are atherogenic, while also a role is thought in the plasmin generation due to its similarity with plasminogen. Consequently, on the clinical laboratory, request for Lp(a) assays are increasing, not only for screening and family studies to advise a healthier life style, but also to monitor response to statin therapy to lower plasma cholesterol concentration.

Methods: A polyclonal antibody against Lp(a) was developed in rabbits. It was monospecific without any cross reaction against other apoproteins and plasminogen. The anti-Lp(a) antibody was used both as coating and as detecting antibody in an ELISA.

Results: A pooled serum as a calibrator containing most Lp(a) isoproteins, and the above mentioned polyclonal antibody, made the assay insensitive for Lp(a)-isoprotein variation. This was also apparent from an IFCC evaluation. The method was

very sensitive and showed a close concentration-response over a wide range (from 10 to 1500 mg/l of Lp(a)). Results with the Elisa (y) and the RIA correlated well: for 182 sera the regression equation was $y = 1.09x - 13$, $r = 0.89$, $n = 182$ (in the RIA, 1 unit was arbitrary considered equal with 0.7 mg). The serum pool calibrator targetted with the RIA method and a calibrator of DAKO (traced to an internal standard lipoprotein reference preparation) gave exactly the same results. Within day precision was excellent (<3%); between day precision around the cut of limit of 300mg/l amounted to 9% ($n = 9$).

Conclusion: Observing that the reference method has a within day CV of at least 10 % at higher concentrations, our newly developed ELISA method is both accurate and precise. This method forms a solid base for future clinical and epidemiological studies.

16. Evaluatie van de Nichols Institute Diagnostics thyroglobuline assay voor monitoring van patiënten met gedifferentieerd schildklier carcinoom

J.M.W. van den OUWELAND¹, E. HEINE¹, A. PERSOON², T.P. LINKS²
Afdeling Pathologie en Laboratoriumgeneeskunde¹, Afdeling Endocrinologie², Academisch Ziekenhuis Groningen, Groningen

Inleiding: In de follow-up van patiënten met gedifferentieerd schildklier carcinoom (DTC) is de bepaling van het schildklier-eiwit thyroglobuline (Tg) essentieel. Internationale richtlijnen schrijven een functionele sensitiviteit voor van 1 ng/ml. Onze huidige methode (IRMA Cisbio) voldoet hier niet aan. Tevens blijkt de Cisbio recovery procedure, als maat voor Tg-antilichamen (Tg-al) interferentie, niet informatief. De Nichols Advantage Tg is getest op o.a. sensitiviteit en gevoeligheid voor Tg-al interferentie middels recovery experimenten.

Methode: Voor de studie werden 162 sera van patiënten met DTC gebruikt. Naast Tg (Cisbio IRMA en Nichols Adv) werden alle sera gescreend op Tg-al (Nichols Adv anti-Tg assay). Sensitiviteit van de Nichols Tg werd getest door verdunningen (1/2, 1/4, 1/8, 1/16) van een serum pool met concentratie 1,2 ng/ml in 4-voud over een periode van 5 dagen te meten. In alle Tg-al positieve sera werd een recovery meting uitgevoerd

middels Tg spiking (10 ng/ml) om Tg-al interferentie in de Tg assay te kunnen vaststellen.

Resultaat: Functionele gevoeligheid (CV < 20%) was beter dan 0,2 ng/ml. In 16 van de 162 sera (10%) was er wel met Nichols assay Tg meetbaar, maar niet met de Cis bio IRMA (< 2 ng/ml). In 21 sera werden Tg-al aangetoond (13%). Tg-recovery was hierbij in 12 gevallen verlaagd (ref: < 80%). In 10 hiervan (10/12) was er geen Tg aantoonbaar ondanks klinische verdenking op ziekteactiviteit. In de 9 Tg-al positieve sera met normale recovery (ref: > 80%) was Tg wel meetbaar.

Conclusie: Nichols Tg assay is gevoeliger dan onze huidige IRMA Tg bepaling en heeft voordelen in de uitvoeringswijze (non-isotoop op geautomatiseerd platform). De mate van Tg-al interferentie in de Tg assay in relatie met de Tg-recovery uitslagen vergt nader onderzoek.

Chromatografie: HPLC, GC, CE

17. Determination of the deoxycytidine kinase activity in cell homogenates with a non-radiochemical assay using reversed-phase HPLC. Identification of a novel metabolite of 2-chlorodeoxyadenosine

J. BIERAU^{1,2}, R. LEEN¹, A.H. van GENNIP^{1,2}, H.N. CARON³, A.B.P. van KUILENBURG¹
Department of Clinical Chemistry and Emma Children's Hospital¹, Academic Medical Centre, University of Amsterdam, Amsterdam; Department of Biochemical Genetics², Academic Hospital Maastricht; Department of Paediatric Oncology and Haematology³, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Deoxycytidine kinase (dCK) is a deoxynucleoside kinase with a broad substrate specificity. Standard procedures to measure dCK activity rely on thin-layer chromatography or weak ion-exchange paper chromatography as analytical techniques. A major disadvantage is that interfering metabolites may not be detected. We have developed a non-radiochemical procedure to measure the dCK activity in cell homogenates. 2-Chlorodeoxyadenosine (CdA) was used as the substrate and was separated from its metabolites by reversed-phase HPLC.

Methods: HPLC was performed at ambient temperature using a 250 x 4.6-mm Supelcosil LC-18-S column at a flow rate of 1 ml/min, using a gradient of 50 mM NH₄H₂PO₄ (pH unadjusted) (Buffer A) and 50% methanol/ 50% Buffer A v/v (Buffer B) using DAD-detection. The effects of formation of metabolites other than CdAMP were studied by adding specific inhibitors of these side-reactions.

Results: Complete separation of CdA and metabolites was achieved in 30 minutes. Under standard reaction conditions, CdA was not only converted to CdAMP, but also to 2-chloroadenine (CAde) and, surprisingly, to 2-chlorodeoxyinosine (CdI). Excess dCyd inhibited the phosphorylation of CdA > 90%, but not the side-reactions. The phosphorylase reaction may be catalysed by purine-nucleoside-phosphorylase (PNP). Addition of inosine, the preferred substrate of PNP, inhibited the formation of CAde by 30-60%. Deoxycoformycin, an inhibitor of adenosine deaminase (ADA), completely inhibited the deamination of CdA, demonstrating that CdA is a substrate for ADA, contrary to general belief. In our method, the additional metabolites were separated from CdAMP and proved not to influence the dCK activity measured.

Conclusion: This HPLC method provides a reliable assay to determine dCK activity in cell homogenates. We demonstrated that CdA is a substrate for ADA.

18. Evaluation of three HbA1c analysers

H.B.J.M. BRINKMAN, F.E.A.M. VERHEUL

General Clinical Laboratory (AKL), Ysselland Hospital, Capelle aan den Yssel, The Netherlands

Introduction: Three HbA1c analysers, Menarini HA8160, Tosoh Bioscience G7 (both using cation-exchange HPLC) and Bayer DCA2000+ (immunoassay technique) were compared.

Methods: The HA8160 and G7 were DCCT calibrated, the DCA2000+ is a ready-to-use instrument. Analytical inaccuracy was measured by comparing the results of 100 samples with the results of a reference laboratory (SKB, Winterswijk). Analytical imprecision was measured by analysing two levels of Biorad controls once a day for 10 days. Thalassaemia modes of the HA8160 and the G7 were compared to check whether samples with abnormal hemoglobins could be detected. Blood samples with abnormal hemoglobins were obtained from reference laboratories.

Results: At HbA1c levels of 5,5 and 10,5% we found a within

run CV of 1.5–0.6% for the HA8160 and 0.6–0.5% for the G7. The between run accuracy at the same levels were 0.9–1.1% (HA8160), 0.9–0.6% (G7) and 2.3–1.9% (DCA2000+), respectively. Good correlation of all 3 analysers with the reference method was obtained. The chromatograms of the G7 are more detailed, which is especially useful in the thalassaemia mode: samples of patients with AS, AC, AD, AE, SS and CC variants were all identified correctly by the G7, where as the HA8160 only can mention S/C windows. The identification of samples of patients with β thalassaemia was a problem for both analysers. **Conclusion:** The DCA2000+ is a usefull analyser for a small scale laboratory and the doctor's office. Analytical differences between the HA8160 and G7 are minimal. The Tosoh G7, however, performed better in the thalassaemia mode.

19. Norepinephrine detection in "Tree Shrews" urine using LC-Tandem MS to verify that stress-induced alterations are prevented by the NK1 receptor antagonist SLV 323

J.A.M. BERK¹, A. van der LAAN², A. WOLTHUIS¹, L. J. OPPENHEIMER¹, G. HOMMEMA¹, P.H. van AMSTERDAM², M.G.C. van het HART³, M.B. HESSELINK², E. FUCHS³
Stichting KCL¹, Leeuwarden; Solvay Pharmaceuticals², Weesp, The Netherlands; Clinical Neurobiology Laboratory³, German Primate Centre, Goettingen, Germany

Introduction: To investigate the therapeutical potentials of the NK1R antagonist SLV 323 in the chronic psychosocial stress paradigm of adult male tree shrews, a sensitive noradrenaline assay was developed using LCMSMS.

Methods: The isolation of catecholamines was achieved with liquid liquid based extraction using complicated complex formation in combination with ion pairing. A LCMSMS (API 3000) method was developed and an "in study" validation was performed.

Results: Absolute recovery based on peak area; assay peak/mobile phase peak: Norepinephrine 96,3% at 165 nMol/l, n=6; Dihydroxybenzylamine 91,7% at 500 nMol/l, n=5; Functional assay range 78 to 1000 nMol/l Norepinephrine. Chronic psychosocial stress induced an increase in urine-

levels of Norepinephrine. The NK1R antagonist (SLV323) counteracted these stress induced alterations.

Conclusion: The newly developed noradrenaline assay (developed under GLP conditions), revealed a very good recovery, reproducibility and repeatability. Using this assay, the activity of the potential drug SLV 323 could be closely monitored: chronic psychosocial stress induced an increase in urine-levels of norepinephrine. These stress effects were prevented by concomitant administration of the NK1R antagonist yielding normal values and thus suggesting that SLV 323 is able to counteract stress-induced neuroendocrine alterations.

Literature: Science 1998; 281: 1640-1645. Stress 2002; 5: 37-46. J Chromatogr B 1982; 231: 25-39.

20. De analyse van carotenoïden en vetoplosbare vitamines in bloedmonsters van prematuren

L.D. DIKKESCHEI¹, J. SLOOTSTRA¹, C.M. van BEUSEKOM², R.A. van LINGEN³, D. van ZOEREN³

Laboratorium¹, Afdeling Kindergeneeskunde, Subafdeling Neonatologie³, Isala Klinieken, Zwolle; Friesland Nutrition Research², Leeuwarden

Inleiding: Bij prematuur geboren kinderen komen respiratoire aandoeningen vaak voor, waardoor kunstmatige beademing noodzakelijk is. Om de rol van oxidatieve stress hierin te bepalen is een onderzoek gestart naar de anti-oxidant-status. Dit onderzoek is vooralsnog gericht op de analyses van de vetoplosbare vitamines A en E (VitA/VitE) en de carotenoïden lycopene (LC), alfa- en β -caroteen (AC en BC) direct na de geboorte en op het concentratieverloop van deze anti-oxidanten in de eerste drie levensweken.

Methode: Twee commerciële HPLC-kits (Biorad, Chromsystems) voor de analyses van resp. VitA/VitE en van BC zijn aangepast op de minimale monstervolumes (100 μ L) en de laatste voor de analyse van AC en LC. VitA, VitE, AC, BC en LC concentraties zijn vervolgens bepaald in bloed van prematuren op dag 1,3,7 en 21.

Resultaat: Tot nog toe zijn 34 (van 80) (17:17 M/V) prema-

turen (gemiddelde zwangerschapsduur 28,9 \pm 1,7 weken, geboortegewicht 1144 \pm 364 g), geïncubeerd. Bij hen blijkt VitE op dag 1 deficiënt te zijn (9,3 \pm 3,6 μ mol/L) en daarna snel te stijgen (32 \pm 19 μ mol/L). VitA is gedurende deze periode laag normaal (0,50 \pm 0,20 μ mol/L). Deze bevindingen komen overeen met de literatuur. De concentraties van BC (34,8 \pm 17,5 nmol/L), AC (9,6 \pm 4,8 nmol/L) en LC (36 \pm 21 nmol/L) zijn vergelijkbaar met eerder gepubliceerde waarden. In de onderzoeksperiode verandert AC niet, vertoont BC een stijgende en LC een dalende tendens op de vier achtereenvolgende meetdagen.

Conclusie: In het bloed van prematuren is postpartum het verloop van de concentratie van vitamine A, vitamine E, alfa-caroteen, β -caroteen en lycopene te bepalen met deels aangepaste commerciële HPLC-kits.

21. Evaluation of haemoglobin F and A2 values as determined on an Arkray HA-8160 A1c analyser (TP-mode)

J. van den BOSSCHE¹, N. van DUN¹, N. JACOBS¹, E. GERLO², A. WAUTERS¹

Clinical Laboratory¹, General Hospital Middelheim, Antwerp; Department of Clinical Chemistry²; University Hospital of the Free University, Brussels, Belgium

Introduction: We evaluated the determination of haemoglobin (Hb) F and HbA₂ on an Arkray HA-8160 automated HbA_{1c} analyser using the Thalassemia Screening mode (TP-mode).

Methods: Within-run imprecision was determined by performing 10 replicate measurements of whole blood samples with different levels of HbF and HbA₂. Coefficients of variation (CV) were calculated. Three levels of commercial controls (Biorad) were processed according to NCCLS EP-10 guidelines. Bias, compared to a target value (sleeve insert), and imprecision were calculated. Following EP-9 guidelines, HA-8160 results of 30 patients were compared with routine laboratory methods (HbF Quiplate kit and HbA₂ Quick Column kit; Helena Laboratories). Correlation coefficient (r) and bias, at a medical decision limit (X_c), were calculated.

Results: Within-run CV's for HbF and HbA₂ were <5% for all samples and controls tested. EP-10 based imprecision was < 5% at every level for HbF and A₂. EP-10 based bias was <10% for HbF and <22% for HbA₂. Using EP-9, we found a reasonable correlation with our routine methods for HbF (r:0.91) and HbA₂ (r:0.5). Bias at X_c was -0.43% for HbF (X_c: 2%) and -0.1% for HbA₂ (X_c: 3.5%).

Conclusion: The Arkray HA-8160 analyser has a good analytical performance for HbF and HbA₂ determination. Bias compared to other methods can partially be explained by the lack of an international standard. Since the analyser offers calibration this bias can possibly be overcome in the future. The TP-mode offers other advantages well known from automated Hb A_{1c} analysis.

Moleculaire biologie

22. Hemochromatosis detection in the Breda region- an updated diagnostic strategy

A. KOEKEN, L. SCHRAUWEN, E. de BAAR, C.M. COBBAERT

Department of Clinical Chemistry and Hematology, Amphia Hospital, Breda, The Netherlands

Introduction: Referred Caucasian patients which are clinically and biochemically suspected of having primary hemochromatosis (PH) are routinely tested for the most prevalent HFE gene mutations (C282Y and H63D) in our hospital. Testing is done according to NVKC guidelines. With respect to the pathogenesis of PH, increasing genetic heterogeneity has been unravelled recently. In order to improve the diagnostic efficiency for PH, the added value of the newer mutations was investigated.

Methods: A selected subgroup (n=66), characterized by elevated transferrin saturation (TS > 50% in M; > 45 % in F) and ferritin (fer > 280 µg/L), was retrospectively examined. 26/66 (39%) of the pts were confirmed to be C282Y/C282Y or C282Y/H63D, whereas 40/66 had a HFE genotype not corroborating the diagnosis of PH. The latter were tested for the N144H-mutation in the FPN1 gene by PCR-RFLP and for 15

other mutations in the HFE, TFR2 and FPN1 genes using a reverse hybridisation assay.

Results: Three out of 40 pts were shown to carry the N144H-mutation, two pts being heterozygous for the N144H-mutation (M, 77yr, TS 90%, fer 1270 µg/L; F, 39yr, TS 50%, fer 389 µg/L) and one young male being compound heterozygous for the N144H/C282Y mutations (M, 33 yr, TS 91%, fer 1628 µg/L). No other mutations were detected.

Conclusion: We conclude that 8% (3/40) of the suspected and unconfirmed pts in our selected subgroup carry the N144H-mutation. No other rare HFE, TFR2 or FPN1 gene mutations were found. Consequently, N144H genotyping is now added as a third step in our diagnostic PH cascade in the Breda region, after biochemical screening and HFE genotyping. According to our limited experience, %TS apparently remains the benchmark criterion for PH detection.

23. Determination of 5-HT_{2a}R His452Tyr, 5-HT_{2a}R 102T/C, and DRD₂ -141C Ins/Del polymorphisms in whole-blood and buccal swabs using PCR-RFLP genotyping

A.F.Y. AL HADITHY¹, N.E. AJUBI², J. SLOMP², J.R.B.J. BROUWERS^{1,4}, H. STORM², B. WILFFERT^{1,3,4}

Department of Social Pharmacy, Pharmacoepidemiology and Pharmacotherapy¹, Groningen University Institute for Drug Exploration (GUIDE), Groningen; Department of Clinical Chemistry², Stichting KCL, Leeuwarden, The Netherlands; Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität³, Bonn, Germany; Hospital Pharmacy⁴, subdivision Clinical Pharmacy and Pharmacology, Zorggroep Noorderbreedte (Leeuwarden) and De Tjongerschans (Heerenveen), The Netherlands

Introduction: Polymorphisms in the human serotonin 2a receptor (His452Tyr and 102T/C) and in the promoter region of human dopamine 2 receptor (-141C Ins/Del) genes are hypothesized to affect clinical response to antipsychotics. PCR-RFLP genotyping for these polymorphisms has been described using whole-blood (WhBl) DNA isolates (1,2). However, amplification of the dopamine promoter region containing the single nucleotide polymorphism (SNP) has been difficult to achieve, due to its high GC content. Aims: To optimize determination of His452Tyr, 102T/C, and -141C Ins/Del SNPs using WhBl DNA, and to set up non-invasive determination methods for these SNPs allowing investigation of the relation between genotype and the clinical response to antipsychotics.

Methods: DNA was isolated using two commercially available kits; Roche's High Pure Template PCR Preparation Kit for WhBl samples and Epicentre BuccalAmp™ Kit for buccal swabs (BcSw). PCR-RFLP analysis for His452Tyr and 102T/C were carried out as described previously (1), with slight modi-

fications. For the -141C Ins/Del, AmpliTaq Gold® and FastStart Taq® polymerase systems (with/without DMSO and GC-RICH solution respectively) were compared with each other.

Results: Determination of the polymorphisms using both BcSw and WhBl-DNA, yielded reproducible results. Sequencing of PCR products confirmed the validity of our protocols. Comparison of genotypes using WhBl DNA with those using BcSw showed no discrepancies. The amplification of -141C Ins/Del SNP was significantly improved using FastStart Taq® in combination with the GC-RICH solution.

Conclusion: We developed reliable genotyping methods for the above mentioned polymorphisms using DNA from both WhBl and BcSw. The use of BcSw is non-invasive, clearly facilitates DNA collection from psychiatric patients, and reduces the need for specialized medical assistance.

Literature: 1. Erdmann, et al. Hum Genet 1996; 97: 614-619.
2. Arinami, et al. Hum Mol Genet 1997; 6: 577-582.

24. Metabole ratio's van psychofarmaca als indicatie voor het cytochroom-P450-genotype

J. van der WEIDE, E. H. van BAALEN, J. E. ROS
Afdeling Klinische Chemie, St. Jansdal Ziekenhuis, Harderwijk

Inleiding: Genetische variatie in cytochroom-P450(CYP)-2D6- en -2C19-genotypen leidt tot grote variatie in het metabolisme van een groot aantal geneesmiddelen. Door middel van genotypering kan een afwijkend metabolisme eenvoudig vastgesteld worden. Een groot aantal ziekenhuizen heeft echter niet de mogelijkheid routinematig een genotypering uit te voeren. Fenotypering m.b.v. testsubstraten laat een goede correlatie met het genotype zien. Dergelijk onderzoek is vaak te belastend voor de (psychiatrische) patiënt. Doel van dit onderzoek is derhalve om te bepalen of er een goede correlatie bestaat tussen het genotype en de metabole ratio van een aantal psychofarmaca dat veelvuldig in onze kliniek gebruikt wordt.

Methode: Bij alle patiënten is routinematig een genotypering gedaan voor CYP2D6 (*3, *4, *5, *6 en genduplicatie) en 2C19 (*2). Van de psychofarmaca venlafaxine (57 patiënten), citalopram (21), risperdal (78), clomipramine (85) en amitrip-

tyline (56) is in het kader van TDM de serumconcentratie van zowel het substraat als de metaboliet gemeten m.b.v. HPLC. De MR's zijn per geneesmiddel gegroepeerd naar het aantal functionele 2D6- en/of 2C19-allelen. Verschillen tussen de groepen zijn berekend met de Kruskal-Wallis-test.

Resultaat: Er blijkt een duidelijke correlatie te bestaan tussen de MR en het genotype. Zo duidt voor venlafaxine een MR tussen 0.2 en 0.9 (95% CI) op een normaal c.q. heterozygoot 2D6-genotype, waarbij geen afwijkende spiegel te verwachten is (Wt/wt en wt/mut samen). De overige metabole ratio's worden momenteel bepaald.

Conclusie: Hoewel het noodzakelijk is meer patiënten in deze studie te includeren om ook de groep "traag metaboliseerders" goed te kunnen karakteriseren, wijzen deze resultaten erop dat de MR van een aantal psychofarmaca als indicatie voor het CYP2D6- en/of 2C19-genotype kan dienen.

25. Rapportage van vals verhoogde HbA1c-uitslagen veroorzaakt door mutaties in het α^2 -globine gen: Hb-Stanleyville-II en HbG-Philadelphia

J. PRINS¹, B.B. van der MEIJDEN¹, W.W. van SOLINGE², A.K.M. BARTELINK³, R.J. KRAAIJENHAGEN¹
Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Interne Geneeskunde³, Meander Medisch Centrum, Amersfoort; Centraal Diagnostisch Laboratorium², Universitair Medisch Centrum, Utrecht

Inleiding: Bij de bepaling van HbA1c met behulp van HPLC wordt bij tijd en wijle naast HbA een Hb-variant gezien. Vaak blijft de aanwezigheid van een dergelijke Hb-variant klinisch onopgemerkt maar leidt deze wel tot de rapportage van een vals verhoogd HbA1c-percentages. Na overleg met de aanvrager wordt een dergelijke Hb-variant door ons nader gekarakteriseerd met behulp van Hb-IEF-capillaire-electroforese en sequentie analyse van de coderende delen van het β -globine gen. Recent zagen wij twee patiënten met Hb-varianten, met elektroforese geïdentificeerd als respectievelijk HbS (28,3 %) en HbD (23,2 %), welke echter niet bevestigd konden worden door β -globinegenesequentieanalyse. Met behulp van α -globinegenesequentieanalyse is geprobeerd deze Hb-varianten alsnog te identificeren.

Methode: De coderende delen van het α^2 -globinegen zijn met

behulp van één primerpaar geamplificeerd, leidend tot een 1076-bp-product. De DNA-sequentie werd vastgesteld om mutaties te identificeren welke aanleiding kunnen geven tot het ontstaan van Hb-varianten.

Resultaat: De in eerste instantie als HbS en HbD aangemerkte varianten bleken veroorzaakt te worden door puntmutaties in het α^2 -globinegen resulterend in respectievelijk Asn78Lys (HbStanleyville-II)- en Asn68Lys(HbG-Philadelphia)-aminozuursubstituties.

Conclusie: Ook mutaties in het α^2 -globinegen kunnen consequenties hebben voor de gerapporteerde HbA1c-uitkomsten. Daarnaast wordt het belang aangetoond van het bevestigen van elektroforetisch geïdentificeerde Hb-varianten met behulp van DNA-diagnostiek.

26. Een 12,6-kb- β -globinegendeletie in een Nederlandse familie.

J. PRINS¹, B.B. van der MEIJDEN¹, M.R. ERNST-KRUIS², E.A.W. BLOKLAND¹, R.J. KRAAIJENHAGEN¹
Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Afdeling Kindergeneeskunde², Meander Medisch Centrum, Amersfoort

Inleiding: Een 12 maanden oud jongetje (CV) werd gezien met een groeiachterstand en een relatief laag Hb. Zijn moeder (JV-S) meldde bekend te zijn met dragerschap voor thalassemie. Hb-electroforese liet bij JV-S en CV HbA2 percentages van respectievelijk 7,1 % en 4,0 % zien, passend bij β -thalassemie.

Methode: Karakterisatie van β -thalassemie-veroorzakende mutaties werd uitgevoerd door sequentie analyse van de promotor-regio (nt -307 tot nt +50 ten opzichte van de cap site), de 5'-regio (nt -103 tot nt 144 in IVS-II) en de 3'-regio (nt 603 in IVS-II tot nt +62 ten opzichte van de 3'-UTR) van het β -globinegen.

Resultaat: Sequentieanalyse liet bij zowel JV-S als CV geen β -thalassemie-veroorzakende mutaties zien. Het homozygoot aantreffen van alle polymorfe sites, waarbij nt 74 bij JV-S van

het T-subtype en bij CV van het G-subtype was, deed een β -globinegendeletie vermoeden. Daarop werd een primerpaar geselecteerd dat bij aanwezigheid van een 12,6-kb- β -globinegendeletie (eerder beschreven door Gilman¹) een 770-bp-PCR-product genereert. Sequentieanalyse van dit 770-bp-product bevestigde de aanwezigheid van deze zogenaamde Dutch β^0 -thalassemie in zowel moeder als zoon. Ook 2 van de 3 dochters van JV-S bleken de deletie te hebben.

Conclusie: Een 12,6-kb- β -globinegendeletie, eerder beschreven als Dutch β^0 -thalassemie, werd aangetoond in deze Nederlandse familie. Deze deletie bleek overigens niet de groeiachterstand bij de patiënt te verklaren.

Literatuur: 1. Gilman JG. Br J Haematol 1987; 67: 369-372.

27. New approach to test growth behaviour of smooth muscle cells measuring the balance between proliferation and apoptosis

P. BUIJTENHUIJS^{1,2}, L. BUTTAFOCO¹, A.A. POOT¹, J. FEIJEN, I. VERMES^{1,2}
University of Twente¹, Enschede; Hospital Medical Spectrum Twente², Enschede, The Netherlands

Introduction: The balance between apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells (SMCs) is responsible for mediating profound changes in vascular architecture in development and disease. New insights in the biology of SMCs can be important to our understanding of (patho) physiological mechanisms. Here the development of a new method to characterise SMCs regarding proliferation versus apoptosis is described.

Methods: Umbilical vein SMCs were used as a model to study the balance between proliferation and apoptosis in vitro. Cyclin E and tissue trans glutaminase (tTG) mRNA expression levels were analysed with use of a semi-quantitative RT-PCR method on a real-time TaqMan analyser. Cells were cultured in medium with 20% serum (control) and in medium without serum to induce apoptosis for up to 36 h. Ratios of cyclin E and tTG mRNA expression levels were calculated to make a quantified comparison of proliferation versus apoptosis.

Results: tTG mRNA expression levels increased in SMCs cultured in medium without serum, whereas control cell cultures did not show this increase. Cyclin E mRNA expression levels were less influenced by serum starvation. Ratios of cyclin E and tTG mRNA expression levels showed a significant reduction during growth of cells in medium without serum compared to control cell cultures.

Conclusion: A new method is developed to characterize cell growth behaviour of SMCs by measuring and comparing proliferation versus apoptosis. This new test can be used to clarify physiological mechanisms of vascular development and diseases. In addition this new method can be used to characterize and compare cell growth behaviour of different batches of cells since standardization of cell cultures with in vitro research is often difficult.

28. Genotyping of CYP3A5 allelic variants by fluorogenic probes using the LightCycler

R.A.M. op den BUIJSCH¹, J.E. de VRIES^{1,2}, P.A.H.M. WIJNEN¹, M.P. van DIEIJEN-VISSER¹, O. BEKERS¹
Department of Clinical Chemistry¹, Department of Biochemical Genetics², University Hospital Maastricht, The Netherlands

Introduction: The influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug concentrations is evident and clinically relevant. This study describes a fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay on the LightCycler to genotype the CYP3A5*1 and CYP3A5*3 alleles. Compared with PCR restriction fragment length polymorphism (RFLP) assays already published, this assay considerably decreases the time of analysis.

Methods: The real-time PCR FRET assay on the LightCycler amplifies a 500 bp part of CYP3A5, which covers the A6986G polymorphism in intron 3. A sample homozygous for the 6986G or 6986A allele produced melting peaks of respectively $\pm 57^{\circ}\text{C}$ and $\pm 62^{\circ}\text{C}$. A heterozygous sample contained both

type of targets and thus generated both peaks. To validate our method the PCR RFLP method has been used.

Results: The analysis of 73 anonymized DNA samples of healthy caucasian volunteers yielded identical genotypes with both assays. The total number of 6986G alleles was 134 (92%) and the total number of the 6986A alleles was 12 (8%). There were 10 heterozygotes and one homozygote 6986A genotype. This is in line with the frequency of the A6986G alleles published elsewhere.

Conclusion: We conclude that the real-time PCR FRET assay to genotype the CYP3A5 A6986G polymorphism on the LightCycler is a fast and reliable method.

29. Comparison of three isolation kits to extract DNA from whole blood samples for quantitative real-time PCR

R.A.M. op den BUIJSCH¹, O. BEKERS¹, P.A.H.M. WIJNEN¹, J. ten KATE³, M.P. van DIEIJEN-VISSER¹, J.E. de VRIES^{1,2}
Department of Clinical Chemistry¹, Department of Biochemical Genetics², University Hospital Maastricht; Department of Clinical Chemistry³, Maastrand Hospital, Sittard, The Netherlands

Introduction: Nowadays, PCR is mainly performed with genomic DNA isolated with DNA isolation kits. Yet, information about extraction efficiency and performance in quantitative PCR of DNA extraction kits is scarcely available. Therefore, this study describes the extraction efficiency and quantitative real-time PCR performance of QIAamp mini blood kit (Qiagen), High Pure PCR Template Preparation kit (Roche) and the Puregene kit (Biozyme).

Methods: The QIAamp mini blood kit, High Pure PCR Template Preparation kit and the Puregene kit are used to isolate DNA from thirty different blood samples with a WBC range from $0.5\text{-}20 \times 10^9$ WBC/L. After DNA isolation UV spectrophotometry is used to determine the DNA amount in every sample. DNA extraction efficiencies have been calculated for every isolation kit since DNA amounts before (WBC counts) and after (UV spectrophotometry) DNA isolation are known. A Taqman assay on the LightCycler, which amplifies exon 1

of the β -globin gene was used to obtain Ct values of every DNA sample.

Results: The extraction efficiency calculated for thirty independent, anonymized EDTA anti-coagulated whole blood samples obtained from routine cytometry was between 35-40% for all isolation kits. However, the isolation kits of Qiagen and Roche showed significant higher extraction efficiencies for the samples with a low amount of DNA, while Puregene showed a large variation in extraction efficiency over the whole DNA amount range. The QIAamp mini blood kit showed the lowest average Ct value with the least variation in each WBC count category of the three kits tested.

Conclusion: All three isolation kits have a reproducible extraction efficiency of 40% over a large DNA range whereas the QIAamp mini blood kit showed the lowest Ct values with least variation.

30. Single step high-throughput determination of the Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism

B.B. van RIJN^{1,2}, M. ROEST², A. FRANX¹, H.W. BRUINSE¹, H.A.M. VOORBIJ²

Department of Perinatology and Gynaecology¹, Department of Advanced Clinical Chemistry², University Medical Centre, Utrecht, The Netherlands

Introduction: Toll-like receptors are central components of host defence in humans, responsible for recognition of pathogen-associated molecular patterns and activation of innate immunity. Toll-like receptor 4 (TLR4) is activated by lipopolysaccharide (LPS) and other microbial components, thereby initiating the expression and release of pro-inflammatory cytokines. The common TLR4 allelic variant Asp299Gly has been related to susceptibility to gram-negative infections and sepsis and may be involved in the development of atherosclerosis. Identification of carriers of the 299Gly allele can be important for examination of genotype / phenotype relationships as well as for individual risk assessment of patients.

Methods: Asp299Gly genotyping was performed by a single tube polymerase chain reaction (PCR), based on exonuclease

degradation of dual labelled allele-specific oligonucleotides. The assay results were compared with conventional restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis.

Results: Genotypes of 333 individuals were determined simultaneously in a single PCR assay. Allele frequencies for our population were 92.8 % for the wild-type Asp299 and 7.2 % for the mutant Gly299 allele. Validation of the results by RFLP analysis revealed misclassification of only 3 subjects, corresponding to an overall accuracy of 99.1 % for this assay.

Conclusion: We developed a novel method for detection of the TLR4 Asp299Gly mutation, allowing for rapid genotyping useful for large-scale population studies as well as applicable for routine clinical testing.

31. Real time multiplex PCR detection of all known (23) different HLA-B27 alleles

L.D. DIKKESCHEI, I.M. SMIT-WALRAVEN, A.P. ABBES, J.M. KOLK-DIJKMAN, A.L.M. STRUNK

Clinical Laboratories, Isala Klinieken, Zwolle, The Netherlands

Introduction: Ankylosing spondylitis (AS) is a rheumatic inflammatory disease. 90% of all AS patients have the HLA-B27 allele. The 10% of AS patients who do not have the HLA-B27 allele often have a family history of other related diseases such as psoriasis and inflammatory bowel disease. Therefore the diagnosis of AS can virtually be excluded in absence of HLA-B27.

Methods: Although many techniques have been used for HLA-B27 typing, the molecular methods are the most sensitive and specific. Two PCR techniques are commonly used. In the first test the second exon of HLA-B27 is amplified, using the primerset according to Olerup. The second PCR test amplifies the third exon using the primerset according to Dominiquez. Up to now 23 different HLA-B27 alleles have been identified. However the primerset according to Olerup does

not amplify subtypes B*2712, B*2716, B*2718 and B*2723. The primerset according to Dominiquez does not amplify subtypes B*2707, B*2711, B*2714, B*2719 and B*2721. When both primersets are used all subtypes are covered.

Results: We developed a real-time multiplex PCR using Light-Cycler technology that detects all 23 known subtypes. To amplify all subtypes a combination of the previous described primersets were used and beta-globin was used as an internal amplification control. During PCR, the amplification was monitored using SYBR Green I dye. After amplification a meltingcurve analysis permitted the accurate identification of the PCR amplicons.

Conclusion: A quick and reliable method has been developed to cover all known subtypes of HLA-B27.

32. Real-time-PCR-genotyping van Factor-V-Leiden- en protrombinemutaties m.b.v. Taqman 7000 en Light-Cycler 2.0

A.G.M. van der ZANDEN¹, J.S. KAMPHUIS¹, J.D.E. van SUIJLEN¹, M. van den CRUIJSEM¹, E.M. te KOPPELE-VIJE¹, M.H.A. HERMANS²

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹, Gelre Ziekenhuizen, Apeldoorn; Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium², Jeroen Bosch Ziekenhuis, Den Bosch

Inleiding: Voor het opzetten van PCR-bepalingen voor mutaties in het protrombinegen en voor factor-V-Leiden zijn twee methodieken vergeleken. Beide mutaties worden aangetoond m.b.v. de TaqMan 7000 (ABI), waarbij gebruik wordt gemaakt van twee verschillende methoden om de primers en probes te ontwikkelen. Daarnaast worden dezelfde monsters getest in de LightCycler2.0 (Roche).

Methode: DNA wordt geïsoleerd uit EDTA-bloed m.b.v. de MagnaPure (Roche). De primers en Minor Groove Binding (MGB) probes voor de TaqMan 7000 zijn ontwikkeld op twee verschillende manieren: Primer Express (V2.0) en de Assay-by-Design (ABI). Voor de real-time PCR voor de LightCycler worden de Mutation Detection Kits voor Factor-V-Leiden en Prothrombin (Roche) gebruikt.

Resultaat: Van 35 gescreende patiëntenmonsters bevatten 26 monsters een wildtype, 5 monsters een heterozygoot type en 4 monsters een homozygoot type voor factor-V-Leiden. Voor de protrombinemutatie zijn 23 monsters getest en bevatten 20 monsters een wildtype en 3 monsters een heterozygoot type. Al deze resultaten komen overeen met die van een extern laboratorium.

Conclusie: Aangetoond wordt dat een verschil te zien is in signaalsterkte van de probes (ABI) voor het protrombine-wildtype en protrombinemutatie tussen dezelfde probes maar van een andere levering. Er is echter geen verschil in het uiteindelijke resultaat voor protrombine en factor-V-Leiden. De TaqMan 7000 en LightCycler2.0 geven eenzelfde resultaat voor de factor-V-Leiden- en protrombinebepaling.

Overigen

33. Selection, preparation and characterization of commutable reference material for enzyme calibration. Study within the framework of the Dutch project "Calibration 2000"

H. BAADENHUIJSEN¹, A. KUYPERS¹, C. WEYKAMP², C. COBBAERT³, R. JANSEN⁴

University Medical Centre Nijmegen/ SKML¹; Queen Beatrix Hospital², Winterswijk; Amphia Hospital³, Breda; St-Anna Hospital⁴, Geldrop, The Netherlands

Introduction: The Dutch project "Calibration 2000" aims at harmonization of laboratory results via calibration by development of commutable, matrix-based, secondary reference materials. The selection, preparation and characterization of suitable reference material for use of calibration of the six routinely measured clinical enzymes is described.

Methods: Patient pools and various candidate materials were analysed by 37 different laboratories. The results of each laboratory were evaluated against the results of a designated reference method by regression analysis. Cryo-protected lyophilized serum with additions of recombinant human enzymes, showing favourable commutability, was implemented as the national enzyme calibrator. The frozen version of this material (without sucrose as cryoprotector) was also used as external control serum in the general chemistry scheme of the SKZL in 2003. The results of "Cal2000 standardized" and "non-standardized" laboratories were compared in terms of the between-laboratory CV.

Results: The results of the most recent EQA surveys, with data of both regular and native samples from "Cal2000 standardized" laboratories versus "non-standardized" laboratories were as follows: the regular samples showed mean between-laboratory CV ranges for all six enzymes involved (low-high) of 5.4% - 10.9% for the "non-standardized" users versus 3.9% - 9.1% for the "Cal2000 standardized" users. For the native samples these respective ranges were 5.3% - 9.0% versus 2.7% - 4.7%.

Conclusion: We were able to identify potential secondary reference material for the six routine clinical enzymes with highly commutable characteristics. It appeared that the regular EQA samples (spiked with non-human enzymes) behaved significantly worse than the native samples (spiked with recombinant human enzymes) and are not fit for accuracy assessment purposes in general clinical chemistry EQA schemes.

34. Evaluatie van een semi-kwantitatieve teststrip voor de detectie van microalbuminurie

A.J. BAKKER, D. JAGER, G. DIJKSTRA

St. Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden

Inleiding: Microalbuminurie is een belangrijke risico-indicator voor ontwikkeling van diabetische nefropathie en hart- en vaatziekten. (Semi-)kwantitatieve methoden (uitvoering geschikt voor de eerste lijn) maken een vroege detectie mogelijk. De bruikbaarheid van de semi-kwantitatieve Immunodip teststrip van de firma DCL is geëvalueerd.

Methode: De routinematig gebruikte kwantitatieve analyse op de Modular analyzer (Roche) met DAKO-antiserum (DAKO: Q328) is vergeleken met de semi-kwantitatieve Immunodip teststrip van DCL (Menarini; prod.no.: 700-01). Urinemonsters werden op de dag van binnenkomst geanalyseerd. De referentiewaarde van de kwantitatieve methode is <16 mg/l albumine of <1,8 (M) resp. <2,5 (V) g albumine/mol creatinine. Uitslagen <12 mg/l van de Immunodip teststrip werden als negatief beoordeeld.

Resultaat: Dagelijkse analyse van drie controlemonsters (één negatieve, één sterk positieve, en één met een grenswaarde) met de Immunodip strip (n=11) leverde iedere keer hetzelfde resultaat op. Uit vergelijking van 187 patiëntenmonsters met

beide methoden bleek de Immunodip teststrip negatieve uitslagen met een specificiteit van 98,3% (sensitiviteit: 80,9%) aan te tonen. Ten opzichte van de albumine/creatinine-ratio waren sensitiviteit en specificiteit 71,4% en 95,1% respectievelijk. De kleur van de teststrip blijft na analyse stabiel. De kleur wordt na 1, 3, 7 en 30 dagen gelijk beoordeeld bij 94,6%, 94,1%, 94,1% en 78,1% van de monsters. Bij 5 (2,6%) van de teststrips verandert de kleur na 1-30 dagen naar (vals) negatief.

Conclusie: De Immunodip teststrip van DCL is voor screening voldoende betrouwbaar en is derhalve geschikt als eerstelijns diagnosticum voor het uitsluiten van microalbuminurie. Positieve uitslagen moeten met een kwantitatieve methode worden bevestigd.

Literatuur: Sacks DB, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of Diabetes Mellitus. Clin Chem 2002; 48: 436-472.

35. Vergelijking 'Point of Care'-INR-testing tussen eerste en tweede capillaire druppel

M.J. BEINEMA, H.J.M. SALDEN

Klinisch Chemisch Laboratorium, Deventer Ziekenhuis, Deventer

Inleiding: De firma Roche adviseert de eerste capillaire druppel te gebruiken voor de INR-bepaling op de CoaguChek S. In de eerste druppel echter zit in theorie wondvocht dat de uitslag kan beïnvloeden. Anderzijds is de tijd tussen de vingerprik en het opbrengen van de druppel op teststrip groter wanneer van de tweede druppel gebruik wordt gemaakt en dit kan de uitslag doen afwijken. Bij de ProTime (IL) wordt juist geadviseerd de eerste druppel af te vegen.

Methode: Wij hebben aan twintig trombosedienst patienten die ervaren zijn in de omgang met de CoaguChek S gevraagd om twee maal de INR te bepalen. De eerste maal met de primaire

druppel, de tweede maal met de secundaire druppel na afvegen. Van de uitslagen is de lineaire regressie bepaald en de correlatie.

Resultaat: De uitslagen zijn vrijwel identiek met een hoge r-waarde en goede correlatie. Wel werd waargenomen dat dit alleen geldt als beide bepalingen kort na elkaar worden gedaan, de INR fluctueert gedurende de dag.

Conclusie: Er is geen statistisch relevant verschil tussen de primaire druppel en de secundaire druppel na afvegen bij ervaren patienten, mits het tijdsverschil tussen de beide bepalingen kort is.

36. Vergelijking M-proteïneonderzoek middels apparatuur van Helena en Sebia

J.S. KAMPHUIS, T. DRAPER-LORIST, J. JASPERS

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Gelre Ziekenhuizen, Apeldoorn

Inleiding: In het kader van vervanging van apparatuur voor M-proteïne onderzoek en aanpassing aan de CBO-richtlijn Monoklonale Gammopathie is apparatuur van twee verschillende firma's met elkaar vergeleken.

Methode: Van 19 monsters met aangetoond M-proteïne in serum zijn zowel een eiwitspectrum (iso-electrische focussing) als immunofixatie uitgevoerd. Monsters zijn geselecteerd op concentratie van M-proteïne en signaal verkregen met de Beckman methode (Paragon). Er is gebruik gemaakt van SAS-1 plus (auto-applicator)/ SAS-2 (auto-stainer) van de firma Helena (VWR) en de Hydrasys (incl. Dynamic Mask) van de firma Sebia. Tevens wordt de software van beide firma's met elkaar vergeleken m.b.t. het scannen en opslaan van eiwitspectra.

Resultaat: Van de 19 geteste serummonsters kwamen de laboratoriumdiagnosen in 19/19 (100%) van de gevallen voor zowel Helena als Sebia overeen met de diagnose die destijds bepaald was met het systeem van Beckman. Eiwitspectra:

geen verschil in kwaliteit waarneembaar tussen Helena en Sebia, die beide overigens betere resultaten lieten zien en meer capaciteit hebben dan Beckman. Immunofixatie: Helena kleurt de aanwezige M-component(en) minder duidelijk aan dan Sebia. Monsterapplicatie is gebruikersvriendelijker en betrouwbaarder met Sebia door o.a. het gebruik van de Dynamic Mask. Aan validatie van de software van beide firma's wordt momenteel gewerkt.

Conclusie: Helena en Sebia laten geen verschil zien in resultaten betreffende eiwitelektroforese en karakterisatie van M-component(en), doch op het niveau van immunofixatie kleurt Helena minder scherp de M-component(en) aan en is minder betrouwbaar qua monsterapplicatie dan Sebia, die daarvoor gebruik maakt van de Dynamic Mask.

Literatuur: CBO-richtlijn Monoklonale Gammopathie, 2001.

37. Exploration of the biological variation of the human milk fatty acid composition with principle component analysis

W. NOTEBOMER^{1,2}, M.R. FOKKEMA¹, E.N. SMIT¹, A.B. de VRIES³, F.A.J. MUSKIET¹

Pathology and Laboratory Medicine¹, University Hospital Groningen; Daprocon²; Life Science and Technology³, Hanze University, Groningen, The Netherlands

Introduction: Multivariate analyses are rarely applied in clinical chemistry. The combination of tests in multivariate analyses may allow identification of different subpopulations that cannot be distinguished on the basis of univariate tests. We evaluated the potential benefit of cluster analyses by exploring the large biological variation of the human milk fatty acid contents (1).

Methods: We performed principle component analysis with a self-written program in Mathcad 2000 Professional®, using fatty acid composition data of mature human milk samples from apparently healthy women. Our analysis was carried out with data of 315 samples from The Netherlands (n=168), Antigua (n=22), Dominica (n=7), St. Lucia (n=11), St. Vincent (n=28), Surinam (n=16), Jerusalem (n=51) and Tanzania (n=5).

Results: Principle component analysis divided the human milk cluster into three clusters of samples that derived from 1) The

Netherlands, 2) the Caribbean region (Antigua, Dominica, St. Lucia, St. Vincent and Surinam) and 3) other countries (Jerusalem and Tanzania). These regions proved distinguishable on the basis of three principle component axes, which mainly consisted of fatty acid loadings that are indicative of different dietary habits.

Conclusion: Principle component analysis revealed that there is no single homogeneous human milk cluster. This raises the question whether the human milk fatty acid composition can serve as 'gold standard' for the manufacturing of infant formulas. Recommendations might preferably derive from data on the function of fatty acids in neonatal development.

Literature: 1. Smit EN, et al. Estimated biological variation of the mature human milk fatty acid composition. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2002; 66: 549-55.

38. Multivariate comparison of the fatty acid compositions of infant formulae and human milk

W. NOTEBOMER^{1,2}, M.R. FOKKEMA¹, A.B. de VRIES³, E.N. SMIT¹, F.A.J. MUSKIET¹

Pathology and Laboratory Medicine¹, University Hospital Groningen; Daprocon²; Life Science and Technology³, Hanze University, Groningen, The Netherlands

Introduction: Multivariate analyses are rarely applied in clinical chemistry. Theoretically, they improve the diagnostic values of laboratory tests, notably by reducing the percentages false-positives and false-negatives. To study its potential, we developed a method that allows comparison of fatty acid (FA) compositions of formulae with those of human milk, which is considered to be the 'gold standard' for formulae FA compositions.

Methods: FA compositions of human milk samples (g%) collected from 455 apparently healthy women living in 14 countries and of 30 formulae were multivariately analyzed with self-written programs in Mathcad 2000 Professional®. The difference between formula FA and the human milk FA cluster was defined as the distance between the formula and the mean of the 'n' nearest human milk samples (not including outliers).

Results: Multivariate analysis showed that the FA compositions of all formulae were different from that of the human milk cluster. Our method was able to determine both the distance and the FA that differentiate formulae from human milk.

Conclusion: Our method provides a basis to compare FA compositions of formulae with that of the 'gold standard' and to qualify and quantify the main differences. This method is the only method known to us that not only estimates the distance, but also the coordinates of the human milk border, allowing evaluation of FA differences. A problem is with interpretation, since not all FA might be equally important. When applied in clinical chemistry, multivariate analyses may be of particular interest for complex interrelated results, such as those deriving from profiling methods, like amino acids and steroids.

Categorie 2: Dienstverlening

Dienstverlening, doorlooptijden, workflowanalyse

39. Registreren van de consulten van de klinisch chemicus

H.J.L.M. ULENKATE

Medische Laboratoria, Klinische Chemie, Reinier de Graaf Groep, Diagnostisch Centrum SSDZ, Delft

Inleiding: Een klinisch chemicus wordt regelmatig geconsulteerd door een arts of laboratoriummedewerker voor advies of initieert zelf een consult. Deze consultaties kunnen voor de dienstdoende klinisch chemicus 24 uur per dag plaats vinden. Gespreksnotities werden in Delft niet of ongestructureerd vastgelegd en essentiële informatie om effectief aan de slag te gaan ontbrak vaak: b.v. wel vraagstelling, maar geen patiëntnummer. Een archief van de consulten werd niet opgebouwd, wat eigenlijk wel past bij CCKL- en DBC-registratie. Het doel was om structuur aan te brengen in de consultregistratie.

Methode: Structuur werd aangebracht in de registratie van de consulten door het ontwerpen van een papieren consultformulier op A6-formaat, waarop alle noodzakelijke gegevens gevraagd werden die in de praktijk nodig zijn. Tevens werd uitgetest of elektronische registratie in een database voordelen bood. De database was multi-user en toegankelijk voor de klinisch chemici en assistent.

Resultaat: Gedurende 18 maanden werden ± 500 consulten ge-

registreerd. Gestructureerde vastlegging op een papieren consultformulier leidt tot efficiency- en kwaliteitsverbetering in de afhandeling van de consulten. Tevens ontstaat er een papieren archief, wat handig is bij overdracht. Door elektronische registratie in een database worden consulten leesbaar en toegankelijk voor elkaar. Bovendien wordt doorverwijzen, het zoeken in de consulten en de procesbewaking van de afhandeling nog eenvoudiger. Verder is het mogelijk om statistiek rondom de consultaties te verrichten. Tevens wordt de DBC-code toegekend. Bespreking van de consulten is bovendien leerzaam voor elkaar. Uiteraard kan de database overgezet worden naar een PDA, zodat de consultgegevens altijd voorhanden zijn.

Conclusie: Kortom, gestructureerde elektronische consultregistratie geeft meer inzicht in de consulten en levert een kwaliteitsverbetering op van de consultatieve dienstverlening van de klinisch chemicus. Met plezier wordt het consultformulier sinds het ontwerp gebruikt.

Point-of-care testing

40. De introductie van poliklinische POC-controle van het HbA1c met de DCA 2000+

W. KORTLANDT¹, M. MEIJERS¹, C. van de WATER¹, G.J. van der VLIST²

Laboratorium Klinische Chemie en Hematologie¹, Afdeling Kindergeneeskunde², Diakonessenhuis, Utrecht/Zeist

Inleiding: Bij controlebezoek van diabetes-kinderen aan de kinderarts worden glucosewaarden en het HbA1c besproken. Tijdige beschikbaarheid van de HbA1c maakte een extra ziekenhuisbezoek daags tevoren noodzakelijk, gepaard gaand met een extra belasting voor ouder-kind. Naast jaarlijks uitgebreid laboratoriumonderzoek wordt het HbA1c 3x per jaar gecontroleerd. De POC-analyser DCA2000+ maakt het de diabetesverpleegkundige mogelijk enkele minuten voorafgaand aan het consult op eenvoudige wijze een HbA1c-waarde te genereren. Het systeem moet echter wel aan kwaliteitscriteria voldoen. Behandeling op geleide van het HbA1c doet ons streven naar een variatiecoëfficiënt van $< 2\%$.

Methode: De bepaling op de DCA2000+ (Bayer) maakt gebruik van competitieve immuno-inhibitie van latexagglutinatie. Hb wordt gemeten met thiocynaat. Alle reagentia zitten in een cartridge. De lichtverstrooiing en thiocyaanmethemoglobine worden gemeten bij 531 nm. De routinemethode loopt zonder handmatige voorbereiding op de Integra-400 (Roche). Beide methoden zijn DCCT-gecalibreerd. Er is getest met EDTA-bloed.

Resultaat: De binnen-dag-reproduceerbaarheid met de DCA 2000+ was 1,3–2,6% (HbA1c range 6-11%). De routinemethode toont een binnen-dag-reproduceerbaarheid van 0,8–1,7%. De P&B-regressielijn tussen beide methoden was $Y=0,92X+0,4$ ($n=27$, $r=0,995$). HbA1c-waarden tussen 4 en 8% lagen met de DCA gemiddeld 0,01% lager ($n=11$). Er was geen onafhankelijkheid van de hemoglobineconcentratie. De exploitatiekosten bedragen € 3,50 meer per resultaat. De diabetesverpleegkundige maakt gebruik van één systeem op twee locaties. Resultaten worden in het LIS verwerkt. Kwaliteitscontrole geschiedt vanuit het laboratorium. Er is een hoog tevredenheidsgehalte van ouders en behandelaars.

Conclusie: Door invoering van een POC DCA2000+ analyser voor HbA1c kan een extra ziekenhuisbezoek van ouder-kind achterwege blijven. De bediening van het apparaat is eenvoudig en door een gemotiveerde verpleegkundige goed uitvoerbaar. De DCA2000+ resultaten blijken in hoge mate vergelijkbaar met de jaarlijkse labcontrole.

41. Extern kwaliteitscontroleprogramma voor bepaling hemoglobine en glucose

J.L.P. van DUIJNHOFEN, C.H.H. SCHOENMAKERS

Algemeen Klinisch Laboratorium, Elkerliek Ziekenhuis, Helmond

Inleiding: Huisartsen en verloskundigen wordt deelname aangeboden aan een kwaliteitscontroleprogramma voor de bepaling van hemoglobine en glucose in bloed. Twee maal per jaar (Hb) respectievelijk vier maal per jaar (glucose) wordt per post een tweetal monsters toegestuurd (normaal en abnormaal; huimaan materiaal), met het verzoek de volgende dag de desbetreffende analyse uit te voeren en per fax of post te rapporteren.

Methode: De resultaten worden ingevoerd en statistisch bewerkt (b.v. in geval van glucosemeting uitsplitsing per type bloedglucosemeter). De gegevens worden grafisch gepresenteerd, waarbij vergeleken wordt met referentiemethoden (hematologie- cq chemieanalyser en zelfde type stripglucose-

meter door analist). Aan de hand van de geconstateerde afwijking van de targetwaarde en/of spreiding tussen de duplowaarden wordt, op basis van ingestelde doelstellingen voor exactheid en herhaalbaarheid, op gestandaardiseerde wijze een rapport gegenereerd middels Excel. Bij overschrijding van gedefinieerde grenswaarden wordt telefonisch contact opgenomen. Het glucose-programma wordt ook gebruikt voor controle van de stripmeters binnen het ziekenhuis.

Resultaat: Ca. 25 huisartsen en verloskundigen nemen deel aan het Hb-programma, en 17 huisartspraktijken (37 meters) aan het glucoseprogramma. Binnen het Elkerliek Ziekenhuis worden 41 glucosemeters gecontroleerd. Doorgaans worden

goede exactheid en herhaalbaarheid behaald. Incidenteel vragen de resultaten om aandacht, sporadisch dient direct telefonisch contact opgenomen te worden. De geconstateerde problemen betreffen met name verlopen strips/cuvetten, onjuiste kalibratie en onzorgvuldige bediening. In voorkomende gevallen wordt ondersteuning aangeboden om het probleem op te sporen en (zo mogelijk) te verhelpen.

42. Ervaring met Omni S bloedgas/elektrolytenanalyser (Roche) op de IC in combinatie met DataCare HOSPOC/Omnilink (Roche)

E.H. SLAATS¹, M. TRESKES¹, K.V. STAVAREN¹, C. MOO¹, W. TOGNI², R. BOSMAN²

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

Inleiding: In een korte analytische evaluatie werd de Omni S bloedgasanalyser (Roche) (bloedgasen, elektrolyten en Hb) vergeleken met de Rapidlab 865 (Bayer). Daarna werd de Omni S geplaatst op de intensive care onder kwaliteitsborging/besturing van het laboratorium met behulp van het data-managementsysteem DataCare HOSPOC / Omnilink (Roche). De acceptatie van IC-verpleegkundigen werd nagegaan om de bloedgasanalyses, na een training door de analisten van het laboratorium, geborgd zelf uit te voeren en in welke frequentie en ernst storingen optraden.

Methode: Met behulp van een scorelijst (1 t/m 5) werd bij de IC-verpleegkundigen de acceptatie gemeten van de Omni S op de aspecten: gebruikersvriendelijkheid, trainingsnoodzaak, onderhoud en traceerbaarheid uitvoerder, directe beschikbaarheid in het PDMS (patient data management systeem) en technische uitval. Ook werd gevraagd naar de ervaren werkdruk

Conclusie: Tot grote tevredenheid van de deelnemers is een kwaliteitscontroleprogramma van glucose- en hemoglobinebepaling opgezet. Tevens worden de in de kliniek gebruikte stripglucosemeters op gestructureerde wijze gecontroleerd. De resultaten zijn doorgaans tevredenstellend. Deze methodiek leent zich ook voor glucosestripmeter controle door patiënten.

t.o.v. de huidige werkwijze, waar een "bloedgas" met een buizenpost naar het laboratorium gestuurd wordt. Tevens werd een kostenvergelijk ten opzichte van de centrale bepaling van bloedgasen opgesteld.

Resultaat: Na een wenningsperiode geven de IC-verpleegkundigen de voorkeur om de bloedgasen en elektrolyten POC in de IC-omgeving te bepalen en waarderen de ondersteuning op afstand door het POC-team van het laboratorium. De introductie van de OmniS bloedgasanalyser op de IC geeft mede aanleiding tot een discussie over de vermindering van het aantal analisten in de avonddienst.

Conclusie: Point of care-uitvoering van uitgebreide bloedgasanalyses is een goede ontwikkeling mits dit in samenwerking gebeurt tussen de klinische afdeling en het laboratorium, waarbij de laatste de kwaliteitsborging verzorgt.

Kwaliteit, referentiewaarden

43. A Six Sigma approach towards analytical quality control

N. de JONGE, J. SLINGER, F. HUDIG, P.F.H. FRANCK

Dept. Clinical Chemistry and Hematology, Leyenburg Hospital, The Hague, The Netherlands

Introduction: We evaluated the applicability of Six Sigma basics and selection tools for QC-procedures. Six Sigma quality management postulates that a decrease in process quality of 1.5 standard deviations should be tolerable without a significant increase in defect rate. For analytical quality this means that a 1.5 SD bias should be readily detected by quality control rules. Moreover, precision should desirably be smaller than 1/6th of the tolerance specification.

Methods: Process capability for precision and accuracy were calculated for all chemistry, hemocytometry, blood gas and immunochemistry assays. New rules were selected for all assays, using commercial software. Rules were based on the analytical variation at a clinical decision level and zero bias. The probability of false rejection was kept as low as possible, while the probability of error detection was maximized. For

practical reasons, new QC procedures were implemented for those assays, for which adequate error detection was achieved testing 2 control samples once a day. New QC-rules were defined for 28 selected tests.

Results: Using CLIA criteria, 28 analyses showed a process capability between 3 and 15, which indicates a very high quality. The traditional Westgard 3 SD rule was substituted by a more strict 2.5 SD rule for 10 assays. For two assays, the 3 SD rule was remained. For 16 assays a wider tolerance limit (3.5 SD) could be set for QC-results.

Conclusion: The number of analytical reruns, and therewith the consumption of quality material decreased considerably (up till 75%) for a number of assays (e.g. enzymes). For every assay the (analytical) process capability is known, which is very helpful in the priority setting of analytical problems.

44. Angiotensin-converting enzyme I/D-specifieke referentiewaarden voor angiotensin-converting enzyme in het personeel van een Nederlands ziekenhuis

H.J.T. RUVEN¹, J.C. GRUTTERS², A. KRUIT², N. POT^{1,2}, W. GERRITSEN¹, J.M.M. van den BOSCH²

Afd. Klinische Chemie¹, Afd. Longziekten², Hart Long Centrum Utrecht, St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein

Inleiding: Bij sarcoidose wordt de activiteit van angiotensin-converting enzyme (ACE) in perifeer bloed gebruikt om de activiteit van longafwijkingen vast te stellen en te vervolgen. Alhoewel er geen betere alternatieven zijn, blijft het klinisch nut en de sensitiviteit van ACE nog steeds beperkt. Reeds enige jaren is bekend dat een insertie/deletie (I/D) polymorfisme in intron 16 van het ACE1-gen leidt tot verschillen in ACE-concentratie: de ACE-concentratie in D/D-personen is ca. twee keer zo hoog als in I/I personen. In een poging de gevoeligheid van de ACE-bepaling te vergroten, hebben wij de

ACE-I/D-afhankelijke referentiewaarden voor onze ACE bepaling in een controlepopulatie vastgesteld.

Methode: ACE en het ACE-I/D-polymorfisme zijn bepaald in 356 personeelsleden. In deze studie, goedgekeurd door de Ethische Commissie, zijn laboratoriumuitslagen en enige gegevens zoals leeftijd, afkomst etc. geanonimiseerd verwerkt.

Resultaat: De ACE-concentratie in de D/D-groep is ca. twee keer zo hoog als in de I/I-groep, terwijl de ACE-concentratie in de I/D groep tussen beide ACE-waarden in ligt. De genotype-frequentie is voor vrouwen 21,5 % (I/I), 57,0 % (I/D),

21,5 % (D/D) en voor mannen 23,5 % (I/I), 50,0 % (I/D), 26,5 % (D/D).

Conclusie: Resultaten met populaties in andere Europese landen worden in onze populatie bevestigd. Op basis van deze uitkomsten wordt in ons huis naast de ACE-bepaling het ACE-

I/D-polymorfisme aangeboden om de ACE-waarde te relateren aan het bijbehorend ACE-I/D-genotype. Of dit daadwerkelijk tot een verbetering van het klinisch nut van ACE leidt, zullen we in de komende tijd gaan vaststellen.

45. De balanced score card uitgewerkt in prestatie-indicatoren ten behoeve van het management review

J.J.H. HENS, H.G. DINGERINK, H.O. AGRICOLA

Klinisch Chemisch Laboratorium, Bloedafname en Trombosedienst, Hofpoort Ziekenhuis Woerden, Zorggroep Utrecht West

Inleiding: Het CCKL-kwaliteitshandboek hanteert als norm dat een laboratorium dient te beschikken over een samenhangend kwaliteitsbeleid, dat vertaald is in meetbare doelstellingen en via management review periodiek beoordeeld wordt. Wij hebben binnen de vier resultaatgebieden van de balanced score card (BSC), die primair gericht is op de bedrijfsvoering, kritische prestatie indicatoren gedefinieerd die management review op een eenvoudige wijze mogelijk maken.

Methode: Vanuit de missie en doelstellingen van de afdeling zijn de kritische bedrijfsprocessen benoemd, die het meest bijdragen aan de realisatie hiervan. Binnen die bedrijfsprocessen zijn vervolgens indicatoren met normwaarden gedefinieerd.

Resultaat: Binnen het resultaatgebied financiën vormen generaliseerde exploitatie, aantal uitgegeven eenheden transfusiebloed en uitgaven aan extern onderzoek kritische prestatie-

indicatoren (KPIs). Binnen het resultaatgebied klant vormen klachtafhandeling en poliklinische wachttijd KPIs. Binnen het resultaatgebied interne bedrijfsprocessen vormen o.a. de interne en externe QC-afhandeling en het percentage goed ingestelde trombosedienstpatienten KPIs. Binnen het resultaatgebied innovatie zijn ziekteverzuim en nascholing KPIs. De verzameling van deze KPI's vormt gezamenlijk een overzichtelijke basis voor het managementreview.

Conclusie: Door jaarlijks op basis van het gehaalde resultaat van KPIs de (kwaliteits)normen vast te stellen binnen de vier resultaatgebieden van de balanced score card, ontstaat een kwaliteitsmanagement review systeem dat de bedrijfsvoering over- en inzichtelijk maakt. De interne en externe QC-afhandeling van de individuele analyses maken hier een integraal onderdeel van uit.

Human resource management

46. Competentiemanagement: hoe functioneer ik nu en wat wordt in de toekomst van mij verwacht?

M. SCHOORL, P.C.M. BARTELS, I. BUIS, E. DEKKER, S. BEENTJES, M. STEL, P. BUIT

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

Inleiding: Laboratoriumorganisaties worden steeds groter en gecompliceerder. Bij het realiseren van strategische doelstellingen zijn bevordering van efficiëntie en effectiviteit kritische succesfactoren. Optimale aanwending van human resources is een belangrijke randvoorwaarde. Mensen zijn immers de spil van de organisatie. Ze fungeren als dragers van kerncompetenties. De laboratoriumsetting is voor het voortbestaan en de ontwikkeling van kernactiviteiten afhankelijk van het vermogen om getalenteerde medewerkers te werven en te behouden. Ten behoeve van een dynamische ontwikkeling van de laboratoriumorganisatie en snelle invoering van innovatie op vakinhoudelijk terrein wordt individuele kennis en vaardigheden voortdurend aangepast. Het groeiende aantal parttime medewerkers is hierbij een kritische factor.

Methode: Bij combinatie van competentie management met Resultaat- en Ontwikkelingsgesprekken ligt het accent op ontwikkelingsaspecten van de individuele medewerker in relatie tot cultuurveranderingen in de laboratoriumorganisatie en nieuwe marktontwikkelingen. Competentieprofielen zijn gebaseerd op gestandaardiseerde kenmerken, o.a. op het gebied van

kennis en vaardigheden, klant- en servicegerichtheid, stress bestendigheid, planning en organisatievermogen, flexibiliteit, kwaliteit, eigen initiatieven, resultaatgerichtheid, interne en externe gerichtheid, logistiek management, coachend leiderschap, werken in teamverband en het vermogen tot motiveren van anderen.

Resultaat: Voor toetsing van competenties zijn verschillende vragenlijsten beschikbaar. Het genereren van dergelijke check lists impliceert maatwerk. Bij gesignaleerde witte vlekken worden persoonlijke opleidingsplannen geformuleerd die in de komende jaren worden uitgevoerd.

Conclusie: Competentiemanagement in combinatie met resultaat- en ontwikkelingsgesprekken heeft er toe geleid dat op verschillende hiërarchische niveaus van de laboratoriumorganisatie meer inzicht is ontstaan in individuele capaciteiten van de medewerker en de wijze waarop de capaciteiten binnen een functie het beste tot hun recht komen. De laboratoriumorganisatie kan zich verder ontwikkelen naarmate de karaktereigenschappen van de medewerker en de bedrijfscultuur beter op elkaar zijn afgestemd.

Automatisering, dataverwerking

47. Selection and implementation of best practice guidelines for reporting molecular genetic diagnostics in the Amphia hospital

C.M. COBBAERT, L. SCHRAUWEN, E. de BAAR, A. KOEKEN

Department of Clinical Chemistry and Hematology, Amphia Hospital, Breda, The Netherlands

Introduction: The Amphia hospital is the resultant of a recent merge between four hospital locations in the Breda region. Facing four different Laboratory Information Systems (LIS) across the locations it was decided to purchase a new LIS (MOLIS, Charles Goffin) which should, among other goals, enable tailored reporting for DNA diagnostics.

Methods: Best draft practice guidelines from CMGS/EMQN, SSGS and NCCLS/CAP were surveyed, selected and implemented into MOLIS. To reach computerized and customized reporting for DNA diagnostics according to the selected guidelines, genotype and phenotype specific decision trees were developed and programmed into MOLIS for each disease.

Results: A checklist containing 10 essential criteria was composed in order to provide our clinicians with a clear and professional answer to their clinical problem. Essentials are: complete lab identification; unequivocal patient identification; knowledge of the clinical request or indication; clarification of the disease and gene/mutation tested; elucidation of the methodology used as well as the extent and sensitivity of the method; concise and univocal genotyping according to HUGO standard nomenclature; thoughtful interpretation of the genotype taking into account clinical context, ethnicity and other lab results, and

clarification of the posterior genetic risk of having the disease in case of negative testing; suggestions for additional investigations, counselling and family screening if relevant; disclaimers; and authorization of the report by an independent clinical chemist. In MOLIS integration of these essential criteria occurs in a customized report with minimal data entry.

Conclusion: We conclude that tailored reporting is essential for GLP/GCP, especially for DNA diagnostics in a clinical chemistry setting. Having the ability for tailored reporting should be considered when selecting a new LIS.

48. Project aanschaf preanalytische stations ASZ te Dordrecht

M.A. FOURAUX, W. van GELDER, R.B. DINKELAAR

Klinisch Chemisch Laboratorium, Albert Schweitzer ziekenhuis, Dordrecht

Inleiding: Uit verschillende studies is bekend dat gedurende een analytisch proces de meeste fouten gemaakt worden in de pre- en postanalytische fase. Binnen het KCL van het Albert Schweitzer ziekenhuis te Dordrecht is besloten om de preanalytische fase te automatiseren, om zo het aantal gemaakte fouten te minimaliseren. Daarnaast is het ook de bedoeling om via automatisering de efficiëntie van de preanalytische fase, en dus de doorlooptijd van een bepaling, te verkorten.

Methode: Een aantal fabrikanten van preanalytische stations (PAS) werd verzocht presentaties en/of bedrijfsbezoeken te organiseren. De systemen werden beoordeeld aan de hand van een vooraf opgesteld plan van eisen. Punten van aandacht hierbij waren onder andere capaciteit, software-aansturing van het PAS en communicatie met het LIS, functionaliteiten (vb. ontstoppen, aliquoteren, herdoppen, indices-bepaling), archivering van monsters en gebruikersvriendelijkheid.

Resultaat: Gaandeweg het project bleek dat de optie van een centrifuge-eenheid in het PAS niet efficiënt werkt. Gekozen is daarom om de buizen voorafgaand aan het aanbieden aan het PAS te centrifugeren. Ook het werken op meerdere lab-locaties bleek de nodige implicaties te hebben. Zo is er uiteindelijk voor gekozen om meerdere PAS'en op meerdere locaties te implementeren. Hierbij bleek het essentieel voor de efficiëntie dat de PAS'en met elkaar en het LIS kunnen communiceren. Aangezien het traject nog in volle gang is, zijn op dit moment nog niet alle resultaten bekend.

Conclusie: Voorlopig kan geconcludeerd worden dat het implementeren van pre-analytische stations de efficiëntie van de pre-analytische fase verbetert en het aantal fouten reduceert. Bijkomend voordeel is dat analisten minder blootgesteld worden aan besmettelijke stoffen, doordat het ontstoppen en aliquoteren automatisch gebeurt.

Overigen

49. Clinical Chemistry and Intellectual Property: how do we manage?

W.A. KAPTEIN

Beacon Bio, Bio Exploitation Platform, Sussex IP, Sussex Innovation Centre, Science Park Square, Brighton, UK

Introduction: Intellectual Property (IP) is developed within hospitals on a daily basis. Part of this will have little commercial value, and will be best utilised through the normal routes of dissemination: publishing and/or sharing information among colleagues. However, some IP will need further investment to reach its full potential, and this will only be obtained through proper protection of the IP for the investor. This presentation will explain how to manage IP based on some real examples.

Methods: The presentation will use some practical examples of successful (and unsuccessful) IP management. It will discuss the process from the identification, protection and the exploitation of IP. An example where a potential exploitable technology got lost was where an MTA was signed previously, assigning all rights to the invention. An other example where IP could not be exploited was a device where the ownership of

IP could not be sorted out. A successful commercialisation of IP was a database, protected by copyright, that was sold to a large organisation.

Results: The presentation describes the 'hands-on' management of IP in institutes working in the Clinical Chemistry arena. It will show the use of a (similar) protocol for IP management and its success in UK universities, and the way it is currently implemented in the National Health Service (including hospitals), and the effect this has on the exploitation of IP.

Conclusion: Proper IP management will enable a strategic approach on commercialisation opportunities of technologies. The management of IP should not only lead to (potential) financial gain, but will also enable applications of technologies that would otherwise not be developed, because of the possibility of return on investment for investors.

Hart- en vaatziekten, atherosclerose

50. Grape polyphenols but not alcohol inhibit platelet adhesion under flow conditions

R.J. KRAAIJENHAGEN¹, D.W. de LANGE², J.W.N. AKKERMAN³, A. van de WIEL⁴
Department of Clinical Chemistry¹, Internal Medicine², Meander Medical Centre Amersfoort; Dept. Internal Medicine², Thrombosis and Haemostasis Laboratory³, University Medical Centre, Utrecht, The Netherlands

Introduction: Alcohol consumption has been associated with decreased cardiovascular morbidity and mortality. Inhibition of platelet function is thought to attribute to this. We already demonstrated that red wine polyphenols but not alcohol are able to inhibit platelet adhesion. We investigated platelet adhesion to fibrinogen and collagen in whole blood under flow conditions at wall shear rates of 300/s and 1600/s.

Methods: Before perfusion, citrated whole blood was preincubated during 5 minutes with different concentrations alcohol, unfractionated red wine and grape polyphenolic compounds (WSP-1). Then, blood was perfused over human fibrinogen coated coverslips or collagen type III-coated coverslips at shear rates of 300/s and 1600/s in a single-passage flow chamber.

Results: Alcohol inhibited platelet adhesion to human fibrinogen and not to collagen at high shear rate and ethanol concentrations of 4.8 % (P <0.01). Red wine did not inhibit

platelet adhesion to human fibrinogen or collagen. Grape polyphenols did inhibit platelet adhesion to human fibrinogen at concentrations of 0.09 g/L (P<0.01) and 0.18 g/L (P<0.05) at low shear rate. Adhesion to collagen at low shear rate was only inhibited at 0.18 g/L (P<0.05). At high shear rate adhesion to collagen was not significantly altered. Though alcohol did not inhibit total platelet adhesion, increasing alcohol concentrations decreased aggregate size (P<0.001 for alcohol 2.4% and 4.8% in comparison to controls (no alcohol) on both fibrinogen and collagen.

Conclusion: Grape polyphenols inhibit adhesion to fibrinogen but not to collagen which at least partly might explain the cardioprotective effects of moderate but prolonged alcohol consumption. This inhibition of adhesion to fibrinogen occurs at high concentrations. Whether this is relevant to human pathophysiology remains to be investigated.

51. Investigating platelet activation with abciximab and high-dose tirofiban in patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention

W.B.M. GERRITSEN¹, J.W. van WERKUM², H.C. KELDER², V.H.M. DENEER³, J.M. ten BERG², F.J.L.M. HAAS¹
Department of Clinical Chemistry¹, Cardiology² and Pharmacology³, St. Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands

Introduction: Glycoprotein IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) antagonists have shown to reduce restenotic complications in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention (PCI). However, in patients with acute myocardial infarction (AMI), there are only few data on the amount and duration of platelet activation. In addition, new data suggest that the dose of tirofiban used in previous studies was too low. The present study investigated platelet activation in AMI patients undergoing PCI as well as the effects of abciximab and a higher-dose of tirofiban.

Methods: We prospectively randomised 60 AMI patients to abciximab (n=20; bolus 25 mg/kg, than 12-hours 0,125 mg/kg/min), to high-dose tirofiban (n=20; bolus 25 µg/kg, followed by 18 hours 0,15 µg/kg/min i.v) or to no addition treatment

(n=20). Platelet activation (CD62p and CD14 positive platelets) and GP IIb/IIIa receptor occupancy (Biocytex GP IIb/IIIa receptor occupancy kit) was measured by flowcytometry at 5 time points: before, immediately after, 30 min, 60 min and 120 min after PCI. Statistical analysis was done by repeated measures using ANOVA.

Results: The number of activated platelets in the treated groups were significantly lower than in the control group (p<0.0001). Abciximab resulted in a significantly higher GP IIb/IIIa receptor-occupancy than high-dose tirofiban (p<0.0001).

Conclusion: Despite an increased high-dose regimen, tirofiban leads to significantly lower platelet inhibition, measured with this method, than abciximab in AMI patients.

52. Is the ADP aggregation with use of the plateletworks tube as valid as flowcytometry to assess the efficacy of platelet glycoprotein IIb/IIIa-receptor inhibitors in patients undergoing percutaneous coronary intervention?

W.B.M. GERRITSEN¹, J.W. van WERKUM², H.C. KELDER², V.H.M. DENEER³, J.M. ten BERG², F.J.L.M. HAAS¹
Department of Clinical Chemistry¹, Cardiology² and Pharmacology³, St. Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands

Introduction: Inhibition of the glycoprotein (GP) IIb/IIIa receptor on platelets by tirofiban and abciximab has been shown to reduce ischemic complications in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention (PCI). Nevertheless, the optimal dosing of these agents is unknown. The effect of GP IIb/IIIa antagonists can be measured by flowcytometry, but it is a labour intensive and expensive method. The ADP aggregation with use of the plateletworks tube (Helena Laboratories) is simple, quick and inexpensive method for platelet activation measurement. In brief, this method performs a reference platelet count in 1 ml fresh blood in a plateletworks tube containing K3-EDTA as the anticoagulant. This process is repeated with a second plateletworks tube containing 20 µmol/L ADP. In the presence of ADP, platelets associate and aggregate. As the aggregated platelets exceed the threshold limitations for platelet size, they are no longer counted as individual platelets. The ratio between the two

tubes is calculated as percent platelet aggregation. The purpose of this study was to compare the results of the ADP plateletworks tube with the results obtained with the flowcytometry in patients treated with abciximab or tirofiban.

Methods: 40 AMI patients undergoing PCI were randomised, treated with abciximab (n=20) or tirofiban (n=20) and included. Blood samples were obtained before, immediately after, at 30 minutes, at 60 minutes and at 120 minutes after PCI and measured using flowcytometry.

Results: In both groups there was no significant correlation between GP IIb/IIIa receptor-occupancy and platelet aggregation. (Pearson's correlation test: r =0,090; respectively; r =-0,031).

Conclusion: The plateletwork tubes are not comparable with "the gold standard" flowcytometry in monitoring the level of GP IIb/IIIa-receptor occupancy and platelet activation with a point of care cell counter.

53. Myocardial oxidative stress measurements by means of coronary sinus sampling in on-pump using bleese cardioplegia versus off-pump CABG

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

Department of Clinical Chemistry¹, Cardiothoracic Surgery² and Anesthesiology³, Sint Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands

Introduction: Parameters for oxidative stress are known to increase substantially during coronary surgery performed with extra corporeal circulation (ECC). When the off-pump technique is used these parameters increase only mildly. The myocardial component of oxidative stress during these two techniques to accomplish coronary artery bypass grafting is still unknown.

Methods: Fifteen patients undergoing elective coronary bypass surgery were consecutively enrolled in a prospective observational study. Group A (10 patients) was operated off-pump and group B (5 patients) on-pump. Simultaneous radial artery (RA) and coronary sinus (CS) samples were taken peri-operatively. Blood samples were analysed for uric acid, allantoin and malondialdehyde. Anti-oxidant activity was expressed as allantoin/uric acid ratios. All patients had three-vessel disease.

Results: Preoperative clinical data showed no significant differences between both groups. In group A coronary sinus and

radial artery allantoin/uric acid ratio remained below detection level during all time points. In group B coronary sinus and radial artery allantoin/uric acid ratio's showed excess production of allantoin during reperfusion. At arrival on intensive care there was a quick return towards pre-operative levels. At 5 and 10 minutes after reperfusion, median coronary sinus concentrations of malondialdehyde were significantly different in favour of group A ($p = 0.037$ and $p = 0.007$). Radial artery samples of malondialdehyde as marker for global oxidative stress showed significant differences during all reperfusion time points between the two groups ($p = 0.003$) in favour of group A.

Conclusion: Myocardial production of oxidative stress parameters is significantly reduced in the off-pump group as compared to the on-pump group. Despite the significant differences found by laboratory measurement there was no impact observed on short time clinical outcome.

54. Alveolar dysfunction in off- versus on-pump versus mini-ECC: a pilot study

W.B.M. GERRITSEN¹, W.J. van BOVEN², D.S. BOSS¹, J.C. GRUTTERS³, L.P.H.J. AARTS⁴, F.J.L.M. HAAS¹

Department of Clinical Chemistry¹, Cardiothoracic Surgery², Pulmonology³ and Anesthesiology⁴, Sint Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands

Introduction: Bio-markers of oxidative stress are known to increase substantially during conventional on-pump CABG (CCABG). In an attempt to further improve the conventional hart lung machine, a mini- extra corporeal circuit (MECC) was introduced. Organ function is known to be influenced by oxidative stress. Prolonged ventilation after coronary artery grafting is known to be an important side effect of extra corporeal circulation. The presence of pneumoproteins in the bloodstream is associated with damage of alveolar membranes. Mucin associated antigen KL6 is a protein that is almost exclusively secreted by pneumocyt II cells within the respiratory tract. The protein CC16, a Clara cell protein, plays an important immunosuppressive and anti-inflammatory role in the lung.

Methods: Twenty patients, twelve men and eight women undergoing elective coronary bypass surgery were consecutively enrolled in a prospective observational setting. In this

study ten patients were operated using CCABG technique (group A) and ten patients were operated using the MECC technique (group B). Both pneumoproteins were measured with a ELISA method. No exclusion criteria other than redo CABG and a minimum of three distal anastomoses were defined.

Results: After start of surgery the concentration of CC16 increases in all groups. The highest median peak is reached on arrival ICU for both groups. During all timepoints group B had lower values than group A for which we found a significant difference in time ($p < 0.001$). For KL-6 we noticed that the concentrations at all timepoints had normal values, however at all timepoints the concentration of KL-6 were at lowest for group A.

Conclusion: Mecc is a promising new technique showing mild alveolar dysfunction as compared to CCABG.

55. Fragmentatie van troponine T bij patiënten met een myocardinfarct

J.H.C. DIRIS¹, C.M. HACKENG¹, E.M. MICHIELSEN¹, W.TH. HERMENS², M.P. van DIEIJEN-VISSER¹

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Academisch Ziekenhuis, Maastricht; Cardiovascular Research Institute Maastricht (CARIM)²

Inleiding: Uit recente literatuur(1) is gebleken dat troponine T fragmenten in de circulatie van dialyse patiënten aantoonbaar zijn. Om meer van het fragmentatiemechanisme te weten te komen hebben we de gebruikte methode toegepast op materiaal van AMI patiënten. Door sequentiële monsters naast elkaar op gel te zetten is het tijdsgebonden fragmentatieproces in kaart gebracht.

Methode: Troponine T fragmenten werden met behulp van een immunoprecipitatie techniek uit monsters van frequent be-monsterde AMI patiënten gezuiverd. Gel-electroforese en Western blotting zijn gebruikt bij het zichtbaar maken van de fragmenten. Door het gebruik van diverse anti-troponine T antilichamen, gericht tegen verschillende epitopen op het troponine T molecuul, is een ruwe schatting verkregen van de samenstelling van de fragmenten.

Resultaat: Diverse troponine T fragmenten zijn in de circulatie

aantoonbaar na een myocard infarct. De gevonden fragmenten variëren in grootte van 9 tot 27 kDa, afhankelijk van de tijdsduur na het infarct. Patiënten met verhoogde kreatinine spiegels als direct gevolg van het infarct, vertonen in de dagen na het infarct een duidelijk ander bandenpatroon dan de infarct-patiënten met een normale nierfunctie.

Conclusie: Opvallend is de nagenoeg volledige afwezigheid van intact troponine T. Blijkbaar wordt het vrijgemaakte troponine T snel gefragmenteerd door de in het necrotische weefsel aanwezige proteases. Door de verschillen tussen patiënten met en zonder nierfunctieverlies wordt nogmaals de renale klaring van troponine T bevestigd.

Literatuur: 1. Diris JHC, etl. Impaired renal clearance explains elevated troponin T fragments in hemodialysis patients. Circulation, accepted for publication.

56. Dynamics in NT-proBNP concentration in patients with acute coronary syndrome

R.K. RIEZEBOS¹, B.A. de BOER², E. RONNER¹, E.H. SLAATS², G.J. LAARMAN¹

Department of Cardiology¹, Laboratory of Hematology and Clinical Chemistry², Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: NT-proBNP and BNP are powerful predictors of prognosis in patients admitted with ACS. As BNP and NT-proBNP are released into the circulation in response to an increase in left ventricular wall stress as caused by ischemia, we have hypothesized that, accordingly, there should be a great dynamic response in the concentration of NT-proBNP in time. This is important because a more strategic blood sampling probably enhance the predictive value of the NT-proBNP measurements and augment the use of NT-proBNP in clinical decision making.

Methods: Patients with ACS without persistent ST-segment elevation, were screened for this study. Samples were taken at admittance and during hospitalisation. The immunoassay for NT-ProBNP was performed on an Elecsys 1010 chemiluminescence analyser (Roche Diagnostics).

Results: Serial measurements after the onset of pain revealed a clear increase in concentrations of NT-proBNP. There were

significant differences in the patterns of release of NT-proBNP between individuals. Peak levels of NT-proBNP were reached approximately 16 hours after the onset of pain. Patients with a proximal lesion (large area at risk) had significantly higher NT-proBNP levels than patients with obstructions in smaller arteries. Similarly, patients with multivessel disease had higher NT-proBNP levels than patients with only one lesion, and patients with unstable AP had higher NT-proBNP levels than patients with stable AP.

Conclusion: As ischemia may lead to a transient decrease both in systolic function and in compliance, elevations in NT-proBNP may reflect not only the underlying impairment in left ventricular function, but also the severity of the acute ischemic insult, thus possibly indicating the area at risk. This could be the pathophysiological substrate for the strong predictive value of NT-proBNP in patients with ACS.

57. Vaccination and changes in plasma levels of high sensitivity C-reactive protein to determine high risk individuals for cardiovascular events

D. POSTHOUWER¹, J.G. van der BOM², M.E. NUMANS³, D.E. GROBBEE¹, H.A.M. VOORBIJ⁴

Julius Center for Health Sciences and Primary Care¹; Van Creveld Clinic³; Department of Advanced Clinical Chemistry⁴, University Medical Centre, Utrecht; Department of Clinical Epidemiology², Leiden University Medical Centre, The Netherlands

Introduction: Plasma levels of high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) are indicative of an increased risk of cardiovascular events. It has been suggested that the degree of response to an inflammatory stimulus is also associated with an increased risk for cardiovascular events. This study was set up to examine whether an influenza vaccine or an influenza vaccine in combination with a pneumococcal vaccine can be used as a model to study the response to mild stimulation of the inflammatory system.

Methods: In this study 39 subjects aged 65 years and older were allocated to two groups; 19 subjects received the influenza vaccine, 20 subjects the combination of influenza and pneumococcal vaccine. HsCRP was measured using the BNII HsCRP Assay (Dade Behring) at day 0, day 2 or 3, and day 4 or 5 after vaccination. The significance of difference in

HsCRP was assessed using Wilcoxon Signed Rank Test.

Results: HsCRP concentration was highest at day two. After influenza vaccination hsCRP increased with 0.20 mg/L (range -0.60 - 2.50, P = 0.029), and after both the influenza and the pneumococcal vaccine hsCRP increased with 0.60 mg/L (range -1.00-29.70, P = 0.001). On average there are higher levels in patients receiving the combined vaccination.

Conclusion: Our findings show that the influenza vaccine alone as well as the combination of the influenza and pneumococcal vaccine increase hsCRP-levels with a peak two days after vaccination. Taken together our findings show that the influenza vaccine is a useful way to induce the production of the acute phase protein CRP. This can be used in determining interindividual differences in inflammatory response.

58. Paraoxonase genotype and phenotype contribute to plasma high-density lipoprotein levels in familial hypercholesterolemia

T.H. van HIMBERGEN^{1,2}, M. ROEST¹, J. de GRAAF², E. JANSEN³, H. HATTORI⁴, J. KASTELEIN⁵, L.J.H. van TITS², A.F.H. STALENHOF², H.A.M. VOORBIJ¹

Department of Advanced Clinical Chemistry¹, University Medical Centre, Utrecht; Department of General Internal Medicine², University Medical Centre, Nijmegen; Laboratory for Health Effects Research³, National Institute for Public Health and Environment, Bilthoven; Department of Vascular Medicine⁵, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands; Department of Advanced Medical Technology and Development⁴, BML Inc., Saitama, Japan

Introduction: Serum paraoxonase (PON-1) is a high-density lipoprotein (HDL) associated enzyme, which protects low-density lipoprotein (LDL) against oxidative modifications. In addition, PON-1 inhibits oxidation of HDL and hence preserves the function of HDL. Both properties of PON-1 may contribute to prevention of cardiovascular disease (CVD). We have investigated the effect of PON-1 genotype and PON-1 phenotype on HDL levels and Intima Media Thickness (IMT), a surrogate endpoint of CVD.

Methods: The L55M and Q192R polymorphisms in the coding sequence and the -107C/T, -162A/G, -824G/A and -907G/C polymorphisms in the promoter sequence of the PON-1 gene were determined in 302 patients with familial hypercholesterolemia (FH). PON-1 levels were measured with PON-1 specific antibodies. PON-1 activity was monitored by the

hydrolysis rate of paraoxon, diazoxon and phenyl acetate.

Results: Genetic make-up for high PON-1 levels and activity was associated with high HDL levels (p values for trend 0.008, 0.020, 0.042 and 0.037 for L55M, Q192R, -107C/T and -907G/C, respectively). In support, high PON-1 levels and activity were associated with high HDL levels (r=0.25 p<0.001, r=0.23 p=0.01, r=0.29 p<0.001 and r=0.19 p=0.03, for PON-1 levels, paraoxonase-, diazoxonase and arylesterase- activity, respectively). Neither HDL levels nor PON-1 genotype, levels and activity were associated with CCA-IMT.

Conclusion: Our observations support the hypothesis that PON-1 preserves HDL in plasma. The relevance of this HDL preserving activity needs to be delineated in studies with clinical endpoints of CVD.

59. The effects of paraoxonase on cholesterol lowering by simvastatin and atorvastatin

M. ROEST¹, T.H. van HIMBERGEN^{1,2}, J. de GRAAF², H. HATTORI⁴, J.J.P. KASTELEIN³, L.J.H. van TITS², A.F.H. STALENHOEF², H.A.M. VOORBIJ¹

Department of Advanced Clinical Chemistry¹, University Medical Centre, Utrecht; Department of General Internal Medicine², University Medical Centre, Nijmegen; Department of Vascular Medicine, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands; Department of Advanced Medical Technology and Development⁴, BML Inc., Saitama, Japan

Introduction: LDL cholesterol lowering with HMG-CoA reductase inhibitors (statins) is an efficient treatment to reduce the cardiovascular disease risk. However, there is a significant inter-individual variation in cholesterol lowering efficiency among patients. This variability among patients may be a consequence of the pharmacokinetic profiles of statins. In the body statins are present as lactone metabolites and as β -hydroxy metabolites. The lactone form is more efficiently eliminated from the body. Paraoxonase type 1 and type 3 (PON-1 and -3) might play a crucial role in statin metabolism, because they are capable of hydrolysing lactones into the active β -hydroxy acid form of statins and vice versa. Plasma paraoxonase levels are highly variable among subjects, mainly due to genetic make-up. Our aim is to study effects of paraoxonase genotype, levels and activity to cholesterol lowering in familial hypercholesterolemia patients treated with statins.

Methods: We studied the effects of six paraoxonase genotypes (PON-1 Q192R, L55M, T-107C, G-162A, G-824A and C-907G), paraoxonase levels and paraoxonase activity towards phenylacetate (PON-1 specific) and dihydrocoumarin (PON-1 and PON-3 specific) on the efficiency of cholesterol lowering by either simvastatin and atorvastatin treatment in 302 patients with familial hypercholesterolaemia. During two years of follow up, LDL- and HDL-cholesterol levels have been determined every two months.

Results: LDL levels decreased with 48.9% and HDL levels increased with 13.3% during two year treatment with simvastatin or atorvastatin treatment. High PON-1 levels, determined by their genetic make-up, significantly predicted a more pronounced LDL reduction during the first 8 weeks and a less steep HDL increment during the whole treatment period.

Conclusion: These results indicate that paraoxonase and its genes modifies the process of lipid lowering with statins.

60. Measurements of changes of lipoprotein(a) during pregnancy: three assays compared

G.T.R. MANTEN^{1,3}, A. FRANX³, Y.Y. van der HOEK², T.M. HAMEETEMAN¹, P. WESTERS⁵, G.H.A. VISSER³, H.A.M. VOORBIJ⁴

Department of Obstetrics and Gynaecology¹, Department of Clinical Chemistry², St. Antonius Hospital, Nieuwegein; Department of Perinatology and Gynaecology³, Department of Advanced Clinical Chemistry⁴, University Medical Centre, Utrecht; Centre of Biostatistics⁵, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

Introduction: Lipoprotein(a) is a low-density lipoprotein (LDL)-like particle. Individual concentrations are predominantly genetically determined and remarkably constant. Little is known about lipoprotein(a) concentrations in pregnancy and those studies are inconclusive. Most studies differ substantially in design and lipoprotein(a) assays used, are very different in specificity and calibration. In this study three commonly used assays were compared for their ability to measure the changes of lipoprotein(a) concentrations during pregnancy.

Methods: Nineteen healthy nulliparous women with uncomplicated pregnancies were enrolled. Blood was drawn every 4 weeks during pregnancy from 9 weeks onwards, during labour and at 2 to 4 weeks and 3 to 5 months after delivery. Lipoprotein (a) was measured by three different commercially available assays: an apolipoprotein (a) isoform independent enzyme-linked immunosorbent assay (method A); an isoform dependent immunoprecipitin analysis (method B), and an

enzyme-linked immunosorbent assay method that is also isoform dependent (method C). Multilevel analysis was used to describe the data and to calculate a curve for the course of lipoprotein (a) in pregnancy.

Results: There are significant differences in mean lipoprotein (a) concentrations as measured by the three assays. For the apo(a) isoform independent assay, mean lipoprotein (a) was highest with greater variance between women. The shape and slope of the mathematical curves, describing the changes during pregnancy, were however comparable between the assays.

Conclusion: All three assays can be used for measuring lipoprotein (a) in pregnant women, with restrictions in interpretation. A mathematical curve can be used to describe the change of lipoprotein (a) concentrations during pregnancy. The pattern of lipoprotein (a) changes in normal pregnancy is independent of the analytical assay and the lipoprotein (a) isoform, but absolute values vary considerably.

61. BNP and NT-proBNP in patients with end-stage heart failure supported by a left ventricular assist device

H. KEMPERMAN¹, M. van den BERG¹, H. KIRKELS², N. de JONGE²

Department of Clinical Chemistry¹, Heart Lung Centre Utrecht², University Medical Centre, Utrecht, The Netherlands

Introduction: In the UMC, each year approximately 25 patients with end-stage heart failure receive a donor heart. Due to the lack of donor organs left ventricular assist devices (LVAD) to bridge the period to transplantation are used. Implantation of such a pump results in a normalization of hemodynamics, improvement of end-organ dysfunction and exercise tolerance. The effect of unloading of the left ventricle on BNP and NT-proBNP was studied.

Methods: Samples of 15 patients were analysed preimplantation, 1 week, 1 month and 3 months after implantation of a LVAD (Heartmate). BNP was analysed on an ADVIA Centaur and NT-proBNP on an Elecsys immunochemistry system.

Results: Overall there is good correlation between BNP and NT-proBNP. All patients had elevated BNP (mean=537

pmol/L) and NT-proBNP (mean=2432 pmol/L) levels preimplantation which decreased within 1 week to 80 pmol/L and 354 pmol/L respectively. After stabilization between 1 week and 1 month both BNP and NT-proBNP further decreased to 34 pmol/L and 110 pmol/L 3 months post implantation. Remarkably, preimplantation BNP levels are twice as high whereas NT-proBNP levels are 10 times higher as reported for NYHA class IV patients. Most likely this discrepancy is because most of our patients have renal dysfunction preimplantation resulting in reduced renal clearance of NT-proBNP. BNP, which is mainly cleared by a specific receptor, is less influenced by renal function. This hypothesis fits with our findings that the NT-proBNP/BNP ratio increased with rising creatinin levels.

Conclusion: BNP and NT-proBNP correlate well with the unloading of the left ventricle and the clinical improvement of patients with end-stage heart failure. Based on our results

overestimation of NT-proBNP has to be considered in patients with severe renal dysfunction.

Endocrinologie en intermediaire stofwisseling

62. Voorspelt de [PTH] de uitslag van de ^{99m}Tc-sestaMIBI-scan en helpt de scan de chirurg bij de bijschildklieroperatie?

H.J.L.M. ULENKATE¹, C.M. LEM¹, J.C. VERZIJL¹, P.W. de GRAAF², P.C. SMIT², D.H. SCHWEITZER³, F. CELIK⁴, J.J.J. BORM⁴
Medische Laboratoria, Klinische Chemie¹, Chirurgie², Endocrinologie³, Nucleaire Geneeskunde⁴, Reinier de Graaf Groep, Delft

Inleiding: Van patiënten die een OK voor bijschildklierexcisie ondergingen, werden MIBI-scans gemaakt om de chirurg te helpen bij de lokalisatie van het bijschildklieradenoom en om een minimaal invasieve ingreep mogelijk te maken. Bijschildklieradenomen zijn vaak zichtbaar op de MIBI-scan. Alleen bij juiste lokalisatie is minimaal invasieve chirurgie mogelijk. De indruk bestond dat peri-operatieve scintigrafie (MIBI-scan) in sterk wisselende mate bijdroeg aan het lokaliseren van bijschildklieradenomen. Doel: nagaan bij welke patiënten peri-operatieve scintigrafie doelmatig is.

Methode: Retrospectieve semi-kwantitatieve blinde herbeoordeling van opeenvolgende peri-operatieve scintigrafische studies in relatie tot de [PTH], het operatieverslag en de PA-uitslag, als gouden standaard.

Resultaat: De [PTH] correleerde niet met de activiteitsopname op de MIBI-scan. Alleen bij [PTH] > 20 pmol/l kwamen geen

lage intensiteitscores voor. In de totale populatie gaven de scans in 66% de juiste lokalisatie aan van het bijschildklieradenoom. De intensiteitscores van de scans toonden geen relatie met de juistheid van de lokalisaties. Uit de PA-verslagen bleek dat het niet altijd gemakkelijk was voor de chirurg om bijschildklierweefsel te herkennen. De rapportagetijd van de PA-verslagen was korter vergeleken met die van de [PTH]'s.

Conclusie: In deze studie bleek dat de [PTH] vooraf aan de OK geen voorspeller was van de scan-uitslag en dat de scans in tweederde van de onderzochte patiënten de juiste lokalisatie-zijde voor de bijschildklierexcisie aangaven. Peri-operatieve bijschildklierscintigrafie lijkt zinvol bij [PTH's] > 20 pmol/l. Bij lagere [PTH's] leverde scintigrafie niet altijd tijdswinst op voor de OK en werd de patiënt wel met straling belast. PA en de peri-operatieve [PTH] droegen respectievelijk bij aan de weefseltypering en het besluit de OK af te ronden of voort te zetten.

63. Is vitamin D prescribed to the elderly in Northern Netherlands?

J.W. BRINKMAN^{1,3}, E. van der VEER¹, M.R. FOKKEMA¹, P. BIJSTER², F.A.J. MUSKIET¹, L.T.W. de JONG-van den BERG³

Pathology and Laboratory Medicine¹, University Hospital; Clinical Chemistry², Lab Noord; Pharmacoepidemiology and Pharmacotherapy³, Department of Social Pharmacy, University of Groningen, Groningen, The Netherlands

Introduction: The Dutch Health Council increased the recommended dietary allowance of vitamin D to 5-12.5 µg/d for persons, aged >50 years in 2000. This recommendation was based on the relation between vitamin D and risk of osteoporosis. We examined the extent to which doctors adhere to the recommendation by studying the prescription of vitamin D supplements and the degree of vitamin D deficiency among elderly in Northern Netherlands.

Methods: The Interaction Database, containing the recipe data of pharmacists in Northern Netherlands, was used to study vitamin D prescriptions in 2002, two years after the publication of the current vitamin D recommendation. Furthermore, the 25OHD serum levels of patients were obtained from two databases (University Hospital and General Practitioners

Laboratory North in Groningen), to determine the prevalence of vitamin D deficiency (<30 nmol/L) and insufficiency (<50 nmol/L) in the same region.

Results: The Interaction Databank contained data of 91.509 persons, aged >50 years, of which 42.358 were men and 49.151 women. The doctors prescribed specific vitamin D supplements to 7/1000 men and to 15/1000 women or multivitamins to 1/1000 men and to 2/1000 women. 25OHD serum levels below 30 nmol/L (below 50 nmol/L) were found in 32% (54%) of the examined samples in winter (n=329) and in 22% (44%) of the samples in summer (n=217).

Conclusion: Pharmacist data and 25OHD serum levels showed that doctors do not yet adhere to the recommendation of the Dutch Health Council.

64. Noodzaak tot aanpassing insulinegrenswaarden voor het vaststellen van hyperinsulinisme bij het insulinoom

J.M.W. van den OUWELAND¹, B.H.R. WOLFFENBUTTEL², J.G.J. POUWELS³, R.S.M.E. WOUTERS⁴
Afdeling Pathologie en Laboratorium Geneeskunde¹, Afdeling Endocrinologie², Academisch Ziekenhuis Groningen; Klinisch Chemisch Laboratorium³, Afdeling Interne Geneeskunde⁴, Scheper Ziekenhuis, Emmen

Inleiding: Een discordant hoge plasma-insuline waarde (> 6 IU/ml) bij een symptomatische hypoglykemie (<2,2 mmol/l) is bewijzend voor een insulinoom. Een clinicus kan voor onverwacht diagnostische problemen worden gesteld als er ondanks wijzigingen in de bepalingsmethodiek voor insuline nog met oude afkapwaarden wordt gewerkt.

Methode: Een 57-jarige patiënt verdacht voor een insulinoom werd in het SZE onderworpen aan een vastenproef. Waarden bij symptomatische hypoglykemie; glucose 2,2 mmol/L, insuline 2,9 mIU/l (Bayer Centaur). Op basis van bovengenoemd afkappunt (en ratio insuline (mIU/l)/ [glucose (mmol/l) - 1,5]

> 9) leek een insulinoom niet bewezen. Herhaling van de vastenproef resulteerde in gelijke bevindingen. Patiënt werd doorverwezen naar het AZG en een nieuwe vastenproef bleek nu wel bewijzend voor een insulinoom (glucose 1,9 mmol/l, insuline 15 mIU/l (DSL RIA)). Een pancreaskop lesie werd aangetoond waarop succesvolle enucleatie volgde met normalisatie bloedsuikerwaarden.

Resultaat: Verschil in laboratoriumuitslagen kon verklaard worden door verschil in proinsuline kruisreactiviteit tussen beide insuline assays (Bayer Centaur 0%, DSL RIA 55%). In 85% van de insulinomen bestaat >25% van het IRI (immuno-

reactieve-insuline) uit proinsuline. Nameting van proinsuline (69 pmol/l; ref <25 pmol/l) toonde aan dat het een voornamelijk proinsuline-producerend adenoom betrof. Insuline afkapwaarden (> 6 IU/ml) of ratio (insuline (mIU/l)/ [glucose (mmol/l) - 1,5] > 9) zijn vastgesteld voor insuline assays met een brede specificiteit. Bij gebruik van een intacte insuline is het raadzaam additioneel een pro-insulinebepaling te laten verrichten.

Conclusie: Bij gebruik van specifieke insuline-assays dient de grenswaarde voor hyperinsulinisme bij hypoglykemie tijdens een vastenproef te worden herzien.

Literatuur: Chia, et al. The diagnosis of fasting hypoglycemia due to an islet-cell tumor obscured by a highly specific insulin assay. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1464-1467.

Bloedvorming, bloedstolling, transfusie

65. Subjects with a shortened activated partial thromboplastin time show increased in-hospital mortality which is associated with elevated D-dimer, C-reactive protein and glucose levels

E. ten BOEKEL^{1,2}, W. de KIEVIET¹, P.C.M. BARTELS²
Clinical Laboratory¹, Sint Lucas Andreas Hospital, Amsterdam; Laboratory for Clinical Chemistry, Haematology and Immunology², Medical Center Alkmaar, The Netherlands

Introduction: Shortened activated partial thromboplastin times (aPTT) are associated with enhanced coagulation activation. Clinical relevance of shortened aPTTs is not well defined. The aim of this study was to determine the in-hospital mortality rate in subjects with shortened aPTTs.

Methods: A total number of 2808 patient with different aPTT values results were monitored prospectively for 10 days in order to determine the in-hospital mortality rate. Plasma D-dimer, CRP and glucose, markers which have been related with increased mortality, were tested in subjects with shortened aPTTs.

Results: Patients with short aPTTs showed clinical diagnoses similar to those with normal aPTTs values. At day 1 of hos-

pital admission, 0.8% of subjects with aPTTs of 30 s died, whereas in case of aPTTs<23 s mortality rate amounted to 3.4%. During hospitalization, 12.7 % of the subjects with aPTTs <26 s died compared with 5.1% for subjects with aPTT of 30 s. Non-survivors with short aPTTs had significantly higher plasma D-dimer, CRP and glucose levels compared with survivors.

Conclusion: Subjects with shortened aPTTs on admission are at increased risk of mortality compared with subjects with normal aPTTs (odds ratio 2.6, 95% CI: 2.1-3.5). High levels of D-dimer, CRP and glucose was associated with increased mortality in patients with short aPTTs.

66. Eén of twee hematologische maligniteiten?

J.W. SMIT^{1,2}, H. PIERSMA², R. BEKKEMA³, J.E.J. GUIKEMA³
LabNoord¹, Martiniziekenhuis², Academisch Ziekenhuis³, Groningen

Inleiding: Chronische B-celleukemieën en B-cel-Non-Hodgkin-lymfomen zijn de meest voorkomende hematologische maligniteiten. Het aantonen van deze aandoeningen gebeurt in het klinisch-chemisch-hematologisch laboratorium met celtellers en microscopisch onderzoek. Een definitieve diagnose volgt na immunofenotyperingsonderzoek, waarbij het monoklonale karakter en het subtype van de chronisch lymfatische proliferatie kan worden vastgesteld. Soms komt het voor dat morfologisch en/of immunofenotyperingsonderzoek twee celpopulaties aantonen, zodat de vraag gesteld kan worden of er sprake is van één of van twee klonen.

Methode: Casus: een 79-jarige man wordt door de huisarts i.v.m. moeheid naar de internist verwezen. Laboratoriumonderzoek: Hb 8,5 mmol/l, leukocyten 22,5x10⁹/l, voornamelijk lymfocyten 17,9x10⁹/l. De handdif geeft een monotone lymfocytenpopulatie.

Resultaat: Immunofenotypering van het bloed: Er sprake is van twee B-celpopulaties; 1. 10% (kleine cellen) van de totale

celpopulatie: CD19+, CD20zw+, CD23st+, CD5+,CD11c+, CD24+, CD25zw+, FMC7+, _zw+, IgMzw+, IgDzw+, passend bij CLL 2. 57% (grotere cellen): CD19st+, CD20st+, CD22st+, CD11c+, FMC7+, _+, IgMzw+, IgGzzw+, geen subtypering mogelijk. Aanvullend onderzoek: De subpopulaties werden m.b.v. FACS gescheiden. DNA werd geïsoleerd, gevolgd door PCR voor het IgH-hypervariabele CDR3-gebied. CDR3-lengteanalyse m.b.v. capillaire gel-electroforese gaf indientieke CDR3 lengtes, suggererend dat de CD19st+ / CD5- en de CD19+ CD5+ celpopulaties klonaal gerelateerd zijn.

Conclusie: Er is bij deze patiënt sprake van één monoklonale populatie die zich gedifferentieerd heeft in twee verschillende celtypen. Nader onderzoek met meer patiënten zal moeten aantonen of er qua prognose of therapeutische behandeling onderscheid is te maken tussen patiënten die een of meerdere populaties van een kloon B-cellen of meer klonen van B-cellen produceren.

67. Microparticles from various cell types in severe dengue virus infections

A.T.A. MAIRUHU¹, A. LEYTE², T.E. SETIATI³, K. JOOP², K. DJAMIATUN³, A. STURK⁴, A.G. SOEMANTRI³, H. ten CATE⁵, R. NIEUWLAND⁴, D.P.M. BRANDJES¹, E.C.M. van GORP¹
Slotervaart Hospital¹; Onze Lieve Vrouwe Gasthuis², Amsterdam, The Netherlands; Paediatric Dept.³, Kariadi Hospital, Semarang, Indonesia; Academic Medical Centre⁴, Amsterdam; Academic Hospital Maastricht⁵, Maastricht, The Netherlands

Introduction: Dengue virus causes an infectious disease which can culminate in the life-threatening conditions dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). Their pathogenesis is still largely unknown. The most prominent pathophysiological change in severe infections is increased vascular permeability, loss of plasma from the vascular com-

partment and impending shock. The characteristic haemorrhagic phenomena are thought to be due to vasculopathy, thrombocytopenia and thrombocytopeny, but coagulation abnormalities may play a more important role than currently perceived (1). Defective endothelial function in dengue infection can lead to changes in thrombogenic properties of the

endothelium for example via expression of tissue factor, putatively mediated by circulating microparticles derived from activated endothelial cells and other cells.

Methods: We have studied microparticle formation in relation to the development of hemostatic and vascular abnormalities in patients admitted to the paediatric intensive care unit and paediatric ward with DHF and DSS.

Results: Our data show that endothelial cell (positive for CD54, CD62e) and monocyte (positive for CD14) derived microparti-

cles were present on admission in eventual non-survivors. Interestingly, no platelet derived microparticles (positive for CD61) could be demonstrated in these severe cases.

Conclusion: Endothelial cell and monocyte derived microparticles may play a pivotal role in the development of severe disease, where platelet particles may already have been consumed.

Literature: 1. Mairuhu, et al. Lancet Infect Dis 2003; 3.

68. Two common polymorphisms in the thymidylate synthase gene and the effect on total homocysteine levels and venous thrombosis risk

H. GELLEKINK^{1,2}, L.A.J. KLUIJTMANS¹, H.J. BLOM¹, M. den HEIJER^{2,3}

Laboratory of Paediatrics and Neurology¹, Department of Endocrinology², Department of Epidemiology and Biostatistics³, University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

Introduction: Elevated homocysteine confers a higher risk for venous thrombosis (VT). Methyltetrahydrofolate (MTHF) is the substrate for the remethylation of homocysteine. Polymorphisms in genes of folate metabolism that influence MTHF may affect homocysteine and disease risk. Thymidylate synthase (TYMS) catalyzes the conversion of dUMP to dTMP and competes with methylenetetrahydrofolate (MTHF) reductase for the substrate MTHF. A double/triple repeat (denoted 2R/3R) in the 5' untranslated region (UTR) and a 6 bp deletion in the 3' UTR of TYMS has been described. The 3R allele was found to be associated with higher translation efficiency while the 6 bp deletion decreased mRNA stability.

Methods: We examined the relationship between these two polymorphisms in the TYMS gene and total homocysteine (tHcy) and risk for developing VT in a population of 161 recurrent VT cases and 417 controls.

Results: Both genotype distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium. Individuals with the 6 bp deletion on both alleles seem to have a protective effect on VT compared to those having no deletion (OR 0.62 [CI 0.23-1.18]) although no effect on tHcy was found.

Conclusion: The assessed polymorphisms in the TYMS gene are no determinants of tHcy. Individuals carrying the 6 bp deletion on both alleles seem to have a protective, though not significant, effect on venous thrombosis.

69. Vitamine B12, transcobalamine en myeloproliferatieve aandoeningen

J. LINDEMANS¹, L.TH. VLASVELD², A.A.M. ERMENS³, P.H. GRIFFIOEN¹, R. de JONGE¹

Afdeling Klinische Chemie¹, Erasmus MC Rotterdam; Interne Geneeskunde², Bronovo Ziekenhuis, Den Haag; Klinische Chemie³, Amphia Ziekenhuis, Breda

Inleiding: Bij chronische myeloïde leukemie (CML) is het vitamine-B12-gehalte sterk gestegen als gevolg van overmatige uitscheiding van haptocorrine (HC), één van de twee vitamine-B12-bindende eiwitten in plasma. De vraag is of hierdoor de beschikbaarheid voor binding aan het functionele transport-eiwit, transcobalamine (TC), zodanig wordt belemmerd dat in de toegenomen vraag van de cellen niet kan worden voorzien.

Methode: Bij negen achtereenvolgende patiënten met CML is bij diagnose en na cytoreductieve behandeling een CBC, het foliumzuur-, vit.B12-, vit.B6- en homocysteïnegehalte bepaald. Ter vergelijking is datzelfde gedaan bij elf gezonde personen die zich beschikbaar hadden gesteld voor perifere stamceldonatie en in dat verband met G-CSF werden behandeld (5g/kg gedurende 5 d).

Resultaat: Bij de CML-patiënten trad, gecorreleerd met de daling in het aantal WBC, een scherpe daling van het aanvankelijk verhoogde plasmahomocysteïne op (mediaan van

24,2 naar 14,2 µM) bij een gelijkblijvend folaat, maar een dalend vitamine B12 (mediaan 1230 naar 390 pM) en vit.B6 (mediaan 113 naar 57 µM). Bij de G-CSF-behandelde gezonden trad een omgekeerd patroon op: homocysteïne mediaan 11,3 naar 13,6 µM; vit.B12 mediaan 216 naar 345 pM en vit.B6 mediaan 53 naar 01 µM (p<0.05 in alle vergelijkingen). Ten tijde van leukocytose was zowel bij CML als tijdens G-CSF behandeling het TC-gebonden vit.B12 verlaagd.

Conclusie: Het verhoogde homocysteïne, in combinatie met een verlaagd TC-gebonden B12 en normaal folaat, suggereert een functioneel tekort aan B12, ondanks het hoge totaal B12. Deze situatie lijkt niet specifiek voor het leukemisch proces, aangezien G-CSF-geïnduceerde celproliferatie eenzelfde beeld veroorzaakt. Vit.B6 wordt in volbloed gemeten en de verhoogde waarde wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de verhoogde bijdrage uit de leukocyten.

70. Increased high molecular weight fibrinogen in pre-eclampsia

G.T.R. MANTEN¹, J.M. SIKKEMA¹, A. FRANX¹, T.M. HAMEETEMAN⁴, G.H.A. VISSER¹, P.G. de GROOT², H.A.M. VOORBIJ³

Department of Obstetrics and Gynaecology¹, Department of Hematology², Department of Advanced Clinical Chemistry³, University Medical Centre, Utrecht; Department of Perinatology and Gynaecology⁴, St. Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands

Introduction: The major coagulation protein fibrinogen is a heterogeneous protein with three main fractions: high molecular weight fibrinogen, low molecular weight fibrinogen and low molecular weight fibrinogen. The clottability of high molecular weight fibrinogen is highest as compared to the other fractions. Pre-eclampsia is associated with a state of hypercoagulability, and with an increase of fibrinogen concentration. The aim of the

present study was to examine if the increased total fibrinogen plasma concentration in patients with pre-eclampsia is associated with a change in distribution of the main fibrinogen fractions.

Methods: Plasma was collected from 14 patients with pre-eclampsia and from 14 healthy pregnant matched controls. Total fibrinogen concentrations were determined according to Clauss. The percentage high molecular weight fibrinogen was

assessed by SDS-electrophoresis and densitometry after isolation of fibrinogen by precipitation. The study groups were compared by the Mann-Whitney U test.

Results: The median (range) total fibrinogen concentration in the pre-eclampsia group was 5.04 (3.25-6.51) g/L and in the control group 4.19 (3.61-5.38) g/L ($p < 0.05$). The median (range) percentage high molecular weight fibrinogen was 76.5 (69.6-84.0) % and 73.0 (69.0-78.9) % in the pre-eclampsia and

control group, respectively ($p < 0.05$).

Conclusion: In pre-eclampsia the concentration of total fibrinogen is increased and the percentage high molecular weight fibrinogen is also slightly higher than in normal pregnancy. These results may be a reflection of the exaggerated inflammatory response, and subsequent endothelial activation, which are currently believed to be the key pathophysiological mechanisms in pre-eclampsia.

71. Verworven M. Glanzmann door auto-antistoffen tegen bloedplaatjes GPIIb/IIIa

H.J. ADRIAANSEN¹, D.W. van TOORN², L. PORCELIJN³, J.D.E. van SUIJLEN¹

Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium¹, afdeling Interne Geneeskunde², Gelre Ziekenhuizen, Apeldoorn en Zutphen; Afd. Trombocyten- en leukocytenserologie³, Sanquin Diagnostiek, Amsterdam

Inleiding: Een 76-jarige vrouw is sinds enkele jaren bekend bij de internist met hemorragische diathese. Haar kleindochter heeft M. Glanzmann, verdere familieanamnese is niet afwijkend. Met name na operaties en invasieve ingrepen heeft zij heftige en langdurige nabloedingen. Geregeld waren ook na relatief kleine ingrepen, zoals een hartkatheterisatie, transfusies van erythrocyten nodig. Er was nimmer een trombopenie en oriënterend stollingsonderzoek was altijd normaal. In 2001 was een elders uitgevoerde trombocytenaggregatie niet afwijkend. In april 2003 ondergaat zij wederom een hartkatheterisatie.

Methode: Gemeten werden APTT, PT, fibrinogeen en het aantal trombocyten. De internist adviseert daags voor de ingreep toediening van twee eenheden FFP en een uur voor de ingreep alsmede na de ingreep toediening van 5-donorenconcentraat trombocyten. In het vervolg werd de trombocytenfunctie geanalyseerd m.b.v. een 'platelet function analyzer' (PFA). Daarbij werd de reactie gemeten op collageen/epinefrine (EPI) en collageen/ADP (ADP). Flowcytometrisch werd de expressie

van GPIIb/IIIa (CD41 en CD61) getest. Tenslotte werden uitgebreide trombocytenaggregatietesten ingezet en werd onderzoek gedaan naar trombocytenantistoffen.

Resultaat: APTT, PT, fibrinogeen waren normaal. Het aantal trombocyten was $265 \times 10^9/l$. Patient had ondanks de toediening van FFP en trombocyten een ernstige nabloeding. De FFA-Öosure time^p EPI en ADP waren beide sterk verlengd > 300 sec. Op de trombocyten was een normale expressie van het GPIIb/IIIa-complex. De trombocytenaggregatie-testen zijn licht afwijkend. Patiënt blijkt een hoge titer IgG auto-antistoffen tegen het GPIIb/IIIa te hebben.

Conclusie: Patiënte heeft auto-antistoffen tegen bloedplaatjes GPIIb/IIIa. Dit complex is belangrijk voor een goede trombocytenfunctie. We kunnen spreken van een verworven M. Glanzmann. Toediening van homologe trombocyten geeft geen duidelijke verbetering van de hemostase omdat de antistoffen de functie van deze trombocyten ook remmen.

72. Negative direct antiglobulin test (DAT) in a patient with hemolytic disease of the newborn?

K. VROONHOF¹, T. van LAAR¹, W.A. KORS², H.C. van PROOYEN¹, W.W. van SOLINGE¹

Central Diagnostic Laboratory¹, Department of Pediatric Haematology², University Medical Centre, Utrecht, The Netherlands

Introduction: In diagnosing hemolytic disease of the newborn the direct antiglobulin test (DAT) can be used to determine whether antibodies are bound to the erythrocytes of the patient. We present a patient with a negative DAT, but with severe hemolysis due to anti-RhD-antibodies.

Methods: The patient described is the second child of the mother. The first baby suffered from hemolytic disease of the newborn, due to anti-RhD-antibodies. For this reason, the second pregnancy was closely monitored. During the pregnancy the titer determination of the antibodies and ADCC-tests were performed several times.

Results: The baby was found to be RhD-positive. Just before delivery the titer of RhD-antibodies was 1:128.000, ADCC-test was >80%. Three intrauterine transfusions had already been given to the baby. After she was born, an exchange transfusion

was performed. The DAT was negative. It was not possible to determine the blood group, due to the presence of donor blood. After 5 days the girl was discharged with an Hb 11.4 mmol/l. Regular control visits were performed. 8 Weeks after birth she came to the emergency unit with an Hb 3.5 mmol/l. The blood group was still tested O negative, with a negative DAT and no reticulocytes. 10 Weeks after birth we performed an anti-RhD titer determination ($> 1: 1024$). Haemolysis parameters were not elevated and no reticulocytes were detected. Only 16 weeks after birth the DAT became weakly positive for IgG1 and mixed fields were seen in blood group determination.

Conclusion: In this baby the patient-specific red cells were already degraded in the bone marrow. No red cells from the patient were observed until 16 weeks after birth. This explains the negative DAT.

73. Acute presentatie van HbH-disease

J. SLOMP¹, A.N. BOSSCHAART², M. DOUSMA², R. ten BOS¹, R. van ZWIETEN³, D. ROOS³, F.A.J.T.M. van den BERGH¹
Afd. Laboratorium¹ en Kindergeneeskunde², Medisch Spectrum Twente, Enschede; Centraal Laboratorium Bloedtransfusiedienst³, Sanquin Diagnostiek, Amsterdam

Inleiding: HbH-disease is een relatief zeldzame vorm van alfa-thalassaemie waarbij minimaal 3 genen van het alfa-globinegen uitgeschakeld zijn. Het klinisch beeld kan hierbij zeer wisselend zijn.

Methode: Hb-pathieonderzoek werd uitgevoerd door middel van Hb-typering (HPLC) en DNA-diagnostiek.

Resultaat: Wij presenteren gegevens van een 14-jarig meisje van Vietnamese afkomst met blanco voorgeschiedenis. Zij presenteerde zich in ons ziekenhuis met een shock door een zeer laag Hb en koorts. Deze bleek veroorzaakt te zijn door een aplastische crisis bij een Parvo-virusinfectie bij HbH-disease.

De HbH-disease werd veroorzaakt door een compoundheterozygotie van de SEA-mutatie en de Constant-Spring-mutatie in de genen van de alfa-ketens. Familieonderzoek toonde bovendien aan dat behoudens deze 2 mutaties in de alfa-ketens enkele gezinsleden tevens drager zijn van de 3,7-kb-deletie in het alfa-gen en een mutatie in het beta-gen resulterend in HbE. Klinische symptomen van de Hb-pathie werden in deze familie niet tot nauwelijks waargenomen.

Conclusie: Uitgebreide Hb-pathie in gezin van Vietnamese afkomst met minimale klinische presentatie.

74. Cave! Consequenties van de diagnose MDS bij een patiënt met medicamenteus gemedieerde beenmergfwijkingen

H.J. ADRIAANSEN¹, L. AUSEMA², H.M. PETERS³, J.J. JASPERS¹

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹, afdeling Interne Geneeskunde², afdeling Klinische Pathologie³; Gelre Ziekenhuizen, Apeldoorn en Zutphen

Inleiding: Een 70-jarige vrouw met type-II-diabetes-mellitus presenteert zich in september 2000 met een Hb van 4,8 mmol/l. Er is een lichte neutro- en trombopenie. Op een beenmergbiopsie suggereert de patholoog, ook na revisie extern, de diagnose MDS. Een aspiraatsel wordt niet beoordeeld. Patiënte krijgt erythrocytentransfusies. Tweewekelijks transfusies blijken noodzakelijk. Tot juli 2003 krijgt zij in totaal 150 eenheden erythrocyten. In juli blijkt het Hb 7,3 mmol/l. Daarna blijkt zij ook geen transfusies meer nodig te hebben. Ferritine is 4456 µg/l.

Methode: In oktober 2003 bloedbeeld met microscopische differentiatie en onderzoek beenmergaspiraatsel.

Resultaat: Hb 10,5, MCV 107 fl, leucocyten 14,0 x 10⁹/l en trombocyten 151 x 10⁹/l. Microscopisch geen dysplastische kenmerken. In het beenmerg een zeer actieve erythropoëse, met goede uitrijping, met een lichte dyserythropoëse maar geen duidelijke dysplasie. Beeld past bij regeneratie erythrocyten-

aanmaak. In een nog aanwezig uitstrijk van het botbiopt in 2000 wordt evenmin duidelijke dysplasie op cellulair niveau gezien. De erythropoëse is hier vrijwel afwezig. Dit beenmerg past goed bij een 'pure red cell aplasia'. I.v.m. slecht te reguleren bloedsuikers blijkt begin 2003 het oraal antidiabeticum (tolbutamide) te zijn vervangen door insuline.

Conclusie: Patiënte heeft in 2000 waarschijnlijk een beenmergaplasie als reactie op tolbutamide. Sulfonylureumderivaten kunnen beenmergremming geven. Na stoppen van het tolbutamide is de erythropoëse weer hersteld. De diagnose MDS is op onvoldoende kenmerken gesteld. Patiënte heeft onnodig veel erythrocytentransfusies gekregen en mogelijk daardoor secundaire hemochromatose. Zeker gezien de twijfels in het rapport van de pathologen, had beoordeling van een aspiraatsel niet mogen ontbreken. Dysplasie dient altijd op cellulair niveau en in meerdere lijnen te worden gezien.

Infectie, afweer, allergie

75. IL-6, IL-8 en LBP als aanvullende tests bij vroege neonatale sepsis?

C. COBBAERT, R. van BEEK, F. van den MUYSENBERG, A. RAEIJMAEKERS, H. JACOBS

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Amphia Ziekenhuis, Breda

Inleiding: Bacteriële sepsis bij neonaten < 72h (NBI) is een diagnose gebaseerd op klinische symptomen en maternale risicofactoren, ondersteund door bacteriële kweken van bloed of liquor, bloedbeeld en aanvullende biochemische testen. De sensitiviteit van bestaande laboratoriumtesten is teleurstellend. In deze studie wordt de bijdrage onderzocht van IL-6, IL-8 en LBP voor het vroegtijdig uitsluiten van de diagnose NBI.

Methode: 34 neonaten > 1000 g, verdacht van NBI, participeerden in het onderzoek. Bloed werd afgenomen op het moment dat er besloten werd over te gaan tot sepsis 'work-up' en antibiotische behandeling; daarnaast werd op 12, 36 en 60 uur na inclusie bloed afgenomen. IL-6, IL-8 en LBP werden bepaald op Immulite one, DPC. Bloedbeeld en CRP werden bepaald op routineanalyzers. % staven/neutrofielen werd bepaald aan de hand van microscopische WBC-differentiatie.

Resultaat: 13 neonaten kregen de diagnose NBI (bewezen dan wel klinisch); 21 neonaten bleken geen systemische infectie te hebben. De sensitiviteit bij inclusie voor herkennen van de diagnose NBI was 92; 75; 83 en 42% voor IL-6; IL-8, LBP resp. CRP met NVW van 91; 70; 80 en 71%. De specificiteit bij inclusie was 83; 50; 53 en 89% voor IL-6; IL-8, LBP resp. CRP, met PVW van 85; 56; 57 en 71%. In geval van NBI zijn de IL-6 en IL-8-spiegels het hoogst bij inclusie; CRP-spiegels zijn maximaal 12h na inclusie. LBP heeft een verloop analoog aan dat van CRP.

Conclusie: IL-8 heeft een teleurstellende sensitiviteit/specifiteit t.o.v. IL-6. LBP voegt weinig toe t.o.v. CRP. IL-6 heeft, t.o.v. CRP, duidelijk toegevoegde waarde voor het vroegtijdig uitsluiten van NBI.

76. Dissociatie tussen procalcitonine en C-reef proteïne in een patiënt met een pro-opiomelanocortine-deficiëntie en hoge doses corticosteroiden

B.E.P.B. BALLIEUX¹, A. HAK¹, R. BREDIUS², W. OOSTDIJK², J.M. BOSMAN-VERMEEREN³, N.A.M. van DAM³

CKCL1, Kinder en Jeugd Centrum², Intensive Care Centrum³, LUMC, Leiden

Inleiding: In augustus 2003 werd een 20 maanden oude jongen van consanguine Turkse ouders met een deficiëntie van het pro-opiomelanocortine (POMC) opgenomen op de kinder-IC wegens respiratoire insufficiëntie. Er bestond reeds een langdurige historie van astma. Een extreem overgewicht (30 kg bij 100 cm) met vervetting van de bronchiën lijkt hier mede een rol te spelen. Bij een sterke verdenking op septische shock (hoge koorts en instabiele bloeddruk, later positieve bloedkweek) werd bij herhaling geen verhoging van het CRP gevonden. Daarom is procalcitonine (PCT) gemeten.

Methode: Gedurende drie maanden is op basis van het klinische beloop regelmatig PCT (PCT-quick sneltest, BRAHMS diagnostica) en CRP (Hitachi 911) gemeten. In de eerste maand van opname werden hoge doses dexamethason (1 mg/kg) en prednison (1 mg/kg) gegeven. Deze werden vervolgens geleidelijk afgebouwd tot een onderhoudsdosis hydrocortison.

Resultaat: PCT bleek het klinische beloop goed te volgen en reageerde op wijzigingen in het antibioticabeleid. Diverse periodes met hoge koorts waarbij ondersteuning met inotropica nodig was gingen gepaard met PCT-waarden >>10 ng/ml terwijl CRP gedurende de gehele opname sterk was onderdrukt (<7 mg/l). Na ontslag is elders (eind nov.) een CRP van 60 mg/l gevonden bij een nieuwe koortperiode (zelfde methode).

Conclusie: In tegenstelling tot CRP lijkt de expressie van PCT niet beïnvloed te worden door hoge doses corticosteroiden. Een dergelijke mate van dissociatie is niet eerder gepubliceerd. Gezien de latere stijging van CRP na het afbouwen van dexamethason/prednison lijkt dit primair een effect van de corticosteroiden. Daarnaast speelt synergie met de POMC-deficiëntie mogelijk een rol. Deze bevinding geeft mogelijk nieuw inzicht in de regulatie van infectieparameters en de rol van corticosteroiden en POMC-afgeleide peptiden hierin.

77. Diagnose in beeld: een patiënt met trombopenie

L.J. van PELT¹, H.J. ADRIAANSEN², R.A. THIEME GROEN³, O. van HAAGEN⁴, P.H.P. GROENEVELD⁴, P.A. KUIPER-KRAMER¹

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Isala klinieken, Zwolle; Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium², Gelre Ziekenhuizen, Apeldoorn; Afdeling Anaesthesie³, Interne Geneeskunde⁴, Isala klinieken, Zwolle

Inleiding: Een Nederlandse zakenman die regelmatig naar Zuid-Afrika reist, bezocht de eerste hulp van de Gelre Ziekenhuizen in Apeldoorn met piekende koorts sinds enkele dagen en sinds enkele uren neurologische verschijnselen. Bij routine hemocytometrieonderzoek werd een trombopenie gevonden. Ter uitsluiting van microaggregatie werd een handmatige differentiatie verricht.

Methode: Hemocytometrie (Sysmex en CellDyn 4000), handmatige differentiatie en dikkedruppelpreparaat.

Resultaat: In de handdiff werden naast de reële trombopenie ook zeer veel malariatrofozoieten gezien. Op het moment dat de aanvraag voor een dikkedruppelonderzoek op het lab arriveerde kon reeds de uitslag worden gegeven: *Plasmodium falciparum* met een parasieten dichtheid van 55%. Onder de diagnose cerebrale malaria werd de patiënt overgeplaatst naar

de IC van de Isala klinieken in Zwolle voor het ondergaan van een wisseltransfusie. In het monster dat enkele uren later in Zwolle werd afgenomen voordat met de wisseltransfusie werd begonnen bedroeg de parasieten dichtheid 37%. In het preparaat waren erythrocyten te zien met 1 tot 6 parasieten per cel. Daarnaast bevatten enkele granulocyten malariapigment. Het gevonden percentage geïnfecteerde erythrocyten correleerde goed met de door de CellDyn 4000 gemeten parasieten-'load' (34%). Op de IC werd, in afwachting van erythroferese, begonnen met de wisseltransfusie. Om technische redenen bleek overplaatsing naar het Academisch Ziekenhuis Groningen noodzakelijk. De patiënt heeft deze acuut levensbedreigende aanval van malaria tropica overleefd.

Conclusie: Cerebrale malaria met een uitzonderlijk hoge parasitemie (55%).

Lever- en darmpathologie

78. Analytical and clinical performance of four anti-tissue transglutaminase assays

R. BAUMGARTEN, M.S.J. KOENDERS-DELNOY

Department of Clinical Chemistry & Hematology, Atrium Medical Center, Heerlen, The Netherlands

Introduction: Celiac disease is a life-long disease in which ingestion of gluten leads to chronic inflammation and damage of the small intestinal mucosa. Diagnosis is based on the clinical history, determination of anti-gliadine or anti-endomysium antibodies and biopsy-proven damage as the golden standard. Tissue transglutaminase (tTG) has been identified as the major auto-antigen in celiac disease and IgA antibodies are suspected to be highly specific serological markers.

Methods: In order to certify introduction of a tTG test for initial diagnosis of celiac disease, we tested the analytical (intra-assay cv) and clinical performance of four IgA anti-tTG kits: Celikey™ by PharmaciaDiagnostics, IgA anti-tTG by DPC, IgA anti-tTG by Orgentec (ITK Diagnostics) and Bindazyme™ by The Binding Site. The same 40 patient samples were analysed by each kit. Celiac disease was considered proven by positive testing for endomysium and gliadine antibodies for

cases where a biopsy was not performed. 13 samples were considered positive, 27 negative. IgA deficient patients were excluded from the study.

Results: The analytical performance of all four tests was satisfactory (< 10% intra-assay cv). In the test by Orgentec identification of one patient failed. All other immunoassays were able to identify the positive patients (sensitivity 100%). Specificity was 100% for all the kits.

Conclusion: Based on this pilot study it seems safe to introduce IgA anti-tTG based screening for celiac disease. The analytical performance of all kits was satisfactory. The clinical performance of the Orgentec test was inferior in comparison to the other assays. It remains to be established if testing for IgA anti-tTG is useful for the follow-up of patients with proven celiac disease.

Nierziekten

79. Glomerular haematuria detection by microscopy for general practitioners

M.P. SCHUIJT¹, J. HUUSSEN², L. van MANEN¹, C. de BAAY¹, M. de METZ¹

Laboratorium of Clinical Chemistry¹, Canisius-Wilhelmina Hospital; Department of Kidney Diseases², University Hospital, Nijmegen, The Netherlands

Introduction: Patients with glomerular haematuria are frequently erroneously referred to the urologist by the general practitioner (GP). We evaluated the use of microscopic urinalysis to assist the GP in the diagnostic process.

Methods: After diagnosis of haematuria by dip-stick at the GP's office, urine sediments (n=235, fixated with Cellfix) were microscopically investigated by two hospital laboratories. An urologic cause was indicated when dysmorphic erythrocytes were <40% and erythrocyte casts were absent; a glomerular cause was indicated when dysmorphic erythrocytes were >40% and erythrocyte casts were present. Less than 2 erythrocytes/HPF was defined as absence of microscopic haematuria. Based on the results, the GPs were advised to send their patients for urologic examination, to follow the progression of the glomerular haematuria, or to supply a new urine sample.

Results: Of the urine sediments, 25 were disqualified for investigation, while 97 samples contained too few erythrocytes. 63 urine sediments were suspected of a glomerular cause. Of these, 42% were defined as glomerular erythrocyturia. In 57% of these samples no erythrocyte casts or too few erythrocytes/HPF were observed. In 50 urine sediments a glomerular cause of the haematuria could be excluded. Of these, 34% were suspected of an infection of the urinary tract combined with leucocyturia. The recommendations given to the GPs by the two laboratories were similar in 92% of the cases.

Conclusion: Microscopic investigation of urine sediment for dysmorphic erythrocytes and presence of erythrocyte casts may be a good method to discriminate between nephrotic and urologic haematuria and may be a valuable support for the GPs' practice. Of the haematuria detected by a dip-stick by GPs, 41% could not be confirmed by microscopic urinalysis in the hospital laboratory.

Gynaecologie/obstetrie

80. Term AGA newborns have lower platelet serotonin than their mothers at birth

R.F.J. KEMPERMAN^{1,2}, S. BRUINS¹, H. LANDMAN³, F.P.L. van der DIJS⁴, I.P. KEMA¹, J.J.H.M. ERWICH⁵, R. BISCHOFF², F.A.J. MUSKIET¹

Department of Pathology and Laboratory Medicine¹, University Hospital Groningen; University Centre for Pharmacy², Bioanalysis and Toxicology, University of Groningen, The Netherlands; Gynecologist³, Curaçao; Analytic Diagnostic Center⁴, Curaçao, The Netherlands Antilles; Obstetrics and Gynecology⁵, University Hospital Groningen, Groningen, The Netherlands

Introduction: Serotonin (5HT) in platelets (PLT) originates from its uptake from plasma. Enterochromaffin cells and neurones in the gut are the principal sources of plasma 5HT. These tissues harbor over 95% of body 5HT. Gut 5HT is notably released after meals in its capacity to act as a neurotransmitter for gut motility. Gut motility might therefore be the principle determinant of PLT 5HT. Comparing PLT 5HT at a condition of low gut motility (i.e. newborns) with a condition of normal motility (their mothers at birth) tested this hypothesis.

Methods: PLT 5HT was measured in cord blood and maternal blood from 23 consecutive uncomplicated pregnancies resulting in healthy term, appropriate for gestational age, singleton babies.

Results: Mean (range) maternal age was 28.9 (18.3-39.0) years, gestational age at birth was 39.0 (36.6-41.9) weeks

and birth weight was 3,450 (2,680-4,410) g. Compared with their mothers, newborns had similar PLT counts [newborns 274.9*10E9/L (168-419); mothers 244*10E9/L (117-347); p=0.222] and lower PLT 5HT [1.6 nmol/10E9 PLT (0.8-3.2) vs 3.2 nmol/10E9 PLT (1.9-6.4); p<0.001]. There was an inverse relationship between PLT count and PLT 5HT in the newborns (r²=0.266; p=0.014; Pearson= -0.516), but not in the mothers (r²=0.002; p=0.835; Pearson=0.047).

Conclusion: Consistent with low intrauterine gut motility, newborns have lower PLT 5HT than their mothers. The inverse relation between newborn PLT 5HT and PLT suggests that the increasing PLT count with advancing gestation reduces PLT 5HT through the distribution of plasma 5HT among a growing PLT compartment.

81. Lipoprotein (a) and other risk factors for cardiovascular disease in women with a history of pre-eclampsia or intrauterine growth restriction

G.T.R. MANTEN¹, J.M. SIKKEMA¹, G.H.A. VISSER¹, H.W. BRUINSE¹, A. FRANX¹, H.A.M. VOORBIJ²

Department of Perinatology and Gynaecology¹, Department of Advanced Clinical Chemistry², University Medical Centre, Utrecht, The Netherlands

Introduction: Lipoprotein(a) is a low-density lipoprotein (LDL)-like particle, that contains the apolipoprotein(a) glycoprotein. The variation in size of apo(a) is genetically determined resulting in several Lp(a) phenotypic isoforms and considerable variations in plasma concentrations. Individual concentrations are remarkably constant. Levels above 300 mg/L indicate an elevated risk for cardiovascular disease. Elevated Lp(a) concentrations are also associated with manifest pre-eclampsia. The pathogenesis of this pregnancy induced disease is still not fully elucidated. Recent studies showed that women with a history of pre-eclampsia, but also with a history of IUGR have an increased risk of future cardiovascular disease. We investigated the Lp(a) concentration in women with a history of pre-eclampsia or intrauterine growth restriction together with other risk factors for cardiovascular disease.

Methods: Twohundred-fifty six women with a history of pre-eclampsia and 59 women with a history of intrauterine growth restriction were studied. Fifty-three women with a history of uncomplicated pregnancy served as controls. Lipoprotein (a) concentrations, blood pressure, body mass index, concentrations of cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides and insulin resistance, were determined.

Results: Women with a history of intrauterine growth restriction or pre-eclampsia exhibited more risk factors for future cardiovascular disease such as dyslipidemia, hypertension, obesity and increased insulin resistance compared to women with a history of uncomplicated pregnancy, but no elevated lipoprotein (a) concentrations.

Conclusion: Various risk factors for cardiovascular disease seem to be involved in the pathogenesis of pre-eclampsia and intrauterine growth restriction.

Neurologie, psychiatrie, KNO en oogheelkunde

82. Exclusive breastfeeding of healthy term infants for at least 6 weeks improves neurological condition

D.A.J. DIJCK-BROUWER¹, H. BOUWSTRA², E.R. BOERSMA³, G. BOEHM⁴, F.A.J. MUSKIET¹, M. HADDERS-ALGRA²
Department of Pathology and Laboratory Medicine¹, Department of Neurology², Perinatal Nutrition and Development Unit, Department of Obstetrics and Gynecology³, Groningen University Hospital, The Netherlands; Numico Research Germany⁴, Friedrichsdorf, Germany

Introduction: It is generally acknowledged that breastfed infants show a better cognitive development than formula-fed infants. Also, cognitive developmental benefits are likely to increase with duration of breast-feeding. Whether the same holds true for neurological condition is less well known. Breast-feeding for at least three weeks as opposed to formula feeding was associated with a better neurological condition at 9 years in a population of at risk infants. However, in that study data on breastfeeding duration were collected retrospectively. The quality of general movements (GM) can be used as a sensitive marker of neurological condition. To investigate the minimal duration of exclusive breastfeeding for optimal neurological outcome, we assessed the quality of GM at the age of 3 months.

Methods: Breastfed healthy term infants (n=147) were enrolled at birth. Information on exclusive breast-feeding duration was collected prospectively. GM quality was assessed after 15 minutes video-recording of spontaneous motility in supine position. The quality of GM was classified as normal-optimal, normal-suboptimal, mildly abnormal or definitely abnormal. Logistical regression analyses were used to adjust for confounders.

Results: There was a positive association between breast-feeding duration and movement quality, with a saturation effect at the age of approximately 6 wk. In the group of infants breastfed for at most 6 weeks (n=55), 18% exhibited normal-optimal GM, 47% normal-suboptimal GM, and 47% mildly abnormal GM. In contrast, in the group of infants breastfed for

>6 weeks (n=92), 43% exhibited normal-optimal GM, 45% normal-suboptimal GM, and 12% mildly abnormal GM. Exclusive breastfeeding for >6 weeks was therefore associated

with markedly less abnormal and more normal-optimal GM. *Conclusion:* We conclude that breastfeeding for >6 weeks might improve the neurological condition in infants.

83. Predictive and diagnostic value of biochemical markers and motor evoked potentials for adverse neurological outcome after thoraco(abdominal) aortic aneurysm surgery

E.C. LASES^{1,2}, F.J.L.M. HAAS¹, H.T.M. ter BEEK³, L.P.H.J. AARTS³, H.P.A. van DONGEN³, M.A.A.M. SCHEPENS⁴, H.P. SIEGERS⁵, I. van der TWEEL⁶, E.H.J.F. BOEZEMAN⁷

Departments of Clinical Chemistry¹, Anaesthesiology and Intensive care³, Cardiopulmonary Surgery⁴, Neurology⁵ and Clinical Neurophysiology⁷, St Antonius Hospital, Nieuwegein; Department of Biomedical Analysis², Centre for Biostatistics⁶, Utrecht University, The Netherlands

Introduction: Paraplegia is still a devastating neurological complication following thoraco(abdominal) aortic aneurysm (TAA(A)) surgery. The aim of this study was to assess the predictive and diagnostic value of the biochemical markers S-100 and neuron-specific enolase (NSE) and motor evoked potentials for adverse neurological outcome after TAA(A) repair.

Methods: Sixty-nine patients undergoing TAA(A) surgery were included in this prospective study. Serum samples were drawn after the induction of anaesthesia and haemodynamic stabilisation, during the cross-clamp period of the critical aortic segment, 5 minutes, 2, 4, 6, 8 and 19 hours respectively after reperfusion. Determinations of the serum concentrations of S-100 and NSE were performed using chemiluminescence immunoassays. In all patients recording of myogenic motor evoked potentials (MEPs) following transcranial electric stimulation was carried out. Spinal cord function was expressed as the ratios area under

the curve (AUC) leg / AUC arm of the MEPs (MEP ratios).

Results: The combination of serum NSE concentrations and MEP ratios at 5 minutes after reperfusion and the combinations of serum S-100 concentrations and MEP ratios at 4, 6, and 8 hours after reperfusion have predictive value for adverse neurological outcome after TAA(A) surgery (PPV (95% CI) = 100% (37-100%)). Furthermore, both the combination of the serum concentrations of S-100 and NSE (PPV (95% CI) = 100% (47-100%)) and MEP ratios < 50% (PPV (95% CI) = 100% (37-100%)) at 19 hours after reperfusion have diagnostic value for identifying patients with adverse neurological complications after TAA(A) repair.

Conclusion: Our results show that the combinations of serum S-100 and/or NSE concentrations and MEP ratios at defined time points have predictive and diagnostic value for adverse neurological outcome after TAA(A) surgery.

Oncologie

84. Verandering in de vrije PSA-ratio in serum tijdens prostatitis

K.P.J. DELAERE¹, R. BAUMGARTEN²

Afdeling Urologie¹, Afdeling Klinische Chemie², Atrium Medisch Centrum, Heerlen

Inleiding: In de klinische praktijk kan het soms lastig zijn te differentiëren tussen een prostatitis en een prostaatacarcinoom. In de literatuur bestaan aanwijzingen dat bepaling van totaal en vrij PSA niet bijdraagt aan verbetering van de diagnostiek. Ter bevestiging hebben we daarom retrospectief bestudeerd hoe het vrij tot totaal ratio van PSA (F/T-ratio) zich gedraagt tijdens en na een klinisch bewezen prostatitis

Methode: Gedurende 4 jaar werden patiënten vastgelegd en vervolgd met een klinisch bewezen prostatitis (n=91; 32-79 jaar: gemiddelde leeftijd 62 jaar). Een prostatitis werd bewezen geacht bij een goede klinische respons op antibiotische therapie, eventueel voorafgegaan door een positieve kweek, gepaard gaand met een daling van totaal PSA (tPSA) tijdens therapie. Co-morbiditeit van een carcinoom werd bij suspecte

patiënten uitgesloten middels een biopsie. Voor statistische analyse werd gebruik gemaakt van een gepaarde Student t-test. *Resultaat:* Bij presentatie van de patiënten met een prostatitis bedroeg het gemiddeld (\pm SEM) totaal PSA $20,3 \pm 9,5$ μ g/l en de F/T-ratio $15,5 \pm 0,8\%$. Na therapie bedroegen deze waarden $4,3 \pm 0,4$ μ g/l resp. $22,1 \pm 0,9\%$. Het statistisch verschil tussen de F/T-ratio's bij presentatie en na behandeling was significant ($p < 0,001$).

Conclusie: Middels deze retrospectieve analyse is bevestigd dat de F/T-ratio bij presentatie van een acute prostatitis <18% bedraagt, hetgeen overlapt met de F/T-ratio's gevonden bij prostaatacarcinoom. Na behandeling van de prostatitis bevond de F/T-ratio zich in het klinisch niet-suspecte gebied. De bepaling van de F/T-ratio's draagt derhalve niet bij om een acute prostatitis van een carcinoom te onderscheiden.

85. Cyclopentenyl cytosine sensitises SK-N-BE(2)c neuroblastoma cells to cladribine

J. BIERAU^{1,2}, A. H. van GENNIP^{1,2}, R. LEEN¹, L. ZOETEKOUW¹, H. N. CARON³, A. B. P. van KUILENBURG¹

Department of Clinical Chemistry and Emma Children's Hospital¹, Academic Medical Centre, University of Amsterdam; Department of Biochemical Genetics², Academic Hospital Maastricht; Department of Paediatric Oncology and Haematology³, Emma Children's Hospital, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Cyclopentenyl cytosine (CPEC) is an inhibitor of CTP synthetase and possesses anti-tumour activity against neuroblastoma in vitro. Incubation with CPEC depletes the (deoxy)cytidine nucleotide pools, and causes S-phase accumulation. This makes the combination of CPEC with deoxy-nucleoside analogues attractive for chemotherapy. Cladribine (CdA) is an analogue of deoxyadenosine used in the treatment of haematological malignancies. However, no anti-tumour activity of CdA against solid tumours has been observed in clinical trials. CdA is an inhibitor of DNA synthesis as well as DNA repair. Although CdA is a purine analogue, the first and rate-limiting step in its activation is catalysed by deoxycyti-

dine kinase (dCK). Depletion of dCTP achieved via inhibition of CTP synthetase by CPEC may thus lead to an enhanced uptake and anabolism of CdA.

Methods: ED50 values were determined using modified MTT assays. CdA metabolism was studied using radiolabelled dFdC and HPLC equipped with online radiochemical detection.

Results: We demonstrated that CPEC sensitised the CdA-resistant human neuroblastoma cell line SK-N-BE(2)c (ED50 \gg 1.5 μ M) towards CdA. Pre-treatment with 100 or 250 nM CPEC for 24 hr sensitised SK-N-BE(2)c cells to cladribine, the 96-hr ED50 values being 419 ± 125 nM and 70 ± 30 nM, respectively. Preincubation with 100 nM CPEC increased the amount of

intracellular CdA-nucleotides 1.2 to 4.7-fold, CdAMP being the major metabolite to accumulate. DNA synthesis was inhibited by 45 % by 100 nM CPEC and > 95 % by the combination of

CPEC and CdA. CdA itself did not inhibit DNA synthesis.

Conclusion: The cytotoxic effects of CdA can be enhanced by inhibition of CTP synthetase.

86. Gemcitabine and cyclopentenyl cytosine: a promising combination for the treatment of neuroblastoma

J. BIERAU^{1,2}, A. H. van GENNIP^{1,2}, R. LEEN¹, J. R. MEINSMA¹, H. N. CARON³, A. B. P. van KUILENBURG¹
Department of Clinical Chemistry and Emma Children's Hospital¹, Academic Medical Centre, University of Amsterdam; Department of Biochemical Genetics², Academic Hospital Maastricht; Department of Paediatric Oncology and Haematology³, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Neuroblastoma is the most common solid malignancy of childhood. Despite intensive chemotherapeutic regimens, the prognosis for children suffering from metastasized neuroblastoma remains poor. Poor prognosis is often associated with amplification of the MYCN-oncogene. We have observed that 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine, dFdC) has potent anti-tumor activity against neuroblastoma in vitro. dFdC is a pro-drug that is activated by phosphorylation to its nucleotides, of which deoxycytidine kinase (dCK) catalyzes the first and rate-limiting step.

Methods: ED50 values were determined using modified MTT assays in a panel of human neuroblastoma cell lines consisting of MYCN-amplified and MYCN-single copy cell lines. dFdC metabolism was studied using radio-labelled dFdC and HPLC equipped with online radiochemical detection. dCK activity was determined using a non-radiochemical assay with HPLC analysis. dCK expression was measured using standard molecular biological techniques.

Results: In both types of cell lines, low ED50 values (nM range) were observed. dFdC induced cell death in MYCN-amplified cell lines, while MYCN-single copy cell lines underwent neuronal differentiation. The specific dCK activity was 60% higher in MYCN-amplified cell lines than in MYCN-single copy cell lines. Although dCK did not correlate with the ED50 values, the higher dCK activity in MYCN-amplified cell lines may, in part, explain the differences in cytotoxicity. Pre-incubation with the CTP synthetase inhibitor cyclopentenyl cytosine (CPEC) significantly lowered the ED50 values of 13 out of 15 cell lines. Pre-incubation of SK-N-BE(2)c cells with 100 nM CPEC for 1-4 days, increased dFdC-anabolism 6-44 times and was paralleled by a significant increase in the expression of dCK-mRNA, dCK proteins and increase of dCK activity.

Conclusion: The combination of dFdC and CPEC may hold promise for the treatment of high-risk neuroblastoma.

87. Quantification of survivin mRNA expression in bladder washings predicts time to tumor recurrence in patients with superficial urothelial cell carcinomas

I.J. SCHULTZ, L.A. KIEMENEY, J.A. WITJES, J.L. WILLEMS, D.W. SWINKELS, J.T.M. KLEIN GUNNEWIEK, J.B. de KOK
Department of Clinical Chemistry, University Medical Centre St. Radboud, Nijmegen, The Netherlands

Introduction: Patients with urothelial cell carcinoma (UCC) frequently experience recurrences after transurethral resection of the tumor (TUR). The gold standard for the detection of recurrences is cystoscopy, but this endoscopic procedure is invasive, labor-intensive and costly. Predicting the time to first recurrence could significantly reduce the number of cystoscopies during a patient's follow-up period. We investigated the recurrence-predicting potential of survivin mRNA expression in bladder washings obtained from patients with UCC.

Methods: Thirty-seven 50-mL bladder washings were obtained prior to TUR. Cells of urothelial origin were isolated using an epithelium-specific antibody. Survivin mRNA expression was quantified with real-time quantitative PCR and normalized using cyclophilin A.

Results: A trend was observed between survivin mRNA expression in the bladder washings and increasing tumor grade

(Kruskal Wallis test: $p=0.004$). Kaplan-Meier curves were constructed for patients with superficial tumors ($n=27$) and a normalized survivin expression above or below the median (0.23). Patients with an expression above 0.23 ($n=11$) had significantly shorter recurrence-free survival periods than patients with an expression below 0.23 (log-rank test: $p<0.0002$).

Conclusion: These preliminary results indicate that 1) bladder washings generally reflect the molecular processes occurring in the bladder during tumorigenesis and 2) quantification of survivin mRNA expression in bladder washings can identify patients with superficial UCC who are at high risk for early tumor recurrence.

Literature: 1. Schultz IJ, et al. Survivin mRNA expression is elevated in malignant urothelial cell carcinomas and predicts time to recurrence. *Anticancer Res* 2003; 23: 3327-3331.

Acute zorg, IC, toxicologie

88. Meting van citraat, totaal en geïoniseerd calcium in kader van citraat-CVVH op IC

A.J. BAKKER¹, C. BOERMA², H. KEIDEL¹, P. KINGMA², P.H.J. van der VOORT²
St. Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Medisch Centrum Leeuwarden², Leeuwarden

Inleiding: Heparine-geïnduceerde trombocytopenie bij IC-patiënten, alsmede actieve of dreigende bloeding, zijn indicaties om citraat als anticoagulans te gebruiken als alternatief voor heparine bij continue veno-veneuze hemofiltratie (CVVH). In het kader van de mogelijkheid om citraatintoxicatie (verhoogd bloedingsrisico) op te sporen, zijn citraat, totaal en geïoniseerd Ca gemeten.

Methode: Analyses van totaal Ca (CPC-methode; Roche prod.no.: 1730240) en citraat (citraatlyasemethode; Instruchemie prod.no.: 2881) zijn uitgevoerd op een Modular Analytics

(Roche). Analyse van geïoniseerd-Ca vond plaats met een AVL OMNI bloedgasanalyser (Roche). Tijdens CVVH werden serum en Li-heparineplasmamonsters genomen uit het pre-filter- en postfilter-compartment van de CVVH-machine en uit een artelielijn van de patiënt.

Resultaat: Na aanpassing van het monstervolume was de citraatmethode lineair tot 15 mmol/l. De reproduceerbaarheid was goed (bij 1,07 mmol/l: VC = 1,6%; $n = 14$). Ter validatie van de standaardisatie werd de citraatoplossing die voor de CVVH wordt gebruikt, gemeten (opgave 500 mmol/l; terug-

gevonden range: 465-500 mmol/l). De resultaten van de citraatmeting in serum en Li-heparineplasma verschillen niet significant. De gemiddelde citraatconcentratie voor het filter ($6,9 \pm 2,4$ mmol/l) is zoals verwacht groter dan na het filter ($2,2 \pm 2,1$ mmol/l) en ook groter dan in de circulatie bij de patiënt ($0,5 \pm 0,25$ mmol/l); de intra-individuele spreiding is aanzienlijk. Een citraatconcentratie $>1,0$ mmol/l kon worden voorspeld op ba-

sis van een ratio totaal/geïoniseerd Ca $>2,5$ met een sensitiviteit van 73% en een specificiteit van 100% en op basis van een geïoniseerd Ca $<0,75$ mmol/l met een sensitiviteit en specificiteit van 84% en 100% respectievelijk.

Conclusie: Voor het aantonen van te hoge citraatconcentraties volstaat het meten van geïoniseerd Ca.

89. Ethylglucuronide as a post mortem marker of alcohol consumption

E.J.M. PENNING¹, K. STEUTEL¹, K.J. LUSTHOF², F.A. de WOLFF¹

Clinical Pharmacy and Toxicology¹, Leiden University Medical Center, Leiden, Department of Toxicology², Netherlands' Forensic Institute, Department of Toxicology, Rijswijk, The Netherlands

Introduction: In post-mortem toxicology, blood alcohol measurements have limited value because of post mortem alcohol formation by microorganisms. Therefore, additional biological markers of alcohol consumption are needed to assess alcohol consumption. Ethylglucuronide has been suggested as a suitable biomarker because it is formed from alcohol in man and is not formed by microbial activity (1). The aim of the present study was to measure ethylglucuronide levels in post mortem heart and femoral blood samples from different individuals, and to compare the results with alcohol measurements in these samples.

Methods: Gas chromatography with mass spectrometric detection.

Results: In 5 out of 8 forensic blood samples ethylglucuronide was found in concentrations ranging from 1.3 to 3.4 mg/L. In

the remaining 3 samples the ethylglucuronide concentration was below the lower limit of quantitation (0.5 mg/L). Ethylglucuronide concentrations did not correlate with femoral or heart blood alcohol concentrations, i.e. ethylglucuronide was found in blood samples both with and without alcohol. In one case with negative femoral and heart blood alcohol but positive vitreous fluid alcohol, ethylglucuronide was found in heart blood at a concentration of 2,7 mg/L.

Conclusion: The results suggest that ethylglucuronide is a useful detector of alcohol consumption if blood alcohol measurements are negative or not possible.

Literature: 1. Schmitt G, et al. Ethyl glucuronide concentration in serum of human volunteers, teetotalers, and suspected drinking drivers. *J Forensic Sci* 1997; 42: 1099-1102.

Erfelijke stofwisselingsziekten

90. New multiple glycosylation disorder with fatal outcome

J.A. BAKKER¹, S.B. van der MEER², J. SYSTERMANS², R.A. WEVER³, J.C. JAEKEN⁴, L.J.M. SPAAPEN¹

Dept. Biochemical Genetics¹, University Hospital Maastricht, Maastricht; Dept. Pediatrics², Atrium Medical Centre, Heerlen; Laboratory of Pediatrics and Neurology³, University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands; Dept. Pediatrics⁴, UH Gasthuisberg, Leuven, Belgium

Introduction: We present two siblings from healthy consanguineous parents, presenting with multiple congenital defects. Both patients were born with perinatal asphyxia and showed several dysmorphic features. There was generalized hypotonia, progressive jaundice and hepatosplenomegaly. Radiologic examination of the skeleton and CT of the brain showed apparent abnormalities. Both children died after recurrent infections and cardiac insufficiency after 5 and 10 weeks respectively.

Methods: Extensive metabolic workup of the first patient showed increased lysosomal enzyme activities in plasma; mucopolidiosis II was ruled out. In the second patient coagulation factors were clearly decreased, no other abnormalities were found in the metabolic workup.

Results: Serum transferrin IEF to detect N-glycosylation defects showed a highly abnormal pattern of sialotransferrines, not resembling a pattern similar to one of the known CDG types. We detected a decreased tetrasialotransferrine and increased tri-, di- mono- and asialotransferrine bands. In liver a similar pattern was found. Searching for O-glycosylation defects an aberrant pattern of ApoCIII was seen after IEF and Western blotting. CDG type I (a-e) and type IIa were excluded enzymatically and in part also by mutation analysis of the subsequent genes.

Conclusion: At the moment work on the elucidation of the defect is in full progress and will be presented in due time. We conclude that these sibs present the clinical presentation of a new type or class of CDG involving structural Golgi defects.

91. The impact of the introduction of a clinical guideline for specific case detection of primary hemochromatosis: compliance, diagnostic accuracy and costs

E.M.G. JACOBS^{1,2}, G.J. van der WILT³, L. ELVING², K. MEULENDIJKS³, D.W. SWINKELS¹

Department of Clinical Chemistry¹, Department of Internal Medicine², Department of Medical Technology Assessment³, University Medical Centre Nijmegen, The Netherlands

Introduction: Primary hemochromatosis (PH) generally presents with aspecific features and therefore remains too often undetected until severe complications develop. Objective: Evaluation of the introduction of a multidisciplinary clinical practical guideline on i) compliance with recommended (new) diagnostic procedures, ii) diagnostic accuracy and iii) costs of diagnosis per case PH detected.

Methods: Retrospective analysis of the medical records of the patients with discharge diagnosis codes suggestive for PH, obtained in a period of 24 months before (1995-1996) and a

similar period after (2001-2002) guideline introduction.

Results: In total 1357 diagnosis codes were selected, of which 434 codes from the period before and 469 codes from the period after guideline implementation were included. Upon introduction of the guideline, the recommended use of the combination of serum iron saturation and serum ferritin measurements rose from 12.2% (n=53) to 29.6% (n=139, p<0.001). The HFE-gene mutation detection test was correctly used in 11 (40.7%) of 27 tested patients and was incorrectly interpreted in 6 (22.2%) of these 27 patients. Five new PH

patients were diagnosed before and 14 after implementation of the guideline. According to the guideline 7 of these 14 patients were correctly diagnosed, 4 were falsely diagnosed and 3 patients were genetically at risk for PH, but had not yet developed iron overload. The diagnostic costs per correctly diagnosed PH patient did not change by guideline introduction.

Conclusion: Introduction of the guideline resulted in an increased use of appropriate diagnostic test procedures. This resulted in a higher detection rate with similar costs per case detected. Drawback of the novel approach was the increased false-positive rate mostly due to misinterpretation of the results of the newly introduced HFE-gene test.

92. Creatine transporter deficiency: development of a functional test for creatine uptake in fibroblasts

S.J.M. van DOOREN¹, P.S. DARMIN¹, N.M. VERHOEVEN¹, T.J. DEGRAUW², C. JAKOBS¹, G.S. SALOMONS¹
Dept of Clinical Chemistry¹, Metabolic Unit, VU Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; Div. of Neurology², Children's Hospital Medical Centre Cincinnati, Ohio, USA

Introduction: The biosynthesis of creatine involves two enzymes: arginine:glycine amidinotransferase (AGAT) and guanidinoacetate methyltransferase (GAMT). Uptake of creatine is mediated via a creatine transporter. Patients with a defect in creatine biosynthesis or creatine uptake present with mental retardation and severe speech and language delay. To unravel which defect is the cause of the creatine deficiency we did set-up a functional test for creatine uptake in cultured fibroblasts. Assays to test AGAT and GAMT activity has been published previously by us (ref 1,2).

Methods: The fibroblasts of patients and controls are cultured for 24 hours in HAM/F10 supplemented with 10% foetal bovine serum. Creatine is added to obtain final creatine concentrations of 25, 125 and 500 mM. Creatine uptake is quantified in total cell lysates by stable isotope dilution gas chromatography mass spectroscopy as described, using D3-creatine as internal standard.

Results: The creatine uptake in fibroblasts of eight unrelated index patients was negligible, when cultured at physiological (25-125 µM) creatine levels. Only incubations with supra-physiological (500 µM) creatine levels resulted in low uptake (approximately a third of the values found in control cells). In contrast to the controls, this uptake could not be significantly inhibited by 500 mM guanidinopropionate, an inhibitor of the creatine transporter. This indicates that this uptake represents either passive diffusion or uptake via other transporters.

Conclusion: We here report a non-radioactive creatine-uptake method that allows identifications of a creatine uptake defect in cultured fibroblasts.

Literature: 1. Verhoeven, et al. Clin Chem 2003; 49: 803-805.
2. Verhoeven, et al. Clin Chem 2004; in press.

Overigen

93. The relationship between fatigue and clinical parameters in pulmonary sarcoidosis

S. ROTHKRANTZ-KOS^{1,4,5}, J. de VRIES^{2,4}, M. P. van DIEIJEN-VISSER^{1,4,5}, M. DRENT^{3,4,5}
Department of Clinical Chemistry¹, Department of Psychology and Health², Tilburg University; Research Institute Psychology and Health Department of Respiratory Medicine³, Sarcoidosis Management Centre⁴, University Hospital Maastricht; Nutrition and Toxicology Research Institute Maastricht (NUTRIM)⁵, The Netherlands

Introduction: Studies on the relationship between fatigue and clinical parameters are sparse. In the present study this relationship was examined in a systematic way.

Methods: Patients with time since diagnosis ≤2 years, visiting the outpatient clinic of the University Hospital Maastricht (n=60; 34 untreated, 26 treated) were clinically evaluated and completed the Fatigue Assessment Scale (FAS). A representative sample of the Dutch population (n=1893) also completed the FAS. Pulmonary disease severity was estimated from lung function test results and measures of metabolic derangement. Acute phase response markers high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), serum amyloid A (SAA) and sarcoidosis activity parameters, soluble interleukin-2-receptor (sIL2R), and angiotensin-converting enzyme (ACE) were also measured.

Results: Only 27% of the sarcoidosis patients were diagnosed as non-fatigued (FAS score < 22), compared to 80% in the control population (n = 1893). In the sarcoidosis patients no sex differences and no differences in fatigue scores between the treated and the untreated groups were found. Patients with fatigue (FAS-score ≥22) had lower DLCO values (p < 0.05). However, none of the tested clinical or serological parameters appeared to be a significant predictor of fatigue.

Conclusion: In the present study, it was confirmed that fatigue is a major problem in sarcoidosis. The extent of fatigue could not be explained by clinical parameters. Thus, up to now, no clinical or physiological variable seems useful in predicting which patients are fatigued. In this light, the Fatigue Assessment Scale might be considered as a supplementary tool in sarcoidosis.

94. Chymase polymorphisms in Dutch sarcoidosis patients

A. KRUIT¹, J.C. GRUTTERS¹, H.J.T. RUVEN³, H. SATO², J.M.M. van den BOSCH¹
Heart Lung Centre Utrecht¹, St. Antonius Hospital, Department of Pulmonology, Nieuwegein, The Netherlands; Royal Brompton Hospital, Clinical Genomics Group, Imperial College, London, UK; Department of Clinical Chemistry³, St. Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands

Introduction: Sarcoidosis is a granulomatous disorder with unknown etiology that involves multiple organs. Activity of the disease is monitored by serum angiotensin-converting enzyme (ACE) levels. The formation of angiotensin II, which is a potent vasoconstrictor as well as a growth factor for fibroblasts, can also be attributed to chymase. Chymase is stored predominantly in mast cells, which are present in a number of organs,

including the lung. In addition to local angiotensin II formation, chymase converts latent TGF-β1 into active TGF-β1, which plays a pivotal role in fibrosis through the activation of fibroblasts. Although chymase has been implicated in cardiac fibrotic events, to date, no studies have described a role for chymase in sarcoidosis. We postulated that chymase might be involved in sarcoidosis and that differential chymase genotypes

could reveal a correlation with the development of fibrosis within a group of Dutch Caucasian sarcoidosis patients.

Methods: We evaluated four single nucleotide polymorphisms in the coding and non-coding regions [-526 (C/T); -153 (C/T); 2821 (C/T); 1628 (A/G)] of the chymase gene, using SSP-PCR and determined four chymase haplotypes in Dutch sarcoidosis patients (n = 145) and healthy subjects (n = 113). Carrier-, allele- and haplotype frequencies were calculated and compared between healthy individuals and sarcoidosis patients.

Results: Thus far, we report four haplotypes of the chymase gene in Dutch Caucasian sarcoidosis patients and healthy controls. No differential carrier-, allele- or haplotype frequencies were found between healthy individuals and sarcoidosis patients.

Conclusion: We will continue this study by carefully assessing the radiological stages of sarcoidosis in order to correlate chymase genotypes with fibrotic development.

95. Short-term carnitine supplementation does not augment LCP ω 3 status of vegans and lacto-ovo-vegetarians

M.R. FOKKEMA¹, H.M van RIEKE¹, O.J. BAUERMANN², E.N. SMIT¹, F.A.J. MUSKIET¹

Department of Pathology and Laboratory Medicine¹, Groningen University Hospital; Sigma-Tau Ethifarma BV, Assen, The Netherlands

Introduction: Consumption of long-chain polyunsaturated fatty acids of the ω -3 series (LCP ω 3), i.e. eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids, is associated with lower risk of cardiovascular disease and possibly of cancer, and of inflammatory and autoimmune disorders. LCP ω 3 synthesis, notably that of DHA, from the precursor alpha-linolenic acid (ALA) proceeds with difficulty. It was recently suggested that LCP ω 3 synthesis is dependent on adequate carnitine status. Vegans and lacto-ovo-vegetarians have low LCP ω 3 status and usually low carnitine status. We investigated in an open study design whether carnitine supplementation of apparently healthy vegans and lacto-ovo-vegetarians augments their LCP ω 3 status.

Methods: Group A (n=11) took 990 mg/day l-carnitine from weeks 1-4, and 990 mg/day l-carnitine + 4 ml/day linseed oil from weeks 5-8. Group B (n=9) took 4 ml/day linseed oil from weeks 1-4, and 4 ml/day linseed oil + 990 mg/day l-carnitine

from weeks 5-8. Fatty acid compositions of erythrocytes, platelets, plasma cholesterol esters and plasma triglycerides were measured in the fasting state at baseline, and after 4 and 8 weeks.

Results: Carnitine supplementation increased plasma free and total carnitine concentrations with 30 and 25%, respectively, but did not affect EPA and DHA contents of any of the investigated compartments. On the other hand, EPA and DHA changes were negatively related to initial carnitine status and EPA changes were positively related to carnitine changes.

Conclusion: Our results suggest that carnitine is not an important limiting factor, if any, for LCP ω 3 synthesis in vegans and lacto-ovo-vegetarians. This conclusion is also likely to apply to omnivores. The most efficient means to augment EPA and particularly DHA status remains consumption of LCP ω 3 from e.g. fish or supplements.

96. De biochemische status op lange termijn van patienten met morbide obesitas na een maagoperatie

J.W. JANSSEN¹, D. NEUMANN-DEZAIRE², A. van der WILD-DE RUIGH², C.H. RUSELER³, J.W.F. ELTE²
Afdeling Klinische Chemie¹, Interne Geneeskunde², Chirurgie³, St. Franciscus Gasthuis, Rotterdam

Inleiding: 234 patiënten met morbide obesitas ondergingen (1978-1989) een maag-reducerende operatie, na 50 % van het overgewicht door dieet verloren te zijn. Er werden twee verschillende operaties toegepast: tot 1983 RYGB en na 1983 VBG. Patiënten uit onderzoeksgroep: 95 met RYGB-operatie en 139 met VBG. Van de 234 patiënten waren er bij de start van het follow-up-onderzoek 26 overleden. 205 patiënten kregen een vragenlijst toegestuurd waarop 53 (25%) patiënten niet reageerden en 155 (75%) patiënten de vragenlijst ingevuld terugzonden. Van deze laatste groep werd bij 131 patiënten follow-up-onderzoek verricht.

Methode: Bloedafname, waarna een breed spectrum van bepalingen uitgevoerd werd om de biochemische status na een maag-reducerende operatie vast te leggen.

Resultaat: Elektrolyten (Na,K,Cl): chloride verhoogd bij 15%. Nierfunctie (creatinine, ureum): creatinine verlaagd bij 40%, ureum verhoogd bij 17%. Leverfuncties (ALAT, ASAT, GGT): leverenzymen verhoogd bij 20% en (albumine, PT): PT ver-

laagd bij 30%. Bloedvorming (Hb, Ht, Ery, MCV): Hb verlaagd bij 10% en ery's verlaagd bij 20%. Ontsteking (leuko, BSE, CRP): BSE en CRP verhoogd bij 20%, leuko's verhoogd bij 10%. Nutriënten (Ca, fosfaat, Mg): fosfaat verlaagd bij 16% en (Fe, transferrine): Fe verlaagd bij 17% en (Fe-verzadiging, ferritine): Fe-verzadiging verlaagd bij 30% en ferritine verlaagd bij 22%. Vetmetabolisme (cholesterol, HDLchol, LDLchol en triglyceriden): verhoogd-risico-cholesterol bij 20% en HDLchol bij 8%, verhoogd-risico-LDLchol bij 15%. Koolhydraatmetabolisme (glucose, HbA1c): glucose verhoogd bij 10%, HbA1c verhoogd bij 43%. Vitamines (B12, foliumzuur): foliumzuur verhoogd bij 45% (suppletie). Schildklier (TSH): TSH verlaagd bij 6% en verhoogd bij 5%.

Conclusie: De biochemische status bij deze patienten lange tijd na operatie wijkt niet sterk af van de normale populatie. Het verlaagde creatinine en Fe-verzadiging en het verhoogde HbA1c vragen om een nadere analyse.