

Posterabstracts

Samenvattingen van de posterpresentaties tijdens de wetenschappelijke vergadering van het 48^e NVKC-congres op 11 en 12 april 1996 te Lunteren

Klinische (bio)chemie en methodologie

Lipiden

01. Rat adipose tissue rapidly accumulates but slowly releases orally administered vitamin D

D.A.J. BROUWER, H.J. van der HEIDEN, F.R.M. van der KLIS, H. FERWERDA and F.A.J. MUSKIET
Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Groningen

Low vitamin D status may be involved in development of osteoporosis. Augmentation of vitamin D status by exposure to UV-B can not cause vitamin D toxicity, but carries the risk of skin cancer development. Oral vitamin D supplementation of postmenopausal women living at high latitudes in winter is therefore recommended. There is concern that this strategy may cause vitamin D toxicity. Little is known about the buffering role of adipose tissue in vitamin D storage and release. The aim of this study was to investigate vitamin D storage in rat adipose tissue, and its subsequent unstimulated and stimulated release. Female Wistar rats were supplemented with 1500 IU vitamin D₃/day during 14 days. Plasma vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D], and adipose tissue vitamin D₃ were monitored during 99 days. From day 14 a subgroup of rats was fasted during 72 hours to investigate the effect of stimulated vitamin D release from adipose tissue. Following vitamin D supplementation, plasma vitamin D₃ reached steady state levels within 3 days. 25(OH)D increased

more slowly to reach plateau levels from about day 10. Adipose tissue vitamin D₃ rose linearly until day 14. Following discontinuation of vitamin D₃ supplementation, plasma vitamin D₃ decreased more quickly ($t_{1/2}$ =29 hours) than 25(OH)D ($t_{1/2}$ =18 days). There were no changes in adipose tissue vitamin D₃ contents. Fasted rats lost about 10% weight, but did not show different courses of plasma vitamin D₃ and 25(OH)D, compared with *ad libitum* fed counterparts. Their adipose vitamin D₃ content (in nmol/g wet weight) rose, indicating that fatty acid mobilization from adipose tissue occurs more easily than that of vitamin D. We conclude that orally supplemented vitamin D rapidly accumulates in adipose tissue, but slowly releases following discontinuation. Storage capacity seems unsaturable and fasting does not cause its massive release. Uptake of vitamin D in adipose tissue may be an important factor in the prevention of vitamin D toxicity and maintenance of long term adequate vitamin D status.

02. Serum Lipoprotein(a) levels in African Aboriginal Pygmies and Bantus, compared to Caucasian and Asian population samples

C. COBBAERT¹, P.G.H. MULDER², H.G. van EIJK², J. LINDEMANS¹ en H. KESTELOOT³
Department of Clinical Chemistry, University Hospital Rotterdam¹, Department of Epidemiology and Department of Chemical Pathology, Erasmus University Rotterdam², Department of Epidemiology, University Hospital Leuven³

Knowledge of the genetic susceptibility of traditional populations has shown to be valuable to anticipate future cardiovascular risk if populations get 'Westernized'. Therefore, serum lipoprotein(a) (Lp(a)) and its correlates were studied in Aboriginal Pygmies (N = 146) and in Bantus (N = 208). Concentrations were compared to those in Belgian (N = 905), Hungarian (N = 400), Philippine (N = 195) and Japanese (N = 42) population samples, with variable serum cholesterol levels and prevalences of CHD. Lp(a) was measured using the same ELISA method. Geometric Lp(a) means were 274 and 289 mg/l in Bantu males (M) and females (F) respectively, and 220 and 299 mg/l in Pygmy M and F, the gender difference being significant in Pygmies (P = 0.02). In Pygmy M and F respectively 41 and 52 % of the participants had Lp(a) levels above 300 mg/l, compared to 47 and 55% of the Bantus. Overall, serum Lp(a) levels did not significantly differ between Pyg-

mies and Bantus, and did not correlate with age, body mass index (BMI), systolic or diastolic blood pressure, apo A-I and HDL-c. In Pygmy, Bantu, Belgian, Hungarian, Philippine and Japanese males age and BMI-adjusted geometric Lp(a) means were respectively 208, 258, 72, 88, 51 and 89 mg/l, and 299, 266, 68, 87, 80, 153 mg/l in the respective females. Using multivariate analysis ethnicity explained 10 and 15% of Lp(a) variance in males respectively females.

We conclude that traditional African Pygmies and Bantus have, despite an obvious absence of CHD, mean serum Lp(a) levels that are two- to fivefold higher than Caucasian and Asian levels. Longitudinal studies across populations are needed to determine the extent to which Lp(a), depending on the variable relationships between nature and nurture, will independently predict disease.

03. Modulation of Lp(a) atherogenicity by serum HDL-cholesterol in middle-aged men with symptomatic coronary heart disease and moderately elevated serum cholesterol

C. COBBAERT¹, J.W. JUKEMA², A.H. ZWINDERMAN², G.J.M. BOERMA¹ and A.V. BRUSCHKE³
Department of Clinical Chemistry, University Hospital Rotterdam¹, University Hospital Leiden², Interuniversity Cardiology Institute, Utrecht, the Netherlands³

Serum apo(a) was measured in 704 male patients who entered the REGRESS study, a clinical angiographical study that assessed the effect of 2 yr of pravastatin treatment. Patients included were symptomatic males with serum cholesterol between 4 and 8 mmol/l. The course of CHD was documented by means of quantitative coronary angiography, primary end-points being mean segment diameter (MSD) and mean minimum obstruction diameter (MOD). Evaluable baseline and final angiograms were available in 80 % of the patients (N = 567).

At baseline, overall median apo(a) was 236 U/l. After 24 months of treatment, median apo(a) was 219 U/L in the pravastatin treated group and 217 U/l in the placebo group (NS). In regressors (N = 72), stable patients (N = 203) and progressors (N = 292) median in-trial serum apo(a) levels were 143,

177 and 259 U/l respectively (p = 0.0075), the regressors being significantly different from the progressors and stable patients. The relative % patients with apo(a) levels >75th percentile (690 U/l) were 14, 22 and 27% respectively.

Multivariate analysis demonstrated that baseline MSD and in-trial apo(a) were significantly and independently associated with MSD changes, while baseline MOD, in-trial apo(a) and HDL-c were independent predictors of MOD changes. The models predicted 10% of the coronary score changes, apo(a) alone 2 to 3%. Strikingly, in the low HDL-c subgroup (< 10th percentile) apo(a) was much stronger related to the course of CHD, explaining 17-23 % of the coronary score changes.

We conclude that Lp(a) atherogenicity is modulated by unfavourable lipoprotein milieu that nurture Lp(a) into a more potent risk factor.

04. Oxidation of lipoprotein(a) and low density lipoprotein containing density gradient ultracentrifugation fractions

H. A. KLEINVELD, P.F.C.C.M. DUIF, H.L.M. PEKELHARING and H.J.M. van RIJN
Afdeling Klinische Chemie, Academisch Ziekenhuis Utrecht

Increased plasma concentrations of lipoprotein(a) (Lp(a)) are associated with an increased risk for atherosclerotic cardiovascular disease. It is thought that the atherogenicity of Lp(a) is mediated both through its LDL-like properties and its plasminogen-like properties. In this study we have investigated the LDL-like atherogenic properties of Lp(a) by comparing the susceptibility to copper-induced *in vitro* oxidation of Lp(a) and LDL, isolated from the same subject.

Lipoproteins are notoriously unstable *in vitro*, consequently differences in *in vitro* handling could influence oxidizability. Therefore, the isolation and handling of Lp(a) and LDL was performed in identical fashion by density gradient ultracentrifugation. The subjects studied varied widely in plasma Lp(a) concentration (331-1829 mg/L) and Lp(a) phenotype (from B to S4). Of each subject 11 separate ultracentrifugation fractions containing various amounts of Lp(a) and LDL, quanti-

tated by measuring both apo(a) and apo B-100, were subsequently oxidized on equimolar apo B-100 basis.

Despite large differences in the apo(a)/apo B-100-ratio of the various fractions (ranging from 5.3 ± 1.7 to 0.2 ± 0.1) they showed quite similar oxidation characteristics. The most dense Lp(a) containing fraction showed an aberrant susceptibility to oxidation. Subsequent gel-filtration and reconstitution experiments showed that this was due to protein (i.e. albumin) contamination. Removal of excess protein revealed an oxidation pattern similar to that of LDL.

It is concluded that the susceptibility of Lp(a) to lipidperoxidation is similar to that of LDL when isolated simultaneously and in the same way from the same subject. Thus, lipidperoxidation of Lp(a) is not influenced by the presence of its distinguishing apolipoprotein(a).

05. Verdeling van lipoproteïne(a) concentraties en apolipoproteïne(a) isovormen in de Curaçaose bevolking

C.B. LEERINK¹ en I. GERSTENBLUTH²
Klinisch chemisch laboratorium¹, Andreas Ziekenhuis Amsterdam, Geneeskundige- en Gezondheidsdienst Curaçao²

In Caucasische populaties is de rol van Lipoproteïne (a)[Lp(a)] als onafhankelijke risicofactor voor atherosclerose goed gedocumenteerd. Ook is in de Caucasische populatie aangetoond dat er een negatieve correlatie is tussen de Lp(a) concentratie en de grootte van de aanwezige apo(a) isovormen. Hoe de verdeling van Lp(a) concentraties en hun relatie met de apo(a)-isovorm grootte in het Caraïbisch gebied is, is onbekend.

Uit de 1004 respondenten uit het Gezondheidsonderzoek Curaçao waarbij bloed is afgenomen zijn 226 respondenten geselecteerd die naar eigen zeggen een goede/zeer goede gezondheid hebben, waarbij geen proteinurie kon worden aangetoond, niet zwanger waren, geen diabetes mellitus hebben en geen andere chronische aandoeningen. In deze sera werd met behulp van een apo(a)/apoB ELISA (Organon Teknika) de Lp(a) concentratie bepaald. In een subgroep van 89 respondenten werd met behulp van SDS-agarose en western blotting

tevens de grootte van de voorkomende apo(a) isovormen bepaald.

De mediane Lp(a) concentratie op Curaçao is 250 mg/l en de 75-ste percentiel ligt bij 415 mg/l. Deze waarden zijn aanzienlijk hoger dan in Nederland. Er is een goede inverse correlatie ($r^2=0,44$) tussen de apo(a) grootte en de Lp(a) concentratie. Circa 10% van de Curaçaose bevolking heeft een apo(a) allel dat codeert voor een apo(a) molecuul met minder dan 20 kringel 4 kopieën. Dit is niet significant afwijkend van gegevens uit de Caucasische populatie.

Conclusie: Op Curaçao is de verdeling van Lp(a) concentraties in de bevolking verschoven naar hogere waarden, terwijl de apo(a) isovormenverdeling niet analoog is verschoven. Of dit gevolgen heeft voor het cardiovasculaire risico bij de individuele patient moet nader worden onderzocht.

06. Rol van lipoproteïne(a) en apolipoproteïne(a) grootte in (pre)eclampsie

C.B. LEERINK¹, C.V.S. de VRIES² en F.R.M. van der KLIS²

Klinisch chemisch laboratorium, Andreas Ziekenhuis¹, Amsterdam en Laboratorium voor de Volksgezondheid², Curaçao, Nederlandse Antillen

Inleiding: Pre-eclampsie ontstaat door een verminderde trofoblast-invasie in het myometrium. Dit zou kunnen berusten op onvoldoende immuunsuppressie ter plaatse, als gevolg van een verminderde activatie van "transforming growth factor" B (TGF- β)-achtige factoren door plasmine. In vitro onderzoek laat zien dat Lp(a) en dan met name de kleine apo(a)-isovormen de plasminevorming kunnen remmen en zodoende de TGF- β vorming kan verminderen. Op Curaçao is de prevalentie van (pre)-eclampsie én de mediane Lp(a) concentratie hoog.

Methode: Bij 39 vrouwen die pre-eclampsie hebben doorgeemaakt (patiënten) en 47 controles werd de Lp(a) concentratie bepaald met behulp van een ELISA (APOTEK, Organon

Teknika) en de apo(a)-grootte vastgesteld met behulp van SDS-agarose-elektroforese en western blotting.

Resultaten: Er waren geen vrouwen met een verhoogd CRP, wat acute fase stijgingen van het Lp(a) uitsluit. Proteinurie kwam bij 33% van de patiënten voor, en bij 11% van de controles ($p=0,01$), maar had geen relatie met de Lp(a) concentratie, zodat deze vrouwen in de vergelijking konden worden meegenomen. De mediane Lp(a) concentratie was niet verschillend tussen de patiënten en de controles ($p=0,48$), en ook de gemiddelde apo(a) grootte was niet significant verschillend. Conclusie: Lp(a) en de apo(a)-grootte zijn niet van belang bij de pathogenese van pre-eclampsie.

07. De invloed van lipoproteïne(a) op de trombocyt functie gemeten met behulp van een aggregometer

D. van LOON, F.J.L.M. HAAS, W.B.M. GERRITSEN en N.C. den BOER

Klinisch Chemisch Laboratorium, St Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein

Lipoproteïne(a) [Lp(a)] wordt gezien als een onafhankelijke risicofactor voor het ontstaan van vaatlijden. Onderzoek heeft laten zien dat het Lp(a) een remmende werking heeft op de omzetting van plasminogeen naar het plasmine. In dit onderzoek is de invloed van Lp(a) onderzocht, waarbij uitgegaan is van een model waarin het Lp(a) een stimulerende invloed uitoefent op de aggregabiliteit van de trombocyt. De trombocyt aggregatie is gemeten, waarbij de term Aggregaten Distributie Breedte [ADW] is gehanteerd als maat voor de lichtverstrooiing.

De gemeten ADW neemt toe met de Lp(a) concentratie indien aggregatie wordt geïnitieerd met collageen.

De invloed van het fenotype van Lp(a) op de trombocyt aggregatie is gemeten door tijdens de aggregaties het fenotype als enige variabele te houden. De eindconcentratie aan Lp(a) alsook het aantal trombocyten is constant gehouden. Gebleken is dat in aanwezigheid van het fenotype S2 (typering volgens Utermann) de hoogste waarde voor de ADW wordt gemeten.

Het verschil in de ADW ten opzichte van andere fenotypen is significant ($p<0,001$).

We concluderen dat trombocyten een verhoogde aggregabiliteit vertonen na stimulatie met collageen, in aanwezigheid van een hoge Lp(a) concentratie (Lp(a)>300 mg/l). Dit model is niet strijdig met het model waarin de atherogene werking van Lp(a) wordt beschreven als remmer van de fibrinolyse.

Tabel 1. Effect van Lp(a) op de aggregatie distributie breedte na stimulatie van de trombocyten met collageen

		Lp(a) >300 N=8	Lp(a) <300 N=8	
Lp(a)	mg/l	549	68	
ADW	mm	4,9	2,4	$p<0,001^*$
PLT	G/l	261	276	ns
MPV	fl	8,0	8,4	ns

*: bepaald met Kruskal-Wallis

08. Identification, allele frequencies and association with coronary artery disease of mutations in Kringle IV type 8 and 10 of the apolipoprotein(a)-gene

J. PRINS¹, F.R. LEUS¹, Y.Y. van der HOEK², J.J.P. KASTELEIN², B.N. BOUMA¹ and H.J.M. van RIJN

Department of Clinical Chemistry, University Hospital Utrecht¹, the Netherlands. Department of Vascular Medicine, Academical Medical Centre, Amsterdam², the Netherlands.

Lipoprotein(a) [Lp(a)], an independent risk factor for the development of atherosclerosis, contains an apolipoprotein(a) [apo(a)] moiety covalently linked to a LDL-like moiety. The apo(a) moiety contains multiple repeats of a plasminogen kringle IV like domain. Based on amino acid sequence analysis, the apo(a) kringles IV can be differentiated in ten types and by molecular modelling kringle IV type 10 and kringle IV type 5 to 8 were indicated as potential lysine binding domains. By single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis and sequencing, polymorphisms in the apo(a)-gene regions coding for kringle IV type 8 and 10 were identified. The mutations predict a Thr \rightarrow Pro substitution located at amino acid position 12 of kringle IV type 8 and a Met \rightarrow Thr substitution located at amino acid position 66 of kringle IV type 10. Allele frequencies and *in vivo* significance of these

polymorphisms were studied in a cohort consisting of 155 subjects with coronary artery disease (CAD) and 153 age and gender matched normolipidemic controls. The allele frequencies of the Thr¹² \rightarrow Pro polymorphism and the Met⁶⁶ \rightarrow Thr polymorphism were 14 % and 70 % respectively. The two mutations are in Hardy-Weinberg equilibrium. A negative association of the Thr¹² \rightarrow Pro polymorphism in kringle IV type 8 and the presence of coronary artery disease (CAD) was observed ($p < 0.05$), while the Met⁶⁶ \rightarrow Thr polymorphism in kringle IV type 10 appeared not to be associated with the presence of CAD.

In conclusion, we identified a polymorphism located in the kringle IV type 8 region of the apo(a)-gene leading to a Thr¹² \rightarrow Pro substitution which shows, in this case-control study, a negative association with the presence of CAD.

09. Oxidation of low density lipoproteins in patients with familial combined hyperlipidemia and the role of coenzyme Q10

Y.B. de RIJKE¹, S.J. BREDIE², P.N. DEMACKER² and A.F. STALENHOEF²

Dept. Clinical Chemistry, Bosch Medicentre, Den Bosch¹ and Dept. General Internal Medicine, University Hospital Nijmegen²

Familial combined hyperlipidemia (FCH) is characterized by a familial clustering of multiple phenotypes of hyperlipidemia, associated with coronary risk. The latter may be related to increased levels of small dense low density lipoprotein (LDL) particles which have been found to be more prone to oxidative modification. We isolated total LDL, as fresh as possible from: 12 normolipidemic relatives with a buoyant LDL subfraction profile (group 1), 7 normolipidemics with a dense LDL subfraction profile (group 2), and 16 hyperlipidemic FCH patients with a dense LDL subfraction profile (group 3). All subjects were non obese and normotensive men. We studied the resistance of the respective total LDL against Cu²⁺-oxidation in vitro. In addition, we analyzed the α -tocopherol and the coenzyme Q10 content of LDL and determined its relation with LDL oxidizability.

LDL, isolated from group 3 subjects, was more susceptible to

oxidative modification than LDL from group 1 subjects (lag time: 60.4 \pm 8.1 vs. 70.4 \pm 11.4 min; p<0.05). The oxidation rate was negatively correlated with the ratio ubiquinol-10/polyunsaturated fatty acids in LDL (p<0.01). The K-value, a measure of the LDL density, correlated with the lag time of LDL to oxidation (r=0.35, p<0.05), and the redox status of coenzyme Q10 (ubiquinol-10/ubiquinone-10) (r=0.37, p<0.05). In both groups 2 and 3, the redox status and the ratio ubiquinol-10 to α -tocopherol in LDL were reduced when compared with group 1 (p<0.05).

We conclude that in patients with FCH total LDL is more prone to oxidation, due to the predominance of dense LDL particles. In addition, the decreased redox status of coenzyme Q10 in the LDL fraction may be indicative of in vivo oxidative stress.

10. Daily intraindividual variability of lipoprotein(a) in serum

J.P.M. WIELDERS, N. BORST en A. van de WIEL

Departments of Clinical Chemistry and Internal Medicine, Eemland Hospital, Amersfoort, the Netherlands

Human serum lipoprotein(a), Lp(a), is considered to be an independent risk factor for atherosclerosis and myocard infarction.

Literature about short-term variation of Lp(a) levels is scarce and conflicting. Therefore we measured the intraindividual fluctuations during daytime in participants of a study concerning the relationship between alcohol consumption and cardiovascular risk.

Methods: Blood samples were obtained from 23 volunteers and the separated serum was immediately frozen (-20 °C) until the time of analyses. Three scheduled conditions for phlebotomy during one day were selected:

after overnight fasting and 30 minutes recumbency (9 o'clock), after breakfast and light labour (11 o'clock) and three hours after a fatty meal and light labour (16 o'clock).

Individual Lp(a) curves were measured in one run by an

ELISA microtiterplate assay (Campro Scientific) having an intra-assay CV of 4.6 % at 216 mg/l for a poolserum.

Results: A range of individual mean values from < 10 up to 733 mg/l was found. Four subjects having mean Lp(a) values less than 30 mg/l were excluded.

Intraindividual variation expressed as range/mean fluctuated more than 5 % for 14 out of 19 remaining subjects and at least 20 % for 5 of these subjects. Repeating the curves for some fluctuating subjects showed that the pattern was irreproducible.

Conclusion: Unlike other parameters of fibrinolysis, in which Lp(a) might play a role, Lp(a) does not show a circadian rhythm. Studies concerning the level of Lp(a) or the influence of external parameters on this level must take into account a rather large bias due to intraindividual daily variations of unknown origine.

11. High Performance Gel Permeation Chromatography: comparison with current methods for the determination of HDL and LDL cholesterol

A.P. van ZANTEN¹, W.M. MAIRUHU¹, M.M. PAUW¹ and A. van den ENDE²

Department of Clinical Chemistry, Municipal Hospital Slotervaart¹, Centre for Hemostasis, Thrombosis, Atherosclerosis and Inflammation Research, Academic Medical Centre², Amsterdam

Different lipoprotein classes can be separated by gel permeation chromatography. Agarose HR 6 10/30 (Pharmacia, Upsala, Sweden) seems to be especially suitable for this purpose. Using a Varian HPLC workstation, consisting of a ternair pump 9012, UV-VIS detector 9050, and an autosampler 9100, with post column reaction it was possible to achieve a complete and reproducible separation of chylomicrons + VLDL, HDL and LDL. Chylomicrons and VLDL are travelling in the void volume of the column.

Using this technique, we compared the quantification of HDL and LDL cholesterol using with some recently published procedures and with our in house procedure for the quantification of HDL cholesterol.

For the determination of LDL cholesterol we used a procedure, which is based on the selective adsorption of HDL cho-

lesterol and VLDL cholesterol with latex beads coated with polyclonal goat antibodies (Sigma, St. Louis, USA).

The new magnetic separation method for HDL cholesterol (Reference Diagnostics Inc., Arlington) utilizes magnetically enhanced particles within a dextran sulfate MgCl₂ reagent to obtain the separation of HDL cholesterol from the other lipoproteins. Our routine method for the determination of HDL cholesterol is based on the precipitation of chylomicrons, VLDL and LDL by adding phosphotungstic acid and magnesium ions to the sample (Boehringer Mannheim Corporation, Mannheim, Germany).

A first comparison study was performed on a total of 39 samples, with triglycerides < 4.2 mmol/l. Samples were obtained after an overnight fast. Some fractions obtained with the precipitation techniques were also analyzed using gel permeation

chromatography. In most circumstances single peaks were obtained.

Regression studies (Passing and Bablok) gave the results as shown in table 1:

HDL cholesterol results (HPLC) showed a feasible correlation with our routine method and with the electromagnetic separation method. The HDL values obtained with the gel permeation chromatography showed the highest values. Surprisingly for LDL cholesterol a better correlation between the different methods was found. This was the case even for the calculated values.

Enzymen

12. Fecal leucocyte esterase in infectious enteritis

J. BROUWER¹ and B.F.M. WERDMULLER²

Depts of Clinical Chemistry¹ and Microbiology², Diagnostic Centre SSDZ, Delft

Fecal concentrations of enzymes secreted by activated phagocytes can serve as markers for disease activity in intestinal inflammation. The semi-quantitative determination of fecal leucocyte esterase (FLE) is a simple, rapid and economical method (Clin Chem 1993; 39: 2531-2). Here we determined FLE in specimens from patients with suspected gastrointestinal infections. FLE was determined in 75 culture-positive and 270 culture-negative stool specimens.

Normal FLE is < 32.

Increased FLE concentrations were measured in 96% of the culture-positive stool specimens. FLE varied between < 8 and 6000 (median 192) with highest values in diarrheal stools (n = 23; range 32-6000, median 750)

FLE concentrations in culture-negative specimens varied between < 8 and 3000 (median < 8). Increased FLE was found in 17% of all culture-negative samples and in 35% of the culture-negative diarrheal stools.

No organisms are recovered from most of the specimens presented to the laboratory for stool cultures. Nevertheless,

Table 1. Results of regression studies according to Passing and Bablok

N	Y	X	Slope	Intercept	R ¹	S _{yx} ¹
39	HDL-C _{BMC}	HDL-C _{HPLC}	0.889	0.063	0.713	0.2419
39	HDL-C _{Mag}	HDL-C _{HPLC}	0.755	0.255	0.795	0.1721
39	HDL-C _{Mag}	HDL-C _{BM}	0.828	0.239	0.927	0.1064
39	LDL-C _{Sig}	LDL-C _{HPLC}	0.808	0.556	0.935	0.4329
39	LDL-C _{Fr}	LDL-C _{HPLC}	1.033	-0.244	0.959	0.4398
39	LDL-C _{Fr}	LDL-C _{Sig}	1.278	-0.945	0.932	0.5621

¹: Obtained from linear regression analysis

increased FLE is measured in one-sixth of them, indicating the occurrence of an inflammatory process.

The ability of fecal leucocyte esterase to detect or exclude infectious enteritis, as defined by a positive stool culture, was as depicted below. Numbers in the table represent percentages of all specimens presented to the laboratory for stool cultures. The pre-test probability of a positive culture in these samples is 0.10. FLE is a useful screening test for determining which specimens require culturing, i.e. about one-quarter of all stool specimens.

		culture		
		pos	neg	
FLE	pos	9.6	15.0	24.6
	neg	0.4	75.0	75.4
		10	90	
				sensitivity: 0.960
				specificity: 0.833
				PVpos: 0.390
				PVneg: 0.995

13. A macro enzyme as a cause of unexplained elevation of aspartate aminotransferase

Y.Y. van der HOEK¹, W.B.M. GERRITSEN¹, F.J.L.M. HAAS¹, N.C. den BOER¹ and P.A.M. van HEES²

Department of Clinical Chemistry¹ and Gastroenterology², St. Antonius Hospital, Nieuwegein

Introduction: Abnormal enzyme activities in a patients serum are generally associated with disease. Sometimes persistently increased enzyme activity is due to the formation of a macro-complex between immunoglobulins and e.g. amylase, alkaline phosphatase, creatine kinase, or aspartate aminotransferase (AST). In the case of immunoglobulin-complexed AST the elevated serum level of AST can be mistaken as a sign of pathological conditions.

Case report: A 58-year old woman was referred to our institution because of unexplained elevated AST levels (988 IU/l versus reference range <40 IU/l). Blood tests, including ESR, haemoglobin, platelet count, alkaline phosphatase, bilirubin, γ -glutamyl transpeptidase, creatinekinase, lactate dehydrogenase and alanine aminotransferase were normal. The physical examination was unremarkable. She had no evidence of hepatomegaly or muscle disease.

Results: To identify the presence of an immuno-complexed

AST, affinity-chromatography was performed. Protein-A Sepharose, was incubated with the patients plasma and a human plasma containing high AST activity as a control. AST activity was measured before and after incubation; AST activity of the patients plasma lowered after incubation from 864 to 56 IU/l. The AST activity of the control lowered from 635 to 612 IU/l. Exclusion chromatography on the patients plasma confirmed the presence of a high molecular weight complex, containing high AST activity accompanied with immunoglobins. Control plasma showed only uncomplexed AST.

Conclusion: We identified an immunoglobulin-complexed AST (macro-AST) in an apparently healthy woman without medical complaints. Circulating macromolecular complexes have been reported for a variety of enzymes. Clinicians and laboratory staff should be aware of this cause of increased AST to avoid unnecessary examinations.

14. Serum lactate dehydrogenase and its isoenzyme pattern in ex-coalminers

N. A. M. COBBEN¹, M. DRENT¹, A. M. W. J. SCHOLS¹, E. F. M. WOUTERS¹ and M. P. van DIEIJEN-VISSER²
Department of Pulmonology¹ and Department of Clinical Chemistry², Academic Hospital, Maastricht

Lactate dehydrogenase (LDH) is a cytoplasmatic enzyme present in essentially all major organ systems, whose extracellular appearance is used to detect cell damage or death. Total plasma LDH activity is elevated in several pulmonary disorders associated with fibrosis and has been suggested to be a useful monitor of disease activity. The lung LDH isoenzyme pattern is characterised by proportional increases in isoenzymes 3,4 and 5, compared to serum isoenzyme pattern. Elevation of LDH has been described in rats after exposition to silica. A rise of plasma LDH₃ has been correlated with lung injury.

The aim of this study was to investigate the serum LDH and its isoenzyme pattern in patients with coal-dust exposition.

The study was performed in a sample of ex-coalminers (n=109), all exposed to coaldust more than 20 years ago and admitted for a medical check-up. Pulmonary function tests were assessed including, forced expiratory volume after one seconde (FEV₁) by standard flow volume measurement and diffusion capacity (DLCO) by single breath methode. Simultaneously blood samples were taken and serum was stored frozen at -70°C until actual measurement of LDH isoenzyme pattern. Correlations between the parameters were estimated by simple Pearson coefficient test.

Total LDH was elevated in 88 out of the 109 ex-coalminers (685±253 U/l) with an isomorphic pattern characterized by mainly an increase of the LDH₃ fraction (32%±5) and to a lesser extent, of the LDH₄ fraction (12%±3) compared to reference values. Of all 109 patients, 106 had an increase of the

LDH₃ fraction. Moreover, all other liver function tests were within normal range, as well as serum creatinine and albumine. Mean values are presented in table I. A negative correlation was found between the FEV₁ and the total LDH (p=0.001), LDH₃ (p=0.01) and LDH₄ (p=0.005). Moreover, a negative correlation was found between the DLCO and LDH₄ (p=0.04) and the LDH₃ tended to be negative correlated.

Conclusions: These results suggest that coal-dust exposition - even many years after the actual exposure - is associated with an increase of serum LDH. The isoenzyme pattern, even with a normal total LDH is characterized mainly by an elevated LDH₃ fraction. Most likely, this increase of serum LDH originates from the lung.

Table 1

	Reference value	Mean	Range	SD
LDH (U/l)	200-450	685	218-1388	253
LDH-1 (%)	19-30	15	7.7-24.8	4
LDH-2 (%)	32-48	37	26.5-48.9	4
LDH-3 (%)	12-22	32	20.1-43.6	5
LDH-4 (%)	5-11	12	4.7-21.2	3
LDH-5 (%)	5-13	5	0.7-17.2	2
ALAT (U/l)	5-40	18	7-77	9
Kreat µmol/l	53-110	100	64-203	22
Albumine g/l	35.0-55.0	39	27-45.5	3

Eiwitten

15. A method for the determination of the ferritin-iron-saturation

J. ten KATE¹, A. WOLTHUIS¹, L. WESTERHUIS¹ and C. van DEURSEN²

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

Iron deficiency as a cause of anemia is commonly diagnosed by the assessment of serum ferritin, being a measure of tissue iron stores. However in patients suffering from chronic disease such as rheumatoid arthritis, serum levels of ferritin are increased because of the acute phase reaction. As a consequence this increased ferritin level may obscure an iron deficiency. Correction of the ferritin levels in relation to CRP or BSE were in our earlier experiments proven to be not useful. In the acute phase the apoferritin synthesis in the liver is increased and as a result, the relative iron saturation of ferritin will be diminished. For the assessment of the iron status in patients

with anemia of inflammation the determination of the ferritin iron content could be more useful than the absolute value of serum ferritin. In this study we describe a method for the determination of serum ferritin-iron-saturation percentage. The method employs a commercial solid phase coupled antibody in order to isolate the ferritin molecule from a serum specimen. After separation from other serum non-ferritin iron compounds, ferritin is liberated from the solid phase and the iron content is determined by atomic absorption spectrophotometry. The validation of this technique will be presented in this poster. Furthermore the first results will be presented.

16. Comparison of capillary and agarose electrophoresis (Paragon) of serum proteins

P. A. H. M. WIJNEN, M. P. J. SCHMITZ and M. P. van DIEIJEN-VISSER

Dept. of Clin. Chem, Academic Hospital Maastricht, Maastricht, the Netherlands

Capillary electrophoresis is a new highly promising tool in clinical chemistry. Capillary zone electrophoresis has been suggested as a method for electrophoresis of serum proteins. We used the Beckman p/Ace 5500 system for separation of serum proteins. Separation was performed after pressure injection (2 seconds, 34.5 kPa) of serum (1:39 dilution in phosphate buffered saline) on an untreated fused silica capillar (50 mm x 20 cm; length until detector). Electrophoresis was performed for 5 minutes at 10 kV at 20°C. Detection occurred at the cathodic end by on-column measurement of the absorbance at 200nm. Quantification of the various fractions was calculated from the area under the curve, using the Gold System. Before

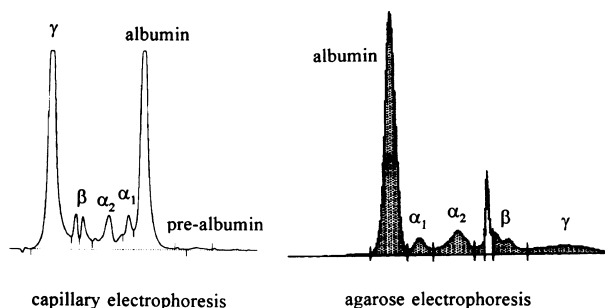
each run the capillary was sequentially rinsed 1 minute with 0.1 M NaOH and 1 minute with distilled water and 2 minutes with assay run buffer (100 mM borate buffer pH 10.2). The method we used was a modification of the method published by Chen et al. (1).

We investigated the within day, between day and between capillary variation using Beckman I.D.-Zone control sera normal (BI 015-555985-AR) and abnormal (BI 015-555983-AP). Data were compared with agarose electrophoresis results obtained with the Paragon Serum Protein Electrophoresis (SPE) kit from Beckman (BI 015-556458-J). After separation the gels were scanned on the Beckman Appraise system.

For the normal control sample capillary electrophoresis performed ten times on one day gave mean fractions of albumin 34.5g, alpha-1 2.7g, alpha-2 7.0g, beta 10.0g and gamma 7.9g and within day variations were respectively 1.0%, 3.6%, 2.6%, 2.2% and 1.7%. Measuring this sample ten times a day during five days resulted in variations of respectively (n=50) 3.4%, 11.0%, 8.0%, 4.5% and 8.3%. Performing the same procedure on two different capillaries resulted in variations (n=100) of 4.2%, 13.1%, 8.4%, 6.6% and 8.6% respectively. Electrophoresis of this sample on an agarose gel (8 positions) measured on two different days gave mean fractions of albumin 39.9g, alpha-1 2.2g, alpha-2 5.8g, beta 7.5g and gamma 6.6g and day to day variations (n=16) were respectively 1.4%, 2.2%, 2.7%, 4.1% and 5.1%

For the abnormal control sample capillary electrophoresis performed ten times on one day gave mean results of albumin 26.6g, alpha-1 1.85g, alpha-2 5.2g, beta 11.5g and gamma 36.8g and within day variations (n=10) were respectively 1.4%, 5.1%, 3.3%, 3.1% and 0.8%. After measuring this sample ten times a day during five days, variations were respectively (n=50) 3.5%, 7.4%, 5.1%, 17.5% and 5.9%. Performing the same procedure on two different capillaries resulted in variations (n=100) of 3.9%, 7.7%, 5.1%, 17.9% and 6.4%. Electrophoresis of this sample on an agarose gel (8 positions) on 2 different days gave mean fractions of albumin 32.8g, alpha-1 1.7g, alpha-2 4.5g, beta 5.8g and gamma 37.1g and variations (n=16) were respectively 1.5%, 5.0%, 2.8, 2.4 and 1.7%.

Figure 1 shows an example of a serum sample, where Paragon SPE showed a band on the application slot. This occurs when



large molecules are kept in the agarose layer and cannot be separated. In capillary electrophoresis this artefact disappears and the band appears in the γ -fraction.

We conclude that capillary electrophoresis is a very useful technique, suitable for separation of serum proteins, but total variation for capillary electrophoresis seems higher compared to agarose electrophoresis. For capillary electrophoresis in the beta fraction a clear separation of the complement C3 and transferrin fraction is possible. The same holds for separation of pre-albumin. Some artefacts of the gel electroforesis are eliminated when using capillary electrophoresis.

References

- Chen FA, Sternberg JC. Characterization of proteins by capillary electrophoresis in fused-silica columns. *Electrophoresis* 1994; 15: 13-21.

Electrolyten

17. Precision of the magnesium determination in mononuclear blood cells and erythrocytes

H.J. HUIJGEN¹, R. SANDERS¹, H.E. van INGEN² and G.T.B. SANDERS¹

Department of Clinical Chemistry, Academic Medical Centre, Amsterdam¹, Dr. Daniel den Hoed Cancer Centre, Rotterdam², the Netherlands

Introduction: An increasing interest can be noticed in the measurement of the total magnesium (Mg) concentration in mononuclear blood cells (MBC) and erythrocytes (RBC). Although several studies about the diagnostic value of intracellular Mg have been published, no thorough study about the precision of the complete assay has been described.

Aim of the study: 1. To establish the analytical variation, and the reproducibility of the complete assay (pre-analytical, analytical, and biological variation) of the determination of the total Mg concentration in MBC and RBC. 2. To assess the influence of platelets on the Mg determination in MBC.

Methods: For the reproducibility experiments (within-day and day-to-day) heparinized blood was used; to assess the influence of platelets on the Mg assay, both heparinized blood and defibrinated blood was obtained from 17 volunteers. MBC and RBC were isolated by density gradient separation. Analytical variation and reproducibility were expressed as the coefficient of variation, based on 10 measurements.

Results and discussion, table 1:

1. The analytical variation, was satisfactory, but the CVs of the reproducibility of the complete assay were high. So,

improvement of the latter, or development of new methods (e.g. determination of ionized intracellular Mg, see poster of G.T.B. Sanders) seems to be necessary. Until then results should be interpreted with care.

2. Mg measurements in MBC (fmol/cell) obtained from heparinized blood result in significantly higher values than in MBC obtained from defibrinated blood. Therefore, we conclude that the removal of platelets is essential in the determination of Mg in MBC.

Table 1

	analytical variation (%) [*]	reprod. of the complete assay (%) [*]
MBC (fmol/cell)	6.6	20.7 ^{**}
MBC (μ mol/g prot)	6.1	14.9
RBC (fmol/cell)	5.6	12.3
RBC (μ mol/g cells)	7.1	13.2

^{*}: Combination of within-day and day-to-day CV; ^{**}: Based on an unlikely large within-day CV of 16.9%

18. Determining intracellular ionized magnesium in mononuclear blood cells

R. SANDERS¹, F.R. GAFFAR¹, R.W. van OLDEN², H.J. HUIJGEN¹ and G.T.B. SANDERS¹

Department of Clinical Chemistry¹ and Nephrology², Academic Medical Centre, Amsterdam

Magnesium is the fourth most abundant cation in the human body and the second most abundant one in the intracellular environment. The magnesium concentration in blood consists of different fractions. The question has to be answered which

magnesium concentration in the body is relevant to be determined and in which clinical situations. Here, we want to focus on the determination of ionized magnesium in mononuclear blood cells (iMg^{2+}_{MBC}).

First it is demonstrated that the overall imprecision (within-day and day-to-day imprecision) of the determination of iMg^{2+}_{MBC} is 8.0%, which is better than the determination of total magnesium in MBC found by Huijgen et al. (see poster of H.J. Huijgen et al.). Then the iMg^{2+}_{MBC} of haemodialysis patients is determined and compared with the values in healthy volunteers.

The iMg^{2+}_{MBC} of the haemodialysis patients is 0.31 ± 0.02 mM ($n=7$), and is significantly higher than the iMg^{2+}_{MBC} of healthy volunteers 0.24 ± 0.01 mM ($n=5$). Therefore the used method is sensitive enough to detect differences in intracellular ionized magnesium concentrations between these two populations.

We note that iMg^{2+}_{MBC} of the patients lower is than the ionized

magnesium concentration in the dialysate (0.50 mM) and lower than the ionized magnesium concentration in serum (0.81 ± 0.08 mM). The exact influence of the elevated ionized magnesium concentration in mononuclear blood cells of the patients is unknown.

In conclusion, the method as used here to measure ionized magnesium in mononuclear blood cells can be useful to determine differences in the ionized magnesium concentration of mononuclear blood cells between healthy volunteers and patients. However, this is only the first step in which analytical aspects are being dealt with and in the future attention has to be focused on the clinical relevance of elevated or lowered ionized magnesium concentration levels in mononuclear blood cells.

Endocrinologie

19. Corticosteroid Bindend Globuline: een "Time Resolved Fluoro Immuno Assay" en de klinische toepassing ervan

H.A. BONTE¹, G. van der SLUIJS VEER² en I. VERMES²

Klinisch Chemisch Laboratorium, Streekziekenhuis Midden-Twente, Hengelo¹ en Medisch Spectrum Twente, Enschede²

Corticosteroid Bindend Globuline (CBG) speelt een analoge rol in relatie tot cortisol als TBG dat doet voor thyroxine. Het is daarom verwonderlijk dat het algemeen gebruik van de vrije T4 bepaling niet gevolgd is door de doorbraak van het vrije cortisol. Verwaarlozing van de invloed van CBG kan aanleiding zijn tot klinisch verkeerde conclusies m.b.t. de bijnierfunctie. Wij ontwikkelden daarom een "Time-Resolved-Fluoro-Immuno-Assay" (TRFIA) voor de CBG-concentratie in serum. Een polyclonaal antilichaam (DAKO, Denemarken) werd gecoat aan een polystyreen microtiterplaat (1e antilichaam) en tevens gelabeld met Eu^{3+} (2e antilichaam). De CBG-standaard (Calbiochem, USA) werd verdund met foetaal kalfserum. De bepaling heeft een meetgebied van 1,8 - 400 mg/l. De binnen-serie VC bedroeg 3,3 %. Het CBG werd eveneens gemeten met een commerciële kit (Medgenix, België). Uit de gemeten totaal cortisol en de CBG-concentratie

werd de FCI (Free Cortisol Index) berekend. Als maat voor de concentratie van het vrije cortisol in serum werd de cortisol-concentratie in speeksel gemeten d.m.v. een gevoelige RIA (Pharmos, Finland). Het speeksel werd daartoe verzameld met het Salivette systeem (Sarstedt, Nederland). Het klinische nut van bovenstaande parameters werd geëvalueerd in de volgende groepen: gezonde vrijwilligers, vrouwen die orale anticonceptiva gebruiken, zwangeren, patiënten verdacht van het Syndroom van Cushing, patiënten met schildklierziekten. We concluderen dat het gebruik van de vrij-cortisol-parameters verkeerde conclusies betreffende de bijnierfunctie kan voorkomen. De dexamethason-suppressie-test gebaseerd op de FCI is specifiek en gevoeliger dan de klassieke test. De TRFIA bleek goedkoop en betrouwbaar. Het bepalen van cortisol in speeksel verdient o.i. meer aandacht.

20. Multi-center evaluation of the Enzymun anti-TPO and Anti-Thyreoglobulin autoantibody assays

F.A.L. van der HORST¹, A.-CH. KESSLER² and N. AMINO³

Dept. Clinical Chemistry¹, Eemland Hospital, Amersfoort, the Netherlands, Boehringer Mannheim², Tutzing, Germany and Dept. Laboratory Medicine³, Osaka University Medical School, Osaka, Japan

Disorders of the thyroid are the most common endocrine diseases, with a highest prevalence of ca. 2% in caucasian female population. A large proportion of these thyroid disorders, such as Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis, is associated with an auto-immune response to the thyroid tissue. In the auto-immune thyroid disorders a high prevalence of auto-antibodies directed towards thyreoglobulin (α -Tg) and thyroid peroxidase (α -TPO) is observed. The clinical relevance of these antibodies is mainly in the area of biochemical confirmation of an auto-immune thyroid disease and, amongst others, of the post-treatment risk-analysis in Graves' disease and post-partum thyroiditis. Due to their complex characteristics, a comprehensive analytical and clinical evaluation is pivotal for assays in which auto-antibodies are quantitatively determined. The aim of this multi-center study, in which 26 laboratories participated was to establish the analytical and clinical performance of the Enzymun α -Tg and α -TPO auto-antibody assays. The average intra-assay reproducibility of the α -Tg assay was better than 2.5% in the range 30 - 700 IU/mL (NIBSC MRC 65/93) using patients samples, whereas the functional detection limit was 8 IU/mL. The inter-assay repro-

ducibility was 9.0% at a 49 IU/mL level and 2.4% at 608 IU/mL, using kit control sera. For α -TPO the inter-assay C.V. was better than 2.5% in the range 30 - 600 U/mL (NIBSC MRC 66/387), whereas the functional detection limit was 3 U/mL. The inter-assay reproducibility was 8.3% at a 6.8 U/mL level and 3.8% at 95.3 U/mL, using kit control sera. Based on 1175 clinical and biochemical euthyroid subjects and patients with auto-immune thyroidal diseases ($n = 410$), cut-off values were established of 63 IU/mL for α -Tg and of 18 U/mL for α -TPO, using ROC-curve analysis. The 95% upper limit for healthy females was significantly higher (44 IU/mL) compared to male subjects (31 IU/mL). A less marked difference was observed with the α -TPO assay. Correlation with other assays, 85% concordant results were obtained for the α -Tg assay and 92% for the α -TPO assay. Discordant results were mainly observed near the cut-off value of the assays. Based on this comprehensive multi-center study it is concluded that the Enzymun assays are analytically as well as clinically well suited for the diagnosis of auto-immune thyroidal diseases.

21. Detection of Prostate-Specific Antigen (PSA) in breast cancer cytosols

M.A. BLANKENSTEIN¹, A.I. VELDKAMP¹, J. de JONGH-LEUVENINK² and J.L.P. van DUIJNHOFEN²

Endocrine Laboratory, Academic Hospital Utrecht¹ and Centralized Department of Hematology and Clinical Chemistry, Elisabeth Hospital, Tilburg²

PSA has been considered for a long time to be highly tissue-specific (1). Immunohistochemically, some doubts have been cast already on this tissue specificity (2). Recent evidence suggests that with a very sensitive immunoassay (3) PSA can also be detected in human breast cancer cytosols (4), human milk (5) and amniotic fluid (6). The presence of PSA in breast cancer tissue has been shown also by molecular biological techniques (7). Following confirmation, these remarkable observations may have a great impact on the tumor marker and prognostic factor laboratory.

The purpose of our study is to confirm the data presented in the literature, which were generated with a highly sensitive home-brew assay (3), with the Immulite 3rd Generation, which parallels this assay in terms of sensitivity and to study the relationship between PSA and other prognostic factors in human breast cancer.

Methods: Cytosol specimens (n=407) remaining after the routine estimation of oestrogen and progesterin receptors and kept at -80°C were used. In a number of cases, other prognostic variables like Cathepsin-D and PS2 have also been measured in these cytosols. PSA was measured with the DPC IMMULITE 3rd Generation PSA assay, which was kindly

made available by EURO/DPC.

Results.: Both laboratories have comparable incidence of oestrogen receptors in their specimens: 71.6%, resp 69.7%, indicating that the data can be combined. The preliminary results confirm the observation reported in the literature, i.e. PSA immunoreactivity can be detected in a considerable number of breast cancer cytosols. Overall, 37.1% of the cytosols were PSA positive (>0.015 ng/mg protein). PSA positivity was related to oestrogen receptor positivity (P< 0.01) Further analysis of the data to establish the relationship to other prognostic factors, is in progress. The present results confirm the presence of PSA in breast cancer cytosol and its relationship to the presence of oestrogen receptors.

References

1. Oesterling JE. *J Cellul Biochem* 1992; 16H: 31-43.
2. Frazier HA et al. *J Urol* 1992; 147: 246-248.
3. Yu H, Diamandis EP. *Clin Chem* 1993; 39: 2108-2114.
4. Diamandis EP et al. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 32: 291-300.
5. Yu H, Diamandis EP. *Clin Chem* 1995; 41: 54-58.
6. Yu H, Diamandis EP. *Clin Chem* 1995; 41: 204-210.
7. Monne M et al. *Cancer Res* 1994; 54: 6344-6347.

22. A patient with prostatic cancer and large discrepancy between PSA-results

J.L.P. van DUIJNHOFEN¹, M.A. BLANKENSTEIN², J. van ZON² and N. PEQUERIAUX¹

Centralized Dept. of Clinical Chemistry and Hematology¹, Elisabeth Hospital, Tilburg, and Dept. of Endocrinology², Academic Hospital Utrecht, the Netherlands

A patient was identified with remarkable discrepancy in serum PSA as assessed by the 2nd generation PSA assay on the Immulite system and IMx: IMx 101 µg/l and Immulite 6.4 µg/l. Additional laboratory data revealed a mildly decreased kidney function, an elevated alkaline phosphatase level, a mildly increased LDH activity and a moderate anemia. The medical record learned that this patient was suffering from prostate cancer since 1989 and died due to advanced metastatic disease three months after this sample was drawn, which explains for these biochemical abnormalities. Clearly, the PSA result reported by Immulite was falsely low. The objective of this study was to determine the possible cause of the observed difference in PSA results. The aspect of the sample, serum electrophoresis and Ig assay results were normal. Dilution of the sample up to 512 times, as well as assay in the presence of mouse serum, ruled out an interfering substance. Seven additional samples of this patient were available from a longitudinal follow-up study, ranging from november 1992 to december 1993. These samples were analyzed on Immulite and reanalyzed on IMx. For all individual samples, the Immulite result was approx. 20 fold lower than the IMx value (range of IMx results 5-275 µg/l). However, the pattern of the consecutive samples was similar for both assays. A selection of the samples was analyzed using a number of other PSA assays (see table). Peculiarly, Immulite free PSA assay result exceeded the total found in the Immulite 2nd and 3rd generation assays.

Free and complexed PSA were separated by gel filtration and

PSA was assessed by IMx. Apart from the antichymotrypsin (ACT) complex no other complexes were found. However, a high percentage of free PSA was detected (approx. 50%). This high ratio of free versus ACT-bound PSA can not be the cause of this phenomenon, since the Immulite 2nd generation PSA assay is nearly equimolar for bound and free PSA. More likely, a change of conformation of the PSA molecule could result in a decreased binding to ACT and a reduced affinity of the antibodies used in the affected assays.

We would like to invite everybody who observed a similar discrepancy or discrepancies between clinical and laboratory findings to contact one of the authors in order to help us find the solution for this intriguing problem.

Resultaten van verschillende assays (µg/l)

PSA assay	Sample 1	Sample 2
IMx (Abbott)	101	185
ACS:180 (Ciba Corning)	139	276
ES-600 (Boehringer Mannh.)	-	184
Coat-a-count IRMA (DPC)	14	30
Immulite (2nd) (DPC)	6	13
Immulite (3rd) (DPC)	-	17
Immuno 1 (Miles/Bayer)	11	-
AIA-pack (Tosoh)	-	35
Tandem-R (Hybritech)	68	-
Immulite free (DPC)	-	41
ES-600 free Boehr. Mannh	-	100

23. Hormonal regulation of extraprostatic Prostate-Specific Antigen (PSA)?

M.A. BLANKENSTEIN¹, A.I. VELDKAMP¹, H. ASSCHEMAN² and L.J.G. GOOREN²

Endocrine Laboratory, Academic Hospital Utrecht¹ and Department of Endocrinology, Free University Hospital Amsterdam²

The tissue specificity of PSA has been questioned recently and it is clear now that tissues other than the prostate can synthesize this member of the kallikrein protease family (1). It is presently unclear whether the extraprostatic sources of PSA contribute to the circulating level of PSA and, if so, to what extent. It is equally unknown whether extraprostatic PSA is regulated by androgens. These two questions were addressed in the present investigation.

Serum specimens were obtained from patients undergoing a female to male sex conversion at different stages of the conversion process, i.e. at the start, after prolonged administration of androgens, but prior to surgical intervention, and during androgen administration after surgical intervention. The study subjects refrained from sexual activity. PSA was measured with immunoassays from Abbott (IMx); Boehringer Mannheim (ES-600), DPC (Immuline 3rd Generation) and Hybritech (Tandem-R) according to the instructions of the manufacturers. For statistical comparison, 0.5 times the lower detection limit was substituted for values reading below the detection limit. Serum testosterone was measured by radioimmunoassay following extraction to verify androgen use.

The results are given in table 1 as means±SD. Testosterone is expressed in nmol/l; PSA in ng/ml. The two androgen treated groups were combined since there were no differences between them.

The concentration of PSA in female serum is largely dependent on the method used. Apparently some methods detect immunoreactivity not seen in others. The identity of the interfering substance(s) which might be other members of the HGK family remains to be established. A statistically highly significant increase during androgen treatment was only observed with the DPC IMMULITE 3rd Generation method, which is the most sensitive of the methods used. It is concluded that extraprostatic PSA contributes to circulating PSA only to a very limited extent, and that its concentration is stimulated by androgens.

1. Graves HCB. Clin Chem 1995; 41: 7-9.

Table 1

	Pretreatment (n=6)	Androgen (n=12)	P*
Testosterone	1.43±0.44	38.1±31.4	0.0001
PSA IMx	0.02±0.01	0.03±0.02	0.18 (NS)
PSA ES-600	0.16±0.14	0.23±0.08	0.38 (NS)
PSA Immuline 3rd	0.003±0.003	0.026±0.016	0.0004
PSA Tandem-R	0.07±0.03	0.08±0.04	0.62 (NS)

*: Mann-Whitney U-test (non-parametri)

24. Preliminary Molecular Biological Characterisation of a PSA Species With a Potential Defect in its ACT Binding Site

M.A. BLANKENSTEIN¹, A. van REMOORTERE¹, J.L.P. van DUIJNHOFEN² and J.L.J.M. TEEPEN³

Endocrine Laboratory, Academic Hospital Utrecht¹ and Centralized Department of Hematology and Clinical Chemistry² and Pathology³, Elisabeth Hospital, Tilburg

A patient has been identified whose serum PSA failed to be recognized in some assays whereas it was readily detected in others (1). Based on characterisation of this patient's PSA at the protein level and the very high proportion of free PSA detected, it was hypothesized that this particular PSA species is hampered in the formation of complexes with α 1-antichymotrypsin (ACT) because of a mutation in the PSA molecule. To test this hypothesis, a method was devised to isolate mRNA from archival paraffin material, the only material left of this patient. The mRNA was reverse transcribed and the resulting cDNA was amplified with three partially overlapping primer sets, spanning the entire nucleotide sequence of the 5 exons of the 237 amino acid PSA molecule, including non-coding leader and trailer sequences. For comparative purposes the transplantable human prostate carcinoma line PC-82 (Courtesy Dr. G.J. van Steenbrugge, Department of Urology, Erasmus University Rotterdam) which is known to synthesize PSA was used.

Preliminary results indicate that: 1. for the PC-82 tumour line

the entire cDNA has been sequenced and the sequence is identical to the published PSA sequence. This validates the methodology used. 2. For the patient's PSA, initial attention has focussed on exon 3, since the coding sequence for the ACT binding site resides in this exon. To date the nucleotides encoding amino acids 75-164, representing approximately one third of exon 3 and a small part of exon 4 have been cloned and sequenced. In addition to the wild type PSA sequence, a product missing 123 nucleotides has been found. The predicted protein encoded by this sequence would miss amino acids 94-134. The deletion would not affect the reading frame. It is tentatively concluded that apart from the wild type PSA in this patient indeed a mutated PSA molecule prevails.

References

1. Van Duijnhoven JLP, Péquériau NCV, Zon JPHM van, Blankenstein MA. Clin Chem 1996; 42: In Press; see also Abstract in this issue.

25. Totaal-PSA of vrij/totaal PSA bij de opsporing van prostaatcancer?

B.G. BLIJENBERG¹, C.H. BANGMA², R. KRANSE² en F.H. SCHRODER²

Afdeling Klinische Chemie¹ en Afdeling Urologie², Academisch Ziekenhuis Rotterdam

Midden 1994 startte in Rotterdam het gerandomiseerde onderzoek naar de vroege opsporing van prostaatcancer, als onderdeel van een grotere Europese studie, na een voorbereidende fase van ruim 2 jaar. De leeftijdsgroep van de te onderzoeken mannen is 55-74 jaar.

Ingangscriteria voor een nader biopsie-onderzoek zijn: PSA \geq 4 μ g/l, afwijkingen bij een rectaal onderzoek en afwijkingen bij een echoscopisch onderzoek.

In een beperkt deel van de serummonsters van de sinds het begin van de studie onderzochte mannen is in 1995, retro- en

prospectief, nagegaan wat de waarde zou kunnen zijn van de op dat moment ter beschikking komende mogelijkheid om de ratio vrij/totaal PSA te bepalen.

Gebruik gemaakt werd van de Wallac ProstatuTM Free/Total PSA methode die gebaseerd is op het Delfia[®] fluorimetrische meetprincipe waarbij in dit geval aan verschillende antilichamen gebonden Eu- en Sm-chelaten gemeten worden. In eerste instantie werd de methode, die op het moment van de studie commercieel nog niet verkrijgbaar was, onderworpen aan een beperkte analytische evaluatie.

Vergelijking van de ProstatuTM Total PSA bepaling met de bepalingen m.b.v. de Abbott IMx, de Hybritech Tandem-E en de Boehringer ES-600 leverde uitstekende correlaties op zowel met monsters van klinische patiënten als met sera afkomstig uit de screeningsstudie.

In een collectief van 1729 mannen uit de screeningsstudie werden er 308 geselecteerd voor een biopsie op grond van de genoemde criteria. De grootste bijdrage werd geleverd op basis van de bepaling van totaal-PSA (PSA alleen, n = 126). Hierin werden 67 kankerpatiënten gevonden.

De mediane waarde van de vrij/totaal ratio voor de groep benigne mannen (n = 1659) bedroeg 0,28 en verschilde significant van de kankergroep (n = 67) waarvoor 0,12 gevonden werd.

ROC-curve analyse op de biopsiegroep leverde echter geen significante verbetering op voor de vrij/totaal bepaling. Een nadere analyse zal volgen na uitbreiding van deze t.o.v. de totaal-PSA-bepaling, mogelijk door de beperkte omvang van de kankergroep. Tevens zal dan de eventuele rol van de bepaling als biopsie-indicator bestudeerd worden.

26. Detectie van tumorcellen in lymfeklieren en perifeer bloed met behulp van Reverse-Transcriptase PCR (RT-PCR)

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

Klinisch Chemisch Laboratorium Medisch Spectrum Twente, Enschede

De detectie van tumorcellen met de RT-PCR, een moleculair biologische techniek, laat zowel een hogere sensitiviteit als specificiteit zien dan de gebruikelijke immunohistochemische methodes.

Wij hebben deze detectietechniek opgezet voor het aantonen van tumorcellen afkomstig van het mamma- of het prostaatcarcinoom, de meest voorkomende maligniteit bij resp. vrouwen en mannen. De assays zijn ontwikkeld voor de meting van cytokeratine-19 en mucine-1 expressie als tumormarkers voor het mammacarcinoom en PSA (prostaat specifiek antigeen) voor het prostaatcarcinoom. Als controles zijn positieve cellijnen gebruikt.

Totaal RNA is geïsoleerd met de RNAzolB kit. Na RNA isolatie wordt het instabiele RNA omgezet naar het stabiele copyDNA met behulp van hexanucleotides en reverse-transcriptase. Vervolgens worden de specifieke tumormarker sequenties geamplificeerd. De detectie van de PCR-producten vindt plaats op een agarose gel en wordt bevestigd door middel van restrictie-analyse.

Om de sensitiviteit en de specificiteit van de RT-PCR assays vast te stellen werd deze methode vergeleken met immunohistochemische technieken en immunologische bepaling van de eiwitten PSA, CYFRA 21.1 (oplosbare fragment van cytokeratine-19) en mucine-1 (CA 15.3 assay). Tevens zijn er verdunningsexperimenten van positieve- en negatieve cellen ingezet.

De assay om de expressie van PSA te detecteren is geoptimaliseerd in positieve cellijnen. De meting van mucine-1 expressie in patiëntenmateriaal gaf de volgende resultaten: vijf patiënten met een primair carcinoom laten allen een zeer sterk positief signaal zien. Als negatieve groep is gebruik gemaakt van lymfeklieren, verkregen via autopsie, van mannelijke patiënten (5/5 negatief) en mammaweefsel van 10 vrouwen na mamma-reductie (5/10 negatief, 5/10 zwak positief). Deze heterogeniteit is bevestigd door immunohistochemisch onderzoek in de literatuur.

Of de vermeende hogere sensitiviteit van deze assays consequenties heeft voor diagnose en behandeling van de patiënt zal de toekomst uitwijzen.

27. Study on the stability of free PSA in sera

F.A.L. van der HORST¹, N.P.H. van ADRICHEM², A. BUITENHUIS¹ and I. STOEVELAAR¹

Dept. Clinical chemistry¹ and Dept. Urology², Eemland Hospital, Amersfoort, the Netherlands

Recent studies demonstrate the diagnostic advantage of the use of the ratio between the free fraction of prostate specific antigen (fPSA) and the total measurable PSA concentration (tPSA), e.g. fPSA and PSA complexed to α 1-antichymotrypsin (ACT-PSA), for the differentiation of prostate cancer (CAP) and benign disease. Other factors than the type of disease that could influence the fPSA/tPSA ratio would negatively affect the diagnostic value of the fPSA/tPSA ratio. We observed that after ejaculation, the fPSA/tPSA ratio could increase up to 30 %, which could cause false negative results. Also, in up to appr. 5% of randomly taken blood samples it was observed that, in contrast to the tPSA, the fPSA concentration significantly decreased (e.g. > 10%) during storage at 20 or 4°C for less than 48 hours. This could cause false positive results. Here the influence are studied of sample handling after venapuncture on the concentrations and of storage conditions on the stability of the PSA species. Using the IMMULITE free and total PSA assays (D.P.C., Los Angeles, CA), the type of sampling tube (n=10; plain, gel, heparin) affected neither the

measured concentrations nor the degree of stability of the PSA species at 4 and 20°C up to 72 hours. Up to 2 hours, the time of cloth separation from serum (n=5) did not influence the tPSA and fPSA. Samples stored at -20°C were stable for at least 1 month. Prior storage (n=10) at -20°C did not influence the degree of stability of the PSA species. Freezing-thawing cycles (n=5) did not affect the measured concentrations of the PSA species. Type of disease (e.g. CAP and benign hyperplasia of the prostate) was not related to the degree of stability of fPSA in samples. Therefore, the degree of stability was inherent to the sample composition. Predominantly the fPSA decreased during storage and not the tPSA. This could be due to an in vitro conversion of fPSA to ACT-PSA or to the deterioration of the epitopes specific for fPSA. Modulation of the in vitro conversion by adding chymotrypsin and ACT, did not yield conclusive results. Though the mechanism of instability of the fPSA is not clear yet, we advise to measure free PSA within 1 day or otherwise store the samples at -20°C prior to analysis.

28. Value of TPS measurements in clinically progressive prostate cancer patients

A.A.J. van LANDEGHEM¹, J.L.P. v. DUIJNHOFEN¹, P. de BROUWER² and P.J.M. KIL³

Dept. of Clinical Chemistry and Hematology¹, St. Elisabeth Hospital, Tilburg; Dr. B. Verbeeten Institute², Tilburg, Dept. of Urology³, St. Elisabeth Hospital, Tilburg

Introduction: TPS (Tissue Polypeptide Specific Antigen) is a cytokeratin-18 associated proliferation marker. It is associated with progressive tumor growth in contrast to PSA which is a tumor volume marker. Since PSA does not always correlate with progression of prostate cancer (PC), this study deals with the value of TPS measurements in recognizing clinically progressive PC.

Methods: In 100 PC patients at least 5 serial measurements were made of simultaneous PSA and TPS values. Clinical progression was defined depending on performance status, pain score, new hot spots on bone scan or new soft tissue lesions. At presentation 49 patients had metastatic disease, 13 had locally advanced disease and 38 had localized PC.

Results: No correlation was present between PSA and TPS

values, indicating the different origin of both markers. At time of presentation patients with M+ disease had significantly higher TPS and PSA values as compared with the M- patients. In the group of clinically progressive M+ patients (n=21) mean TPS values were significantly higher (378 ± 358) as compared with the stable metastatic patients (63 ± 18). During the follow-up period no differentiation could be made between the other 2 patient groups.

Conclusion: Serial TPS measurements are valuable in recognizing clinically progressive M+ prostate cancer patients after hormonal treatment. It may be of additional value in PSA negative patients or during chemotherapy.

M+: metastatic disease; M-: no metastatic disease

29. Mutatie-detectie in de (vroeg)diagnostiek van carcinomen: mogelijkheden en beperkingen geïllustreerd aan de hand van recente ontwikkelingen

C. van de WATER¹, D.W. SWINKELS² en A. STURK¹

Afdeling Klinische Chemie, Academisch Ziekenhuis Leiden¹ en Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis St. Radboud, Nijmegen²

Dankzij recente ontwikkelingen in de moleculaire biologie neemt het inzicht in de pathogenese en carcinogenese van tumoren in snel tempo toe. Mutaties in proto-oncogenen en tumorsuppressoren leveren een belangrijke bijdrage aan maligne transformaties. Doordat nieuwe ontwikkelingen in de PCR technologie het mogelijk hebben gemaakt om mutaties te detecteren in matrices die voor een groot percentage uit "normale" cellen bestaan, behoort mutatie-detectie in matrices zoals urine, faeces en sputum nu tot de mogelijkheden. Dit betekent dat gescreend kan worden op materiaal dat via eenvoudige, niet-invasieve methoden is verkregen, hetgeen met name interessant is in het kader van vroegdiagnostiek van carcinomen. De perspectieven die mutaties bieden als tumormarker in de vroegdiagnostiek van carcinomen zullen met name bepaald worden door de sensitiviteit en specificiteit van de detectie.

De sensitiviteit wordt mede bepaald door:

- (i) de efficiëntie waarmee "shedding" van tumorcellen in de te onderzoeken matrix (urine, faeces, sputum) optreedt; deze wordt ondermeer bepaald door de lokalisatie van de tumor ten opzichte van de betreffende excreten/secreten.
- (ii) de incidentie van de betreffende mutatie in de primaire

tumor; in veel gevallen zal een hoge sensitiviteit alleen kunnen worden bereikt als meerdere mutaties in de screening worden betrokken.

(iii) het tijdstip in de carcinogenese waarop de betreffende mutatie ontstaat; alleen "vroeg" mutaties kunnen gebruikt worden in de vroegdiagnostiek.

(iv) de efficiëntie waarmee DNA kan worden geïsoleerd uit het betreffende excreet/secret.

De specificiteit wordt bepaald door de incidentie van het voorkomen van de betreffende mutatie in "normale" populaties en in andere typen tumoren. De literatuur geeft aan dat er in de meeste gevallen geen sprake is van tumor-specifieke maar eerder van tumor-gerelateerde mutaties. Echter, door meer mutaties in de screening te betrekken worden mutatie-spectra verkregen die een veel hogere tumorspecificiteit bezitten. Uiteraard heeft dit wel een meer complexe detectieprocedure tot gevolg. Over de incidentie van mutaties in "normale" populaties is tot dusver erg weinig bekend.

In de huidige presentatie zullen de recente ontwikkelingen alsmede de beperkingen en voorwaarden die verbonden zijn aan mutatie-detectie in de (vroeg)diagnostiek van carcinomen worden gepresenteerd.

30. Serum CYFRA 21-1 spiegels in niet-kleincellige longcarcinomen in relatie tot het biologisch gedrag van de tumor

H.G. IJNTEMA¹, H.J. SMIT², L.L.J. van der MAAS², F.M.F.G. OLTHUIS¹, C. HAANEN¹, M. HAVENITH³ en I. VERMES¹

Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Afd. Longziekten², Medisch Spectrum Twente, Enschede, Streeklaboratorium voor de Pathologie³, Enschede

CYFRA 21-1, een immunoradiometrische assay waarmee fragmenten van cytokeratine 19 (ck19) aangetoond worden (CIS bio international), is een nieuwe tumormarker voor niet-kleincellige longcarcinomen (NSCLC). CYFRA spiegels werden gemeten in serum van 26 patiënten met een longaandoening en een controle groep van 7 patiënten met een ovariumcarcinoom. De groep longpatiënten betrof 17 NSCLC, 3 kleincellige carcinomen (SCLC), 1 longmetastase van een leiomyosarcoom en 5 niet-maligne longaandoeningen. De test bleek niet specifiek voor NSCLC, aangezien verhoogde serum CYFRA spiegels

werden aangetroffen in 2 van de 3 SCLC en bij 2 chronisch obstructieve longaandoeningen. Bovendien bleek een patiënte met een ovariumcarcinoom een sterk verhoogd serum CYFRA niveau te hebben, waaruit blijkt dat ook bij andere dan longcarcinomen fragmenten van ck19 in de bloedbaan terecht komen. De test bleek echter wel bruikbaar om de longitudinale follow up van patiënten met een plaveiselcelcarcinoom te vervolgen. Bij 3 patiënten is zowel voor als na resectie van de tumor de serum CYFRA-spiegel bepaald. In al deze gevallen bleek een normalisering van het CYFRA niveau op te treden.

Het CYFRA niveau vóór de operatie is sterk patiënt-gebonden. Mogelijk hangt dit samen met verschillen in het biologische gedrag van de tumor. Om dit nader te onderzoeken wordt thans de groeikinetiek van de tumorcellen bepaald door *in vivo* labeling met iododeoxyuridine (IdU), dat tijdens de S-fase van de celcyclus in het DNA wordt ingebouwd. Met behulp van een monoklonaal antilichaam tegen IdU kan informatie verkregen worden over het percentage cellen in de S-fase (Labeling Index) en kan de potentiële tumorverdubbelingstijd (Tpot) als maat voor de proliferatiesnelheid berekend worden.

In een gelimiteerd aantal patiënten is een goede correlatie gemeten tussen de serum CYFRA-spiegel en groeisnelheid van de tumor. Er kan geconcludeerd worden dat er meer informatie verkregen kan worden over NSCLC wanneer de metingen aan *in vitro* en *ex vivo* parameters aan elkaar gekoppeld worden.

Hematologie

31. Routinematige detectie van IgH herschikkingen ter ondersteuning van B-cel lymfoom diagnose

L.A.P. BALLERING¹, F.A.J.T.M. van de BERGH¹ en J. van BAARLEN²

Klinisch Chemisch Laboratorium, Medisch Spectrum Twente, Enschede¹ en Streeklaboratorium voor de Pathologie, Enschede²

Maligne B-cel lymfomen kunnen met conventionele histologische beoordeling, zelfs met additionele hulp van immunohistochemie, moeilijk te onderscheiden zijn van goedaardige en/of reactieve (ontstekings-) processen. Op moleculair niveau onderscheiden de maligne B-cel lymfomen zich echter door een klonale herschikking van het immunoglobuline zware keten (IgH) gen. Gedurende de herschikking worden de Variabele (V), Diversity (D) en Joining (J) regio's dicht bij elkaar gebracht en samengevoegd. Dit gebeurt vroeg in de ontwikkeling van de B-cel en kan daardoor worden gebruikt als een unieke tumormarker. In tegenstelling tot de arbeidsintensieve Southern Blot techniek, kan de recent ontwikkelde PCR-techniek IgH herschikkingen detecteren in DNA van bipten, al dan niet formaline gefixeerd en/of in paraffine ingebed.

In ons laboratorium is een PCR-test opgezet om een panel van 10 verschillende B-cel lymfomen (30 histologisch en immunohistologisch goed gedefinieerde paraffine-ingebode weefsel monsters) te screenen op een klonale populatie van herschikte

IgH genen. Onze test maakt gebruik van vier verschillende PCR-primerparen (twee complementair aan de V- en twee complementair aan de J-regio). Als negatieve controle werden 25 goedaardige en/of reactieve lymfeklieren en vier tonsillectomie monsters.

Met combinaties van deze primers kon in 67% (20/30) van de maligne B-cel lymfomen een klonale IgH herschikking worden aangetoond. Er werden geen vals-positieve resultaten verkregen. Met verdunningsexperimenten kon een maligne celpopulatie van 10% nog worden gedetecteerd.

Hoewel de gevoeligheid van de PCR-test lager is dan de "gouden standaard" het Southern Blotten, is het toch, door zijn bredere toepasbaarheid een belangrijk hulpmiddel ter assistentie van de diagnose van B-cel lymfomen. De totale gevoeligheid van de test werd belangrijk gedrukt door het feit dat maar in 40% van de centoblastische B-cel lymfomen een klonale IgH herschikking kon worden aangetoond.

32. IgG subklassen: een analytische evaluatie

J.W. JANSSEN, J. van OORD en M. JANSZ

Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium, Sint Franciscus Gasthuis, Rotterdam

Wij hebben de human IgG subclass kit van The Binding Site (TBS) (Birmingham, Engeland, lotnr. 6865) en de human IgG subclass nephelometry kit van het CLB (Amsterdam, Nederland, lotnr. 16820102) nader analytisch onderzocht. Het Array protein system (Beckman instruments Mijdrecht) is gebruikt als nefelometer om de bepalingen uit te voeren. QC sera van "oude" immunoenquêtes (n=22) en van "oude" IgG subclass quality surveys (n=12) zijn ter beschikking gesteld door respectievelijk het SKZL (Nijmegen) en het CLB (Amsterdam).

Van beide kits zijn meerdere kalibratielijnen (n=5) op verschillende dagen bepaald. De VCn van de TBS standaarden zijn lager en gelijkmatiger (range 1,8-8,5%) in vergelijking met de VCn (range 0,4-44%) van de CLB standaarden. Bij de CLB kit werden bij lage concentraties zeer hoge VCn gevonden (13-44%). Voor IgG1, IgG3 en IgG4 is de kalibratielijne van de TBS kit vergeleken met die van de CLB kit steiler (i.e. hogere ratewaarden worden gevonden bij dezelfde eiwitconcentraties). Voor de IgG2 kalibratielijne verschillen de ratewaarden van standaard 1 (0,5 g/l) en standaard 2 (0,9 g/l) niet significant.

De SKZL consensuswaarde is vergeleken met de uitslag verkregen met respectievelijk de TBS kit (y) en de CLB kit (y). Hiervoor is de orthogonale regressieanalyse, $y=ax+b$, n=22 toegepast. Goede correlatie wordt gevonden voor IgG1 en IgG2. Voor IgG3 worden met de TBS kit hogere waarden en met de CLB kit lagere waarden in vergelijking met de consen-

sus waarde gevonden. Voor IgG4 is dit net andersom: De TBS kit geeft lagere uitslagen en de CLB kit hogere uitslagen t.o.v. de consensuswaarde. De resultaten van beide kits gevonden met de quality survey sera van het CLB tonen ook deze genoemde verschillen t.o.v. de CLB consensuswaarde.

Prijzen worden vooral door lokale afspraken bepaald. Op basis van listprijzen blijkt de prijs van de CLB kit gerekend per patiëntenuitslag tweemaal de prijs van de TBS kit te zijn.

Conclusie: De stabielere en meer gevoelige kalibratielijne, de lage interassay variatiecoëfficiënt en de gunstiger kostprijs vallen in het voordeel van de subklassen IgG bepaling met de TBS kit uit.

Tabel 1. Interassay reproduceerbaarheid

	TBS Controle serum			CLB Controle serum		
	Range TBS (g/l)	X SFG (g/l)	VC (%)	Range CLB (g/l)	X SFG (g/l)	VC (%)
n=5						
IgG1	6,33 - 8,37	7,34	2,5	3,70 - 5,00	4,83	9,1
IgG2	3,73 - 4,93	4,23	1,3	2,01 - 2,73	2,64	9,7
IgG3	0,694 - 0,918	0,837	1,9	0,252 - 0,340	0,307	5,3
IgG4	0,388 - 0,513	0,477	0,9	0,355 - 0,481	0,462	8,9

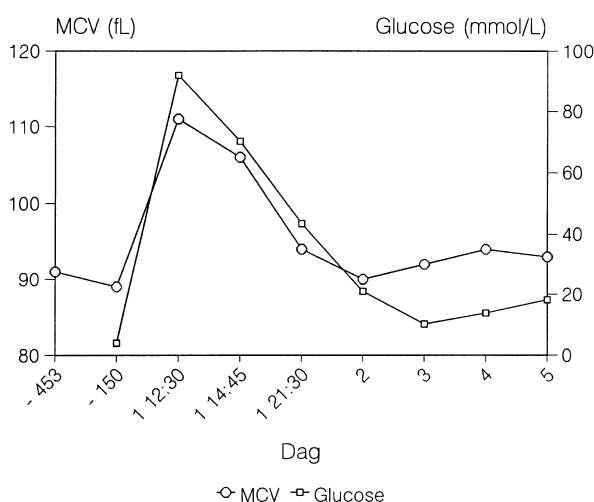
33. Invloed van hyperglycemie op de bepaling van het MCV

J.L.P. van DUIJNHOFEN en M. TRESKES

Centraal Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium (CKCHL), St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg

Naar aanleiding van een discrepantie tussen opeenvolgende MCV (gemiddelde erythrocyt volume) uitslagen van een patiënt met diabetische ketoacidose werd een interferentie van hyperglycemie op de bepaling van het MCV met behulp van de Technicon H1/H2 hematologie-analyser geconstateerd (zie figuur). Dit fenomeen werd ook waargenomen nadat in vitro glucose werd toegevoegd aan bloedmonsters. Verder onderzoek toonde aan dat de Technicon H analysers gevoeliger zijn voor deze interferentie dan de Coulter T660 ($p < 0.01$). Verschil in incubatietijd en de samenstelling van de verdunningsvloeistoffen zijn hierbij mogelijk van invloed. De resultaten die werden verkregen gedurende de drie opeenvolgende meetintervallen van Coulter T660 lieten zien dat gedurende de incubatietijd het verhoogde MCV afneemt ($p < 0.05$). De invloed van de aanwezigheid van glutaraaldehyde als fixatief in RBC-diluent op de MCV verhoging is bestudeerd. Na 20 seconden incuberen (analoog aan Technicon H1) werd na aanbieden van het monster door middel van direct cytometrie zowel bij gebruik van RBC diluent als PBS-Natriumdodecylsulfataat (SDS) een vergelijkbaar MCV gevonden. Na langduriger incuberen in deze vloeistoffen nam het gemeten MCV bij gebruik van PBS-SDS sterker af dan bij RBC-diluent. Bij aanbieden van PBS-SDS of RBC-diluent op de gebruikelijke wijze werden vergelijkbare MCV uitslagen verkregen. Ook de invloed van SDS is onderzocht. Indien aan Coulter Isoton III SDS werd toegevoegd in een concentratie zoals ook gebruikt in Technicon RBC-diluent, was de procentuele verhoging van MCV gemeten door de Coulter T660 bij toename van de glucose concentratie aanzienlijk groter dan bij gebruik van Isoton III ($p < 0.05$). Het verschil in gevoeligheid van de MCV bepaling voor hyperglycemie kan dus verklaard worden door het

gebruik van SDS in het Technicon RBC diluent en door verschillen in incubatietijd. In geval van ernstige hyperglycemie zijn MCV, MCHC en hematocriet resultaten, verkregen met behulp van elektronische celltellers, onbetrouwbaar. Het is zinvol om op de hoogte te zijn van dit fenomeen om eventuele plotselinge verandering van MCV te kunnen verklaren. Het verdient de voorkeur om in het geval van ernstige hyperglycemie terughoudend te zijn met het rapporteren van MCV, MCHC en hematocriet gemeten met behulp van elektronische celltellers. Hierdoor kan onnodig vervolgonderzoek naar de oorzaak van de macrocytose worden voorkomen.



34. Hemocytometrische parameters in arterieel, veneus en capillair bloed

H.J.M. SALDEN¹, J.F. MONKELBAAN², E.A.M. VERSCHUUREN² en W.J.A. WIJNANDS²

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Afdeling Longziekten², Deventer Ziekenhuis, Deventer

In onze kliniek is het gebruikelijk dat hemocytometrisch onderzoek bij volwassenen plaats vindt in veneus EDTA-bloed. In sommige situaties wordt hiervan afgeweken, bijvoorbeeld bij aanwezigheid van een arteriële canule. Er is weinig onderzoek verricht naar verschillen in hemocytometrische parameters in veneus, arterieel en capillair bloed.

Doel van dit onderzoek is het intra-individueel en simultaan vergelijken van bovengenoemde parameters. Hiertoe zijn 30 intensive care patiënten en 30 gezonde vrijwilligers op een gestandaardiseerde manier onderzocht: na 30 minuten rust in liggende houding en door dezelfde onderzoekers. Er zijn veneuze (EDTA), arteriële (Li-heparine) en capillaire monsters (EDTA) afgenomen. Deze zijn direct na afname geanalyseerd door een hemocytometer (Sysmex NE-8000). Het hemoglobine (Hb), de hematocriet (Ht), het aantal erythrocyten (RBC), leucocyten (WBC) en bloedplaatjes (Plt) in arterieel en capillair bloed zijn per proefpersoon vergeleken met de veneuze waarden en getoetst ten opzichte van elkaar met de gepaarde Student T-toets. Waarden worden significant verschillend beschouwd bij $p < 0,05$.

Het hemoglobine bepaald in arterieel en capillair bloed bij dezelfde persoon is significant hoger dan in veneus bloed (zie tabel). Dit verschil is het grootst voor capillair bloed. De arteriële hematocriet is lager dan de veneuze. De arteriële RBC is hoger dan de veneuze waarde. Het arterieel en capillair aantal bloedplaatjes is lager dan het veneus aantal. De capillaire hematocriet, RBC en WBC en de arteriële WBC verschillen niet van de overeenkomstige veneuze waarden (zie tabel 1).

Conclusie: er zijn significante verschillen in het arteriële Hb, Ht, RBC en Plt en het capillaire Hb, en Plt ten opzichte van de overeenkomstige veneuze waarden. In klinische situaties kunnen deze parameters verkregen via verschillende afname technieken niet onderling met elkaar vergeleken worden.

Tabel 1. Vergelijk van hemocytometrische parameters

	gem.	SD	p
Hb veneus	8,03	1,15	–
Hb arterieel	8,11	1,25	< 0,05
Hb capillair	8,60	1,44	< 0,05
Ht veneus	0,378	0,055	–
Ht arterieel	0,375	0,057	< 0,05
Ht capillair	0,394	0,051	0,06
RBC veneus	4,28	0,66	–
RBC arterieel	4,33	0,67	< 0,05
RBC capillair	4,48	0,63	0,098
WBC veneus	8,74	4,70	–
WBC arterieel	8,90	4,83	0,50
WBC capillair	8,64	5,32	0,72
Plt veneus	230	91	–
Plt arterieel	195	78	< 0,05
Plt capillair	208	86	< 0,05

Eenheden: Hb (mmol/l), Ht (l/l), RBC $10^{12}/l$, WBC ($10^9/l$), Plt ($10^9/l$); SD: standaard deviatie, p de p-waarde berekend met de gepaarde T-toets.

35. A limited evaluation of the Sysmex K-4500 haematology analyser and comparison of the three-part leucocyte differential screen of the Sysmex K-4500 and the five-part leucocyte differential screen of the Sysmex NE-8000

S.G.A. KOEHORST, W.E. KLUITENBERG, H.J.M. SALDEN and F.M.J. ZUIJDERHOUDT

Klinisch Chemisch laboratorium, Deventer Ziekenhuis, Deventer

The automated haematology analyser Sysmex K-4500 was compared to the Sysmex NE-8000, the automated analyser which is routinely used in our laboratory. For the comparison of haemocytometric parameters, 250 samples were examined. The results from the two blood cell counters showed good correlation ($r > 0.98$) for the white blood cell count, red blood cell count, platelets, haemoglobin, haematocrit, mean cell volume, neutrophils and lymphocytes.

The NE-8000 white blood cell differentiation is routinely used as leucocyte differential screen to assign a sample abnormal or normal. The screen exists of adjustable numerical data defined by the user (mark limits) and/or morphological flags generated by the analyser. The five-part leucocyte differential screen (NE-8000) is compared to the three-part leucocyte differential

screen (K-4500) by using 550 samples. Of these samples 453 (82.4 %) were either both normal or abnormal as determined by the NE-8000 and K-4500, whereas 97 (17.6%) were not in agreement with each other. These 97 samples were examined by the manual microscopic leucocyte differential count in order to assign these samples as true positive or false positive. Of these 97 samples, 11 samples (2%) were true positive, 77 (14%) were false positive as it was determined by the microscopic leucocyte differential count and 9 samples (1.6%) were positive by borderline differences on mark limits.

We conclude that the five-part, and three-part leucocyte differential screen of these Sysmex analysers were almost equal and can both be used in order to assign a sample normal or abnormal for the leucocyte differential count.

36. A novel mutation in the human red cell type pyruvate kinase gene causing hereditary nonspherocytic hemolytic anemia

W.W. van SOLINGE¹, F.C. NIELSEN², R. van WIJK¹, G. BRUUN-PETERSEN³, B. WILTON-DJERNES⁴, R.J. KRAAIJENHAGEN¹ and G. RIJKSEN⁵

Clinical Laboratory, Eemland Hospital, Amersfoort, the Netherlands¹, University Department of Clinical Biochemistry, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark², Department of Clinical Genetics, Vejle Hospital, Vejle, Denmark³, Department of Pediatrics, Esbjerg Central Hospital, Esbjerg, Denmark⁴ and Unit of Medical Enzymology, Academic Hospital Utrecht, the Netherlands⁵

Background: Pyruvate kinase (PK) deficiency causes nonspherocytic hemolytic anemia. Since measurement of enzyme activity alone does not distinguish between normal, heterozygous, homozygous or compound heterozygous patients, we have examined PK-deficiency at the DNA and RNA-levels.

Patients and Methods: The proband is a severely PK-deficient boy of eleven years old. After his mother was divorced and remarried, she and her new husband had a baby, who died at the age of six weeks of PK-deficiency. DNA of the deceased baby was isolated from paraffin embedded liver sections. All other DNA was isolated from full blood. Extra-Long PCR (XL-PCR), nested-PCR, Reverse Transcription PCR (RT-PCR) and DNA-sequencing was used to detect mutations in the PKLR gene and RNA.

Results: The proband was found to be a compound heterozygote and exhibited a novel G1091/A mutation in exon 8 (PK-Tjaereborg) and a second mutation was detected at nucleotide 1529 on the other allele. PK activity was 1.3 U/gHb (reference range 8.4-14.4 U/gHb). The 1529 mutation was detected in his father (PK-activity 5.0 U/gHb), while the 1091

mutation was present in the mother. (PK-activity 6.0 U/gHb). Analysis of the PKLR gene of the second husband revealed the PK-Tjaereborg mutation on one allele. His PK-activity was 6.4 U/gHb. The deceased baby was homozygous for the PK-Tjaereborg mutation. The mutations were also detected in PK-RNA of proband and parents.

Conclusions: A novel mutation (PK-Tjaereborg) in the PKLR gene was identified. When present in the heterozygous form the mutation causes a mild PK-deficiency. The effect of this mutation in the homozygous form is severe, since the patient died of hemolytic anemia shortly after birth. Mutant-RNA was detected in reticulocytes, indicating transcription of the mutant alleles. The 1091 G/A mutation results in the substitution of a conserved glycine by an aspartate. Configuring this substitution by computer analysis on a three-dimensional model of a human red cell PK, indicates a possible effect on the C-domain of this enzyme. This is likely to affect the tetramerization of the protein. Co-inheritance of PK-Tjaereborg with the 1529 mutation results in severe PK-deficiency.

37. Komt Hemolytische Anemie voor bij een Familie met Fish Eye Disease?

E. van VOORST tot VOORST¹, J.A. KUIVENHOVEN², C.J.A. DOELMAN³ en K. MIEDEMA¹

Laboratorium Ziekenhuis De Weezenlanden¹, Zwolle; Afdeling voor Hemostase, Thrombose, Atherosclerose en Ontstekingsonderzoek, A.M.C², Amsterdam; Laboratorium, Streekziekenhuis Koningin Beatrix³, Winterswijk

In een groot gezin van elf kinderen werd bij twee broers en twee zusters fish eye disease (troebeling van de cornea) geconstateerd. Deze vier gezinsleden zijn homozygoot en de zeven andere leden heterozygoot voor de missense mutatie in het lecithine:cholesterol acyltransferase (LCAT) gen, welke resulteert in een Asp¹³¹-Asn (N131D) vervanging (1). Deze mutatie leidt o.a. tot een verlies van LCAT activiteit, een verlaging van HDL-cholesterol en van Apo A-1.

Het voorkomen van hemolytische anemie bij LCAT deficiëntie is in de literatuur beschreven (2). De reden hiervan is een andere samenstelling (minder cholesterol-esters) van de erythrocyten membranen. Bij dit gezin is daarom onderzocht of

er aanwijzingen zijn voor hemolytische anemie. Hiervoor werden de hemoglobine concentratie (Hb), het aantal reticulocyten (R), de totaal bilirubine concentratie (TB), de aangezuurde glycerol lysis test (AGLT) en de microscopische beoordeling van de rode bloed cel morfologie bepaald bij de vier homozygoten, de zeven heterozygoten en de tien echtgenoten (controles).

Bij de homozygoten werden een iets lager Hb en een iets hoger R en TB gevonden dan bij de heterozygoten en controles. De AGLT was bij alle personen normaal. Bij het beoordelen van de rode bloed cel morfologie m.b.v. de microscoop werd een gering maar noemenswaardig aantal schietschijf-

cellen, echinocyten en/of stomatocyten bij de homozygoten gezien.

Concluderend kan gesteld worden dat er een geringe aanwijzing is voor hemolytische anemie bij deze vier homozygoten en er nader onderzoek van de samenstelling van de erythrocyten membranen gewenst is.

38. Identification of a novel mutation (PK-Dordrecht) and a novel polymorphism in the human red cell type pyruvate kinase gene

W.W. van SOLINGE¹, R. van WIJK¹, R.J. KRAAIJENHAGEN¹, G. RIJKSEN² and F. NIELSEN³

Clinical Laboratory, Eemland Hospital, Amersfoort, the Netherlands¹; Laboratory of Medical Enzymology, Department of Hematology, University Hospital, Utrecht, the Netherlands² and University Department of Clinical Biochemistry, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark³

Background: Mutations in the liver (L) and red cell (R) type pyruvate kinase gene are associated with pyruvate kinase deficiency, a disorder causing hereditary nonspherocytic hemolytic anemia. The classical laboratory diagnosis is made by measuring enzyme activity, but numerous factors may complicate a correct interpretation of the results. Therefore, molecular diagnostics may provide a solution to these problems.

Methods: The proband is a severely PK-deficient girl of six months old. We isolated DNA from full blood of the proband and her parents. Extra-Long PCR (XL-PCR), nested-PCR and DNA-sequencing were used to detect mutations in the PKLR gene.

Results: A novel mutation (PK-Dordrecht) in the PKLR gene of the proband was detected in codon 310, nucleotide 929 (T/A). The same mutation was detected in her mother. A C/T

Literatuur

1. J Clin Invest. 1995; 96: 2783-2791.
2. Lipid Metabolism Disorders and Coronary Heart Disease: primary prevention, diagnosis and therapy guidelines for general practice / G. Assmann (ed.) 2, enl ed. 1993.

polymorphic site was identified in exon 12, at nucleotide position 1738 (13 nucleotides downstream of the termination codon). Estimated from 100 chromosomes of unrelated individuals, the allelic frequency was as follows:

Frequency C-alleles: 0.26

Frequency T-alleles: 0.74

Observed homozygosity for C/C: 0.04

Observed heterozygosity for C/T: 0.43

Observed homozygosity for T/T: 0.53

Conclusions: A novel mutation in the PKLR gene (PK-Dordrecht) has been identified. In addition, we found a new polymorphic site in this gene. This novel polymorphic site will be useful for molecular diagnosis of pyruvate kinase deficiency via linkage analysis.

39. Prenatale diagnostiek van het Kell-bloedgroepsysteem

C. van de WATER¹ and M.S. HARVEY²

Afdeling Klinische Chemie¹ en Immunohematologie en Bloedbank², Academisch Ziekenhuis, Leiden

Bloedgroepantagonisme, veroorzaakt door maternale immuunantistoffen gericht tegen Rhesus(D) en/of andere bloedgroepantigenen, kan leiden tot hemolytische ziekte van de foetus. In Nederland is in ongeveer 5-10% van de gevallen sprake van antagonisme veroorzaakt door anti-Kell (K₁). Vaak leidt met name Kell-antagonisme tot ernstige hemolyse of zelfs intra-uteriene vruchtdood. Vroegdiagnostiek van de Kell-status van de foetus (bij 14-16 weken) van een moeder bekend met anti-Kell is van belang vanwege:

(i) de frequentie van gynaecologische controle gedurende de zwangerschap;

(ii) eventuele doorverwijzing naar een specialistisch centrum;

(iii) planning van de regelmatig te verrichten invasieve onderzoeken in geval van Kell-positiviteit, bijvoorbeeld onderzoek op hyperbilirubinemie in amnionvocht met behulp van de 'Liley' methode;

(iv) eventuele inplanning van een serie intra-uteriene transfusies met Kell-negatieve erythrocyten vanaf 24-26 weken.

De structuur van de Kell bloedgroepantigenen Kell (K₁) en cellano (K₂) en de bijbehorende cDNA sequenties zijn volledig opgehelderd (1). Hieruit blijkt dat er slechts één-nucleotide

verschil is tussen K₁ en K₂. Deze puntmutatie is gelokaliseerd in exon 6 en betreft een C → T base substitutie, hetgeen resulteert in een threonine → methionine verandering van aminozuurresidue 193 bij het K₁-antigeen. De C → T base substitutie bij K₁ leidt tevens tot de introductie van een restrictieplaats voor het restrictie-enzym Bsm-1 endonucleotidase. In de onlangs beschreven PCR-techniek (2) wordt daarom na amplificatie van een deel van exon 5 en 6 een incubatie met het genoemde restrictie-enzym uitgevoerd. De ongeknijpte DNA producten die ontstaan in geval van Kell-negativiteit (740 bp band) en de geknijpte DNA-fragmenten in geval van Kell-positiviteit (540 bp + 200 bp band) kunnen elektroforetisch worden gescheiden.

Deze poster beschrijft het opzetten en gebruik van dit systeem op DNA geëxtraheerd uit amniocyten van "at-risk" zwangeren.

References

1. Lee S et al. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 6353-6357.
2. Lee S et al. Blood 1995; 85: 912-916.

40. Kan de APTT bepaald met actine, gebruikt worden bij de heparinecontrole ?

M.H. BEUNIS¹, M.J. VEERHOEK², W.J. de WILDE², G.J.F.A. van HARMELEN¹

Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium¹ en Afdeling Cardiologie², Sint Franciscus Gasthuis, Rotterdam

In het SFG wordt reeds jaren het reagens actine gebruikt voor de Activated Partial Tromboplastin Time (APTT) ter controle van de heparinetherapie. Daar in de Relac-enquête actine het meest toegepaste reagens is in Nederland en daar er geen klachten kwamen, werd op het laboratorium aangenomen dat er dus geen reden tot verandering was. Totdat een van de cardiologen (RV) meldde dat in het SFG in vergelijking met een ander ziekenhuis in de regio veel psao-bloedingen voorkwamen bij patiënten die met heparine werden behandeld.

Naar aanleiding van deze melding werd in samenwerking met de verpleging de APTT-controle van cardiologie-patiënten met 3 reagentia bepaald, Actine (Dade), Platelin LS (Organon) en later Actin FSL (Dade). Tevens werd de toegediende hoeveelheid heparine genoteerd. Uit deze vergelijking bleek dat de APTT-ratio's (APTT patiënt / APTT normaal) verkregen met Platelin en Actine FSL een factor 2 tot 3 maal hoger waren dan die verkregen met actine. Dat betekent dat in monsters van patiënten die waren ingesteld op de APTT-actine (APTT-ratio 2-3), met platelin of actine FSL een APTT-ratio van 5 - 6 wordt gevonden.

Tevens bleek dat een groot aantal patiënten de maximale heparinedosering kregen, nl 40.000 U/24u.

Gealarmeerd door deze resultaten is aan andere klinici gevraagd hoe zij de APTT in het kader van de heparinetherapie interpretererden.

De meesten streefden naar een APTT-ratio van 1,5 - 2,5 en meldden geen problemen. De vraag naar bloedingen werd beantwoord met: dat hoort toch bij het risico.

Enkelen lieten zich desgevraagd kritischer uit: de dosering van heparine bleek hoger dan gewend in andere ziekenhuizen,

soms meer dan 40.000 U per 24 uur; liever een standaard dosering dan vertrouwen op een onbetrouwbare controle. Sinds de heparinetherapie gecontroleerd wordt met de APTT, gaat het slechter!

Het probleem van de verschillende reagentia is in de literatuur reeds lang bekend (1,2). Standaardisatie werd dan ook dringend noodzakelijk geacht, maar is niet mogelijk gebleken. Uit de enquête van de Besselaar (1) en door navraag bij andere gebruikers blijkt dat bij heparinetherapie meestal gestreefd wordt naar een APTT-ratio van 1,5 tot 3, ongeacht het reagens. Dit betekent dat de heparinedosering van ziekenhuis tot ziekenhuis sterk zal verschillen. Een effect wat in het SFG versterkt is door implementatie van doseringsschema's uit de medische literatuur (3) of afkomstig van klinische trials.

Conclusie:

- De APTT bepaald met actine leidt tot een hoge heparinedosering
- Standaardisatie wordt door klinici dringend gewenst. Grote verschillen tussen ziekenhuizen kunnen worden weggenomen door te kiezen voor een heparine-gevoelig reagens.
- Geen bericht is niet altijd goed bericht: klantgerichte instrumenten zijn nodig om het gebruik en interpretatie van laboratoriumtesten eenvoudig te toetsen.

Literatuur

1. Besselaar, AMHP van den, Bertina RM. Tijdschr NVKC 1989; 14: 47-51.
2. Bjornsson TD, Nash PV. Am J Clin Pathol 1986, 86: 199-204.
3. Cruickshank MK, Levine MN, Hirsh J, Roberts R, Siguenza M. Arch Intern Med 1991, 151: 333-337.

41. Routine Immunoassay of Free Protein S Antigen using Monoclonal Antibodies

K.W.H. WODZIG^{1,2}, R. van OERLE² en K. HAMULYAK²

Departments of Clinical Chemistry¹ and Hematology², Academic Hospital Maastricht, the Netherlands

Protein S is an important anticoagulant protein. Patients who suffer from a deficiency of this protein are at risk for a thrombotic event. In plasma protein S is present in two forms: free and bound to C4b. Only the free form is thought to be important in the anticoagulant pathway. Free protein S (131 nmol/l) averaged 38% of total protein S (346 nmol/l) in plasma (Griffin et al., Blood 1992; 79: 3203-11).

Until now, determination of free protein S was performed by preliminary treatment of plasma with polyethylene glycol (PEG) to precipitate the protein S complexed to C4b and subsequent measurement of free protein S in the supernatant using polyclonal antibodies (PEG-assay). The main disadvantage of this method is the requirement of PEG-precipitated plasma which is difficult to standardize and therefore the test is poorly reproducible in most laboratories.

We now report the use of a sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the direct measurement of free protein S in citrated plasma. In this assay we used two monoclonal antibodies (mAbs) specific for distinct epitopes of the free form of protein S, but lacking reactivity with protein S-C4b-BP complexes. Commercially available purified mAb 15C4 and mAb 34G2 were used as capture antibodies. Also a commercially available polyclonal antibody directed to total protein S and conjugated with horseradish peroxidase, was used as detector antibody. This assay (mAb-ELISA) has been

compared with the PEG-assay. In 30 subjects (range of free protein S: 47-138 %), measurement of free protein S concentration with the mAb-ELISA and PEG-assay were of similar magnitude and the correlation between both assays was good ($r=0.91$).

Reproducibility of the mAb-ELISA was also tested by measuring free protein S concentrations of the 100% and 50% standard ($n=24$). For the 100% standard the mean free protein S concentration, standard deviation, standard error of the mean and coefficient of variation were 100.8%, 5.3%, 1.1% and 5.3%, respectively and for the 50% standard 50.1%, 3.5%, 0.71% and 6.9%, respectively.

The correlation between free protein S and total protein S as assessed in 30 subjects by using the PEG-assay was not that good ($r=0.74$), probably due to increased variability resulting from the PEG-precipitation step which is used to separate free protein S from C4b-bound protein S. However, the correlation between free and total protein S as determined by performing the mAb-ELISA was found to be $r=0.91$.

In conclusion, this new mAb-ELISA of free protein S antigen in plasma is an accurate, reproducible and easy to perform assay as no preliminary treatment of plasma is required. Implementation of monoclonal rather than polyclonal antibodies assures the continuous supply of antibodies with known characteristics.

42. De in-vivo activatiestatus van bloedplaatjes, gemeten met behulp van flowcytometrie, bij patiënten met pre-eclampsie en bij gezonde zwangere vrouwen

A. KONIJNENBERG¹, J.A.M. van der POST¹, M.C.L. SCHAAP², O.P. BLEKER¹, K. BOER¹ en A. STURK²

Afdeling Verloskunde¹ Gynaecologie, Academisch Medisch Centrum¹, Amsterdam, Afdeling Klinische Chemie, Academisch Ziekenhuis², Leiden

De pathogenese van pre-eclampsie is nog grotendeels onbekend, maar bloedplaatjes spelen hierbij waarschijnlijk een grote rol en circuleren in geactiveerde toestand bij dit ziektebeeld. Flowcytometrie is momenteel de gevoeligste methode om activatie van bloedplaatjes te detecteren. Monoclonale antilichamen binden aan antigenen op het oppervlak van het bloedplaatje, die zich gedurende de verschillende stadia van bloedplaatjesactivatie presenteren op de plasmamembraan. Bloedplaatjes van 10 pre-eclamptische patiënten (diastolische RR > 90 mmHg en proteinurie > 0,3 g⁻¹.l⁻¹.24h⁻¹) en van 10 gezonde zwangeren met normale bloeddruk werden gelabeld met de volgende antilichamen: Anti-GMP140 (α -granulaire secretie), anti-GP53 (lysosomale secretie), PAC-1 (antistof tegen de fibrinogeenreceptor conformatie van het GPIIb/IIIa-complex), anti- IIa' (PECAM-1) 'platelet endothelial cell adhe-

sion molecule' en annexine V (een eiwit afkomstig van de placenta dat bindt aan negatief geladen fosfolipiden, die op het oppervlak van de plasmamembraan verschijnen bij plaatjesactivatie). We vonden duidelijk significante verschillen in % geactiveerde bloedplaatjes tussen patiënten met pre-eclampsie en gezonde zwangeren voor de expressie van anti-GMP-140 (mediane waarden resp. 4,0 / 0,1, p=0,008), anti-GP53 (mediane waarden resp. 8,0 / 0,3, p=0,03) en anti-IIa' (mediane waarden 10,2 / 1,4, p=0,005). PAC-1 en annexineV expressie lieten geen significante verschillen zien.

In deze studie kon de reeds bekende toegenomen secretie van α - en lysosomale granula worden bevestigd. Uit logistische regressie analyse bleek dat anti-IIa' beide patiëntengroepen het beste kan onderscheiden. Mogelijk is dit dus een goede merker om pre-eclampsie te voorspellen.

43. Eerste ervaringen met de ACL Futura, een stolautomaat van de nieuwe generatie

T. RAMMELOO, H. FRIJTERS, W. VERMUNT, M. GEERTS, C. van WEZEL, H.J. ADRIAANSEN

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Franciscus Ziekenhuis, Roosendaal

De ACL Futura van de firma Instrumentation Laboratory (IL) is een volautomaat voor zowel chromogene als turbidimetrische stolbepalingen, waarmee random-access-, batch- en citoanalyses zijn uit te voeren. Monsteridentificatie vindt plaats d.m.v. een ingenieuze barcodescanner; zowel primaire buizen als cupjes zijn te gebruiken. De Futura heeft 30 reagensposities, waaronder een aantal gekoelde. Het pipetteren van monsters en reagentia geschiedt door twee afzonderlijke pipetteer-eenheden, te vergelijken met het Tecansysteem.

Wij evalueerden de Futura, wat betreft de turbidimetrische bepalingen van de protrombintijd (PT), de APTT en de PT-afgeleide fibrinogeenconcentratie (PT-FIB) met reagentia van de firma IL. Correlaties werden uitgevoerd met een KC10 (fa. Amelung), waarop werden bepaald de Thrombotest (TT; fa. Nycomed), PT (PT-HS; fa IL), APTT (Thrombofax; fa Ortho). De resultaten van de TT en de PT werden voor de vergelijking omgerekend naar INR.

Duplicerbaarheid van de PT- en APTT-bepaling (within-run precisie) en de reproduceerbaarheid (dag-tot-dag precisie) van de PT-bepaling op Futura waren goed, zowel op het normale als het abnormale niveau (zie tabel 1). Vergelijking van de INR uit de PT met de Futura (Y) en de INR uit de TT met KC10 (X) leverde een prima correlatie op: $Y = -0,01 + 1,04 X$. De resultaten van de APTT en fibrinogeen bepalingen lieten in het abnormale gebied duidelijke verschillen met de KC10 zien, waarschijnlijk t.g.v. verschil in meettechniek. Voor de fibrinogeenbepaling introduceert IL binnenkort een bepaling volgens het Von Claus principe. Carry-over was niet aantoonbaar.

Voor onze Trombosedienst worden jaarlijks ongeveer 30.000 controles uitgevoerd. Het maximale "aanbod" per dag bedraagt

ongeveer 250 monsters, die tussen ca. 11.00 en 13.00 uur geanalyseerd moeten worden. Om de resultatenverwerking snel en accuraat te laten verlopen is de Futura voorlopig unidirectioneel aan Trodis gekoppeld, een geautomatiseerd doseersysteem.

Wij concluderen dat de Futura een gebruiksvriendelijk apparaat is. Het geeft de mogelijkheid om grote aantallen monsters in een korte tijd te meten, koppeling met informatiesystemen uni- en bidirectioneel is goed mogelijk. De resultaten van de PT-INR bepaling zijn goed, andere bepalingen worden thans geëvalueerd.

Tabel 1. Within-run precisie van PT en APTT en dag-tot-dag precisie van PT

	Gemiddelde	SD	VC(%)
<i>Within-run precisie</i>			
PT (sec)			
Normaal	12,1	0,22	1,8
Abnormaal	33,8	1,00	3,0
PT (INR)			
Normaal	0,98	0,08	8,2
Abnormaal	4,7	0,21	4,4
APTT (sec)			
Normaal	43,2	0,43	1,0
Abnormaal	55,4	0,99	1,8
<i>Dag-tot-dag precisie</i>			
PT (sec)			
Normaal	13,6	0,27	2,0

44. Automatisering van een Trombosedienst Laboratorium met de Falcor 300 chemie analyzer

E.M. SMIT, P.W.L.J. BEMELMANS en J.C. VERDUIJN

Laboratorium IJsselmeerziekenhuizen, Lelystad

Nederland kent een uniek systeem van Trombosediensten waardoor langdurige orale antistollingstherapieën met Coumarine derivaten, ook extramuraal, mogelijk zijn. De controle die deze therapie vereist, wordt uitgevoerd m.b.v. een Thrombotest(TT), Nycomed Pharma AB Oslo, of een Protrombintijd(PT).

Trombosediensten kennen een strak tijdschema: bloedmonsters

nemen in een groot werkgebied, stollingsbepalingen uitvoeren, doseren en het doseeradvies bij de PTT aanleveren zodat dit de volgende dag bij de patient bezorgd kan worden. De stap in het totale proces die zich bij uitstek leent voor mechanisering en automatisering, is het uitvoeren en administratief verwerken van de analyses.

Er zijn stollingsautomaten te koop maar de mate van automatisering loopt achter op die van de chemie analyzers. Het inzetten van een chemie analyzer voor stollingsbepalingen zou een verbetering kunnen zijn. Zowel wat snelheid als monster en data verwerking betreft, voldoen de chemie analyzers aan de eisen die een Trombosedienst stelt. Ons onderzoek onder de chemie analyzers die op de Nederlandse markt te koop zijn, heeft slechts een echte automaat opgeleverd die zowel voor chemische als TT bepalingen geschikt is : de FALCOR 300 van Menarini Diagnostics.

De TT bepaling op de Falcor 300 correleert goed met de standaard methode. De precisie is goed: normalen VC=4,1% en

gem. ontstonden VC=2,9%. Ongeveer 150 TT bepalingen per uur kunnen zo geheel automatisch uitgevoerd worden. De resultaten worden gepresenteerd in een vorm die geschikt is voor het TDAS.

Daarnaast zijn de analytische en mechanische eigenschappen van de Falcor 300 bepaald aan de hand van een aantal veel gevraagde laboratorium parameters, vijf enzymen en zes substraatbepalingen. De analytische en logistieke mogelijkheden van de Falcor 300 doen niet onder voor die van een grote automaat en maken het tot een geschikt apparaat voor back-up en speciale tests.

Toxicologie

45. Tranylcypromine intoxication with malignant hyperthermia and thrombocytopenia

E.J.M. PENNING^{1,2}, J.C.M. SCHOUTEN-VERHAGEN¹ and J. DE KONING³

Psychiatric Hospital Endegeest, Biochemistry Laboratory¹, Department of Clinical Pharmacy and Toxicology, Toxicology Laboratory², Department of General Internal Medicine, Medical Intensive Care Unit³, Leiden University Hospital

Tranylcypromine (Parnate[®]) is an irreversible monoamine oxidase (MAO) inhibitor used in the treatment of resistant or atypical depression. The popularity of this drug is increasing because of its effectivity in a subgroup of patients unresponsive to other pharmacotherapy. Here, a case is described of an almost fatal intoxication in a male after ingestion of 4 g of tranylcypromine.

On the night before admission, the patient ingested 400 10mg tablets of Parnate[®]. He was found the next morning in a state of unconsciousness. On arrival in the hospital he was in coma (Glasgow Coma Score 3), the temperature was 35.6°C, the pulse was 143/min, respirations were shallow 40/min, the blood pressure was 123/68. Diffuse rhonchi were heard over all lung fields. Blood gas analysis: pH 7.33, PCO₂ 7.7 kPa, pO₂ 8.4 kPa, bicarbonate 30 mmol/l, oxygen-saturation 90%. Creatine phosphokinase activity in blood rose to 385 U/L. The thrombocyte count was 198 x 10⁹/L. The patient was intubated and mechanically ventilated. In the first hours after admission he developed what seemed to be chills and fever which was initially attributed to an infectious complication of the insertion of a suprapubic bladder catheter. He was immediately treated with broad spectrum antibiotics. Blood cultures indeed

became positive the next day. During the night diffuse muscular contractions started to occur. Epilepsy was excluded by EEG registration. The next morning the patient developed a malignant hyperthermia syndrome with shaking of the whole body and a rise in body temperature from 39.6°C to 41.6°C in about 1 hour. The hyperthermia was treated successfully by intensive cooling and administration of dantrolene (Dantrium[®]) 2.5 mg/kg i.v. (total dose 160 mg). Hypotension ensued, which was treated with colloids and noradrenaline. After regaining consciousness and extubation, he was noted to be disoriented, agitated, paranoid and unable to sustain attention. Delirium was diagnosed.

The tranylcypromine concentration in the blood sample taken on admission was 19.9 µg/ml which is more than 1000-fold the concentration usually found therapeutically (6.9 - 14.2 ng/ml at doses of 50 mg b.i.d). MAO activity was zero and the serotonin concentration in whole blood was 1.3 µmol/L (reference range 0.46-1.57 µmol/L). Thrombocytopenia developed on the second day and serotonin fell below the reference range. MAO activity, thrombocyte count and serotonin concentration recovered during a period of 9 days together with resolution of the delirium.

Geneesmiddelen/farmakinetica

46. Afwijkende fysiologische respons op prednisonbehandeling; bijnierschors-insensitiviteit of compliance: een casuïstische beschouwing

A. WOLTHUIS¹, J. TEN KATE¹, L. WESTERHUIS¹ en F. MAESEN²

Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Afdeling longziekten², De Wever Ziekenhuis, Heerlen

Casus: Een twintigjarige vrouw met een voorgeschiedenis van astma bronchiale, werd opgenomen met progressieve kortademigheid ondanks de hoge dosering prednison (150 mg oraal 1 x daags). Een reeds poliklinisch verrichte bijnierfunctie test i.v.m. de hoge prednison dosering leverde een normale respons op ACTH. Bij herhaling werden tijdens medicatie echter verhoogde cortisol waarden gevonden.

Vraagstelling: Wat is de oorzaak van de bij herhaling verhoogde cortisol concentratie, ondanks lage ACTH spiegels bij hoge prednison dosering. Is dit gerelateerd aan de exacerbaties van de astma. Speelt compliance een rol of zijn er structurele biologische problemen (bijnierschors insensitiviteit, glucocor-

ticoïd receptor defect, resorptie stoornis).

Actie:

- * Analyse van de bepalingsmethodiek in relatie tot de medicatie.
- * Klinische proefopzet om de metabole reactie op synthetisch glucocorticoïd te analyseren mbv. HPLC.
- * Glucocorticoïd receptor analyse (Dr. M. A. Blankenstein te Utrecht).

Resultaten:

A. Prednisolon vertoont een kruis-reactiviteit van 60% met cortisol in de cortisol (bindings)assay. De cortisol waarden zijn derhalve uiterst onbetrouwbaar.

- B. Chromatografisch kan prednisolon onafhankelijk van cortisol worden bepaald in hetzelfde chromatogram. De proefopzet leverde een volledig normale respons (ook klinisch: geen klachten).
- C. De kinetiek van de plasma prednisolon klaring was overeenkomstig de literatuur.
- D. De receptor analyse vertoonde geen grote afwijkingen.
- E. Een week na de proefopzet werd tijdens dexamethason behandeling een normale cortisol concentratie gevonden.

Conclusie:

- A. Deze casus onderstreept het belang van een goede

communicatie tussen kliniek en laboratorium mbt. data verkregen tijdens medicatie.

- B. Een chromatografische bepaling van cortisol is tijdens prednison behandeling een goede methode om het fysiologische effect te volgen.
- C.D.E Een goede klinische en fysiologische respons op prednison tijdens de proefopzet sluit een resorptiestoornis en receptor defect uit maar doet een compliance probleem vermoeden, waarvoor echter anamnestic geen aanknopingspunten werden gevonden.

Diversen

47. Improved selectivity of urinary oligosaccharides screening by using two one-dimensional TLC systems

N.G.G.M. ABELING, H. RUSCH and A.H. van GENNIP

Academic Medical Center, Depts. of Clin.Chem. and Pediatr., Amsterdam, the Netherlands

TLC of oligosaccharides in urine is widely used for the detection of a number of lysosomal storage diseases. Interpretation of 1-dim. TLC chromatograms, which are essentially based on the method of Humbel and Collart, is complicated by the occurrence of compounds originating from bloodgroup antigens, diet and medication. Moreover, most of these systems do not allow the reliable detection of β -mannosidosis. Therefore we introduced a second 1-dim. TLC system using n-propanol-acetic acid-water (Dorland). Combination of this system with the regular system was also evaluated to establish the additional discriminative power with respect to pathology.

Replacement of n-propanol in the mobile phase by isopropanol appeared to give a clear discrimination between the α -mannosidosis and the often very similar breast-fed newborn oligosaccharide pattern, while conserving the detectability of β -mannosidosis. Also the bloodgroup A trisaccharide can easily be recognised and abnormal profiles can be verified.

References

- Humbel R. Collart M. Clin Chim Acta 1975; 60: 143-145.
- Dorland L et al. J Inher Metab Dis 1988; 11: 255-258.

48. 4-Amidinoindan-1-one 2'-amidinohydrazone (CGP 48664A) exerts in vitro growth inhibitory effects that are not only related to S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMdc) inhibition

B. DORHOUT, M.F.G. ODINK, E. de HOOG, A.W. KINGMA, E. van der VEER and F.A.J. MUSKIET

Central Laboratory for Clinical Chemistry, University Hospital Groningen

Polyamines are essential for cell proliferation. A key enzyme in biosynthesis is S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMdc). Treatment with SAMdc inhibitors causes polyamine depletion resulting in growth arrest. Inhibitors of SAMdc are: methylglyoxal bis(guanylhydrazone) (MGBG; unspecific, highly toxic), 5'-[(Z)-4-amino-2-butenyl]methylamino-5'-deoxyadenosine (AbeAdo; an irreversible inhibitor) and the recently developed MGBG-analog 4-amidinoindan-1-one 2'-amidinohydrazone (CGP 48664A). At CGP 48664A and AbeAdo dosages that cause similar changes in L1210 murine leukemia polyamine contents, CGP 48664A inhibits L1210 growth more effectively *in vivo*. SAMdc inhibition may therefore not be the only mechanism of CGP 48664A action. To study this hypothesis we investigated the *in vitro* growth inhibitory and cytotoxic effects of increasing concentrations AbeAdo, CGP 48664A and MGBG on L1210 cells, that were constantly exposed to an AbeAdo concentration that causes complete SAMdc inhibition

(i.e. 10 μ M). L1210 cells were incubated with 10 μ M AbeAdo from day 0-4. From day 2-4 cells were additionally exposed to increasing concentrations of either AbeAdo, CGP 48664A or MGBG. Viable cell numbers and viability were determined day 4. SAMdc (days 2 and 4) activity, and L1210 polyamine contents (day 4) were established. SAMdc activity was undetectable, except for MGBG treated cells on day 4. Increasing AbeAdo concentrations had not affected L1210 cell numbers nor viability (92%) on day 4. CGP 48664A and MGBG decreased viable L1210 cell numbers dose dependently. IC_{50} values amounted to 127 μ M for CGP 48664A and 7.4 μ M for MGBG. Viability was 0% from 50 μ M MGBG and 77% at 200 μ M CGP 48664A. L1210 polyamine contents were not affected by additional AbeAdo and CGP 48664A, whereas additional MGBG increased all polyamines. We conclude that, except through SAMdc inhibition, CGP 48664A exerts growth inhibitory effects that are not related to SAMdc inhibition.

49. Virtueel Centraal Laboratoriumonderzoek: hoe nabij is de toekomst?

J.H.M. DIJKMAN

Virtueel Centraal Laboratorium, Nijmegen

Het Virtueel Centraal Laboratorium (VCL) is opgericht op 1 september 1995 in reactie op het snel toenemende gebruik van centrale laboratoria bij klinisch geneesmiddelen onderzoek. Het VCL optimaliseert de dienstverlening van lokale laboratoria, zodat lokaal gegenereerde data geschikt gemaakt worden

voor gebruik voor onderzoeksdoeleinden. Behalve een conversie van de resultaten om trends binnen de onderzochte groep weer te geven, wordt ook de kwaliteit bevorderd door het gebruik van "paraplu" standard operating procedures en laboratorium protocollen en neemt het VCL een aantal taken voor

haar rekening die lastig lokaal zijn uit te voeren, zoals langdurige archivering van brongegevens en lange termijn opslag van monsters onder gecontroleerde omstandigheden.

Bij de conversie wordt gebruikt gemaakt van omrekenfactoren die bepaald worden aan de hand van met regelmatige intervallen uit te voeren kalibraties met kalibratoren die worden gedistribueerd door SKZL. Deze methode is ontwikkeld na uitgebreid onderzoek in 11 laboratoria met verschillende meet-systemen. De bewaking van de gevonden factoren en de gegevens -invoer en -verwerking gebeurt met het speciaal voor dit doel ontwikkelde software pakket "VCLbase".

Het VCL wordt beheerd door een koepelorganisatie waarin geledingen zijn vertegenwoordigd van de NVKC, SKZL, di-

rektes van algemene en academische ziekenhuizen en Ne-Farma, de belangenorganisatie van de farmaceutische industrie. Een directeur en een technisch manager zijn aangesteld voor de uitvoering van VCL's activiteiten.

De voordelen voor lokale laboratoria om met VCL te werken zijn onder meer verbetering van de kwaliteit van uw lokaal klinisch onderzoek met minimaal ingrijpen in lokale procedures, ervaring met calibratie gegevens en conversie technieken met reductie van tussenlaboratorium spreiding, aantrekken van meer onderzoek waarvoor plaatselijk bepalingen kunnen worden uitgevoerd en continuïteit van laboratoriumzorg tijdens de uitvoering van trials.

50. Assay for total antioxidant status in plasma: what are we measuring?

J. LINDEMANS, C. COBBAERT, J. SMITS en H. van den HANDEL

Department of Clinical Chemistry, University Hospital Rotterdam

Various methods for the measurement of antioxidant activity of compounds in solution or body fluids have been described. The majority is based on the detection of the inhibitive effect of the sample on a process of controlled radical production. Recently a commercialized assay (Randox T.A.S.) has become available in which the metmyoglobin- and hydrogen peroxide-mediated production of the radical cation ABTS⁰⁺ is followed photometrically at 660nm. Antioxidant activity in the sample suppresses this production. The assay is calibrated against known concentrations of the water-soluble vitamin E-analogue Trolox^R.

This assay was evaluated with respect to its applicability for measurement of anti- or pro-oxidant activity of additives to human plasma. To that purpose we investigated the effect of sample dilution, recovery of known amounts of antioxidants

such as uric acid, added to the serum sample, and variations in the reagent composition and incubation time of the assay.

We could confirm the statement of the manufacturer of the assay that only rigorous conformity with respect to prescribed assay conditions can lead to reproducible results. Increase or decrease of metmyoglobin concentration is strongly connected to increased or decreased antioxidant levels in the serum sample. In a similar way the recovery of added antioxidants depends on reagent composition and measurement time. We conclude that different antioxidants exert their effect on the total antioxidant status result in a different way and cannot be translated to Trolox equivalents without further definition of measurement conditions. The method as a whole requires a more extended evaluation before diagnostic application is warranted.

51. Sandwich ELISA for glutathione S-transferase Alpha1-1: plasma levels in controls and in patients with gastrointestinal disorders

T.P.J. MULDER, W.H.M. PETERS and J.B.M.J. JANSEN

Department of Gastroenterology, University Hospital St. Radboud, Nijmegen

Due to their high hepatic concentration (2% of the soluble protein) and low molecular mass (52 kD), class Alpha glutathione S-transferases (GST-Alpha) are released quickly and in considerable quantity into the bloodstream during hepatocellular damage. Because GST-Alpha has a short half-life in blood (1 hour), its concentration in plasma will follow changes in liver damage more rapidly than conventional aminotransferases. A sandwich type ELISA for glutathione S-transferase Alpha1-1 (GSTA1-1), the most abundant isoform of GST-Alpha, was developed. The assay was based on a monoclonal antibody binding to human GSTA1-1 and a polyclonal rabbit anti-human GST-Alpha antiserum. The ELISA is specific for human GSTA1-1 and has a detection limit of 0.04 µg/l. Intra- and inter-assay coefficient of variation were 2.5% and 7.3%, respectively. The distribution of plasma GSTA1-1 concentrations in 350 blood donors was nearly normalized by logarithmic transformation. A normal reference range of 0.4-5.9 µg/l was calculated. In females, but not in males, a significant increase was noted with age and in the age groups 20-40 and 40-60 years males had significantly ($P < 0.0001$) higher plasma GSTA1-1 levels than females.

In patients with inflammatory bowel disease (1.28 µg/l, 0.16-

29.76; n=210), gastrointestinal tumours (1.52 µg/l, 0.40-10.4; n=70), irritable bowel disease (1.28 µg/l, 0.24-5.52; n=31) or chronic pancreatitis (1.20 µg/l, 0.56-8.08; n=11) plasma GSTA1-1 levels were similar as in controls. Of the 37 patients with various liver disorders studied, 12 had elevated plasma GSTA1-1 levels and 11 had elevated alanine aminotransferase levels. We conclude that plasma GSTA1-1 levels: (i) are higher in males than in females, (ii) increase with age in females, but not in males, (iii) are normal in patients with non-hepatic gastrointestinal disorders and, (iiii) are elevated in a similar number patients as alanine aminotransferase in patients with hepatic disorders.

	Plasma GSTA1-1 concentration (µg/l) median (range; number of controls)	
	Males	Females
20-40 years	1.80 (0.48-8.64; n=70)	1.08 (0.24-6.36; n=83)
40-60 years	2.08 (0.56-8.96; n=61)	1.44 (0.16-4.80; n=57)
>60 years	1.70 (0.56-6.16; n=44)	1.84 (0.64-9.12; n=33)

52. Het gebruik van de HemoCue glucose meter door verpleegkundigen bij neonaten

M. de METZ, J. van de CALSEIJDE en A. BAIJENS
Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen

Veel populaire bloedglucosemeters maken gebruik van stripjes, die reageren met glucose in een filtraat van bloed, en zijn ongeschikt voor neonaten met een hoge hematocriet. Het Hemocue meetsysteem (Hemocue AB, Ängelholm, Zweden) bestaat uit een fotometer en wegwerpcuvettes met reagens (glucose dehydrogenase) en saponine, dat de rode bloedcellen lyseert. De glucose wordt dus in gelyseerd volbloed gemeten. Alvorens de Hemocue op de afdeling neonatologie te introduceren werden de glucosemetingen met de Hemocue vergeleken met de labmethode (glucose dehydrogenase met een RA-XT van Bayer). Analyse van de gegevens volgens Passing en Bablok leverde de vergelijking op: Hemocue = $-0,68 + 1,17$ RA-XT, $R^2 = 0,95$ ($n=89$). Lage glucoseconcentraties gaven lagere resultaten met de Hemocue. Op grond hiervan werd besloten waarden lager dan 2,1 mmol/l altijd te verifiëren met de labmethode. Hypoglykemieën werden in de proefperiode niet gemist met de Hemocue. Er werd een procedure vastgesteld voor het uitvoeren van de glucosemeting op de verpleegafde-

ling onder verantwoordelijkheid van het KCL volgens de in het laboratorium geldende normen (kwaliteitshandboek). De verpleegafdeling werd geïnstrueerd door het KCL over het gebruik van de Hemocue en het belang van goede kwaliteitscontrole.

Afgelopen jaar lagen 17 % van de 600 Hemocue metingen beneden de 2,1 mmol/l. Deze waarden werden beschouwd als hypoglykemie en vereisten actief ingrijpen door de verpleging. De hypoglykemie werd in 58 % van de gevallen niet bevestigd met de labmethode. Verklaringen voor het grote verschil tussen Hemocue en labmethode bij lage glucose concentraties kunnen o.a. zijn: foutieve monsternamen, onvolledig gevulde cuvetten, met bloed besmeurde cuvetten, onjuiste opslag van de cuvetten. Ondanks de genoemde beperking wordt de meting van glucose bij neonaten met de Hemocue beschouwd als een waardevolle aanwinst voor de kliniek om snel een hypoglykemie uit te sluiten.

53. Een computerprogramma voor het aanvragen van laboratoriumonderzoek: een evaluatie in de praktijk

W.P. OOSTERHUIS¹, A. OLIEMAN², W.J.H.M. van den BOSCH³ en H.J.M. van den HOOGEN³
Klinisch Chemisch Laboratorium¹ Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen, Vakgroep Huisarts-, Sociale- en Verpleeghuisgeneeskunde², Katholieke Universiteit Nijmegen

Het computerprogramma 'LISA' werd ontwikkeld ter ondersteuning van het aanvragen van laboratoriumonderzoek, voor gebruik in de huisartspraktijk. Dit programma voldoet aan de volgende randvoorwaarden: 1) de huisarts kan aparte bepalingen aanvragen, maar tevens aanvragen door het aangeven van een probleem (bijvoorbeeld: uitsluiten hepatitis), en ook op basis van klachten (bijvoorbeeld: algemene malaise). 2) Werkafspraken en standaarden zijn opgenomen in de adviezen. 3) De huisarts krijgt direct informatie tijdens het aanvragen van diagnostisch onderzoek. In 8 praktijken (11 artsen) was het programma gedurende 3 maanden in gebruik, gekoppeld aan het huisartsinformatiesysteem Promedico (VVAA/RAET).

Doel van het onderzoek was: nagaan of het programma in de praktijk voldoet, invloed van het programma op het aanvraaggedrag en gegevensverzameling voor verdere ontwikkeling van het programma. In het afsluitende interview gaven de huisartsen aan het programma te beoordelen met gemiddeld een ruime zeven, en de meesten wilden het blijven gebruiken. Op punten was het nog te beperkt, zo moeten er nog meer klachten en aandoeningen worden opgenomen. Ongeveer 600 aanvraagformulieren werden met het programma tijdens het onderzoek gegenereerd. Huisartsen verschillen onderling sterk in stijl van aanvragen, waarbij software moet aansluiten op deze diversiteit in aanvraaggedrag.

54. Protocolaire analytische evaluatie van de Instrumentation Laboratory / Shimadzu ILab 900 klinische chemie analyzer

C.H.H. SCHOENMAKERS¹, J. van DOESBURG² en H.E. van INGEN²
Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Academisch Ziekenhuis Dijkzigt, Rotterdam en Klinisch Chemisch Laboratorium², Dr. Daniel den Hoed Kliniek, Rotterdam

De Instrumentation Laboratory / Shimadzu ILab 900 behoort tot de laatste generatie patiënt-georiënteerde, random access, klinische chemie analyzers. De analyzer biedt alle opties die verwacht mogen worden voor de veelzijdige analyzers die heden ten dage in het klinisch-chemisch laboratorium gebruikt worden, dit bij een maximale doorvoer van 1050 testen per uur. Gebruik makend van gestandaardiseerde protocollen (NCCLS EP5-T2: imprecisie, NCCLS EP6-P: lineariteit, Krouwer27: multi-factor en CERMAB: interferentie door bilirubine, hemoglobine en lipiden) werden de analytische prestaties van het apparaat op een betrouwbare manier geëvalueerd uit bijna 50.000 metingen. De evaluatie werd gecompleteerd door het evalueren van de juistheid (vergelijking van methoden met de betreffende referentie methode met het Passing & Bablok algoritme), de kalibratie stabiliteit (herhaalde analyses zonder her-kalibratie) en interferentie door paraproteïnen (onderzoek op parallelisme door analyse voor en na verdunning).

De analytische prestaties bleken in bijna alle gevallen ruim binnen de claims van de fabrikant te liggen. De amylase bepaling vertoonde hoge imprecisie die ontstond door verschuivingen na het in gebruik nemen van vers reagens. De directe bilirubine bepaling vertoonde relevante niet-lineariteit in zowel het EP6-P als het Krouwer27 protocol. Alleen wanneer een magnesium bepaling voorafgegaan werd door een triglyceride bepaling, werd een significante reagens carry-over van 0,6 % gedetecteerd (magnesium concentratie in het triglyceride reagens = 9,5 mmol/l). De correlatie van de magnesium bepaling met de referentiemethode was twijfelachtig. Interferentie door paraproteïnen werd in een klein deel van de monsters gevonden voor de ijzer en anorganisch fosfaat bepaling. Ten gevolge van deze evaluatie worden momenteel de bepalingen van amylase, directe bilirubine en magnesium onderzocht in IL laboratoria om de prestaties te verbeteren.

55. CDtect[®] als marker voor chronisch alcoholgebruik

J. van PELT¹, M.H. VELMANS¹, A.B. EDERVEEN², J.J.A. HAEGENS², M.P.A. MORSHUIS³ en A.G.M. WIJDEVELD³

st. Maartens Gasthuis, Venlo¹; ZALV, Venray² en Verslavingskliniek Paschalis, Wanssum³

Zoals bekend verandert het glycosyleringspatroon van transferrine bij langdurig fors alcoholgebruik, hetgeen met elektroforese technieken bepaald kan worden. Recent is voor de detectie van de zogenaamde Koolhydraat Deficiënte Transferrines een EIA-microtiterplaat methode op de markt gebracht (Pharmacia, Woerden). Voor de scheiding van de transferrine subtypes worden anion-wisselings kolommetjes gebruikt. Wij bepaalden de waarde van de CDtect[®] analyse naast die van MCV en γ GT bij 122 opeenvolgende patiënten (101 m; 21 v) voor een ontwenningskuur bij de verslavingskliniek Paschalis. Van hen hadden 64 volgens eigen opgave in de twee weken voorafgaand aan opname meer dan gemiddeld 60 g alcohol per dag gebruikt. De anderen hadden minder tot geen alcohol gebruikt (zelfstandig eerder gestopt of andere verslaving). Met de bij opname aangegeven alcoholconsumptie als gouden standaard werden de sensitiviteit en de specificiteit van genoemde analyses en van de verhouding CDtect/Transferrine bepaald. Uit de tabel blijkt dat bij mannen bij vergelijkbare specificiteit van γ GT, CDtect* en CDtect/Transferrine de sensitiviteit van CDtect superieur is. Het MCV blijkt onbruikbaar. Voor vrouwen liggen de resultaten van alle analyses een stuk slechter. Opvallend in deze studie is dat, ondanks het feit dat de refe-

rentiegroep deels uit recent gestopte drinkers en polygebruikers bestaat, de specificiteit van zowel γ GT als CDtect* zeer hoog zijn. De samenstelling van de alcoholistengroep (fors tot zeer fors gebruik gedurende lange tijd) maakt de sensitiviteitscore van γ GT teleurstellend en die van CDtect* bevredigend.

Tabel 1. Sensitiviteit en specificiteit van een aantal bepalingen bij 61 alcoholisten (51 m; 10 v) en 61 anders verslaafden of recent gestopte drinkers (50 m; 11 v)

		Grenswaarde	Specificiteit (%)	Sensitiviteit (%)
CDtect*	M	≤ 20 U/l	88	82
	V	≤ 25 U/l	80	46
γ GT	M	≤ 48 U/l	86	62
	V	≤ 31 U/l	40	73
MCV	M	≤ 104 fl	98	14
	V	≤ 104 fl	90	30
CDT/Tf	M	$\leq 0,60$ U/ μ mol	86	65
	V	$\leq 0,60$ U/ μ mol	60	64

56. Fully automated HPLC analysis of thiamin and its phosphates in whole blood using the ASTED dialysis system for an on-line sample pretreatment

F.A.L. van der HORST and N. TOP

Dept of Clinical Chemistry, Eemland Hospital, Amersfoort, the Netherlands

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is well suited for the selective determination of compounds in complex biological matrices. However, HPLC suffers from the fact that in most laboratories the sample pretreatment is not automated and is therefore often labour intensive. Automation of sample pretreatment prior to analysis would greatly simplify the use of HPLC in less specialized laboratories. Amongst other approaches, on-line column-switching techniques have successfully been combined with subsequent HPLC-analysis. Here a study is presented on the use of on-line dialysis using the fully automated ASTED-system (Gilson, Villiers-le-Bel, France) for the determination in whole blood of thiamin (T), thiamin monophosphate (TMP) and the physiologic active analogue, thiamin pyrophosphate (TPP).

In short, after venapuncture, blood samples were stored at -20°C, which allowed lysis of the erythrocytes. An aliquot of 1 ml was pipetted into an Eppendorf polypropylene sample cup and placed into the ASTED-system, after which the sample was processed by the ASTED-system. Next, 2 times 200 μ l were dialysed with a 50 mM acetic acid buffer (pH 3.2) as

recipient. Thiamin, TPM and TPP in the dialysate were concentrated on a sulfonic acid (10 x 2 mm, I.D.) Trace Enrichment Cartridge. Finally, the analogues were analyzed using a (150x 4.6, I.D.) octadecyl RP-HPLC system with an aqueous 5 % (v/v) methanol mobile phase (pH 7.2) and subsequent fluorescence detection after a conventional thiochrome post column reaction. The overall recovery of thiamin and TPP was appr. 8 %, which sufficient for convenient analysis of the compounds. Using spiked whole blood samples, the linearity of the procedure was good ($r=0.997$) in the range 20-800 nM/l. The reproducibility was better than 10 % in the studied range, whereas the functional detection limit was better than 15 nM/ml. Correlation with a conventional procedure for the determination of vitamin B1 gave satisfactory results. Long-term ruggedness of the fully automated ASTED-system is currently in progress. It is concluded that on-line dialysis as sample pretreatment prior the HPLC analysis using the fully automated ASTED-system may have high potentials for the determination of compounds in complex biological matrices.

57. Correctie van urinezuur- en magnesiumuitslagen van icterische monsters op de Hitachi 747 met behulp van de "icterus index"

C. van de WATER, J.H.M. SOUVERIJN en W.Th. HELVERSTEYN

Afdeling Klinische Chemie, Academisch Ziekenhuis Leiden

Het tegelijkertijd testen van patiëntenmateriaal op verschillende apparaten binnen het laboratorium brachten bij icterisch materiaal interferenties op de urinezuur- en de magnesiumbepaling aan het licht bij de Hitachi 747. Bij icterische monsters bleken de Hitachi 747 uitslagen voor magnesium consequent te hoog terwijl de urinezuuruitslagen consequent te laag uitvielen. Deze conclusies zijn gebaseerd op een vergelijkings-

onderzoek waarbij voor urinezuur de Kodak Ektachem 700-bepaling en voor magnesium de 'Parkin-Elmer 3030 atomic absorption spectrofotometric' bepaling als referentiemethoden zijn genomen. Metingen verricht aan een verdunningsreeks van een sterk icterisch serum in normaal serum resulteerde voor zowel de Hitachi-urinezuurbepaling als de Hitachi-magnesiumbepaling in een goede correlatie met de betreffende

referentiemethode ($r=0,9976$ resp. $0,9928$). Deze bevinding geeft aan dat de interferentie bij zowel de Hitachi-urinezuurbepaling als de Hitachi-magnesiumbepaling rechtevenredig is met de bilirubineconcentratie. Vanwege het feit dat een urinezuur- en/of magnesiumaanvraag niet ten alle tijde gepaard gaat met een bilirubine aanvraag, lijkt het in eerste instantie niet mogelijk om een correctie van alle urinezuur- en magnesiumuitslagen uit te voeren. Echter, de Hitachi heeft nog een andere parameter die informatie verstrekt met betrekking tot het bilirubinegehalte, namelijk de icterus-index. Deze icterus-index blijkt uitstekend te correleren met de bilirubine-concentratie ($r=0,9996$). De verschilwaarden tussen de referentiemethode en de Hitachi 747 vertonen een lineair verband met de icterus-

index ($r=0,9926$ voor urinezuur; $r=0,9973$ voor magnesium). Deze resultaten geven aan dat het verantwoord is om de icterus-index, die aanvankelijk bedoeld is als semi-kwantitatieve parameter, toe te passen voor kwantitatieve doeleinden, in dit geval de correctie van de Hitachi 747 urinezuur- en magnesiumuitslagen. De formules waarmee de urinezuur- en magnesiumuitslagen worden omgerekend, zijn:

$$[\text{urinezuur}]_{\text{rapportage}} = [\text{urinezuur}]_{\text{Hitachi}} + (0,0021 \times \text{icterus index})$$

$$[\text{magnesium}]_{\text{rapportage}} = [\text{magnesium}]_{\text{Hitachi}} - (0,0089 \times \text{icterus index})$$

58. Evaluatie van vitamine B₁₂ (MEIA) en folaat (IC) assays

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

Klinisch Chemisch Laboratorium, Psychiatrisch Ziekenhuis Veldwijk, Ermelo

Omdat deficiëntie van vitamine B₁₂ en folaat tot verstoring van erythrocyten vorming kan leiden, is het van belang dat de serumconcentratie van deze nutriënten nauwkeurig en betrouwbaar bepaald kan worden. Recent zijn voor de kwantitatieve bepaling van vitamine B₁₂ en folaat volledig geautomatiseerde immunoassays ontwikkeld, gebaseerd op nieuwe principes voor scheiding en detectie: de microparticle enzyme immunoassay (MEIA) voor vitamine B₁₂ en de ion capture (IC) methode voor folaat. Beide assays kunnen worden uitgevoerd met behulp van de Abbott IMx analyzer.

In deze studie zijn de IMx vitamine B₁₂ en folaat assays geëvalueerd en vergeleken met de cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA), in ons laboratorium de huidige routine-methode voor vitamine B₁₂ en folaat bepalingen. De correlatie

tussen CEDIA en MEIA of IC blijkt uitstekend te zijn, met correlatiecoëfficiënten van 0,97 voor zowel vitamine B₁₂ als folaat. Een detectie-limiet van 1,9 nmol/l voor folaat en 56,2 pmol/l voor vitamine B₁₂ is vergelijkbaar met CEDIA en toereikend voor klinisch onderzoek. De IMx analyses overtreffen CEDIA in precisie, dat wil zeggen intra-assay en interassay variaties zijn lager. De lineariteit is goed, de analytische recovery is 95% voor folaat en 119% voor vitamine B₁₂.

MEIA en IC zijn op de IMx analyzer volledig geautomatiseerd, waardoor ze gemakkelijker uitvoerbaar en minder tijdrovend zijn dan CEDIA. Daarnaast zijn de exploitatiekosten van de IMx assays relatief laag. Een nadeel van de IMx is dat vitamine B₁₂ en folaat niet in dezelfde run gemeten kunnen worden.

59. Determination of lactate levels with the CCD 860 biosensor technology

E.K.A. WINCKERS¹ en J.S. KROUWER²

Department of Clinical Chemistry¹, University Hospital Utrecht, the Netherlands and Ciba Corning Diagnostics², Medfield (MA), USA

The CCD 860 Blood Gas and Critical Analyte System (Ciba Corning Diagnostics, Medfield, MA, USA) is a modular analytical system which utilizes biosensor technology to measure glucose and lactate. The availability of the lactate and glucose sensor in the CCD 860 is clinically relevant, because it provides faster turnaround times for these important critical blood analytes.

The analytical performance characteristics of the CCD 860 lactate assay obtained in the first clinical evaluation of the assay, was evaluated. We compared for patient samples ($n=188$) the results for whole blood (x) to the plasma values (y) on the CCD 860. Orthogonal regression analysis gave the following results:

$y = 1.095x - 0.706$; $r=0.969$. Furthermore the CCD plasma values (x) with those on the Ektachem 700 (y_1), the Dimension (y_2) and the Hitachi 911 (y_3) were compared; results of orthogonal regression analysis:

$y_1 = 0.913x - 0.365$; $r=0.979$; $n=188$

$y_2 = 0.892x - 0.115$; $r=0.984$; $n=49$

$y_3 = 0.862x - 0.061$; $r=0.959$; $n=169$

Interassay precision studies were performed with Ciba Corning provided quality control material. Within run imprecision for the CCD 860 was calculated from duplicate measurements of whole blood and plasma patient samples.

Within run imprecision:

Lactate < 5 mmol/l: SD= 0.067 (blood) and SD=0.070 (plasma);

Lactate > 5 mmol/l: SD= 0.068 (blood) and SD=0.091 (plasma).

Between run imprecision:

Serum Pool Low: CV= 7.0 % (2.03 mmol/L); Serum Pool

Mid: CV= 4.8 % (5.23 mmol/l); Serum Pool High: CV=3.5 % (13.8 mmol/l)

During our evaluation the lifetime of the lactate sensor was approximately 14 days. The results of the correlation and precision studies indicate an acceptable performance over a clinically relevant range. We conclude that the CCD 860 system offers a reliable lactate sensor.

Klinische studies

Maligniteiten

60. MIBG is a non-competitive inhibitor of the Q binding site of complex I of the respiratory chain

J. CORNELISSEN, R. van BELZEN, A.B.P. van KUILENBURG, P.A. VOUTE and A.H. van GENNIP
Departments of Pediatrics and Clinical Chemistry, Academic Medical Centre, Amsterdam, the Netherlands

MIBG (meta-Iodobenzylguanidine) is a structural analogue of the neurotransmitter norepinephrine. It accumulates selectively in tissues of neuroendocrine origin. In its radio-iodinated form, MIBG is used as a tumour seeking radio-pharmaceutical for the diagnosis and treatment of neuroblastoma and pheochromocytoma. It has been suggested that at least part of the clinical responses with [¹³¹I] MIBG are not related to the radio-emitting properties of the drug. Unlabelled MIBG is known to inhibit cell proliferation of a large number of cell lines. Inhibition of complex I of the respiratory chain by MIBG was thought to be partly responsible for the decreased proliferation rate. Impaired mitochondrial function leads to stimulation of glycolytic activity and subsequent reduction of the pH. A reduction of pH can potentiate the cytotoxic activity of alkylating and platinum containing anti-cancer drugs. We demonstrated in the human lymphoblastic leukaemia cell line Molt-4 and the human neuroblastoma cell line SK-N-BE(2c),

that inhibition of the mitochondrial ATP synthesis by MIBG is partially responsible for the anti-proliferative effect of MIBG in these cell lines. The activity of both complex I and III of the respiratory chain was inhibited by MIBG. In order to further clarify the mode of inhibition of MIBG on complex I and III, several experiments were performed in beef heart submitochondrial particles (SMPs). Inhibition of the enzyme activity of complex I and III by MIBG was independent of the concentration of coenzyme Q for both complexes, showing that MIBG is a non-competitive inhibitor. EPR analysis of the SMPs in the presence of MIBG and NADH (complex I) or MIBG and succinate made clear that all prosthetic groups of complex I were in a reduced state, the same appears to be the case for complex III. This means for complex I that the electron flow through the complex is blocked by MIBG at the end of the complex, i.e. near the Q binding site of complex I. Complex III is most likely inhibited near the Q_{in} binding site.

61. HBO and the uptake of MIBG in neuroendocrine cell lines

J. CORNELISSEN, A.B.P. van KUILENBURG, P.A. VOUTE, A. van der KLEIJ and A.H. van GENNIP
Departments of Pediatrics and Clinical Chemistry, Academic Medical Centre, Amsterdam, the Netherlands

MIBG (meta-Iodobenzylguanidine) is a structural analogue of the neurotransmitter norepinephrine. It is recognised by the active norepinephrine transport system (uptake 1) and accumulates therefore in tissues of neuroendocrine origin. In its radio-iodinated form, MIBG is used as a tumour seeking radio-pharmaceutical agent for the diagnosis and treatment of neuroblastoma and pheochromocytoma. Treatment of, especially stage IV, neuroblastoma with [¹³¹I] MIBG or any other therapy, often does not lead to a complete cure. Therefore a phase II study was started in which patients with recurrent stage IV neuroblastoma were treated with a combination of [¹³¹I] MIBG administration and exposure to HyperBaric Oxygen (HBO). The preliminary results of this study are promising. Exposure of cells to HBO is thought to lead to the production of Reactive Oxygen Species (ROS). ROS can have various effects on the different components of the uptake and storage systems used by MIBG to accumulate in endocrine cells: uptake1 mediated accumulation of serotonin in platelets

increases; granular storage of catecholamines and serotonin in pheochromocytoma cells however, is inhibited. We compared the effect of HBO and menadione (a well known inducer of oxidative stress) on the uptake and retention capacity of MIBG in two cell lines, the human neuroblastoma cell line SK-N-BE(2C) and the rat pheochromocytoma cell line PC12. By doing this we hoped to elucidate whether the positive effect of HBO on [¹³¹I] MIBG therapy was due to improved uptake and/or retention of MIBG by the tumour cells for MIBG. Menadione decreased both the uptake and the retention capacity of MIBG, most probably by inhibiting the granular uptake system as well as the norepinephrine transport protein. Exposure of the two cell lines to HBO on the other hand did not influence uptake or retention of MIBG. It is therefore highly unlikely that the positive effect of HBO on the survival percentage of patients in the phase II study with HBO and [¹³¹I] MIBG is caused by increased accumulation or retention of [¹³¹I] MIBG in the tumours.

62. Spermine enhances mitoxantrone cytotoxicity in wild type, adriamycin and mitoxantrone resistant human small cell lung cancer cells in vitro

B. DORHOUT¹, C. MEIJER², F.A.J. MUSKIET¹ and E.G.E. de VRIES²
Central Laboratory for Clinical Chemistry¹ and Department of Medical Oncology², University Hospital Groningen

Polyamines are ubiquitous polycations present in all mammalian cells. Increasing polyamine concentrations have been suggested to facilitate DNA-Topoisomerase II interaction (Biochemistry 28: 995, 1989), while decreasing polyamine levels decrease etoposide cytotoxicity (Cell Mol Biol 40: 975, 1994). Thus, we hypothesized that increasing intracellular polyamine concentrations might increase cytotoxicity of Topoisomerase II drugs like etoposide. The human small cell lung cancer cell line GLC4 and its Adriamycin- (GLC4-Adria) and Mitoxantrone (Mito) resistant (GLC4-Mito) sub-lines, cultured in serum free SCLC₂ medium, were continuously exposed to increasing Mito concentrations in the presence of 5 or 30 μM

spermine immediately after seeding. In addition, the cell lines were continuously exposed to increasing spermine concentrations in the presence of their respective Mito IC₂₅. After 4 days, cell survival was assayed with MTT assay. Mito cytotoxicity was increased by 5 μM and 30 μM spermine [Dose Modifying Factors: 1.3 and 1.6 (GLC4); 1.1 and 1.3 (GLC4-Adria); 1.3 and 1.5 (GLC4-Mito), respectively]. In the absence of Mito, increasing spermine concentrations did not affect cell survival of all 3 lines. In the presence of Mito IC₂₅, however, spermine caused a dose dependent reduction in cell survival. It remains to be established whether increased intracellular spermine and increased Mito cytotoxicity are causally related.

63. Evaluation of the IMMULITE free PSA assay for the diagnosis of prostate cancer

F.A.L. van der HORST¹, N.P.H. van ADRICHEM², J.J. MAJOOR¹ and R.G. RUMMENIE¹
Dept. Clinical Chemistry¹ and Dept. Urology², Eemland Hospital, Amersfoort, the Netherlands

Recent studies demonstrate the potential use of the ratio between the free fraction of prostate specific antigen (fPSA) and the total measurable PSA concentration (tPSA), e.g. fPSA and PSA complexed to α 1-antichymotrypsin, for the differentiation of prostate cancer (CAP) and benign disease. In this study the use of the IMMULITE free PSA and total PSA assays of Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA) were evaluated. The between-lot (n=3) interadjustment (n=8) coefficients of variation (C.V.) of the IMMULITE free PSA assay were 5.6 and 6.7 % at a 0.7 and a 2.4 ng/mL level of fPSA, respectively, using Lyphocheck immunoassay controls. The functional limit of detection (C.V. < 20 %) was better than 0.05 ng/mL, using patient's sera. The between-lot (n=3) inter-adjustment (n=7) coefficients of variation (C.V.) of the second generation IMMULITE PSA assay were 5.1 and 6.4 % at a 3.5 and a 27.1 ng/mL level of PSA, respectively, using Lypho-

check control sera. tPSA and fPSA concentrations were determined of patients who were referred to the Dept. of Urology with symptoms of prostatic dysfunction. Patient samples were routinely assayed within 8 hours after venapuncture or else stored at -20°C prior to analysis. Hundred and fifty six patients were selected with tPSA levels between 4 and 20 ng/mL. Based on sextant biopsies, 57 patients had a CAP and 99 benign disease. Based on ROC-curve analysis, for tPSA an optimal positive predictive value (PVP) and negative predictive value (PVN) of 58 % and 68 % were obtained for the differentiation of CAP and benign disease with a cut-off value of 12.5 ng/mL. Also based with ROC-curve analysis, using the fPSA/tPSA ratio the PVP and PVN were 73% and 87%, respectively, with a cut-off value of 10.4%. These results demonstrate that the use of the fPSA/tPSA ratio seems to beneficially contribute to the diagnosis of prostate cancer.

64. Circadian variation of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), uridine phosphorylase (UP), β -alanine (β -ALA) and 5-fluorouracil (5-FU) during continuous infusion (CI) of fluoropyrimidines (FP)

A.B.P. van KUILENBURG, R.L. POORTER, G.J. PETERS¹, H. van LENTHE, A.E.M. STROOMER, A.H. Van GENNIP, K. SMID¹, P. NOORDHUIS¹, P.J.M. BAKKER and C.H.N. VEENHOF
Academic Medical Centre and Free University Hospital¹, Amsterdam, the Netherlands

There is evidence for a circadian variation of the major pyrimidine catabolic enzyme DPD. We studied the relationship between plasma levels of DPD, the anabolic enzyme UP, the Uracil catabolite β -ALA and 5-FU during CI of FP.

Methods: So far 8 patients (pts) who were treated with CI of 5-FU 300-450 mg/m²/day or FUDR (floxuridine) 0.175-0.325 mg/kg/day for 14 days every 4 weeks entered the study. Blood samples for the determination of plasma levels of DPD, UP, β -ALA and 5-FU were taken 7 times every 4 hours on day 7 and 14 of one chemotherapy course. The amount of β -ALA was quantified by HPLC separation with postcolumn o-phthaldialdehyde detection. DPD and UP activities were determined in

purified leucocytes with radiochemical assays. 5-FU levels were measured by GC-MS.

Results: For pts analyzed up to date a circadian rhythm was observed for the activities of DPD and UP and maximal activities were observed between 12 AM and 4 PM. A profound circadian variation was also observed for the β -ALA concentrations with peak values occurring between 4 PM and 8 PM. An inverse pattern was observed for the levels of 5-FU compared to that of β -ALA.

Conclusion: We observed not only a circadian variation of the levels of DPD and 5-FU, but also for β -ALA and UP. Surprisingly DPD and UP demonstrated the same pattern.

Neurologie en psychiatrie

65. Apolipoproteïne-E genotypering in Parkinson's patiënten met Alzheimer symptomen

H.M. STEFFENS-NAKKEN¹, L.A.P. BALLERING¹, R. ESSELINK², I. VERMES¹, R.A.I. de VOS³ en E.N.H. JANSEN STEUR²

Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Neurologie², Medisch Spectrum Twente, Enschede en Streeklaboratorium voor de Pathologie³, Enschede

Sedert enkele jaren is het bekend dat bij patiënten met Alzheimer (AD) en bij patiënten met Lewy Body disease (LBD) het apolipoproteïne E (Apo-E) e4 allel verhoogd voorkomt. LBD is een spectrum van aandoeningen met insluitsels (Lewy Bodies) in de hersenen. De ziekte van Parkinson (PD) maakt deel uit van dit spectrum maar daarbij wordt geen verhoogde incidentie van het Apo-E e4 allel aangetoond. Een aantal PD patiënten ontwikkelt ook AD en bij 25% van de PD patiënten wordt klinisch een foutieve diagnose gesteld.

In dit onderzoek wordt in bloedmonsters een mogelijk verband bestudeerd tussen het Apo-E e4 allel en PD patiënten die AD ontwikkelen.

Voor de definiëring van de verschillende groepen voor deze studie is uitgegaan van paraffine-ingeboden hersenweefsels waarvan de diagnose post-mortem is bevestigd (AD volgens de CERAD criteria). Uit deze monsters en uit vers ingevroren hersenweefsels is DNA geïsoleerd. Vervolgens is een nested PCR uitgevoerd in het exon 4 van het Apo-E gen gevolgd door een hybri-

disatie met oligo's complementair aan de codons 112 en 158.

Van patiënten met de diagnose "Parkinsonisme" is uit het bloed DNA geïsoleerd. De genotypering is bij deze monsters verricht door het Apo-E gen te amplificeren en het vervolgens te knippen met het restrictie enzym Cfo I.

De verkregen Apo-E allel frequenties zijn onderstaand weergegeven.

Groep	Materiaal	Aantal	Frequentie(%)		
			e2	e3	e4
Normaal Kaukasisch	(Lit.)	1000	8	76	15
Controles	hersens weefsel	23	11	63	26
Parkinsonisme	bloed	64	9	70	20
AD	hersens weefsel	12	8	79	13
PD met AD	hersens weefsel	7	14	64	21
zonder AD		19	16	71	13

66. The dietary fatty acids of patients with coronary artery disease and controls in Curaçao. Implications for primary and secondary prevention

D.A.J. BROUWER¹, F.P.L. van der DIJS², C.B. LEERINK², H.N. STEWARD^{3,4}, T.A.J. KROON³, G.H.J. SUVERKROPP⁴, J.W.PH. ROMER⁴, J.J. van DOORMAAL⁵ and F.A.J. MUSKIET¹

Central Laboratory for Clinical Chemistry, University Hospital Groningen¹ (the Netherlands), Department of Clinical Chemistry and Haematology, Public Health Laboratory (Curaçao)², Thorax Centre (Curaçao)³, Cardiologists (Curaçao)⁴ and Atherosclerosis-lipid outpatient clinic, University Hospital Groningen⁵ (the Netherlands)

Patients with coronary artery disease are advised to augment their dietary linoleic acid intakes at the expense of saturated fatty acids. We investigated whether the dietary linoleic acid intake of 57 patients with coronary artery disease (47 males, 10 females; ages 61±10 years) in Curaçao is higher as compared with 77 controls (51 males, 26 females; ages 56±7 years). For this, we measured plasma cholesterol ester fatty acids, which reflect the dietary fatty acid composition of the preceding weeks. Patients with coronary artery disease and controls had minor differences in cholesterol ester fatty acids. Their cholesterol ester linoleic acid content suggests that the

dietary polyunsaturated/saturated fatty acid ratio is far below 1. Comparison with data reported for the Netherlands, Greenland and Crete showed that the dietary fatty acid composition in Curaçao is typically Western with a high intake of saturated fatty acids, a low intake of monounsaturated fatty acids and the consumption of linoleic acid as the predominant polyunsaturated fatty acid. Reduction of dietary saturated fatty acids, augmentation of fish consumption, and an increase of the α -linolenic/linoleic acid ratio are likely to be of benefit to both primary and secondary prevention from coronary artery disease in Curaçao.

67. Lipids, apolipoprotein-E genotypes and other risk factors of patients with coronary artery disease in Curaçao

D.A.J. BROUWER¹, C.B. LEERINK², H.N. STEWARD^{3,4}, T.A.J. KROON³, G.H.J. SUVERKROPP⁴, J.W.PH. ROMER⁴, M. VOLMER¹ and F.A.J. MUSKIET¹

Central Laboratory for Clinical Chemistry, University Hospital Groningen¹ (the Netherlands), Department of Clinical Chemistry and Haematology, Public Health Laboratory², Thorax Centre³ and Cardiologists⁴ (Curaçao)

We studied lipids, apolipoprotein-E (apo- ϵ) genotypes and other coronary artery disease (CAD) risk factors of 67 CAD patients (male/female ratio 5) in Curaçao. Compared with 57 controls, male CAD patients had higher cholesterol, triglycerides, LDL-cholesterol, apo-B and apo-B/apo-AI, and decreased HDL-cholesterol and HDL-cholesterol/cholesterol. Other CAD risk factors were increased fasting glucose and HbA_{1c}, decreased creatinine clearance, and increased prevalences of lipoprotein (a) >500 mg/l, renal disease, hyperhomocysteinaemia, diabetes mellitus type II (DM-II), positive CAD family history and cigarette smoking. Male CAD patients had higher plasma α -

tocopherol_{eq}, but normal plasma α -tocopherol_{eq}/total lipid and β -carotene/total lipid. Compared with 29 female controls, female CAD patients had higher fasting plasma glucose, HbA_{1c} and prevalence of DM-II. Predicting factors for CAD development in the whole CAD group were DM-II, cigarette smoking, apo- ϵ_3/ϵ_4 and apo- ϵ_4/ϵ_4 . Apo- ϵ_4 was associated with lower HDL- and higher LDL-cholesterol. Studies on local improvement of diabetic control, reference values of lipoprotein (a) and homocysteine, apolipoprotein (a) phenotypes, causes of hyperhomocysteinaemia, and dietary influences on CAD development in subjects who carry the apo- ϵ_4 allele are needed.

68. Oral supplementation of high dose α -tocopherol and β -carotene. Influence on plasma, platelet, erythrocyte and adipose tissue contents, and on mobilization from adipose tissue during fasting

D.A.J. BROUWER, F.A. MOLIN, C.M. van BEUSEKOM and F.A.J. MUSKIET

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Groningen

α -Tocopherol and β -carotene are lipid soluble antioxidants. Epidemiological studies suggest that they protect against coronary artery disease. We investigated the effect of oral α -tocopherol and β -carotene supplementation on their contents in plasma and adipose tissue (α -tocopherol and β -carotene), and in platelets and erythrocytes (α -tocopherol). Six apparently healthy volunteers (3 males, 3 females; mean 31 years, range 23-44) took 500 mg α -tocopherol and 25 mg β -carotene daily for 25 days, and 500 mg α -tocopherol per day for another 16 days. Samples were collected in the fasting state at baseline, during supplementation and after discontinuation. We also studied α -tocopherol and β -carotene mobilization from adipose tissue. For this, we monitored their plasma levels during a 17 hour fast, following 2 days discontinuation of supplement intake and the consumption of an α -tocopherol and β -carotene poor breakfast. Mobilization was studied at baseline, during supplementation and after its discontinuation. Plasma, platelet,

erythrocyte and adipose tissue α -tocopherol contents rose during supplementation. Within 22 days after discontinuation α -tocopherol fell to baseline in plasma and platelets, but not in erythrocytes and adipose tissue. Plasma and adipose tissue β -carotene rose steeply during supplementation, and did not reach baseline levels within 38 days after discontinuation. Fasting caused a linear increase of plasma free fatty acid concentrations, but did not clearly affect the contents of plasma, erythrocyte and platelet α -tocopherol and plasma β -carotene at any stage of the experiment. In conclusion, oral intake of high dose α -tocopherol and β -carotene causes their accumulation in adipose tissue. Adipose tissue storage capacity seems unsaturable. Adipose tissue α -tocopherol and β -carotene release slowly following discontinuation of supplement intake, and fasting does not cause massive release. Adipose tissue may be important for long term α -tocopherol and β -carotene status.

69. Ischemie/reperfusie-schade tijdens open-hartchirurgie

F.J.L.M. HAAS¹, W.B.M. GERRITSEN¹, L.H.P.J. AARTS², W.J. MORSHUIS³, D van LOON¹ en N.C. den BOER¹
Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Anesthesiologie² en Thoraxchirurgie³, St Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein

Bij verstoring van de bloedtoevoer naar een orgaan kan ischemie ontstaan. Bij open-hartchirurgie, waarbij bloedvaten gedurende enige tijd worden afgeklemd, kan dit onder andere het gevolg zijn. Ischemie initieert een cascade van biochemische reacties in cellen. Bij reperfusie komen reactieve verbindingen vrij, waaronder zuurstofmetabolieten. Het lichaam beschikt over anti-oxidantia die bescherming bieden tegen deze reactieve zuurstofmetabolieten. Indien het evenwicht tussen de gevormde zuurstofmetabolieten en de aanwezige anti-oxidantia verstoord is, kan beschadiging van cellen het gevolg zijn.

Een groep van 8 patiënten is bestudeerd op ischemie/reperfusie-schade tijdens open-hartchirurgie, met 3 tot 5 "bypass-anastomosis". De volgende parameters zijn gemeten:

- de purines hypo- en xanthine als indicatoren voor de rol van xanthineoxidoreductase in weefselbeschadiging
- malondialdehyde als eindproduct van de lipidenoxidatie
- Totale Antioxidantia Status (TAS) als maat voor de plasma antioxidantia activiteit
- urinezuur, eindproduct van de purine-afbraak
- albumine en hematocriet ter correctie van de hemodilutie.

Arteriële plasmamonsters, afgenomen vóór, tijdens en na de

operatie zijn geanalyseerd op deze parameters. Hypoxanthine, xanthine en malondialdehyde zijn bepaald in één run op een octadecylsilyl kolom met behulp van hogedruk vloeistofchromatografie volgens de methode van Lazzarino. Urinezuur, albumine en de hematocriet zijn bepaald met routine-technieken. De TAS is gemeten met behulp van de Randox kit.

Uit eerdere onderzoeksresultaten blijkt dat het bemonsteren uit een arterie een vergelijkbaar patroon geeft met het bemonsteren uit de Sinus Coronarius. De purine-concentraties liggen echter gemiddeld een factor drie lager. De purine-concentraties stijgen vóór de cardioplegie en nemen geleidelijk af na verwijdering van de klem. De toename in de TAS, na correctie voor hemodilutie, is voor een groot deel te verklaren door een stijging van urinezuur tijdens de operatie.

De malondialdehyde concentratie is kleiner dan de laagst te detecteren standaard concentratie (0,6 µmol/l), gedurende de gehele duur van de operatie. Gezien het feit dat malondialdehyde wordt gezien als een parameter voor de totale reperfusie-schade veroorzaakt tijdens de operatie, mogen we voorzichtig concluderen dat tijdens de operatie nagenoeg geen ischemie-schade wordt toegebracht aan de patiënt.

70. Fatty acid-binding protein as plasma marker of acute myocardial infarction: development of a rapid micro-particle-enhanced turbidimetric immunoassay

M. ROBERS¹, F.F. van der HULST¹, M.M.A.L. PELSERS¹, W. ROOS², H.G. EISENWIENER² and J.F.C. GLATZ¹
Department of Physiology¹, University of Limburg, Maastricht, Roche Diagnostic Systems², Basel

Fatty acid-binding protein (FABP) is a newly introduced plasma marker of acute myocardial infarction (AMI). The plasma concentration of FABP is significantly increased within 3 hours after AMI, similar to that of myoglobin, another early biochemical marker of myocardial injury. The assessment of the plasma ratio of myoglobin over FABP allows the discrimination between myocardial and skeletal muscle injury (Circulation 1995; 92: 2848-2854). We developed a rapid and sensitive homogeneous latex particle-enhanced turbidimetric immunoassay for FABP to be used in combination with an already existing immunoassay for myoglobin (UNIMATE 3 MYO, Roche). Monoclonal antibodies against human FABP (J Immunol Methods 1995; 183: 149-153) were coupled to latex particles. The combinations of monoclonal antibodies against FABP were optimised regarding agglutination, analytical sensitivity and form of the agglutination curve. The optimal latex reagent was found to be

a combination of 3 monoclonal antibodies bound to separate microparticles, and showed a dose-dependent agglutination both with recombinant and human FABP. The assay was performed on a conventional clinical chemistry analyser (COBAS MIRA Plus, Roche) with 25 µl sample volume. The reaction was monitored at 550 nm over a ten minute period. A linear calibration range could be obtained between 0 and 150 ng/ml FABP, and the assay sensitivity was around the normal plasma FABP value (2-3 ng/ml). When judged to be out of range of the calibration, the sample was automatically re-started after automatic dilution. The latex test showed a good correlation with a highly sensitive enzyme linked immunosorbent assay, but the performance time was much shorter (10 versus 45 min). The assay sensitivity and measuring range are suitable for routine measurement in clinical laboratories of plasma samples from patients with suspected AMI.

71. Fatty acid-binding protein as predictive non-enzymatic marker of acute myocardial infarct size in humans

K.W.H. WODZIG¹, M.M.A.L. PELSERS², M.P. van DIEIJEN-VISSER¹, J.A. KRAGTEN³, W.TH. HERMENS⁴, G.J. van der VUSSE², J.F.C. GLATZ²

Department of Clinical Chemistry¹, Academic Hospital Maastricht, Department of Physiology² and CARIM⁴, University of Limburg, Maastricht, and Department of Cardiology³, De Wever en Gregorius, Heerlen, the Netherlands.

Fatty acid-binding protein (FABP, 15 kD) is a small cytoplasmic protein abundantly present in heart and muscle cells. Being an intracellular equivalent of plasma albumin, FABP serves as carrier for fatty acids, which are important substrates for cardiac energy metabolism. Damage to myocardial tissue, for instance during myocardial infarction (AMI), will result in the release of FABP from cardiomyocytes into plasma (Glatz et al. Br Heart J 1994; 71: 135-140). The plasma kinetics of FABP closely resemble those of myoglobin (18 kD) in that significantly elevated plasma concentrations are found within 4 hours after AMI and that these return to normal values gene-

rally within 12-24 hours (Van Nieuwenhoven et al. Circulation 1995; 92: 2848-2854). These features make FABP a useful biochemical marker especially for the early assessment or exclusion of AMI, and for the monitoring of a recurrent infarction. Since FABP released from the heart after AMI is quantitatively recovered in plasma, FABP can also be applied for the estimation of infarct size. Moreover, FABP is much more rapidly released from myocardium into plasma, than creatine kinase (CK) and α -hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH), which implies the possibility of early prediction of infarct size. The present study compares infarct size, as determined from

the cumulative release of CK and HBDH over 72 hours, with infarct size as predicted from early elevations of FABP levels in plasma. A group of 17 patients with AMI receiving thrombolytic therapy (1.5E+6 U streptokinase in 40 min, 12,500 U heparin every 12 hours), to induce reperfusion, showed that: (i) Peak plasma concentrations of FABP, CK, and HBDH were reached after 4, 16, and 24 hours, respectively, following treatment. (ii) Cumulative release into plasma of CK and HBDH after 72 hours (Q72), expressed in gram equivalents of tissue per liter plasma using a total tissue content of 2163 U CK and 156 U HBDH per gram wet weight, were for CK 3.8 ± 0.7 g-eq/l and for HBDH 3.9 ± 0.7 g-eq/l (mean \pm SEM, n=17). Cumulative release into plasma of FABP after 24 hours, calculated using a total tissue content of 560 μ g FABP per gram wet weight, was 4.9 ± 0.9 g-eq/l (mean \pm SEM, n=17). (iii) Correlations (r) and standard errors of estimate (SEE) for prediction of cumulative release of FABP after 24 hours (Q24) from cumulative release after 4 (Q4), 6 (Q6), 8

(Q8), 10 (Q10), and 12 hours (Q12) were estimated (table 1). These data indicate the suitability of FABP as biochemical marker for the early diagnosis of AMI and for the early estimation of infarct size, i.e. calculation is already possible from samples taken up to 10 hours after onset of first symptoms.

Table 1. Correlations (r) and standard errors of estimate (SEE) for prediction of cumulative release (Q (t)) of FABP after 24 hours from cumulative release after t hours

Cumulative Release Q (t)	Correlation (r)	Standard Error of Estimate (SEE)	y = a x + b
Q(4)	0.59	72%	y = 1.13 x + 2.75
Q(6)	0.69	47%	y = 0.94 x + 1.95
Q(8)	0.92	25%	y = 1.16 x + 0.34
Q(10)	0.98	8%	y = 1.10 x - 0.02
Q(12)	0.99	5%	y = 1.03 x + 0.02

Interne Geneeskunde

72. Reumaserologie: een vergelijking van drie testmethoden

A.J. BAKKER¹, B. MULDER², H. STORM¹, T. de VRIES², V. de VRIJ²

Stichting Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden¹; voorheen Afd. Immunologie, Laboratorium voor de Volksgezondheid in Friesland², Leeuwarden

Voor de bepaling van de reumafactor kan gebruik gemaakt worden van diverse testmethoden. Voor de screening van patiënten in de 1^e en 2^e lijn werden (tot voor kort) op de afd. Immunologie drie testen naast elkaar uitgevoerd: de Waaler-Rose (Cello-gnost-RF, Behring; ref.waarde ≤ 50 kU/l), een nefelometrische RF test (BNA, Behring; ref.waarde ≤ 20 kU/l) en een IgM-RF ELISA (Malakit IgM-RF, Biolab; ref.waarde ≤ 15 kU/l). De patiëntenresultaten van deze drie testen zijn vergeleken.

Methoden: Van ruim 4800 patiënten werden serummonsters onderzocht met genoemde testen, die werden uitgevoerd overeenkomstig de richtlijnen van de leveranciers.

Resultaten: Bijna 4100 patiëntenmonsters waren negatief in alle drie testen (85%). Van de resterende monsters (15%) was één of meer van de resultaten positief. Van de 4199 negatieve resultaten met de BNA waren 4191 ook negatief in de Waaler-Rose. De resterende 8 uitslagen in de Waaler-Rose waren alle-

maal 100 kU/l. Van de 4186 negatieve uitslagen van de IgM-RF ELISA waren 4183 ook negatief in de Waaler-Rose (de andere 3 uitslagen waren 100 kU/l). Van de 4199 negatieve BNA monsters bleken er in de IgM-RF ELISA 4074 (97%) ook een negatieve uitkomst te hebben. De resterende 125 bleken allemaal < 100 kU/l te zijn in de IgM-RF ELISA (112 waren < 50 kU/l). Omgekeerd waren van de 4186 negatieve IgM-RF ELISA resultaten er 4070 (97%) die met de BNA een negatief resultaat gaven. Van de overblijvende 116 monsters waren de BNA resultaten op 2 na allemaal < 100 kU/l. De vergelijking van de monsters met positieve resultaten laat een goede correlatie zien.

Conclusies: Uitvoering van de Waaler-Rose heeft geen zin bij een negatief resultaat voor de BNA of IgM-RF ELISA. Het bepalen van de reumafactor met een IgM-RF ELISA heeft geen duidelijke voordelen boven de nefelometrische methode.

73. Ex vivo flowcytometrische detectie van apoptose in het circulerend bloed bij HIV positieve personen en bij patiënten met "hairy cell" leukemie na chemotherapie

E.M. KALSBEK-BATENBURG¹, I. VERMES¹, L.F. te VELDE², CHR.H.H. ten NAPEL² en C. HAANEN¹

Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en afd. Interne Geneeskunde², Medisch Spectrum Twente, Enschede

Bij het optreden van celdood (apoptose, necrose) wordt fosfatidylserine (PS), dat in viabele cellen gelokaliseerd is aan de cytosolzijde, geëxponeren aan de buitenkant van de celmembraan. Annexine V is een Ca²⁺ afhankelijk fosfolipide-bindend eiwit met een zeer hoge affiniteit voor PS. Bij celnecrose wordt de celmembraan direct poreus, terwijl tijdens apoptose de integriteit van de celmembraan intact blijft. Deze fenomenen vormen de basis voor een flowcytometrische bepaling, waarbij FITC-gelabeld Annexine V (groene fluorescentie) als bewijs dient voor het deceleren van PS-expositie en propidium iodide (PI) opname (rode fluorescentie van de kern) als bewijs voor celmembraan lekkage. Viabele cellen tonen geen fluorescentie (FITC-/PI-), apoptose gaat gepaard met PS-expositie bij intacte celmembraan (FITC+/PI-), necrose (type II) wordt gekenmerkt door PI opname (FITC+/PI+).

De beschreven flowcytometrische bepaling, is gevoelig en betrouwbaar ten aanzien van cellen *in vitro*. De vraagstelling was of deze bepalingmethode ook *ex vivo* bruikbaar zou kun-

nen zijn. Er werden twee categorieën patiënten onderzocht.

HIV-geïnfecteerde personen: De FITC-Annexine V/PI binding werd onderzocht aan vers bereide interfase cellen na Ficoll-paque gradient centrifugatie (d: 1.077) bij 8 HIV positieve personen en 8 gezonde vrijwilligers. Het percentage apoptotische cellen (FITC+/PI-) was in de HIV-groep $16,5\% \pm 10,2\%$, bij de gezonde personen was dit $6,1\% \pm 2,1\%$. Het percentage necrotische cellen (FITC+/PI+) was bij beide groepen minder dan 1,5%.

Hairy cell leukemie patiënten: Drie patiënten met hairy cell leukemie (HCL) werden behandeld gedurende 7 dagen met een continu infuus 2-chlorodeoxyadenosine (Cladribine). Tijdens deze kuur en gedurende twee weken na het beëindigen ervan werd dagelijks het perifere bloed onderzocht op apoptose / necrose fenomenen. Bij alle drie patiënten werd een sterke toename van apoptotische cellen in circulatie waargenomen (tot 40 %). De toename van apoptotische cellen in de circulatie hield aan tot ongeveer 10 dagen na het staken van de behandeling.

74. Potentiële parameters voor de activiteit van chronische inflammatoire darmziekten: een klinische evaluatie

J.W. JANSSEN¹, A.J.P. van TILBURG², P.M. BENNER² en P. VLOT¹

Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium¹ en Afdeling Inwendige Geneeskunde², Sint Franciscus Gasthuis, Rotterdam

De activiteit van chronische inflammatoire darmziekten (IBD) zoals colitis ulcerosa (CU) en morbus Crohn (MC) is soms moeilijk vast te stellen. Wij hebben bij patiënten met CU en MC de diagnostische waarde van CRP in plasma, lysozym in faeces en de bepalingen van albumine en leucocyten in faeces onderzocht. Deze uitslagen zijn vergeleken met de in de kliniek gehanteerde indices van de ziekteactiviteit bij deze patiënten: voor patiënten met CU is de index volgens Seo en voor patiënten met MC is de index volgens Best toegepast.

Van 37 patiënten met IBD (12 patiënten met CU, 35 faecesmonsters en 25 patiënten met MC, 90 faecesmonsters) zijn elke drie maanden 24 uurs faecesmonsters verzameld.

Index volgens SEO: Rectaal bloedverlies, ontlastingsfrequentie, BSE, Hb en serum albumine

Index volgens Best: Ontlastingsfrequentie, buikpijn, algeheel welbevinden, enkele andere specifieke klachten m.b.t. MC, anti-diarrhoica gebruik, palpabele massa in abdomen, Ht en lichaamsgewicht.

CRP in plasma immunoturbidimetrische methode Hitachi 717.

Lysozym in faeces Turbidimetrische bepaling met Micrococcus lysodeikticus als substraat (25°C).

Albumine in faeces Immunologische bepaling met colon albumine strip.

Leucocyten in faeces Strip voor de bepaling van leucocyteneesterase in urine.

Conclusie: Bij de bepaling van de ziekteactiviteit van chronische inflammatoire darmziekten is de waarde van de eenvoudig te hanteren leucostrip minimaal gelijk aan de waarde van de arbeidsintensieve bepaling van lysozym in faeces.

Parameter (cut-off waarde)	(UC)			
	Index volgens Seo		Index volgens Best (MC)	
	sensitiviteit	specificiteit	sensitiviteit	specificiteit
Lysozym (275 kU/L)	82%	89%	63%	74%
CRP plasma (8 mg/L)	57%	62%	88%	53%
Albumine (150 mg/kg)	88%	56%	50%	64%
Leucocyten (10*10 ⁶ /kg)	94%	62%	88%	61%

75. Ondersteuning van de diagnostiek van acute appendicitis door middel van klinische chemometrie

W.P. OOSTERHUIS¹, E.L. KOLDEWIJN² en J. HOOGBERGEN²

Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en afdeling Algemene Heelkunde², Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen

Met dit onderzoek werd nagegaan of de klinische chemometrie een verbetering kan bewerkstelligen in de diagnostiek van acute appendicitis. In de klinische chemometrie wordt met behulp van statistische technieken getracht objectieve gegevens optimaal te vertalen naar informatie. Deze benadering is toegepast bij patiënten die zich op de eerste hulp presenteerden met acute buikklachten, en waarbij de diagnose appendicitis werd overwogen. Er is een databestand opgebouwd van ruim 250 patiënten met verdenking appendicitis, waarvan de uitkomst bekend is (indien geopereerd: PA uitslag van de appendix, indien conservatief behandeld: het verdere klinische beloop). Op basis van deze gegevens (de leerset) werd een multivariate analyse uitgevoerd (discriminant analyse) waarbij de volgende gegevens statistisch significante diagnostische waarde hadden: leeftijd en geslacht patiënt, duur klachten, wel/niet braken, temperatuur, leukocyten en CRP. Deze gege-

vens werden gecombineerd tot een lineaire functie, waarmee de bevindingen bij nieuwe patiënten werden beoordeeld. Dit onderzoek diende ter validatie van deze functie bij een aantal nieuwe patiënten (de validatieset). Met deze gegevens kan in de leerset in 79% van de gevallen de diagnose wel/niet appendicitis correct worden gesteld. In de validatieset (50 patiënten) werd een percentage van 75% gehaald, waarmee de geldigheid van de discriminantfunctie in een andere populatie dan de leerset wordt aangetoond. Dat de juistheid van de interpretatie lager is dan 100% betekent dat er onvoldoende diagnostische informatie in de gebruikte data aanwezig is om de diagnose met zekerheid te stellen; aanvullend onderzoek door de arts blijft uiteraard noodzakelijk. Het is mogelijk om uitgaande van de gegevens van de patiënt de kans te berekenen dat sprake is van acute appendicitis. Op deze wijze vindt er een optimale interpretatie plaats van de laboratoriumresultaten.

76. Responses of bone resorption markers to bisphosphonate therapy in rheumatoid arthritis

L.W.J.J.M. WESTERHUIS¹, G.J.M. van VEEN² and H.H.M.L. HOUBEN²

Departments of Clinical Chemistry¹ and Rheumatology², Ziekenhuis De Wever & Gregorius, Heerlen, the Netherlands

Rheumatoid arthritis (RA) is associated with bone erosions. By now, it is known that this bone resorption can be suppressed by the use of bisphosphonates such as APD (aminohydroxypropylidene bisphosphonate).

In the literature, the suppressive effect of bisphosphonates on bone resorption in RA was studied using only hydroxyproline as the principal biochemical marker.

However this parameter is not very specific for bone because it is derived from the total collagen pool of the body and has thus several drawbacks.

In the present study we assessed the suppressive effect of APD

on bone resorption in RA patients by measurement of some new biochemical markers such as ICTP (carboxy terminal telopeptide of type 1 collagen) and urinary DPD excretion (deoxypyridinoline crosslinks of type 1 collagen). The latter parameter was measured with a very recently introduced enzyme immunoassay. Also calcium excretion in urine and serum TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) were measured.

Results and discussion: At the start of the study the urinary calcium and hydroxyproline excretion and the values of TRAP were within the normal reference ranges. Two patients had slightly increased DPD values (8.8 and 7.6 nmol/mmol creati-

nine) in comparison with the reference range (2.5-6.5 nmol/mmol creatinine) and the basic mean ICTP value (7.0 ± 2.5 $\mu\text{g/L}$) in our patient group was above the normal range (1.8-5.0 $\mu\text{g/L}$), see table 1.

After a single APD infusion the hydroxyproline and calcium excretion as well as serum TRAP were declining not statistically significant. Serum ICTP and urinary DPD excretion show a significant and pronounced decline consistent with a suppression of bone resorption.

The suppression reaches a maximum of 75-78% of initial values. Only when the bone resorption was assessed with TRAP a suppression to only 92% of the initial value is obtained.

In our patient group we did deliberately not prescribe a diet, so

it is not surprising that the hydroxyproline excretion is rather fluctuating. This demonstrates the generally accepted disadvantage of the use of hydroxyproline as a biochemical bone resorption marker.

As a biochemical marker, urinary DPD excretion shows some advantage because the decline is rapidly and the DPD excretion normalises quickly to baseline values.

ICTP follows the same significantly declining pattern, although the decline is more slowly in comparison with the DPD excretion. Moreover, in the investigation period of eight weeks ICTP remains low and does not return to baseline.

Assessment of DPD cross-links in urine may provide therefore a promising measure for follow-up studies and for efficacy of anti-resorptive drug therapy in RA.

Table 1. Parameters of bone resorption before and after infusion with APD*

Parameter units	specimen	base line	weeks after infusion			
			1	2	4	8
TRAP U/l	serum	2.45 \pm 0.39	2.32 \pm 0.35 p=0.06	2.25 \pm 0.41 N.S.	2.45 \pm 0.47 N.S.	2.46 \pm 0.45 N.S.
ICTP $\mu\text{g/l}$	serum	7.0 \pm 2.5	6.6 \pm 2.3 p=0.07	5.4 \pm 1.7 p<0.001	5.8 \pm 2.0 p<0.001	5.9 \pm 2.5 p<0.001
DPD/Cr nmol/mmolCr	urine	5.5 \pm 1.9	3.9 \pm 1.1 p<0.01	4.5 \pm 2.3 p<0.05	4.7 \pm 1.8 N.S.	5.1 \pm 2.3 N.S.
OHP/Cr nmol/10 mmol Cr	urine	0.23 \pm 0.09	0.18 \pm 0.09 N.S.	0.20 \pm 0.10 N.S.	0.18 \pm 0.08 p<0.05	0.23 \pm 0.11 N.S.
Ca/Cr nmol/10 mmol Cr	urine	3.35 \pm 2.93	2.67 \pm 3.62	2.72 \pm 2.52	2.71 \pm 2.54	2.93 \pm 2.47

*: values are means \pm S.D.; a p-value < 0.05 indicates a from base line statistically different value; N.S.: not statistically significant (p>0.1)

77. De zin van de meting van de isoamylase S/P-ratio bij patiënten met diabetes mellitus type 1 en 2

J.L. WILLEMS¹, C.G.J. SWEEP¹, A. van DIEPENBEEK¹ en J. LUTTERMAN²

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Afdeling Algemene Interne Geneeskunde² van het Academisch ziekenhuis Nijmegen St. Radboud

De glomerulaire basaalmembraan is in staat de doorlaatbaarheid te regelen op basis van ladingsverschillen. Aangetoond is dat er een verhoogde isoamylase S/P-ratio (speeksel(S)- en pancreas(P)- isoenzym van amylase) bestaat bij patiënten met nierziekten en proteinurie (1). In 1994 publiceerden Recio et al. (2) een artikel over een toename van de S/P ratio bij patiënten met diabetes mellitus type 1 van belang voor de vroege opsporing van veranderingen in het filtratiemechanisme.

Wij hebben de S/P ratio bepaald bij patiënten met diabetes mellitus type 1 en 2 volgens de methode van O'Donnell et al. (3). Daarvoor zijn de isoamylases gemeten in bloed en urine van dezelfde dag in combinatie met albumine in de urine. De klaring van de zowel S- alsook P-amylase is daaruit berekend en vervolgens is S/P-ratio berekend. De resultaten staan vermeld in de tabel 1. Significantie werd bepaald met de Student-

T toets waarbij een significantie grens van 0,01 gehanteerd werd (Bonferroni correctie).

Onze resultaten kunnen de bevindingen van Rechio et al. (2) niet bevestigen. Zij vonden voor type 1 diabetes en controles een S/P ratio van 0,49 respectievelijk 0,34. Ook voor type 2 diabetes vs de controle groep konden wij geen significante verschillen aantonen. Wij twijfelen er dus sterk aan of de meting van de S/P ratio bij deze patiënten een betere voorspellende waarde heeft dan de meting van de microalbumine voor de vroege opsporing van diabetische nefropathie. Bij diabetes werden wel meer hogere S/P ratio's gevonden.

Literatuur

1. Wetzels J et al. Clin Chem 1988; 34: 589-91
2. Rechio F et al. Kidney Int 1994; 46 suppl 47: S89-92
3. O'Donnell MD et al. Clin Chem 1977; 23: 560-6

Tabel 1.

Gemiddelde (range)	controle (27)	type 1 (31)	type 2 (26)	controle vs type1	controle vs type2
Kreatinine klaring (ml/min)	108 (66-148)	97 (55-158)	79 (25-136)	NS	p<0,001
P-amylase klaring (5)	4,7 (2,1-6,5)	4,8 (2,0-9,1)	3,9 (0,3-9,6)	NS	NS
S-amylase klaring (5)	1,6 (0,9-4,2)	1,7 (0,5-3,2)	1,8 (0,2-4,0)	NS	NS
Micro-albumine (mg/l)	8 (2-28)	40 (4-205)	72 (7-578)	p<0,001	p<0,001
S/P ratio	0,33 (0,20-0,54)	0,34 (0,11-1,2)	0,46 (0,17-3,3)	NS	NS

78. The xanthinuria in a patient with molybdenum cofactor deficiency is not reduced by allopurinol

A.H. van GENNIP¹, H. MANDEL², A. van CRUCHTEN¹ and N.G.G.M. ABELING¹

Academic Medical Center, Depts. of Pediatrics and Clinical Chemistry¹, Amsterdam, the Netherlands, Rambam Medical Center, Dept. of Pediatrics², Haifa, Israel

Molybdenum-cofactor (MCF) deficiency leads to the combined deficient activities of sulphite oxidase, aldehyde oxidase (AO) and xanthine dehydrogenase (XD). The deficient XD activity leads to xanthinuria and some patients even present with xanthine calculi. We diagnosed a 2 month old boy who already had urinary calculi. An allopurinol loading test (10 mg/kg b.w. orally) was performed in order to see whether a. the xanthine (X) to hypoxanthine (H) ratio could be altered in favour of the more soluble H; b. allopurinol could be converted into oxipurinol. The parents were also loaded for comparison. Urinary X, H, allopurinol (A), allopurinol-riboside (AR) and oxipurinol (O) were analysed by HPLC with UV-detection. The results showed that our patient did respond with

a slightly decreased but not reversed X/H ratio, and this appeared to be caused by an increased excretion of H but not decreased excretion of X. Moreover, in contrast to his parents he did not excrete O and excreted much more AR. These findings suggest that: 1. AO plays a role in vivo in the conversion of A into O; 2. AO plays a role in vivo in the conversion of H into X; 3. the reduction of PRPP availability for the conversion of H into IMP by the formation of AR contributes to the decreased X/H ratio in the XD deficient responders to treatment with A. According to literature only patients with isolated XD deficiency do respond to A by reversed X/H ratio, but this is not the case in patients with combined XD and AO, or MCF deficiency.

80. Subcellular localisation of dihydropyrimidine dehydrogenase

A.B.P. van KUILENBURG, H. van LENTHE and A.H. van GENNIP

Academic Medical Center, University of Amsterdam, Divisions of Clinical Chemistry and Pediatrics, Amsterdam, the Netherlands

Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) is the initial and rate-limiting enzyme in the catabolism of the pyrimidine bases thymine and uracil. DPD is also responsible for the breakdown of the widely used antineoplastic agent 5-fluorouracil, thereby limiting the efficacy of the therapy. Patients with a deficiency of DPD suffered from severe neurotoxicity including death, following 5-fluorouracil chemotherapy. Recently, we provided the first evidence at the molecular level that the mRNA of a patient with a deficiency of DPD lacked a segment of 165 nucleotides that resulted from exon-skipping (1). The activity of DPD can be detected in a variety of tissues but its precise subcellular localisation is not known.

To determine the localisation of DPD we prepared crude subcellular fractions of a rat liver homogenate by means of differential centrifugation. In the fractions obtained [heavy

mitochondrial, light mitochondrial, microsomal and cytosolic] the activity of different marker enzymes was measured as well as the activity of DPD. These results showed that almost all of the activity DPD was located in the cytosolic fraction. To exclude any particulate-associated DPD, the light mitochondrial fraction was subsequently subjected to equilibrium density gradient centrifugation. The distribution profile of the activity of DPD and the various marker enzymes indicated that DPD was exclusively located in the cytosol since no significant activity of DPD could be detected in any subcellular organelle.

References

1. Meinsma R, Fernandez-Salguero P, Kuilenburg ABP van, Gennip AH van and Gonzalez FJ. DNA Cell Biol 1995; 14: 1-6.

81. CDTECT® bij de diagnose van het Koolhydraat Deficiënt Glycoproteïne Syndroom en Galactosemie

J. van PELT¹, M.H. VELMANS¹, J.A. BAKKER² en L.J.M. SPAAPEN²

KCHL, st. Maartens Gasthuis, Venlo¹ en Stichting Klinische Genetica Maastricht²

De erfelijke multisysteemziekte 'Koolhydraat Deficiënt Glycoproteïne Syndroom (CDGS) wordt biochemisch gekarakteriseerd als een defecte glycosylering van velelei glycoproteïnen. Voor de diagnostiek is de deficiënte glycosylering van transferrine het belangrijkste, hetgeen door middel van iso-electric focusing electroforese (ISE) van serum sialotransferrines onderzocht wordt. Ook bij Galactosemie zijn afwijkingen in de glycosylering van een aantal glycoproteïnen waaronder transferrine beschreven, die ook met ISE kunnen worden aangetoond. Hoewel de afwijkende serum sialotransferrine patronen bij onbehandelde galactosemiepatiënten vergelijkbaar zijn met die van CDGS-patiënten zijn deze afwijkingen waarschijnlijk secundair.

Wij onderzochten of een commercieel verkrijgbare test voor de detectie van Koolhydraat Deficiënt Transferrine (CDTECT®, Pharmacia) bruikbaar is voor de diagnose van genoemde aandoeningen. De CDTECT®-bepaling is een EIA-microtiterplaat methode ontwikkeld voor de vaststelling van chronisch alcoholmisbruik.

Serum van 175 neonaten, 5 Galactosemie patiëntjes vóór behandeling en 3 CDGS patiënten werd gebruikt voor de bepaling van CDTECT en (totaal) transferrine. In de eerste levensdagen blijkt de CDTECT-concentratie sterk verhoogd te zijn. In navelstrengbloed werd gemiddeld 55 U/l gevonden (referentiewaarden $m \leq 20$; $v \leq 25$), hetgeen daalde tot ± 23 U/l vanaf een leeftijd van \pm twee weken. Zoals verwacht bleken de CDGS patiënten (ouder dan 1 maand) veel hogere CDT-concentraties te vertonen respectievelijk 102, 214 en 267 U/l. Ook de Galactosemie patiëntjes hadden verhoogde CDT-concentraties vergeleken met de referentiewaarden (per leeftijdsdag!): respectievelijk 78,79, 49, 34 en 37 U/l (bloedafname op dag 7,8, 10, 12 en 14). Daar de galactosemie patiëntjes ook sterk verlaagde transferrine concentraties hadden (respectievelijk 12, 11, 4, 9 en 14 μ mol/l), bleek het berekenen van de verhouding CDT/Transferrine het verschil tussen Galactosemie en normaal groter te maken.

Concluderend kan gesteld worden dat de kwantitatieve en semi-automatische CDTECT-test bijzonder bruikbaar is bij de metabole screening op CDGS en Galactosemie.

82. A point mutation in an invariant splice donor site leads to exon skipping in two unrelated Dutch patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency

P. VREKEN, A.B.P. van KUILENBURG, R. MEINSMA and A.H. van GENNIP

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

Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency is an autosomal recessive disease characterized by thymine-uraciluria and associated with a variable clinical phenotype. In order to identify the molecular defect underlying complete DPD deficiency in a Dutch patient previously shown to have a 165 basepair deletion in the mature DPD mRNA, caused by exon skipping (1), we cloned the genomic region encompassing the skipped exon and its flanking intron sequences. Sequence analysis revealed that the patient was homozygous for a single G→A point mutation in the invariant GT dinucleotide splice donor site downstream of the skipped exon. The G→A point mutation reduces the Senopathy consensus value from 0.864 (wild-type) to 0.682 (mutant) for the 5' splice donor sequence. As a consequence, the upstream exon is no longer recognized by the splicing machinery and skipped, in good agreement with the effect of similar mutations in other human genes. The

same mutation was identified in another, unrelated, homozygous Dutch patient, suggesting some kind of homogeneity for this mutation in the Dutch population. Because this mutation destroys an unique MaeII restriction site, rapid screening using restriction enzyme cleavage of the amplified genomic region encompassing this mutation is possible. In three additional Dutch patients and three Turkish patients with complete DPD deficiency, this mutation was excluded as cause of their disease. Analysis of 50 control samples did not reveal any carriers for this mutation.

Literature

1. Meinsma R, Fernandez-Salguero P, Kuilenburg ABP van, Gennip AH van, Gonzalez FJ. Human polymorphism in drug metabolism: Mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene results in exon skipping and thymine uraciluria. *DNA Cell Biol* 1995; 14: 1-6.

83. A new case of tyrosine hydroxylase deficiency

R.A. WEVERS¹, J.F. de RIJK-van ANDEL², F.J.M. GABREELS¹, B. LUDECKE³, N. BLAU⁴, K. BARTHOLOME³

Institute of Neurology, University Hospital Nijmegen¹, the Netherlands, Ignatius Hospital Breda², Kinderklinik Bochum³, Kinderspital Zürich⁴

A 2-year old boy of healthy non-consanguineous dutch parents presented with severe psychomotor retardation, hypokinesia with an expressionless face, hypertonic tetraparesis and some hypersalivation. There was no tremor and no ptosis. The head circumference is on the P3. The EEG showed a monotonous background pattern. Neuroimaging of the brain (CT and MRI) was without abnormalities.

In CSF the concentration of homovanillic acid was low (117 and 97 nM on two occasions, reference 400-700) with normal 5-HIAA, neopterin, biopterin, phenylalanine and tyrosine. CSF Moprog, epinephrine, norepinephrine and dopamine were all below the reference range. In urine both HVA and VMA were low. Dihydropteridine reductase activity in blood was

normal. These findings suggest that the child has tyrosine hydroxylase deficiency. The child showed a rapid favourable response to treatment with L-Dopa combined with carbidopa (total dose 3 mg/kg/day and 0.75 mg/kg/day).

A point-mutation in the tyrosine hydroxylase gene was found in the child and in his mother. It was not present in 50 normal controls. Both the mother and the child were heterozygotes for this mutation. We suspect that the boy is a compound heterozygote. A second mutation has not yet been found, but the gene has not been investigated completely. A first patient with definite tyrosine hydroxylase deficiency has been described by Lüdecke et al (*Hum Genet* 1995; 95: 123-25).

84. Lang-keten 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiëntie: ontwikkeling van een methode ter identificatie van de G1528C-mutatie in genomisch DNA, expressie van het mutante enzym en lokalisatie van het gen op chromosoom 2p24.1-23.3

L. IJLST, J.P.N. RUITER, J.M.N. HOOVERS, M.E. JAKOBS en R.J.A. WANDERS

Universiteit van Amsterdam, Academisch Medisch Centrum, Klinische Chemie, Kindergeneeskunde en Antropogenetica, Amsterdam

Oxidatie van vetzuren in mitochondriën is een ingewikkeld katabool proces waarbij vetzuren gesplitst worden in acetylunits en propionylunits die vervolgens via de Krebs-cyclus tot CO₂ en H₂O worden omgezet. Het mitochondriale β -oxidatie proces impliceert de actieve betrokkenheid van een groot aantal enzymen en transport-systemen zoals de carnitine/acyl-carnitine transporter.

Eén van de β -oxidatie enzymen betrokken bij de oxidatie van lang-keten vetzuren is het mitochondriale trifunctionele proteïne (MTP) dat drie enzymactiviteiten bevat: enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase en thiolase activiteit. In 1989 identificeerden wij samen met anderen een patiënt met een deficiënte lang-keten 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activiteit terwijl de 2 andere componenten van het MTP (enoyl-CoA hydratase en thiolase) normaal actief bleken. M.b.v. immunoblotting, immunofluorescentie en andere technieken vonden wij dat het MTP in cellen van de patiënt normaal geassembleerd was. Deze bevindingen suggererden dat we hier te maken hadden met een mutatie in het gen koderend voor de α -subunit van MTP die het enzym katalytisch

inactief maakt doch niet tot een instabiel enzym aanleiding geeft. Analyse van het cDNA toonde een mutatie aan op positie 1528 (G→C) die aanleiding geeft tot een glutamaat → glutamine substitutie (IJlst et al. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1215: 347-350). Wij hebben nu een methode opgezet die identificatie van de G1528C-mutatie mogelijk maakt in genomisch DNA hetgeen m.n. ernstig bemoeilijkt werd door de aanwezigheid van een pseudo-gen. Met deze nieuw ontwikkelde methode hebben wij de frequentie van de G1528C-mutatie kunnen bepalen in 55 patiënten zoals door ons enzymatisch geïdentificeerd: wij vonden een allel-frequentie van 87%. Een groot voordeel van deze methode is dat deze ook gebruikt kan worden in "blood-spots" met vanzelfsprekend grote toekomstige implicaties.

In tweede instantie hebben wij door expressie van het mutante enzym in *S. cerevisiae* eenduidig laten zien dat de G1528C-mutatie het enzym katalytisch inactief maakt. Tenslotte werd het gen koderend voor de 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase component van het mitochondriale trifunctionele proteïne (MTP) m.b.v. FISH gelokaliseerd op chromosoom 2p24.1-23.3.

85. ¹H-NMR spectroscopy of body fluids in two patients with a creatine biosynthesis defect

R.A. WEVERS¹, STOCKLER³, U. ENGELKE¹, A. HEERSCHAP², A. SCHULZE⁴, D. RATING⁴ and F. HANEFELD³
Institutes of Neurology¹ and Radiology², University Hospital Nijmegen, Nijmegen, the Netherlands; Institute of paediatrics, University Hospitals Göttingen³ and Heidelberg⁴

Recently a new inborn error was described in the biosynthesis of creatine at the level of guanidinoacetate-methyltransferase (1). The patient had a complete deficiency of creatine in the brain. We had the opportunity to study urine, blood plasma and cerebrospinal fluid (= CSF) of this patient and of a second case with this defect with ¹H-NMR spectroscopy at 600 MHz. Both the creatine- and the creatinine resonances are lacking completely in the patient's CSF samples. Resonances of these metabolites were always present in CSF samples of 40 patients with other neurological diseases (2). Guanidinoacetic acid, the expected storage product in this disease, could not be quantified reliably because of the coinciding acetic acid resonance. Creatine was not detectable in urine of our 2 patients. Its

concentration in plasma was low. Creatinine in plasma was also low. In urine, however, the creatinine concentration can be completely normal. Dietary intake may explain this. Creatinine in urine is unreliable as diagnostic parameter in this disease. In our 2 patients the low values of both creatine in plasma, urine or CSF and creatinine in plasma and CSF were indicative for the diagnosis.

References

1. Stöckler S et al. *Ped Res* 1994; 36: 409-13.
2. Wevers RA et al. *Clin Chem* 1995; 41: 744-751.

Gynaecologie en Obstetrie

86. Urinaire uitscheiding van follikel stimulerend hormoon (FSH): een alternatief voor het meten van ovariële reserve

G.J.E. OOSTERHUIS¹, I. VERMES², C.B. LAMBALK³ en J. SCHOEMAKER³

Afdeling Gynaecologie en Obstetrie¹ en Klinisch Chemisch Laboratorium², Medisch Spectrum Twente, Enschede en Afdeling Gynaecologie en Obstetrie³, Academisch Ziekenhuis Vrije Universiteit, Amsterdam

Teneinde de ovariële reserve van een vrouw te bepalen wordt de basale FSH spiegel in bloed gemeten op cyclusdag 3. Eén enkele bloedbepaling is als gevolg van een fluctuerende FSH uitscheiding echter niet erg betrouwbaar. Seriële meting heeft als nadelen dat het belastend en duur is. Wij onderzochten de mogelijkheid de urinaire FSH uitscheiding te meten als maat voor de ovariële reserve. De urine werd verzameld in een plastic container zonder toevoeging en bewaard bij 4°C. Bij een bewaartemperatuur van -20°C werd een snel verlies van FSH immunoreactiviteit (FSHi) gezien. FSHi bepalingen in zowel geëxtraheerde als niet geëxtraheerde monsters zijn binnen 24 uur na inlevering verricht. Extractie van de aan pH 4,5 aangepaste monsters is gedaan met aceton. De FSHi bepalingen werden verricht met behulp van een AxSYM random access immunoassay analyzer (Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill, USA) door middel van een MEIA kit. De sensitiviteit was 0,09 mU FSHi/ml. Seriële verdunning van monsters met een hoge FSH concentratie gaf een lineaire verdunningscurve in het gebruikte concentratiegebied (0-150 mU/ml). De analyti-

sche recovery werd gemeten door bekende concentraties FSH zowel aan geëxtraheerde als aan niet geëxtraheerde monsters toe te voegen en was tussen de 92% en 99%. De correlatie tussen FSHi concentraties in geëxtraheerde en niet geëxtraheerde monsters was hoog. Wij vonden urinaire FSHi concentraties van $3,7 \pm 2,6$ mU/mg creatinine in prepuberale kinderen (leeftijden 5-9 jaar, n=10), $5,7 \pm 2,8$ in mannen (leeftijden 18-36 jaar, n=16), $17,1 \pm 7,1$ in premenopausale vrouwen gedurende de folliculaire fase van de cyclus (leeftijden 19-28 jaar, n=14) en $78,7 \pm 15,8$ in postmenopausale vrouwen (leeftijden 46-62 jaar, n=18). Bij premenopausale vrouwen vonden we FSHi concentraties in de ochtendurine op de dag van de ovulatie (gemeten door middel van LH-detectie in een spontane cyclus) die gemiddeld $4,2$ (2,8-6,0) maal hoger waren dan drie dagen later (leeftijden 30-35 jaar, n=4). Het bepalen van urinaire FSH is non-invasief, gemakkelijk, analytisch betrouwbaar en zou een goed alternatief kunnen zijn om de ovariële reserve van een vrouw te bepalen.

Kwaliteitsbewaking, data handeling, referentiewaarden en statistiek

87. Kalibratie versus Standaardisatie; Een praktische aanpak voor interlaboratorium variatie reductie

H. BAADENHUIJSEN, R. SCHOLTEN, C.W. WEYKAMP, H. STEIGSTRA, J.L. WILLEMS en R.T.P. JANSEN
Stichting SKZL, Nijmegen

De onacceptabel grote interlaboratorium variatie van klinisch chemische uitslagen, met name bij de enzymbepalingen, frustrert een eenduidige interpretatie van de resultaten. De hoogte van deze interlaboratorium variatie wordt maar zeer ten dele ten gunste beïnvloed door het aanbrengen van methode-stratificatie. Tot nu toe hebben pogingen om de hoge interlaboratorium variatie te verkleinen zich voornamelijk geconcentreerd op de implementatie van methodologische aanbevelingen. Het in beeld brengen van de interlaboratorium variatie, door middel van het uitvoeren van externe kwaliteitsbewaking, wordt

ten slotte ook nog bemoeilijkt door het niet-commuteerbaar zijn van de gebruikte controlesera in de externe enquêtes. In lijn met recent gepubliceerde suggesties voor verbetering van beschreven situatie door gebruik te maken van kalibratoren, presenteren we de resultaten van een interlaboratorium kalibratie experiment waarin de resultaten van enzymbepalingen worden herberekend op basis van een gezamenlijke enzym kalibrator. Voorafgaande experimenten toonden aan dat in het geval van ASAT en ALAT verrijking van beoogde kalibratoren met preparaten afkomstig van varkenshart geschikt waren.

De resultaten voor Alk. Fosfatase, LD, γ GT, CK en Amylase werden echter in negatieve zijn beïnvloed als gebruik gemaakt werd van enzymtoevoegingen van niet-humane oorsprong. De oplossing voor genoemde vijf enzymen werd gevonden in het gebruik van gevriesdroogde kalibratoren, afkomstig van patiëntmateriaal geselecteerd op grond van hun verhoogde enzym activiteitswaarden. De kalibratielijns werd geconstrueerd op basis van deze (verhoogde) serumpool en twee verdunningen daaruit met een lage basale humane pool. De resultaten van een rondzending waarin 11 laboratoria deelnamen, met

evenredige vertegenwoordiging van verschillende methodes en apparaten (Boehringer Mannheim Hitachi; Dupont Dimension; Bayer Axon; Johnson&Johnson Ektachem en Beckman Synchron), die de betreffende calibratoren en 14 verse patiëntensera analyseerden waren als volgt (nominale activiteit (U/l), tussen-lab CV vóór en na kalibratie): *Alk. Fosf.*: 150, 16.7%, 4.2%; *ASAT*: 50, 35%, 8%; *ALAT*: 50, 30%, 5%; *LD*: 300, 27%, 8.5%; *CK*: 100, 33%, 7.5%; γ GT: 200, 25%, 5% en *Amylase*: 100, 40%, 10%. Momenteel loopt er een studie naar de lange-termijn stabiliteit van deze kalibratoren.

88. Real time kwaliteitsborging van satellietlaboratoria via het ziekenhuis netwerk

J.W. JANSSEN, L.A.J. BUIJS-CUPEDO, J.A.W.M. VERBAKEL, N. van TILBURG en J.P. PATTINAMA
Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium, St Franciscus Gasthuis, Rotterdam

Wij hebben een systeem mede ontwikkeld waarmee de analyse dichtbij de patiënt plaatsvindt en de kwaliteit van de analyse door analisten op het laboratorium continu en real time geborgd wordt. Het betreft bloedgas en elektrolyt analyzers die via het ziekenhuisnetwerk verbonden zijn met een geavanceerde data-manager, het 3C systeem (Ciba Corning, Houten). Real time worden de gegevens van kalibratie en QC, de patiëntresultaten en de foutmeldingen vanuit de analyzers doorgegeven. De patiëntresultaten worden via het laboratorium computersysteem Labosys (Philips, Eindhoven) aan het ziekenhuis informatiesysteem Systeem A (SMS, Nieuwegein) doorgegeven.

Om dit te kunnen realiseren hebben wij aan een drietal items veel aandacht besteed:

- humane aspect. Een intensieve samenwerking tussen onze medewerkers en medewerkers van: Ciba Corning, de IC, verkoper en verloskonde, de afdeling automatisering en van Philips.
- analytische aspect. Analyzers moeten behalve analytisch juist en reproduceerbaar presteren ook gemakkelijk en robuust in het gebruik zijn (analytische evaluatie).
- het elektronische aspect. De analyzers moeten in een netwerk omgeving kunnen werken. Het 3C systeem op het KCHL moet aan elke analist snel inzicht verschaffen over de status van de analyzers. Tevens moet detailinformatie over de historie van de analyzer grafisch beschikbaar zijn.

Het systeem, dat nu operationeel is, biedt ons de volgende mogelijkheden:

- Real time een overzicht van de status van de analyzers op de satellietlaboratoria gedurende 24 uur per dag. Detailinformatie van meerdere weken tot op kalibratieniveau.
- Bij problemen:
 - vraagt de kliniek de analist om in het 3C systeem mee te kijken en suggesties voor oplossingen te doen (vakinhoudelijke ondersteuning).
 - signaleert de analist zelf het probleem en onderneemt actie.
- De actie op afstand kan achtereenvolgens bestaan uit:
 - uitvoeren van een wasprocedure of een kalibratie. Telefonisch contact opnemen met satellietlab met het advies: gebruik analyzer niet meer, maar stuur bloedgasspuiten naar het laboratorium. Om vergissingen te voorkomen kan de analyzer op afstand geheel of gedeeltelijk geblokkeerd worden.
 - Eventueel op later tijdstip:
 - Technisch analist repareert ter plaatse of plaatst een identieke back-up analyzer.

Conclusie: Ook bij decentrale, point of care testing kan het laboratorium haar professionele taak van vakinhoudelijke ondersteuning van de zorg gedurende 24 uur per dag waarborgen.

Diversen en late inzendingen

89. Evaluatie van de Roche Unimate HbA_{1c} immunoassay

TJ. de HAAN, E. LENTERS-WESTRA en K. MIEDEMA
Laboratorium, Ziekenhuis De Weezenlanden, Zwolle

De Roche Unimate HbA_{1c}-bepaling is een geautomatiseerde, turbidimetrische methode gebaseerd op reactie van monoclonale antilichamen tegen het HbA_{1c}-epitop. Hierbij wordt tijdens de hemolyse van het monster tegelijk de hemoglobineketens proteolytisch gesplitst, waarbij een betere expositie van het HbA_{1c}-epitop plaatsvindt. Standaardisatie van het HbA_{1c}-kanaal vindt plaats met behulp van een set synthetische glycopeptides.

De prestaties van de Unimate HbA_{1c}-bepaling zijn geëvalueerd na applicatie van de bepaling op een Hitachi 717 analyser; gedurende het gehele onderzoek is gebruik gemaakt van een hemolysestap buiten de automaat.

Met behulp van het ontwikkelde applicatievoorschrift blijkt de Unimate HbA_{1c}-bepaling niet Hb-afhankelijk, waardoor verschillende verdunningen mogelijk zijn. De reproduceerbaarheid binnen de serie is zeer goed, nl. 0,6 - 0,9 en 2,8% VC (n=10) bij HbA_{1c}-niveau's van resp. 4,7 - 7,7 en 12,5%. Ook de tussenserie reproduceerbaarheid is, gemeten aan verschil-

lende controle materialen, bevredigend, nl. 0,9 tot max. 2,3%. De correlatie met andere, gebruikelijke technieken is uitstekend. Na DCCT-kalibratie m.b.v. de SKZL-kalibratoren is de regressie met de affiniteitsmethode volgens Pierce: $y_R = 0,09 + 0,97x_P$ (n=70, r=0,989). Gebruik van de SKZL-kalibratoren levert een geringe correctie van de Unimate HbA_{1c}-resultaten, alhoewel de test volgens de fabrikant reeds DCCT gestandaardiseerd is.

De onderzochte methode blijkt lineair over het totaal onderzochte meetbereik (3-15% HbA_{1c}) en wordt bij niet-diabeten niet gestoord door Hb-varianten. Deze eigenschappen maken de Unimate HbA_{1c}-test tot een snelle, gemakkelijke en nauwkeurige methode voor de bepaling van HbA_{1c}. De mogelijkheid de bepaling te kalibreren op de DCCT-resultaten en een aparte applicatie te ontwikkelen voor routine chemie-analysers maakt de methode uiterst geschikt voor de dagelijkse routine in klinisch-chemisch laboratoria.

90. De bepaling van cANCA, pANCA en ANA bij verdenking op autoimmuun gemedieerde vasculitiden

L.D. DIKKESCHEI, A.J. PIETERS-KOMDUUR, A.M. EDELAAR, H.L. STEENDIJK, J.M. KAMPHUIS en E.J.G.M. VAN VOORST TOT VOORST.

Klinisch chemisch en hematologisch laboratorium, Ziekenhuis De Weezenlanden, Zwolle

Gegeneraliseerde autoimmuunziekten zoals SLE en RA kunnen evenals sommige infectieziekten en overgevoeligheidsreacties op medicijnen geven, gepaard gaan met systemische necrotiserende vasculitis. Daarnaast bestaan er ook primaire vormen van vasculitis zoals polyarteriitis nodosa, ziekte van Wegener en het syndroom van Churg-Straub. Met het aantonen van antineutrofiële cytoplasmatische antistoffen (ANCA's) heeft het onderzoek naar de immunologische component van de primaire vasculitiden een flinke impuls gekregen.

Methode: Monsters van patiënten met verdenking op vasculitis worden op ANCA's gescreend met behulp van een commerciële immuun fluorescentie test (Inova). Polymorfonucleaire leucocyten (PMN's) zijn in deze test met ethanol op objectglasjes gefixeerd. Alhoewel alle ANCA's gericht zijn tegen antigenen in de granulae van de PMN's in het cytoplasma, migreren een aantal specifieke antigenen ten gevolge van de ethanol fixatie naar de kern.

Op basis van dit fixatie artefact worden de ANCA's ingedeeld als zijnde cytoplasmatisch, perinucleair of atypisch. Aangezien antinucleaire antistoffen (ANA's) ook een nucleair fluorescentie patroon veroorzaken op ethanol gefixeerde PMN's is van ieder monster met een pANCA ook een ANA (op Hep-2 cellen) ingezet. pANCA's reageren per definitie niet met Hep-2 cellen cq celkernen.

Resultaten:

Totaal aantal onderzochte ANCA monsters	465
Positief:	201 (43%)
waarvan cANCA	66
pANCA	59
atypisch	76
Negatief:	264 (57%)

Van de 59 positieve pANCA's blijken er 14 ook een positieve ANA reactie te vertonen. Hieruit volgt dat bij het uitsluitend testen van ANCA's in 24 % van de gevallen een pANCA ten onrechte als positief wordt afgegeven.

Conclusies:

- Van de positieve p-ANCA reacties blijkt 24 % te worden veroorzaakt door ANA's.
- Het rapporteren van een positieve p-ANCA uitsluitend op basis van immuunfluorescentie op ethanol gefixeerde PMN's is een kunstfout.
- Een positieve pANCA reactie op basis van ANA's kan met behulp van Hep-2 cellen worden aangetoond.
- Bij een positieve ANA en pANCA dient de pANCA als "niet interpreteerbaar" te worden gerapporteerd.

91. Cystathionine β -synthase regulation defect in homocystinuria

L.A.J. KLUIJTMANS¹, G.H.J. BOERS², E.M.B. STEVENS¹, W.O. RENIER³, J.P. KRAUS⁴, F.J.M. TRIJBELS¹, L.P.W.J.W. van den HEUVEL¹ and H.J. BLOM¹

Departments of Pediatrics¹, Internal Medicine² and Childneurology³, University Hospital Nijmegen, Nijmegen, the Netherlands, Department of Pediatrics⁴, University of Colorado School of Medicine, Denver CO, USA.

We determined the molecular basis of cystathionine β -synthase (CBS) deficiency in a partially pyridoxine responsive homocystinuria patient. Direct sequencing of the entire CBS cDNA revealed the presence of a homozygous G1330A transition. This mutation causes an amino acid change from aspartic acid to asparagine (D444N) in the regulatory domain of the protein and abolishes a *TaqI* restriction site at DNA level. Despite the homozygous mutation, CBS activities in extracts of cultured fibroblasts of this patient were not in the homozygous but in the heterozygous range. Furthermore, we observed no stimulation of CBS activity by S-adenosylmethionine, contrary to a three-fold stimulation in control fibroblast extract.

The mutation was introduced in an *E.coli* expression system and CBS activities were measured after addition of different S-adenosylmethionine concentrations (0-200 μ M). Again, we observed a defective stimulation of CBS activity by S-adenosylmethionine in the mutated construct, whereas the normal construct showed a three-fold stimulation in activity. These data suggest that this D444N mutation interferes in S-adenosylmethionine regulation of CBS. Furthermore, it demonstrates the importance of S-adenosylmethionine regulation of the transsulfuration pathway in homocysteine homeostasis in humans.

92. A common mutation in the 5,10-methylene tetra hydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida

N. v. d. PUT¹, P. FROSST², R. STEEGERS-THEUNISSEN^{3,4}, T. ESKE³, F. TRIJBELS¹, L. v. d. HEUVEL¹, E. MARIMAN⁵, M. de HEYER⁶, R. ROZEN² and H. BLOM¹

Department of Paediatrics¹, Gynaecology³, Epidemiology⁴ and Human Genetics⁵, University Hospital Nijmegen, Department of Hematology⁶, Municipal Hospital Leyenburg, the Hague, the Netherlands and Department of Human Genetics², McGill University, Montreal, Canada.

Periconceptional folate administration reduces the risk of neural tube defects. In a previous study, we observed significantly elevated plasma homocysteine levels in mothers of a child with spina bifida (SB), suggesting a dysfunction of folate metabolism. This study evaluates a common mutation (C677T) in the MTHFR, resulting in thermolability, by genotyping and by enzymatic assay, as a possible risk factor for SB in 55 patients with SB and their parents (70 mothers and 60 fathers). Restriction analysis of a genomic PCR-fragment revealed homozygosity of the previously identified mutation in the MTHFR gene in 4.8% of the controls, 10% of the

fathers, 15.7 % of the mothers and 13.7% of the patients. The odds ratios were, 3.7 [95% CI: 1.5-9.1]; 2.2 [95% CI: 0.8-6.3] and 2.9 [95% CI: 1.0-7.9] for mothers, fathers and children, respectively, versus controls. By enzymatic assay, thermolabile MTHFR was found in 8% of controls, 13% of fathers, 17% of mothers and 17% of children. In individuals homozygous for this mutation, significantly decreased plasma folate and elevated homocysteine and red blood cell folate were found.

Conclusion: The C677T in the MTHFR gene, resulting in thermolabile protein, is a genetic risk factor for SB.

93. Multicenter evaluatie van de EBIO plus glucose analyser

M. TRESKES¹, H.J. ADRIAANSEN², J.J.C.M. van de LEUR³, R.N. IDEMA³, N. PEQUERIAUX¹ en C. PRONK²
Klinisch Chemisch & Hematologisch Laboratorium van St. Elisabeth Ziekenhuis¹, Tilburg, Drechtsteden Ziekenhuis², Dordrecht en Sophia Ziekenhuis³, Zwolle

De EBIO plus is een nieuwe glucose analyser die op drie verschillende plaatsen in Nederland is geëvalueerd. De analytische karakteristieken bleken voldoende. Een lineariteit van 2 tot 50 mmol/l, een imprecisie van 2-4% binnen run en 3-5% tussen dagen op een niveau van 1,8 mmol/l respectievelijk 1-2% en 1-3% op een niveau van 4-20 mmol/l. Drift was over het algemeen < 3% over 60 metingen. De kalibratie bleek 90 minuten stabiel. Er is geen belangrijke invloed van de mogelijke interferenten triglyceriden, bilirubine, albumine, fructose, xylose, galactose, ascorbinezuur, isoniazide en paracetamol geconstateerd en geen significante monster op monster overdracht.

De methode correleerde goed met diverse andere methoden. Intercept en helling weken soms aanzienlijk af van respectievelijk 0 en 1 (zie tabel 1).

De maximale monstercapaciteit is 166 per uur. De ware monstercapaciteit hangt af van het wel of niet implementeren van de barcodelezer, wel of niet duplo draaien en de kalibratiefrequentie. Na oplossen van enkele initiële problemen bleek de

EBIO plus een gebruikersvriendelijke glucose analyser met een hoge monstercapaciteit en goede analytische karakteristieken.

Tabel 1. Methode vergelijkingen met de Ebio plus

EBIO vs.	Dordrecht [#]		Tilburg [§]		Zwolle [*]	
	routine	back up	routine	backup	routine	back up
helling	0,97	0,93	0,94	0,94	0,9	0,96
intercept	0,41	0,81	0,68	0,10	-0,066	0,23

[#]routine: ESAT 6660 (Eppendorf, GOD + electrochemische detectie van H₂O₂) met back-up: Hitachi 717 (Boehringer Mannheim), hexokinase methode; [§]routine: ESAT 6660-2 (Depex, GOD + electrochemische detectie van H₂O₂) met back-up: Axon (Bayer), glucose dehydrogenase methode; ^{*}routine: G400 (Greiner), glucose dehydrogenase methode met back-up: Cobas bio (Roche), glucose dehydrogenase methode.

94. Guanidine en Triton-X100 en de bepaling van ijzer in plasma en gevriesdroogde SKZL-controlesera met reagentia van Beckmann

F. WILLEKENS^{1,2}, M. BERENDSEN¹, R. BEUMER², D. OORTGIJS¹ en K. SCHEPS¹
Laboratorium, Psychiatrisch Ziekenhuis Wolfheze¹ en Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Rijnstate, Arnhem²

Fibrinogeen interfereert sterk in de bepaling van ijzer met de reagensset van Beckmann. Toevoeging van guanidine of een niet-ionogeen detergent is een bekende remedie, die voor een deel al beschreven is. De controlesera van de SKZL vertonen een duidelijk matrixeffect.

Doel van het onderzoek: De invloed van guanidine eventueel in combinatie met 1% Triton-X100 op de fibrinogeeninterferentie en van 2 mol/l guanidine op het matrixeffect van de SKZL-controlemonsters.

Methode: Plasmamonsters (heparine, n=49) werden geanalyseerd met de ICSH-referentiemethode (calibrator: Beckmann), met de Beckmannmethode (Bckm) zonder toevoeging en met toevoeging van 2 of 4 mol/l guanidine of 2 mol/l guanidine in combinatie met 1% Triton-X100. Daarnaast werd bij 50 patiënten tegelijkertijd plasma en serum afgenomen en geanalyseerd. Twaalf controlesera van de SKZL werden geanalyseerd met de Beckmannmethode met en zonder toevoeging van 2 mol/l guanidine en met de methode van Boehringer Mannheim (BM).

Resultaten: zie tabel 1. De asafsneden waren niet significant van nul afwijkend. De gemiddelde afwijking van de consensuswaarde was voor de oorspronkelijke Beckmannmethode -2,0 ± 0,56 µmol/l en veranderde naar -0,53 ± 0,25 µmol/l. Voor

de Boehringer Mannheim methode werd een gemiddelde afwijking van -0,35 ± 0,39 µmol/l gevonden.

Conclusies: Toevoeging van 2 mol/l guanidine is al voldoende om de interferentie van fibrinogeen te onderdrukken. Ook het matrixeffect in de SKZL-controlesera is aanzienlijk gereduceerd.

Tabel 1.

Methode	helling ± SE	r ²
<i>Analyse plasmamonsters n=49, x= ICSH referentiemethode</i>		
Bckm -	niet uitvoerbaar	
Bckm +2	0,98 ± 0,019	0,983
Bckm +4	1,00 ± 0,019	0,983
Bckm +2 1% Tr	0,98 ± 0,019	0,982
BM	0,94 ± 0,021	0,977
<i>Analyse serum en plasma, n=50, x=serumwaarde</i>		
Bckm +2	1,00 ± 0,015	0,998
Bckm +4	0,99 ± 0,008	0,997
Bckm +2 1% Tr	0,99 ± 0,008	0,997
BM	1,00 ± 0,015	0,989

95. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia related cardiovascular disease

L.A.J. KLUIJTMANS¹, L.P.W.J. van den HEUVEL¹, G.H.J. BOERS², E.M.B. STEVENS¹, P. FROSST³, B.A. van OOST⁴, M. den HEIJER⁵, F.J.M. TRIJBELS¹, R. ROZEN³ and H.J. BLOM¹
Departments of Pediatrics¹, Internal Medicine² and Human Genetics⁴, University Hospital Nijmegen, Nijmegen, the Netherlands, Departments of Human Genetics, Pediatrics and Biology, McGill University, Montreal Children's Hospital, Montreal³, Canada and Department of Hematology, Municipal Hospital Leyenburg⁵, the Hague, the Netherlands.

Mild hyperhomocysteinemia is an established risk factor for cardiovascular disease. Genetic aberrations in the cystathionine β-synthase (CBS) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes may account for reduced enzyme activities and elevated plasma homocysteine levels. In 15

unrelated Dutch patients with homozygous CBS deficiency, we observed the 833T→C (I278T) mutation in 50% of the alleles. Very recently, we identified a common mutation (677C→T; A → V) in the MTHFR gene which, in homozygous state, is responsible for the thermolabile phenotype, and

which is associated with decreased specific MTHFR activity and elevated homocysteine levels. We screened 60 cardiovascular patients and 111 controls for these two mutations to determine whether these mutations are risk factors for premature cardiovascular disease. Heterozygosity for the 833T→C mutation in the CBS gene was observed in one individual of the control group, but was absent in patients with premature cardiovascular disease. Homozygosity for the 677C→T mutation in the MTHFR gene was found in 9 (15%) out of 60 car-

diovascular patients, and in only 6 (~5%) out of 111 control individuals (odds ratio: 3.1 [95% CI: 1.0-9.2]). Because of the high prevalence of the 833T→C mutation among homozygotes for CBS deficiency and its absence in 60 cardiovascular patients, we may conclude that heterozygosity for CBS deficiency does not appear to be involved in premature cardiovascular disease. However, a frequent homozygous mutation in the MTHFR gene is associated with a threefold increase in risk for premature cardiovascular disease.

96. Verhoging van het percentage HbA1 bij miltloze personen door retentie van haemoglobine bevattende vesikels

F.L.A. WILLEKENS², J.M. WERRE¹, H.J.BOS¹, B. ROERDINKHOLDER-STOELWINDER¹, Y.A.M. GROENEN-DOPP², G.C. van der PLAS¹ en A.J. VERKLEY³

Rode Kruis Bloedbank Arnhem e.o.¹, KCL Rijnstate Ziekenhuis Arnhem² en Afdeling Moleculaire Celbiologie Universiteit Utrecht³

De verhoging van het HbA1-percentage in rode bloedcellen (RBC) van miltloze personen kan niet verklaard worden uit hyperglycaemie of toename van de gemiddelde RBC-leeftijd. Eerder onderzoek liet zien dat het HbA1-percentage bij miltlozen in RBC-fracties, gescheiden op grootte en dichtheid, positief gecorreleerd is met het percentage vacuolen bevattende RBC. Deze vacuolen bevatten hemoglobine. In het plasma van normalen komen haemoglobine bevattende vesikels voor.

Doel van dit onderzoek: Aannemelijk maken dat de veranderingen in Hb-samenstelling en morfologie in RBC van miltlozen het gevolg zijn van retentie van deze vesikels.

Methoden: EM-onderzoek van RBC van miltlozen en vesikels werd verricht middels een freeze-etch en een transmissie techniek. De Hb-samenstelling van RBC en vesikels werd bepaald met HPLC. Isolatie vesikels uit door plasmaferese verkregen plasma van normalen:

- centrifugatie bij 8000xg bij 4°C gedurende 15 min
- filtratie door een 0,8µm nitrocellulose filter
- centrifugatie van het filtraat 50.000xg en 4°C gedurende 1,5 uur
- pellet: Hb-HPLC en freeze-etch EM

Resultaten:

1. EM-onderzoek van vesikels liet zien dat deze uit RBC afkomstig waren; de grootte varieerde van 80-800 nm. EM-onderzoek van de RBC van miltlozen toonde vacuolen van 40-1000 nm grootte.

2. De Hb-samenstelling van RBC van normalen en miltlozen, en plasma vesikels wordt getoond in de tabel 1.

Conclusies:

1. Het verhoogde HbA1-gehalte en de bovenbeschreven EM-afwijkingen in de membraan van RBC afkomstig van miltloze personen kan verklaard worden uit retentie van vesikels die in het plasma van normalen circuleren.
2. Deze vesikels zijn afkomstig uit de erythrocyten membraan en bevatten haemoglobine. Miltloosheid leidt tot vertraging van uitstoting van kleine vesikels waardoor conglomeratie tot grotere kan plaats vinden. De verwijdering van deze grotere en kleinere vesikels wordt kennelijk door de milt gefaciliteerd.

Tabel 1. Percentages van totaal Hb ± SD

Hb-component	normalen (n=8)	miltlozen (n=5)	plasma vesikels (n=3)
HbA1	10,66 ± 0,98	11,84 ± 1,21*	15,26 ± 1,75*
HbA0	84,62 ± 1,28	82,27 ± 1,44*	79,90 ± 2,03*
overig	4,84 ± 0,83	5,89 ± 0,85	4,73 ± 0,41

*: Verschillen t.o.v. overeenkomstige waarden normalen statistisch significant (P<0,0424).

97. Belasting van een capillaire bloedafname d.m.v. een hielprik bij neonaten

J.J.C.M van de LEUR¹, Y. HOLTERMAN¹, H. WARNAR¹, A. FLIERMAN², R.A. van LINGEN², P.A. KUIPER-KRAMER¹

Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Afdeling Kindergeneeskunde, subafdeling Neonatologie², Sophia Ziekenhuis Zwolle

Capillaire bloedafname m.b.v een hielprik is bij pasgeborenen de meest gebruikte methode voor bloedafname. Te grote hoeveelheden bloed afnemen leidt tot meer pijn, stress en hematoomvorming bij kinderen. Wij bestudeerden de duur en de frequentie van afname via een hielprik om een bepaald bloedvolume te verkrijgen.

Gedurende twee maanden werd een prospectief onderzoek verricht op de afdeling neonatologie. Bij alle afnames werd de methode van de bloedafname (hielprik, venapunctie of afname uit arteriële lijn), de duur van de afname en voor de hielprik het aantal prikken genoteerd.

Het onderzoek werd bij 47 kinderen uitgevoerd (geboortegewicht 1594 ± 220 g). In totaal waren er 1030 afnames, 509 arterieel, 503 capillair en 18 veneus. Een maximale afname van 1500 µl kon in 90,5% van de gevallen met 1 tot 4 hielprikken verkregen worden, en kon in 89% binnen de 8 minuten geprikt worden. Arteriële afnames duurden in de regel minder

dan 4 minuten en vonden plaats zonder dat het kind gestoord werd. De duur van de veneuze afnames was gelijk aan de arteriële.

Concluderend kan gezegd worden dat capillair prikken van bloed tot een volume van 1500 µl in 90% van de gevallen binnen 8 minuten en binnen 4 keer hielprikken kan plaatsvinden. Langer en vaker prikken geeft nauwelijks extra resultaat. Het is dan aan te bevelen om veneus te prikken, dit geldt ook voor afnamevolumina boven de 1500 µl.

Wij komen tot de volgende aanbevelingen. Aanvragen vanuit de kliniek moeten met grote zorgvuldigheid geschieden, waarbij het totale afnamevolume bekend moet zijn bij de aanvrager en bekendheid met de afname-conditie bij de patiënt. Het laboratorium dat regelmatig metingen verricht bij neonaten moet betrouwbare bepalingmethoden kiezen waarbij een zo laag mogelijk bloedvolume nodig is.

98. Occupational allergy in horticulture, IgE-mediated allergy to amaryllis flowers

A.W. van TOORENENBERGEN, A.P.H. JANSEN, J. WAANDERS en A.M. VERMEULEN

Dijkzigt Ziekenhuis, Rotterdam en Rijnstate ziekenhuis, Arnhem, the Netherlands

During the last two years of his work in a green house, where Amaryllis plants (*Hippeastrum hybride*) were cultivated, an 48 year old man developed symptoms of rhinitis and shortness of breath, especially in the evening and at night. Symptoms decreased during weekends and at holidays. Intracutaneous skin tests (ICT) with 0.1% extracts of bulb, leaf, flower and pollen of Amaryllis each gave wheals > 10 mm diam. ICT with these extracts was negative in three controls. Extracts from Amaryllis -pollen, -flowers and -stem were covalently

coupled to CNBr-activated agarose beads. Incubation of the patient serum with these immunosorbents gave 21, 17 resp. 19 kU/L, when read from the CAP standard curve; Control sera with total IgE levels up to 1100 kU/L scored less than 0.4 kU/L in these Amaryllis RASTs; the patients' serum total IgE level was 600 kU/L. Immunoblotting experiments with the patient serum showed a major IgE binding structure with a MW of 105-110 kD.