

Posterabstracts*

Samenvattingen van de posterpresentaties tijdens het Lustrumcongres NVKC 50 Jaar van 25 tot 27 juni 1997 in Grand Hotel Huis ter Duin, Noordwijk aan Zee

Klinische (bio)chemie en methodologie

Lipiden

1. Increased diffusion of chylomicron lipids to apo B-100 containing triglyceride-rich lipoproteins as a major cause for accumulation of β -VLDL in familial dysbetalipoproteinemia

P.N.M. DEMACKER, S.J.H. BREDIE, A.F.H. STALENHOEF
Department of Internal Medicine, University Hospital Nijmegen

Subjects with familial dysbetalipoproteinemia (FD) are characterized by increased concentrations of β -VLDL thought to be "remnants" of chylomicrons and VLDL. The typical apo E-2 isoprotein is unable to bind these particles to specific receptors in the liver.

In 8 patients with FD and 6 controls we studied the metabolism of chylomicrons after a fat load (50 g fat/m²) containing retinyl palmitate and tocopherol as tracers. Up to 48 h after loading the distribution and contents of apo B-48, apo B-100, and of both vitamins were followed over the various lipoprotein fractions, including some flotation classes of the VLDL+IDL fraction.

From these experiments we derived the following conclusions:

- Although in FD apo B-48 concentration in the triglyceride-rich fraction (TRL) is considerably increased, its course after a limited amount of fat is normal.
- Retinyl palmitate is not a valid marker for chylomicrons because, like tocopherol, it is in time increasingly present in other lipoprotein fractions especially the apo B-100 containing TRL.
- This marks a diffusion process; that of both vitamins is an estimate for that of the total amount of chylomicron lipids.
- The excess of exogenous lipid, temporarily present on the endogenously produced lipoproteins, contributes to β -VLDL accumulation.

2. Comparison of different analytical techniques of analysis of LpA-I and LpA-I/A-II in plasma

J.H.M LEVELS, R.J. LAMPING and A. van den ENDE
Centre for Hemostasis, Thrombosis, Atherosclerosis and Inflammation Research, Academic Medical Centre, Amsterdam

Introduction. High Density Lipoprotein (HDL) can be subdivided in pre-b HDL, HDL2 and HDL3. Mature HDL in plasma exists in two major density classes, HDL2 and HDL3 which can be subdivided further on the basis of the presence of two major apolipoproteins, Apo-AI (28kD) and Apo -AII (17 kD). Both types of HDL contain particles with either Apo-AI (LpA-I) alone or with Apo-AI and Apo-AII (LpA-I/A-II). There is strong evidence that apoA-I on LpA-I is catabolized faster than on LpA-I/A-II. The clinical significance of these particles is not entirely elucidated, however there is a growing evidence that LpA-I might be a protective factor against CHD.

Materials and methods. In order to investigate the composition of HDL and its apo content we compared different analytical methods using plasma of healthy volunteers. First we isolated LpA-I and LpA-I/A-II from 2 ml EDTA plasma by affinity chromatography using goat-anti-human Apo-AI and Apo-AII antibodies respectively. Subsequently, the composition of the different isolated fractions was investigated with rocket immuno-electrophoresis using anti apo-AI, HPGC with chole-

sterol postcolumn detection and capillary electrophoresis using a column coated with linear polyacrylamide and filled with a tris-buffer containing 0.1 % SDS. Separation was performed under reduced conditions.

Results. LpA-I as well as LpA-I/AII isolates showed on HPGC a major peak in the HDL region, however minor components in the LDL and VLDL region were detected. In the electropherogram the LpA-I isolate showed a distinct peak corresponding with apo-AI. The LpA-II isolate showed a major apo-AI and a minor double apo-AII peak. This facilitates the calculation of the AI/AII ratio in individuals. Immuno-electrophoresis showed in most cases a single apo-AI precipitate in the LpAI isolate and apo A-I and apo A-II precipitate in the LpA-II isolate.

Conclusions. There are several procedures described in literature for isolation and analysis of LpA-I and A-I/A-II in plasma. We found discrepancies in the results obtained using these different techniques. This prompted us to investigate the underlying cause of these differences.

* Voor de presentatie zijn genummerde borden beschikbaar van 85 cm breed en 240 cm hoog; posters dienen uitsluitend met dubbelzijdig plakband, dat ter plekke beschikbaar wordt gesteld, te worden aangebracht.

3. Unusual test for measuring Lp(a) levels in serum: a time-resolved immunofluorometric assay

M.A.M. BON, G. van der SLUIJS VEER, I. VERMES
Medisch Spectrum Twente, Hospital Group, Enschede, The Netherlands

Lp(a) is a cholesterol-ester-rich lipoprotein that resembles low density lipoprotein (LDL). Lp(a) contains apolipoprotein B-100 and glycoprotein(a) which is covalently bound to the apoB-100.

The molecular mass of Lp(a) ranges from 300 through 800 Dalton. A strong and independent relationship exists between the serum concentrations of Lp(a) and the incidence of atherosclerotic vascular disease. There are several methods to determine the Lp(a) levels in serum. Mostly these methods are time consuming and difficult to perform in large series. In addition, all of these assays are influenced by matrix effects.

We attempted to set up an assay to determine the Lp(a) levels in serum with use of a Time Resolved Fluorometric Assay (TRIFMA) as used in the DELFIA™ system (Wallac Oy, Turku, Finland). In this TRIFMA we used a 70 times higher dilution factor which diminishes matrix effects. Although use of an immunometric assay is an unusual application to measure such high concentrations of circulating protein, the high dilution factor has benefits.

Microtiter plates were coated with a sheep anti-human Lp(a) (Immuno GmbH, Heidelberg, Germany). Anti-human Lp(a) raised in rabbits (DAKO ITK Diagnostics, Glostrup, Denmark) was labelled with Eu³⁺, using the Wallac labelling reagent (Wallac Oy, Turku, Finland) and used in the assay to mark the bound Lp(a).

The lower detection limit of the assay is 2.2 mg/l. Linearity in serum dilutions is satisfactory. The intra- and inter-assay imprecisions CV's were 9% and 10% respectively. The median of the Lp(a) concentration found in blood samples of 194 healthy volunteers was 106 mg/l, the 75th percentile was 296 mg/l, the 90th 547 mg/l and the 95th 738 mg/l Lp(a) respectively. Comparison with a turbidimetric assay shows the correlation ($r = 0.96$, $n = 25$).

The great advantage of this TRIFMA is the low background, large working range and the high dilution factor. This TRIFMA is an assay which is reliable, easy to handle and suitable for automation in routine use.

Enzymen

4. The activity of dihydropyrimidine dehydrogenase in human blood cells

A.B.P. van KUILENBURG¹, H. van LENTHE¹, M.J. BLOM¹, E. MUL² and A.H. van GENNIP¹
Academic Medical Centre¹, University of Amsterdam and Central Laboratory of The Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service², 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 5-fluorouracil, thereby limiting the efficacy of the therapy. Patients suffering from a deficiency of this enzyme do not exhibit a characteristic clinical phenotype, although in children the deficiency of DPD is often accompanied by a neurological disorder. The diagnosis of patients with a DPD deficiency can be established by measurement of the activity of DPD in leukocytes. So far, it was not known whether DPD is present in all types of human blood cells. Therefore, we purified human monocytes, lymphocytes, granulocytes, platelets and red blood cells from healthy donors with elutriation and determined the activity of DPD with a radiochemical HPLC assay.

Surprisingly, the highest activity was found in monocytes (13.7 ± 5.5 nmol/mg/h, $n = 12$) followed by lymphocytes (5.6 ± 1.6 nmol/mg/h, $n = 14$), granulocytes (2.2 ± 0.5 nmol/mg/h, $n = 7$) and platelets (1.5 ± 0.9 nmol/mg/h, $n = 12$). We could not detect any DPD activity in red blood cells. There appeared to be a significant inter-patient variation in the activity of DPD in the various blood cells. Furthermore, the intra-patient variation of the ratio between monocytes and lymphocytes proved to be 2.4 ± 0.6 , $n = 12$). Our observation that the activity of DPD is not restricted to lymphocytes but is also present in other blood cells (except red blood cells) might provide an explanation for the large variation in DPD activity measured in leukocytes from patients during treatment with 5-fluorouracil.

5. Evaluation of diagnosis of falciparum malaria by measurement of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* (pLDH)

N. de JONGE¹, L.G. VISSER², M.A. van RIJN^{1,3} and J.M. PEKELHARING^{1,3}
CKCL¹, Ziekenhuis Leyenburg, Afdeling Infectieziekten², AZL, SSDZ³, Delft

The diagnosis of malaria still relies on the microscopic examination of thick smears and blood films. Although inexpensive in reagents and equipment, this method is laborious and requires high skill. Makler and Hinrichs (1993) recently described the measurement of *Plasmodium* specific lactate dehydrogenase (pLDH) as a method for the diagnosis of falciparum malaria. This method is based on the ability of pLDH to use 3-acetyl pyridine NAD (APAD) at a much faster rate than human red cell LDH (hLDH).

We studied the possible interference of human LDH activity in the assay. In addition we tested serum samples from patients with pneumonia caused by *Pneumocystis carinii* and patients with typhoid. The following samples were studied: (1) A "standard curve" of hLDH. (2) Serum from two patients with

microscopically confirmed infection with *P. falciparum*, with a parasitemia of 17% and 30%, resp. and hLDH activity of 571 and 693 U/l, resp. (3) Two serum samples with hLDH activity of 157 U/l and 282 U/l, from patients with typhoid. (4) Two serum samples from patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) with hLDH activity of 222 U/l and 273 U/l. (5) Serum samples of six patients with no history of malaria, PCP, or typhoid, with hLDH activity ranging from 163 - 1433 U/l.

An increased pLDH activity was observed for the non-infected individuals with increased hLDH activity. A positive, though not statistically significant relationship was found between human LDH activity and pLDH activity (Spearman's rho 0.6, $n=12$). Positive assay results were found for the *P. falciparum*

infected patients, but also for the non-infected individual with increased hLDH concentration. Positive reactions were found for the patients with falciparum malaria with a parasitemia of 30% and 17%, respectively. Samples of patients with *Pneumocystis carinii* or typhoid did not show a positive reaction above the background level.

Concluding, there is a considerable cross reaction between pLDH and hLDH, a finding which undoubtedly lowers the

sensitivity of the assay in the diagnosis of *P. falciparum* infections with low parasitemia.

Reference

Makler, Hinrichs. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *P. falciparum* as an assessment of parasitemia. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 205-10.

6. Uniforme uitslagen van enzymactiviteiten in de (ziekenhuis)laboratoria in de regio rondom Vliet en Oude Rijn

G. STEEN¹, P. FRANCK², J. SOUVERIJN³ en R. van WERMESKERKEN⁴

Klinisch Chemische Laboratoria van Ziekenhuis Rijnland¹, Leyenburg², AZL³ en Bronovo⁴

Uitslagen van enzymactiviteiten gemeten in verschillende laboratoria kunnen aanzienlijk variëren als gevolg van verschillen in meettemperatuur of samenstelling van het reactiemengsel. In 1994 is met dit project aangevangen om vergelijkbaarheid van enzymuitslagen voor alle 19 deelnemende laboratoria te bereiken. Het gaat om de enzymen AF, ALAT, ASAT, Gamma GT, LD, CK en Amylase.

Aanpak. Het Rijnland Ziekenhuis heeft gefungeerd als Regio Referentie Laboratorium (RRL). Hier zijn de enzymactiviteiten gemeten van 300 donoren/poliklinische patiënten (Ref. W. RRL). De toenmalige rapportagetemperatuur was 30°C. De nieuw te hanteren Regio Referentiewaarden (RRW) zijn vastgesteld a.d.h.v. literatuur, aanbevelingen, bijsluiters van reagenskits en referentiewaarden van laboratoria of regio's die reeds 37°C als rapportagetemperatuur hadden. Het RRL past zijn meetniveau aan aan het Regioniveau door voor elk enzym de factor te vermenigvuldigen met de ratio bovengrens RRW/bovengrens Ref. W. RRL).

Het RRL analyseert 6 pools van verse patiëntensera met een groot bereik aan enzymactiviteiten en stuurt deze naar alle

andere laboratoria. Elk laboratorium analyseert de 6 pools en berekent de ratio tussen de uitslagen van het RRL en de zelf gevonden uitslagen en past zijn meetniveau aan aan het Regioniveau door voor elk enzym zijn factor te vermenigvuldigen met deze ratio.

Resultaten. A.g.v. de uniformering is de regionale spreiding in de enzymuitslagen afgenomen van gemiddeld 36 tot 7 %. De spreiding in de uitslagen van meegezonden controlemonsters was aanzienlijk groter, terwijl de spreiding in de resultaten van BCR-referentiepreparaten gering was. De uitslagen van de meeste enzymbepalingen kwamen goed overeen met die van de BCR-preparaten.

Conclusie Het is mogelijk om enzymbepalingen binnen een regio te uniformeren m.b.v. pools van verse patiëntensera.

Consolidatie. Door tweemaal per jaar pools rond te sturen, blijven we in staat het bereikte resultaat vast te houden. Aan laboratoria die per enzym meer dan 10 % van het gemiddelde afwijken, wordt geadviseerd zich aan het regiogemiddelde te conformeren.

7. Lysozyme activity in faecal fluid: reference range and a possible dietary effect on baseline levels

J.P.M. WIELDERS¹, H.C. HOMAN¹, E. BATMAN² and M.H. OTTEN²

Departments of Clinical Chemistry¹ and Internal Medicine², Eemland Hospital, Amersfoort

Introduction. Lysozyme (muramidase EC 3.2.1.17) hydrolyses the bond between N-acetylglucosamine and N-acetyl-muramic acid. It has been detected in leucocytes and in many biological fluids like tears, urine, serum, pleural effusion and faecal fluid. Lysozyme measurement in faecal fluid has been suggested for discriminating and monitoring inflammatory bowel disease. This study describes the analytical method and the establishment of a reference range for lysozyme in faecal fluid. Special attention has been given to a possible dietary effect on baseline levels of lysozyme.

Study protocol and analytical method. A group of 26 healthy subjects (age 20-50 years), volunteered to collect their stools for 7 days and to write down their meal constituents. At one day during this period they were asked to eat a very spicy meal. Stool samples were kept frozen until processing and analysis.

Lysozyme was recovered by extraction of faeces with NaCl/Brij solution. After centrifugation lysozyme activity was measured in the supernatant by monitoring the absorbance

decrease of a *Micrococcus Leisodycticus* suspension, using hen egg-white lysozyme as a standard. Results are expressed as mg HEL/l: Hen Egg Lysozyme activity equivalents.

Results. The intra assay VC of the analysis was 7.5 % at 10.7 mg HEL/l and 4.4 % at 73 mg HEL/l. From the history of previous meals, 78 stool samples were considered to be regular, that is not preceded by spicy meals in the 3 previous days. The frequency curve showed positive skewness. The one-sided reference range for faecal fluid lysozyme was calculated by the distribution-free method of Bezemer (1981): < 42 mg KEL/l. For a group of 39 samples excreted within the 2 days after a spicy meal, we found a mean faecal lysozyme concentration of 48 mg KEL/l (s.d. 54 mg KEL/l).

Discussion. The method developed is suitable for determination of lysozyme in faecal fluid. There seems to be a significant contribution of diet on the baseline level. Some volunteer's faecal lysozyme activity increased, while others did not respond. Further details will be presented at the conference.

8. Detection and identification of monoclonal gammopathies by capillary electrophoresis and immunosubtraction

Y.M.C. HENSKENS, J.M. PEKELHARING and G.A.E. PONJEE

Klinisch Chemisch Laboratorium, Diagnostisch Centrum SSDZ, Delft

Capillary electrophoresis (CE) is an analytical tool for separating molecules based on molecular size, electric charge and hydrophobicity. CE has been suggested as a sensitive and rapid alternative for conventional agarose gel electrophoresis (AGE) in detecting monoclonal gammopathies. The standard method for identifying paraproteins, immunofixation electrophoresis (IFE), can be replaced by immunosubtraction capillary electrophoresis (IS-CE). IS-CE is performed by immunoprecipitation of the paraprotein with solid phase bound antibodies (against IgG, IgM, IgA, κ or λ) followed by CE separation.

The aim of this prospective study was to compare CE and IS-CE with the conventional reference methods (AGE en IFE) for detection and identification of paraproteins. AGE was performed using home-made gels, coomassie brilliant blue staining and densitometric scanning. IFE reagents were from Dako. CE was performed on a Beckman P/ACE System 5000 using UV detection, untreated fused-silica capillaries (27 cm, 50 μ m ID), boric acid running buffer (150 mM, pH 9.9) a running time of 4.4 min. IS-CE reagents were from Beckman. Sixty-one monoclonal bands with concentrations ranging from 0.6 to 50.9 g/l were demonstrated by the routine method out of 468 serum samples. Using CE, fifty-seven paraproteins were detected and quantified (fig.1) on the electropherogram. Four paraproteins were not detected by CE of which three were IgG of 0.6, 1.1 and 2.2 g/l respectively and one was an IgM paraprotein of 20.3 g/l. Although the above described running conditions were optimized for paraprotein detection, the IgM band of 20.3 g/l could only be separated by changing the ionic strength (150 to 100 mmol/l) or the pH (9.9 to 10.2) of the running buffer. In comparison with IFE, fifty-six paraproteins were typed identically using IS-CE and only one paraprotein (IgM kappa, 14.9 g/l) could not be identified. On the other

hand, a monoclonal IgA band was demonstrated by CE and IS-CE which had not been detected by AGE. We conclude that in general CE could be a useful method for detection of paraproteins and that IS-CE is a good alternative for IFE. On the other hand, all running conditions tried so far appeared to miss one or more of the paraproteins. Further studies are required to investigate ionic strength and pH of the running buffer since these prove to be the most crucial factors for the CE separation of paraproteins.

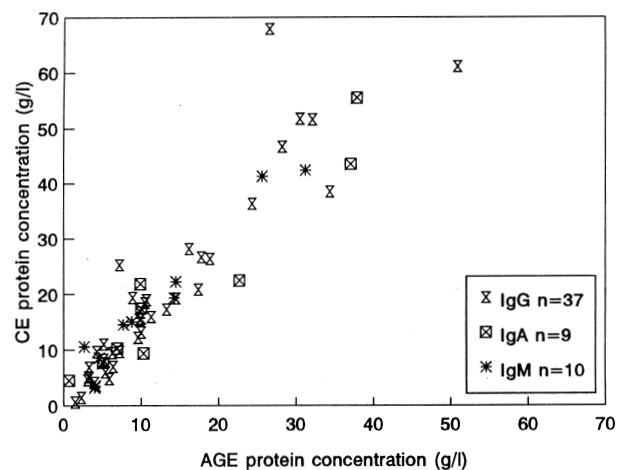


Figure 1. Comparison of the quantitation of 57 paraproteins that could be detected by agarose gel electrophoresis (AGE) and capillary electrophoresis (CE); correlation between the methods was 0.96.

9. Laboratoriumdiagnostiek van auto-immuun ziekten (AIZ): immunofluorescentie (IF) of ELISA?

J. M. M. RONDEEL, W. van GELDER, H. van der LEEDEN¹ en R. B. DINKELAAR

Afdeling Klinische Chemie en Reumatologie¹, Drechtsteden ZH, Dordrecht

Inleiding. In de diagnostiek van AIZ wordt IF steeds meer vervangen door ELISA. Wij vergeleken beide technieken m.b.t. aanvragen voor anti-nucleaire antilichamen (ANA) en extraheerbare nucleaire antigenen (ENA) en onderzochten hun klinische waarde.

Materialen en methoden. Gedurende 20 weken werden alle ANA/ENA aanvragen (n=500) onderzocht met IF op Hep-2 cellen, Ouchterlony immunodiffusie (OID) en met een ANA/ENA screen ELISA (VARELISA; importeur IQP, Groningen). Alleen de IF+OID uitslag werd gerapporteerd aan de kliniek. Bij een positieve uitslag van 1 of meerdere testen werd de aanvrager schriftelijk gevraagd naar de reden van de aanvraag, de consequentie van de uitslag en naar de aanwezigheid van een AIZ bij de patiënt. Wij vergeleken 3 strategieën: IF+OID, ELISA alleen en IF+ELISA.

Resultaten. De gemiddelde leeftijd van de patiënten was 53 (2-92) jr; 64% was vrouw. De meeste aanvragen werden door de internist (29%), de reumatoloog (21%) en de huisarts (18%) gedaan. Respons op de enquête was 80%. De meest genoemde redenen voor aanvraag waren: gewrichtsklachten (37%), follow-up/controle (30%) of afwijkende laboratorium uitslagen (7%). In 66% van de gevallen vond de aanvrager dat de uitslag geen klinische consequenties had ongeacht de uit-

slag of gebruikte techniek. Van de onderzochte sera was 8% positief bij IF+OID en 11% in de ELISA. In 12% kwamen IF+OID en ELISA niet met elkaar overeen. Er kwamen 25 AIZ voor in de geënuquêteerde groep (18x reumatoïde artritis, RA). Voorspellende waarde van een positieve (PVW) en een negatieve (NVW) uitslag voor AIZ samen met kosten voor reagentia (lijstprijzen) en arbeidsduur staan vermeld in onderstaande tabel.

	PVW (%)	NVW (%) ²	reagentia	arbeidsduur
IF+OID	53 ¹	83	±Fl 4500,-	209 uur
ELISA	26	61	±Fl 9000,-	108 uur
IF+ELISA	41	75	±Fl 6000,-	230 uur

1: $p=0.04416$ (IF+OID vs ELISA; χ^2 met Bonferroni); 2: $p>0.05$

Indien RA buiten de groep van AIZ werd gehouden bleek de PVW niet significant te verschillen tussen de 3 strategieën.

Conclusies. In de laboratoriumdiagnostiek van AIZ geniet IF+OID de voorkeur. Opvallend is echter de zeer geringe klinische consequentie van deze diagnostiek. De rol van het laboratorium in de diagnostiek van AIZ verdient nader onderzoek.

10. Vrije lichte ketens in urine

M.J.H. KOCK-JANSEN, C.M.M. LAARAKKERS, A.J.W. BRANTEN¹, J.F.M. WETZELS¹ en I.S. KLASSEN
Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium en afdeling Nefrologie¹, AZN-St Radboud, Nijmegen

Kwantitatieve bepalingen van vrije lichte ketens worden bemoeilijkt door de specificiteit van de antisera. Antisera tegen vrije ketens hebben veelal ook reactiviteit met gebonden ketens. Wij maken gebruik van de sandwich-ELISA methode waarin zonder voorbereiding monsters kunnen worden gemeten. Na testen van meerdere antisera kwamen als de meest specifieke bepalingen uit de bus:

Vrije kappa bepaling: coating met konijn anti-humaan vrije kappa, detectie met HRP gelabeld konijn anti-humaan totaal kappa (beide Dako)

Vrije lambda bepaling: coating met anti-humaan vrije lambda, 2e antiserum muis monoclonaal anti-humaan lambda en detectie met HRP gelabeld konijn anti-muis-immunoglobuline (Alle Dako). Als het 2e antiserum vervangen werd door antilichamen gericht tegen het Fc gedeelte van IgG dan werd geen signaal gevonden. Dit wijst erop dat geen intacte immunoglobuline moleculen worden meegemeten. Omdat geen internationale, of betrouwbare commerciële standaard bestaat voor vrije lichte ketens, wordt hier gebruik gemaakt van een zelfge-

maakt standaardserum. In een pilotexperiment werd met behulp van deze ELISA bepalingen bij een viertal nefrologische patiënten met proteïnurie de hoeveelheid vrije kappa en lambda ketens in bloed en urine gemeten. Tevens werd hiervan de ratio berekend en werd de selectiviteitsindex bepaald, berekend als de klaring van IgG gedeeld door de klaring van transferrine (<0,1 hoog selectief; 0,1-0,2 matig selectief; >0,2 laag selectief).

Deze preliminaire resultaten geven aan dat de fractionele excretie van vrije kappa ketens vele malen hoger is dan de fractionele excretie van vrije lambda ketens. De ratio hiervan lijkt omgekeerd evenredig te zijn met de selectiviteitsindex. Mogelijke verklaringen hiervoor zijn dat door een grotere polymerisatiegraad de klaring van vrije lambda ketens minder is dan voor vrije kappa ketens, of dat er een verschil bestaat in tubulaire reabsorptie voor vrije kappa en lambda ketens. Dit, evenals een mogelijk verband met de klinische verschillen tussen kappa en lambda nefropathie, dient nader te worden onderzocht.

11. Vergelijking van de performance van twee ANA-ELISA's

R. KUSTERS, E.G.M. CRISTEN en G. van der SLUIJS VEER
Medisch Spectrum Twente, Enschede

De firma's Bayer en Gull diagnostics bieden beide een ELISA-kit aan voor de screening op de aanwezigheid van anti nucleaire antistoffen (ANA). In het laboratorium van het Medisch Spectrum Twente (MST) is onderzocht of de ELISA-methode analytische-, logistieke- of financiële voordelen zou hebben t.o.v. het gebruikelijke onderzoek. In het onderzoek zijn resultaten, verkregen met beide kits, vergeleken met de resultaten van de standaard procedure, die in het laboratorium van het MST gevolgd wordt. In deze procedure wordt met behulp van indirecte immuno-fluorescentie van humane epitheliale cellen (HEP-2) bepaald of ANA in het patiëntens serum aanwezig zijn. Bovendien wordt het fluorescentiepatroon bepaald en de intensiteit van de fluorescentie geschat. Deze twee parameters zijn indicatief voor de aard van het vervolgonderzoek. Voor de test is een selectie gemaakt uit de in de serumbank van het MST aanwezige, bijzondere monsters, deze zijn dus niet representatief voor het aanbod van sera in de routine. De totale overeenkomst van de ELISA's met de HEP-2 is redelijk (70%).

De ELISA's komen onderling goed overeen (76%). Het zogenaamde dubieuze gebied van uitslagen is bij de Malakit breder dan bij de ANA-screen. ROC-analyse laat zien dat het oppervlak onder beide curves identiek is, echter de curves kruisen elkaar.

Geconcludeerd wordt dat de ELISA-bepalingen wat betreft sensitiviteit en specificiteit bruikbaar zijn voor routine-screening op de aanwezigheid van ANA. Echter, het ontbreken van aanwijzingen voor vervolgonderzoek, wordt door ons laboratorium als duidelijk nadeel gezien. Hierdoor zou het vervolgonderzoek t.w. anti-DNA antistoffen met TRFIA, ANA-blot en immunodiffusie sterk toenemen, hetgeen zowel voor de logistiek als de kosten negatieve gevolgen zou hebben. Bovendien is het met de nieuwe generatie HEP-cellen (HEP-2000) mogelijk om in de indirecte fluorescentie-assay ook het anti-SSA-antilichaam te detecteren. In laboratoria waar het vervolgonderzoek niet uitgevoerd wordt, zouden de ELISA's voor primaire screening toegepast kunnen worden.

12. De wenselijkheid van uniforme calibratie van IgM-reumafactorbepalingen

R.K.A. van WERMESKERKEN¹, G.W. VELDHUIZEN¹, M.J. v.d. ZWAN¹ en M.L. WESTEDT²
Klinisch Chemisch en Hematologisch laboratorium¹ en Afdeling Reumatologie², Ziekenhuis Bronovo, Den Haag

De bepaling van de IgM-reumafactor speelt een belangrijke rol bij de diagnostiek van reumatoïde artritis (R.A.) en bij de voorspelbaarheid van het verloop van deze ziekte. In dit verband werd door ons tot 1996 gebruik gemaakt van de semi-kwantitatieve latex-fixatie test (F. Klein et al. J Clin Pathol 1979; 32: 90). Daarbij werden de resultaten uitgedrukt in IU/ml door toepassing van het Nederlands referentieserumpreparaat voor de bepaling van reumafactoren van de stichting Relares. De test werd als positief beschouwd bij een concentratie $\geq 12,5$ IU/ml. In 1996 werd deze semi-kwantitatieve test i.v.m. een hogere klinische sensitiviteit (77%) en een betere reproduceerbaarheid vervangen door de kwantitatieve IgM-reumafactor-elisa-test van het C.L.B. te Amsterdam. Ook bij deze test werd voor de kalibratie gebruik gemaakt van het bovengenoemde preparaat. Mede tengevolge hiervan werd bij 46

patiënten met een positieve latex-test een opvallend goed verband gevonden tussen de nieuwe (= y) en de oude (= x) onderzoeksresultaten: $y = 1,47 \cdot x - 11,9$, $r = 0,90$.

Helaas blijkt uit de enquête reumafactoren, nrs. 104 - 109 van de SKZL, sectie MCA, dat er nationaal bij een grote verscheidenheid aan methodes, waarvan niet bekend is, wat wordt gemeten, nog onvoldoende sprake is van uniformering van uitslagen (voorbeeld: positief serum 104; door ons gevonden: 230 IU/ml; laagste gerapporteerde waarde: <25 IU/ml; hoogste: > 4096 IU/l). Het is daarom gewenst, dat naar analogie van de uniforme calibratie van de GlyHb-HbA1c-bepaling, het op een WHO-standaard gebaseerde referentieserum zal worden gebruikt om tot een betere vergelijkbaarheid van de resultaten van verschillende laboratoria te komen.

13. Wat is er mis met de vergelijkbaarheid tussen de verschillende ceruloplasminebepalingen, ondanks herstandaardisatie?

C. de KAT-ANGELINO en I.S. KLASSEN

Centraal Klinisch Chemisch laboratorium, AZN-St. Radboud, Nijmegen

Ondanks herstandaardisatie t.o.v. CRM470 blijft bij de ceruloplasminebepaling in de rondzendingen van de kwaliteitsbewaking een concentratieverschil waarneembaar tussen de diverse firma's. Om de oorzaak hiervan te achterhalen werden verschillende methoden en antisera vergeleken, waarbij ook meerdere standaarden werden gebruikt. Regressie lijnen werden berekend t.o.v. de Mancini methode met Behring antiserum (MB).

Opmerkelijk was dat drooggevroren standaarden in de nefelometrie hoger werden gemeten dan in de Mancini-methode met hetzelfde antiserum.

Zolang deze verschillen blijven bestaan, staan zij het vaststellen van consensus-referentiewaarden in de weg.

Een correcte ceruloplasminebepaling, zodat bovenstaande verschillen geminimaliseerd worden, dient o.i. gebruik te maken van:

- een buffer die zo min mogelijk specifieke reacties geeft (d.w.z. zo min mogelijk signaal van het monster met de buffer, zonder antiserum)
- een gezuiverde antiserumfractie i.p.v. volserum
- een standaardserum dat in de nefelometrie en de Mancini vergelijkbare waarden geeft.

Antiserum	buffer	standaard	methode	regressie lijn	R2
B (vol serum)	B	B (droog)	nefelometrie BNII	1,16 MB + 0,02	0,990
B (vol serum)	O	B (droog)	nefelometrie BNII	1,12 MB - 0,01	0,991
D (Ig fractie)	B	B (droog)	nefelometrie BNII	0,92 MB + 0,04	0,972
D (Ig fractie)	O	B (droog)	nefelometrie BNII	0,95 MB + 0,01	0,978
D (Ig fractie)	O	O (serum)	nefelometrie BNII	1,00 MB - 0,01	0,977
A (ontvet en gestabiliseerd vol serum)	A	A (droog)	nefelometrie Array	1,35 MB + 0,01	0,942
D (Ig fractie)		O (serum)	mancini	0,95 MB + 0,02	0,985
B (vol serum)		O (serum)	mancini	1.00 MB + 0,00	

n= 8 of 9 patiëntensera; A: Beckman; B: Behring; D: Dako; O: eigen standaard of buffer

Elektrolyten

14. Standardisation of ISE to FAES for ionised sodium and potassium in undiluted serum, plasma or whole blood by use of IFCC recommended reference materials

H. BAADENHUIJSEN¹, N.C. den BOER², C.M. BOERSMA-COBBAERT³, W.R. KULPMANN⁴, B.H.A. MAAS⁵ and A.H.J. MAAS⁵

University Hospital Sint Radboud¹ Nijmegen; Sint Antonius Hospital² Nieuwegein; University Hospital Dijkzigt³, Rotterdam; Institut für Klinische Chemie I, Medizinische Hochschule⁴, Hannover; EURO-TROL⁵, Wageningen

Ion-selective electrodes (ISEs) respond to ion-activity and therefore do not sense substance concentration directly. However, it is recognised that sodium and potassium in plasma will continue to be expressed for clinical purposes in terms of substance concentration (mmol/l). A convention is proposed by IFCC (SD-WGSE) and NCCLS whereby for routine clinical purposes results of ISE measurements of sodium and potassium in *undiluted* plasma should be reported in terms of substance concentration. In specimens with *normal* concentrations of plasma water, the values will concur with the true total substance concentration as determined for example by flame atomic emission spectrometry (FAES) or ISE measurements on *diluted* samples. In specimens with *abnormal* concentrations of plasma water the results differ. However, under these circumstances, measurement of sodium and potassium by ISE in the undiluted sample will more appropriately reflect the reactivity of sodium and potassium and are therefore clinically more relevant than the determination in diluted samples.

An interlaboratory study for the standardisation of direct sodium and potassium ISE systems to the FAES reference method was organised to evaluate the tentative IFCC Guide-

lines. Ampoules (3 ml, 2 ml sol.) containing blanks, standards (6 levels), bovine albumin containing solutions (BA, 5 levels) and human pooled serum (HS, 5 levels) providing a range of sodium concentrations from 120 to 160 mmol/l and a range of potassium concentrations from 2.0-6.0 mmol/l were manufactured. The series of standards were used to check the calibration and to verify the linearity of the FAES according to the NIST reference method. The BA and HS were analysed with the FAES and ISE-instrument according to manufacturer's instructions showing a coefficient of correlation (0.99). The intra- and inter-laboratory variation for FAES was (1%. For ISE the intra-laboratory variation was (1% and >1% for the inter-laboratory variation. The ISE results were standardised to FAES providing a coefficient of correlation (0.99, an intercept of 0 and a slope of 1. The standardisation protocol was validated using patient serum, plasma and whole blood.

The stability of the HS reference material seems to be at least one year, when it is kept at -20°C. The BA reference material shows a stability of at least 2 years when stored in the refrigerator at 2-8°C.

15. Het belang van de meting van iCa bij IC patiënten

J.W. JANSSEN¹, A.T. POST² en A.P. RIETVELD²

Klinische chemisch hematologisch laboratorium¹ en Afdeling intensive care², St. Franciscus Gasthuis te Rotterdam

Wij hebben onderzocht of de meting van geïoniseerd calcium (iCa) tot dezelfde interpretatie leidt van de calcium status bij IC patiënten als de (traditionele) meting van het totale calcium (tCa). Tevens is de waarde van het berekende geïoniseerde calcium (biCa) voor de interpretatie van de calcium status onderzocht.

Bij 146 IC patiënten zijn 456 calcium bepalingen uitgevoerd. De groep patiënten is onderverdeeld in 5 diagnosegroepen: A, respiratoire insufficiëntie (n=17); B, cardiovasculaire insufficiëntie (n=32); C, overige interne aandoeningen, (n=30); D, gecompliceerde chirurgie (n=44); E, eenvoudige chirurgie (n=23). Het tCa (referentie waarden 2,15-2,55 mmol/l) is gemeten in heparine plasma en het iCa (referentie waarden 1,15-1,35 mmol/l) is gemeten in arterieel volbloed. De formule voor biCa luidde: $biCa = 0,524 \{tCa \cdot 2,7 / (1,7 + [Alb] / 42)\}$. In alle diagnosegroepen wordt een discrepantie in de interpretatie van de waarden van tCa en iCa gevonden: Bij een normale tCa waarde wordt in 35% van die monsters een verlaagde iCa waarde gemeten en in 2% van die monsters een

verhoogde iCa waarde. Deze verhoogde iCa waarde bij een normale tCa waarde wordt alleen bij patiënten in diagnose groepen B en C gevonden. Bij een verhoogde tCa waarde wordt in 62% van de monsters een normale iCa waarde gevonden, in 35% van de monsters is eveneens het iCa verhoogd en in 4% (een waarde) wordt bij een verhoogd tCa een verlaagd iCa gevonden. Bij verlaagde tCa waarden is de correlatie met de iCa waarden beter: In 88% van deze monsters is het iCa ook verlaagd en in 12% is het iCa normaal.

Het gebruik van het biCa, waarbij gecorrigeerd wordt voor het aanwezige albumine, biedt t.o.v. het tCa geen verbetering. Ook hier vinden wij een discrepantie tussen de waarden van het biCa en het iCa. De biCa waarde komt gemiddeld 0,2 mmol/l hoger uit in vergelijking met de iCa waarde. Dit verschil is het grootst (0,54 mmol/l) in diagnose groep B.

Conclusie. Het gebruik van tCa en het biCa leidt bij de behandeling van IC patiënten vaak tot een overschatting van de calcium status. Wij bevelen voor IC patiënten de meting van iCa aan.

Endocrinologie

16. Aldosteron/renine ratio voor de diagnostiek van primair hyperaldosteronisme

J.H. SCHADE¹, D. DIJKSTRA¹, J.A.M. BERK¹, A.J. BAKKER¹, C. HALMA², W.J. FAGEL², L.J.M. de HEIDE² en J.W. KAPPELLE²

Stichting Klinisch Chemisch Laboratorium Leeuwarden¹ en MCL-Noord Leeuwarden²

Inleiding. De door Hiramatsu et al. (Arch Intern Med 1981; 141: 1589-1593) beschreven aldosteron/renine ratio voor de diagnostiek van primair hyperaldosteronisme is door ons gebruikt bij een dertigtal patiënten met hypertensie en/of hypokaliëmie. De patiënten stopten of reduceerden hun medicatie, indien mogelijk. Bloed werd zowel staand als liggend (30 minuten rusten) afgenomen, waarbij één van de vragen was of beide afname protocollen noodzakelijk waren. Bij patiënten werd een dexamethason remming (FIH-1) en/of een zout belasting uitgevoerd, indien daartoe aanleiding was.

Methoden. Als renine bepaling werd de iRenine(IRMA) bepaling van Nichols Institute gekozen; dit mede n.a.v. verkregen biochemische informatie vanuit het AZ Rotterdam. Het voordeel van deze bepaling is de grote stabiliteit van iRenine in EDTA-plasma bij kamertemperatuur, de korte analysetijd en het niet nodig zijn van een angiotensine generatiestap. Serum

aldosteron werd gemeten met een RIA met PEG-scheiding (Abbott).

Resultaten. De door ons gehanteerde referentiewaarden voor aldosteron, iRenine en de aldosteron/iRenine ratio zijn gebaseerd op de gegevens uit Rotterdam. De interassay variatiecoëfficiënt voor aldosteron is <7% (n=16), voor iRenine zijn alleen data beschikbaar van de kitcontrole (<5%; n=7), omdat de condities waaronder controles stabiel blijven bij -20°C nog uitgezocht moeten worden. In totaal werden 4 patiënten gevonden met primair hyperaldosteronisme, nl. één met dubbelzijdige bijnierhyperplasie en drie met een bijnier adenoom.

Conclusie. Beide bepalingen zijn goed uitvoerbaar, en lijken goed reproduceerbaar. De aldosteron/iRenine ratio geeft een duidelijke scheiding tussen patiënten met essentiële hypertensie en patiënten met primair hyperaldosteronisme. Dit geldt voor zowel de monsters die liggend als staand zijn afgenomen.

17. Glucocorticoid receptors, fibromyalgia and low back pain

E.G.W.M. LENTJES¹, E.N. GRIEP², J.W. BOERSMA³, F.P.T.H.M. ROMIJN¹ and E.R. de KLOET⁴

Clinical Chemistry¹, University Hospital Leiden, Rheumatology, Medical Center², Leeuwarden, formerly Rheumatology³, Rijnstate Hospital, Arnhem, Division of Medical Pharmacology⁴, Leiden/Amsterdam Center for Drug Research, University of Leiden

The fibromyalgia syndrome (FMS) is a puzzling form of nonarticular rheumatism, characterized by stiffness and chronic widespread musculoskeletal pain, accompanied by fatigue, anxiety, poor sleep, headache, irritable bowel complaints, subjective swelling of (peri-)articular areas and a rather typical disturbance of stage 4 (non-REM) sleep. The syndrome is marked by pain upon pressure at certain sites, known as tender points. FMS was shown to be a disorder associated with an altered functioning of the stress response system. We suggested that negative feedback of cortisol could be disturbed. Therefore we investigated the properties and func-

tion of the glucocorticoid receptors (GR) in 40 FMS patients and compared this to patients with 28 chronic low back pain (LBP, a localized pain condition) and 14 healthy, control persons.

Urinary free cortisol excretion in FMS and LBP patients was lower compared to controls (p=0.02). Only FMS patients displayed lower basal serum cortisol concentrations compared to controls (p<0.05) and lower CBG concentrations (p<0.05). Plasma free cortisol concentrations were similar in the three groups.

The number of GR per cell was not different among the three

groups (FMS: 6498 ± 252 , LBP: 6625 ± 284 , controls: 6576 ± 304), but the dissociation constant (Kd) in the FMS (14.5 ± 0.9 nmol/l) and LBP (14.7 ± 1.3 nmol/l) subjects was significantly higher than in the controls (10.9 ± 0.8 nmol/l) ($p < 0.05$). The maximal stimulation of the thymidine incorporation in phytohemagglutinine-c (PHA-c) stimulated lymphocytes (no cortisol present) in the FMS group was approximately 1.5 times higher ($p < 0.05$) than in the control and LBP group. The

ED50 (the cortisol concentration giving 50% inhibition of the thymidine incorporation), however, was identical in all three groups.

We conclude that FMS patients show a mild hypocortisolemia, which might be responsible for the enhanced reactivity of MNC to PHA-c, but there is only little indication for altered GR functioning in lymphocytes. Patients with LBP show less pronounced features than those with FMS.

18. Isotope effect in the binding of tritium and ^{14}C -labeled cortisol to corticosteroid-binding-globulin in serum

E.G.W.M LENTJES, F.P.T.H.M. ROMIJN and A.J. MOOLENAAR

Department of Clinical Chemistry, University Hospital Leiden

Tritium or ^{14}C -labeled radioactive steroids are used as tracers in hormone binding assays (e.g. RIA, IRMA), receptor assays and metabolic studies because of their high specific activity, low cost and low radiation dosage. A prerequisite for their use is that both they and unlabeled steroids behave identically. This is not always the case. Differences, *in vitro* in chromatographic mobilities and *in vivo* in metabolism of ^3H and ^{14}C -labeled cortisol and unlabeled cortisol have been described. We have determined the free cortisol concentration in serum using either the Amicon MPS-1 ultrafiltration-centrifugation method (I) or equilibrium dialysis (II).

If procedure I was used we found that $[1,2,6,7\text{-}^3\text{H}]$ - and $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ cortisol had a lower affinity than unlabeled cortisol for corticosteroid binding globulin (CBG). When we used these cortisol tracers for the measurement of free cortisol, results were two to five times higher ($p < 0.0001$) compared to the results obtained with unlabeled cortisol.

The binding affinity (K_a) to three separate CBG-containing samples, was 8 to 18 times lower for $[1,2,6,7\text{-}^3\text{H}]$ cortisol and 30 to 90 times lower for the $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ cortisol, when compared with that of unlabeled cortisol. This difference in affinity to CBG was not observed if method II was used for the free cortisol determinations.

The observed isotope effect in method I is not caused by unspecific binding to material such as the Amicon MPS-1 chamber or to impurities in the tracer.

We suggest that the centrifugation step during ultrafiltration changed the conformation of CBG, thereby reducing its affinity for labeled cortisol.

It is concluded that incorrect results will be obtained if radio-labeled cortisol is used for determining the free cortisol content of plasma with the Amicon MPS-1 device.

(To be published in J Ster Biochem Mol Biol 1997)

19. HbA1c-per-post: een alternatief?

K. MIEDEMA, E. LENTERS en T. de HAAN

Laboratorium, Ziekenhuis De Weezenlanden, Zwolle

De bepaling van het gehalte HbA1c/glycohemoglobine is algemeen erkend als de onafhankelijke parameter ter beoordeling van de metabole controle bij de patiënten met diabetes mellitus. Zeker met de publicatie van de DCCT-studie heeft de HbA1c/glycohemoglobine bepaling enorm aan waarde gewonnen en dient de uitslag bij elk arts-patiëntencontact te worden besproken, teneinde een juiste risico-inschatting (op de ontwikkeling van "late" complicaties) te kunnen maken. Een probleem hierbij is dat onder de hedendaagse omstandigheden laboratoria niet in staat zijn de HbA1c/glycohemoglobine bepaling bij elk arts-patiënten contact met enige spoed te bepalen.

Een mogelijk alternatief is de zogenaamde HbA1c-per-post. Hierbij stuurt de patiënt enkele dagen voor het bezoek aan de diabetes poli een druppel bloed (op een speciaal geïmpregneerd filtreerpapier) op naar het laboratorium, zodat hieruit het HbA1c/glycohemoglobine kan worden bepaald en dus bekend is ten tijde van het poliklinisch bezoek.

Onderzocht is de geschiktheid van de HbA1c Spot Check, een speciaal voor deze reden ontwikkeld teststrookje van de firma Boehringer Mannheim. Op deze strip moet 15 ml capillair of

veneus bloed worden opgebracht, gedroogd en geëluëerd, waarna het percentage HbA1c met verschillende methoden werd bepaald.

Uit de resultaten blijkt dat bij elutie van de bloeddruppels na 1 uur, 1 dag of na 7 dagen de resultaten niet verschillen (5 verschillende bloedmonsters, gemeten in duplo, n.s.), terwijl de resultaten behaald uit een capillaire bloeddruppel gelijk zijn aan de HbA1c-resultaten uit EDTA-bloed: $y_{\text{capp}} = 1,00x_{\text{ven}} + 0,1$ (Tina Quant, Boehringer Mannheim). Merkwaardigerwijs is de correlatie tussen HbA1c uit veneus EDTA-bloed met en zonder Spot Check iets minder goed: $y_{\text{Spot Check}} = 0,96x_{\text{EDTA}} + 0,27$ (Tina Quant, Boehringer Mannheim). Echter ook met andere methoden, zoals de Menarini HA 8140 cation uitwisselingschromatografie HPLC geeft de Spot Check goede resultaten ($y_{\text{Spot Check}} = 1,03x_{\text{HPLC}} - 0,02$), evenals met de Roche immunoturbidimetrische methode ($y_{\text{Spot Check}} = 1,03x_{\text{Roche}} - 0,02$). Deze resultaten wijzen erop dat HbA1c-per-post een haalbaar alternatief is, ten einde de diabetische polikliniek zodanig te reorganiseren dat bij het patiënt-artsencontact alle relevante informatie bekend is

20. De gevoeligheid van TSH-bepalingen op enkele immunoassay-automaten

A.P.M. SCHELLEKENS en F.J. VISSER

AKL Afdeling Endocrinologie, Catharinaziekenhuis, Eindhoven

De functionele gevoeligheid (FG) wordt gedefinieerd als de TSH-concentratie die met een interassay-variatiecoëfficiënt van 20% kan worden gemeten. De criteria hiervoor zijn door Spencer et al (1995) als volgt voorgesteld: 2e generatie bepaling FG = 0.1-0.2 mU/l en 3e generatie bepaling FG = 0.01-0.02 mU/l. In deze studie hebben wij de FG van TSH-bepalingen

op enige immunoassay-automaten in een normale bedrijfs-situatie gemeten.

Monsters. Wij hebben humane sera met verscheidene lage TSH-waarden verzameld en gepooled. De concentraties waren ongeveer: 0,015-0,025-0,045-0,11-0,27-0,80 en 3,4 mU/l. Elk poolmonster werd uitgevuld (0,4 ml) in een tiental polypro-

pyleen buisjes, ingevroren bij -20°C en gedistribueerd onder 6 deelnemers, die 8 methoden gebruikten.

Methoden. TSH-bepalingen: 1: Access, Sanofi-Pasteur; 2: ACS-180, CibaCorning, TSH-1; 3: ACS-180, CibaCorning, TSH-2; 4: AXSYM, Abbott, TSH-II; 5: DELFIA, LKB-Wallac, TSH-Ultra; 6: Immulite, DPC (3e); 7: ES-700, Boehringer-Mannheim (2e); 8: Johnson&Johnson, TSH30.

Elke deelnemer heeft de metingen verricht in een normale routine situatie in mei 1996.

Resultaten. Voor elke methode werd de tussen-serie precisie dosis plot (PDP) geconstrueerd, waarbij voor elke pool de gemiddelde waarde van alle TSH-metingen op de x-as werd

uitgezet tegen de %CV op de y-as. Uit deze PDP's bleek dat de Immulite-methode het best scoorde met een FG < 0,018 mU/l, de Delfia TSH-ultra en de CibaCorning TSH-2 beide een FG toonden tussen 0,018 en 0,026 mU/l en de andere methoden daarbij ver achter bleven.

Opvallend was dat de systematische verschillen tussen de TSH-methoden groot waren: afwijkingen t.o.v. het algemeen gemiddelde per pool varieerden van - 50% (Johnson&Johnson TSH30) tot +28% (ACS-180 TSH-1). De grootste systematische verschillen bevonden zich in het gebied van TSH-concentraties < 0,1 mU/l.

21. Evaluation of a microparticle enzyme immunoassay determination of progesterone on a AxSYM analyzer

R.M. HAMPSINK and I. VERMES

Department of Clinical Chemistry, Medical Spectrum Twente, Hospital Group, Enschede

The AxSYM Progesterone assay is based on the microparticle enzyme immunoassay technology. The sample Progesterone is added to a sheep monoclonal Progesterone antibody conjugated to alkaline phosphatase forming an antigen-antibody complex. The not-bound Progesterone antibodies bind to Progesterone coated polystyrene microparticles which bind irreversibly to a glass fiber matrix. The substrate, 4-Methylumbelliferyl Phosphate, is added to these matrix and a fluorescent product is measured by the MEIA optical system of the AxSYM. The fluorescence is inversely proportional to the Progesterone concentration.

The analytical sensitivity representing the lowest measurable

Progesterone concentration ranged from 0.08 to 0.12 ng/ml. Intra- and inter-assay precisions (CV) at three different concentrations varied from 2.8% to 4.8% and from 4.2 to 7.3% respectively. Serial dilutions of serum samples containing high concentrations of Progesterone showed linear dilution curves in the concentration range used (0 - 40 ng/ml). Once a calibration curve is made on the AxSYM, it was tested to be stable for at least four weeks. Linear regression analysis of Progesterone results between AxSYM and DPC Immulite shows a good correlation ($y=0.92x+0.37$; $r=0.970$; $n=104$). According to these results the AxSYM Progesterone assay is a sensitive and reliable test for serum Progesterone.

22. Laboratory assessment of pituitary-adrenal reserve in critically ill patients

A. BEISHUIZEN and I. VERMES

Medisch Spectrum Twente, Enschede

Introduction. The best dynamic test for assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and the interpretation of cortisol levels in ICU patients remain a matter of controversy. In general, the insulin stress test and metyrapone test are accepted as the gold standard in testing adrenal reserve, but are not feasible in ICU setting. The short Synacthen test (250 or 1 µg synthetic ACTH1-24) or the measurement of basal ACTHi levels might be an alternative. However, misinterpretation of normal responses to ACTH-stimulation and a low basal ACTHi level can be potentially hazardous, especially in patients with prolonged stress activation.

Methods. We performed serial measurements of cortisol and ACTHi during 8 days. 45 patients were studied, 18 with severe sepsis, 12 with multiple trauma and 15 control patients without acute medical illness. Additionally we performed in 7 ICU patients with clinically suspected adrenal insufficiency a low dose (1 µg) Synacthen test.

Results. On admission to the ICU, plasma cortisol and ACTHi were significantly elevated in septic patients (1.35 ± 0.21 mmol/l and 130.0 ± 38.2 pmol/l) and trauma patients (1.24 ± 0.28 µmol/l and 123.7 ± 41.3 pmol/l) compared to the control group

(0.36 ± 0.08 µmol/l and 15.6 ± 5.8 pmol/l $p<0.001$). Plasma cortisol remained elevated (>0.8 mmol/l) in all ICU patients, while plasma ACTHi levels decreased to lower levels than in the control group from day 5 on ($p<0.001$). The low dose Synacthen test gave a normal response in these patients: basal cortisol levels of 0.63 ± 0.30 µmol/l, which increased to 0.86 ± 0.23 at 30 min. and to 0.78 ± 0.24 µmol/l at 60 min. ACTH1-24 levels were at $t=0$: 4.20 ± 5.47 , at $t=30$: 5.25 ± 5.25 and at $t=60$: 4.16 ± 5.08 pmol/l. Despite the observed normal response to ACTH, all patients clinically improved during glucocorticoid therapy.

Conclusions. The HPA-axis undergoes a biphasic change during acute illness, with a persistent high cortisol and a paradoxically low ACTH level in the second phase, which cannot be explained by prolonged stress activation. The low dose Synacthen test and the basal ACTHi level failed to predict an inadequate cortisol response to endogenous stress and was clinically misleading. Improvement after glucocorticoid substitution therapy should be interpreted as more relevant than the rapid Synacthen test.

23. Kinetic properties of CTP synthetase from HL-60 cells

A.B.P. van KUILENBURG, L. ELZINGA and A.H. van GENNIP

Academic Medical Centre, University of Amsterdam, Lab. Genetic Metabolic Diseases

CTP synthetase is generally regarded as the rate-limiting enzyme in the synthesis of cytosine nucleotides from both *de novo* and uridine-salvage pathways. Increased activity of CTP synthetase has been observed in a variety of malignant cells. Furthermore, mutations eliminating the allosteric regulation of CTP synthetase by CTP caused a form of multidrug resistance. So far, the kinetic properties of CTP synthetase have not been studied in human tumor cells.

The steady-state kinetic properties of CTP synthetase were studied using homogenates of HL-60 cells. The activity of CTP synthetase was determined with a non-radiochemical assay using anion-exchange HPLC.

A profound positive cooperativity was observed for UTP, with

a Hill number of 3.0, under saturating conditions of the other substrates. In an analogous way only a slight positive cooperativity was observed for ATP (Hill number = 1.2). Moreover, negative cooperativity was observed for GTP (Hill number = 0.7). The enzyme proved to be still sensitive to inhibition by CTP.

The observed profound cooperative behavior of CTP synthetase from HL-60 cells for the substrates UTP, ATP and GTP is not in line with results obtained by others for the enzyme of bovine liver or rat liver. These latter studies showed that the enzyme follows normal Michaelis-Menten kinetics. The purification and characterization of CTP synthetase from tumour and human tissues is in progress.

24. The activity of CTP-synthetase is increased in pediatric acute lymphoblastic leukemia

A.C. VERSCHUUR, A.H. van GENNIP, E.J. MULLER, P.A. VOUTE and A.B.P. van KUILENBURG

Academic Medical Centre, University of Amsterdam, Laboratory Genetic Metabolic Diseases

Children suffering from acute lymphoblastic leukemia (ALL) possess an increased concentration of cytidine triphosphate (CTP) in their lymphoblasts compared to resting lymphocytes. Through studying nucleotide fluxes in a MOLT-3 lymphoblastic cell line we already showed that the increased CTP concentration is the result of an enhanced activity of CTP synthetase (CTPS). We now analyzed the *in vitro* CTPS activity in lymphoblasts of children with ALL. If increased, CTPS might be inhibited by drugs like cyclopentenylcytosine (CPEC).

We measured the CTPS activity in lymphoblasts of 16 pediatric patients with ALL at diagnosis, compared to proliferating and quiescent lymphocytes. The enzyme activity was measured by a non-radiochemical assay using ion-exchange HPLC.

The mean enzyme activity proved to be significantly higher in lymphoblasts compared to quiescent lymphocytes (6.9 versus 2.1 nmol CTP/mg protein/hr, $p=0.002$). The activity in lymphoblasts seems also higher compared to proliferating lymphocytes (6.9 versus 5.0, $p=0.17$). Preliminary results of incubation experiments with lymphoblasts show that CPEC is metabolized to its active triphosphate configuration, leading to a CTP depletion.

Our results provide the first evidence of an increased CTPS activity in pediatric ALL. Therefore, inhibiting CTPS by a drug like CPEC might be promising. CPEC is not only a potential cytostatic drug, but is also capable of enhancing the cytotoxic effect of arabinofuranosyl cytosine.

25. The sensitivity of tumor cells for induction of apoptosis by anticancer drugs: a technique to study optimal drug choice *in vitro*

H.J. GUCHELAAR¹, I. VERMES², R.P. KOOPMANS³, C.P.M. REUTELINGSPERGER⁴ and C. HAANEN²

Depts. of Pharmacy¹ and Clin. Pharmacology³, Academic Medical Centre Amsterdam, Dept. of Clin. Chemistry, Medical Spectrum Twente², Enschede, and Dept. of Biochemistry⁴, State University Maastricht

The induction of apoptosis and necrosis by the anticancer drugs cladribine (CDA), cytarabine (ARA-C), cisplatin (CDDP), and 5-fluorouracil (5FU) was studied in a concentration range of 10^{-4} - 10^{-9} M *in vitro* in the human leukemia cell lines HSB2 and Jurkat using a flowcytometric assay. In the assay, FITC-labelled Annexin-V is used, which is a sensitive probe for phosphatidylserine exposure on the outer side of the membrane on apoptotic (A) and necrotic (N) cells. Together with Propidium iodide exclusion by vital (V) and A cells, it permits the quantification of V, A and N cells simultaneously.

A time- and dose dependent decrease of V cells, as well as an increase of A and N cells was observed upon continuous incubation with a range of concentrations likely to be reached in the cellular compartment (10^{-6} - 10^{-8} M) *in vivo*.

The data were fit to a differential equation model in which V cells become irreversibly A by a direct pathway ($V \rightarrow A$) and N by an irreversible indirect pathway following the A state ($A \rightarrow N$). The rate constants of both pathways were estimated and

turned out to be concentration dependent. Plots of the rate constants were fitted to concentration-effect model, and E_{max} (maximum rate at infinite concentration) and EC_{50} (concentration at half maximum rate) were calculated. It has been shown that apoptosis was induced with increasing sensitivity in the order $CDDP < 5FU < CDA < ARA-C$; EC_{50} values ranged from 5.2×10^{-8} to 7.3×10^{-6} M.

Furthermore, it was shown that drug treatment followed after 17 hrs by 6 Gy irradiation acts synergistic for the induction of apoptosis; drug sensitivity was increased 2.3 and 2.9 fold for CDA and ARA-C respectively.

This study demonstrates that CDA, ARA-C, CDDP and 5FU possess all a concentration dependent but significantly different apoptosis-inducing effect in tumor cell lines. Our method for pharmacodynamic modelling permits quantification of the sensitivity of tumor cells to anticancer drugs and combined treatments. We suggest that our method can be used *ex vivo* to predict the clinical efficacy of anticancer treatments in patients.

26. Determination of CTP synthetase activity by a fast and sensitive non-radiochemical assay using anion-exchange HPLC

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

Academic Medical Center, University of Amsterdam, Lab. Genetic Metabolic Diseases

CTP synthetase is generally regarded as the rate-limiting enzyme in the synthesis of cytosine nucleotides from both *de novo* and uridine-salvage pathways. Increased activity of CTP synthetase has been observed in a variety of malignant cells. Up to now, no fast and sensitive assay procedures are available in which the activity of CTP synthetase can be measured in crude cell homogenates through the detection of non-radiolabeled CTP.

A non-radiochemical assay procedure of CTP synthetase was developed in which CTP is detected at 280 nm after separation of all nucleoside triphosphates with anion-exchange HPLC. A complete separation was achieved within 11 min and the minimum amount of CTP which could be accurately determined proved to be 5 pmol. Therefore, our assay procedure is ten-fold more sensitive compared to the frequently used radiochemical

assays. The assay was linear with time and protein concentration, although at low protein concentration a lag phase was observed. An amount of 2×10^6 cells was already sufficient to determine the specific activity of CTP synthetase in HL-60 cells, lymphocytes and in lymphoblasts obtained from pediatric patients suffering from acute lymphoblastic leukemia.

The mean specific activity of CTP synthetase in lymphoblasts (6.6 ± 2.8 nmol/mg/h) was approximately 3.5-fold higher than that observed in lymphocytes from healthy donors (1.9 ± 0.8 nmol/mg/h). Furthermore, we observed that the specific activity of CTP synthetase in lymphoblasts from a patient obtained at diagnosis (10 nmol/mg/h) was almost 4-fold higher than that observed in the lymphocytes obtained at remission (2.7 nmol/mg/h).

27. Serum CYFRA 21-1 levels in non-small cell lung carcinoma in relation to tumour staging, prognosis and tumour growth kinetics

H.J. SMIT, L.L.J. van der MAAS, I. VERMES en C. HAANEN

Medisch Spectrum Twente, Enschede

Cyfra 21-1, measuring the soluble fraction of cytokeratin 19, has been described as a sensitive tumour marker for non-small cell lung carcinoma (NSCLC). Serum Cyfra 21-1 levels were measured by an IRMA(CIS) in 57 patients with lung disease (41 NSCLC, 5 small cell lung cancer (SCLC) and 11 patients with benign diseases). A control group consisted of 9 patients with different non-lung tumours. No specificity of the test was found for NSCLC, as 4 out of 5 SCLC and 4 benign pulmonary disease showed elevated Cyfra 21-1 levels. In 17 patients who underwent surgery because of NSCLC serum Cyfra 21-1 levels were determined before and one week after surgery. Considering staging, stage T2 NSCLC showed higher mean Cyfra 21-1 levels than stage T1. In stage T2 and T3 there was a decrease of the mean Cyfra 21-1 level after resection. We have investigated whether serum Cyfra 21-1 level before resection is related to the biological character of the tumour. Flow cytometric analysis of labelling indices and S-phase time

in cell suspensions of these tumours after in vivo labeling with iododeoxyuridine provides information on tumour cell proliferation capacity (T pot; potential tumour doubling time). The relation between T pot and Cyfra 21-1 level is not clear: 7 patients with long potential doubling time (> 5 days) showed high ($\Delta 3$ ng/ml), but of 10 patients with short potential doubling time (< 5 days) showed 6 a low (< 3 ng/ml) and 4 a high ($\Delta 3$ ng/ml) Cyfra 21-1 levels. Finally we investigated whether there is a relationship between Cyfra 21-1 level before resection and prognosis (follow up: 3 - 14 months). Eight evaluable patients had Cyfra 21-1 levels higher than 3.0 ng/ml. Three of them have died, but 5 are still in good condition, showing that a high Cyfra level is not a prognostic factor for (bad) survival. On the contrary, 30 evaluable patients had low (< 3) Cyfra levels. Three of them have died, and 27 still survive. We can conclude that Cyfra 21-1 is not a specific marker for NSCLC but it has some prognostic indication.

Hematologie

28. Evaluatie van de pré-operatieve bloedbestellijst voor electieve urologische ingrepen

C.M.B. DUWEL¹, C.J. JONGKIND², E.R. BOEVÉ³, Th. N. GROENLAND⁴ en M.R. SCHIPPERUS¹

Afdeling Hematologie, Transfusielaboratorium¹, Centrale Dienst Automatisering Informatieverwerking², Urologie³ en Anesthesiologie⁴, AZR, Dijkzigt Ziekenhuis, Rotterdam

Herziening van pré-operatieve bloedbestellijsten beoogt een vermindering in gereserveerde en uitgegeven / retour aangeboden erythrocytenconcentraten (EC's).

Method. Urologische operaties / ingrepen waarbij bloedtransfusies hebben plaatsgevonden, worden geëvalueerd aan de hand van de volgende variabelen: transfusiekans %T, gemiddeld aantal toegeodiende eenheden EC's (mEC's) en de BOQ (Blood Ordering Quotiënt: aantal gereserveerde EC's / toegeodiende EC's bij getransfundeerde patiënten).

Aan de hand van gegevens uit de programma's OPERA en BLOEDBANK van het ziekenhuisinformatiesysteem (ZIS) zijn over 1995, na samenvoeging van verrichtingen, de bovengenoemde variabelen berekend, 24 en 48 uur postoperatief. Bij de evaluatie is als richtlijn aangehouden: 1) het bestellen van EC's bij een %T van $\geq 30\%$; 2) bij een %T van $< 30\%$ een T&S (Type and Screen) en 3) bij een %T van 0% een

ABO/rhesus bepaling. Het aantal te bestellen EC's is afgestemd op het mEC's. Een vertegenwoordiger van urologie en anesthesiologie hebben de nieuwe bloedbestellijst geëvalueerd waarna beide staven deze accordeerden.

Resultaat. De nieuwe pré-operatieve bloedbestellijst is uitgebreid van 12 naar 19 operaties / ingrepen. Het aantal operaties waarvoor EC's worden besteld, is van 11 naar 8 verminderd. Kruisplasma, dat bij één operatie / ingreep in voorraad werd gehouden, is veranderd in 11 T&S's.

De berekende reductie voor het aantal gereserveerde EC's is 15,6%, voor het retourpercentage 31,4%.

Samenvatting. Een jaarlijkse evaluatie van de pré-operatieve bloedbestellijst kan d.m.v. een ZIS-algoritme plaatsvinden. Een verhoogde afstemming in ondersteuning van het transfusielaboratorium op electieve urologische ingrepen is hiermee vorm gegeven.

29. Klinisch-chemische toepassing van capillaire elektroforese met gebruik van een dynamische coating

C.J.A. DOELMAN, C.W.M. SIEBELDER, W.A. NIJHOF, C.W. WEYKAMP en TH.J. PENDERS

Streekziekenhuis Kon. Beatrix, Winterswijk

Capillaire Elektroforese (CE) is een relatief nieuwe scheidingstechniek, waarbij gebruik wordt gemaakt van de ladingsdichtheid van het molecuul. Bij CE kunnen zeer hoge resoluties bereikt worden door een combinatie van elektroforese en elektroendosmose (1). Sinds de komst van commerciële apparatuur is de ontwikkeling van CE razendsnel gegaan en zijn er vele toepassingen beschreven.

Hemoglobine derivaten en varianten kunnen met eenvoudige capillaire zone elektroforese worden gescheiden, echter daarvoor is een hoge pH vereist. Een nieuwe methode voor het scheiden van hemoglobine varianten (HbC, HbS) en derivaten (HbA1c) is door ons uitvoerig getest. Deze scheiding (bij pH 4,5) maakt gebruik van een zogenaamde dynamische coating, waarbij het capillair voor de scheiding gecoat wordt met behulp van een eiwit, waarbij een stabiele elektroendosmotische flow wordt verkregen. Hemoglobine derivaten en varianten worden door binding aan een polysaccharide binnen 5 minuten gescheiden op deze kolom.

Deze techniek is voor de HbA1c bepaling uitermate geschikt.

Er vindt geen interferentie plaats met gearbamyleerd, geacetyleerd of foetaal hemoglobine. Bovendien beïnvloeden de hemoglobine varianten HbS en HbC de HbA1c-bepaling niet.

De variatie van de bepaling is bij een laag (4,3%), midden (7,0%) en hoog (10,5%) percentage HbA1c voor de binnenrun variatie respectievelijk 0,7%, 2,9% en 1,4% en voor de tussenrun variatie respectievelijk 3,7%, 3,3% en 1,9%.

Deze methode correleert uitstekend met de DCCT referentiemethode Bio-Rex 70 HPLC waarbij een vergelijking van CE HbA1c = -1,41 + 1,02 HPLC HbA1c ($r=0,98$) gevonden is. De CE methode bleek zeer goed te standaardiseren op de DCCT referentiemethode met behulp van 3 SKZL calibratoren.

Literatuur

1. Li SFY. Capillary electrophoresis. J Chromatogr Library. Vol 52. Amsterdam, Elsevier, 1993.
2. Doelman CJA, Siebelder CWM, Nijhof WA, Weykamp CW, Janssens J, Penders TJ. Capillary electrophoresis system for HbA1c determinations evaluated. Clin Chem, in press.

30. New hemoglobin-based reference material suitable for all types of Hemoximeters

B.H.A. MAAS¹, R.A.J. ERNST¹, A.H.J. MAAS¹, N. FOGH-ANDERSEN², E.K.A. WINCKERS³, A. BUURSMA⁴ and W.G. ZIJLSTRA⁴

Euro-Trol B.V. NL¹, Wageningen; Herlev Hospital², Herlev; University Hospital³ Utrecht; Beatrix Childrens Clinic⁴, Groningen

Dedicated instruments (hemoximeters) for the simultaneous measurement of the clinically relevant hemoglobin derivatives, i.e. oxyhemoglobin (O2Hb), deoxyhemoglobin (HHb), carboxyhemoglobin (COHb) and methemoglobin (MetHb), are based on multiwavelength spectrophotometry. Dye-based materials, commonly used as calibrators for total Hb and for quality control of some of the Hb-derivatives, are selected for use on a specific instrument because of the dependency on wavelengths and optical design. Hence there is a need for reference material which may be used for all types of hemoximeters.

We evaluated HEMOXITROLTM, a lyophilized bovine hemoglobin matrix containing predefined fractions of hemoglobin derivatives (FO2Hb, FHHb, FCOHb and FMetHb) and predefined total hemoglobin concentration (ctHb) and oxygen saturation (sO2).

Continuous spectra of single Hb-derivatives of human and bovine hemoglobin and of HEMOXITROLTM were compared on a HP-8450A spectrophotometer to establish the absorptivities at $\lambda = 480 - 650$ nm with intervals of 2 nm; in between wavelengths were obtained by interpolation.

Arterial and venous HEMOXITROLTM samples were analysed with the HP-8450A in two modes: first using human

absorptivities, and second, bovine absorptivities, in order to observe non-human behaviour. The outcome was compared with results of four types of routine analysers (Radiometer ABL520/OSM3, Instrumentation Laboratory IL282/IL482, Ciba-Corning CCD2500/270 and AVL912) and computer models simulating the routine analysers at the instrument-specific wavelengths. The absorptivities of human hemoglobin or Hemoxitrol were used and the absorbances were measured with the HP-8450A.

To evaluate the practical usefulness of HEMOXITROLTM a field study has been carried out in five major hospitals and a quality assessment trial in 40 laboratories.

Based on continuous spectra, it can be concluded that HEMOXITROLTM derivatives for hemoglobin are virtually identical with those of human hemoglobin, except for small methemoglobin differences. Results based on routine analysers and computer models show but small differences when the human mode (or default mode) was used on bovine hemoglobin. Also the problem of absorptivities at room temperature used to simulate the outcome of analysers at 37 °C may be of influence as well as pH.

The stability of HEMOXITROLTM was found to be at least one year, when it is kept at 2-8 °C (2 years at -20 °C).

31. Flowcytometrie van intracellulaire cytokinen

A.M.T. van LEEUWEN¹, Chr.H.H. ten NAPEL¹, F.M.F.G. OLTHUIS¹ en C.G. FIGDOR²

Laboratorium Medisch Spectrum Twente¹, Enschede en Afdeling Tumorimmunologie² Katholieke Universiteit, Nijmegen

Cytokinen zijn polypeptiden, die in leukocyten worden geproduceerd en die na vrijkomen (release) uit de cel kunnen aanhechten aan specifieke receptoren van naburige cellen. Op deze wijze geven cytokinen signalen, die de intercellulaire communicatie verzorgen en het gedrag van andere cellen beïnvloeden. Cytokinen spelen een belangrijke rol bij de orkestratie van immunologische reacties, ontstekingsreacties, auto-immuun fenomenen, het groeigedrag van weefsels en tumoren, het immuniteitsbeloop na HIV-infectie en bij de ontwikkeling van AIDS.

Dit onderzoek betreft de cytokineproductie in CD4+ lymfocyten bij gezonden en bij een groep patienten met HIV-infectie. Het is bekend dat bij een voortschrijdende HIV-infectie het aantal CD4+ cellen vermindert en het immuunapparaat deficiënt wordt. In de literatuur zijn aanwijzingen dat als gevolg van HIV infectie, een verschuiving plaatsvindt van de aanvankelijk dominante Th1-populatie (de cellulaire immuniteit stimulerende, IFN en IL2 producerende CD4+ cellen) naar de Th2-populatie (de humorale immuniteit stimulerende, IL4 en IL10 producerende CD4+ cellen). De verhouding Th1 tot Th2

lymfocyten is derhalve een parameter voor het beloop van een HIV infectie en bij de beoordeling van het effect van een anti-retrovirale behandeling.

Vol bloed wordt gestimuleerd met phorbol ester en een calcium-ionofoor. De geproduceerde cytokinen worden in het Golgi-apparaat van de lymfocyten geaccumuleerd door de release te blokkeren middels incubatie met Brefeldin-A. Na membraankleuring van de CD4+ cellen met anti-CD4, worden de cellen gefixeerd en gepermeabiliseerd, waarna kleuring van de cytokinen plaatsvindt met fluorescerend gelabelde humane monoclonale antilichamen. (anti-IFN, anti-IL2, anti-IL4, anti-IL10). Vervolgens worden in de CD4+ cellen de betreffende

cytokinen gemeten met behulp van flowcytometrie.

Onderzoek naar de verhouding in de omvang van de Th1- en Th2-populaties bij twintig gezonde mannelijke vrijwilligers en bij 10 HIV geïnfecteerde patiënten lijkt de in de literatuur beschreven teruggang van de Th1-populatie te bevestigen ten voordele van de Th2-populatie tijdens het beloop van een HIV infectie.

Vervolg onderzoek bij patiënten, die een anti-retrovirale behandeling ondergaan, zal moeten uitwijzen of een vermindering van de "viral load" gepaard gaat met een immunologisch herstel en een herstel van de verhouding tussen de Th1- en Th2-populatie.

32. Integriteit van CD34+ cellen vóór en na selectie met immunobeads

F.M.F.G. OLTHUIS, D.J. RICHEL, M.R. SCHAAFSMA, C.E.I. SCHENKEVELD en E.M. KALSBECK-BATENBURG
Medisch Spectrum Twente, Enschede

Onderzocht werd het cytaferese materiaal verkregen bij patiënten, die na een intensieve chemotherapie wegens maligniteit een autologe reïnfusie van hematopoïetische cellen ontvingen. De fenotypering van de CD34+ cellen was bij zeven evalueerbare patiënten als volgt:

95 % : CD13+,CD38+,HLA-DR+
10-50 % : CD7+
0 % : CD90+,CD38-,HLA-Dr-
≤10 % : CD3+
20 % : CD13+,CD38+,HLA-DR+,Thy-1+
<5 % : CD19+ (bij 6 van de 7 patiënten)
<5 % : CD16/56+

Na selectie van de CD34+ cellen met immunobeads waren de CD3+ en CD 16/56+ cellen niet meer aantoonbaar. Overigens was de immuno-fenotypering onveranderd.

Met FITC-gelabelde Annexine V werd onderzocht in hoeverre na selectie met immunobeads in de CD34+ cellen verlies van de celmembraan asymmetrie had geïnduceerd (groene fluorescentie), danwel verlies van de celmembraan integriteit had veroorzaakt zich uitend in opneming van propidium iodide (PI, rode fluorescentie), gemeten met flowcytometrie.

Conclusie. Zowel voor als na selectie van CD34+ cellen met immunobeads is bij een aantal patiënten aantoonbaar verlies van de asymmetrie van de celmembraan, passend bij beginnende apoptose. Toch was de snelheid van herstel van beenmergfunctie na intensieve chemotherapie, gevolgd door stamcelreïnfusie bij alle patiënten klinisch gelijk. In hoeverre de membraanveranderingen van de CD34+ cellen betekenis hebben voor de celviabiliteit dient nader onderzocht te worden.

		Annexine V positief		PI positief
		vóór selectie	na selectie	na selectie
patient 8	CD34+ fractie	48,9	30,0	< 5 %
patiënt 9	CD34+ fractie	23,2	21,5	< 5 %
patiënt 10	CD34+ fractie	16,8	58,5	< 5 %
patiënt 13	CD34+ fractie	11,2	10,0	< 5 %
patiënt 14	CD34+ fractie	15,5	18,5	< 5 %
patiënt 15	CD34+ fractie	10,1	43,8	< 5 %
patiënt 16	CD34+ fractie	50,3	16,8	< 5 %
patiënt 19	CD34+ fractie	43,0	28,4	< 5 %

33. Haemochromatosis gene mutations in β -thalassemia patients

W. W. van SOLINGE, R. van WIJK, B. B. van der MEIJDEN and R. J. KRAAIJENHAGEN
Clinical Laboratory, Eemland Hospital, Amersfoort

Background. Haemochromatosis is an autosomal recessive disorder in the iron metabolism. Recently, the identification of a single point mutation in the HLA-H gene was reported, responsible for the disease. This mutation causes the substitution of a cysteine residue by a tyrosine residue at position 282. In addition, a polymorphic site was described at position 63 (histidine to aspartate). Patients with β -thalassemia may have a microcytic anemia and hemolysis. These patients are at risk of developing iron deposits, either as a consequence of faulty medication or of blood transfusions. For these patients, mutations in the HH gene may be an additional riskfactor for developing haemochromatosis.

Materials and Methods. PCR-primers were synthesized with M13 sequences added. DNA was isolated from patients and amplified using PCR. Restriction enzyme digestion and sequencing were used to identify mutations in the HH gene. In all β -thalassemia patients screened, thalassemia causing mutations were identified by DNA sequencing.

Results. To date, we identified in three out of fourteen β -thalassemia patients mutations in the HH gene. One patient was heterozygous at position 282 and homozygous for histidine at position 63. This was a patient of dutch origin, with a common mutation in the β -globin gene. Two other patients were normal at position 282, but heterozygous at position 63. More data will be available at the time of the conference.

Conclusion. Until now, we did not detect homozygous mutations at position 282 in our mixed population of β -thalassemia patients. One patient was heterozygous. The mutations found in the HH gene so far, have been identified in the caucasian population. In other populations the prevalence of these mutations is probably low, although this needs to be confirmed. If β -thalassemia patients do carry mutations at position 282, one should be reluctant to use iron supplements or blood transfusions, if possible. Molecular testing of individuals with an increased risk for haemochromatosis should be considered.

34. Utilisation of a cryptic splice site induced by a novel mutation in the human red cell type pyruvate kinase gene causing severe nonspherocytic hemolytic anemia

W. W. van SOLINGE, R. van WIJK and R. J. KRAAIJENHAGEN

Clinical Laboratory, Eemland Hospital, Amersfoort

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. Molecular studies help to establish a correct diagnosis and make prenatal diagnosis possible. In addition, these studies -when extended to RNA analysis- focus on understanding the pathogenesis of the disease.

Patients and Methods. DNA from a family with known pyruvate kinase deficiency was isolated. In addition, total RNA was isolated from reticulocytes. Glycolytic enzyme activities were measured. PCR, Reverse Transcription PCR and DNA sequencing were used to analyse the PKLR genes.

Results. A novel mutation in the PKLR gene was detected at position +1 in IVS-5 (G to A). A second mutation was detected in this family at nucleotide 1436 (G to A). Two family members were compound heterozygotes, seven were heterozygotes and three individuals were unaffected. PK activity correlated

with the number of mutated alleles. An aberrant RNA transcript was detected in individuals with the IVS-5+1 mutation, containing an extra sequence of 51 nucleotides of intron 5.

Conclusions. As a result of the novel mutation in the PKLR gene the 3'-splice site of exon 5 is skipped and a cryptic splice site in intron 5 is used instead. This generates a transcript which, if translated, codes for a PK protein with an insert of 17 aminoacids. At present, we configure the 17 additional aminoacids into a 3D model of human red cell pyruvate kinase to better understand the effect of this mutation. The 1436 mutation involves the last nucleotide of exon 10 and thus also involves a splice site. No aberrant RNA transcripts induced by this second mutation have been detected to date. In addition, the 1436 mutation leads to the substitution of an arginine by a histidine residue. Both mutations are associated with PK deficiency. Co-inheritance of the IVS-5+1 mutation with the 1436 mutation results in severe PK-deficiency.

35. Prenatal diagnosis of pyruvate kinase deficiency by DNA analysis

W. W. van SOLINGE¹, R. J. KRAAIJENHAGEN¹, R. van WIJK¹, R. J. SINKE², H. K. PLOOS van AMSTEL² and G. RIJKSEN³

Clinical Laboratory, Eemland Hospital¹, Amersfoort; Clinical Genetics Centre² Utrecht and Department of Hematology, University Hospital³, Utrecht

Background. Mutations in the red cell type pyruvate kinase gene are associated with pyruvate kinase deficiency, an important cause of nonspherocytic hemolytic anemia. In utero, measurement of relevant enzyme activity is not possible, because the red cell type PK enzyme is not expressed at this stage of development. For a reliable diagnosis, fetal DNA needs to be analysed for mutations in the PK gene.

Parents who have a severely affected (blood transfusion dependent) PK deficient child, often request prenatal diagnosis in subsequent pregnancies. We describe here the first prenatal diagnosis in The Netherlands for pyruvate kinase deficiency.

Patients and Methods. The proband is a severely PK-deficient boy of 3 years old. DNA was isolated from white blood cells from proband and both his parents. A chorionic villi biopsy was performed 10 weeks after gestation and DNA extracted according to standard procedures. Mutations were analysed using PCR and direct DNA-sequencing.

Results. The proband was found to be a compound heterozygote. The paternal allele exhibited a Glu241Stop nonsense mutation caused by a G to T conversion at position 721. The maternal allele showed a Arg510Gln missense mutation due to a G to A conversion at position 1529.

PK activity was < 2.0 U/gHb (reference range 8.4-14.4 U/gHb). The fetus was shown to be a compound heterozygote for the described mutations.

Conclusions. Two disease causing mutations in the PK gene were identified. Both mutations were published before and known to be associated with PK deficiency. The fetus was a compound heterozygote and thus severely affected by the disease. Prenatal diagnosis for PK deficiency is now possible, using molecular techniques. If parents decide to carry the pregnancy to term, the DNA test is useful for clinicians to anticipate problems that may occur in the newborn.

36. Molecular diagnosis of haemochromatosis

W.W. van SOLINGE^{1,2}, R.J. KRAAIJENHAGEN¹, B.B. van der MEIJDEN¹, J.P.M. WIELDERS¹ and D.W. SWINKELS²

Clinical Laboratory, Eemland Hospital¹, Amersfoort and Department of Clinical Chemistry², University Hospital Nijmegen St Radboud, Nijmegen

Background. Haemochromatosis is an autosomal recessive disorder in the iron metabolism. Recently, the identification of a single point mutation in the HLA-H gene was reported, responsible for the disease in its hereditary form. This mutation causes the substitution of a cysteine residue by a tyrosine residue at position 282. In addition a polymorphic site was described at position 63 (histidine to aspartate). We wished to develop the molecular tools to detect these mutations, in order to evaluate the test in relevant patients in our hospitals.

Materials and Methods. PCR-primers were synthesized with M13 sequences added. DNA was isolated from patients and amplified using PCR. Restriction enzyme digestion and sequencing was used to identify mutations. Patient samples were either from known haemochromatosis patients or from patients in which the disease was listed in the differential diagnosis.

Results:

Genotypes	Patients	Controls
C282Y / H63D		n
++	7	0
+-	2	0
+-	1	2
-	3	1
-	5	24
Total	18	27

More data will be available at the time of the conference.

Discussion. The molecular analysis of mutations in the gene for haemochromatosis is now available. In all patients previ-

ously diagnosed to have haemochromatosis, the mutation at position 282 was detected in homozygous form. If the diagnosis can be confirmed on the molecular level, liver biopsies

may not be necessary. The diagnosis can now be made at an early age, making treatment possible before excessive iron storage takes place.

37. Preventie immunisatie door c-, E- of K antigeen bij vrouwen < 45 jaar

E. van VOORST tot VOORST¹, M. FOKKERT¹, J. KOLKMAN - de VROOMEN¹, S. KOEKKOEK - MEIJER¹, M. WESTERVOORDE¹ en F. van de LOGT²

Laboratorium¹ en Kindergeneeskunde², Ziekenhuis De Weezenlanden, Zwolle

Eind april 1996 werd poliklinisch bloed van een 1 dag oude baby aangeboden voor bilirubine. Resultaat: 299 µmol/l. Moeder en zootje werden opgenomen. Hij kreeg onmiddellijk fototherapie, daar bilirubine na 3 uur reeds 322 mmol/l was. Verder onderzoek (directe antiglobulinetest (DAT): 4+, Hb: 9,0 mmol/l, LDH: 1160 U/l) wees op een hemolytische anemie van de pasgeborene (oorzaak: anti-c). Door 4 dagen fototherapie daalde bilirubine tot 148 µmol/l.

De moeder was tijdens haar zwangerschap niet onderzocht op irregulaire antistoffen omdat zij D-positief is. Dit was haar derde kind.

Bloedgroepserologisch onderzoek (februari 1997) van moeder, vader en kinderen resulteerde in:

	moeder	vader	1e kind	2e kind	3e kind
Bloedgr./rh.	A/pos	B/pos	B/pos	O/pos	B/pos
Rh.fenotype	CCDee	CcDee	CcDee	CcDee	CcDee
Irr.antistof	anti-c				

Retrospectief onderzoek van positieve DAT bij pasgeborenen (1-1-1995 t/m 10-2-1997, totaal 32) leverde op 7 x: zwakke reactie, geen verder onderzoek gedaan, klinisch irrelevant; 18 x: IgG anti-A of IgG anti-B; 5 x: anti-D; 1x anti-D èn anti-E; 1x anti-c (zie boven).

De moeder met anti-D èn anti-E bleek zeker 5 keer zwanger te zijn geweest. Bloedgroepserologisch onderzoek van haar en haar echtgenoot (hun drie kinderen zijn niet onderzocht): moeder: A/neg, rhesusfenotype ccdee; vader: O/pos, rhesusfenotype ccDEE.

Conclusie:

- onderzoek naar irregulaire antistoffen tijdens zwangerschap (3e en 7-8e maand) dient, ook bij D-positiviteit, te gebeuren,
- immunisatie door het c- respectievelijk E-antigeen (en D-) niet te voorkomen was gezien de rhesusfenotypes van de ouders en
- ons ziekenhuis de aanbeveling van het College voor de Bloedtransfusie om vrouwen tot 45 jaar uitsluitend erythrocyten toe te dienen die compatibel zijn m.b.t. de antigenen c, E en K, terecht *niet*, mede om kosten-baten analytische redenen (ca 150 vrouwen/jaar), heeft ingevoerd.

Stolling

38. Een turbidimetrische methode voor Von Willebrand Factor

J.H. SCHADE, D.A.G. BOYMANS, A. ZEINSTRAS, R. de JONG en A.J. BAKKER

Stichting Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden

Inleiding. Von Willebrand Factor kan worden gemeten via de ristocetine cofactor test (VWF:Rcof) of de bepaling van Von Willebrand antigeen (VWF:Ag). VWF:Ag wordt bepaald m.b.v. rocketelektroforese (Laurell) of een ELISA. Een bruikbare turbidimetrische of nefelometrische methode is niet beschreven. De gemiddelde concentratie van VWF:Ag van 8 mg/l in plasma stelt bijzonder hoge eisen aan affiniteit en specificiteit van het antilichaam voor turbidimetrie.

Methoden. De Laurell methode wordt uitgevoerd met zelf-gemaakte gels met Dako antilichaam (A 0082). Voor turbidimetrie wordt vooraf VWF:Ag geïsoleerd door een 60 minuten durende incubatie bij 4 °C m.b.v. een PEG-6000 precipitatie (eindconcentratie 6.25%). Na centrifugeren bij 200xg wordt het eiwitpellet in PBS-T (0,05 mol/l fosfaat buffer, pH=7,5, 0,01% Tween-80) gesolubiliseerd, waarna de antigene concentratie wordt gemeten met de ELAN (Merck) en het Dako antiserum (A 0082). Een standaardreeks wordt gemaakt uitgaande

van poolplasma van 80 mannelijke en vrouwelijke donoren (100%). Patiënten plasma wordt onverdund en 1+1 verdund gemeten. De concentratie van totaal eiwit wordt door de voorbewerking gereduceerd van 65 naar 8 g/l. Tevens wordt een kruisreagerende component, die alleen in vrouwelijk plasma aantoonbaar is, door deze procedure geëlimineerd. De VWF:Rcof wordt gemeten m.b.v. een BioData 4-kanaals aggregatiemeter en Behring bloedplaatjes.

Resultaten. Regressieanalyse, uitgevoerd volgens Passing/Bablok geeft de volgende resultaten: VWF:AgELAN = 0,975xVWF: AgLaurell + 12,6; n=40; R=0,58 en VWF:Ag-ELAN = 0,80xVWF:Rcof + 32,7; n=40; R=0,63.

Conclusie. De turbidimetrische bepaling voor VWF:Ag lijkt een alternatief voor de Laurell methode te kunnen zijn. Tevens is deze methode mogelijk geschikt te maken voor het collageen bindend vermogen van VWF.

39. Performance and quality control concerning measurement of Lysis Onset Time on a Thrombolytic Assessment System

P.C.M. BARTELS and M. SCHOORL

Department of Clinical Chemistry, Hematology and Immunology, Medical Centre Alkmaar

A Thrombolytic Assessment System (TAS) has been designed for point of care testing. Guidelines and criteria for quality assurance should be provided as a service from the laboratory to the clinical department.

Measurement of Lysis Onset Time (LOT) is applicated in

order to establish the effect of treatment during thrombolytic therapy in subjects with a myocard infarct. The principle of measurement is based on establishment of the lytic state of a blood sample after 'in vivo' administration of streptokinase (SK).

Within day precision studies resulted in coefficients of variation of approximately 23 % and 10 % for control plasma specimens and blood samples, respectively.

The time interval elapsed before actual measurement is a very critical pre-analytical factor. According to instructions of the manufacturer blood samples should be tested within 5 minutes after venapuncture.

Inaccuracy due to deterioration of blood samples as well as control specimens has been estimated. In blood samples which

have been 'in vitro' enriched to a concentration of 1000 Units SK/l increases in LOT are demonstrated amounting to 15-30 % within 5 minutes storage and 35-65 % within 15 minutes. Control plasma samples demonstrated an increase in LOT results of 15-20 % and 25-40 % respectively. Our results are not within specifications which had been supplied by the manufacturer. More detailed Operator's Instructions and further critical evaluation of quality control results are needed to optimize performance of this test methodology.

40. De mate van aanwezigheid van antigenen op het bloedplaatjesoppervlak is sterk afhankelijk van het gebruikte fixatief

R.J. BERCKMANS, R. NIEUWLAND, M.C.L. SCHAAP en A. STURK

Afdeling Klinische Chemie, Academisch Ziekenhuis, Leiden

Vol bloed flowcytometrie wordt algemeen gebruikt om de expressie te bestuderen van oppervlakte antigenen op diverse celtypen, waaronder bloedplaatjes. Desondanks is er relatief weinig aandacht besteed aan de optimale omstandigheden om bloed te fixeren. Dit is wel belangrijk, omdat fixatie de expressie van antigenen stabiliseert. Het doel van deze studie was het vaststellen van het effect van toenemende concentraties formaldehyde (0% tot 1% [w/v] fc) op de expressie van diverse antigenen op het oppervlak van zowel rustende als met ADP (10 mM)-gestimuleerde bloedplaatjes, tot maximaal 48 uur na stimulatie. Bloed werd afgenomen bij 7 gezonde vrijwilligers en de expressie werd gemeten met vol bloed flowcytometrie. Bij niet-gefixeerde bloedplaatjes nam de expressie toe van het glycoproteïne (GP) Ib, CD62 (P-selectine) en CD63 (GMP55), evenals de fibrinogeen-bindingsconformatie van het GPIIb/IIIa-complex (PAC-1), zowel op rustende als met ADP-gestimuleerde bloedplaatjes. De enige uitzondering was PAC-1 op

gestimuleerde bloedplaatjes die afnam tijdens opslag, waarschijnlijk door het binden van fibrinogeen uit bloed. Bij de hoogst gebruikte concentratie formaldehyde, 1%, bleef de expressie van CD62, CD63 en 'PAC-1' constant op rustende en gestimuleerde bloedplaatjes. De expressie van GPIb daarentegen nam sterk af in de tijd en de efficiëntie van de flowcytometer om bloedplaatjes te herkennen in vol bloed nam af met een factor 4. De telefficiëntie bleek afhankelijk te zijn van de gebruikte concentraties formaldehyde en albumine. Zowel de expressie van de onderzochte antigenen op rustende en gestimuleerde bloedplaatjes als de telefficiëntie van de flowcytometer waren optimaal tot 48 uur na fixatie met 0,2% formaldehyde [w/v]. Samenvattend kan worden gezegd dat het gebruikte percentage fixatief de mate van expressie van antigenen sterk beïnvloedt en daarmee de resultaten van klinische studies.

41. Lage proteïne S concentraties: methode of pilgebruik?

M.H. BEUNIS en P. VLOT

St. Franciscus Gasthuis, Rotterdam

Sinds de introductie van het trombofiliepakket in 1995 bepalen we de concentraties van proteïne C (Nodia proteïne C), proteïne S (Laurell kit, Helena), Antitrombine III (Nodia, coagmate) en de APC resistentie ratio op verzoek van de arts bij patiënten die zich presenteren of zich gepresenteerd hebben met diep veneuze trombose. Ter controle bepalen we ook de PTT-INR en de APTT. Bij de interpretatie van de resultaten viel het ons op dat de proteïne S -concentraties veel vaker verlaagd waren dan we op grond van de literatuur verwachtten, nl. in 49 van de 152 monsters met een normale PTT-INR.

We hebben ons afgevraagd of we de bepaling juist uitvoerden. Afgezien van de soms technische problemen met de Laurell-techniek was de controle (standaard humaan plasma, Behringwerke) stabiel en kwam overeen met de briefjeswaarde: $x \pm sd = 79 \pm 5 \%$.

Bij een vergelijking met een ELISA-test (Organon Teknika) waren de proteïne S-concentraties weliswaar iets hoger, maar nog steeds werd bij vele monsters een verlaagde proteïne S-concentratie gevonden: in de Laurell techniek waren 31/69 monsters lager dan 75%, in de ELISA 21/69.

Was de proteïne S dan fysiologisch of ten gevolge van het ziekteproces verlaagd?

Proteïne S lijkt geen negatief acute fase eiwit en is ook niet sterker verlaagd dan proteïne C of antitrombine bij diffuse intravasale stolling. Recente literatuur geeft aan dat met name de derde generatie anticonceptiepill invloed heeft op verschillende stollingsparameters.

Retrospectief hebben we onze resultaten van monsters met een INR < 1,3 en een APTT < 40 geëvalueerd: De resultaten zijn gegeven in onderstaande tabel:

Conclusie:

Er is een groot verschil tussen immunochemische proteïne S bepalingen;

Bij vrouwen worden meer verlaagde waarden gevonden dan bij mannen;

Hangt het verhoogd trombose risico bij orale anticonceptie samen met een verlaagde proteïne S concentratie?

Tabel.1. Evaluatie proteïne C en proteïne S uitslagen

	Proteïne C		Proteïne S	
	M	V	M	V
Aantal	61	91	61	91
Gem.	89	99	91	81
SD	16	22	23	23
<75%	4/61	7/91	10/61	39/91
%<75%	6,5%	7,6%	16%	43%

42. Een patiënte met een ernstige, verworven Factor X-deficiëntie

A. CASTEL¹, E.W.H. WAALDER¹, E. de JAGER² en R. BIEGER²

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹ en Afdeling Interne Geneeskunde², Ziekenhuis Bronovo, Den Haag

In februari 1996 werd in ons ziekenhuis een 69-jarige vrouw opgenomen met spontane haematomen en pijnklachten in de extremiteiten. In het verleden had zij ondermeer een appendectomie en uterusextirpatie ondergaan zonder bloedingscomplicaties. De APTT en de PTT waren beide zeer sterk verlengd (>80 sec.) en er was geen reactie op het toedienen van vitamine K. Coumarine-derivaten waren in serum niet aantoonbaar. De percentages Normotest en Factor V waren respectievelijk 7% en 68%. Mengproeven wezen niet op het voorkomen van een circulerend anticoagulans. De uitslagen van het overige stollingsonderzoek waren als volgt: Factor VIIIc: >130%, Factor VIIIaAg: >130%, Factor IX: 67%, Factor II: >100%, Factor X: <1%, Trombinetijd: 10,4 sec, Fibrinogeen: 4,3 g/l en Bloedingstijd: 120 sec. Aanvullend onder-

zoek in het CLB leverde de volgende resultaten: Factor II (act.): 116%, Factor II (Ag): 143%, Factor X (act.): <1% en Factor X (Ag): 0,76%. Er bleek sprake van een ernstige, verworven Factor X-deficiëntie, waarschijnlijk op basis van amyloïdose bij een 'light chain disease', met uitscheiding van vrije kappa-ketens in urine. Het effect van het toedienen van "4 factoren-concentraat" en plasma-infusie op de Factor X-concentratie werd nagegaan. Gelet op de ernst van de bloedingen werd patiënte behandeld met CVP-kuren (2 mg oncovin en 1200 mg cyclofosfamide i.v.; 5 x 60 mg prednison d.d. per os). Patiënte werd eind april 1996 uit het ziekenhuis ontslagen en verder poliklinisch behandeld. De APTT en PTT bleven fors verlengd (\pm 60-70 sec.) en in februari 1997 was patiënte in redelijk goede conditie.

43. A fast, quantitative plasma d-dimer latex based assay

B. VAN DEN ENDE¹, W. M. MORRIEN¹, D. P. M. BRANDJES^{1,3} and E. J. R. VAN BEEK²

Centre for Hemostasis, Thrombosis, Atherosclerosis and Inflammation Research¹ and Department of Diagnostic Radiology², Academic Medical Center, Amsterdam, Department of Internal Medicine³, Slotervaart Hospital, Amsterdam

The determination of plasma D-dimer may be of potential value for the safe exclusion of venous thromboembolism. For this purpose the sensitivity has to approach 100%, which so far can only be obtained by ELISA's, because cut-off values can be adjusted. A disadvantage is the laboratory time involved, whereas in the clinical setting a quick result often is required.

Materials. We modified a qualitative latex assay (Minutex D-dimer, Biopool, Umea, Sweden) into a quantitative test, and compared the outcomes with the results of a similar ELISA (Asserachrom D-di, Diagnostica Stago, Asnières, France) in plasma samples of 79 patients with suspected pulmonary embolism. Both assays were performed on a kinetic microplate reader (Thermomax Microplate Reader, Molecular Devices Corp. Menlo Park CA, USA).

We tested plasma samples of 301 patients with clinical suspected pulmonary embolism, who underwent lung scintigraphy and angiography if a non-diagnostic lung scan was obtained.

The prevalence of pulmonary embolism was 30%.

Results. The correlation coefficient between the two methods in 79 patient samples was 0.63 for a range of < 1000 mg/l for the ELISA and < 800 mg/l for the quantitative latex test with a regression equation of $LATEX = -15.5 + 0.2 * ELISA$.

In plasma samples of 301 patients of which 30% had pulmonary embolism, as proven by lung scintigraphy and angiography, we found a sensitivity of the quantitative latex test of 91.1% with a specificity of 32.7% using a cut-off value of 100 mg/l. This cut-off value we established in material of 40 healthy women and 39 healthy males.

Conclusions. This quantitative latex assay may be of value for the exclusion of venous thromboembolism, leading to a substantial decrease of patients requiring invasive diagnostic procedures. It has an accuracy comparable to an ELISA and it is easy to perform at reduced laboratory time and in a less expensive setting.

44. De waarde van de D-dimeer bepaling in een prospectief onderzoek bij verdenking op longembolie

J. de JONGH-LEUVENINK¹, J. WALLIS², M. JANSEN¹ en A. DENISSEN¹

Centraal Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹ en Afdeling Radiologie², St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg

In een Prospectieve studie in het St. Elisabeth Ziekenhuis te Tilburg wordt op dit moment de longangiografie in combinatie met echografie van de beenvenen als diagnostische methode geëvalueerd bij patiënten met verdenking op longembolie, zowel bij klinische als poliklinische patiënten. Dit onderzoek wordt door de afdeling radiologie uitgevoerd. Daarnaast worden de D-dimeer bepalingen SimpliRED, direct (Nodia, Semi-kwantitatief) en een kwantitatieve bepaling (Vidas, D-dimeer, BioMérieux) uitgevoerd om de diagnostische waarde daarvan te bepalen. Tot nu toe (1-1-1997) zijn bij 75 patiënten D-dimeer bepalingen uitgevoerd. In tabel 1 zijn de resultaten vermeld. De negatief voorspellende waarde van de Vidas D-dimeer is uitstekend bij een cut-off value van 500 ng/ml, vergelijkbaar met de resultaten van De Moerloose in 1996. De conclusie is, voor wat betreft de waarde van deze bepaling, dezelfde namelijk dat met behulp van deze test aanwezigheid van een longembolie kan worden uitgesloten. De SimpliRED-bepaling bleek in een aantal gevallen vals-negatief te zijn. Een grote managementstudie, om de waarde te toetsen van de D-

dimeer bepaling op de spoedeisende hulp bij patiënten met verdenking op longembolie, moet een logisch vervolg zijn.

Tabel 1. Resultaten van D-dimeer bepalingen bij patiënten (75) met verdenking op longembolie

	D-dimeer Vidas 500 ng/ml	SimpliRED
Sensitiviteit	100 %	81,8 %
Specificiteit	27,9 %	68 %
PPV	35,4 %	54,5 %
NPV	100 %	88,9 %

Literatuur

1. Moerloose P de, et al. Contribution of a new, rapid, individual and quantitative automated D-dimer ELISA to exclude pulmonary embolism. *Thrombosis and Haemostasis* 1996; 75: 11-13.

45. Comparison of the Partial Thromboplastin Time (PTT) on the ELECTRA 1600C and the STA using RecombiPlasTin and Thrombotest reagents

P. LANGESLAG, L. van LEEUWEN and P.S.H. KUPPENS
St. Jans Gasthuis, Weert

Background. The ELECTRA 1600C (Hemoliance) as well as the STA (STAGO) are fully automated random access analysers, both featuring bi-directional exchange with a host computer.

Aim. Actually our laboratory uses the reagent Thrombotest (Nycomed) on a six channels Lode (Lode) to control Oral Anticoagulation Therapy (OAT). Changing to a different instrument as well as changing to a factor sensitive Recombinant PTT reagent at the same time does effect OAT. This study illustrates the variance in Thrombotest between the Electra 1600C and STA as well as the variance introduced by switching to a factor sensitive reagent, RecombiPlasTin (ORTHO).

Material & Methods. PTT's were determined using the STA in combination with Thrombotest reagent and the ELECTRA 1600C in combination with Thrombotest and RecombiPlasTin reagent in 10 normal subjects and 71 patients receiving Oral Anticoagulant Therapy (OAT). The PTT's were determined and expressed in International Normalised Ratios (for concurrent warfarin therapy). Citrated samples from normal subjects and anticoagulated patients were analysed within 2 hours.

Results. The mean +/- 2 standard deviations of normal PTT's using Thrombotest on the STA was 37-43 sec. The normal value using the ELECTRA 1600C for Thrombotest was 37-43 sec, when using RecombiPlasTin the normal value on ELECTRA 1600C was 11.4-13.0 sec and for the STA 11.3-13.1 sec. The ISI value used for RecombiPlasTin was 1.00 and for Thrombotest (Nycomed) 1.01. The mean INR value for

Thrombotest on STA was 2.74 compared to the mean value on the ELECTRA 1600C 2.85. The mean INR value for RecombiPlasTin using the ELECTRA 1600 C and STA for the Thrombotest reagent was 0.976 with Standard Error= 0.1710 INR.

The correlation coefficient calculated for ELECTRA 1600C and STA for the Thrombotest reagent was 0.976 with Standard Error=0.1710 INR. The correlation coefficient calculated for the ELECTRA 1600C Thrombotest versus RecombiPlasTin was 0.947 with Standard Error=0.2558 INR.

From these results, the variations at INR 3.0, introduced by instrument change and instrument related in-precision together were 5.7%. Variations at INR 3.0, introduced by switching from Thrombotest to RecombiPlasTin together with instrument related in-precision on the ELECTRA 1600C were 8.5%. Day to day precision on ELECTRA 1600C for RecombiPlasTin was 3.7% and on STA 2.8%.

Day to day precision on ELECTRA for the Thrombotest was 8.9% and on STA 7.5%.

Conclusion. All the methods compared on both automated systems give good correlations and good precisions.

Switching instruments and reagents at the same time may cause OAT adjustments. The results from this study show that at INR of 3.0, OAT treatment will not change in at least 90% of the tested samples when switching from Thrombotest to RecombiPlasTin and switching to the ELECTRA 1600C or to the STA at the same time.

46. Antithrombine productie door de humane hepatoma cellijn HepG2 wordt verlaagd door interleukines 6 en 1β: Antithrombine gedraagt zich als een negatief acuut fase eiwit

R. W. L. M. NIESSEN^{1,2}, R. J. LAMPING², C. E. HACK⁴, M. H. PRINS³, M. PETERS¹, J. J. M. de VIJLDER¹, J. W. ten CATE² en A. STURK⁵

Emma Kinder Ziekenhuis AMC¹, Afdeling Hemostase, Trombose, Atherosclerose en Ontstekingen², Afdeling Epidemiologie en Biostatistiek³, AMC, Amsterdam. Afdeling Autoimmuunziekte⁴, Centraal Laboratorium van de Nederlandse Bloed Transfusie Dienst, Amsterdam. Afdeling Klinische Chemie⁵, AZL, Leiden

Achtergrond. Patiënten met sepsis en patiënten na een grote operatie hebben verlaagde antitrombine plasma niveaus. In zulke patiënten worden verhoogde niveaus van interleukine 6 (IL-6) waargenomen. Van IL-6 is het bekend dat het een inducer is van positieve en negatieve acuut fase reacties. In deze studie is de relatie bestudeerd tussen de antitrombine productie door de humane hepatoma cellijn HepG2 en de acuut fase reactie. Aan de hand van de interleukinen IL-6 en IL-1β is bekeken of antitrombine productie beïnvloed kan worden in deze cellijn. **Methode.** De humane hepatoma cellijn HepG2 werd gedurende 48 uur behandeld met kweekmedium van de IL-6 producerende humane galblaas carcinoma T24 cellen, recombinant humaan IL-6, IL-1β, of combinaties van de laatste twee. Als controle op de inductie van de positieve en negatieve acuut fase reactie zijn respectievelijk de concentraties van fibrinogeen en prealbumine (transthyretine) bepaald.

De concentraties van antithrombine, fibrinogeen en prealbumine in het kweekmedium zijn met behulp van ELISAs bepaald. Stimulatie ratios zijn berekend door de hoeveelheid geproduceerd eiwit in de aanwezigheid van de interleukinen te delen door de hoeveelheid in de situatie van afwezigheid van deze interleukinen.

Resultaten. De HepG2 cellen reageren op het T24 kweekmedium met een verhoogde productie van fibrinogeen (7,4 maal), en verlaagde productie van prealbumine (0,4 maal) en antitrombine (0,4 maal). Behandeling van HepG2 cellen met IL-6 of IL-1β resulteert in een dosis afhankelijke verhoging van fibrinogeen concentratie (met een maximaal effect van resp. 2,9 maal en 2,8 maal), en een dosis afhankelijke verlaging in prealbumine (met een maximaal effect van resp. 0,7 maal en 0,6 maal) en antitrombine concentraties (met een maximaal effect van resp. 0,8 maal en 0,6 maal). Gelijktijdige behandeling van de HepG2 cellen met IL-6 (1000 pg/ml of 2500 pg/ml) en IL-1β (25 pg/ml), leidt tot een sterkere afname in prealbumine (resp. 0,8 en 0,6 maal) en antitrombine concentratie (resp. 0,7 en 0,6 maal) vergeleken met de enkelvoudige interleukine behandeling bij deze concentraties.

Conclusies. Deze *in vitro* resultaten wijzen erop dat antitrombine zich gedraagt als een negatief acuut fase eiwit, vergelijkbaar met prealbumine. Deze resultaten zouden mogelijk de verlaagde antitrombine plasma niveaus kunnen verklaren, welke waargenomen worden in patiënten na grote operatie en in patiënten met sepsis.

47. Evaluatie van point-of-care bepaling van stollingsparameters op de coronary care unit (CCU)

A. LEYTE¹, E.-J. van den DOOL¹, F. BERENDS¹, R. ADAMS², E. van de HOEFF², R.J. de WINTER² en R.J.G. PETERS²
Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam, Afdeling Klinische Chemie¹ en Cardiologie², Amsterdam

In de diagnostiek van stollingsstoornissen en ter monitoring van antistollingstherapie wordt op grote schaal gebruik gemaakt van de geactiveerde partiële tromboplastinetijd (aPTT) en de protrombinetijd (PT)/INR. In een klinische situatie kan de relatief lange turnaround time van deze stollingsbepalingen indien uitgevoerd op een centraal laboratorium problemen opleveren, bijvoorbeeld in situaties waar hoge doseringen heparine geïndiceerd zijn. Sinds enige tijd zijn er diverse systemen voor point-of-care stollingsbepalingen beschikbaar die in zulke gevallen voor een snel resultaat zouden kunnen zorgen. In dit kader hebben het Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie en de afdeling Cardiologie van het AMC gezamenlijk een verkennende studie opgezet met als doel voldoende gegevens te verzamelen voor een onderbouwde selectie van een coagulometer voor gebruik op de CCU en catheterisatiekamer. Al in een vroeg stadium bleken meters die gebruik maakten van volbloed zonder anticoagulans niet te voldoen. De verdere evaluatie betrof dan ook uitsluitend het "Thrombolytic Assessment System" (TAS) (Cardiovascular Diagnostics Inc.), een draagbare analyzer die in citraatbloed of citraat-

plasma stollingsparameters kan bepalen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van droge chemie voor de stollingsactivatie en paramagnetische ijzeroxide deeltjes voor de (mechanische) stollingsdetectie. In eerste instantie zijn er methodenvergelijkingen uitgevoerd, waarvoor patiëntenmonsters deels op de CCU werden geanalyseerd (TAS aPTT bepalingen in citraatbloed) en deels op het klinisch chemisch laboratorium (TAS aPTT en PT/INR bepalingen in citraatbloed en -plasma, en de huidige bepalingen van het laboratorium als referentiemethoden). Bovendien zijn er zowel voor de aPTT als voor de PT gegevens voor het vaststellen van referentiewaarden en voor het berekenen van imprecisieparameters verzameld. De eerste ervaringen bevestigden het gemak van het werken met snelle en eenvoudige stollingsbepalingen en de analytische resultaten zijn waar het de PT/INR betrof veelbelovend te noemen. Aan de andere kant illustreren deze resultaten zowel de valkuilen van decentraal testen in het algemeen als de meer specifieke problematiek samenhangend met de aPTT als niet gestandaardiseerde bepaling.

48. Glycoproteïne Ib verdwijnt van het bloedplaatjesoppervlak in pericardiaal bloed tijdens hartoperaties

K.N. MAQUELIN¹, R.J. BERCKMANS², R. NIEUWLAND², M.C.L. SCHAAP², K. ten HAVE¹, L. EIJSMAN¹, C.R.H. WILDEVEUR¹ en A. STURK²

Afdeling Thoraxchirurgie¹, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam; Afdeling Klinische Chemie², Academisch Ziekenhuis, Leiden

Glycoproteïne (GP) Ib is een receptor, uniek gelocaliseerd op bloedplaatjes, voor von Willebrand Factor. Dit eiwit vormt een schakel tussen geëxposeerde adhesieve eiwitten in het subendotheel, zoals diverse typen collagenen, en bloedplaatjes. Het GPIb is dan ook één van de belangrijkste adhesie receptoren op het bloedplaatjesoppervlak. Tijdens (open) hartoperaties wordt bloed geactiveerd door het extracorporele circuit en door het wondveld. Recente studies hebben aangetoond dat de lokale activatie van bloed waarschijnlijk bijdraagt aan systemische bloed activatie en aan post-operatief bloedverlies. Bloedplaatjes in de systemische circulatie van de patiënt hebben een geringe verminderde expressie van het GPIb (15%-40%). Aangenomen wordt dat deze verminderde expressie leidt tot een vermindert adhesief vermogen om aan de beschadigde vaatwand te adhereren en dit is mogelijk één van de oorzaken van post-operatieve bloedingen. Over activatie van bloedplaatjes in het wondveldbloed daarentegen, dat zich verzamelt in het pericardium, is niets bekend. Deze activatie werd

daarom onderzocht met vol bloed dubbel-label flowcytometrie in bloed dat werd afgenomen bij 6 patiënten die een hartoperatie ondergingen. Dit bloed werd op verschillende tijdstippen afgenomen uit een veneuze lijn (systemisch bloed) en rechtstreeks uit het pericardium. De expressie van GPIb nam af met 15% (start operatie) en 8% af (einde operatie) in het systemische bloed, terwijl op deze tijdstippen de afname in het pericard bloed 54% en 43% bedroeg. In pericardiaal bloed werd, evenals in systemisch bloed, geen toename gezien van de activatie-markers CD62 (P-selectine; α -granula) en CD63 (GP53; lysosomale granula) en de fibrinogeen-bindings conformatie van het GPIIb/IIIa complex (PAC-1), maar wel werden hoge concentraties micropartikels aangetroffen. GPIb verdwijnt dus tijdens hartoperaties in geringe mate van het bloedplaatjesoppervlak in systemisch bloed en in veel sterkere mate in pericard bloed. Of deze afname (patho)fysiologische consequenties heeft is nog onbekend.

49. Micropartikels, ontstaan *in vivo*, zijn procoagulant *in vitro*

R. NIEUWLAND¹, R.C. ROTTEVEEL-EIJKMAN², K.N. MAQUELIN³, R.J. BERCKMANS¹, K.J. ROOZENDAAL², L. EIJSMAN⁴, C.E. HACK⁵ en A. STURK¹

Afdeling Klinische Chemie¹, Academisch Ziekenhuis Leiden; Afdeling Hematologie, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis², Amsterdam; Afdeling Thoraxchirurgie, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis³, Amsterdam; Afdeling Cardiopulmonale Chirurgie⁴, AZVU, Amsterdam; Afdeling Autoimmuunziekten⁵, Centraal Laboratorium voor de Bloedtransfusie, Amsterdam

Stimulatie van bloedplaatjes *in vitro* resulteert in het verlies van membraan asymmetrie waardoor fosfatidylserine (PS), een aminofosfolipide, verschijnt op de buitenkant van de plasma membraan. Membranen die PS exposeren, katalyseren de vorming van tenase- en protrombinase complexen die leiden tot het ontstaan van trombine. Gestimuleerde bloedplaatjes snoeren ook blaasjes af, micropartikels, die net als geactiveerde bloedplaatjes een hoge expressie hebben van PS. Algemeen is bekend dat micropartikels, afkomstig van bloedplaatjes, in verhoogde concentraties circuleren in patiënten die

lijden aan diverse ziekten die gepaard gaan met een verhoogde kans op trombose. Desondanks is vrijwel niets bekend over de functie(s) van deze *in vivo* ontstane micropartikels. In de huidige studie is met vol bloed dubbel-label flow cytometrie in 6 patiënten die een openhartoperatie ondergingen, aangetoond dat aan het einde van de operatie systemisch bloed $1,6 \times 10^9/l$ (mediaan; range 0,4 - 8,9) micropartikels bevatte die afkomstig waren van bloedplaatjes. Bloed, rechtstreeks afgenomen uit het pericardium en afkomstig uit het wondveld, bevatte $14,8 \times 10^9/l$ (mediaan; range 9,7 - 27,4) van deze microparti-

kels. Daarnaast konden ook micropartikels van erythrocyten en monocytten worden aangetoond. Zowel het plasma als de hieruit geïsoleerde micropartikels bleken in staat het ontstaan van trombine in gedefibrineerd normaal plasma sterk te stimuleren. Deze stollingsbevorderende activiteit werd niet beïnvloed in factor XII-deficiënt plasma of door een antilichaam, OT-2, gericht tegen factor XII/XIIa. In factor VII-deficiënt plasma

werd het ontstaan van trombine echter sterk vertraagd ($p < 0,001$) en in normaal plasma in aanwezigheid van een remmer van de extrinsieke route van de stolling, 'tissue factor pathway inhibitor' (0,4 mM) werd geen trombine meer gegenereerd. Deze resultaten tonen aan dat *in vivo* ontstane micropartikels het ontstaan van trombine bevorderen via de extrinsieke route van de bloedstolling.

50. Postoperatieve monitoring met behulp van CRP en fibrine-afbraakproducten na een heupvervangende operatie

W.P. OOSTERHUIS¹, M. de METZ², A. KROONEN² en R.D. DONK²
 Stichting Ziekenhuis 'de Heel' Zaandam¹ en Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen²

Infectie en trombose zijn gevreesde complicaties na orthopedische operaties. Het postoperatieve verloop van de CRP-concentratie zou een gevoelige parameter kunnen zijn voor infectie, en van fibrine-afbraakproducten voor trombose. In dit onderzoek is het postoperatieve verloop van deze twee bepalingen bestudeerd.

Patiënten. 44 patiënten met een artroplastiek van de heup wegens osteoartritis.

Laboratoriumonderzoek. CRP (kwantitatief turbidimetrisch) en fibrine-afbraakproducten (kwantitatief ELISA (Fibrinostika FbDP, Organon Technika) op de volgende tijden: dag -1, 2, 5, 7 en 10 (t.o.v. de operatie=dag 0).

Resultaten. bij 8 patiënten was er postoperatief een complicatie, variërend van lokaal oedeem tot een wondinfectie, zonder een geval van klinisch manifeste trombose. Na de ingreep bestond het normale patroon uit een aanzienlijke stijging van de

CRP-concentratie met een maximum op dag twee na operatie van gemiddeld 104 ± 49 mg/l (SD). Daarna daalde de CRP-concentratie geleidelijk, waarbij een daling van $\geq 10\%$ tussen opeenvolgende waarden als normaal werd beschouwd. Bij complicaties werd er bij 7/8 een afwijking in dit CRP-verloop gevonden (sensitiviteit 88%) terwijl bij een normaal postoperatief beloop het CRP-patroon normaal was bij 29/30 patiënten (specificiteit 97%). De FbDP-concentratie stijgt in ongecompliceerde gevallen na operatie van gemiddeld 399 ± 200 ng/ml tot 2003 ± 1540 ng/ml op dag 5 na operatie (spreiding 718-8747 ng/ml), en blijft daarna op dat niveau.

Conclusie. de FbDP-concentratie stijgt na operatie en blijft hoog. In deze patiëntengroep kunnen geen conclusies worden getrokken met betrekking tot de diagnostische waarde voor trombose. Het CRP-patroon is bij deze patiënten een gevoelige maat voor postoperatieve complicaties.

51. APC-resistentietest en Factor V Leiden

G.A.E. PONJEE en W. QUINT
 Reinier de Graaf Groep/Diagnostisch Centrum SSDZ, Delft

Twintig tot 60% van de volwassen patiënten met een spontane diepveneuze trombose is drager van het factor V Leiden gen, dat codeert voor een gemuteerd factor V stollingseiwit en ongevoelig is voor inactivatie door geactiveerd proteïne C. Momenteel is de APC resistentie test alom geaccepteerd als screeningsmethode voor de aanwezigheid van de FV Leiden puntmutatie. Bij deze test wordt de ratio berekend van APTT voor en na toevoeging van geactiveerd proteïne C. De sensitiviteit en de specificiteit van de APC resistentietest als screeningsparameter voor de FV Leiden werd in deze studie onderzocht.

De APC resistentie werd bepaald op de Elektra 1600 met behulp van reagentia van Chromogenix. Het referentiegebied van de APC resistentietest, bepaald in citraatplasma van 50 gezonde vrijwilligers, is een ratio groter dan 1,9.

De aan- of afwezigheid van de puntmutatie in het gen dat codeert voor FV werd aangetoond middels restrictie-enzym digestie van het PCR produkt. Na DNA isolatie uit volbloed m.b.v. QIAamp Bloedkit werd PCR uitgevoerd met primers gelegen op positie 1581-1602 en 1779-1801 van het gen.

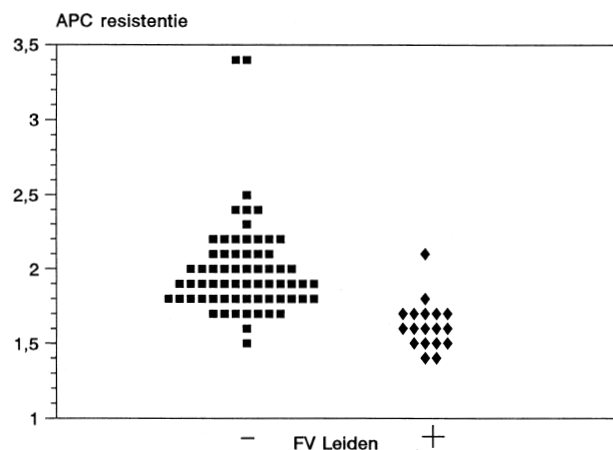
Indien geen mutatie aanwezig was, werden na digestie met het restrictie-enzym MnlI, 3 fragmenten zichtbaar op de agarose gel van respectievelijk 116 bp, 67 bp en 37 bp. In geval van een mutatie op nucleotide positie 1691 was 1 restrictieplaats verdwenen in het PCR fragment en werd naast het 67 bp fragment, een fragment van 153 bp gevormd.

Van 83 patiënten waarbij een APC resistentie test werd aangevraagd werd tevens de FV Leiden DNA test uitgevoerd. Bij 35 patiënten was de APC resistentietest kleiner of gelijk dan 1,9.

Van deze 35 patiënten bleken 17 personen heterozygoot te zijn voor de FV Leiden puntmutatie.

Bij één patiënt waarbij de puntmutatie heterozygoot aangetoond werd, was de APC resistentie 2,1.

Uit deze gegevens kan geconcludeerd worden dat over het algemeen de APC resistentietest een goede screeningsparameter is ter uitsluiting van een FV Leiden. Echter slechts bij 49% van de APC resistente patiënten was sprake van een FV Leiden mutatie.



Figuur 1. APC resistentie en de FV Leiden puntmutatie

52. Geautomatiseerde bepaling van complement activiteit mbv liposome immunoassay

A.W. van TOORENENBERGEN, B. de GRAAF en B. van ZELST

Afdeling Klinische Chemie, Academisch Ziekenhuis Rotterdam

Onderzoek naar de functionele activiteit van het complement systeem is van belang bij de diagnostiek van auto-immuun ziekten en recidiverende bacteriële infecties. De CH50 is een test om de "klassieke route" van het complement systeem te onderzoeken. Deze test wordt traditioneel uitgevoerd door na te gaan hoeveel serum van een patiënt vereist is om een standaard hoeveelheid gesensibiliseerde erythrocyten te lysisen. Deze procedure is relatief arbeidsintensief.

Recent is een nieuwe test (liposome immunoassay; Wako, Japan) beschikbaar gekomen, waarmee de activiteit van de "klassieke route" van het complement systeem mbv routine (klinisch chemische) analyse apparatuur gemeten kan worden. Deze methode is gebaseerd op lysis van G6PDH- bevattende,

DNP-gelabelde liposomen, welke met anti-DNP antistoffen zijn gecoat.

Wij vergeleken resultaten van de liposome immunoassay met die van de CH50 (volgens Mayer) en een hemolyse-in-gel bepaling van totaal complement (Kallestadt).

Inmiddels is de complement activiteit in 30 sera gemeten mbv bovengenoemde 3 tests. 3 sera toonden bij alle 3 methodes een sterk verlaagde complement activiteit.

De liposome immunoassay, uitgevoerd op de Hitachi 911, had een binnen-run vc van < 1%. De voorlopige resultaten suggereren dat de liposome immunoassay een zeer tijdsbesparend alternatief voor de Mayer- en lysis-in-gel methode kan zijn.

53. De draagbare "Thrombolytic Assessment System" analyzer: evaluatie van enkele bed side stollingstesten

E. van VOORST tot VOORST¹, A. EDELAAR¹ en W. SIEMONS²

Laboratorium¹ en Afdeling Thoraxanesthesiologie², Ziekenhuis De Weezenlanden, Zwolle

De "Thrombolytic Assessment System" analyzer (TAS) is een draagbaar apparaatje, waarmee bed side stollingstesten kunnen worden uitgevoerd. Wanneer een druppel citraat bloed of plasma in het reactiekamertje van een testkaartje wordt gebracht worden de paramagnetische deeltjes en de reagentia gereconstitueerd en begint de test automatisch te lopen omdat er een verandering optreedt in een lichtsignaal, opgevangen door een fotodetector. De beweging van de paramagnetische deeltjes door het snel aan- en uitzetten van een electromagneet produceert een signaal. Veranderingen in de snelheid van deze beweging kunnen hierdoor worden gevolgd en stol- of lysisistijden in seconden verkregen.

De APTT, PTT en heparin management time (HMT) werden onderzocht alsook de gebruikersvriendelijkheid. De APTT en PTT werden vergeleken met de Electra 1000C (MLA) en de HMT met de activating clotting time (ACT) op de Hemochron 401(3) apparaatjes). Regressie-lijnen($y=ax + b$, $y=TAS$, $x=MLA/ACT$) en correlatie-coëfficiënten werden vlg. Passing Bablok berekend. Ook werden 2 lotnummers van de testen vergeleken.

Conclusie. De TAS is een zeer gebruikersvriendelijk apparaatje. De APTT en PT voldoen, de HMT dient nog verder onderzocht te worden (gebeurt binnenkort). Tussen de lotnummers zijn (geringe) verschillen geconstateerd. Deze dienen voorkomen te worden, gezien de mogelijk toekomstige gebruikers.

Resultaten

Vergelijking van 2 methoden:

Bepaling	n	range	a	b	R
APTT	63	22-103	1,4	1,4	0,930
PTT	58	12-70	1,3	-7,5	0,960
HMT*	34	123-805	0,5	129,5	0,855

*In de plot van de HMT/ACT worden twee populaties gezien, met verschillende regressielijnen. Uitsplitsing van de resultaten per Hemochron geeft eveneens verschillende lijnen.

Vergelijking van 2 lotnummers:

Bepaling	n	range	a	b	R
APTT	10	30-65	1,0	4,1	0,970
PTT	10	13-78	0,79	2,4	0,993
HMT	11	180-490	1,1	26,9	0,991

54. Leidt hyperhomocysteinemie als gevolg van een methioninebelastingstest tot verhoogde stollingsneiging?

A. WOLTHUIS en J.W.J. van WERSCH

Haematologisch Laboratorium, De Wever Ziekenhuis, Heerlen

Gezien de relatief hoge incidentie van hyperhomocysteinemie en de in de recente literatuur beschreven sterke associatie met zowel arterieel als veneus vaatlijden, worden patiënten tbv de dd. steeds vaker onderworpen aan een onderzoek naar hyperhomocysteinemie. Het onderzoek bestaat uit een nuchtere homocysteïne bepaling in het bloed, waarna de patiënt met methionine wordt belast en na 6 uur wederom een homocysteïne bepaling wordt verricht. Door de methioninebelasting stijgen de homocysteïnespiegels na 6 uur bij gezonde vrijwilligers tot $\pm 3 \times$ de basaalwaarde. Gezien deze sterke stijging bij deze patiënten met een vaatlijden, rijst de vraag of deze combinatie niet zou kunnen leiden tot stolactivatie. Dit zou met name het geval kunnen zijn wanneer er reeds afwijkingen in de stollingscascade aanwezig zijn (b.v. APC-resistentie)

Methoden. Patiënten die om reden van een vaatlijden een hy-

perhomocysteinemie-onderzoek ondergingen (n=43), werden zowel nuchter als 6 uur na belasting, gescreend op TAT, PAP en APC-resistentie. Tevens werd middels een nieuwe test het proteïne C complex geëvalueerd (ProC Global).

Bij 28 van de 43 patiënten werd na belasting een normale homocysteïneconcentratie gevonden terwijl bij 15 patiënten een verhoogde waarde werd vastgesteld.

Bij selectie op APC-resistentie werden 35 patiënten normaal bevonden en 6 patiënten dubieus dan wel afwijkend (ratio < 0,8).

Resultaten en discussie. In geen van de genoemde patiëntengroepen vond een significante verandering in de bepaalde parameters plaats na methioninebelasting.

Men dient echter wel te bedenken dat een aantal van deze patiënten wel degelijk uitslagen had die stollingsactivatie na

methioninebelasting deden vermoeden. Overigens, het effect van homocysteinemie op de stolling zou mede gezien de gesuggereerde pathofysiologie (endotheel- schade, factor V en factor VIII verhoging, competitieve remming van de thrombine-thrombomoduline-binding) op een langere termijn dan de hier aangehouden 6 uur evident kunnen worden.

Hoewel er vooralsnog geen duidelijke casuïstiek over bestaat, zou gezien de associatie tussen hyperhomocysteinemie en vaatlijden en de gesuggereerde pathofysiologie, een methionine-belastingsproef luxerend kunnen werken bij patiënten met een thrombotisch risico. Het hier gepresenteerde onderzoek geeft hier echter geen aanwijzingen voor.

Moleculaire Biologie

55. Genotypering van het Cytochroom P450 2C19 systeem

M.A.M. BON, E. FALCONI, I. VERMES en F.A.J.T.M. van den BERGH
Medisch Spectrum Twente, Enschede

Een belangrijke metabole weg in de afbraak van lipofiele stoffen, waaronder veel geneesmiddelen, is het cytochroom P450 enzym systeem (CYP450). Van een aantal isoenzymen zijn genetische polymorfismen bekend, gepaard gaand met een veranderde metabole capaciteit. Ten gevolge hiervan hebben z.g. *poor metabolizers* (PM fenotype) te hoge bloedspiegels van bepaalde antidepressiva, neuroleptica, β -blokkers en opiaten en een verhoogd risico op bijwerkingen. Het CYP2C19 isoenzym hydroxyleert S-mefenytoïne en is tevens betrokken bij de afbraak van tricyclische antidepressiva zoals amitriptyline en clomipramine, en voorts o.a. van barbituraten, diazepam, en fluoxetine. Van CYP2C19 zijn twee mutaties (M1 en M2) beschreven die aanleiding zijn voor het PM fenotype. De frequentie van het polymorfisme is afhankelijk van het ras, waarbij CYP 2C19 M1 in Aziaten bij 13-23% van de bevolking voorkomt, in het Kaukasische ras 3-5% en in het negroïde ras 4%. M2 is tot nu toe alleen gesignaleerd bij Aziaten. Getracht is om een assay op te zetten voor de mutatie M1, een G 681 \rightarrow A substitutie in exon 5.

DNA wordt geïsoleerd uit volbloed m.b.v de Qiagen bloed kit (Westburg). Vervolgens kan het specifieke M1-bevattend CYP 2C19 genfragment geamplificeerd worden. Dit levert een 169-bp produkt op waarvan de sequentie (Dr.W.van Solingen, Eemland Zkh, Amersfoort) overeenkomt met de literatuur. Tengevolge van de puntmutatie bezit het restrictie-enzym Sma-I een herkeningsplaats in het wildtype doch niet in het gemuteerde genfragment. Omgekeerd knipt het restrictie-enzym Mva-I het gemuteerde fragment in brokstukken ter grootte van 49 en 120 bp maar niet het wildtype. Toepassing van beide restrictie-analyses resulteert in eenduidige genotypering. Ofschoon op 12% PAGE gel in sommige gevallen een tweede fragment detecteerbaar is ter hoogte van 170 bp, leidt tweezijdige restrictie-analyse niet tot interpretatie-problemen. Screening van een normale populatie (n=106) levert een allel frequentie voor de mutatie op van $16,5 \pm 0,5\%$, overeenkomend met een homozygootfrequentie voor de CYP 2C19 M1 mutatie van 3%. Dit correleert goed met de in de literatuur gevonden waarde van 3-5% in het Kaukasische ras.

56. BglI restrictie analyse van HLA-B27 PCR fragmenten

G. de KORT, C. POSTMA, A.P. SPAANS en P.H.F. FRANCK
Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Leyenburg, Den Haag

Spondylitis ankylopoetica (SA) is een vorm van reumatoïde artritis die leidt tot aantasting van de ruggewervels (ziekte van Bechterew). Indien na klinisch en röntgenologisch onderzoek onzekerheid bestaat over de diagnose, dan kan de uitslag HLA-B27 van de bepaling behulpzaam zijn bij het stellen van een diagnose. Verder is gebleken dat een HLA-B27 positieve SA patiënt een slechtere prognose heeft dan één die negatief is.

De procedure voor de HLA-B27 DNA-typering is snel, nauwkeurig en relatief eenvoudig. Het DNA van de patiënt wordt geïsoleerd uit bloed. Een gedeelte van het DNA wordt vermenigvuldigd met de zgn. PCR (Polymerase Chain Reaction) Techniek. Het geamplificeerde DNA wordt nader geanaly-

seerd d.m.v. gel-elektroforese. Hierbij geeft een HLA-B27 positieve PCR een fragment van 136 bp te zien. Nadere controle van dit fragment wordt veelal niet uitgevoerd. In onze ogen dient dit wel te geschieden. Wij hebben het HLA-B27 fragment dan ook onderzocht op de mogelijkheid om een restrictie-fragment analyse uit te voeren. Hieruit kwam naar voren dat BglI het meest geschikte enzym voor een dergelijke bepaling is. Indien het 136 bp fragment afkomstig is van het HLA-B27 gen en wordt geknipt met BglI, dan worden er twee fragmenten gegenereerd: een van 80 bp en een van 56 bp. Deze restrictie-enzym digestie is volgens ons essentieel voor een kwalitatief goede HLA-B27 test.

57. Bezint eer ge begint: pitfalls in RT-PCR studies

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

We hebben getracht om assays op te zetten waarbij vroegtijdig micrometastases in perifere bloed, lymfeklieren en beenmerg aangetoond kunnen worden. De tumorcellen zijn afkomstig van het mamma- respectievelijk het prostaatacarcinoom, de meest voorkomende maligniteit bij vrouwen respectievelijk mannen. De RT-PCR reacties zijn ontwikkeld om de expressie van de mammatumormarkers cytokeratine-19 (K19) en mucine-1 (Muc-1), en de prostaatumormarkers PSA (prostaat

specifiek antigeen) en PSM (prostaat specifiek membraan antigeen) te detecteren. Voor de optimalisatie zijn positieve mamma- en prostaat-carcinoma cellijnen gebruikt. Totaal RNA wordt geïsoleerd m.b.v de RNeasy kit (Qiagen Scientific, Venendaal, the Netherlands). Voor de synthese van het cDNA wordt gebruik gemaakt van de random- of de specifieke priming methode. Vervolgens kunnen de specifieke tumormarker sequenties geamplificeerd worden. De detectie

van de PCR-producten vindt plaats op een polyacrylamidegel na kleuring met EtBr.

In dit onderzoek wordt duidelijk dat RNase niet de enige pitfall is bij RNA-werkzaamheden zoals vaak benadrukt wordt in de literatuur. De verschillende stappen in de procedure van RNA-isolatie, cDNA synthese, PCR en detectie spelen ieder een kritische rol.

Pitfalls in deze RT-PCR studies betreffen de RNA-integriteit in paraffine coupes, target cDNA dat niet de vereiste lengte bezit, storende co-amplificatie van genomisch DNA en ten slotte niet-specifieke expressie van de tumormarker Muc-1. Deze laatste pitfall werd bekend na checken van de gevoelig-

heid van de RT-PCR t.o.v de huidige immunohistochemische technieken. Om uiteindelijk aan te kunnen tonen dat de RT-PCR gevoeliger is, werden er verdunningsexperimenten uitgevoerd met behulp van positieve cellen van de mammapcarcinoom- en de prostaatacarcinoomcellijnen. Uit de verdunningsexperimenten m.b.t de sensitiviteit van de Muc-1 RT-PCR bleek dat in alle jonge gezonde vrijwilligers die gehanteerd werden als negatieve controle een lage expressie van het Muc-1 gen te detecteren was. De conclusie die hieruit volgt is dat er een 'cut-off' waarde gesteld dient te worden en dat de detectie van tumorgenen dient te geschieden m.b.v een kwantitatieve RT-PCR.

Diversen

58. Bed-side Glucose Monitoring in de Neonatologie

H.J. HUIJGEN¹, M. OFFRINGA², M. NINTEMAN¹, J.L.S. DOLS¹ en G.T.B. SANDERS¹

Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam, afdeling Klinische Chemie¹ en Neonatologie², Amsterdam

Sinds enkele jaren wordt in het AMC in overleg met de Afdeling Klinische Chemie op verpleegafdelingen gebruik gemaakt van een bedside glucosemeter. Voor het gebruik in de neonatologie bleek deze meter ongeschikt vanwege de hoge hematocriet (Ht) bij pasgeborenen. Toch is snelle herkenning van ontregeling van het glucose metabolisme bij zieke à terme en premature pasgeborenen zeer belangrijk; hypoglycaemie komt geregeld voor. Daarom hebben wij een studie gestart waarin een nieuwe glucosemeter (Accutrend Sensor, Boeringer Mannheim/Lilly BV) bij deze specifieke patiënten populatie is uitgetest.

Opzet. Bij 35 zieke pasgeborenen (zwangerschapduur 27-41 weken) werd na de hielprik volbloed aangebracht op de glucosestrip. Tevens werd 25 ml fluoride bloed direct onteiwit voor onze standaard glucose bepaling (glucose-dehydrogenase/NAD) en werd de Ht uit hetzelfde monster volgens de centrifugatie methode bepaald.

Resultaten. Van 30 patiënten waren alle drie parameters beschikbaar. Accutrend glucose: gem 4,6; min 2,8; max 8,9 mmol/l; standaard glucose: gem 4,2; min 1,7; max 7,6 mmol/l; Ht: gem 55; min 24; max 76%. Gemiddeld verschil 0,4 mmol/l; gepaarde t-test p=0,005. Vijf maal werd een "Error" melding waargenomen: 3 maal buiten de specificaties van de fabrikant (20%<Ht<65%) en 2 maal viel de Ht daarbinnen (glucose en Ht respectievelijk 3,8 mmol/l en 56%; 3,7 mmol/l en 61%).

Conclusie. De Accutrend sensor meet bij pasgeborenen significant hogere glucose waarden dan onze standaard glucose methode. Bij 5 van de 35 patiënten was de meter niet bruikbaar, 3 maal vanwege de Ht en 2 maal onbegrepen. Er zijn nog te weinig monsters met glucose<2,5 mmol/l gemeten om over de bruikbaarheid bij neonatale hypoglycaemie een conclusie te kunnen trekken.

59. On the role of iron chelate in the production of reactive oxygen species by submitochondrial particles

Y.C.M. de HINGH¹, J.C. FISCHER¹, R. BERGER¹, F.A. KUYPERS³ en J.A.F. op den KAMP²

Wilhelmina Children's Hospital¹, University Hospital for Children and Youth, CBLE, Department of Lipid Biochemistry², Utrecht University, The Netherlands and Children's Hospital Oakland Research Institute³, California, USA

Up to 5% of the oxygen consumed by the mitochondrial electron transport chain, results in formation of superoxide (O₂^{-•}). In the present study we investigated which reactive oxygen species are subsequently produced by NADH-oxidising submitochondrial particles (SMPs) in the absence or presence of exogenous iron complex.

Production of reactive oxygen species was induced by addition of NADH to rotenone-inhibited SMPs of rat skeletal muscle, in the absence or presence of iron chelate (ADP-Fe³⁺). The ESR spin trapping technique with DMPO was used for detection. Rotenone-inhibited SMPs supplemented with NADH produced hydroxyl radicals (OH•; detected as DMPO-OH adduct). This OH• production was confirmed by addition of ethanol, yielding the DMPO-CH₃CHOH adduct. Hydroxyl radical production was completely inhibited by superoxide dismutase (S.O.D.) as well as catalase, while addition of hydrogen peroxide (H₂O₂) greatly enhanced OH• production. These results strongly suggest that transition-metal complexes in the SMP membrane are involved in the catalytic cleavage of

endogenous generated H₂O₂ to OH• (Fenton reaction). Furthermore, superoxide is probably responsible for keeping these metal complexes in the correct redox state.

When ADP-Fe²⁺ or ADP-Fe³⁺ was added to the incubation system, no DMPO adduct was observed. However, subsequent addition of ethanol did result in the formation of the DMPO-CH₃CHOH adduct. These observations indicate that instead of the formation of OH• or O₂^{-•}, iron-ADP complexes give rise to the production of iron oxidising species such as ferryl ions (Fe(IV)=O). The signal was completely inhibited by catalase, whereas S.O.D. did not have any inhibiting effect. Apparently, ADP-Fe²⁺ and/or ADP-Fe³⁺ are able to form oxidising iron species via H₂O₂, not via O₂^{-•}. NADH oxidation can be held responsible in this experimental system for the reduction and recycling of the iron-chelates.

In conclusion, NADH oxidation by rotenone-inhibited SMPs gives rise to production of OH•. It is unlikely that in the presence of an iron chelate, O₂^{-•} and/or OH• play a significant role in radical induced damage to biological structures.

60. Stabiliteit van klinisch-chemische parameters in verschillende Li-heparine gelbuizen

S.C. ENDENBURG¹, J. HESSELS¹, H.J.H. KREUTZER² en M.P.W.M. PAANAKKER²

Klinisch Chemisch Laboratorium, Twenteborg Ziekenhuis¹, Almelo en Klinisch Chemisch Laboratorium, Bosch Medicentrum², locatie Groot Ziekengasthuis, 's-Hertogenbosch

De stabiliteit van klinisch-chemische parameters in Li-heparine plasma is over een periode van zeven dagen onderzocht. Hiervoor is in twee verschillende klinisch-chemische laboratoria bloed afgenomen in gelbuizen van drie verschillende firma's. In het onderzoek zijn zowel testen uitgevoerd in plasma dat op de gel is bewaard als in plasma dat direct van de cellen is gescheiden. In elk monster zijn op tijdstippen 0, 6, 24, 72, 186 uur de volgende testen uitgevoerd: ALAT, albumine, AF, amylase, ASAT, bilirubine-direct, bilirubine-totaal, calcium, chloride, cholesterol, CK, eiwit, fosfaat, gGT, glucose, kalium, kreatinine, LD, natrium, triglyceriden, uraat en ureum. Het plasma is op tijdstippen tussen 0 en 6 uur bij kamertempera-

tuur bewaard terwijl voor de overige metingen de buizen bij 4°C zijn bewaard. Vóór iedere meting zijn de buizen gecentrifugeerd. Met behulp van uitgebreide statistische analyse kan het volgende worden geconcludeerd: 1. er is geen significant verschil gevonden tussen buizen van verschillende firma's; 2. voor ALAT, ASAT, fosfaat, glucose, kalium en LDH bleek een significant verschil tussen plasma dat direct op de gel is bewaard en plasma dat in een aparte buis is overgegoten; 3. indien het plasma direct van de cellen is gescheiden, zijn de onderzochte parameters tenminste zeven dagen stabiel met uitzondering van ALAT, ASAT, bilirubine en LDH.

61. Determination of pheomelanin by measurement of aminohydroxy-phenylalanine isomers with high performance liquid chromatography

E.G.W.M. LENTJES¹, A.M. KOLB¹, N.P.M. SMIT², A. SCHOTHORST², B.J. VERMEER² and S. PAVEL²

Departments of Clinical Chemistry¹ and Dermatology², University Hospital, Leiden

The colour of human skin mainly depends on the quantity, quality and distribution of the pigment melanin. There are two types of melanin: black or dark-brown eumelanin and light-brown or red pheomelanin. Eumelanin pigment appears chemically resistant and it absorbs a wide range of ultraviolet (UV) radiation and visible light. Pheomelanin is a heteropolymeric pigment consisting of phenolic and sulphur containing benzothiazine units. This melanin is less stable and its UV absorbing capacity is less pronounced. In addition, UV irradiation of this pigment has been shown to lead to generation of free radicals. The presence of a relatively high concentration of pheomelanin is possibly connected with an increased risk of skin cancer. The analysis of pheomelanin in biological samples is based on a chemical degradation of the melanin polymer and HPLC and measurement of specific degradation products. Hydroiodic hydrolysis provides 4-amino-3-hydroxyphenylalanine (AHP) and 3-amino-L-tyrosine (AT) which are detected with an electrochemical detector. The samples are hydrolysed overnight at

130°C, for sixteen hours, and AT and AHP are then extracted from the hydrolysates by ion exchange chromatography, and separated and quantitated by HPLC and electrochemical detection. Separation of both isomers has not been described before. The method shows good reproducibility; total imprecision range from 0.3 to 4% for melanoma cell cultures. The linearity of the method was shown from 0-490 ng AT and 0-850 ng AHP using a melanoma cell suspension with dilutions up to 24x of the original sample (27 mg protein/ml). Measurement of AT and AHP gives us the opportunity not only to quantify the pheomelanin in cell samples, but also to give more insight into qualitative aspects of the synthesised melanin in the cell lines.

In conclusion, this method offers the possibility to quantitatively measure AT and AHP in melanocyte cell suspensions, hair samples and melanoma and skin tissue. The method shows good reproducibility, high sensitivity, and is linear over a broad range of AT and AHP concentrations.

62. Comparison of the Bio-Rad Porphyrin Column Test with a simple spectrophotometric test for total urine porphyrin concentration

F.M.J. ZUIJDERHOUDT en J. DORRESTEIJN-DE BOK

Department of Clinical Chemistry, Deventer Ziekenhuis, Deventer

We compared two screening methods for increased urine porphyrin and related the results to values measured with a HPLC method. The screening methods were the Bio-Rad (Porphyrin) Column Test and a simple spectrophotometric method. The latter method was recently evaluated by us. Results were obtained for urines with three different porphyrin compositions in several concentration ranges. Both methods were easy to perform. The accuracy and precision of the spectrophotometric method were both slightly better than that of the Bio-Rad Column Test. Recovery of porphyrin measurements in samples with different porphyrin composition varied between 73% and

59%, as well as 82% and 116% for the spectrophotometric method and the Bio-Rad Column Test respectively as compared to HPLC. This illustrates the Bio-Rad Column Test to be more susceptible to variation in urine porphyrin composition.

Between batch precision measurements revealed coefficients of variation for these screening methods of 2% - 4% and 4% - 10% respectively. Notwithstanding the better performance of the spectrophotometric test, both methods will show satisfactory results in cases of overt porphyria because of the high urine porphyrin concentration.

63. Effect van opslaan of transport op standaard klinisch-chemische, hematologische en stollings parameters in (bloed) monsters; onderzoek van 17 laboratoria

E. van VOORST tot VOORST¹, W.C.J. HOP², J.J. TAMMINGA³ en #

Laboratorium Ziekenhuis De Weezenlanden, Zwolle¹, Instituut voor Epidemiologie Erasmus Universiteit, Rotterdam², Medische Afdeling Glaxo B.V., Zeist³

Achtergrond. Een vraag van een klinische multicenter trial om (bloed) monsters voor onderzoek van standaard klinisch-chemische, hematologische en stollings parameters op te sturen was aanleiding tot een pilot studie op één laboratorium. De resultaten vormden de reden het onderzoek uit te breiden.

Methoden. Er werd een strikt afgesproken en met de 17 laboratoria doorgesproken procedure gevolgd voor bloedafname, préanalytische omstandigheden, bewaartemperaturen en -tijden. Per dag werd één willekeurig gekozen patiënt ingesloten (per laboratorium 10 t/m 15 patiënten). In totaal werden 32 parameters en de differentiatie van witte cellen m.b.v. geautomatiseerde apparatuur bepaald in de uitverdeelde (bloed) monsters direct na afname, 6, 24, 48 en 72 uren bewaard bij kamertemperatuur (kt) of 4°C en na verzending per post

Resultaten. Een verschil met het resultaat direct na bloedafname werd significant genoemd indien $p < 0,01$ is (variantie analyse rekening houdend met eventuele tussen laboratoria

verschillen). Na resp. 6, 24, 48, 72 uren bij kt en na verzending waren resp. 11, 13, 18, 20 en 17 parameters van de 32 significant veranderd. Voor 4°C zijn deze aantallen resp. 9, 12, 14 en 15. De automatische differentiatie is voor meer dan 50% niet meer mogelijk na resp. 24 uur bewaard bij kt en 48 uur bewaard bij 4°C. Een significant ($p < 0,01$) laboratorium effect met een variantie percentage $> 20\%$ was bij resp. klinische chemie, hematologie en stolling voor enkele resultaten van resp. 4, 6 en 1 parameter(s) aanwezig.

De grootte van de verschillen is soms aanzienlijk en niet altijd lineair met de tijd.

Opvallend zijn de significante veranderingen bij cholesterol en fosfaat.

Conclusie. Bewaren bij kt of bij 4°C of verzenden per post veroorzaakt significante veranderingen, die bij klinische-chemie in enkele gevallen vrij groot en bij hematologie en stolling in vele gevallen groot zijn.

D.L. Bakkeren, Diaconessenhuis Eindhoven; C.J.A. Doelman, Streekziekenhuis Kon. Beatrix Winterswijk; J.P. Flikweert, Ziekenhuis Gooi-Noord Laren; F. van der Graaf, St. Joseph Ziekenhuis Veldhoven; J.J.M.L. Hoffmann, Catharina Ziekenhuis Eindhoven; P.J.M.J. Kok, Groene Hart Ziekenhuis Gouda; G.C.M. Kusters, Medisch Spectrum Twente Enschede; D. van Loon, St. Antonius Ziekenhuis Nieuwegein; A. Martens, Twenteborg Ziekenhuis Almelo; J.G.C. van de Meene, Sophia Ziekenhuis Zwolle; J. van Pelt, St. Maartens Gasthuis Venlo; R.H.M. Peters, Stg. Ziekenhuis De Tjongerschans Heerenveen; H.J.M. Salden, Stg. Deventer Ziekenhuizen, Deventer; P. van 't Sant, St. Anna Ziekenhuis Oss; H. Storm, Stg. Klinisch Chemisch Laboratorium Leeuwarden; H.J. Verhoef, Pasteurziekenhuis Oosterhout.

64. Enzymatic determination of creatinine: comparison with Jaffé methodologies and HPLC

A.P. van ZANTEN¹ and J.A. WEBER²

Department of Clinical Chemistry¹, Slotervaartziekenhuis, Amsterdam and Department of Clinical Chemistry², Academisch Medisch Centrum, Amsterdam

Two enzymatic procedures, based on creatinine iminohydrolase (Serapak Creatinine, Bayer) or creatininase (CREAT PAP, Boehringer Mannheim), and three procedures based upon the kinetic Jaffé reaction (Beckman Instruments) were compared with the HPLC procedure of Zwang and Blijenberg (1). The enzymatic procedure using creatininase was applied to the Hitachi 747 (Boehringer Mannheim), the other procedures were applied to the Synchron CX-7 (Beckman Instruments).

The imprecision studies yielded satisfactory results for the enzymatic procedures and two of the Jaffé modifications. The Beckman Jaffé modification "CRT" yielded unsatisfactory CV's between 3.0 and 19.7 %. All procedures were found to be linear upto at least 2000 $\mu\text{mol/l}$. Accuracy was evaluated with mountain plots, as described by Krouwer and Monti (2), using patient samples with normal or elevated bilirubin concentrations. From these plots it became apparent that at creatinine concentrations above 250 $\mu\text{mol/l}$ the Jaffé procedures were able to produce results within -5 to 7 % of the reference procedure. In the normal range, especially at the lower end, positive procentual deviations up to 175 % were found with the Jaffé based methods. In all methods some influence of

bilirubin on the final result could be measured. The enzymatic procedure, using creatinine iminohydrolase, showed less interference of bilirubin as compared with the other methods. Interference of other compounds was evaluated with a number of substances known for their interference in the Jaffé or enzymatic procedures.

The inaccuracy of the Jaffé based methods should have its impact in the clinical setting. Especially in medical decision making concerning pediatrics, transplantation medicine, selection of patients for clinical trials, therapeutic drug monitoring and in patients with diabetic coma, replacement of the Jaffé reaction by enzymatic procedures should seriously be considered as the enzymatic procedures represent state of the art technology for the routine department of clinical chemistry.

References

1. Zwang L, Blijenberg BG. Assessment of a selected Method for Creatinine with special emphasis on bilirubin interference. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29: 795-800.
2. Krouwer JS, Monti KL. A simple, graphical method to evaluate laboratory assays. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 525-527.