

het apparaat voor de screening van grote aantallen urines in te kunnen gaan zetten, moeten oplossingen bedacht worden voor de detectie van eiwit en glucose. Ook het meten van de pH zou mogelijk moeten zijn. Daarnaast moet de gevoeligheid voor het signaleren van cilindres verbeterd worden. Voor onderzoek waarbij het van belang is geringe aantallen erythrocyten of leukocyten te detecteren of waarbij een geringe toename van deze cellen te verwachten is, kan de flowcytometer nu al goed gebruikt worden. Immers, nauwkeurigheid en snelheid zijn - vergeleken met de microscoop - sterke kanten van deze techniek.

Dankbetuiging

Mw G. Veluwenkamp heeft met grote inzet de praktische uitvoering van deze evaluatie op zich genomen. Dhr G. Dulon heeft voor de verwerking van de resultaten en de grafische presentatie zorggedragen.

Literatuur

1. Bonnardeux A, Somerville P, Kaye M. A study on the reliability of dipstick urinalysis. *Clin Nephrol* 1994; 4: 167-172.
2. Marx AM, Kropf, Gressner AM. On the performance and reliability of mechanized urine teststrip measurement in comparison with visual reading. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27: 433-443.

Ned Tijdschr Klin Chem 1997; 22: 188-191

Bepaling van referentie-intervallen voor serumeiwitten na IFCC herstandaardisatie

P.J. HELMSING

Door het IFCC committee for plasma protein standardisation is nieuw referentiemateriaal (RPPHS) uitgebracht voor de standaardisatie van kalibratoren ten behoeve van de bepaling van plasma- of serumeiwitten. In dit onderzoek zijn referentielimieten berekend voor 17 serumeiwitten voor zowel vrouwen als mannen. Monstersselectie en berekeningsmethodiek zijn beschreven. Tevens zijn indicaties verkregen omtrent een mogelijke leeftijdsafhankelijkheid van de referentielimieten voor sommige eiwitten.

Trefwoorden: nefelometrie; RPPHS; referentiewaarden; serumeiwitten; leeftijdsafhankelijkheid

De afgelopen decaden zijn verschillende primaire referentiepreparaten voor serumeiwitten onder het label van de World Health Organisation (WHO) beschikbaar gekomen. Met behulp hiervan zijn door professionele en commerciële organisaties een groot aantal secundaire referentiematerialen geproduceerd.

Klinisch chemisch en hematologisch laboratorium, Van Weel-Bethesda Ziekenhuis, Dirksland

Correspondentie: Dr. P. J. Helmsing, Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Stationsweg 22, Van Weel-Bethesda Ziekenhuis, 3247 BW Dirksland.
Ingekomen: 10.01.97

3. Yasui Y, Tatsumi N, Park K, Koezuka T. Urinary sediment analyzed by flow cytometry. *Cytometry* 1995; 22: 75-79.
4. Muranaka K. Clinical uses of the UF-100™ for the diagnosis of urinary tract infection. *Sysmex J Int* 1996; 6: 46-50.
5. Birch DF, Fairley KF, Whitworth JA, Forbes I, Fairley JK, Cheshire GR, Ryan GB. Urinary erythrocyte morphology in the diagnosis of glomerular hematuria. *Clin Nephrol* 1983; 20: 78-84.
6. Hyodo T, Kumano K, Haga M, Sakai T. Analysis of urinary red blood cells of healthy individuals by automated urinary sediment analyzer. *Kidney and Dialysis* 1995, Vol 38 no 5.

Summary

Flow cytometry and the urine laboratory: the SYSMEX-UF-100™. Keijzer MH de and Brandts RW. Ned Tijdschr Klin Chem 1997; 22: 184-188.

Results from a recently developed flow cytometer, for the investigation of urine sediments, were compared with parameters from standard urine techniques. As a golden standard the microscopic inspection of the sediment was used. We conclude that with regard to the investigation of sediments a flow cytometer is a good option in the urine laboratory. Before such an apparatus can be used for the screening of urine samples, features as the detection of glucose and protein and the measurement of pH should be added.

Key-words: flow cytometry; urine; sediment; dipstick; microscopy

In de praktijk bleek, dat tussen deze verschillende secundaire referentiepreparaten de waarden van sommige eiwitten meer dan 100% verschillen lieten zien. In 1984 is het Committee for Plasma Protein Standardization van de International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) begonnen aan de realisatie van een nieuwe internationale secundaire matrix als referentiepreparaat voor plasma- eiwitten. De betreffende 14 plasma-eiwitten zijn: pré-albumine (PAB), albumine (ALB), α_1 -zuurglycoproteïne (AAG), α_1 -antitrypsine (AAT), ceruloplasmine (CER), haptoglobine (HPT), α_2 -macroglobine (AMG), transferrine (TRF), complement C3 (C3), complement C4 (C4), immunoglobuline A (IGA), immunoglobuline G (IGG), immunoglobuline M (IGM) en C-reactive proteïne (CRP) (1). In 1993 en 1994 is dit materiaal vrijgegeven door het Bureau Communautaire de Référence (BCR) van de Europese Economische Gemeenschap als Certified Reference Material (CRM 470) en door het College of American Pathologists (CAP) als Reference Preparation for Proteins in Human Serum (RPPHS). RPPHS is bedoeld als secundair matrix referentiemateriaal op basis waarvan werkbare kalibratoren en controles voor de bepaling van serumeiwitten gemaakt kunnen worden. De bereidingswijze, waarde-toekenning en randvoorwaarden, zoals optische helderheid e.d. van RPPHS door het IFCC committee, zijn in de literatuur beschreven (2,3). Daarbij zijn

tevens de fabrikanten van apparatuur en reagentia voor de bepaling van serumeiwitten betrokken. De invoering van nieuw referentiemateriaal voor de productie van standaarden kan leiden tot andere resultaten en derhalve tot wijziging van referentieintervallen voor de afzonderlijke serumeiwitten. In dit artikel worden de resultaten gegeven van een onderzoek dat tot doel had het vaststellen van referentielimieten voor 17 serumeiwitten. Daaronder zijn 13 van de 14 eiwitten van RPPHS geïdentificeerd.

MATERIAAL en METHODEN

Patiëntenpopulatie en patiëntensera

Aan poliklinische patiënten, die geen medicatie gebruikten, is expliciet gevraagd of zij bereid waren aan het onderzoek mee te doen. Patiënten werden ingedeeld naar de leeftijdsgroepen 15 t/m 24 jaar, 25 t/m 34 jaar, 35 t/m 44 jaar, 45 t/m 54 jaar, 55 t/m 64 jaar en 65+ jaar. In elk van deze 6 groepen werden de sera van 20 mannen resp. 20 vrouwen ingesloten.

Van elke ingesloten patiënt is d.m.v. een venapunctie een bloedmonster afgenomen in een stolbuis. Binnen 1 uur na afname werd het serum uitverdeeld in porties van minimaal 0,5 ml en bij -20°C ingevroren. Sera werden niet vaker dan 1x ingevroren.

Sera met een hemolytisch, icterisch of lipemisch aspect werden verworpen.

Van alle sera werden bepaald: totaal eiwitgehalte (Biuret methode), cholesterol (CHOD-PAP), triglyceriden (enzymatische bepaling met automatische glycerol correctie) en hemoglobine (spectrofotometrie, 400-600 nm).

Deze analyses werden uitgevoerd op een Cobas-MIRA. Spectra werden op een Beckman DU-50 spectrofotometer gemeten.

Vooraf waren als criteria voor de sera voor insluiting in het onderzoek vastgesteld:

- totaal eiwitgehalte binnen het referentiegebied van ons laboratorium (60-75 g/l) om t.a.v. de eiwitverhoudingen in het serum afwijkende monsters uit te sluiten.
- cholesterolwaarde < 6,5 mmol/l en triglyceridegehalte < 2 mmol/l. Ten aanzien van het lipidenpatroon waren normale sera gewenst daar de apolipoproteïnes A-1 en B in het onderzoek waren opgenomen.
- hemoglobinegehalte < 0,5 mmol/l om hemolyse uit te sluiten (4).
- CRP diende een lage waarde te hebben, < 10 mg/l, om actieve ontstekingsprocessen bij de patiënten uit te sluiten, daar deze processen acute fase eiwitten beïnvloeden.

Bepaling serumeiwitten: concentraties van de afzonderlijke serumeiwitten werden volgens instructies van de fabrikant bepaald op een Beckman Array nefelometer. De kalibratoren voor elke bepaling waren tegen RPPHS gestandaardiseerd.

Als controle sera werden Virgil Plus, 3 niveaus voor de CRP-bepaling en Virgil PRx, 3 niveaus (fa. Beckman, Mijdrecht) voor de overige eiwitten gebruikt.

Naast de 14 eiwitten van RPPHS zijn tevens de ei-

witten apolipoproteïne A1 (APA), apolipoproteïne B (APB), kappa-ketens (totaal) (KAP) en lambda-ketens (totaal) (LAM) in het onderzoek opgenomen.

Statistische berekening

Voor de berekening van het referentiegebied werd het software programma GraphROC for Windows (5, 6) gebruikt. Dit programma heeft de mogelijkheid om voor non-parametrische verdelingen referentielimieten te berekenen bij elk te kiezen percentiel van de verdeling. In dit onderzoek zijn de referentielimieten berekend voor het 2,5 en 97,5 percentiel van de populatie met een betrouwbaarheidsinterval van 90% (4).

Data werden via een spreadsheetprogramma ingelezen in GraphROC en uitbijters volgens de methode van Dixon (7) verwijderd. De methode van Dixon is standaard als een mogelijkheid voor de berekening van uitbijters in GraphROC opgenomen.

RESULTATEN en DISCUSSIE

De voorgestelde richtlijnen van het National Committee for Clinical Laboratory Standards (4) zijn waar mogelijk in het onderzoek toegepast. Deze richtlijnen gaan er van uit dat de verdeling van de waarnemingen geen Gausse curve zal geven. Dit betekent dat het aantal waarnemingen voor de statistische berekening tenminste 120 dient te zijn (8). In totaal zijn zoveel sera bepaald dat aan dit aantalscriterium voor zowel vrouwen als mannen werd voldaan.

Van de criteria voor insluiting van sera bleek de norm t.a.v. het triglyceridegehalte en in mindere mate voor hemolyse en de CRP-waarde de belangrijkste reden voor uitsluiting te zijn. In totaal zijn ruim 50 monsters als gevolg van de opgestelde criteria niet in het onderzoek meegenomen.

De Dixon-test voor de detectie van uitbijters is aanbevolen door het N.C.C.L.S. en mag worden toegepast mits de verdeling van de waarnemingen geen sterke non-parametrie vertoont (4). De grafische weergave van de waarnemingsresultaten in het programma GraphROC liet zien dat er voor geen van de componenten sprake was van een sterk non-parametrische verdeling. In totaal werden 5 uitbijters gedetecteerd. Bij AMG, IGA en LAM 1 en bij IGM 2 uitbijters.

Door de gekozen samenstelling van de patiëntenpopulatie is de leeftijdsopbouw over het gehele leeftijdsbereik gelijkwaardig. Het resultaat hiervan was een t.a.v. de leeftijd vergelijkbare populatie mannen en vrouwen. De gemiddelde leeftijd voor mannen was 45,8 jaar (16-84 jaar, n = 120) en voor vrouwen 46,1 jaar (17-86 jaar, n = 120).

In tabel 1 is de dag tot dag variatie voor elk van de eiwitbepalingen opgenomen. Uit deze tabel blijkt dat de dag tot dag variatie op elk van de drie niveaus laag is. Hieruit kan geconcludeerd dat de bepaling van deze eiwitten, volgens de gebruikte methode, als robuust beschouwd kan worden.

In tabel 2 zijn de berekende referentieintervallen voor zowel vrouwen als mannen van de 17 eiwitten weergegeven. T.a.v. C3 dient opgemerkt te worden dat in de ideale situatie het serum voor deze bepaling bij -70°C bewaard moet worden om de omzetting van

Tabel 1. Interassay variatie voor de nefelometrische bepaling van 18 serumeiwitten

| | Level 1 | | | Level 2 | | | Level 3 | | |
|-------------------------------|--------------------|-----|----|--------------------|-----|----|--------------------|-----|----|
| | X-gem. (gram/l) | VC% | n | X-gem. (gram/l) | VC% | n | X-gem. (gram/l) | VC% | n |
| α_1 -zuurglycoproteïne | 0,55 | 2,6 | 21 | 0,72 | 2,2 | 21 | 1,12 | 2,8 | 21 |
| α_1 -antitrypsine | 0,57 | 3,3 | 19 | 1,27 | 2,0 | 19 | 1,97 | 1,9 | 19 |
| α_2 -macroglobuline | 0,94 | 2,8 | 21 | 2,20 | 4,0 | 21 | 2,45 | 3,4 | 21 |
| albumine | 23,6 | 4,0 | 21 | 32,9 | 3,9 | 22 | 43,0 | 3,8 | 21 |
| apolipoproteïne A-1 | 1,12 | 3,7 | 21 | 1,49 | 3,8 | 21 | 1,77 | 4,0 | 21 |
| apolipoproteïne B | 0,58 | 4,5 | 21 | 0,78 | 3,2 | 21 | 1,30 | 2,8 | 21 |
| ceruloplasmine | 0,09 | 7,1 | 16 | 0,25 | 4,5 | 21 | 0,41 | 4,6 | 21 |
| complement C3 | 0,56 | 3,4 | 22 | 1,52 | 4,7 | 22 | 2,46 | 5,3 | 22 |
| complement C4 | 0,24 | 4,4 | 21 | 0,39 | 4,1 | 21 | 0,58 | 3,1 | 21 |
| C-reactief proteïne | 10,4* | 5,0 | 15 | 46,8* | 5,2 | 16 | 69,1* | 4,6 | 15 |
| haptoglobine | 0,68 | 2,7 | 22 | 1,11 | 2,5 | 22 | 1,92 | 3,5 | 22 |
| immunoglobuline A | 1,24 | 2,5 | 23 | 2,21 | 3,3 | 23 | 2,99 | 3,3 | 23 |
| immunoglobuline G | 5,22 | 3,0 | 23 | 11,4 | 3,6 | 23 | 16,2 | 3,6 | 23 |
| immunoglobuline M | 0,49 | 3,7 | 23 | 1,01 | 4,0 | 23 | 1,34 | 3,8 | 23 |
| kappa ketens | 4,34 | 3,6 | 22 | 9,32 | 3,3 | 22 | 13,6 | 3,1 | 22 |
| lambda ketens | 2,53 | 6,1 | 23 | 4,56 | 3,9 | 23 | 6,21 | 6,1 | 23 |
| pré-albumine | 0,19 | 3,4 | 21 | 0,29 | 2,6 | 21 | 0,44 | 3,0 | 21 |
| transferrine | 1,60 | 2,2 | 21 | 3,16 | 6,0 | 21 | 4,59 | 3,2 | 21 |

*: mg/l

Tabel 2. Referentie- en 90% betrouwbaarheidslimieten voor 17 serumeiwitten

| | Mannen | | | Vrouwen | | |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------|--------------------|-------------------------|-------------------|--------------------|
| | ref. limiet (gram/l) | 2,5 percentiel | 97,5 percentiel | ref. limiet (gram/l) | 2,5 percentiel | 97,5 percentiel |
| α_1 -zuurglycoproteïne | 0,50-1,23 | 0,43-0,57 | 1,15-1,41 | 0,41-1,31 | 0,37-0,44 | 1,09-1,47 |
| α_1 -antitrypsine | 0,38-1,84 | 0,30-0,90 | 1,77-2,10 | 0,42-2,20 | 0,40-0,77 | 2,03-2,42 |
| albumine | 35,2-50,1 | 33,3-36,3 | 47,1-53,9 | 31,2-44,6 | 28,5-32,8 | 42,9-48,1 |
| α_2 -macroglobuline | 1,06-2,60 | 1,02-1,13 | 2,38-3,04 | 1,21-2,58 | 1,08-1,29 | 2,34-3,04 |
| apolipoproteïne A-1 | 0,98-1,76 | 0,74-1,07 | 1,67-1,87 | 1,08-2,13 | 0,97-1,22 | 1,89-2,37 |
| apolipoproteïne B | 0,61-1,71 | 0,35-0,64 | 1,58-2,06 | 0,54-1,73 | 0,43-0,72 | 1,52-1,80 |
| complement C3 | 0,82-1,57 | 0,77-0,88 | 1,48-1,73 | 0,80-1,66 | 0,33-0,85 | 1,59-2,02 |
| complement C4 | 0,14-0,40 | 0,12-0,16 | 0,39-0,44 | 0,14-0,45 | 0,11-0,16 | 0,37-0,54 |
| ceruloplasmine | 0,23-0,46 | 0,21-0,25 | 0,43-0,51 | 0,27-0,70 | 0,12-0,28 | 0,64-0,78 |
| haptoglobine | 0,37-2,48 | 0,36-0,48 | 2,22-3,54 | 0,38-2,39 | 0,16-0,53 | 2,14-2,94 |
| immunoglobuline A | 0,93-4,49 | 0,60-1,08 | 3,64-5,08 | 0,74-4,57 | 0,61-0,91 | 3,69-4,63 |
| immunoglobuline G | 6,87-15,9 | 5,12-7,31 | 14,1-17,0 | 6,01-15,0 | 5,64-7,50 | 13,6-16,8 |
| immunoglobuline M | 0,35-2,15 | 0,25-0,45 | 1,75-2,70 | 0,32-2,49 | 0,28-0,48 | 2,33-3,71 |
| kappa ketens | 5,34-13,1 | 4,60-5,85 | 11,7-14,2 | 5,06-13,2 | 4,56-6,15 | 11,7-14,6 |
| lambda ketens | 2,18-6,14 | 1,95-2,74 | 5,71-7,19 | 2,61-6,34 | 2,08-2,84 | 5,65-7,37 |
| pré-albumine | 0,16-0,35 | 0,11-0,35 | 0,33-0,44 | 0,12-0,31 | 0,09-0,16 | 0,30-0,32 |
| transferrine | 1,80-3,24 | 1,71-1,92 | 3,05-3,93 | 1,91-3,67 | 1,45-2,08 | 3,45-4,00 |

Tabel 3. Indeling naar statistisch significantieniveau, als indicatie voor leeftijdsafhankelijke referentielimieten, van de afwijking t.o.v. nul, van de helling (b) uit de formule $y = a + bx$

| P-Waarde | Mannen | Vrouwen |
|----------------|---------------|------------------------|
| $p \leq 0,01$ | ALB, AMG | CER, IGA |
| $p \leq 0,001$ | APB, CER, TRF | AAG, APB, C4, HPT, IGM |

C3 in de factoren C3a en C3b zoveel mogelijk te voorkomen. In dit onderzoek zijn alle monsters bij -20°C bewaard. De in vitro omzetting van C3 is dan zodanig sterk beperkt dat de C3-bepaling voor de kliniek bruikbaar is (9).

Vergelijking van de referentiegebieden uit tabel 2 met recent gepubliceerde (10) interim referentie-interval- len laat voor 12 van de 13 eiwitten van RPPHS een overeenkomstig referentiegebied zien. Een afwijking werd vastgesteld voor de lage referentielimiet van AAT: 0,4 g/l tegen de gepubliceerde waarde van 0,9 g/l (10). De reden voor dit verschil is niet duidelijk. De hoge referentielimiet was wel vergelijkbaar.

Door de fabrikant zijn via een rondschriven indicaties gegeven over te verwachten wijzigingen in de referentiegebieden voor de genoemde eiwitten na herstandaardisatie. Vergelijking van deze waarden met de referentielimieten in tabel 2 laat zien dat voor de eiwitten AAG, ALB, APA, C3, C4, CER, IGG, KAP en LAM de in dit onderzoek berekende referentielimieten van dezelfde orde van grootte waren als de door de fabrikant verwachte waarden. Voor APB, HPT, IGA en IGM bleken de referentiegebieden meer dan 15% naar een hoger concentratiegebied verschoven en voor PAB meer als 15% naar een lager concentratiegebied. Het referentiegebied voor AAT, AMG en TRF bleek meer dan 10% ruimer te zijn.

De opbouw van de patiëntenpopulatie bood de mogelijkheid om na te gaan of er aanwijzingen waren voor leeftijdsafhankelijke referentiegebieden. Daartoe werd van alle meetwaarden voor elke component de functie $y = a + bx$ (y = concentratie eiwitcomponent, x = leeftijd, bereik: 15 - 85 jaar) berekend. Indien de helling b statistisch significant afwijkt van 0, is dat gegeven indicatief voor een afhankelijkheid van de berekende referentielimieten met de leeftijd. In tabel 3 zijn de berekende statistische significantieniveaus (p -waarde) voor de afwijking van de helling (b) t.o.v. 0 voor de verschillende eiwitten weergegeven. Uit deze tabel blijkt dat met name voor APB, CER, TRF en in mindere mate voor ALB en AMG bij mannen en AAG, APB, C4, HPT, IGM resp. CER en IGA bij vrouwen in deze populatie er statistische significantie is voor leeftijdsafhankelijke referentielimieten.

Bij het ouder worden lijken APB en CER bij de mannen en AAG, APB, C4, HPT en IGA bij vrouwen naar hogere limieten te verschuiven. Naar lagere concentratiegebieden verplaatsen zich ALB, AMG en TRF bij mannen en CER, IGM en TRF bij de vrouwen. Het feit dat APB bij het ouder worden bij zowel mannen als vrouwen naar een hoger bereik verschuift zou mogelijk verband kunnen houden met veranderingen in de vetstofwisseling. De verschuiving van TRF bij beide sexen naar een lager referentiegebied

zou het gevolg kunnen zijn van veranderingen in de ijzerhuishouding. Verder onderzoek hierover is gewenst, maar valt buiten het kader van deze studie.

Uit deze tabel blijkt eveneens dat er geen indicatie is voor veranderingen in de referentiegebieden tussen de 15 en 85 jaar voor AAG, AAT, APA, C3, C4, HPT, IGG, IGM, KAP en LAM bij mannen en ALB, APA, C3, IGG, KAP, LAM en PAB bij vrouwen.

Een grafische weergave van alle meetgegevens is bij de firma Beckman op verzoek verkrijgbaar.

Dankbetuiging

Dit onderzoek was zonder de technische hulp van Machteld Keijnemans, Ruud Huisman, Ineke Bakker en Diane Berkenbosch, medewerkers van het K.C.H.L., niet mogelijk geweest. Dankzij de firma Beckman, Mijdrecht, is de uitvoering van het onderzoek gerealiseerd.

Literatuur

1. Johnson AM. A new international reference preparation for proteins in human serum. Arch Pathol Lab Med 1993; 117: 29-31.
2. Whicher JT, Ritchie RF, Johnson AM, Baudner S, Bienvenu J, Bliurup-Jensen S, Carlstrom A, et al. New international reference preparation for proteins in human serum (RPPHS). Clin Chem 1994; 40: 934-938.
3. Bonhall LR. Reference preparation for proteins in human serum, the new world-wide protein standard. Clin Lab Sci 1995; 8: 80-83.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. How to define, determine, and utilize reference intervals in the clinical laboratory; Proposed guideline. NCCLS document C28-P (ISBN 1-56238-143-1). Villanova, Pennsylvania, NCCLS, 1992.
5. Kairisto V. Optimal bin widths for frequency histograms and ROC curves. Clin Chem 1995; 41: 766-767.
6. Kairisto V en Poola A. Handleiding "GraphROC for Windows", Turku, Finland, 1995.
7. Dixon WJ. Processing data for outliers. Biometrics 1953; 9: 74-89.
8. Reed AH, Henry RJ en Mason WB. Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. Clin Chem 1971; 17: 275-284.
9. Beunis MH. De immunonefelometrische bepaling van serumeiwitten. Proefschrift. Utrecht: Rijksuniversiteit Utrecht, 1980, pag 105-106.
10. Dati F, Schumann G, Thomas L, Aguzzi F, Baudner S, Bienvenu J, Blaabjerg O, et al. Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on the standardization against IFCC/BCR/CAP reference material (CRM 470). Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996; 34: 517-520.

Summary

Determination of reference ranges of serum proteins after IFCC recalibration. Helmsing PJ. Ned Tijdschr Klin Chem 1997; 22: 188-191.

The committee for plasma protein standardisation of the IFCC has released a new reference preparation (RPPHS) for the standardisation of calibrators necessary for the determination of plasma proteins. In this study the reference ranges are calculated for as well man as women. The selection of samples and the used methods of calculations are described. Indications of an age-dependence of the calculated reference values are found for a number of the proteins investigated.

Key-words: nephelometry; RPPHS; reference values; serum protein; age dependency