

Posterabstracts

Samenvattingen van de posterpresentaties tijdens het 52^e Congres van de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie 8 en 9 april 1999 te Lunteren

Lipiden

001. Comparison of the measurement of lipids and lipoproteins versus measurement of apolipoprotein B for estimation of coronary heart disease risk: a study in familial combined hyperlipidemia

P.N.M. DEMACKER, M. VEERKAMP, S.J.H. BREDIE, S.M. MARCOVINA and A.F.H. STALENHOF
Department of Medicine, Division of General Internal Medicine, University of Nijmegen, The Netherlands, and Department of Medicine, Northwest Lipid Research Laboratories, University of Washington, Seattle, WA, USA

We compared in 506 members of families with familial combined hyperlipidemia (FCH), characterized by a predominance of small dense low density lipoproteins (LDL), two approaches to select subjects with an apparently increased risk for coronary heart disease: measurement of only apolipoprotein (apo) B versus measurement of plasma lipids and lipoproteins. On the basis of each approach, the subjects were divided into two groups; those with normal values and those with at least one deviating parameter. For apo B a value of 1250 mg/l was used as cut off limit.

When comparing the apo B- or the lipid/lipoprotein approach, the same subjects with no deviating parameter were selected in at least 81.2% of the cases. On the other hand, the subjects having one or more deviating parameters and selected with one of both approaches were identical in 96.9% of the cases. The groups with an apparently normal risk based on the apo B concentration <1250 mg/l included a group with low to normal HDL-cholesterol concentrations, but their total cholesterol concentration was also low. At nearer insight the apo B approach in this subgroup, with an apparently low reverse cholesterol transport adapted to a low cholesterol deposition, is thus more informative than the lipid/lipoprotein approach. At apo B concentrations >1250 mg/l we observed two deviating groups; one with increased HDL-cholesterol concentrations and one group with normolipemia (10.9% of this subgroup; 6.2% of the total of 506 subjects). The first subgroup consisted mainly of women

which supposedly have an adequately adapted reverse cholesterol transport on the base of their increased HDL-cholesterol concentrations. The second subgroup comprises subjects with "normolipemic hyperapobetalipoproteinemia", known to have an increased risk for coronary heart disease because of the predominance of dense low density lipoproteins. Again, also in this subgroup, apo B determination was most informative. The selection of the subgroup with "normolipidemic hyperapobetalipoproteinemia" on the base of the conventional lipid/lipoprotein based approach could be refined by decreasing the cut off limit for triglycerides from 2.0 mmol/l to 1.5 mmol/l. This limit optimally distinguished subjects with an atherogenic dense LDL subfraction pattern or a buoyant LDL-subfraction pattern.

Thus, based on the results of our study, the determination of apo B appeared to be, if not superior, at least as effective as the determination of conventional lipid and lipoprotein parameters in classifying subjects for coronary artery disease risk. The validity of this conclusion is stressed by economical factors: one single analyte versus three different analytes. Also the knowledge that apo B can be measured in non fasted plasma in contrast to measurement of lipids and lipoproteins is a point of interest. On the other hand, examination in a fasting condition, allows additional determination of glucose which gives insight into the associated carbohydrate metabolism.

002. Measurement of LDL particle diameter by high performance gel filtration chromatography

P.G. SCHEFFER¹, S.J.L. BAKKER², R.J. HEINE² and T. TEERLINK¹
Departments of Clinical Chemistry¹ and Endocrinology², Academic Hospital Vrije Universiteit, Amsterdam

Small dense LDL is increasingly recognized as a risk factor for cardiovascular disease. We have developed a technique for LDL size measurement based on high performance gel-filtration chromatography (HPGC). Separations were performed on a Superose 6 column from Pharmacia. LDL, isolated by ultracentrifugation, was injected and eluted with PBS at a flow rate of 0.5 mL/min and the column effluent was monitored at 280 nm. Measurement of the LDL particle size was carried out by comparing its retention time with the retention times of two LDL samples of known size. To validate the procedure, we compared the HPGC method with gradient gel electrophoresis (GGE), a widely used technique for the measurement of LDL size. LDL diameters as measured by HPGC and GGE were highly correlated ($r=0.88$, $P<0.001$, $n=60$). Within-run and between-run CV for LDL size measured by HPGC were less than 0.1% and 0.2%, respectively. Interference by coeluting plasma proteins detected at 280 nm precludes the use of the HPGC technique for the measurement of LDL size in whole

plasma or serum. We overcame this limitation using a more selective fluorescence detection, by post-column labelling of LDL with parinaric acid (PnA). The PnA reagent is particularly suited for post-column detection of lipoproteins after separation by HPGC, as the fluorescence intensity of this probe in aqueous solution is very low and is enhanced manifold upon its spontaneous incorporation into lipoproteins. Using this detection system, LDL sizes measured in whole plasma correlated strongly with the respective values in isolated LDL ($r=0.98$, $n=54$).

In conclusion, we have developed an HPGC based technique for determination of the mean LDL particle diameter using isolated LDL, serum or plasma. Values measured by HPGC were in close agreement with values obtained by GGE. The main advantages of the HPGC method are its high precision, good reproducibility and the possibility for the automated analysis of large series of samples.

003. Supplementation of Dutch vegans with α - and γ -linolenic acids does not augment their long-chain polyunsaturated fatty acid ω 3 status

M.R. FOKKEMA, D.A.J. BROUWER, M.B. HASPERHOVEN and F.A.J. MUSKIET
Pathology and Laboratory Medicine, Groningen University Hospital

Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) are fatty acids with ≥ 20 carbon atoms and ≥ 3 double bonds. They derive from the parent essential fatty acids by chain elongation/desaturation, giving rise to the LCPUFA ω 6 (from linoleic acid; LA) and LCPUFA ω 3 (from α -linolenic acid; ALA) series. Important LCPUFA are arachidonic (AA; 20:4 ω 6), eicosapentaenoic (EPA; 20:5 ω 3) and docosahexaenoic (DHA; 22:6 ω 3) acids. In a previous study we found that administration of ALA, γ -linolenic acid (GLA), or both, to apparently healthy omnivores does not augment LCPUFA ω 3 status (1). It was hypothesized that dietary AA (notably from meat) inhibited ALA conversion to LCPUFA ω 3, or that the low ALA/LA ratio favored conversion of LA to LCPUFA ω 6. We investigated whether the conversion of ALA to LCPUFA ω 3 proceeds with less difficulty in vegans. Vegans do not consume animal products, which implies absence of dietary AA inhibition, if any. Four apparently healthy vegans (24-57 years) (group A) received a daily dose of 4 g linseed oil (2.2 g ALA) for 4 weeks and subsequently 4 g linseed oil plus 6 g borage oil (2.2 g ALA + 1.5 g GLA) for another 4 weeks. Five vegans (32-52 years) (group B) received a daily dose of 6 g borage oil for 4 weeks and subsequently 6 g borage oil plus 4 g linseed oil (1.5 g GLA + 2.2 g ALA) for another 4 weeks. EDTA-blood was collected in the fasting state at 0, 4 and 8 weeks. Erythrocytes (RBC), platelets (PLT), plasma cholesterol esters (CE), plasma phospholipids (PL) and plasma triglycerides

(TG) were isolated and their fatty acid compositions determined by capillary gas chromatography. Differences in fatty acid compositions between 0 and 8 weeks were tested for the combined groups A and B, using the paired Student's t-test at $p < 0.05$. Supplementation of both ALA and GLA increased GLA (in all but RBC), DGLA (PLT, PL), ALA (PLT, TG) and EPA (TG). We conclude that the present ALA dose augments LCPUFA ω 3 status to a minor extent and that GLA administration increases GLA and DGLA status. Augmentation of DGLA status and inability to augment LCPUFA ω 3 status to any appreciable extent is in agreement with our previous results from omnivores. We therefore conclude that the inhibitory effect of dietary AA in omnivores, if any, does not contribute to the low conversion efficiency of ALA to LCPUFA ω 3 at the prevailing dietary ALA/LA ratios. In other words, the still very low dietary ALA/LA ratio is likely to be the principal reason for the poor conversion of ALA to LCPUFA ω 3.

Literature

1. Brouwer DAJ, Hettema Y, Doormaal JJ van, Muskiet FAJ. γ -Linolenic acid does not augment long-chain polyunsaturated fatty acid ω 3-status. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998; 59: 329-334.

004. Polymorfismen in apolipoproteïne(a) en hun invloed op de Lipoproteïne(a) concentratie in individuen met een verschillend risico voor het ontwikkelen van cardiovasculaire ziekte

J. PRINS¹, M.E. WITTEKOEK², F.R. LEUS¹, M.D. TRIP², J.J.P. KASTELEIN² en H.J.M. van RIJN¹
Afdeling Klinische Chemie, Academisch Ziekenhuis Utrecht¹; Afdeling Trombose en Hemostase, Academisch Medisch Centrum Amsterdam²

De lipoproteïne(a) [Lp(a)] concentratie van een individu wordt geacht genetisch vastgelegd te zijn en een verhoogde concentratie is een risico factor voor het ontwikkelen van premature symptomatisch cardiovasculaire ziekte (CVZ). In het beschreven onderzoek is gekeken naar de invloed van verschillende polymorfismen in het apolipoproteïne(a) [apo(a)] gen op de Lp(a) concentratie en op de klinische manifestatie van CVZ. De bestudeerde groepen zijn een gezonde controle populatie, individuen met de heterozygote vorm van familiale hypercholesterolemie (FH) met en zonder klinische manifestaties van CVZ (respectievelijk FH-S en FH-A), en non-FH patiënten met premature CVZ (PA). Het verhoogde risico voor het ontwikkelen van CVZ in FH patiënten wordt veroorzaakt door een defect in de LDL receptor, resulterend in een verhoogde LDL-cholesterol concentratie. De klinische manifestaties van CVZ varieert aanzienlijk tussen FH patiënten, zelfs binnen families met hetzelfde LDL receptor defect. Dit suggereert dat naast het LDL receptor defect andere factoren van belang zijn voor het optreden van klinisch manifeste CVZ. Diverse studies hebben Lp(a) aangewezen als een belangrijke determinant voor het optreden van klinische manifestaties bij FH patiënten. In de populatie varieert de Lp(a) concentratie van 1 tot meer dan 1000 mg/L. De variatie in de Lp(a) concentratie tussen individuen wordt deels veroorzaakt doordat het een omgekeerde correlatie met de apo(a) eiwit grootte vertoont. Toch moeten additionele factoren van invloed zijn op de Lp(a) concentratie, aangezien binnen één bepaalde apo(a) isovorm grootte nog een meer dan 100-voudige variatie in concentratie gezien wordt. Polymorfismen die mogelijk van invloed kunnen zijn

op de Lp(a) concentratie kunnen gelegen zijn in de promoter-regio van het apo(a) gen, of in de regio die codeert voor de kringles (K.IV) die belangrijk zijn voor de vorming van Lp(a) (K.IV type 5 - 10). Zowel door ons als door anderen zijn diverse polymorfismen in deze regionen van het apo(a) gen geïdentificeerd. Er is gekeken naar het effect van deze polymorfismen op de Lp(a) concentratie en de klinische manifestatie van CVZ.

Bij de vergelijking tussen de individuen met en zonder symptomatische CVZ was een significant verschil te zien tussen zowel het gemiddelde als de mediane Lp(a) concentratie, en de verdeling over de apo(a) eiwit groottes. Daarbij werd in de FH-A groep een significant verhoogde Lp(a) concentratie gezien, maar een vergelijkbare verdeling over de apo(a) isovorm groottes in vergelijking met de controles. De verschillen in Lp(a) concentratie werden maar voor een klein deel verklaard door de bestudeerde polymorfismen in het apo(a) gen. Lineaire regressie analyse van de apo(a) eiwit grootte versus de Lp(a) concentratie liet een verhoogde Lp(a) concentratie per eiwit grootte zien in de FH-A, FH-S en PA groepen ten opzichte van de controles. Voor FH patiënten (FH-S en FH-A) wordt gedacht dat dit fenomeen mogelijk verklaard wordt door een invloed van de verhoogde LDL concentratie op de klaring van Lp(a). Voor de groepen met klinische manifestaties van CVZ (FH-S en PA) wordt gedacht aan een acuut fase responsief effect, mogelijk geïnduceerd door de aanwezigheid van CVZ, die leidt tot een verhoging van de apo(a) expressie en daarmee de Lp(a) concentratie.

005. Dutch vegans have low long-chain polyunsaturated fatty acid ω 3 status

M.R. FOKKEMA, D.A.J. BROUWER, M.B. HASPERHOVEN, Y. HETTEMA and F.A.J. MUSKIET
Pathology and Laboratory Medicine, Groningen University Hospital

Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) are fatty acids with 20 or more carbon atoms and with at least 3 double bonds in the so-called methylene-interrupted cis-configuration. LCPUFA derive from the diet or from synthesis of the parent essential fatty acids linoleic acid (18:2 ω 6; giving rise to the LCPUFA ω 6 series) or α -linolenic acid (18:3 ω 3; LCPUFA ω 3 series) by chain elongation and desaturation. In this pathway 18:2 ω 6 is subsequently converted into 18:3 ω 6, 20:3 ω 6, 20:4 ω 6, 22:4 ω 6, 24:4 ω 6, 24:5 ω 6 and 22:5 ω 6; whereas 18:3 ω 3 is converted into 18:4 ω 3, 20:4 ω 3, 20:5 ω 3, 22:5 ω 3, 24:5 ω 3, 24:6 ω 3 and 22:6 ω 3. Delta-6 desaturation is involved in (competitive) conversions of 18:2 ω 6 to 18:3 ω 6; 18:3 ω 3 to 18:4 ω 3; 24:4 ω 6 to 24:5 ω 6; and 24:5 ω 3 to 24:6 ω 3. Vegetable oils are important dietary sources of 18:2 ω 6 (corn, sunflower, safflower oils) and 18:3 ω 3 (linseed, soybean oils). The principal dietary LCPUFA sources are animal products such as meat (20:4 ω 6) and fish (20:5 ω 3 and 22:6 ω 3). Vegans do not consume animal products and may therefore mainly be dependent on LCPUFA biosynthesis from 18:2 ω 6 and 18:3 ω 3. We investigated whether Dutch vegans have different LCPUFA status, compared with omnivorous counterparts. EDTA-anticoagulated blood was collected from 12 vegans (ages: 38 \pm 11 years) and 15 omnivores (34 \pm 11) in the fasting state. Erythrocytes (RBC), platelets (PLT), plasma cholesterol esters (CE) and plasma triglycerides (TG) were isolated. Fatty

acids were determined by capillary gas chromatography. Vegans had higher ($p < 0.05$ by Mann-Whitney U-test) 18:2 ω 6 (RBC, CE, TG), 18:3 ω 6 (TG), 20:3 ω 6 (TG), 22:4 ω 6 (TG), 22:5 ω 3 (RBC, PLT) and 22:5 ω 6/22:6 ω 3 (RBC, PLT), compared with omnivores. Their 20:5 ω 3 (RBC, PLT, CE), 22:5 ω 3 (TG), 22:6 ω 3 (RBC, PLT, CE, TG), LCPUFA ω 3 (CE, TG), 22:4 ω 6 (RBC, PLT) and 22:4 ω 6/22:5 ω 6 (RBC, PLT) were lower. Higher 18:3 ω 6, 22:4 ω 6 and notably 20:3 ω 6 in fasting TG of vegans, compared with omnivores, is likely to indicate a higher conversion rate of ω 6 EFA through chain elongation and desaturation in the liver. It may derive from a lack of negative feed back inhibition exerted by dietary LCPUFA. The lower LCPUFA ω 3 status in CE and TG of vegans becomes confirmed by their higher 22:5 ω 6/22:6 ω 3 (a marker for 22:6 ω 3 deficiency) in RBC and PLT. The combination of higher 22:5 ω 3/22:6 ω 3 and lower 22:4 ω 6/22:5 ω 6 in RBC and PLT of vegans is likely to indicate more successful competition of the ω 6-series EFA for delta-6 desaturation. Our data suggest that vegans have higher hepatic LCPUFA ω 6 synthesis rates than omnivores. The ω 6 EFA dominance in vegans causes their more successful competition for desaturation, compared with ω 3 EFA. More successful competition of ω 6 fatty acids, together with low dietary intake of LCPUFA ω 3 (e.g. from fish) causes a state of lower LCPUFA ω 3 (notably 22:6 ω 3) status.

006. Low dose fish oil supplementation of healthy pregnant women augments LCPUFA ω 3 contents of umbilical arteries and veins without affecting LCPUFA ω 6

F.V. VELZING-AARTS¹, F.R.M. van der KLIS², C.M. VAN BEUSEKOM³, H. LANDMAN⁴, J.J. CAPELLO⁴, F.P.L. van der DIJS² and F.A.J. MUSKIET¹
Pathology and Laboratory Medicine, Groningen University Hospital¹, Public Health Laboratory, Curaçao (The Netherlands Antilles)², Friesland Nutrition, Leeuwarden³, Gynecologists, Curaçao⁴

Preeclamptic pregnancies have lower contents of long chain polyunsaturated fatty acids of the ω 3 and ω 6 series (LCPUFA ω 3, LCPUFA ω 6) in umbilical veins (UV) and arteries (UA), compared with normotensive and normoproteinuric controls. It may be related to their abnormal eicosanoid formation and the state of increased platelet aggregation and vasoconstriction. We investigated in an open trial design the effect of approximately 20 weeks LCPUFA ω 3 supplementation of healthy pregnant women on the LCPUFA contents of UA and UV at birth. The study was conducted in the island of Curaçao. The study population was composed of women who had uneventful pregnancies and delivered healthy babies at term. LCPUFA ω 3 was administered as fish oil capsules (Omega 1000®) or a milk product designed for pregnant

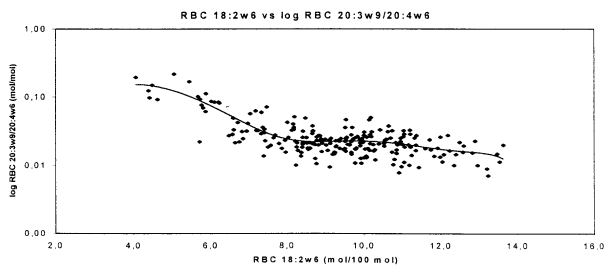
women (Frisomum®). They gave rise to daily intakes of 330 (fish1; n=15), 720 (Frisomum; n=24) and 1050 (fish3; n=20) mg LCPUFA ω 3. Fifty-seven untreated women served as controls. Women who took less than 75% of the prescribed dose were excluded. Between-group differences were analyzed with the Mann-Whitney-U-test corrected for type-1 errors. Women who received LCPUFA ω 3 through Frisomum and fish3 had about 19% higher LCPUFA ω 3 contents in UA and UV, compared with controls. Their LCPUFA ω 6 contents did not change. We conclude that supplementation of 720-1050 mg LCPUFA ω 3 daily during pregnancy increases LCPUFA ω 3 in UA and UV without affecting their LCPUFA ω 6 contents. It remains to be established whether this regimen lowers the risk of preeclampsia development.

007. Erythrocyte linoleic acid cut-off value for establishment of subclinical essential fatty acid deficiency

E.N. SMIT^{1,2}, M.R. FOKKEMA², D.A.J. BROUWER², C.I. LANTING¹, H.A. WOLTIL³, E.R. BOERSMA¹ and F.A.J. MUSKIET²
Obstetrics and Gynecology, Groningen University Hospital¹, Pathology and Laboratory Medicine, Groningen University Hospital² and Pediatrics, Martini Hospital Groningen³

Linoleic (18:2 ω 6) and α -linolenic (18:3 ω 3) acids are the parent essential fatty acids (EFA). They are converted into long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) by alternating chain elongation and desaturation, in which Δ 6 desaturation is rate limiting. The major LCPUFA synthesized from 18:2 ω 6 is arachidonic acid (20:4 ω 6). Δ 6-Desaturase has preference in the sequence 18:3 ω 3 > 18:2 ω 6 > 18:1 ω 9 (oleic acid). Consequently, shortage of both 18:2 ω 6 and 18:3 ω 3 ('EFA deficiency') causes decreased 20:4 ω 6 synthesis, and alternative desaturation and elongation of non-essential 18:1 ω 9 to 20:3 ω 9 (Mead acid). For

the clinical chemical establishment of EFA deficiency, we estimated the cut-off value of erythrocyte (RBC) 18:2 ω 6, by using the RBC 20:3 ω 9/20:4 ω 6 ratio as a functional marker of EFA deficiency. Fatty acid compositions were determined in RBC from 116 Pakistani children (median age 15 months; range 2-60), 31 well nourished breastfed Palestinian children (3 months; 1-6), 33 apparently healthy Dutch children (42 months) and 69 apparently healthy Dutch adults (37 years; 22-61). Sixty-seven Pakistani children were breastfed (19 well nourished; 48 malnourished), whereas 46 were non-breastfed



(6 well nourished; 40 malnourished). The RBC 20:3w9/20:4w6 ratio of Dutch and Palestinian subjects decreased until an age of about 3 months, reflecting a gradual disappearance of the high intrauterine 20:3w9 levels. The Figure shows the relation

between RBC 18:2w6 and the 10log RBC 20:3w9/20:4w6 ratio for all subjects aged >3 months (n=231), as fitted into a polynomial function. It indicates an initial steep decrease of the RBC 20:3w9/20:4w6 ratio with increasing RBC 18:2w6, followed by a gradual decrease from about 8.0 mol/100 mol (at RBC 20:3w9/20:4w6 ratio of 0.02 mol/mol). The use of this cut-off value implied that the number of subjects aged >3 months with RBC 18:2w6 contents below 8.0 mol/100 mol amounted to 3% (Dutch adults), 3% (Dutch children), 13% (Palestinian children) and 40% (Pakistani children). We conclude that a RBC 18:2w6 cut-off value of 8.0 mol/100 mol can be used to establish a subclinical EFA deficiency. This value is in excellent agreement with a p97.5 for apparently healthy Dutch adults and 3.5 years old children.

Enzymen / Eiwitten

008. Albumine bepaling in plasma: vergelijking BCP-, BCG- en immunologische methode bij volwassen (niet)-hemodialyse patiënten

J.S. KAMPHUIS, H.J.M. SALDEN en F.M.J. ZUIJDERHOUDT
Klinisch Chemisch Laboratorium, Deventer Ziekenhuis, Deventer

Voor de bepaling van albumine wordt veelal gebruik gemaakt van één van de volgende methoden: broomcresolpurper (BCP), broomcresolgroen (BCG) of de immunologische methode. Uit literatuuronderzoek blijkt dat de BCG-methode een hogere albumineconcentratie geeft dan de BCP methode (aspecifieke binding andere plasmaeiwitten aan BCG) en in een groep van pediatrische hemodialyse-patiënten de BCP-methode lagere albumineconcentraties geeft dan de immunologische referentiemethode (EIA).

Het doel van dit onderzoek was na te gaan hoe de BCP- en BCG-methode zich verhouden tot de immunologische methode (onze referentiemethode) in een groep van volwassen hemodialyse-patiënten (n=27) en niet-hemodialyse-patiënten (n=15). De BCG-methode is gekalibreerd (CFAS) volgens de voorschriften van Roche, i.t.t. de BCP-methode (geen CFAS-waarde Roche) die door ons is geijkt op de immunologische methode, waarbij het gemiddelde van de SKZL immunochemie enquête als 'juist' wordt gehanteerd.

De discrepantie tussen de BCP-en de immunologische methode bij pediatrische hemodialyse-patiënten wordt door ons niet bevestigd, althans voor volwassen hemodialyse patiënten. De BCP-methode levert nagenoeg identieke waarden op als de immunologische methode.

De BCG-methode wijkt zowel voor en nog sterker na dialyse af van de immunologische methode. De BCG-methode moet dus ook geijkt worden op dezelfde referentiemethode, maar blijft na dialyse niet voldoen.

Resultaat albumine(g/l) voor en na hemodialyse en voor niet-hemodialyse-patiënten

	Voor dialyse		
	Ref. meth.	BCP	BCG
Gemidd.	35,69	34,90	39,08
Sd	4,45	3,76	3,81
Correlatie*	0,92	0,96	
Snijpunt Y-as	3,79	7,39	
	Na dialyse		
	Ref. meth.	BCP	BCG
Gemidd.	40,51	40,25	43,43
Sd	6,23	5,93	5,19
Correlatie*	0,98	0,98	
Snijpunt Y-as	2,75	11,98	
	Niet-hemodialyse-patiënten		
	Ref. meth.	BCP	BCG
Gemidd.	25,31	26,29	30,44
Sd	8,86	8,95	7,34
Correlatie*	1,00	0,98	
Snijpunt Y-as	0,57	9,55	

* correlatie t.o.v. immunologische ref. methode

009. Microalbuminurie: screenen met albumine concentratie of albumine-kreatinine ratio?

A. J. BAKKER, G. A. van den BERG en H. STORM
Stichting Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden

Inleiding: Voor de screening op microalbuminurie wordt gebruik gemaakt van de albumine concentratie (ALB) dan wel de albumine-kreatinine ratio (ACR). Sensitiviteit en specificiteit van beide screeningsmethoden blijken elkaar in de meeste publicaties te overlappen door het beperkte aantal patiënten dat in dergelijke onderzoeken is gebruikt. Doel van dit onderzoek was om met een uitgebreidere patiëntengroep een meer betrouwbare analyse uit te voeren. Tevens is de geslachtsafhankelijkheid van de discriminatiegrenzen onderzocht.

Methoden: Gedurende 2½ jaar werd van alle patiënten, waarvan getimede nachtelijke urine werd aangeboden voor onderzoek op microalbuminurie, naast de albumine excretie snelheid (AER), de ALB en de ACR bepaald. Albumine werd

gemeten middels een turbidimetrische procedure en kreatinine middels een kinetische Jaffé procedure. De vergelijking van beide screeningsmethoden met de AER werd verricht met regressieanalyse volgens Passing en Bablok en met ROC-curve analyse.

Resultaten: Van 2394 patiëntenresultaten (1171 mannen en 1223 vrouwen), die geschikt waren voor evaluatie, vertoonde 63,4% een normale AER. Bij de regressieanalyse bleek de ACR beter met de AER te correleren dan de ALB. Door mannen en vrouwen afzonderlijk te evalueren werd de correlatie van de ACR met de AER verder verbeterd. ROC-curve analyse (referentieprocedure: AER) liet zien dat voor ALB er geen geslachtsafhankelijke discriminatiegrens nodig is. Met

een discriminatiegrens van 15 mg/l voor de ALB is de sensitiviteit 89% en de specificiteit 90% voor vrouwen en 90% resp. 89% voor mannen. Voor de ACR geldt bij een discriminatiegrens van 2,5 g/mol voor vrouwen een sensitiviteit van 94% en specificiteit van 92%. Bij mannen is de sensitiviteit 94% en

de specificiteit 93% bij een discriminatiegrens van 1,8 g/mol. *Conclusie:* ROC-curve analyse geeft aan dat de ACR beter presteert als screening voor microalbuminurie dan de ALB. Daarbij is het echter nodig voor mannen en vrouwen verschillende discriminatiegrenzen te hanteren.

010. Microalbuminurie: leeftijdsafhankelijkheid van de albumine-kreatinine ratio

A. J. BAKKER, G. A. van den BERG en H. STORM
Stichting Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden

Inleiding: Bij de screening op microalbuminurie wordt veelvuldig gebruik gemaakt van de albumine-kreatinine ratio (ACR). Omdat de spiermassa en ten gevolge daarvan de kreatinine uitscheiding afneemt met de leeftijd is onderzocht of de discriminatiegrens van de ACR leeftijdsafhankelijkheid vertoont.

Methoden: Gedurende 2½ jaar werd van alle patiënten, waarvan getimede nachtelijke urine werd aangeboden voor onderzoek op microalbuminurie met de albumine excretie snelheid (AER), tevens de ACR bepaald. Albumine werd gemeten middels een turbidimetrische procedure en kreatinine middels een

kinetische Jaffé procedure. De leeftijdsafhankelijkheid, waarbij de patiënten per decade werden gegroepeerd, werd onderzocht middels ROC-curve analyse, waarbij de AER als referentie procedure werd gebruikt.

Resultaten: De resultaten van 2394 patiëntenmonsters (1171 mannen en 1223 vrouwen), die geschikt waren voor evaluatie, staan in onderstaande tabel vermeld.

Conclusie: ROC-curve analyse geeft aan dat voor de beoordeling van de albumine-kreatinine ratio een leeftijdsafhankelijke discriminatiegrens nodig is.

Leeftijd	Patiënten Totaal / Pos. (%)	Albumine-kreatinine ratio			Albumine concentratie		
		Grens (g/mol)	Specificiteit (range) (%)	Sensitiviteit (range) (%)	Grens (mg/l)	Specificiteit (range) (%)	Sensitiviteit. (range) (%)
<i>Mannen</i>							
<50	410 / 94 (22,9)	1,7	95,9 (94-98)	94,7 (88-98)	16	88,6 (85-92)	89,4 (83-96)
50-60	254 / 86 (33,8)	1,7	92,9 (89-97)	90,7 (85-97)	13	86,9 (82-92)	88,4 (82-95)
60-70	306 / 146 (47,7)	2,0	94,4 (91-98)	92,5 (88-97)	15	89,4 (85-94)	91,8 (87-96)
>70	201 / 103 (51,2)	2,4	96,9 (91-99)	96,1 (90-99)	16	91,8 (86-97)	94,2 (90-99)
<i>Vrouwen</i>							
<50	351 / 61 (17,3)	1,9	91,4 (88-95)	93,4 (84-98)	15	85,5 (82-90)	86,9 (78-95)
50-60	234 / 57 (24,3)	2,2	94,9 (92-98)	96,5 (88-100)	15	94,4 (91-98)	93,0 (83-98)
60-70	337 / 110 (32,6)	2,9	92,1 (89-96)	92,7 (88-98)	14	90,7 (87-95)	91,8 (87-97)
>70	301 / 114 (37,9)	3,0	92,5 (89-96)	93,9 (90-98)	14	89,8 (86-94)	90,4 (85-96)

011. Immunoblot analysis of occupational allergens in horticulture

A.W. van TOORENENBERGEN¹, J. WAANDERS¹, R. GERTH VAN WIJK² en A.M. VERMEULEN¹
Afdeling Klinische Chemie¹, Afdeling Allergologie², Academisch Ziekenhuis Rotterdam

In florists and greenhouse workers various flowers may cause occupational airway disease. With sera from 9 of such patients, the pattern of IgE-binding to SDS-PAGE-separated extracts of pollen from Chrysanthemum, Freesia and Gerbera flowers was investigated by immunoblotting. 6 patients showed a closely related pattern of IgE-binding to Chrysanthemum: major IgE-binding structures were seen with a MW of 29, 43 and 67 kD respectively. 5 patients with IgE against

Freesia pollen showed IgE binding to two bands with a MW around 14 kD. Another patient gave no IgE binding to this 14 kD proteins, but showed strong IgE binding to at least 4 bands in the 30 - 70 kD range. All 9 sera showed strong IgE-binding to blotted extracts of Gerbera pollen. 6 sera displayed strong IgE binding to a 16 kD band in Gerbera pollen. 3 other sera only showed major IgE binding to >30 kD bands.

012. Wat schuilt achter een verhoogde transferrineverzadiging ?

F.L.A. WILLEKENS¹, E.M.G. JACOBS² en R.A. de VRIES²
Ziekenhuis Rijnstate, Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Afdeling Inwendige Geneeskunde², Arnhem

Hereditaire hemochromatose (HH) is een veel voorkomende, erfelijke afwijking (autosomaal, recessief). De verantwoordelijke mutatie veroorzaakt een algemene ijzerstapeling, die in vele orgaansystemen kan leiden tot onomkeerbare schade. Vroege diagnose is daarom belangrijk.

Een verhoogde transferrineverzadiging (Tr%) is een geaccepteerde screeningsparameter. Besliswaarden: > 50% voor vrouwen en > 60 % voor mannen.

In deze studie is retrospectief nagegaan hoeveel HH-patiënten voorkomen in een groep patiënten met een verhoogde Tr% en welke andere ziekten worden gevonden.

De gegevens van alle patiënten (n=91), bij wie in de periode van januari 1995 tot september 1998 een verhoogde Tr% is gevonden, zijn verzameld en nagekeken op diagnose, behandeling en uitslagen van andere laboratoriummetingen.

Onder de patiënten bevinden zich alle tien bekende patiënten met HH (homozygote mutatie).

De overige 81 patiënten zijn te verdelen over 5 ziektecategorieën: gebruik van ijzermedicatie i.v.m. ijzergetekort; hematologische ziekten; leverziekten; chronische ontstekings- of infectieziekten; diversen.

Niet alleen in de HH-groep, maar ook in enkele andere groepen

variëren de ferritineconcentraties van normaal tot zeer hoog. De TIJBC is voor HH normaal; een hoge TIJBC wordt gevonden bij degenen die ijzermedicatie gebruiken en een laag tot laag-normaal TIJBC wordt gevonden bij leverziekten. Voor HH is het Hb normaal. Bij hematologische ziekten wordt vaak een laag Hb gevonden en voor de gebruikers van ijzermedicatie een laag tot laag-normaal Hb.

013. Identificatie van antinucleaire antistoffen: overgang naar nieuwe detectiemethoden voor vervolgonderzoek na screening op Hep-2000 cellen

J. KOERTS, E.G.M. CRISTEN, G. van der SLUIJS VEER
Afdeling Laboratorium Medisch Spectrum Twente, Enschede

Tot voor kort werd in het Medisch Spectrum Twente bij de aanvraag Anti Nucleaire Antistoffen (ANA) eerst gescreend met de indirecte immunofluorescentietechniek op Hep-2000 cellen. Indien een positief beeld werd gezien dan vond identificatie van de antistoffen plaats met zowel een Immunoblot (Gull) als Ouchterlony (BMD) methode. Echter, de Immunoblot miste vaak antilichamen (b.v. RNP en SSA) en gaf veel UBPs (Unidentified Blot Profiles) te zien, en bij de Ouchterlony waren de resultaten moeilijk te interpreteren en slecht reproduceerbaar.

Gezocht werd naar een alternatief voor de Immunoblot en Ouchterlony methode. De keuze viel op de Inno-Lia van Inno-genetics, waarbij 10 verschillende autoantigenen gecoat zijn op een membraan. Binding van antistoffen wordt zichtbaar gemaakt door incubatie met enzymgelabelde anti-humaan IgG en een chromogeen substraat. Daar deze test kostbaar is werd een tweede screeningstest ingevoerd, de Combi-antigeen ELISA van Pharmacia & Upjohn. De Inno-Lia wordt slechts

In de groep diversen bevinden zich wellicht 2 patiënten met HH.

In deze studie vertoonden alle HH-patiënten (11%) een verhoogd Tr%; 89% van de patiënten blijkt een andere ziekte te hebben. Als anamnese en klinisch beeld niet voldoende zijn voor verdere selectie, kunnen Hb en TIJBC in tegenstelling tot ferritine hiervoor behulpzaam zijn.

uitgevoerd indien na een positieve uitslag met de Hep-2000 cellen ook de ELISA positief is.

Uit een pilot onderzoek waarbij monsters zowel met de Hep-2000 cellen, Combi-antigeen ELISA als de Inno-Lia getest zijn blijkt dat als gevolg van invoering van de Combi-antigeen ELISA er helaas monsters met ANA gemist worden. Echter, door alleen de Inno-Lia uit te voeren na een positieve Hep-2000 screening zouden de kosten van de ANA-typering ten opzichte van de oude werkwijze toegenomen zijn met circa 40%. Door invoering van de Combi-antigeen ELISA kan deze stijging beperkt blijven tot circa 10%.

Resultaten van monsters die met zowel de oude als nieuwe detectiemethoden zijn getest laten zien dat met de Inno-Lia meer monsters met SSB antistoffen worden gevonden en dat deze test gevoeliger is voor SSA en RNP antistoffen dan de oude Immunoblot. Interpretatie van de resultaten van de Combi-antigeen ELISA en Inno-Lia zijn eenvoudiger en eenduidiger dan met de oude Immunoblot en Ouchterlony methoden.

014. Serum beta-glucuronidase (BGD) activity in ex-coalminers

N.A.M COBBEN¹, M. DRENT¹, M.P. van DIEIJEN-VISSER², E.F.M. WOUTERS¹ and R.F. HENDERSON³
Department of Pulmonology¹, Department of Clinical Chemistry², Academic Hospital Maastricht; Inhalation Toxicology Research Institute, Lovelace Biomedical and Environmental Research Institute³, Albuquerque, New Mexico, USA.

Background: Previously, we found that coal-dust exposure causes an increase in the total serum lactate dehydrogenase (LDH) activity and changes in the LDH-isoenzyme pattern (1). Besides LDH, other indicators of cell damage or death, or increased fagocytosis could be investigated.

The aim of this study was to investigate whether BGD, a membrane-bound lysosomal enzyme, is a marker of exposure to coal-dust. BGD release occurs from inflammatory, phagocytic cells such as macrophages, polymorphonuclear neutrophils, as a result of increased cell membrane permeability. A possible relation between BGD and LDH was studied.

Methods: Ex-coalminers (n=201) - with a history of coal-dust exposure, more than 20 years ago - were admitted to our hospital for a medical check-up and were included in the study. Group I consisted of ex-coalminers with a normal serum LDH activity (n=42; LDH \leq 450 U/l), group II consisted of cases with an elevated serum LDH activity (n=159; LDH $>$ 450 U/l). As controls a group of 48 healthy subjects, all men (age 58 ± 13 years) - without relevant medical history - was used.

Results: Serum BGD in ex-coalminers (1.10 ± 0.79 U/l) was

higher than in the control group (0.39 ± 0.50 U/l, $p < 0.0001$), both in group I and II. No correlation between BGD and LDH was found. Furthermore, a negative correlation between BGD and resting pO_2 was demonstrated ($r = -0.49$, $p < 0.008$).

However, no such correlation was found with LDH, nor with other pulmonary function tests.

Conclusion: The results indicate that serum BGD is increased in ex-coalminers, even in those with a normal LDH. In contrast to LDH, BGD was related to hypoxemia, suggesting different pathophysiological release mechanisms, which needs further investigation.

Next to LDH, BGD might be a powerful biomarker in monitoring pulmonary inflammation caused by coal-dust exposure.

Literature

1. Cobben NAM, Drent M, Schols AMWJ, Lamers RJS, Wouters EFM and van Dieijen-Visser MP. Serum lactate dehydrogenase and its isoenzyme pattern in ex-coalminers. *Respiratory Medicine* 1997; 91: 616-623.

015. Invloed van gebruikte methodologie bij de colorimetrische bepaling van albumine

M.G.L.M. ELISEN, R. IJSELSTIJN, C.M. POORT-BOELEEE, L. BUIJS-CUPEDO, J.W. JANSSEN
Klinisch Chemisch Haematologisch Laboratorium, St Franciscus Gasthuis Rotterdam

De meest gebruikte methoden voor het bepalen van albumine in plasma in een routine klinisch-chemisch laboratorium zijn de broomkresolgroen (BCG) en de broomkresolpaars methode (BCP). Bij patiënten waarbij zowel de albumineconcentratie en de ratio albumine:globuline laag is kan de bepaling van al-

bumine middels de BCG methode leiden tot vals verhoogde albuminewaarden. De BCP methode geeft bij lage albuminewaarden vals verlaagde waarden met name bij haemodialysepatiënten.

De juistheid van beide colorimetrische bepalingen is verder

bestudeerd en vergeleken met een immunochemische bepalingwijze waarbij de uitslagen van gezonde donoren zijn vergeleken met die van patiënten afkomstig van verschillende afdelingen (haemodialyse, intensive care, inwendige geneeskunde (poli), en chirurgie (poli)). De immunochemische bepaling van albumine is gebruikt als zg. "gouden standaard". Van de onderzochte methodes blijkt de BCG methode blijkt voor alle patiënten consequent een hogere waarde voor albumine te geven vergeleken met de BCP en de immunochemische bepalingmethode. Dit verschil in albumineuitslag tussen de BCG en BCP methode is niet voor alle patiëntengroepen constant. Vergeleken met de immunochemische en de BCP methode komt de relatieve ongevoeligheid van de BCG methode met name tot uiting bij de afdelingsgemiddelden van intensive care. Gepaarde analyse van de albuminewaarden toont aan dat de BCG methode een overschatting van het IC afdelingsgemiddelde geeft van 5 g/l ten opzichte van de immunochemi-

sche en de BCP methode. Ten aanzien van gebruik van de BCP methode is een valse onderschatting van de albuminewaarde bij haemodialyse patiënten aantoonbaar. Gepaarde analyse van de albuminewaarden van de verschillende methodieken laat zien dat de BCP methode een onderschatting van het patiëntgemiddelde van de afdeling haemodialyse geeft van 1,5 g/l. De keuze voor een specifieke methode heeft geen significante invloed op het onderling vergelijken van albuminewaarden voor de gemiddelden van de poli chirurgie, de interne poli en de donorgroep.

Resumerend: Voor de afdelingen haemodialyse en IC heeft de keuze van een colorimetrische bepalingstechniek voor albumine effect op de uitslag van de test. Gebaseerd op de grootte van afwijking van de albumine waarde ten opzichte van de immunologische bepalingstechniek voor verschillende patiëntengroepen is de BCP methode te prefereren boven de BCG methode.

016. Infusie van gelofusine verlaagt de tubulaire reabsorptie van laagmoleculaire eiwitten

I.S. KLASSEN¹, M.H. de KEIJZER¹, M.A.G.J. ten DAM², A.J.W. BRANTEN² en J.F.M. WETZELS²
Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Afdeling Interne Geneeskunde², AZN-St.Radboud, Nijmegen

Plasmavervangingsmiddelen worden veelvuldig gebruikt om het circulerend volume van de patiënt te handhaven. Wij rapporteerden al eerder dat de van gelatine afgeleide middelen, afhankelijk van de gebruikte eiwitbepaling, meetbaar kunnen zijn in de urine. In hoeverre infusie van een dergelijk middel kan leiden tot proteïnurie door serumeiwitten was onbekend. Wij hebben daarom 330 ml gelofusine (40 g/l) geïnfundeed in zes gezonde, mannelijke proefpersonen met een snelheid van 8,5 tot 16,5 ml/min. Om een gelijke volumestatus te behouden

werd gelijktijdig bij deze proefpersonen een zelfde volume bloed afgenomen. De glomerulaire filtratie snelheid (GFR; inuline klaring), effectieve renale plasma flow (ERPF; PAH klaring), filtratie fractie (FF) en fractionele klaring (FC) van IgG, albumine (Alb), α 1-microglobuline (α 1-m) and β 2-microglobuline (β 2-m) werden gemeten één uur voor, tijdens en in het eerste (T1) en tweede uur (T2) na gelofusine infusie. De resultaten (gemiddelde \pm sd) staan hieronder vermeld:

	Voor	Tijdens	T1	T2
GFR (ml/min)	127 \pm 16	128 \pm 16	121 \pm 11	113 \pm 11*
ERPF(ml/min)	716 \pm 185	830 \pm 251*	750 \pm 202	748 \pm 266
FF (%)	19 \pm 4	16 \pm 4*	17 \pm 4*	17 \pm 5*
FC IgG (% x 10 ⁻⁶)	268 \pm 205	705 \pm 418**	767 \pm 429**	653 \pm 356*
FC Alb (% x 10 ⁻⁶)	99 \pm 30	137 \pm 48*	116 \pm 36	94 \pm 19
FC α 1-m (%)	0,2 \pm 0,2	1,0 \pm 0,4**	1,2 \pm 0,5*	0,8 \pm 0,4**
FC β 2-m (%)	0,04 \pm 0,02	18 \pm 4**	22 \pm 6**	13 \pm 5**

*: p<0,05; **: p<0,01

Infusie van gelofusine blijkt de fractionele klaring van eiwitten te verhogen, vooral van de laag moleculaire eiwitten. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door competitieve inhibitie van de tubulaire eiwit absorptie. Met dit effect moet rekening

gehouden worden bij patiënten die gelofusine toegediend gekregen hebben. Gelofusine is mogelijk ook van waarde bij de bestudering van tubulaire eiwitreabsorptie.

Elektrolyten

017. Hypercalcemia due to vitamin A toxicity in a patient with renal failure

C. BEIJER¹ and E.V. PLANKEN²
Department of Clinical Chemistry¹, Department of Internal Medicine², Het Diaconessenhuis, Leiden, The Netherlands

Hypercalcemia has many causes. The most frequent causes are malignancy and primary hyperparathyroidism. Here we present a case of hypercalcemia caused by vitamin A toxicity due to a longstanding chronic ingestion.

A 86-year old woman was hospitalised because of hypercalcemia and renal failure. She complained of thirst, weight loss and nycturia. The patient used no medication except for Davitamon tablets containing 600 IE retinol palmitate and 200 IE cholecalciferol. The patient was requested to stop taking these tablets. Laboratory results: calcium, 3.34 mmol/l; creatinine, 333 μ mol/l. The patient was rehydrated and treated with APD. No cause for her condition e.g. no malignancy, hyperparathyroidism, thyrotoxicosis or sarcoidosis could be established.

This patient was hospitalised two more times within six months because of relapsing hypercalcemia. She complained of back pain and pain in her right hip. Radiological evaluation revealed arthrosis. Additional laboratory results during these hospitalisation periods: 25(OH) and 1,25 di(OH)vitamin D, normal; vitamin A, 3.2 μ mol/l (reference interval:1.2-2.7 μ mol/l). Laboratory results 1 year after her last hospitalisation period: calcium, 2.44 mmol/l; creatinine, 202 μ mol/l; vitamin A, 2.8 μ mol/l.

We confirmed the hypervitaminosis A in this patient resulting in hypercalcemia. As also observed in this patient chronic hypervitaminosis A may present with only minimal elevated concentrations in the patient's serum which may persist for up

to 12 months. The concomitant intake of cholecalciferol and presence of renal failure in this elderly patient apparently dramatically increases the risk of retinol toxicity with even modest dose supplementation. Her clinical symptoms e.g.

anorexia, weight loss and bone pain although non-specific, are characteristically seen in the elderly patient with vitamin A toxicity. Two years after her first hospitalisation period this patient was free of symptoms related to vitamin A toxicity.

Endocrinologie

018. Dehydroepiandrosteron sulphate (DHEA-S) in schistosomiasis

N. de JONGE¹ and L. van LIESHOUT²

Department of Clinical Chemistry, Leyenburg Hospital, the Hague¹, Department of Parasitology, Leiden University Medical Center, Leiden²

Schistosomiasis is a parasitic disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma*. Infection occurs in contact with surface water containing the infective larvae. Approximately 500 million people in the tropics are afflicted by this disease. In endemic areas, intensity of infection shows a typical skewed pattern in relation to age; rising during childhood until a peak at adolescence, and declining when age further increases. This pattern could not be completely explained by age related differences in water contact behaviour. Whether the reduced susceptibility to *Schistosoma* infection in adults is due to slowly acquired specific immunity or to other factors which are intrinsically related to age, is currently debated. The latter explanation is supported by the recent finding that in communities where all ages have the same (short) experience to *Schistosoma* infection, adults still show relatively lower levels of infection. Recently, it has been suggested this innate shift in susceptibility during adolescence to be dependent on sexual maturity. An inverse relationship was described between the concentration of dehydroepiandrosteron sulphate (DHEAS) and parasite burden, as expressed by schistosome egg output in the patient's faeces. DHEAS is a steroid androgen produced by the cortical adrenal

gland. Its measurement may be of value in the assessment of delayed puberty and adrenarche, as well as in the evaluation of hirsutism.

To study the relationship between serum concentration of DHEAS and schistosome (re-)infection status, we measured this hormone in 130 serum samples of a study population (age 5-21 years) from a recently established, highly endemic, focus in Senegal. Hormone status were compared with initial schistosoma infection level and with infection status one year after treatment with the schistosomicide praziquantel. All subjects, were permanently exposed to the risk of infection. DHEAS was measured by a solid phase chemiluminescent enzyme immunoassay.

The results showed an increase of DHEAS with age and an inverse relation with the number of parasite eggs counted in faeces. However, after allowing for age, no association was found between levels of DHEAS and intensity of infection. These findings suggest the typical switch in susceptibility to *Schistosoma* infection during puberty not to be related to sexual maturation. Other factors intrinsically related to age may still contribute to infection patterns generally observed.

019. Het voorkomen van interferentie door antistoffen bij schildklieronderzoek

N. OSMANOWIC en W.P. OOSTERHUIS

Ziekenhuis de Heel, Zaandam

Het optreden van specifieke reacties bij de bepaling van thyreoïd stimulerend hormoon (TSH) en vrij thyroxine (fT4) was reden om storende factoren te onderzoeken. Drie oorzaken van interferentie zijn 1) autoantilichamen gericht tegen schildklierhormonen, 2) heterofiele antilichamen gericht tegen dierlijke immunoglobulinen, 3) reuma factor (RF) gericht tegen het Fc fragment van humaan IgG. Autoantilichamen kunnen een interferentie veroorzaken die zich beperkt tot een specifieke test, bijvoorbeeld anti-TSH antistoffen die deze bepaling storen. Heterofiele antilichamen kunnen verantwoordelijk zijn voor storing van een test waarbij de betreffende muizenmonoclonalen zijn toegepast. De bekendste heterofiele antilichamen zijn humane anti-muis antilichamen (HAMA). Meestal worden interferenties veroorzaakt door aggregatie van immunoglobulinen, zoals bij RF, of door verbinding van capture antilichamen met detectie-antilichamen.

Doel van het onderzoek is het vaststellen van de prevalentie van deze antilichamen in de routine van een gewoon ziekenhuislaboratorium. De methoden voor het identificeren van sto-

rende antilichamen en het tegengaan van deze interferenties werden geoptimaliseerd.

fT4 en TSH werden bepaald met de volgende apparatuur: ACCESS (Beckman), IMMULITE (DPC) en IMX (Abbott). De dialysemethode was de referentiemethode voor fT4. Bij het onderzoek naar interfererende antistoffen werden fT4 en TSH bepaald na verdunning met PEG en muizenserum, elk op de 3 apparaten.

Bij 100 patiënten waarbij fT4 en TSH zijn aangevraagd werden deze bepalingen volgens de bovenstaande methoden bepaald. Het onderzoek naar interferenties werd in de volgende gevallen ingezet: waar een discrepantie van de concentratie fT4 en TSH werd gevonden (TSH normaal en fT4 verlaagd of verhoogd, TSH verhoogd en fT4 verhoogd of normaal, TSH verlaagd en fT4 verlaagd of normaal). Daarnaast werden monsters waarbij de overeenkomst tussen de verschillende apparaten laag was ook gecontroleerd op storende interferenties. In totaal werd bij 43/100 monsters het onderzoek naar interferenties uitgevoerd, waarvan de resultaten worden besproken.

Tumordiagnostiek / Maligniteiten

020. Troponin I, troponin T, and CKMB-mass in patients with the carcinoid syndrome

J.C.J.M. SWAANENBURG, W.G. MEIJER, I.P. KEMA, P.H.B. WILLEMSE, D-J. van VELDHUISEN and E.G.E. de VRIES

University Hospital Groningen

Introduction: Patients with carcinoid syndrome are at risk for the development of carcinoid heart disease (CaHD). In CaHD

carcinoid plaques lead to tricuspid valve regurgitation and subsequently to right heart failure.

Conventionally CKMB-mass is used as measure for myocardial tissue damage. Recently, the new markers troponin I (cTnI) and troponin T (cTnT) have been introduced as more specific and more sensitive markers for myocardial tissue damage.

We investigated cTnI, cTnT and CKMB-mass in the serum of twenty histologically proven carcinoid patients with the related carcinoid syndrome.

Patients and methods: Twenty carcinoid patients (9 male, 11 female, median age 57 years, range 43-74 years) with a median duration of symptoms of 72 months (range 9-154 months) were included in this study. Four of these patients showed echocardiographic evidence of CaHD.

CKMB-mass and cTnT measurements were performed on an

Elecsys 2010 analyser (Roche, Boehringer Mannheim, Almere, The Netherlands). An AxSYM analyser (Abbott, Amstelveen, The Netherlands) was used for the cTnI measurements.

Results: For all twenty patients cTnI as well as cTnT levels were below the detection limits of the analysers. CKMB-mass ranged from 0.3 until 2.4 ng/ml (reference range 0-5.0 ng/ml). The four patients with CaHD showed a range from 0.7 until 1.3 ng/ml.

Conclusion: The results of the cTnI, cTnT and CKMB-mass measurements show no evidence of myocardial tissue damage in the twenty carcinoid patients. Furthermore, no difference was observed between the patients with or without echocardiographic signs of CaHD.

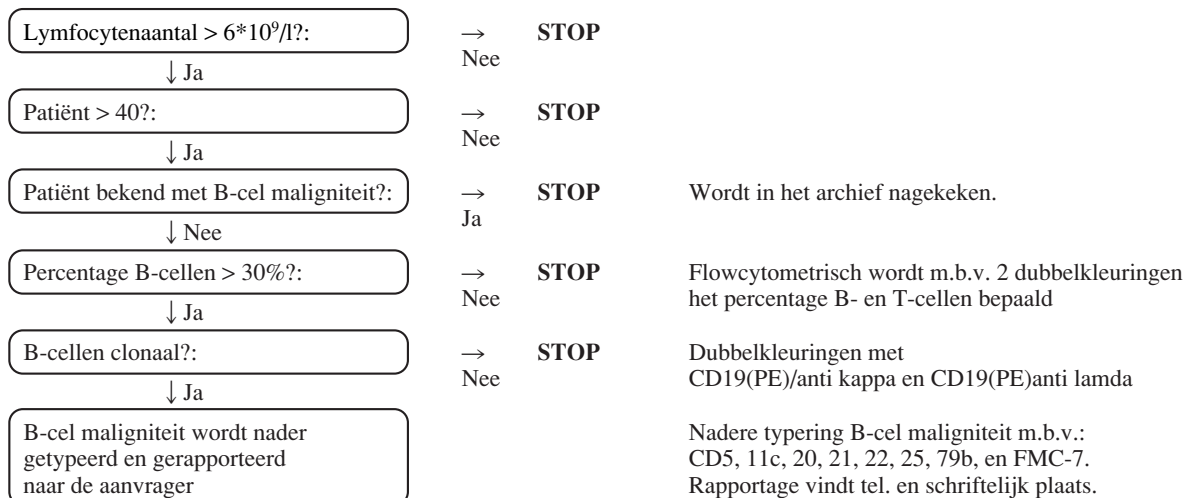
021. Screening op B-cel maligniteiten bij patiënten > 40 jaar

H.H.M. EIDHOF, H.G. EERTMAN, S.C. ENDENBURG, J.J. VERHAEGH en A. MARTENS

Klinisch Laboratorium, Twenteborg Ziekenhuis, Almelo

Op het klinisch laboratorium van het Twenteborg Ziekenhuis worden per week ongeveer 1200 analyses verricht op de H2/H3 bloedcel analysers. Indien er afwijkingen worden gevonden kan dit aanleiding zijn tot vervolgonderzoek m.b.v. microscopie en/of flowcytometrie. Hierbij is ons opgevallen

dat er, met name bij oudere patiënten, bij een lymfocytose regelmatig een B-cel maligniteit werd gevonden. Om dit nader te onderzoeken is de onderstaande werkwijze (flowschema) gevolgd:



Van de inmiddels 13.500 geanalyseerde monsters (onderzoek van bijna drie maanden) bleken 15 monsters te voldoen aan de criteria: patiënt > 40 jr en lymfocytenconcentratie > 6 * 10⁹/l. In 8 monsters kon een B-cel maligniteit worden aangetoond (B-CLL).

Conclusie: in ruim 50% van patiënten ouder dan 40 jaar die voor een bloedonderzoek werden ingestuurd blijkt een lymfocytose (lymfocytenconc. > 6 * 10⁹/l) veroorzaakt te worden door een B-cel maligniteit.

022. Automated profiling of tryptophan related indoles in plasma

I.P. KEMA¹, G. MEIBORG¹, O. HALMINGH², J. A. OOMS² and F.A.J. MUSKIET¹

Pathology and Laboratory Medicine, University Hospital Groningen¹ and Spark Holland B.V. Emmen²

Measurements of serotonin (5-HT) and its metabolites in body fluids and tissues are used for the clinical chemical diagnosis and follow-up of patients with carcinoid tumours. Of these, the assay of 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in urine is the most commonly employed. Assessment of urinary and platelet 5-HT and urinary 5-hydroxytryptophan (5-HTP) are useful in the diagnosis of specific forms of carcinoid tumours. Recently, we showed that platelet 5-HT is the most sensitive parameter for the diagnosis and follow-up of carcinoids that are characterised by production of only small amounts of 5-HT. In contrast to urinary 5-HIAA, platelet 5-HT is not influenced by short-term dietary intake of 5-HT containing foodstuff. Profiling of the tryptophan (TRP) related indoles TRP, 5-HTP, 5-HT and 5-HIAA in body fluids and tissues of patients with

carcinoid tumours can provide additional information on place of origination and presence of metastases. Using hyphenated solid phase extraction (SPE) (Prospect) and gradient HPLC with fluorometric detection (HPLC-FLU), we developed a fully automated indole profiling method that enables the simultaneous assay of TRP, 5-HTP, 5-HT and 5-HIAA in plasma. Since TRP related indoles differ considerably with respect to functional groups a non-selective strong hydrophobic sorbent was applied to enable their simultaneous extraction from biological matrices. Validation results show that non specific SPE combined with highly selective HPLC-FLU analysis enables reliable quantitative profiling of TRP related indoles in platelet rich plasma.

023. An in vitro model for the protective effect of bismuth against cisplatin induced nephrotoxicity

B.T. LEUSSINK, E. de HEER, G.B. van der VOET, A. SLIKKERVEER, F.A. de WOLFF and J.A. BRUIJN
Toxicology Laboratory and Department of Pathology, University Medical Center, Leiden

Renal impairment due to tubular damage, is an important, dose-limiting side effect of the cytostatic agent cisplatin. Animal and clinical studies provided evidence that bismuth salts are able to lower cisplatin nephrotoxicity without compromising its anti-tumour activity. We developed an in vitro model to elucidate the mechanism of this protective effect using NRK-52E cells, a rat kidney cell line of tubular origin, grown to near-confluence on glass slides. The cells were pre-treated with 100 μM BiCl_3 and 400 μM citrate in serum free medium for 12 to 48 hours. Subsequently, the cells were incubated in serum free medium for 6 to 24 hours before being treated with 50 μM cisplatin for 41 hours. Normal, necrotic

and apoptotic cells could be discerned after staining with Hoechst 33258, a DNA-specific dye. Cisplatin treatment caused part of the cells to become apoptotic as detected by the fragmentation of the nuclei. Bismuth pre-treatment significantly lowered the percentage of apoptotic cells when compared to controls which had been pre-treated with citrate only. The largest reduction found was from 77% \pm 15 (SD) to 41% \pm 9 apoptotic cells. We conclude that this in vitro model can serve to investigate the mechanism of the protective effect of bismuth against cisplatin induced nephrotoxicity in order to prevent or reduce this side effect or enabling the use of higher cisplatin doses.

024. Determination of CA 19-9 and CA 15-3 on Elecsys® 2010 Immunoanalyzers: results of a field study

G.J. van KAMP¹, P. STIEBER², J. van HELDEN³, S. FRIESE⁴, I. DOMKE⁵, H.J. ROTH⁶, F. TROALEN⁷, Ch. WEISBRICH⁸ and P. WOLLENBERG⁹
Acad Hospital VU¹, Amsterdam; Institut für Klinische Chemie², Klinikum Grosshadern, Munich; Labor Dr. Stein³, Monchengladbach; MEDTRAC Laborbetriebsgesellschaft mbH, Poing⁴, D; Roche Diagnostics GmbH⁵, Mannheim; Labor Dr. Limbach und Kollegen⁶, Heidelberg, D; Inst Gustave-Roussy, Villejuif⁷, F; Inst Klin Chem Pathobiochem⁸, Leipzig, D; Labor Dr. Kramer⁹, Geesthacht, D

In the present study the technical performance of the new Elecsys® CA 19-9 and CA 15-3 tumor marker assays was assessed. These assays were developed for use on Elecsys® immunoassay systems (Roche Diagnostics). Nine laboratories participated in the field study. The sandwich-type immunoassays each use a biotinylated capturer (1116-NS-19-9; 115D8) and a ruthenylated tracer antibody (1116-NS-19-9; DF3) and the very sensitive electrochemiluminescence technology for detection. Results are available after 18 minutes. The assays are referenced against the corresponding Enzymun-Test® assays. The measuring range of the new tests extends from the detection limit of <1 U/ml (defined as mean + 2 sd of 21 replicates of the zero calibrator) up to 1000 U/ml for CA 19-9 and 300 U/ml for CA 15-3. For human sera in the normal range (10 - 20 U/ml) between-day CV values (singletons on 11 days) ranged from 2.4 to 3.5 % for CA 19-9 and from 4.6 to 6.0 % for CA 15-3. In the decision range (29 - 58 U/ml) sera gave CVs from 2.6 to 4.6 % and 3.3 to 4.7 % for CA 19-9 and CA 15-3, respectively. In the high pathological range (298 - 965 U/ml for CA 19-9, 143 - 187 U/ml for CA 15-3) CVs from 2.1 to 3.5 % and from 4.8 to 9.4 % were obtained. In an interlaboratory survey four control sera and three human sera were measured in duplicates on five days. Interlaboratory CVs from 4.0 to 7.1 % were found for CA 19-9 (50 replicates in five

labs) and from 4.5 to 8.1 % for CA 15-3 (80 replicates in eight labs). Elecsys® and Enzymun-Test® CA 19-9 test results were compared in four labs, using each 65 to 182 human sera. Passing-Bablok regression analysis revealed slopes from 0.89 to 1.02, with intercepts ranging from 0.2 - 2.9 U/ml and correlation coefficients from 0.93 to 0.96. The comparability with other immunoassay systems (x median all methods) using an identical set of up to 362 samples, gave the following results: y (Elecsys) = 1.01 x - 0.1, r = 0.95; y (ES 700) = 1.05 x - 0.8, r = 0.98; y (AxSYM®) = 0.83 x - 0.7, r = 0.94; y (ACS 180) = 0.63 x + 3.5, r = 0.77. The poor correlation between ACS 180 and the other methods can be explained by the use of different antibodies and technology in this assay. Method comparison studies of Elecsys® CA 15-3 (y) with Enzymun-Test® CA 15-3 (x) were performed in five labs with 98 to 216 human sera. The following results were found: slopes 0.87 - 1.04, intercepts from -3.7 - 5.4 U/ml, and correlation coefficients of 0.95 - 0.99.

The field study shows that precise results are obtained with the new Elecsys® CA 19-9 and CA 15-3 assays, comparing well in different laboratories. Between the new Elecsys® assays and the corresponding Enzymun-Test® assays, a good agreement was found. This demonstrates that both assays are well-suited for routine use on Elecsys® immunoassay systems.

025. Comparison of five tPSA serum assays in the detection of prostate cancer in symptom free men

G.J. van KAMP¹, C. MULDER¹, R. SUBURU², M.D. KOUTSILIERIS², H.A. HAZEWINDUS¹ and J. KIBOURIS³
Dept of Clin Chem¹, Vrije Universiteit, Amsterdam; Dept of Endocrinology², Univ. of Laval, Canada; Bionalytiki³, Athens, Greece

PSA is an established marker for detection and monitoring of prostate cancer. PSA is not a single entity; total PSA assays detect α -1-antichymotrypsin complexed and free PSA and can give different results.

We measured tPSA with five assays (Hybritech R, Abbott IMx, BMD Enzymun, CIS RIA and Seratec EIA) in sera from 694 apparently healthy Greek men (median 62.5, range 39-87 yrs). Regression analysis with Hybritech R as reference method showed relationships with slopes ranging from 0.87 to 1.42.

Men with tPSA \geq 3 $\mu\text{g/l}$ (n=104) were submitted to DRE and TRUS; "TRUS-positive" men (n=41) underwent TRUS-guided biopsy. Prostate cancer was diagnosed in 18 men: one case/2.3

biopsies.

Age-related tPSA values (P95) ranged from 1.8 (BMD, 39-49 yrs) to 8.3 (Seratec, 70-83 yrs). Using these, the number of cases identified was reduced to 12/18 with Seratec, 14/18 with Hybritech and BMD, and 15/18 with CIS and IMx.

Conclusion: tPSA tests give different results, and standardisation is urgently needed; application of age-related cut-offs is misleading, cases remain undiagnosed. In our protocol a favourable cancer case/biopsy rate of 2.3 was reached.

Certified PSA material, in compliance with the European Community Directive on In Vitro Diagnostics, is under development.

026. Telomerase activity in prostate cancer

A. DONKOR, J. DANNEBERG, J. GERRITS and A. MARTENS
Twenteborg Ziekenhuis Almelo

Telomeres are specialized structures at the ends of eukaryotic chromosomes. They consist of hundred to thousands of tandem repeats of the sequence TTAGGG and associated proteins. The telomeres protect the chromosome by preventing recombination between chromosomes, and from functional DNA loss during semi-conservative replication.

Telomerase is an enzyme that adds hexameric TTAGGG nucleotide repeats onto the ends of vertebrate chromosomal DNAs (i.e., telomeres) to compensate for the losses that occur with each round of DNA replication. Somatic cells do not have telomerase activity and stop dividing when the telomeric ends of at least some chromosomes have been shortened to a critical length. It has been suggested that immortalized cells (including most, but probably not all, cancer cells) have the ability to continue to proliferate indefinitely because they express telomerase.

Telomerase activity can be measured in vitro by using a Polymerase Chain Reaction (PCR) based telomerase assay (the

Telomeric Repeat Amplification Protocol; TRAP assay). The PCR products are then analyzed by electrophoresis on a 6% polyacrylamide gel. A non-radioactive procedure using fluorescence labeled primers and an automated DNA sequence (ALFexpress) to detect and quantitate the repeats-products produced by telomerase activity was used during this study.

The aim of the study was to detect telomerase activity in tissue samples (patients suspected of prostate cancer) by the TRAP-assay and to investigate if the findings can be used to offer new diagnostic utility.

Among the 32 prostate cancers, 26 tissues samples (81%) displayed telomerase activity. The relative level of telomerase activity was associated with the pathological differentiation report. High levels of telomerase activity was more frequently in poorly differentiated prostate cancer.

Our results indicate that telomerase activity may be useful as a diagnostic marker to detect the existence of malignant cells in prostate tissue.

Hematologie / Allergie

027. Performance Characteristics of Blast Flagging on the CELL-DYN 4000 Hematology Analyzer

R.M.J. HOEDEMAKERS, J.M.A. PENNINGES and J.J.M.L. HOFFMANN
Department of Clinical Laboratories, Catharina Hospital, Eindhoven, The Netherlands

Detection of blasts in patient blood samples is important for the diagnosis and follow up of hematological malignancies. In this study, we investigated the performance characteristics of blast flagging on the Abbott CELL-DYN 4000 (CD4000) hematology analyzer. The CD4000 generates a flag for the presence of blasts, accompanied by a calculated confidence fraction (CF) ranging from 0.50-0.99. Our special interest was focused on the performance and prognostic value of the blast flag CF.

One hundred patient samples with blast flagging on the CD4000 were examined microscopically for the presence of blasts. A strong correlation was observed between the value of the blast flag CF and the presence of blasts in blood smears. A receiver operating characteristic (ROC) curve clearly demonstrated that combining the blast flag CF with the WBC

count significantly increased the predictive value for the presence of blasts. The calculated area under the curve of all samples with a blasts flag, and of samples with blast flagging and $WBC \geq 4 /nl$, was 0.854 ± 0.056 and 0.958 ± 0.045 , respectively. A model with criteria for blood smear examination following blast flagging was developed, using the blast flag CF and the WBC count. The model was tested and validated in a new set of 100 patient samples. Implementation of the criteria of the model resulted in a reduction of the number of microscopic smear examinations of 36-54%, without losing clinically significant sensitivity.

Our results indicate that the blast flag CF of the CD4000 can be used as a reliable parameter for the prediction of the presence of blasts in samples with normal and increased WBC.

028. Pseudo-reticulocytose door malaria infectie

J. HOFFMANN en J. PENNINGES
Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina-ziekenhuis, Eindhoven

Telling van de concentratie reticulocyten in bloed geschiedt tegenwoordig veelal met geautomatiseerde flowcytometrische methoden. De gebruikte kleurstoffen zijn niet altijd specifiek voor RNA, maar reageren ook met DNA. In de meeste instrumenten zijn voorzieningen getroffen om leukocyten uit te sluiten van de telling van reticulocyten. Voor erythrocyten met DNA-bevattende insluitsels is dit veel moeilijker. Zo worden erythrocyten met lichaampjes van Howell-Jolly vrijwel altijd als reticulocyten geteld. Erythrocyten die geïnfecteerd zijn met malaria parasieten bevatten ook DNA en kunnen derhalve ten onrechte als reticulocyten beschouwd worden, zoals onderstaande casus aantoon.

Een vrouw van 63 jaar oud werd opgenomen wegens progressieve neurologische problemen. Zij bleek een ernstige malaria-infectie te hebben: 9% van haar erythrocyten bevatten *Plasmodium falciparum*. Pas daarna werd duidelijk dat zij enkele weken tevoren Gambia (West Afrika) had bezocht. Zij had geen koorts gehad en had ook bij opname geen koorts. Er werd onmiddellijk behandeling met kinine en wisseltransfusie

ingesteld. Patiënte overleed drie dagen later.

De reticulocyten concentratie, gemeten met behulp van de CellDyn 4000 (Abbott), was bij opname sterk verhoogd (6,6%) en steeg nog tot 18%. De parasitemie-index maakte een vrijwel identiek verloop door. Er bleek een zeer significante correlatie te bestaan tussen de gemeten reticulocyten en de parasitemie-index ($r = 0,944$; $P < 0,0015$; $n = 7$). Uit de aanvullende parameters van de CellDyn 4000 bleek dat de immature reticulocyten fractie (IRF) extreem verhoogd was (0,92); deze waarde is zelfs voor een zeer sterk geactiveerde erythropoiese zeer uitzonderlijk. Onze patiënte had geen reden voor een gestimuleerde aanmaak: haar hemoglobine concentratie bedroeg bij opname 9,4 mmol/l.

Conclusie: er was sprake van een pseudo-reticulocytose doordat de malaria parasieten met de gebruikte kleurstof reageren en door de CellDyn ten onrechte als reticulocyten werden beschouwd. Waarschijnlijk komt dit fenomeen ook bij andere hematologie instrumenten voor; laboratoria dienen rekening te houden met malaria als oorzaak van pseudo-reticulocytose.

029. Automatische detectie van linksverschuiving en jonge granulocyten door de Sysmex SE-9000 hematologie analyzer: waarde van het IMI-kanaal bij de leukocyten differentiatie

J.J.H. HENS en R.J. KRAAIJENHAGEN

Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Eemland, Amersfoort

Wij onderzochten de bruikbaarheid van de automatische melding voor linksverschuiving ('Left-shift?') en aanwezigheid van jonge granulocyten ('Imm. gran?'), zoals gegenereerd door de Sysmex SE-9000 hematologie analyzer tijdens de perifere leukocyten differentiatie. Het Sysmex systeem maakt hiervoor in belangrijke mate gebruik van het zogenaamd IMI-kanaal, waarin door een combinatie van impedantiemethoden in een gelijkstroomveld, radiogolven en verschillende lyseerreagentia differentiatie van jonge granulocyten plaatsvindt. Er wordt een zogenaamde Q-flag gegenereerd wanneer een ingeprogrammeerd algoritme resulteert in een arbitraire score hoger dan 100 (minimum: 0 - maximum: 300). Voor de detectie van jonge granulocyten hebben wij als referentiemethode gebruik gemaakt van de microscopische beoordeling van 100 cellen in een bloeduitstrijkje gekleurd volgens May-Grünwald Giemsa. Linksverschuiving was gedefinieerd als een toename van het aantal staafkernige granulocyten ($\geq 0,6 \times 10^9/l$) en / of de aanwezigheid van metamyelocyten of myelocyten bij microscopi-

sche beoordeling. In totaal zijn 298 klinische en poliklinische patiëntenmonsters geëvalueerd. Wij vonden een duidelijk verband tussen het totaal aantal leukocyten en de hoogte van de absolute score voor de Q-flag 'L-shift?'. Bij de standaardinstelling van de Sysmex SE-9000 berekenden wij voor de Q-flag 'L-shift?' een sensitiviteit van 63%, een specificiteit van 83% en een positief voorspellende waarde van 36%. Voor de Q-flag 'Imm. Gran?' vonden wij een sensitiviteit van 70%, een specificiteit van 86% en positief voorspellende waarde van 42%.

Wij concluderen dat de Q-flag melding voor linksverschuiving en aanwezigheid van jonge granulocyten door de Sysmex SE-9000 hematologie analyzer beperkt bruikbaar is bij het reduceren van het aantal uit te voeren microscopische leucocyten differentiaties, dat momenteel ongeveer 40% betreft van de 600 tot 700 wekelijkse aangevraagde leukocyten differentiaties in onze populatie.

030. Hereditary Pyropoikilocytosis (HPP) caused by a hereditary elliptocytosis (HE) mutation in exon 2 of α spectrin in combination with the α^{LELY} allele in trans

P.F.H. FRANCK¹, G. de KORT¹, F.A. KUYPERS², J. POSTMA¹, A. SPAANS¹ and M.M.M. SALIMANS¹

Department of Clinical Chemistry, Leyenburg Hospital¹, The Hague, The Netherlands, Children's Hospital Oakland Research Institute², Oakland, CA., U.S.A.

HPP is a rare recessive haemolytic anaemia characterised by remarkable red cell fragmentation and bizarre poikilocytosis. The nature of these abnormalities is the defective membrane skeletal protein spectrin (Sp). Sp is the major component of the erythrocyte membrane skeleton and is composed of two long flexible, intertwined chains of an α and β subunit. These heterodimers form tetramers by a head to head self-association. The tetramers bind to actin filaments and this complex is stabilised by protein 4.1. The membrane skeleton is attached to the overlying lipid bilayer by linkage through ankyrin to the integral protein Band 3.

The clinical phenotype HPP is genetically an aggravated form of HE. The latter is characterised by a defective dimer-dimer self-association. HPP results from homozygosity for several

Sp / HE mutations or from a heterozygosity for an α Sp / HE mutation in combination with spectrin α^{LELY} .

Spectrin α^{LELY} (Low Expression LYon) is a widespread, asymptomatic mutation which results in a low expression of α Sp.

Here we report a family of three generations with silent carrier HE, mild HE or HPP. DNA analysis (RFLP, SSCP and sequences) demonstrated a mutation in exon 2 of α Sp (codon 28, Arg \rightarrow Cys) in combination with the presence of spectrin α^{LELY} (combined defects in exon 40, intron 45 and partial skipping of exon 46). Protein analysis showed a loss in Sp (SDS PAGE) and an altered limited tryptic digestion fragment pattern of Sp ($\alpha^{1/74}$). Deformability profiles (Ektacytometry) and osmotic fragilities vary in relation to the type of α Sp mutation.

031. The diagnostic performance of IL-8 as discriminator between fever episodes caused by bacterial infection or of nonbacterial origin in chemotherapy-related neutropenic patients

J.C.J.M. SWAANENBURG, E.S.J.M. de BONT, P.J. VISSER-van BRUMMEN, E. VELLENGA and W. A. KAMPS

University Hospital Groningen

Introduction: Fever episodes are a serious complication in chemotherapy-related neutropenic patients. These episodes can be caused by bacterial infections. In these patients proven bacterial sepsis has a high mortality. Standard therapy include broad spectrum intravenous antibiotics for at least five days at the hospital by lack of a good discriminator. The conventional parameters leucocyte count and CRP are of low discriminating value.

We investigated the diagnostic performance of IL-8 to discriminate between bacterial sepsis and other causes of fever episodes in patients with chemotherapy-related neutropenia at presentation with fever.

Patients and methods: Fifty-three patients (resulting in 72 febrile episodes) were included in this study. The median age was 34 years (range 1-66 years). Blood was collected at pre-

sentation of fever. Proven sepsis was defined as blood culture positive sepsis or clinical defined sepsis.

For IL-8 measurements an Immulite analyser (DPC, Apeldoorn, The Netherlands) was used.

Results: The non-sepsis group (n=54) shows a median IL-8 concentration of 81 (range 5-4879) ng/l. The proven sepsis group (n=18) shows a median IL-8 concentration of 204 (range 44-17500) ng/l. These results are significantly different (p=0.034).

Conclusion: We conclude, that IL-8 can discriminate between fever episodes caused by bacterial infection and other causes in chemotherapy-related neutropenic patients. So, it might be possible with IL-8 measurement to detect a group of patients at low risk for septicemia. Early discharge of these low risk patients will result in cost reduction.

032. Combinatie van α - en β -thalassemie

G.A. van den BERG, A.J. BAKKER en H. STORM
Stichting Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden

Inleiding: In sommige gebieden van de wereld, vooral in het Verre Oosten, bestaat een hoge incidentie van zowel α - als β -thalassemie. Personen uit deze gebieden kunnen zowel α - als β -thalassemie hebben. Uit publicaties blijkt dat de incidentie van α -thalassemie bij aanwezigheid van β -thalassemie circa 10% is in populaties uit het Middellandse Zee gebied en het Verre en Midden Oosten. In een pilot studie is de frequentie en identiteit van α -thalassemie vastgesteld bij personen met β -thalassemie in onze patiënten populatie.

Methoden: Bij 53 patiënten, waarvoor op grond van hemocytometrie, morfologie en een verhoogd percentage HbA₂ een β -thalassemie is vastgesteld, is met behulp van PCR onderzoek

uitgevoerd naar de meest voorkomende deleties in de α -globine genen (3.7 Kb, SEA en MED).

Resultaten: Bij 5 (9,4%) van de 53 patiënten met β -thalassemie is tevens een heterozygote 3,7 Kb deletie in één van de α -globine genen vastgesteld. Er kon geen duidelijke relatie worden gevonden tussen het voorkomen van zowel een α -thalassemie als β -thalassemie en de ernst van de afwijkingen in de hemocytometrie en de morfologie van het rode bloedbeeld.

Conclusie: Het verdient aanbeveling om bij personen met β -thalassemie tevens DNA onderzoek naar deleties in de α -globine genen uit te voeren. Op deze manier kan adequate voorlichting aan dragers worden gegeven bij kinderwens.

033. Hb O-Indonesia (α 116 Glu→Lys) in a Dutch woman

S.C. ENDENBURG¹, J. HESSELS¹, R. van VEEN², J.W. SMIT², A. DIMOVSKI³ and G.D. EFREMOV³
Department of Clinical Chemistry¹, Twenteborg Hospital, Almelo, The Netherlands; Central Clinical Haematological Laboratory², University Hospital Groningen, Groningen, The Netherlands and Research Centre for Genetic Engineering and Biotechnology³, Skopje, Macedonia

Hb O-Indonesia was originally discovered by electrophoresis as Hb Buginese in Buginese from Sulawesi, but was later on also found in Makassar, Iranian, South African, Italian and Chinese families. Functional studies are not reported; Hb O-Indonesia is slightly less stable than HbA. Hb O-Indonesia does not seem to have clinical consequences.

In this paper we report the occurrence of Hb O-Indonesia in a 57-year-old Dutch woman. Screening of her blood samples for hematological (Hb 9.5 mmol/L, PCV 0.46 L/L, RBC 5.3 x 10¹²/L, MCV 86 fL, MCH 1770 amol, MCHC 20.7 mmol/L)

and chemistry parameters revealed no abnormalities. There was no clear relationship between her clinical symptoms and Hb O-Indonesia. An abnormal HbX (9.6%) was found by a modified cation exchange HPLC and by isoelectrofocussing.

DNA analysis using PCR with primer set combinations for different a-chain deletions identified the result of an unequal crossover, the $\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}/\alpha\alpha$ genotype. Sequencing of the α -globin genes demonstrated a mutation in codon 116 (GAG → AAG) of the α 1-globin gene, which results in a replacement of Glu → Lys. This mutation is characteristic for Hb O-Indonesia.

034. Domains of band 3 associated with senescent antigens can be demonstrated on vesicles derived from old red cells

F.L.A. WILLEKENS¹, G.J.C.G.M. BOSMAN², I.P.G. BARTHOLOMEUS², B. ROERDINKHOLDER-STOELWINDER³, Y.A.M. GROENEN-DOPP¹, H.J. BOS³ en J.M. WERRE³
Clinical Chemistry Laboratory Ziekenhuis Rijnstate¹, Arnhem; Biochemistry Dept.² FMW, KUN, Nijmegen; Sanquin Blood Bank Geldersche Rivieren³, Nijmegen

Introduction: Death of red cells (RBC) can be explained by complement dependent lysis followed by phagocytosis. During this process altered band 3 and naturally occurring immunoglobulins act as respectively senescent antigen and senescent antibodies. Previous studies showed that a decrease of anticomplement activity per se, by loss of CD55 and CD59 in vesicles, was not the only explanation. Therefore, we turned to a study in which antibodies to different band 3 domains were used to explore their presence on red cells of different age and on vesicles derived from old red cells.

Methods: RBC were fractionated in five fractions of different cell age (I-V) by a combination of counterflow centrifugation and a density fractionation technique (Percoll). Vesicles were isolated from whole blood by a centrifugation procedure. Immunoblotting was performed with 9 different antibodies. As marker of cell age the HbA_{1c} -percentage was used.

Results

- In fractions I to V the HbA_{1c} c-% increased from 3.7 ± 0.54 to 6.7 ± 0.59 p<0.01 (6).
- Only antigenicity to antibody K10 was shown on old and not on young cells. The same antigenicity was shown on vesicles (see table).

Conclusion: This study shows that band 3 domains associated with senescent antigen(s) can be lost from old red cells by the process of vesiculation. Whether more anticomplement

activity than senescent antigen activity is lost from (old) red cells (by vesiculation) has still to be determined, as this could be an important part of the RBC death process.

Reactivity of antibodies to RBC fractions and vesicles

Antibody Code	Directed to Band 3 epitope	Presence in Fraction I-V	Presence In vesicles
BIII-136	25-35	++ → ++	0
IIE1	390-550	+ → ++	+
B6	542-555	++ → ++	+
K10*	562-565	0 → ++	+++
K11*	566-569	0 → 0	++
K7	620-637	0 → 0	0
K5	630-648	0 → 0	0
1514*	812-827	++ → +	0
IVF12	840-911	++ → ++(+)	+

*: Domains 560 - 580 and 810 - 830 show senescent antigenicity

035. Newborns with genotypic and phenotypic heterozygous α -thalassemia-2 have higher prematurity frequency

F.P.L. van der DIJS¹, D.G. van GIJSSEL-WIERSMA², H. LANDMAN³ and F.A.J. MUSKIET²

Public Health Laboratory, Curaçao (The Netherlands Antilles)¹, Pathology and Laboratory Medicine, Groningen University Hospital² and Gynecologist, Curaçao (The Netherlands Antilles)³

We investigated whether the previously established higher prematurity frequency of newborns with $0.5\% < \text{HbBarts} \leq 2.0\%$ and $\text{HbBarts} > 2.0\%$, compared with $\text{HbBarts} \leq 0.5\%$, is caused by α -thalassemia-2. Cord blood was collected from 211 consecutive spontaneous life births in Curaçao (The Netherlands Antilles). HbBarts percentages and α -thalassemia-2 genotypes (i.e. $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, $-\alpha/\alpha\alpha$ and $-\alpha/-\alpha$) were established and related to their prematurity (< 37 weeks) frequencies and gestation lengths. Newborns with $0.5\% < \text{HbBarts} \leq 2.0\%$ [$n = 30$; odds ratio for prematurity: 1.34 (1.34-18.58); mean gestational age 38.3 weeks] and $\text{HbBarts} > 2.0\%$ [$n = 6$; odds ratio: 41.50 (4.79-487.8); 33.5 weeks] had higher prematurity frequencies and shorter gestation lengths, compared with newborns with

$\text{HbBarts} \leq 0.5\%$ [$n = 174$; 39.3 weeks]. Newborns with $-\alpha/\alpha\alpha$ [$n = 51$; odds ratio for prematurity: 3.55 (1.16-10.73); mean gestational age 39.5 weeks] had higher prematurity frequencies compared with newborns with $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ($n = 158$; 39.0 weeks). From the 18 prematures 10 had $\text{HbBarts} > 0.5\%$ and 9 had $-\alpha/\alpha\alpha$. Classification into $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, $-\alpha/\alpha\alpha$ and $-\alpha/-\alpha$ coincided to a large extent with classification into $\text{HbBarts} \leq 0.5\%$, $0.5\% < \text{HbBarts} \leq 2.0\%$ and $\text{HbBarts} > 2.0\%$, respectively. Misclassification was partially due to the gestational age dependency of HbBarts. We conclude that newborns with heterozygous α -thalassemia-2 have higher prematurity frequency than their unaffected counterparts.

036. Predictive value of cord blood hematological indices and HbBarts for the detection of heterozygous α -thalassemia-2 in an African Caribbean population

F.P.L. van der DIJS¹, M. VOLMER², D.G. van GIJSSEL-WIERSMA², J.W. SMIT², R. van VEEN³ and F.A.J. MUSKIET²
Public Health Laboratory, Curaçao (The Netherlands Antilles)¹, Laboratory Center², and Pathology and Laboratory Medicine³, Groningen University Hospital

We investigated by logistic regression analysis whether the combination of cord blood HbBarts and hemocytometric indices improves classification of newborns into those without α -thalassemia-2 ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) and with heterozygous α -thalassemia-2 ($-\alpha/\alpha\alpha$), compared with classification based on a single analyte. Data derived from 208 consecutive newborns in Curaçao (Netherlands Antilles), of which 157 had $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ and 51 $-\alpha/\alpha\alpha$. There were significant between-group differences for RBC, MCV, MCH, MCHC, PLT, HbF0 and

HbBarts. The Logit equation of the logistic regression model was: $42.7164 + 5.7916 * \text{HbBarts} - 1.3110 * \text{MCH}$ (HbBarts in percentage, MCH in pg). A sensitivity of 100% was reached at a Logit value of -3.70. The corresponding specificity was 62.2% and the predictive value of a positive test (PV+) was 46.6% (95% CI: 37.0-55.6%). The information gain was 89%, when compared with the 24.6% $-\alpha/\alpha\alpha$ prevalence. This gain is higher than the gains from univariate classification with MCH (26%, not significant) or HbBarts (0%).

037. De diagnostische waarde van het MCV voor de detectie van vitamine B12 deficiëntie

W.P. OOSTERHUIS^{1,2}, R.W.L.M. NIESSEN³, G.T.B. SANDERS⁴ en A. STURK³

Committee on Systematic Reviewing in Laboratory Medicine of the IFCC¹, Ziekenhuis de Heel, Zaandam², Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden³, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam⁴

Vaak zijn een verhoogd MCV, een macrocytaire anemie of diverse neurologische symptomen de reden om onderzoek te doen naar vitamine B12 (B12) deficiëntie. De toepassing van het MCV als screening op B12 deficiëntie is alleen gerechtvaardigd als de sensitiviteit en specificiteit voldoende hoog zijn. Er is een systematisch literatuuronderzoek uitgevoerd naar de diagnostische waarde van een verhoogd MCV voor B12 deficiëntie. Ongeveer 3500 titels en/of abstracts zijn beoordeeld, waarvan uiteindelijk 37 publikaties bruikbare gegevens bevatten. De bestudeerde populatie (ziekenhuis, huisartsenpraktijk, bevolkingsonderzoek) blijkt van grote invloed op de resultaten, waardoor samenvoegen van gegevens van verschillende studies slechts ten dele mogelijk is. Wanneer binnen een populatie gerandomiseerd wordt gescreend op B12 deficiëntie, is de sensitiviteit van het MCV hiervoor

slechts 16%, terwijl de sensitiviteit 39% is voor een bevestigde B12 deficiëntie bij patiënten met anemie. Wanneer de bepaling van B12 is aangevraagd om een B12 deficiëntie uit te sluiten, is de sensitiviteit van het MCV 58% voor een B12 deficiëntie en 75% voor een B12 deficiëntie bij patiënten met anemie. Bij patiënten met een pernicioze anemie blijkt de sensitiviteit 77% te zijn. Dit systematische literatuuronderzoek laat zien dat een B12 deficiëntie vaak (tot 84% van de gevallen) onopgemerkt kan blijven wanneer het MCV zou worden gebruikt als criterium om verder onderzoek te doen. Conclusie: het MCV speelt weliswaar een rol bij het aantonen of uitsluiten van B12 deficiëntie, maar moet niet als enige criterium gebruikt worden om patiënten te identificeren die in aanmerking komen voor verder diagnostisch onderzoek naar B12 deficiëntie.

038. Screening for inhaled allergies

R. OOSTEROM and J.E. GOEDEGEBUUR
Ikazia Hospital, Rotterdam

In our hospital, we perform the screening for inhaled allergies with ALATOP® (DPC) on Millennia microplates. A positive screening is followed by a panel of six allergen specific IgE tests: house dust mite (D1); grasses (GP1); birch tree (T3AL); weeds (WP3); cat (E1) and dog (E5).

In this retrospective study we were interested to know whether

testing for weeds is useful in our setting.

Results: In a 2-year period, 2663 screenings for inhaled allergies were requested by specialists (65 %) and practitioners (35 %). A positive screening was found in 890 patients. In 790 (30%) of these patients one or more allergen specific IgE reactions were found positive.

In 295 of the 790 (37%) patients, only one allergen was found positive. Most of these were house dust mite. Weed pollen was positive only once.

In the remaining 63% of the patients, reactions with more than one allergen was found positive. Weed pollen were positive in 96 patients in combination with mostly grass pollen and some-

times with house dust mite. The reaction with weed pollen was always weaker than with one of the other allergens.

From this we conclude that in a cost-effective screening strategy for inhaled allergies there is no need testing for weed pollen specific IgE.

Stolling

039. The detection of an insidious case of pseudothrombocytopenia

J. ZIJLSTRA¹, A.J.P.F. LOMBARTS², R.H.M. PETERS¹ and C.G. THOMASSON¹
De Tjongerschans Hospital, Heerenveen¹ and Leyenburg Hospital, The Hague²

EDTA-induced aggregation of platelets (PLT) leads to pseudothrombocytopenia (PTCP). It occurs several times a week in laboratories all over the world. Non-recognition can lead to grossly erroneous PLT values and consequently to unnecessary examinations and/or inappropriate examinations and/or therapies.

Generally, PTCP is automatically indicated in blood cell counters by alarms, flags and/or other warnings.

In the blood of patient Mrs KF we detected an insidious PTCP where no warnings were given. Moreover the very small number of PLT in the examination area of the blood smear

strongly suggested confirmation of the very low PLT concentration measured by the counter.

This case again emphasizes the importance of a careful inspection under a low magnification of the feather edge and the lateral edges of the smear, where in this case massive PLT aggregates were observed. In this sample the size of the aggregates is so large that they apparently neither simulate the size of lymphocytes (and consequently do not trigger any WBC alarms) nor fit in the PLT clumping and flagging algorithms set by the Coulter Company.

040. The quantitation of the platelet concentration in an "ACD-resistant" case of pseudothrombocytopenia

A.J.P.F. LOMBARTS¹ and J. ZIJLSTRA²
Leyenburg Hospital, The Hague¹ and De Tjongerschans Hospital, Heerenveen²

Quantitation of the true platelet (PLT) concentration is especially important in cases where pseudothrombocytopenia (PTCP) might mask a true thrombocytopenia (1). Moreover, quantitation is important to evaluate the PLT-concentration with time. Acid Citrate Dextrose (ACD) compares favourably to citrate and heparin in its ability to prevent PTCP (2). However, in the patient described here (Mrs KF, the same patient as discussed in the "twin" poster), PTCP was resistant to all three anticoagulants. The abilities of two known anti-aggregant substances to prevent PTCP were tested. CTAD (3) was not successful, whereas the addition of 1 drop of Iloprost[®] to ACD gave a rather effective, though incomplete inhibition of the aggregation. Iloprost[®] is a commercial, stable prostacyclin- I_2 . To our surprise, we could confirm the findings of Sakurai et al (4) that the addition of Gentamicin[®] completely prevented the aggregation. This successful experiment enabled us to assess that the absolute PLT concentration of this patient was

at the lower level of normal ($160 \cdot 10^9$ PLT/L); so in this case PTCP did not mask a true thrombocytopenia.

References

1. Forscher CA et al. Pseudothrombocytopenia masking true thrombocytopenia. *Am J Hematol* 1985; 18: 313-317.
2. Lombarts AJPF, de Kieviet W. Recognition and prevention of pseudothrombocytopenia and concomitant pseudoleukocytosis. *Am J Clin Pathol* 1988; 89: 634-639.
3. Contant G et al. Heparin inactivation during blood storage: Its prevention by blood collection in Citric Acid, Theophylline, Adenosine, Dipyridamole. *Thromb Res* 1983; 31: 365-374.
4. Sakurai S et al. Aminoglycosides prevent and dissociate the aggregation of platelets in patients with EDTA-dependent pseudothrombocytopenia. *Br J Haematol* 1997; 99: 817-823.

041. Microparticles in healthy human volunteers: basal coagulation explained?

R.J. BERCKMANS¹, R. NIEUWLAND¹, A.N. BOING¹, C.E. HACK² and A. STURK¹
Department of Clinical Chemistry, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands¹; University Hospital Vrije Universiteit, Amsterdam; CLB, Sanquin Blood Supply Foundation, Amsterdam, The Netherlands²

The coagulation system is active at a low level in human blood, the so called basal coagulation. For coagulation not only (activated) coagulation proteins are required, but also calcium ions and a membrane surface. The membrane surface exposes negatively charged phospholipids to which coagulation proteins are able to bind. The aim of the present study was to determine whether microparticles are present in blood obtained from healthy volunteers and, if so, whether these microparticles are involved in basal coagulation.

Microparticles were isolated from citrate-anticoagulated whole blood from 6 healthy volunteers by differential centrifugation. Flow cytometric analysis showed that low numbers of microparticles are present, which were predominantly of platelet (CD61>90%)-and erythrocyte (glycophorin A<10%)-origin. All microparticles bound annexin V, a protein known

to bind with high specificity to negatively charged phospholipids. Reconstitution of microparticles in defibrinated, microparticle-free normal plasma resulted in generation of thrombin after recalcification. In contrast, no thrombin was generated when microparticle-free normal plasma was recalcified. Thus, the presence of microparticles was a prerequisite for coagulation. A correlation was found between the number of annexin-positive microparticles and the concentration of the prothrombin fragment F1+2 ($r=0.90$; $P=0.005$).

In conclusion, blood from healthy volunteers contains low numbers of circulating microparticles which are of various cellular origin. Microparticles expose negatively charged phospholipids, trigger coagulation in vitro and are likely to play a role in the basal coagulation activation status in vivo.

042. Microparticles and DIC in meningococcal sepsis

R. NIEUWLAND¹, R.J. BERCKMANS¹, S. MCGREGOR², A.N. BOING¹, F.P.H.TH.M. ROMIJN¹, R.G.J. WESTEN-DORP³, C. E. HACK⁴ and A. STURK¹

Department of Clinical Chemistry, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands¹; Department of Physiology, University of Edinburgh, Edinburgh, UK²; Departments of General Internal Medicine and Clinical Epidemiology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands³; University Hospital Vrije Universiteit, Amsterdam; CLB, Sanquin Blood Supply Foundation, Amsterdam, The Netherlands⁴

Patients with meningococcal sepsis generally suffer from disseminated intravascular coagulation (DIC). The aim of the present study was to address the question whether these patients have elevated numbers of circulating microparticles and whether those particles contribute to the development of DIC. Plasma samples from 5 survivors, 2 non-survivors and 5 healthy volunteers were analyzed for the presence of microparticles by flow cytometry. Ongoing coagulation activation in vivo was quantified by ELISA of plasma prothrombin fragment F1+2 and procoagulant properties of the microparticles in vitro were estimated by thrombin-generation assay. On admission, all patients had increased numbers of microparticles originating from platelets (CD61-positive) or granulocytes (CD66b-positive), when compared to healthy volunteers ($P=0.004$ and $P=0.008$, respectively). The patients also had elevated plasma levels of prothrombin fragment F1+2 ($P=0.004$) compared to healthy controls, indicating an enhanced coagulation activation in vivo. The microparticles

from patients and controls bound annexin V, a protein that binds to exposed phosphatidylserine, a clotting phospholipid cofactor. The patients' microparticles supported thrombin generation more strongly in vitro than those of the volunteers ($P=0.003$). Plasma from the patient with the most fulminant disease course and severe disseminated intravascular coagulation contained microparticles that expressed both CD14 (a monocyte marker) and tissue factor, and microparticles from this patient demonstrated extreme thrombin generation in vitro. This thrombin generation was completely blocked by antibodies directed against tissue factor or coagulation factor VII, but not by a monoclonal antibody inhibiting factor XII activity.

We conclude that patients with meningococcal sepsis have elevated numbers of circulating microparticles which are procoagulant and suggest that these findings may open a novel therapeutic approach to combat clinical conditions with excessive coagulation activation.

043. Endothelial-cell derived microparticles are procoagulant

R. NIEUWLAND, S.A.J. van EGMOND and A. STURK

Department of Clinical Chemistry, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

Microparticles are small blebs which are released from cellular surfaces during activation and apoptosis. Recently we showed that microparticles are generated, especially from platelets and erythrocytes, in patients undergoing cardiac surgery, and that these particles are procoagulant (Circulation, 1997). The aim of the present study was to determine whether cultured human endothelial cells (Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)) release procoagulant microparticles in vitro upon stimulation by interleukin-1 (IL-1).

Confluent HUVECs were grown with (or without) IL-1 (5 ng/mL). After 8 and 16 hours, cells were isolated, labeled with anti-CD34 in combination with anti-tissue factor (anti-TF) and analyzed by flow cytometry. IL-1 strongly induced cell surface expression of TF, which was transient. It peaked after 8 hours and thereafter decreased. Concurrently, microparticles were isolated from the cell supernatant (culture medium) by

differential centrifugation. Microparticles were stained with FITC-labeled annexin V, a protein which binds with high specificity to negatively charged phospholipids, anti-CD34 and anti-TF, and analyzed by flow cytometry. In the supernatant of resting cells, only a modest number of annexin V- and CD34-positive microparticles was found, which did not bind anti-TF. After stimulation with IL-1, the number of microparticles increased 6-30 fold. Although the microparticles hardly stained for anti-TF, upon reconstitution in normal plasma they strongly initiated thrombin generation which was completely inhibited by preincubation with either anti-F.VII or anti-TF, but not by anti-F.XII. These data indicate that stimulation of endothelial cells by a cytokine results in the release of procoagulant microparticles which facilitate coagulation via a TF/factor VII-dependent pathway.

044. Baseline platelet activity correlates with 6 months angiographic restenosis after long stent implantation in patients with stable angina

P.V. OEMRAWSINGH¹, M.C.L. SCHAAP², R. PABLO², R.J. BERCKMANS², R. NIEUWLAND², M.J. SCHALIJ¹, A. STURK¹ and A.V.G. BRUSCHKE¹

Departments of Cardiology¹ and Clinical Chemistry², Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

In-stent restenosis (ISR) is primarily caused by intimal hyperplasia, which may be initiated by platelet-derived factors. The aim of the present study was to determine the relation between platelet activation and ISR.

Platelet activation was assessed by double label whole blood flow cytometry. Platelets were identified on basis of their characteristic light scatter profile and binding of anti-glycoprotein Ib. Monoclonal antibodies directed against the activation markers P-selectin (CD62P), GP53 (CD63) and (platelet-bound) fibrinogen were used. Blood samples were obtained before and after stent implantation from patients with stable angina and a single de novo stenosis > 24 mm length. All patients received aspirin and ticlopidin after stent placement. Quantitative coronary angiography (QCA) was performed

before and after stent implantation and at 6 months follow up. QCA and platelet activation analysis was done after successful implantation of 18 stents (1.1 ± 0.3 stents/patient) with a length of 32 ± 8 mm in 16 patients (13 male, 3 female), aged 57 ± 8 years. Baseline CD62P and fibrinogen had a positive correlation with the in-stent plaque area at 6 months ($r=0.6$, $P=0.022$ and $r=0.5$ and $P=0.039$, respectively). No significant correlations were found between plaque area at 6 months and baseline CD63 levels, levels of platelet activation markers after stent implantation, stent diameters or stent length.

In conclusion, baseline platelet activation correlates with in-stent restenosis at 6 months after long stent implantations and invites further investigation of the role of platelet activation in the development of in-stent restenosis.

045. Een flowcytometrische bepaling van micropartikels van trombocyten in volbloed en trombocyten concentraten

E.M. KALSBEK-BATENBURG¹, G.C.M. KUSTERS², I.VERMES¹ en F.M.F.G OLTHUIS¹

Afdeling Laboratorium Medisch Spectrum Twente, Enschede¹; Afdeling Laboratorium Bosch Medicentrum, Den Bosch²

Micropartikels zijn kleine membraanblaasjes, die worden afgesnoerd van cellen gedurende celactivatie of apoptose. Micropartikels kunnen o.a. worden afgesnoerd van trombocyten, erythrocyten, monoccyten en epitheliale cellen. De micropartikels van trombocyten zijn tot nu toe het best bestudeerd. Verhoogde concentratie trombocytenmicropartikels worden aangetroffen in de bloedsomloop van patiënten met diverse ziekten met een verhoogde kans op trombose, hetgeen suggereert dat ook in vivo gevormde micropartikels een rol spelen bij de bloedstolling. In de publicaties tot nu toe werd bij de bepaling van micropartikels gebruik gemaakt van twee selectiecriteria: de grootte en de membraaneigenschappen (zoals CD41, CD42b of CD61). In 1997 is door Nieuwland en Sturk (Ned Tijdschr Klin Chem 1997; 22, 207-214) gepubliceerd dat vrijwel alle trombocytenmicropartikels gekenmerkt worden door een hoge expressie van fosfatidylserine. Deze expressie

is een voorwaarde voor het binden van stollingsfactoren. Met dit gegeven hebben wij een flowcytometrische bepaling ontwikkeld voor de kwantificering van micropartikels, geactiveerde trombocyten en aggregaten in volbloed.

Bij deze bepaling wordt gebruik gemaakt van een dubbelkleuring met CD61-PERP en Annexine-V-FITC en een no lyse-no wash methode. CD61 is een marker die gericht is tegen het GPIIb/IIIa, een onderdeel van de receptor van fibrinogeen, die specifiek aanwezig is op trombocyten, hun partikels en megakaryocyten. Annexine-V is een eiwit dat bindt aan het fosfatidylserine.

Samen met de meting van de FSC, en de SSC blijkt het mogelijk te zijn om de micropartikels betrouwbaar en reproduceerbaar te meten. Mbv fluorescerende beads is het mogelijk gebleken de partikels ook kwantitatief te meten. De bepaling is zowel bruikbaar in volbloed als in trombocyten concentraten.

046. Pseudotrombocytose en pseudoleukocytose: van artefact naar diagnose

M.H. BEUNIS, J.W.JANSEN en G. van HARMELEN
St. Franciscus Gasthuis, Rotterdam

Wanneer een cryoglobuline onverwacht voorkomt en al bij kamertemperatuur "precipiteert", zijn de bekende artefacten niet meteen herkenbaar. Door het presenteren van deze casus willen we attenderen op een aantal valkuilen in de laboratoriumdiagnostiek, waardoor een cryoglobuline niet herkend wordt.

Op de zevende dag van de ziekenhuisopname werd gemeld dat het monster van patient T. problemen gaf bij het bepalen van het aantal leukocyten en trombocyten in bloed (Coulter STKS). De resultaten zijn weergegeven in tabel 1. Bij melding merkte de hoofdanalist tevens op dat de buffycoat er vreemd uitzag.

Op grond van het volledige normale rode bloedbeeld, werd koude agglutinatie uitgesloten.

Een paraproteïnemie als oorzaak werd minder waarschijnlijk geacht omdat het totaal eiwit 44 g/l was en omdat in de dif geen blauw precipitaat werd gevonden. Wel was het opgevallen dat het difpreparaat "niet schoon" was: een amorf kleurloos of bruin neerslag werd waargenomen. In een opnieuw afgenomen monster werd geen amorf neerslag waargenomen.

Tenslotte bleek dat in EDTA bloed, dat een half uur bij 37 °C had gestaan, normale uitslagen, zonder foutcode, verkregen werden. Nadat het EDTA bloed vervolgens een half uur bij kamertemperatuur had gestaan, waren de leukocyten en trombocyten weer verhoogd.

Op basis van deze waarneming werd cryoglobuline bepaald. Na een week bij 4 °C was in vrijwel de hele buis serum een gelatinemassa gevormd, getypeerd als monoclonaal IgM kappa. De IgM concentratie in serum, afgedraaid bij 37 °C was 20 g/l. De totale eiwitconcentratie in warm afgedraaid serum bedroeg 59 g/l.

Door de toenemende werkdruk en automatisering wordt aan de productie de hoogste prioriteit gegeven. Hierdoor dreigen bijzonderheden niet meer op te vallen en is het verleidelijk onverwachte en onverklaarbare resultaten niet meer te melden of uit te zoeken.

Artefacten kunnen echter analist, klinisch chemicus en clinicus op een dwaalspoor brengen of juist attenderen op een belangrijk symptoom.

Tabel 1. Resultaten cytometrie

	Leukocyten 10 ⁹ /l	Trombocyten 10 ⁹ /l
EDTA bloed, onverdund	–	–
10 x verdund met PBS	48	760
Plasma vervanging door PBS	21	394
Telkamer	9,2	292
Difpreparaat	±10	± 300

047. Soluble fibrin as a marker of a hypercoagulative state in subjects with Colitis Ulcerosa

P.C.M. BARTELS en M. SCHOORL

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

An elevated level of soluble fibrin is considered to yield an indication with respect to activation of coagulation. Soluble fibrin represents an end product of the coagulation cascade demonstrating that thrombin has acted on fibrinogen by cleavage of fibrinopeptides A and B. Soluble fibrin is the generic term for various molecular variants of fibrin that are kept in solution and circulating in the blood as complexes with fibrinogen. Quantification is useful to get information on the degree of intravascular coagulation. Increased concentrations of prothrombin F1+2 and TAT indicate that thrombin has been formed.

Relapse of Colitis Ulcerosa is known to affect haemostasis resulting in a hypercoagulative state. In a longitudinal follow up markers of procoagulant activation are established for 20 subjects. Samples were drawn in the exacerbation phase (T=0) and after 12 weeks (T=12) during reconvalescence. In order to compare these results with a reference group 25 apparently healthy donors were tested.

If compared with fibrinogen concentrations in the reference group (3.3 ± 0.21 g/L, mean " SEM) at the moment of exacerbation increased values for this acute phase reacting protein are demonstrated in 14 out of 20 subjects (5.1 ± 0.35 g/L,

mean \pm SEM). An obvious tendency to decrease towards results within the reference range is observed during reconvalescence for 13 out of 20 subjects (3.6 ± 0.21 g/L, mean \pm SEM).

Soluble fibrin concentrations are obviously increased in the exacerbation phase (182 ± 9.5 SF Units, mean \pm SEM) with a decrease at the stage of reconvalescence (143 ± 7.0 SF Units, mean \pm SEM)

048. Casuïstiek van patiënten met een verlengde APTT

J. de JONGH-LEUVENINK, A. DENISSEN en M. JANSEN
CKCHL, St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg

In het afgelopen jaar hebben zich in korte tijd 5 patiënten gepresenteerd met een verlengde APTT en normale PT. Bij alle 5 patiënten was in de voorgeschiedenis geen stollingsstoornis bekend. Het bloedonderzoek werd bij 3 patiënten in het kader van screening voor OK uitgevoerd; bij de andere patiënten omdat deze bloedingen hadden. Bij een pre-operatieve screening wordt alleen een PT aangevraagd en bij 1 patiënt werd toevallig ook een APTT gevraagd. Bij een verdenking op hemorragische diathese wordt een stollingsstatus (APTT, PT, trombo's, bloedingstijd) geprikt.

Bij een herhaald verlengde APTT (zonder heparinetherapie) wordt volgens een stappenplan gekeken waar de verlenging het gevolg van is. Het vervolgonderzoek start met een mengproef (direct en na incubatie 1 uur bij 37°C) met mengsels van 10%, 50% en 90% patiëntenplasma en normaalplasma. Afhankelijk van de uitslagen van deze mengproef wordt naar remmers of naar factordeficiënties gekeken. Een factor deficiëntie zal immers zeer snel door het mengen met normaalplasma de APTT normaliseren. Bij geen van deze patiënten bleek een factor deficiëntie uit de resultaten van de mengproef. Vervolgens werden testen voor het aantonen van Lupus Anticoagulans uitgevoerd, te weten dRVVT met en zonder neutralisatie procedure. Wanneer deze negatief bleken te zijn werd gekeken naar de factoren 8, 9, 11 en 12 om te zien of sprake is van een remmer tegen deze factoren. In geval van een of meer verlaagde factoren werd eventueel een remmeractiviteitstest ingezet om het aantal Bethesda units te bepalen.

049. Proteïne C pathway screening test

E. van VOORST tot VOORST, H.P. van BERKEL, A. EDELAAR en A. van PUTTE
Laboratorium, Isala klinieken, locatie Weezenlanden

In het kader van de laboratoriumdiagnostiek van trombose en longembolie is de proteïne C pathway screening test (PCP) ontwikkeld. De test is eenvoudig uit te voeren en relatief goedkoop.

Ons laboratorium is nagegaan of de PCP geschikt is om onderscheid te maken tussen patiënten zonder en met afwijking(en) zoals proteïne C deficiëntie (PCD), proteïne S deficiëntie en Factor V Leiden mutatie (FVL), ten einde alleen de juiste monsters voor het meer gespecialiseerde (en dus duurder) laboratoriumonderzoek (FVL e.d.) in aanmerking te laten komen. Hierbij dient opgemerkt te worden dat antistollingstherapie (AST) (coumarinederivaten) de synthese van o.a. proteïne C en S verminderen en dat het gebruik van de anti-conceptiepil de PCP eveneens verlaagt. De PCP-referentiewaarde (ratio patiënt / ratio pool) is $> 0,8$.

Onderzocht zijn 86 normalen, d.w.z. geen aangetoonde afwijking in de stolling m.b.v. laboratoriumdiagnostiek (groep 1), 16 patiënten met AST (groep 2), 14 patiënten met FVL heterozygoot / homozygoot (groep 3), 5 patiënten met PCD (groep 4) en 3 patiënten met FII mutatie (groep 5). De bijgaande figuur geeft de resultaten weer. Deze komen overeen met onze verwachting m.u.v. PCP=0,9 in groep 4, de proteïne C activi-

Fibrinogen concentraties are increased at exacerbation. After combination of results from subjects with CU and apparently healthy individuals a statistically significant relationship between fibrinogen and soluble fibrin is established ($r = 0.581$). From this observation it is concluded that cases with excess of fibrinogen yield favourable conditions for increased generation of soluble fibrin.

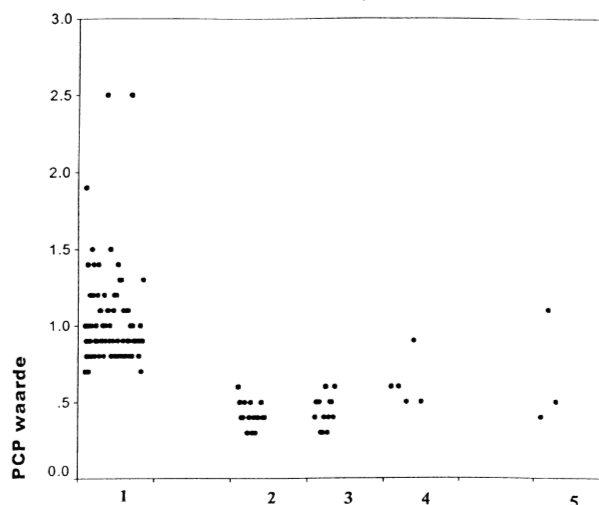
De uiteindelijke resultaten van de 5 patiënten staan vermeld in onderstaande tabel.

Patiënt	Geb.	APTT*	Oorzaak verlengde APTT
1.	1926	98 sec	Fosfo-Lipiden onafhankelijke remmer
2.	1934	135 sec	Lupus Anticoagulans
3.	1922	119 sec	F8,11,12 remmer (5 Bethesda units)
4.	1951	74 sec	Zeer sterke Fosfo-Lipiden onafhankelijke indirecte remmer
5.	1950	59 sec	onbekend

*: referentiewaarde 29-41 sec

Voor een routine laboratorium voor klinische chemie en hematologie is dit type laboratoriumonderzoek lastig in te plannen en vraagt veel extra inspanning. Echter bij analyse in het eigen laboratorium heeft de aanvrager snel antwoord en kan snel adequaat handelen. Tevens is het voor het laboratoriumpersoneel een extra voldoening wanneer de oorzaak van de verlengde APTT in het eigen laboratorium gevonden wordt. Wat opvallend is, is dat dergelijke remmers en Lupus Anticoagulans toch vaker voorkomen dan verwacht.

teit is echter 67 %. De literatuur is niet éénduidig over de invloed van FII op m.n. het proteïne C complex (groep 5). Ons inziens voldoet de PCP aan het gestelde.



Moleculaire Biologie

050. Genotypering in urine

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

Klinisch Chemisch Laboratorium, Psychiatrisch Ziekenhuis Veldwijk, Ermelo

Voor het uitvoeren van genotyperingen wordt over het algemeen gebruik gemaakt van genomisch DNA uit witte bloedcellen. Bloed is vaak een eenvoudig te verkrijgen DNA-bron, bijvoorbeeld wanneer bij opname in een ziekenhuis toch al routine-bloedonderzoek plaatsvindt. Behalve uit bloed kan ook uit weefsel, haren, botten, nagels, tanden, sperma, slijmvlies en urine, DNA worden geïsoleerd, al zijn de methoden voor isolatie vaak moeilijker. Echter, soms zijn bloedmonsters niet voorhanden, zoals bij forensisch onderzoek. Ook kan het verkrijgen van bloedmonsters problemen opleveren, bijvoorbeeld bij jonge kinderen of bij patiënten die principiële geen bloed geven, of wanneer bij cohortstudies grote aantallen vrijwilligers gescreeend moeten worden. Het verzamelen van urine-monsters ligt dan meer voor de hand.

In deze studie beschrijven wij een protocol, volgens hetwelk op betrouwbare wijze genomisch DNA uit urinemonsters kan worden geïsoleerd. Er is onderzocht in hoeverre dit DNA-materiaal geschikt is voor toepassing van op PCR gebaseerde technieken, zoals die in ons ziekenhuis normaliter routine-

matig worden uitgevoerd met genomisch DNA uit leukocyten. Uit meer dan 30 urinemonsters werd volgens bedoeld protocol genomisch DNA geïsoleerd. Daarmee werden diverse RFLP analyses uitgevoerd, ondermeer van het apolipoproteïne E-gen en de cytochroom-P450 genen CYP2D6 en CYP2C19. Bij alle monsters werden met behulp van standaard PCRs verschillende DNA-fragmenten, in grootte variërend van 156 bp tot 1103 bp, in voldoende mate geamplificeerd. De opbrengst was over het algemeen wel lager dan wanneer met DNA uit bloedcellen werd gewerkt. Na restrictie-digestie of dot-blot analyse kon de genotypische status van elk individu worden bepaald. Deze kwam in alle gevallen overeen met wat eerder op basis van uit volbloed geïsoleerd DNA was gevonden.

Onze conclusie is dat, wanneer het verzamelen van bloedmonsters problemen geeft, urinemonsters een geschikt alternatief zijn voor de extractie van genomisch DNA voor genotyperingen, tenminste wanneer de benodigde PCR-fragmenten maximaal 1103 bp lang zijn.

051. Bile can not be used for the detection of mutated DNA from liver metastases

J.B. de KOK¹, D.W. SWINKELS¹ and T.J.M. RUERS²

Department of Clinical Chemistry¹ and Surgery², University Hospital Nijmegen St Radboud

In 25% of patients diagnosed with colorectal cancer, hepatic metastases are not detected at presentation of the colorectal primary but will develop during the follow up period. Early detection of these metastases may improve the chance of curative resection. We hypothesized that in patients with occult hepatic metastases, tumor DNA might be detected in bile which can be collected during resection of the colorectal primary.

Bile from the gall bladder and bile from the common bile duct was collected from 17 patients scheduled for resection of hepatic metastases from previously resected colorectal primary. Five of these patients containing a K-ras mutation in the hepatic lesions were selected for bile analysis. DNA was isolated from bile samples. DNA quality and the presence of K-ras mutations were tested. DNA isolation efficiency was evaluated with an internal control by quantitative PCR.

The DNA isolation method could efficiently isolate PCR amplifiable DNA from all bile samples while the mutation detection method could detect as little as 50 pg of mutated DNA. Mutant K-ras could be detected in the bile of only one patient.

Although the patients in this study represent an optimal test-group for our hypothesis, no mutant DNA could be detected in bile samples in 4 out of 5 patients. The use of controls for isolation efficiency, DNA quality and mutation detection sensitivity exclude false negative results due to technical deficits. We conclude that, although bile can be used for the detection of mutant K-ras shedded by pancreatic or biliary tract tumors, it can not be used for the detection of occult liver metastases from primary colorectal carcinomas.

052. Evaluatie van Factor V Leiden (G1649->A) / Protrombine (G20210->A) puntmutatie karakterisatie met behulp van een Line Probe Assay (LiPA)

A. LEYTE¹, P.H.M. SMITS², R. BAKKER², J.P. van STRAALEN³, F. BERENDS³, E. STET⁴, L.J. van DOORN⁴ en W.G.V. QUINT⁴

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹ en Moleculair Biologisch Laboratorium², Slotervaartziekenhuis, Amsterdam; Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam³; DDL, Delft⁴

Deze studie betreft de validatie van een reverse hybridisatie LiPA voor het gelijktijdig vaststellen van de aan- of afwezigheid (heterozygoot dan wel homozygoot) van specifieke Factor V Leiden (G1649->A) en Protrombine (G20210->A) puntmutaties in het genomisch DNA van patiënten. Van de genoemde mutaties is aangetoond dat ze geassocieerd zijn met een verhoogd risico op veneuze trombose.

Methoden

Honderd patiëntenmonsters (genomisch DNA, geïsoleerd uit EDTA-bloed) werden getypeerd voor Factor V (G1649->A) en Protrombine(G20210->A) op het LAKC van het AMC (conventionele methode: in grote lijnen volgens: Bertina et al.,

Nature 1994; 369: 64-67 en Poort et al., Blood 1996; 88: 3698-3703: afzonderlijke PCR's voor Factor V en Protrombine; restrictie-enzymdigesties en agarosegel-elektroforese). Vervolgens werden van dezelfde monsters op het Moleculair Biologisch Laboratorium van het Slotervaartziekenhuis opnieuw de Factor V Leiden (G1649->A) en Protrombine (G20210->A) genotypes vastgesteld met de LiPA methode (multiplex PCR; hybridisatie en detectie van PCR producten op strips).

De uitkomsten van het AMC en het Slotervaartziekenhuis werden met elkaar vergeleken. Bovendien werd aandacht besteed aan gebruikersgemak en kosten.

053. Het opsporen van mutaties in het DNA van patiënten met Hereditaire Hemorrhagische Telangiectasieën

Y.Y. van der HOEK¹, M.W.F.J. MUL-STEINBUSCH¹, A.E. van DIERMEN¹, E.C. LASES¹ en C.J.J. WESTERMANN²
Klinische Chemie¹ en Afdeling Longziekten², St. Antonius Ziekenhuis Nieuwegein

Hereditaire Hemorrhagische Telangiectasieën (HHT) of de ziekte van Rendu Osler Weber is een erfelijke aandoening die wordt gekenmerkt door gemakkelijk bloedende vaatverwijdingen (telangiectasieën) in huid en slijmvliezen (neus) en soms in andere organen. De diagnostiek is gebaseerd op de aanwezigheid van een of meerdere telangiectasieën en aan familiair voorkomen van HHT.

De overerving is autosomaal dominant en een homozygote status is vermoedelijk niet levensvatbaar. Tot op dit moment zijn twee afwijkende genen gevonden op chromosoom 9 en 12 die vermoedelijk tot de ziekte leiden. Mutaties in het endogline gen op chromosoom 9 leiden tot een vorm van HHT met vooral veel orgaanafwijkingen. Afwijkingen in het activin like kinase 1 receptor (ALK-1) gen op chromosoom 12 geeft vaak een wat mildere vorm van HHT.

Momenteel zijn er ± 50 mutaties bekend in het endogline gen

en een aantal in het ALK-1 gen van verschillende families over de gehele wereld.

In het St. Antonius Ziekenhuis zijn ongeveer 60 Nederlandse en Antilliaanse families met deze ziekte bekend. Van al deze families zijn stambomen gemaakt en is van een groot aantal (± 600) familieleden DNA geïsoleerd.

Inmiddels is in samenwerking met Dr. D. Marchuk van Duke University, Durham, USA een viertal mutaties in het gen voor endogline bekend geworden die voorkomen in de Nederlandse en Antilliaanse populatie. Met behulp van PCR technieken worden de Nederlandse en Antilliaanse families gescreend op het voorkomen van de mutaties en is bekend geworden hoe de Nederlandse mutaties zijn geïntroduceerd op de Antillen.

Met behulp van PCR en SSCP techniek wordt verder intensief gezocht naar het voorkomen van mutaties binnen de overige families.

054. Analysis of PCR products of the Factor V Leiden Mutation by Capillary Electrophoresis and UV detection

Y.M.C. HENSKENS and G.A.E. PONJEE

Laboratory for Clinical Chemistry and Hematology, Diagnostisch Centrum SSDZ, Reinier de Graaf Groep, Delft

Capillary gel electrophoresis (CGE) is a fast separation method that can be used to automate DNA analysis. Since it was shown that the FV Leiden point (G1691A) mutation caused resistance for cleavage by activated protein C, PCR product detection has become a routine analysis in clinical laboratories. The aim of the present study was to automate our conventional method to detect the PCR products (agarose gel electrophoresis) of the FV Leiden mutation by CGE combined by ultraviolet (UV) detection instead of the more commonly used and more expensive laser induced fluorescence (LIF) detection method for DNA. For this purpose we investigated both a commercial "ready to use CGE kit" (Beckman eCAP dsDNA 1000 kit) and a home-made replaceable polyacrylamide gel buffer on P/ACE 5000 capillary electrophoresis equipment (Beckman). Using the same methods for DNA isolation, PCR and PCR digestion preceding the conventional separation method (1) and the CGE method we could only detect the PCR fragments by CGE and UV detection after introducing a

simple desalting sample preparation procedure. Both the conventional agarose gel electroforesis method, the commercial kit CGE method and the home-made CGE gel buffer demonstrated 30 wild-types, 30 heterozygotic and 2 homozygotic samples out of 62 patient samples that were presented to our laboratory for the analysis of the FV Leiden mutation. Reproducibility of migration times for the different base pair lengths using the same home-made polyacrylamide gel buffer was determined for a period of three weeks; variation coefficients were very small and varied from 2.2 % (116 bp peak) tot 2.6 % (37 bp peak). We conclude that CGE combined with UV detection using a replaceable home-made gel buffer is a rapid, highly reproducible and reliable method to analyse PCR products of the FV Leiden mutation and can be used in routine laboratory.

1. G.A.E. Ponjee en W. Quint, Ned T Klin Chem 1997; 22: 133.

055. Simultaneous phenotyping and DNA in situ hybridization on immobilized cells

M.L. TJOA, S. GRIFFIOEN, M. de JONG, C. OUDEJANS and I. van WIJK

Molecular Biology Laboratory, Department of Clinical Chemistry, University Hospital, Vrije Universiteit, Amsterdam

A multiparameter in situ procedure permitting identification of target cells by immunophenotyping with simultaneous analysis of cytogenetic aberrations using chromosome specific DNA probes has been developed. Immunophenotyping is performed using a 3-step staining procedure with visualization by peroxidase catalyzed reporter deposition of the brightly fluorescent (green) FITC- or (blue) AMCA-tyramide complexes. Single fluorescent cells can be detected among high numbers of negative cells using this sensitive assay. Moreover, the complex is stable enough to withstand the subsequent DNA in situ hybridization (FISH) using directly labelled fluorescent probes (Vysis Inc.), while the availability of different fluorochromes permits versatile exchange of substrate color used in either assay. Using conventional fluorescent microscopy, positive cells sequentially labelled for cell markers and chromosomal content can be visualized directly permitting simultaneous analysis of cellular identity and chromosomal

aberrations. The procedure can be completed within 28 hours. Phenotypic analysis of rare cells with simultaneous detection of chromosomal abnormalities in positive cells can be of great value for a variety of clinical procedures such as detection of circulating cancer cells for diagnostic or prognostic purposes, analysis of blood cells following allogeneic bone marrow transplantation or for non-invasive prenatal diagnosis. In our laboratory, the combination of fluorescent immunocytochemistry and FISH is used to detect and analyse fetal trophoblast cells circulating in maternal blood during early pregnancy. These cells are a source of fetal DNA and can be used for non-invasive prenatal diagnosis of chromosomal aberrations. Furthermore, extravillous trophoblast cells circulating in maternal peripheral blood may permit early diagnosis of pregnancy-related diseases such as pre-eclampsia. This possibility is currently under investigation in our laboratory.

056. ApoE-genotypering met capillaire elektroforese als detectiemethode

O. BEKERS, J. de VRIES, P. WIJNEN en M.P. van DIEIJEN-VISSER
Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch ziekenhuis, Maastricht

Apolipoproteïne E (apoE) is een eiwit dat een belangrijke rol speelt in het lipiden metabolisme (1). De meest voorkomende apoE isotypen zijn apoE2, apoE3 en apoE4. De aanwezigheid van apoE2 is geassocieerd met familiale dysbetalipoproteïnemie, terwijl er tegenwoordig veel onderzoek wordt verricht naar de relatie tussen apoE4 en de ziekte van Alzheimer (2). Het bepalen van het apoE fenotype gebeurt met isoelectrische focussing. Aan deze methode kleven diverse bezwaren (3). Met de komst van de PCR (Polymerase Chain Reaction) is het momenteel betrekkelijk eenvoudig een apoE genotypering uit te voeren. Na de amplificatie van het geïsoleerde 'target-DNA' vindt digestie plaats met het restrictie-enzym HhaI (Pharmacia) en vindt de analyse van het PCR-product plaats met agarose-gel-elektroforese gevolgd door kleuring van het DNA met ethidiumbromide. In plaats van de detectie met agarose is een detectiemethode met behulp van capillaire elektroforese (CE) ontwikkeld.

Methode: De condities waaronder de analyse van de apoE-isotypen met CE plaats vindt worden hier kort weergegeven: P/ACE 5500 systeem (Beckman) met laserfluorescentie (488 nm/520 nm); 4 min voorspoelen met gelbuffer (1,5 ml eCAP™dsDNA 1000 Gel Buffer + 4,5 µl LIFluor™dsDNA 1000 Enhance) onder hoge druk vervolgens 0,2 min met TBE buffer (89 mM Trisboraat, 0,2 mM EDTA, pH 8,3) onder lage

druk; elektrokinetische injectie: 25 sec, 10 kV (1 µl monster+ 300 µl milliQ); scheiding: 5 min, 12,5 kV; na run 0,5 min spoelen met HCl en vervolgens 0,5 min met H₂O.

Conclusie: De bepaling van het apoE-isotype door apoE-genotypering met CE als detectie verdient in een aantal opzichten de voorkeur boven gel-elektroforese. Zo is de methode sneller en goed te automatiseren, is er een betere scheiding van de gedigesteerde apoE-fragmenten, is de CE gevoeliger en kan er eenvoudig een kleine batch monsters geanalyseerd worden. Nadelen van de CE zijn dat de methode duurder is en dat de bediening van de CE-apparatuur specifieke kennis vereist.

Literatuur

1. Siest G, Pillot T, Regis-Bailly A, Leiniger-Muller B, Steinmetz J, Galteau M-M, Visvikis S. Apolipoprotein E: An important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* 1995; 41: 1068-1086.
2. Mayeux R, Saunders AM, Shea S, Mirra S, Evans D, Roses A et al. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 1998; 338: 506-511.
3. Zannis VI, Breslow JL. Human very low density lipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and post translational modification. *Biochemistry* 1981; 20: 1033-1041.

057. Expression based RT-PCR analysis of differentially expressed alleles in the absence of RFLP

B. WESTERMAN, S. GOOYER, I. van WIJK and C. OUDEJANS

Molecular Biology Laboratory, Department of Clinical Chemistry, University Hospital, Vrije Universiteit, Amsterdam

An increasing number of genes controlling critical steps in cell determination and - differentiation show differential expression of alleles according to parental origin (genomic imprinting). Expression-based direct assays to analyze mono-versus biallelic expression frequently use restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of cDNA copied from RNA of cells suspected to show differential expression. Using the XIST gene as a model system, we developed a reliable and reproducible allele-specific RT-PCR method that permits analysis of mono- versus biallelic expression in the absence of restriction fragment length polymorphism (RFLP). Total RNA was extracted from confluent explant cultures of chorionic villus samples. Prior to extraction, cultures were screened for cellular identity/purity by immunophenotyping, foetal sex by fluorescent XY DNA in situ hybridization and XIST polymorphism by PCR of genomic DNA. For allele-specific RT-PCR

analysis of XIST mRNA, a 628 bp XIST cDNA fragment was amplified using the one step Superscript II RT-PCR system (Life Technologies). PCR fragments were diluted 1:10,000 and re-amplified in separate reactions with nested allele-specific XIST primers recognizing a single base polymorphism (G:A at base 15944) (allele frequencies of 0.31 [G; allele 1] and of 0.69 [A; allele 2]) in combination with a common upstream nested primer using a reduced number of PCR cycles (n=20). By this method, the mono- and biallelic expression of the XIST gene was predicted correctly, reproducibly and reliably in samples known to be homozygous for either allele A or B or known to be heterozygous for both XIST alleles. This straightforward method can be used both for clinical and scientific applications where expression based RT-PCR analysis of differentially expressed alleles is necessary but hampered by the absence of RFLP.

058. Fully automated DNA mutation analysis using a robotic pipetting workstation and the molecular beacon technology

M.L. SMIT, B.A.J. GIESENDORF, J.A.M. VET, J.M.F. TRIJBELS and H.J. BLOM

University Hospital Nijmegen, Laboratory of Pediatrics and Neurology, Nijmegen

Knowledge of the molecular basis of many different diseases is expanding fastly. The demand for DNA mutation analysis has increased rapidly and will continue to grow in the next years, necessitating the development of a fully automated assay.

We developed a fully automated and fast method for molecular genetic analyses, combining a robotic workstation for DNA isolation with the molecular beacon technology for DNA analysis.

As an example for the development of this assay we used the molecular genetic analysis of the C677T mutation in the MTHFR gene, which has been associated with a significant risk for cardiovascular diseases and neural tube defects.

The Biomek 2000 is a robotic workstation that can perform DNA isolation on a 96 wells format using magnetic beads and an integrated magnetic particle concentrator. For analysis of the DNA samples, the molecular beacon technology was applied. Molecular beacons are hairpin probes that only show fluorescence upon hybridisation and have an enhanced specificity compared to linear probes to detect single base pair mutations. By developing a set of multicolour molecular beacons, one specific for the wild type allele and the other for the mutated allele, we are able to distinguish between the three different genotypes. Fluorescence of both molecular beacons in a single tube was measured on a 96 wells format during PCR (real time) with the ABI Prism 7700.

Within six hours, DNA of 96 samples was isolated, amplified and analysed. Genotypes were all unambiguously interpretable and in agreement with the outcomes determined by conventional methods.

This technology is not only very elegant, robust and much faster than current available techniques, but also eliminates the chance of crossover contamination because fluorescence is measured through closed tubes.

059. Comparison of molecular beacons and TaqMan probes for quantification of messenger RNA

B.A.J. GIESENDORF¹, J.A.M. VET², S. MARRAS³, J.M.F. TRIJBELS² and H.J. BLOM²
University Hospital Nijmegen St Radboud, Dept Clinical Chemistry CKCL¹ and Dept Pediatrics²; Public Health Research Institute, Dept Molecular Genetics³, New York

The detection of expression levels of specific mRNA molecules can provide useful information for the diagnosis of disease or the monitoring of treatment. Current methods for RNA quantification, like competitive PCR or Northern blot analysis, are laborious and unfit to be used in a routine setting.

The TaqMan technology, based on real time detection of PCR amplification, allows high throughput quantitative analysis of samples with a minimal risk of cross contamination. The goal of this study is to compare TaqMan probes with the recently developed molecular beacons for quantification of mRNA. Molecular beacons are fluorescent probes that have a hairpin structure. Compared to linear probes they have an enhanced specificity. Moreover, molecular beacons can be constructed that fluoresce in a wide variety of different colors.

Both TaqMan probes and molecular beacons were designed to detect cystathionine beta synthase (CBS) mRNA in cultured fibroblasts and both types of probes had identical target sequences.

CBS expression was compared to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA levels on a thermal cycler with real time fluorescent detection. Samples were analysed in duplicate and CBS and GAPDH were measured in separate tubes.

Both molecular beacons and TaqMan probes detected similar levels of GAPDH and CBS mRNA in standard dilution series and all fibroblast samples. Both methods displayed equally high sensitivity and reproducibility was excellent.

In conclusion, molecular beacons are excellently suited for nucleic acid quantification. Since molecular beacons can be labeled with a wide variety of fluorophores, multiple targets can be detected in one tube. This permits closer monitoring of efficiency of extraction procedures and performance of (RT-) PCR thus enabling the development of even more accurate quantitation assays.

060. Haemochromatose in the Dutch population

R.J. SLINGERLAND, I.J.M. de KRUIJF, N.J.PH GIJSELHART-NIVILLAC, C. van TEEFELEN, F. van der GRAAF and H.L. VADER
Clinical Laboratories, Sint Joseph Hospital, Veldhoven

Genetic haemochromatosis is an autosomal recessive disorder resulting in iron overload. In northern European populations, where the disease is believed to have originated, as many as 1 in 300 individuals are thought to be affected. Two mutations have been associated with hereditary haemochromatosis known as C282Y and H63D. Clinically manifested haemochromatosis is associated with the C282Y mutation in about 81% of the cases. Although the prevalence of the C282Y mutation has been analyzed in our neighboring countries no studies have been undertaken so far to determine the prevalence of these mutations in the Dutch population.

Therefore, to determine the prevalence of the C282Y mutation we have analyzed (using PCR) EDTA-blood from 222 patients who attended our hospital for reasons not associated with haemochromatosis and who had not received a bloodtransfusion in the past 3 months. Twenty-eight persons were heterozygous for this mutation leading to a prevalence of the

C282Y mutation of 13% (95% Confidence Interval (CI): 8.2-16.9). This means that 1 in 256 persons (1/8 x 1/8 x 1/4) is homozygous for the C282Y mutation (95% CI: 1 in 139-595). For a general hospital as ours serving a population of approximately 150,000 persons, this means that theoretically 252-1079 persons (95% CI) are homozygous for the mutation.

At the start of our study only a few patients were known in our hospital with hereditary haemochromatosis. Since then we found 16 patients who are homozygous for the C282Y mutation and who have or had symptoms of disease varying from liver cancer to diabetes and seronegative rheumatoid arthritis (reumafactor absent). Our results on the prevalence of the C282Y are the first published for the Dutch population and are comparable with those reported from other countries and indicate that in the past hereditary hemochromatosis was not properly considered in the differential diagnosis.

Neurologie & Psychiatrie

061. Correlatie van neurogenetische factoren met betrekking tot de ziekte van Parkinson

M.A.M BON¹, E.N.H JANSEN-STEUR², R.A.I de VOS³, F.A.J.T.M van den BERGH¹ en I. VERMES¹
Afdeling Laboratorium¹ en Neurologie², Medisch Spectrum Twente, Streeklaboratorium Pathologie Oost Nederland³, Enschede

De ziekte van Parkinson (Parkinson Disease, PD) is na de ziekte van Alzheimer de tweede meest voorkomende neurodegeneratieve afwijking. De diagnose kan alleen post-mortem met zekerheid worden bevestigd.

Bij leven wordt de term Parkinsonisme gehanteerd (20% kans op misdiagnose) waarbij minstens drie van de volgende symp-

tomen aanwezig moeten zijn: spierstijfheid, rusttremor 4-6 Hz, bewegingsarmoede, verlies van houdingsreflexen of abnormale traagheid m.b.t geestelijke activiteit.

Binnen een PD, Parkinsonisme en een controle groep werd het polymorfisme bestudeerd van apoE en het cytochrom P450 enzymstelsel. Het apoE-polymorfisme is een belangrijke de-

terminant voor het ontwikkelen van cardiovasculaire ziekten en ziekte van Alzheimer.

In dit onderzoek is gekeken of er een correlatie bestaat tussen apoE-subtype en twee mutanten van het cytochroom P450 enzymstelsel 2D6*4 of *3 in samenhang met de ziekte van Parkinson. Bij de drie groepen werden de volgende genotypeeringen uitgevoerd: 2D6*3, 2D6*4, apoE2, -E3 en -E4. DNA werd geïsoleerd uit bloedmonsters ontdoed met EDTA van de Parkinsonisme- en controlegroep. Van de PD-groep is het DNA geïsoleerd uit hersenweefsel, ingebed in paraffine, m.b.v xyleen. Vervolgens zijn voor alle monsters de specifieke PCR reacties uitgevoerd gevolgd door specifieke restrictie fragment analyse.

Resultaten staan weergegeven in de tabel waarbij in A de allelfrequentie van elke mutatie per groep is berekend en in B gecombineerde allelfrequentie. In een vergelijking van de PD groep met de controle groep is een significante verhoging van de *4 allelfrequentie waarneembaar (Odds ratio [OR] 2,2 p<0,05). Betreffende de gecombineerde allelfrequentie tussen deze groepen is een significante verhoging waarneembaar bij *4 + E2 (OR 2,4 p<0,05) en bij *3 +E4 (OR 23 p<0,05).

	PD (n = 50)	Parkinsonisme (n = 149)	Controle (n = 96)
<i>A</i>			
<i>Allelfrequentie %</i>			
2D6*4	35	14,1	19,8
2D6*3	6	3,7	3,0
APO-E2	12	10,1	6,8
APO-E3	69	73,1	79,7
APO-E4	19	16,7	12,5
<i>B</i>			
<i>Gecombineerde allelfrequentie %</i>			
*4 + E2	14,1	7,0	6,0
*4 + E3	68,7	75,0	78,8
*4 + E4	17,2	18,0	15,1
*3 + E2	0	0	6,7
*3 + E3	66,7	77,7	91,7
*3 + E4	33,3	22,3	1,6

Hart- en vaatziekten

062. Paraoxonase 2 (PON2) polymorfisme beschermt FH-patiënten tegen atherosclerose

H.A.M. VOORBIJ¹, F.R. LEUS¹, J. PRINS² en J.J.P. KASTELEIN²

Klinische Chemie, Academisch Ziekenhuis¹, Utrecht; Academisch Medisch Centrum², Amsterdam

Familiaire hypercholesterolemie (FH) is een frequent voorkomende metabole ziekte, die geassocieerd is met een verhoogd risico op het ontstaan van vroegtijdig vaatlijden. Er bestaan sterke verschillen in de ernst en het begin van hart-en vaatziekten tussen de patiënten met FH, zelfs binnen families die hetzelfde LDL-receptorgendefect bezitten. Dit suggereert dat er naast het LDL-receptorgendefect additionele factoren een rol spelen bij het ontstaan van atherosclerose. Eén van de potentiële factoren is het enzym paraoxonase 1 (PON1) dat verbonden met het apoA1 voorkomt op het HDL en in staat is LDL te beschermen tegen oxidatieve modificatie ten gevolge van lipidperoxidatie. Recent is aangetoond dat er ook een PON-lijke gen bestaat, PON2, dat eveneens bij iedereen voorkomt.

In ons onderzoek hebben we gekeken naar het voorkomen van polymorfismen in het PON1 gen codon 192 en het PON2 gen codon 311 bij 226 patiënten met FH. Deze groep werd verdeeld in FH-patiënten met atherosclerose (FH-s, n=95) en FH-patiënten zonder atherosclerose (FH-a, n= 131). De klassifica-

tie van FH-patiënten en atherosclerose werd uitgevoerd op basis van klinische criteria. De controle groep bestond uit 201 gezonde bloeddonoren die "gematched" waren voor leeftijd, geslacht en ras met de FH-populatie. Tussen de FH-s en FH-a populatie was geen verschil in de cholesterol concentratie. Genotypen voor PON1 en PON2 werden onderzocht door gebruik te maken van PCR-amplificatie en restrictie-enzymen. De verdeling van de PON1- en PON2-polymorfismen waren in Hardy Weinberg equilibrium in elke groep en in de totale populatie. In de FH-s populatie kwamen geen personen voor die homozygoot waren voor het polymorfisme van PON2 311 (CysCys). Dit was statistisch significant verschillend (p<0,05) ten opzichte van de FH-a en controle-populatie waar het polymorfisme in ongeveer 7% van de personen voorkwam. We concluderen dat homozygotie voor PON2 Cys311 mogelijk een bescherming biedt tegen het ontstaan van atherosclerose in FH-patiënten.

063. Het immuunsysteem bij patiënten met reflex dystrofie

M. de METZ¹, W. OOSTERHUIS², J van LIMBEEK² en G RIBBERS²

Canisius Wilhelmina Ziekenhuis¹ en Sint Maartenskliniek², Nijmegen

Reflex dystrofie (reflex algoneurodystrofie e.v.a. benamingen) is een syndroom dat typisch kan volgen op een gering perifeer trauma. Het kan echter ook uitgelokt worden door ziekten als CVA en hartinfarct. De belangrijkste klinische verschijnselen zijn pijn, vasomotore stoornissen in extremiteit, arm of been en trofische veranderingen. De diagnose is lastig, het ziektebeloop onvoorspelbaar en de etiologie onbekend. Momenteel wordt een oorzaak meer gezocht in een ontspoord ontstekingsproces dan in een betrokkenheid van het sympatische zenuwstelsel, hoewel er maar weinig data bekend zijn over het immuunsysteem bij patiënten met deze ziekte.

Bij 13 opeenvolgende patiënten van de polikliniek van de St Maartenskliniek en bij 21 controle personen werd laboratoriumonderzoek naar het immuunsysteem gedaan. De patiënten (4 mannen, 9 vrouwen) hadden klachten van 3 maanden tot 8 jaar en voldeden aan de criteria volgens Kozin voor reflex

dystrofie en aan de in 1994 opgestelde criteria voor het "chronic regional pain syndrome type 1".

Resultaten van IgG, IgA, IgM en serum-eiwitelektroforese vielen voor de patiënten in het referentiewaardengebied. Eén patiënt had een verhoogde BSE (50 mm/uur) en een andere patiënt een verhoogd aantal leukocyten ($13 \times 10^9/l$). Het gemiddelde aantal monocyten, T cellen, B cellen, NK cellen, CD4 en CD8 pos T cellen, en CD25 en HLA-DR geactiveerde T cellen van patiënten en controle personen verschilde niet significant. Verschil kon evenmin aangetoond worden, wanneer rekening werd gehouden met medicatie (NSAID's) of ernst van de ziekte.

Wij konden geen verandering aantonen in de gemeten parameters van het immuunsysteem bij patiënten met reflex dystrofie. Indien een ontstekingsproces betrokken is bij het ontstaan van deze ziekte blijft dit beperkt tot lokaal niveau.

064. Effects of triglyceride-lowering therapy on platelet activation status in patients with endogenous hypertriglyceridemia

F.H.A.F. de MAN¹, R. NIEUWLAND², A. van der LAARSE¹, F.P.H.TH.M. ROMIJN², A.H.M. SMELT³, J.A. GEVERS LEUVEN⁴ and A. STURK²

Departments of Cardiology¹, Clinical Chemistry² and Internal Medicine³, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; TNO-prevention and Health, Gaubius Laboratory⁴, Leiden, The Netherlands

Platelets play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis and acute coronary syndromes. Although hypertriglyceridemia is a risk factor for cardiovascular disease and is associated with elevated fibrinogen levels, as are factor VII and plasminogen activator inhibitor-1 levels, the effects of triglycerides on platelet function and activation status in vivo are less well known. To evaluate the in vivo platelet activation status in patients with hypertriglyceridemia, platelet activation was assessed by double label flow cytometry.

Blood was collected from 17 unrelated patients with endogenous hypertriglyceridemia, which received (double-blind cross-over study) a daily dose of 400 mg of bezafibrate or placebo for 6 weeks. Between the two periods of medication a wash-out period of six weeks was present. The control group consisted of 17 normolipidemic, age- and sex-matched volun-

teers. Platelet activation status was assessed at the end of the placebo and treatment periods by flow cytometry, using monoclonal antibodies directed against human P-selectin (CD62P), GP53 (CD63) and (platelet-bound) fibrinogen. Platelets were identified on basis of their characteristic light scatter profile and binding of anti-glycoprotein Ib. No differences were observed in the expression of CD62P and fibrinogen between patients and controls, but the expression of GP53 was elevated ($16.3 \pm 4.8\%$) compared to controls ($8.9 \pm 3.4\%$; $P < 0.001$). Bezafibrate therapy improved serum lipid values, but did not affect expression of CD62P or CD63. In contrast, the expression of GP53 normalized to $13.1 \pm 4\%$ ($P < 0.05$).

In conclusion, patients with hypertriglyceridemia have an increased platelet activation status in vivo, which normalizes by bezafibrate therapy.

065. Parameters of oxidative stress in urine of patients undergoing minimal invasive coronary artery bypass grafting without cardiopulmonary bypass using the Octopus technique: a preliminary study

W.B. GERRITSEN¹, W.-J.P. van BOVEN², I.A. JONG, A. LIEM¹, L.P. AARTS³ and F.J. HAAS¹

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

During coronary artery bypass grafting (CABG) with use of cardiopulmonary bypass (CPB) the heart is in a global ischemic phase due to aortic crossclamping despite protection by cooling down the body temperature to 30°C and the cold cardioplegia. This global ischemia can be prevented by doing CABG without CPB which is now an accepted technique of myocardial revascularization. To perform accurate anastomoses in the beating heart, surgeons should be provided with a well expired and immobilized target site. This can be established with the Octopus tissue stabilizers which allow displacement and rotation of the heart, by suction, to present the target site and so enable multivessel revascularization [1].

The aim of this pilot study was to determine to which extend the potential and actual damage in patients undergoing minimal invasive CABG due to ischemia and reperfusion injury occur. The following parameters in urine are measured: hypoxanthine, xanthine, uric acid, malondialdehyde and for reasons of standardization creatinine.

Samples were taken from 20 patients undergoing elective first time MI-CABG using the Octopus technique. Twelve patients were male and eight female with mean ages of 62 ± 13 years and 67 ± 9 years respectively. The number of anastomoses were 2 ± 1 (men) and 3 ± 1 (female) respectively. This study was approved by the local medical committee and all participants gave written informed consent.

Urinary samples were collected from patients before and after minimal invasive CABG at specific time points without any preservative:

- 24 hours before surgery
- arrival Intensive Care Unit (ICU)
- 9 hours ICU
- the first postoperative day (8.00 am)

The concentrations in urine of the purines hypoxanthine, xanthine and uric acid, malondialdehyde are slightly increased during minimal invasive coronary artery bypass grafting. Comparing these results with our previous findings in a group of patients undergoing CABG with use of cardiopulmonary bypass [2], the measured indices hypoxanthine, xanthine and malondialdehyde are at least four times lower at the first postoperative day. We conclude that patients undergoing MI-CABG have a mild form of oxidative stress.

Literature

1. Jansen EWL, Lahpor JR, Borst C, Gründeman PF, Bredée JJ. Off-pump coronary bypass grafting: How to use the Octopus tissue stabilizer. *Ann Thorac Surg* 1998; 66: 576-579.
2. Gerritsen WB, Aarts LP, Morshuis WJ, Haas FJ. Indices of oxidative stress in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 737-742.

066. Effect of acute phase response on cumulative troponin T release

M.P. van DIEIJEN-VISSER¹, J.A. KRAGTEN², A.H. KLEINE¹ and W.Th. HERMENS³

Department of Clinical Chemistry¹, Academic Hospital Maastricht; Department of Cardiology, Atrium Heerlen²; Cardiovascular Research Institute Maastricht³, University of Maastricht

We studied a possible effect of the extent of the acute phase response after acute myocardial infarction, on the cumulative release of troponin T. The height of the acute phase response, might influence the cumulative release of the free cytoplasmic cardiac markers, creatine kinase (EC 2.7.3.2) and hydroxybu-

tyrate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) and markers bound to myofibrillar structures, like troponin T, in a different way. Therefore, cumulative releases of the acute phase proteins C-reactive protein, α 1-antitrypsin and haptoglobin were measured during the first 168 hours after acute myocardial

infarction, and were related to the cumulative release of the free cytoplasmic cardiac enzymes, creatine kinase and hydroxybutyrate dehydrogenase and to that of troponin T. The study was performed in patients treated with thrombolytic therapy (n=16) and in patients not treated with thrombolytic therapy (n=6). On the basis of clinical symptoms and coronary arteriogram within 24 hours, the patients treated with thrombolytic therapy were divided into two groups, reperfused (n=9) and non-reperfused (n=7). In the patients not treated with thrombolytic therapy absence of spontaneous early reperfusion was judged only from clinical symptoms. Cumulative protein release (Q) was calculated using a two-compartment model for circulating proteins.

067. Increased preoperative C-reactive protein plasma concentrations as a risk factor for infections after cardiac surgery

E.J. FRANSEN¹, J.G. MAESSEN¹, T.T. ELENBAAS¹ and M.P. van DIEIJEN-VISSER²

Department of Cardiopulmonary Surgery¹, Academic Hospital Maastricht, Department of Clinical Chemistry, Academic Hospital Maastricht²

Purpose: We examined the possible predictive role of preoperative C-reactive protein (CRP) concentrations for postoperative infections in patients undergoing cardiac surgery.

Methods: CRP concentrations were determined on the day before surgery, and at days 1 to 4 and 6 after surgery in 593 consecutive patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. Furthermore, we documented infectious disease related data.

Results: Patients developing an infection during the postoperative course (n=85) had significantly higher CRP levels at the day before surgery, 17.8 ± 3.9 mg/L versus 7.7 ± 0.7 mg/L ($p < 0.001$), and at day 4 and 6 after surgery. The incidence of postoperative infections was significantly higher in patients with enhanced preoperative CRP levels than in those with normal preoperative CRP levels (upper quartile vs. lower three quartiles) 25.2% vs. 11.2%, respectively ($p < 0.001$). Further-

Conclusions

- Cumulative CRP-release is significantly higher in patients not receiving thrombolytic therapy, as in accordance with earlier studies.
- For α -1-antitrypsin and haptoglobin, slower reacting acute phase proteins, no significant differences were observed between the groups.
- Increased C-reactive protein response (QCRP) does not result in a different relative release of troponin T, a protein bound to the myofibrils, compared to the release of free cytoplasmic protein hydroxybutyrate dehydrogenase (Qtroponin T / QHBDH).

more, the length of postoperative hospital stay was significantly longer in patients with enhanced preoperative CRP levels than those with normal preoperative CRP levels, 10.8 ± 1.2 vs. 7.7 ± 0.3 days. Multivariate analysis including "classical" risk factors and increased preoperative CRP levels, demonstrated that preoperatively increased CRP was the most important variable predicting postoperative infection (OR=2.7; 95% CI= 1.7 to 4.3; $p < 0.001$).

Conclusions: This study showed that patients with enhanced preoperative CRP concentrations are at increased risk for postoperative infections and have a longer postoperative hospital stay.

Clinical implications: Therefore, preoperative measurement of CRP may be a useful, predictive marker in risk stratification for postoperative infections in patients scheduled for cardiac surgery.

068. Plasma homocysteine is highly dependent on vitamin B12 status in apparently healthy East-Indians living in Curaçao

M.R. FOKKEMA¹, D.A.J. BROUWER¹, C. de GRAM^{1,2}, K. L. van OIRSCHOT^{1,2}, D.-J. REIJNGOUD³, F.P.L. van der DIJS² and F.A.J. MUSKIET¹

Pathology and Laboratory Medicine, Groningen University Hospital¹ and Public Health Laboratory, Curaçao (The Netherlands Antilles)², Laboratory for Metabolic Disorders, Groningen University Hospital³

Subjects from East-India who migrated to Western countries have unexplained high coronary artery disease (CAD) risk. Plasma homocysteine (Hcy) is a recently recognized CAD risk factor. Its concentration is dependent on genetic and nutritional factors. We investigated the influence of vitamin B6, vitamin B12 and folic acid status on plasma Hcy in 36 apparently healthy adults of East-Indian descent living in the Caribbean island of Curaçao (The Netherlands Antilles). Their median age was 40 years (range 23-64), male/female ratio was 19/17, and 19/36 were self-reported vegetarians. Whole blood vitamin B6, serum vitamin B12, serum and erythrocyte (RBC)

folic acid, and plasma Hcy were measured during an oral vitamin supplementation regimen with 25-31*US-RDA vitamin B6 (50 mg/day), 500*RDA vitamin B12 (1 mg/day) and 25-28*RDA folic acid (5 mg/day). Sampling occurred at baseline (P0); after 1 week vitamin B6 (P1); after 2 weeks vitamins B6+B12 (P2); and after 2 weeks vitamins B6+B12+folic acid (P3). Results (medians, ranges) are depicted in the Table. Numbers of subjects (in percentage) who exhibited significant individual Hcy decreases or increases (Δ Hcy beyond 2.8 CV_{anal,biol}), compared with the previous sampling point, are depicted in the last two rows.

	P0	P1	P2	P3
Vitamin B6 (nmol/l)	69(33-1600)	485(82-844) ¹	460(69-3360)	445(46-1538)
Vitamin B12 (pmol/l)	137(68-470)	135(45-436)	348(97-797) ²	372(122-787)
Serum folic acid (nmol/l)	27(9-256)	22(8-34)	22(8-32)	40(24-471) ³
RBC folic acid (nmol/l)	726(267-1731)	718(324-1898)	691(304-1565)	993(369-1806) ³
Plasma Hcy (μ mol/l)	10.1 (6.3-36.8)	9.6 (5.3-36.1)	8.2 (5.1-26.0) ²	7.2(3.8-19.7) ³
Number Hcy decrease (%)		3	33	14
Number Hcy increase (%)		8	0	0

Significant by paired Student's t-test corrected for type-1 errors ($p < 0.05$); 1: compared with P0; 2: compared with P1; 3: compared with P2

The percentage subjects who had baseline circulating vitamin concentrations below our local reference ranges amounted to 31 for vitamin B6 (reference range: 55-110 nmol/l), 42 for vitamin B12 (120-700 pmol/l), 0 for serum folic acid (4-30 nmol/l) and 11 for RBC folic acid (430-1360 nmol/l). Vitamin concentrations increased upon supplementation. Plasma Hcy decreased from P1-P2 (after vitamin B12) and from P2-P3 (after folic acid). Thirty-three percent showed decreases upon vitamin B12 and 14% after folic acid administration. Seventy-

one percent had a greater Hcy decrease from P1-P2 than from P2-P3. We conclude that a considerable percentage did not exhibit the lowest possible baseline plasma Hcy concentrations, partially because of low folic acid status but notably because of vitamin B12 marginality. Low vitamin B12 status is likely to be caused by their vegetarian diet. The ensuing suboptimal Hcy concentrations may contribute to the high CAD risk.

069. De waarde van Troponin-i op de SEH bij patiënten die verdacht worden van AMI

H.J.L.M. ULENKATE¹, P.G. MELMAN², W.H. PASTEUNING² en N.C.V. PÉQUÉRIAUX¹
Centraal Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹ en Afdeling Cardiologie², St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg

Jaarlijks melden zich ±1000 patiënten met pijn op de borst op de Spoed Eisende Hulp. Hiervan blijken 250 patiënten een duidelijk AMI te hebben. 250 Patiënten uiten klachten die niet van cardiale oorsprong zijn. De overige patiënten (n=500), verdacht van een AMI, worden onderzocht met de vraagstelling of Troponine-i

- een meerwaarde heeft ten opzichte van de CKMB-mass in het onderscheid tussen cardiale en niet cardiale oorzaken van pijn op de borst
- de patiënten met instabiele angina pectoris kan aantonen
- de gezondheidskosten kan drukken (b.v. optimalisatie van het beddengebruik op de hart-IC).

Van 107 patiënten, die verdacht worden van cardiale klachten, worden de conventionele hartmarkers inclusief troponine-i prospectief in de tijd gevolgd. Troponine-i werd gemeten op

de Immuno-1 van Bayer (VC's: laag=4,1%, midden=2,4%, hoog=1,6%; detectie limiet 0,1 ng/ml).

Resultaten (AMI versus niet AMI): T=0 sensitiviteit=68,8%, specificiteit=96,7%, NPV=94,6%; T=8 sensitiviteit=100%, specificiteit=92,3%, NPV=100%.

Troponine-i draagt bij in:

- een beter onderscheid tussen klachten van cardiale en niet cardiale oorsprong
- de detectie van instabiele angina pectoris patiënten
- de optimalisatie van de bezetting van de hart-IC bedden.

Verder kan troponine-i bijdragen aan het voorkomen van onnodig diagnostisch onderzoek en het verminderen van het aantal hartmarkers en meetpunten. Een observatieverblijf nabij de SEH kan mogelijk de gezondheidskosten reduceren. De reden van opname van 44% van de patiënten zou heroverwogen kunnen worden.

Interne Geneeskunde

070. Nitric oxide production is reduced in patients with chronic renal failure

R. WEVER¹, P. BOER², M. HIJMERING^{2,3}, E. STROES², M. VERHAAR², J. KASTELEIN⁴, H. van RIJN¹, H. KOOMANS² and T. RABELINK²

Department of Clinical Chemistry¹ and Nephrology and Hypertension², University Hospital Utrecht, The Netherlands; U-Geno Clinical Pharmacology Unit, Utrecht, The Netherlands³; Department of Vascular Medicine, University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands⁴

In patients with chronic renal failure (CRF), atherosclerosis is a major cause of cardiovascular morbidity and mortality. Generally, atherosclerosis has been associated with a reduced bioavailability of nitric oxide (NO). Experimental studies have indicated the presence of enhanced NO degradation by reactive oxygen species as well as decreased NO production as possible causes for this reduced NO bioavailability. So far, the question whether or not NO production is impaired in patients with chronic renal failure has never been investigated. Therefore, we measured whole body NO production in 7 patients with CRF, and in 7 matched healthy subjects. To assess the relative importance of a dysfunction of NO synthase (NOS), we compared the NO production of these patients to that of 2 other groups known to have endothelial dysfunction, i.e., 7 patients with familial hypercholesterolemia (FH) who did not yet have signs of clinical cardiovascular disease (all non-smokers), and 5 cigarette smokers. These groups were also compared to 7 non-smoking age matched healthy subjects. Whole body NO production, determined as in vivo arginine-to-citrulline conversion, was assessed by giving an intra-

venous infusion of [¹⁵N₂]-arginine as a substrate for NOS and measuring isotopic plasma enrichment of [¹⁵N]-citrulline by LC-MS. NO production in the CRF patients (0.13 ± 0.02 μmol.kg⁻¹.h⁻¹) was significantly lower (p < 0.05) than in the corresponding control group (0.23 ± 0.09 μmol.kg⁻¹.h⁻¹). NO production also tended to be lower in the FH patients (0.16 ± 0.04 μmol.kg⁻¹.h⁻¹), but the difference with the corresponding control group did not reach significance (0.22 ± 0.06 μmol.kg⁻¹.h⁻¹). In the group of smokers, NO production was similar to that in non-smokers (0.22 ± 0.09 μmol.kg⁻¹.h⁻¹). In conclusion, it is demonstrated for the first time that basal whole body NO production is reduced in patients with CRF. This finding implicates that therapeutic interventions to endothelial dysfunction in these patients should be primarily directed to improvement of NO production. The finding of only a tendency towards reduction in patients with FH and the absence of a reduction in cigarette smokers suggests that other mechanisms such as enhanced NO degradation may be involved in the decrease of NO bioavailability in these groups.

071. Association of fatigue with an acute phase response in sarcoidosis

M. DRENT¹, R.M. WIRNSBERGER¹, J. de VRIES², M.P. van DIEIJEN-VISSER³, E.F.M. WOUTERS¹ and A.M.W.J. SCHOLS¹

Department of Pulmonology¹, Department of Clinical Chemistry³, Academic Hospital Maastricht, Dept of Psychology², Tilburg University, The Netherlands

Background: The pathophysiological explanation for one of the most common symptoms in sarcoidosis, i.e. fatigue, still has to be elucidated. It was hypothesized that the presence of fatigue is associated with an acute phase response in sarcoidosis.

Methods: A cross-sectional study was performed in 38 sarcoidosis patients (22 male, 16 female). Resting energy expenditure (REE) was measured in the fasting state by indirect calorimetry using a ventilated hood and adjusted for fat free mass (FFM) measured by bioelectrical impedance analysis. Simultaneously fasting blood samples were taken to assess the presence of the acute phase protein C-reactive protein (CRP) as well as the serum angiotensin converting enzyme (sACE).

Results: Patients with fatigue (n=25) suffered also more from other symptoms, e.g. exercise intolerance (p<0.01), the neces-

sity for sleep (p<0.02) and weight loss (p<0.01) compared to those without fatigue (n=13). However, no relationship was found between fatigue and serum angiotensin converting enzyme (sACE) or lung function test results. Patients with fatigue had a higher C-reactive protein (CRP) (11.4±6.8 mg/l, p<0.0001) and REE adjusted for FFM (33.0±3.7 kcal/kg FFM, p<0.003) compared to those without fatigue (3.2±2.2 mg/l; 29.2±2.8 kcal/kg FFM). Furthermore, REE/FFM was significantly related to CRP (r=0.54, p<0.001).

Conclusion: This study confirms the presence of an acute phase response indicated by metabolic derangements and a moderate increase of CRP in sarcoidosis, particularly in those patients with constitutional symptoms. Future studies should focus on the clinical relevance and therapeutic implications of these findings.

072. A Comparison of Immulite sIL-2R with other parameters for sarcoidosis

F.J. HOEK¹ and C. ALBERTS²

Departments of Clinical Chemistry¹ and Pulmonology², Academic Medical Center, Amsterdam

For diagnosis and follow-up of sarcoidosis only a specific clinical chemical parameters are available as ACE, which is mainly produced by the epithelioid cells involved in granuloma formation, lysozyme and neopterin as products of activated monocytes/macrophages, and sIL-2R as a result of T-cell activation.

We wanted to evaluate the use of sIL-2R, because it has recently become available as a parameter on the Immulite (DPC).

We measured sIL-2R, ACE, and lysozyme in untreated (sub)acute and chronic sarcoidosis patients and during follow-up, as well as in patients already on prednisone therapy

Results: For all samples a linear correlation between sIL-2R and ACE was found (r= 0.62), comparable to the relation between lysozyme and ACE. The correlation between sIL-2R and lysozyme was much stronger (r=0.78), although a large proportion of the lysozyme results was in the reference range. In 22 (sub)acute patients (14 with clinical activity grade 2, 4 grade 3 and 4 grade 4) sIL-2R was 1812 ± 1231 U/mL. sIL-2R was increased in 12 (55%), 5 with activity grade 2, 3 grade 3 and all grade 4 patients. ACE was increased in all but 3

patients with activity grade 2 (86%). In 26 untreated chronic cases of sarcoidosis (5 with activity grade 1, 8 grade 2, 7 grade 3, and 6 grade 4) sIL-2R was increased in 19 (73%), while ACE was increased in 20 (77%). The mean sIL-2R result was 1909 ± 1568 U/ml. A normal sIL-2R result was found in 4 grade 1 patients, in one grade 2 and in two grade 3 patients.

In the group of 16 patients on prednisone therapy, sIL-2R was 786 ± 502 U/mL, and was increased in only 2 patients (12%). ACE was increased in 7 of the 16 patients (44%). In 9 additional patients therapy was started during the observation period. After 3-6 months of prednisone sIL-2R was 15 to 80% lower, but was still above the ULN in 7 patients, while ACE was increased in only 3 of the 9.

Conclusions: sIL-2R proved to be a good parameter for follow-up of sarcoidosis patients, comparable to ACE, but not always reacting in the same way as ACE.

The high correlation between sIL-2R and lysozyme in the sarcoidosis patients is in favour of the activated macrophage instead of the activated T-cell as the origin of the sIL-2R in the circulation.

73. Verbeterde diagnostiek van appendicitis acuta met behulp van klinische chemometrie

A.B. MULDER¹, E. KRAANEVELD², R.H. GEELKERKEN² en G. van der SLUIJS VEER¹

Afdelingen Laboratorium¹ en Chirurgie², Medisch Spectrum Twente, Enschede

Bij de initiële klinische diagnose appendicitis acuta wordt een vals negatieve score van 20% als normaal aanvaard, terwijl in 15-40% van de geopereerde patiënten de appendix normaal blijkt te zijn. In een eerdere studie is nagegaan of statistische interpretatie van onderzoeksgegevens (klinische chemometrie) kon bijdragen tot een betere diagnostiek van appendicitis acuta (W.P. Oosterhuis, Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 100). Hierbij zijn gegevens uit anamnese (leeftijd, geslacht, duur van de klachten, wel/niet braken), lichamelijk onderzoek (temperatuur) en laboratoriumonderzoek (leukocyten, CRP), met een diagnostische waarde voor appendicitis acuta, gecombineerd tot een discriminantfunctie. Bij een positieve discriminantscore kwamen de testresultaten van een patiënt meer overeen met gegevens van patiënten met appendicitis, bij een

negatieve discriminantscore kwamen de resultaten meer overeen met de gegevens van patiënten zonder appendicitis.

In het huidige onderzoek is de validiteit van deze functie getest. In een cohort patiënten, die zich op de Spoedeisende Hulp van het Medisch Spectrum Twente presenteerden met een klachtenpatroon, waarbij in de chirurgische differentiaal diagnose appendicitis acuta was opgenomen, werd de discriminantscore vergeleken met de uiteindelijke diagnose. Indien de patiënt geopereerd was, fungeerde de PA uitslag als gouden standaard. Indien de patiënt conservatief behandeld was, werden de resultaten vergeleken met het klinisch beloop, waarbij moet worden opgemerkt dat het klinisch beloop niet volledig bewijzend is voor de aan- of afwezigheid van de diagnose appendicitis acuta.

In een groep van 65 patiënten werd met behulp van de discriminantfunctie in 75% van de gevallen de diagnose wel/niet appendicitis correct gesteld. Bij 15% van de patiënten werd een vals negatieve discriminantscore en bij slechts 9% van de patiënten een vals positieve score gevonden.

Geconcludeerd kan worden dat het mogelijk is om met behulp van de beschreven statistische functie het hoog percentage foutief gediagnosticeerde patiënten te reduceren. Toepassing van deze chemometrische methode lijkt dan ook van nut bij de diagnostiek van appendicitis acuta.

074. Polymorfisme in β 3-adrenerge receptor gen in samenhang met diabetes mellitus type 2 en vetzucht

A.M. van OEVEREN-DYBICZ¹, M.A.M. BON¹, H.E. VONKEMAN², F.A.J.T.M. van den BERGH¹ en I. VERMES¹
Afdeling Laboratorium¹ en Interne Geneeskunde², Medisch Spectrum Twente, Enschede

De β 3-adrenerge receptor (β 3-AR) speelt een belangrijke rol bij de regulatie van de energiebalans door lipolyse en thermogenese in evenwicht te houden. Het polymorfisme van het β 3-AR gen manifesteert zich als substitutie van het aminozuur tryptofaan in arginine (Trp64Arg). In de literatuur wordt beschreven dat een hoge frequentie van het Arg64 allel in het β 3-AR gen geassocieerd zou zijn met het ontwikkelen van Niet-Insuline-Afhankelijke Diabetes Mellitus (NIDDM) en een toename van het lichaamsgewicht.

In dit onderzoek is gekeken of er samenhang bestaat tussen β 3-AR genotype en de metabole stoornissen (vetzucht en type 2 diabetes mellitus) in een Europese populatie. De allelfrequentie van de Trp64Arg mutatie zou dan, bij patiënten met NIDDM en vetzucht in vergelijking met de controle groep significant hoger moeten zijn.

Het DNA is geïsoleerd uit EDTA-bloed (QIAamp blood kit,

Westburg, Nederland). Het Trp64Arg polymorfisme in het β 3-AR gen is vastgesteld met behulp van de polymerase kettingreactie (PCR) gevolgd door restrictie fragment analyse.

De Trp64Arg mutatie in het β 3-AR gen is onderzocht in 200 individuen (137 met en 63 zonder NIDDM).

In de groep met NIDDM is gekeken naar de aan- of afwezigheid van de mutatie in correlatie tot de Body Mass Index (BMI kg/m²).

Er is geen significant verschil gevonden in allel frequentie van Arg64 tussen de patiënten en de controle groep (respectievelijk 6% en 5%, $p=0.77$). Polymorfisme in het β 3-AR gen binnen de NIDDM groep vertoont geen associatie met de BMI index. Binnen de groep met ($n=14$) en zonder ($n=123$) mutatie was de BMI (gem. \pm SD) respectievelijk 31 ± 8.5 en 29 ± 4.8 , $p=0.38$.

Onze resultaten hebben aangetoond dat β 3-AR polymorfisme geen bepalende factor is voor NIDDM en vetzucht.

075. De bepaling van de GFR volgens Cockcroft en Gault na remming van de tubulaire secretie van kreatinine

A.P. van ZANTEN¹, E.H. SLAATS², F.A.W. KEMPERMAN³, J.A. WEBER⁴, J. SILBERBUSCH³, R.T. KREDIET⁵ en L. ARISZ⁵

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium Slotervaartziekenhuis¹, Amsterdam; Hematologisch Klinisch Chemisch Laboratorium² en Afdeling Inwendige Geneeskunde³, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam; Klinisch Chemisch Laboratorium⁴ en Afdeling Interne Geneeskunde Academisch Medisch Centrum⁵, Universiteit van Amsterdam

Cockcroft en Gault hebben in 1976 een formule gegeven voor de berekening van de glomerulaire filtratiesnelheid uit de plasma kreatinine concentratie (GFR). In deze formule wordt gebruik gemaakt van plasma kreatinine concentratie, leeftijd, geslacht en lichaamsgewicht. In de kliniek wordt deze formule regelmatig gebruikt voor een snelle inschatting van de GFR.

Doel van het onderzoek was het bepalen van de invloed van een specifieke kreatinine bepaling, onder remming van de tubulaire secretie van kreatinine, op de GFR berekening m.b.v. de formule van Cockcroft en Gault.

In 30 poliklinische patiënten met type II diabetes werd de GFR bepaald. In deze patiënten werd daags tevoren begonnen met de remming van de tubulaire secretie van kreatinine. De GFR, berekend m.b.v. plasma kreatinine concentraties gemeten met een kinetische Jaffé methode, een enzymatische (PAP)

methode of een HPLC methode, werd vergeleken met de 'gouden standaard' methode van continue infusie van ¹²⁵I-thalamaat en ¹³¹I-hippuraat.

De kreatinine resultaten van de Jaffé methode waren significant hoger dan de resultaten van de enzymatische of HPLC methode. Dit resulteerde in onderschatting van de GFR van gemiddeld ca. 25 % indien gebruik gemaakt werd van de Jaffé resultaten. Bij gebruik van de enzymatische of HPLC waarden in de formule van Cockcroft en Gault werd geen significant verschil gevonden.

Conclusie: de berekening van de GFR m.b.v. de Cockcroft en Gault formule levert een acceptabele schatting op van de GFR mits gebruik gemaakt wordt van een specifieke kreatinine bepaling en de tubulaire secretie van kreatinine geremd wordt met cimetine.

076. Simple determination of advanced glycation end products in serum or plasma: relation with complications in type 1 diabetic patients

T. TEERLINK and C. G. SCHALKWIJK

Department of Clinical Chemistry, Academic Hospital Vrije Universiteit, Amsterdam

Long-term incubation of proteins with glucose ultimately leads to the formation of advanced glycation end products (AGEs), that may be involved in the pathogenesis of diabetes related complications. Although they form a heterogeneous group of compounds, many AGEs share typical fluorescence properties. We have evaluated a recently described simple assay procedure for the determination of fluorescent AGE-peptides in serum (K. Wróbel et al, Clin Chem 1997; 43: 1563-1569). Samples are deproteinized with trichloroacetic acid and lipids are extracted with chloroform. AGE-peptides

are determined in the supernatant by measuring AGE fluorescence (excitation 247 nm, emission 440 nm) and UV absorbance (280 nm) with a flow injection system, using HPLC equipment. The ratio of the fluorescence and UV absorbance peak areas is used to calculate AGE-peptide content. The system is calibrated with a proteinase K digest of a preparation of human serum albumin incubated with 0.5 M glucose for 6 weeks (100% AGE-peptide calibrator). Both within- and between-series CVs were below 3%. AGE-peptide levels measured in EDTA plasma did not differ significantly

from levels in paired serum samples. In a group of healthy individuals we measured plasma AGE-peptide levels of $10.6 \pm 1.7\%$ (mean \pm SD; range 7.6-14.4%; n=44). Plasma AGE-peptide levels were slightly higher in type 1 diabetic patients than in age-matched healthy controls (mean \pm SD: $11.2 \pm 1.9\%$ vs. $9.3 \pm 1.6\%$, $P=0.003$, both groups n=18). In a second group of

type 1 diabetic patients with normo-, micro-, or macroalbuminuria, a significant increase of AGE-peptide levels across the three subgroups was observed, which was associated with increased plasma creatinine levels. We conclude that this simple procedure can be used to study the pathophysiological role of AGEs in diabetic vascular complications.

077. Increased dicarbonyl compounds in peritoneal dialysis fluids lead to activation of endothelial cells

C.G. SCHALKWIJK¹, T. TEERLINK¹, N. LIGTVOET¹, P.M. ter WEE², R. OVERBEEKE³ and A.B. MULDER³
Department of Clinical Chemistry¹ and Nephrology², Academic Hospital of the Free University, Amsterdam and Laboratory Clinical Chemistry, Medical Spectrum Twente, Enschede³

Conventional glucose-based peritoneal dialysis (PD) solutions are characterized by the presence of toxic compounds, which has been related to the sterilization process. Glucose degradation products such as dicarbonyl compounds are believed to be important intermediates in the formation of advanced glycation endproducts (AGEs) and both dicarbonyl compounds and AGEs might be linked to the development of long-term complications associated with peritoneal dialysis. We quantified 3-deoxyglucosone (3-DG), glyoxal (GO) and methylglyoxal (MGO), in glucose-based heat-sterilized commercial PD-fluids (Dianeal®) with a newly developed HPLC method, based on derivatization with 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene and fluorescence detection. The analysis revealed that during heat sterilization high concentrations of 3-DG, GO and MGO were formed. Albumin incubations in vitro with these dicarbonyls yielded in all cases a time-dependent increase of AGE-fluorescence. The presence of these dicarbonyl com-

pounds were also studied in effluents of PD patients collected from peritoneal kinetic studies with dwell times up to 240 min. In effluents taken from eight patients, the concentrations of MGO, GO and 3-DG were rapidly decreased with increasing dwell time, which was accompanied by a significant increase in AGE-fluorescence. Based on the hypothesis that MGO and 3-DG contribute to the peritoneal dysfunction, we studied the effect of these dicarbonyl compounds on proliferation, protein synthesis and apoptosis in cultured endothelial cells. We obtained evidence that 3-DG decreased the proliferation and MGO induced apoptosis of endothelial cells. In contrast, protein synthesis was unaffected by these dicarbonyl compounds. In conclusion, increased dicarbonyl compounds in PD fluids decrease proliferation capacity and induce apoptosis in endothelial cells and may provide an explanation for peritoneal dysfunction associated with peritoneal dialysis.

Gynecologie / Obstetrie

078. Veilige opslag van semen in een semenbank

P.M.W. JANSSENS, L.L.M. ENGELS en M. JACOBS
Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Rijnstate, Arnhem

Opslag van semen in semenbanken dient sterk uiteenlopende doelen voor gebruikers. Enerzijds worden semenbanken gebruikt om реципиënten die niet beschikken over een vruchtbare mannelijke partner te helpen aan semen van anonieme donoren. Anderzijds worden semenbanken gebruikt voor het bewaren van semen voor mannen persoonlijk, voor hun partners of voor реципиënten anderszins meer of minder individueel direct gebonden met een specifieke donor. Van de semenbank wordt geëist dat het semen wordt bewaard met optimaal behoud van kwaliteit en met minimale kans op verlies of verwisseling. Dit maakt noodzakelijk een systeem met sluitende administratieve procedures, registratie en archivering.

Van de semenbank mag voorts worden verwacht dat het uitgegeven semen veilig is, d.w.z. een minimale kans geeft op overbrenging van infectieuze ziekten. Hiertoe worden donoren vantevoren gescreend en onderzocht, serologisch voor HIV, Hepatitis B+C en lues en in de urine voor Chlamydia en

Gonorrhoe. Voor bepaalde type donoren wordt er bovendien gewerkt met een quarantaine-systeem. Een factor wat betreft veiligheid die tot dusver nog weinig aandacht kreeg was de mogelijkheid van kruisbesmetting met pathogenen tussen semens onderling via de vloeibare stikstof in het opslagvat. Om dergelijke kruisbesmetting te ondervangen hebben wij, aansluitend op een reeds gebruikt quarantaine-systeem voor anonieme semen-donoren een zgn. kwartaalsysteem ontwikkeld. Volgens dit systeem wordt de quarantaineperiode van 6 maanden niet uitgevoerd op individuele basis, per donor, maar collectief voor alle semens binnenkomend per kwartaal. Bloed en urine van donoren worden elke drie maanden getest. Het systeem wordt gecontroleerd en gestuurd door middel van een computerprogramma. Wij denken aldus voor de gebruikers van het semen van onze anonieme donoren maximale veiligheid te kunnen garanderen.

079. Reasons to report dubious pregnancy test results

P.P.C.A. MENHEERE¹, O. BEKERS¹, A.H. KLEINE¹, J.W.M. MAAS² and J.A. LAND²
Departments of Clinical Chemistry¹ and Obstetrics² and Gynaecology, University Hospital Maastricht

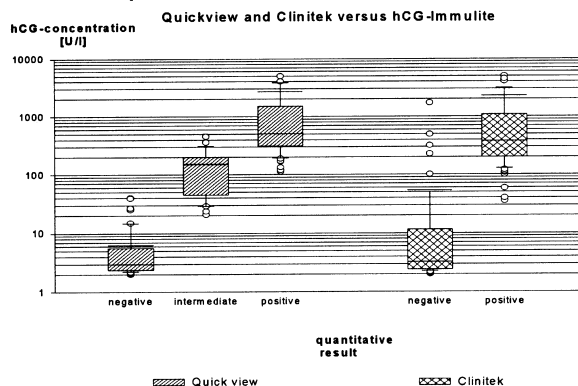
Introduction: Modern pregnancy tests are manufactured to give a positive result above and a negative result below the transition value, mostly 25 U/l. Although rarely realized, this concentration corresponds to a region of uncertainty. Consequently, samples within this region should not be attributed a positive or negative result.

Object: The aim of our study was 1st to verify the transition

value of two qualitative tests, 2nd to compare this value with the result of an identical study of four years ago, 3rd to consider clinical relevance of reporting intermediate results. To this purpose urine samples have been analysed by two qualitative tests (Quickview, n=472 and Clinitek, n=430). Quantitative measurement was done with the hCG-Immulate test.

Results: None of the qualitative tests gave false positive

hCG: qualitative versus quantitative results



results. However, the Quick-view test had a false negative rate of 6.7 % (using the manufacturers protocol), while the false

negative rate of the Clinitek hCG-test was 4.0 %. Furthermore, the false negative rate of the Quick-view fell to 0.3 % if intermediate results are reported as such using a modified protocol. The transition concentration of the Quick-view test was 26.0 ± 4.5 U/l (mean \pm standard error) in 1996, but has increased to 135.7 ± 20.3 U/l in 1998. The transition concentration of the Clinitek hCG test was found about 115 U/l.

Using the Quick-view test, 26 samples were considered dubious, most of them coming from subfertile patients. HCG concentrations within this group varied from 20.5 to 455 U/l. Six patients experienced spontaneous abortions and nine patients have an ongoing pregnancy. The rest of the patients were not pregnant.

Conclusions: The investigated slide tests do not produce false positive results. However, they show a small proportion of false negative test results. Verifying the transition concentration of slide tests regularly is worthwhile. Reporting intermediate results instead of negative or positive, allows more judicious clinical decision making.

080. Apoptose in semen: een maat voor mannelijke infertiliteit?

A.B. MULDER¹, G.J.E. OOSTERHUIS², E. KALSBECK-BATENBURG¹, B. ALTHOF¹, H.W.B. MICHELSEN² en I. VERMES¹

Afdeling Laboratorium¹ en Gynaecologie², Medisch Spectrum Twente, Enschede

In geval van ongewenste kinderloosheid blijkt via semenanalyse in een deel van de gevallen mannelijke subfertiliteit aanwezig te zijn. Tijdens de normale turnover van spermatozoa gaat 50-70% van de cellen ten gronde aan geprogrammeerde celdood, apoptose genaamd. Of er een samenhang bestaat tussen de mate van apoptose en fertiliteitsstoornissen is niet bekend. Het doel van de studie was het ontwikkelen van assays voor het meten van apoptose in semen en de resultaten te vergelijken met die van routine fertiliteitsonderzoek. Vroegtijdig in het proces van apoptose treedt er translocatie op van fosfatidylserine (PS) van de binnenzijde van het membraan naar de buitenzijde, terwijl later fragmentatie van DNA optreedt. In een groep van 69 mannen is de expressie van PS en het optreden van DNA-fragmentatie mbv flowcytometrie onderzocht en zijn de resultaten vergeleken met die van routine semenonderzoek, dat plaatsvond vanwege de ongewenste kinderloosheid. Expressie van PS werd bepaald met behulp van een labeling

met Annexine V. Expressie van PS ten gevolge van in vitro inductie van de acrosoomreactie werd uitgesloten via een labeling met Peanut Agglutinine, een lectine dat bindt aan spermatozoa die een acrosoomreactie ondergaan. DNA-fragmentatie is gemeten door labeling van de vrije 3'-OH-uiteinden van DNA-fragmenten met een fluorescerend nucleotide dUTP en het enzym TdT, volgens de zogenaamde TUNEL techniek.

Er bleek een significante correlatie te bestaan tussen de expressie van PS en verminderde beweeglijkheid van spermatozoa ($p = 0.027$). De later in het proces van apoptose optredende DNA-fragmentatie bleek significant te correleren met verminderde concentratie van het semen ($p = 0.019$).

De resultaten geven aan dat het meten van apoptose in spermatozoa van nut lijkt te zijn bij mannen met fertiliteitsstoornissen. Uit vergelijking met klinische eindpunten zal moeten blijken hoe groot de additieve waarde van deze methode ten opzicht van routine semenonderzoek is.

081. Serum CA-125 en zwangerschap na IVF/ET: is er een verband?

J.W. JANSSEN¹, A. BAALBERGEN², J. BAKKER¹, J. van OORD¹, R.M.F. van der WEIDEN²

Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium¹ en Afdeling Gynaecologie, St. Franciscus Gasthuis², Rotterdam

Wij hebben in een prospectieve longitudinale studie onderzocht of er een verband is tussen de CA-125 concentratie in serum en een geslaagde zwangerschap na in vitro fertilisatie en embryo-transplantatie (IVF/ET). Aan het onderzoek hebben 44 IVF patiënten deelgenomen die LHRH suppressie kregen gevolgd door stimulatie met hMG. De patiënten kregen progesteron of hCG voor de ontwikkeling van het corpus luteum. Serummonsters werden op drie tijdstippen afgenomen: direct voor de oogst van de eicellen (OPU), 14 dagen na terugplaatsing van de embryo's (ET + 14) en na vaststellen van de zwangerschap op dag ET + 21.

De samples werden bewaard bij -80°C . De bepaling van CA-125 werd uitgevoerd met twee verschillende enzymimmunoassays: (IMx CA-125, Abbott, USA) en (Immulite OMMA, DPC, USA). Wij wilden daarmee tevens onderzoeken of de uitslagen afhankelijk zijn van de in de test gebruikte antilichamen. Voor de statistische analyse is de toets van Wilcoxon toegepast.

Wij hebben geen verschillen in de CA-125 concentratie in serum gevonden op het tijdstip OPU tussen zwangeren ($n = 18$) en niet zwangeren ($n = 26$) IVF patiënten. Na de oogst van eicellen en terugplaatsing van embryo's stijgt de CA-125 in zwangeren ($p < 0.0001$) en in niet zwangeren ($p < 0.001$). Deze toename in CA-125 concentratie is groter bij zwangeren dan bij niet zwangeren ($p < 0.01$).

Voor CA-125 liggen de resultaten van de IMx methode gemiddeld 20% hoger in vergelijking met de resultaten verkregen met de Immulite methode. Dit verschil zien wij ook terug in de referentiewaarden: CA-125 IMx (< 18 kU/L) en OMMA Immulite (< 14 kU/L). Maar met beide analytische methoden konden dezelfde conclusies met een gelijk niveau van significantie getrokken worden.

Conclusie: Verschillen in de serum CA-125 concentratie tussen zwangere en niet zwangere IVF patiënten lijken gerelateerd aan het optreden van een succesvolle implantatie.

082. Increased homocyst(e)ine in Afro-Caribbean women with pre-eclampsia

F.V. VELZING-AARTS¹, D.A.J. BROUWER¹, F.P.L. van der DIJS², D-J. REIJNGOUD³, A.J. DUITTS⁴ and F.A.J. MUSKIET¹

Pathology and Laboratory Medicine, Groningen University Hospital¹, Public Health Laboratory, Curaçao (The Netherlands Antilles)², Laboratory for Metabolic Disorders, Groningen University³, Sint Elisabeth Hospital, Curaçao⁴

Plasma homocyst(e)ine was measured in 14 women with pre-eclampsia and 14 nonproteinuric normotensive controls, matched for maternal age, gestational age, parity and socioeconomic status. The women were predominantly from Afro-Caribbean descent. Pre-eclamptic women had higher ($p=0.0015$) homocyst(e)ine (median: 12.4 $\mu\text{mol/l}$; range: 7.0-29.8) than controls (7.2; 4.8-9.4). Homocyst(e)ine of pre-eclamptic women did not correlate with urinary protein, serum

creatinine or haematocrit, but correlated inversely with platelet count ($r = -0.6182$, $p=0.043$, $n=11$) and positively with serum uric acid ($r=0.6545$, $p=0.029$, $n=11$). High plasma homocyst(e)ine in pre-eclampsia confirms the observation of Rajkovic et al. (Obstet Gynecol 1997; 90: 168-71). The relations with platelet count and uric acid suggest a role in the pathophysiological cascade.

Stoornissen in het intermediaire metabolisme

083. Sensitive analysis of serum 3 α , 7 α , 12 α , 24-tetrahydroxy-5 β -cholestan-26-oic (varanic acid) acid diastereoisomers using gas chromatography/mass spectrometry and its application in peroxisomal D-bifunctional protein deficiency

P. VREKEN¹, A. van ROOIJ¹, E.G. van GRUNSVEN¹, S. DENIS¹, D.A. CUEBAS² and R.J.A. WANDERS¹

Academic Medical Center, University of Amsterdam, Emma Children's Hospital and Dept. of Clinical Chemistry¹ Amsterdam; Southwest Missouri state University, Dept. of Chemistry², Springfield, Missouri, USA.

The final step in bile acid biosynthesis takes place in peroxisomes and involves oxidative cleavage of the side chain of C27- β -cholestanic acids leading to the formation of the primary bile acids cholic and chenodeoxycholic acid. The enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase activities involved in the chain shortening of C27- β -cholestanic acids reside with the recently identified peroxisomal D-bifunctional protein. Deficiencies of D-bifunctional protein lead to an accumulation of, among others, varanic acid. Here, we describe a sensitive GC/MS method, using 2R-butylester-trimethylsilylether derivatives which enables good separation of the four varanic acid diastereoisomers. This

analysis showed the specific accumulation of (24R, 25R)-varanic acid in the serum of a patient with isolated deficiency of the D-3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase part of peroxisomal D-bifunctional protein, whereas this diastereoisomer was absent in a serum sample from a patient suffering from complete D-bifunctional protein. In both samples an accumulation of (24S, 25S)-varanic acid was observed, most likely formed by the action of L-bifunctional protein on 24-THCA-CoA. This GC/MS method is applicable to serum samples, obviating the use of bile fluid, and is a helpful tool in the subclassification of patients with peroxisomal D-bifunctional protein deficiency.

084. Rapid analysis of conjugated bile acids using electrospray tandem-mass spectrometry in plasma and its application in screening for peroxisomal disorders

P. VREKEN, A.H. BOOTSMA, H. OVERMARS, A. van ROOIJ, R.J.A. WANDERS and A.H. van GENNIP

Academic Medical Center, University of Amsterdam, Dept. of Clinical Chemistry and Div. Emma Children's Hospital, Amsterdam

The final step in bile acid biosynthesis takes place in peroxisomes and involves oxidative cleavage of the side chain of C27- β -cholestanic acids leading to the formation of the primary bile acids cholic and chenodeoxycholic acid. As a consequence, there is an accumulation of C27-bile acid precursors in a number of peroxisomal disorders. Since routine GC/MS plasma bile acid analysis requires laborious sample preparation including enzymatic and/or chemical deconjugation of plasma bile acids prior to derivatization and GC/MS analysis, we have developed a rapid HPLC electrospray tandem-MS method for analyzing free bile acids, taurine and glycine conjugated bile acids, sulphated bile acids and bile alcohols in a

single analysis using various parent ion scans. Including sample preparation the complete procedure takes less than one hour, whereas actual HPLC-MS/MS analysis is achieved in 15 minutes. The method was validated by comparison with the well established GC/MS method and shown to detect C27-bile acid precursors and the C29-bile acid characteristically observed in Zellweger patients in all 25 samples tested. These bile acids could not be detected in significant amounts in 50 control samples. In conclusion, we have developed a simple and rapid analysis which allows a quick judgement on the presence or absence of bile-acid precursors which is applicable in the screening for peroxisomal disorders.

085. The activity of dihydropyrimidine dehydrogenase and mRNA expression in human blood cells

A.B.P. van KUILENBURG¹, P. VREKEN¹, H. van LENTHE¹, R. MEINSMA¹, E. MUL² and A.H. van GENNIP¹

Academic Medical Center, University of Amsterdam, Emma Children's Hospital and Department of Clinical Chemistry¹, Amsterdam. Central Laboratory of The Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service², Amsterdam.

Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) is the initial and rate-limiting enzyme in the catabolism of the pyrimidine bases thymine and uracil. 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. 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. The highest activity was found in monocytes (13.7 ± 5.5 nmol/mg/h, $n = 12$) followed by lymphocytes (5.6 ± 1.5 nmol/mg/h, $n = 16$), granulocytes (2.2 ± 0.5 nmol/mg/h, $n = 7$) and platelets (1.7 ± 0.6 nmol/mg/h, $n = 22$). We could not detect any DPD activity in red blood cells. On a Northern blot containing total RNA the mRNA expression of DPD in monocytes was clearly detect-

able whereas we could not detect mRNA encoding DPD in lymphocytes. However, with RT-PCR we could detect the DPD transcript in liver, fibroblasts, monocytes, granulocytes and also in lymphocytes. 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.

086. Measurement of the catabolic pathway of uracil and thymine in human liver

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

Academic Medical Center, University of Amsterdam, Emma Children's Hospital and Department of Clinical Chemistry, Amsterdam

In man, the pyrimidine bases uracil and thymine are degraded via a three-step pathway leading to the synthesis of β -alanine and β -aminoisobutyric acid, respectively. Defects in the degradation of pyrimidines are often associated with convulsive disorders during childhood whereas the same defects can lead also to severe life-threatening toxicities when (partially) deficient individuals are treated with the pyrimidine analogue 5-fluorouracil (5FU). Although the activity of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) can be detected in a variety of tissues the activity of dihydropyrimidinase (DHP) and ureidopropionase (UP) can only be detected in liver tissue. The activity of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) was measured in human liver with radiolabeled thymine followed by separation with reversed-phase HPLC with online detection of

radioactivity. The activity of DPD proved to be linear with protein concentration although at high protein concentrations a decrease in specific activity was observed. [4- 14 C] thymine was catabolised to dihydrothymine, N-carbamyl- β -aminoisobutyric acid and β -aminoisobutyric acid, thus indicating the presence of the entire catabolic pathway. In the presence of [2- 14 C] thymine, 14 CO₂ is produced by liver homogenates instead of radiolabeled β -aminoisobutyric acid. In a patient suffering from DHP deficiency, only radiolabeled dihydrothymine was produced from [2- 14 C] thymine while no further catabolism of dihydrothymine was observed. Therefore, this procedure to measure the activity of DPD provides information about the relative activities of DHP and UP as well.

087. Pitfalls in the diagnosis of patients with a dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in blood cells

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

Academic Medical Center, University of Amsterdam, Emma Children's Hospital and Department of Clinical Chemistry, P.O. Box 22700, 1100 DE Amsterdam, The Netherlands.

Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) is the initial and rate-limiting enzyme in the catabolism of the pyrimidine bases thymine and uracil. In children, the deficiency of DPD is often accompanied by a neurological disorder but a considerable variation in the clinical presentation among these patients has been reported. DPD is also responsible for the breakdown of 5-fluorouracil (5FU), thereby limiting the efficacy of the therapy. To identify patients suffering from a complete or partial DPD deficiency peripheral blood mononuclear cells (PBM cells) are frequently being used. In this respect, we initially detected a low DPD activity in PBM cells containing significant amounts of immature myeloid cells of patient suffering from 5FU toxicity which was comparable to that observed of obligate heterozygotes. However, after full clinical recovery of the patient a

normal DPD activity was observed in PBM cells. In addition, the DPD assay of purified lymphocytes proved to be linear with protein concentration in the range from 0.2 to 6 mg/ml. However, at low protein concentrations (<0.2 mg/ml) a deviation from linearity occurred which could not be prevented by the addition of human serum albumine. Therefore, the low activity of DPD measured in PBM cells containing (immature) myeloid cells or that measured at a low protein concentration in the assay mixture is not indicative for heterozygosity for a mutant DPD allele. Thrombocytes can also be used for the determination of DPD activity. However, thrombocytes have the disadvantage that a profound decrease in specific activity is observed at high protein levels suggesting the presence of an endogenous inhibitor of DPD.

088. Cystamine therapie bij sulfiet oxydase deficiëntie

W. RUITENBEEK¹, W. RENIER², E. RUBIO-GOZALBO¹, H. BLOM¹, W. HEYS¹, H. KWAST¹, E. v.d. BODE-v.d. LAAN³, J. JOHNSON⁴ en F. TRIJBELS¹

Academisch Ziekenhuis Nijmegen, Afd. Kindergeneeskunde¹ en Kinderneurologie², Het Nieuwe Spitaal, Zutphen³ en Duke University Medical Center, Durham (USA)⁴

Sulfiet oxydase (SuOx) deficiëntie is een zeldzame, autosomaal recessief overervende stofwisselingsstoornis in de afbraak van cysteïne. De in deze route gevormde sulfiet-ionen kunnen dan niet omgezet worden tot sulfaat en gaan accumuleren. Daardoor vindt stapeling van andere gereduceerde zwavelbevattende componenten plaats. Neurologische symptomen staan op de voorgrond bij SuOx-deficiënties. De meeste patiënten overlijden op jeugdige leeftijd bij gebrek aan adequate therapie. Kamoun & Tardy (Eur J Pediatr 1990; 149: 594) suggererden cystamine suppletie, teneinde de SuOx-reactie non-enzymatisch te laten verlopen.

Bij een meisje, waarbij de diagnose SuOx-deficiëntie was gesteld via metaboliëten-metingen in serum en urine en via enzymmetingen in fibroblasten, hebben wij cystamine suppletie (75 mg/kg/dag) toegepast vanaf haar 5e levensmaand. Zij was ernstig geretardeerd en spastisch, en had therapie-resistente multifocale epilepsie met burst suppression beeld op het EEG. Het cystamine-effect werd beoordeeld aan de hand van klinische symptomen en metaboliëtspiegels in urine. Binnen enkele dagen na de start was patiëntje meer ontspannen en reageerde beter op contact. Het aantal convulsies nam niet af. De uitscheiding van S-sulfocysteïne, taurine en sulfiet bleef onver-

anderd hoog. Ondanks therapie verslechterde de gezondheid in de zevende levensmaand vrij snel. Het aantal convulsies nam toe en patiëntje overleed aan respiratoire complicaties. Deze studie heeft niet aannemelijk kunnen maken, dat sulfiet-accumulatie in vivo door cystamine voorkomen kan worden.

Waarschijnlijk is cystamine niet in staat de intracellulaire redoxstatus te normaliseren. Andere benaderingen dienen overwogen te worden bij de therapie van de lethale SuOx-deficiënties, wellicht door het verbeteren van de lage cysteine en homocysteïne spiegel.

089. Een patiënt met een kreatine synthese-defect

N.M. VERHOEVEN¹, M.S. van der KNAAP², E.A. STRUYS¹, P.J.W. POUWELS³ en C. JAKOBS¹
Afdeling Klinische Chemie¹, Afdeling Kindergeneeskunde² en Afdeling Klinische Fysica en Medische Techniek³, Academisch Ziekenhuis Vrije Universiteit, Amsterdam

Op de leeftijd van 2,5 jaar presenteerde dit jongetje zich met een vertraagde mentale en motorische ontwikkeling en autisme. Al een paar maanden na zijn geboorte was opgevallen dat zijn ontwikkeling vertraagd was, maar nooit was er sprake van regressie. Bij neurologisch onderzoek werden duidelijke tekenen van autisme gevonden. Het jongetje toonde weinig belangstelling voor mensen en was geobsedeerd met bepaalde objecten. Hij vermeed oogcontact en sprak niet. Hij had een milde, gegeneraliseerde hypotonie maar kon lopen zonder steun. Metabool onderzoek van de 24 uren urine toonde verhoogde concentraties aminozuren, organische zuren en urinezuur, alles uitgedrukt per kreatinine concentratie. Kreatinine in urine (1,4 mmol/l) en plasma (38 µmol/l, n: 25-55) waren binnen de normaal range. Guanidinoacetaat, de metabole precursor van kreatine, werd bepaald met behulp van stabiele isotoop dilutie gas chromatografie massa spectrometrie. De concentratie was sterk verhoogd in urine (3597 mmol/mol kreatinine, n: 17-116), plasma (38,4 µmol/l, n: 0,8-1,4) en CSF (13,7 µmol/l, n: 0,027-0,143). Daarbij was de excretie van kreati-

nine per 24 uur verlaagd (78 en 25 µmol/kg.24h, n: 88-132). Deze bevindingen wijzen op een deficiëntie van het enzym guanidinoacetaat methyltransferase. Meting van dit enzym in fibroblasten (dr. S. Stöckler) toonde inderdaad een volledige deficiëntie.

MRI van de hersenen toonde vertraagde myelinisatie, maar verder geen afwijkingen. Proton MRS van de hersenen toonde een totale afwezigheid van kreatine in de witte stof, cerebrale cortex, basale kernen en cerebellum.

De patiënt werd behandeld met kreatine monohydraat, waarna duidelijk verbetering optrad.

De klinische presentatie van deze patiënt is erg specifiek, met mentale retardatie en autisme als enige symptomen. De andere tot nu toe beschreven patiënten met deze ziekte hadden epilepsie en extrapyramidale bewegingsstoornissen. Bij deze patiënt waren de plasma en urine kreatinineconcentraties bovendien normaal, wat aanduidt dat het bepalen van guanidinoacetaat van belang is bij screening op deze ziekte.

090. Quantification of homogentisic acid in urine with mid-infrared spectroscopy: a new technique for metabolic investigations ?

A.P. J.A. MARKUS¹, B.S. JAKOBS¹, D.W. SWINKELS¹, R.A. WEVERS², J.M.F. TRIJBELS² and H.L. WILLEMS¹
Department of Clinical Chemistry¹ and Laboratory of Paediatrics and Neurology², University Hospital Nijmegen, St Radboud, Nijmegen.

Fourier Transform infrared (FT-IR) spectroscopy has been used as a new technique in the investigation of inborn errors of metabolism by studying alkaptonuria. The main advantages of FT-IR are the simple, low costs measurements and the short time of analysis.

Spectra of 39 urine samples from randomly selected hospitalised patients were obtained with the attenuated total reflection (ATR) technique in the mid-IR region with two different detectors; a deuterated triglycine sulphate (DTGS) detector and a mercury-cadmium-telluride (MCT) detector. Before adding homogentisic acid, no detectable amounts of homogentisic acid in urine were present and therefore homogentisic acid can be seen as a primary standard. The concentrations of creatinine and urea were analysed according to standard clinical chemical procedures. Finally, after adding homogentisic acid, the calibration region ranged from 0 to 24 mM, from 1.7 to 13.3 mM and from 53 to 277 mM for homogentisic acid, creatinine and urea, respectively. The concentrations of the

three analytes in urine are quantitated with partial least-squares regression analysis. Standard errors in the IR-predicted analyte levels for homogentisic acid were 1.7 mmol/l and 0.8 mmol/l for the DTGS and the MCT detector respectively with correlation coefficients of 0.98 and higher.

Intra- and inter-assay variations were determined for each analyte and the coefficients of variation for homogentisic acid were about 5 times better for the MCT detector than for the DTGS detector, both for the low concentration (5 mM (5.6 %)) and the high concentration (29 mM (1.4 %)) region. An urine sample from an alkaptonuria patient was analysed both with FT-IR and with gaschromatography and the concentration of homogentisic acid was 13.8 mmol/l and 12.8 mmol/l, respectively.

The first results indicate that FT-IR can be used in diagnosing or follow-up of patients with alkaptonuria, but extensive experiments in comparison with gaschromatography have to be performed.

091. Uredopropionase deficiency: a novel inborn error of metabolism discovered with NMR spectroscopy

S.H. MOOLENAAR¹, U. ENGELKE¹, B. ASSMANN², G. GOHLICH-RATMANN³, C. BRAUTIGAM², A.H. van GENNIP⁴, J.G.N. de JONG¹, T. VOIT³, G.F. HOFFMANN² and R.A. WEVERS¹
University Hospital Nijmegen, Laboratory of Pediatrics and Neurology, Nijmegen, The Netherlands¹; University Children's Hospital, Laboratory of Metabolic Diseases, Marburg, Germany²; University Hospital Essen, Department of Pediatrics, Essen, Germany³; Academic Medical Centre, Laboratory of Genetic Metabolic Diseases, Amsterdam, The Netherlands⁴

Therapeutische geneesmiddelenmonitoring en klinische toxicologie

092. De rol van genetisch polymorfisme van het cytochroom CYP2D6 bij de metabole afbraak van Simvastatine

A.B. MULDER¹, J.H. van LIJF², M.A.M. BON¹, A.M. van OEVEREN-DYBICZ¹, F.A.J.T.M. van den BERGH¹, C. NEEF³ en I. VERMES¹

Afdelingen Laboratorium¹, Interne Geneeskunde² en Apotheek³, Medisch Spectrum Twente, Enschede

Tot de hepatische cytochroom P450 familie (CYP) behoort onder andere het CYP2D6 enzym, dat betrokken is bij het metabolisme en de eliminatie van een groot aantal geneesmiddelen. Genetisch polymorfisme van het CYP2D6 kan leiden tot verhoogde of verlaagde enzymactiviteit en daarmee samenhangend verminderd effect van een geneesmiddel of het optreden van bijwerkingen.

In het beschreven onderzoek is het effect van behandeling met Simvastatine (SV), een HMG-CoA reductase inhibitor, en het optreden van bijwerkingen gerelateerd aan het CYP2D6 genotype.

Aan de studie namen 88 patiënten met vetstofwisselingsstoornissen deel, die voor primaire of secundaire preventie van hart- en vaatziekten op de lipidenpolikliniek van het Medisch Spectrum Twente behandeld werden met Simvastatine.

Voor het genotyperen werd DNA geïsoleerd uit bloed met behulp van Qiamp blood DNA purification kit (QIAGEN, Westbrug, Leusden). De inactiverende mutaties CYP2D6*3, CYP2D6*4, deletie CYP2D6*5 en multiplicatie van CYP2D6 genen, gepaard gaande met verhoogde enzymactiviteit, wer-

den aangetoond met behulp van een polymerase-kettingreactie gevolgd door restrictie fragment analyse.

Bij 3 van de 4 patiënten, homozygoot voor een inactiverend allel, werd de SV medicatie gestopt in verband met het optreden van ernstige bijwerkingen. Er werd een gemiddelde daling van 36% van de pretherapeutische nuchtere cholesterolwaarden gevonden bij een gemiddelde dagdosis van 13 mg SV.

Bij 15 van de 30 heterozygote patiënten traden ernstige bijwerkingen op, waarbij een gemiddelde cholesteroldaling van 31% bij een gemiddelde dagdosis van 17 mg SV werd gevonden.

Een patiënt met gemultipliceerde CYP2D6 genen vertoonde een cholesteroldaling van slechts 6% bij een dagdosis van 40 mg SV.

De resultaten tonen aan dat het CYP2D6 enzym hoogstwaarschijnlijk betrokken is bij het metabolisme van Simvastatine.

Door bepalen van het genotype kan op eenvoudige manier een inschatting gemaakt worden van de enzymactiviteit, hetgeen kan bijdragen tot het optimaliseren van een individuele farmacotherapie.

093. Pilotstudy druggebruik bij automobilisten

L.J. MOSTER¹ en M.P.M. MATHIJSEN²

Deltalab, Poortugaal¹, SWOV², Leidschendam

In het najaar van 1997 is in opdracht van het Ministerie van V&W een studie uitgevoerd onder automobilisten om o.a. inzicht te verkrijgen over de mate waarin automobilisten onder invloed zijn van drugs, geneesmiddelen en alcohol. Deze pilotstudy werd gecombineerd met het jaarlijks terugkerende onderzoek "Rij- en drinkgewoonten" dat wordt uitgevoerd door de SWOV.

Van de in totaal 22614 automobilisten zijn er 402 verdeeld over 10 locaties benaderd om deel te nemen aan de pilotstudy. Van de automobilisten werd een interview afgenomen, een alcohol ademanalyse verricht en een portie urine afgenomen. Alleen de ademtest was verplicht, de overige onderdelen waren op vrijwillige basis. Urine werd ter plaatse onderzocht (op amfetamines) met Drugwipe®, een sneltest voor drugs in "zweet". Daarnaast werd de urine onderzocht met Triage®, AccuSign® en EMIT II®. Positieve monsters en discrepanties werden bevestigd m.b.v. GC/MS of HPLC/DAD (cannabinoiden).

Van de 402 automobilisten hebben er 47 (11,7%) geweigerd mee te werken aan het onderzoek. Van 62 proefpersonen (15,4%) werd wel een interview afgenomen maar bleek het niet mogelijk een urinemonster te verkrijgen.

Van de 293 urinemonsters waren er 25 (8,5%) positief op drugs, meestal veroorzaakt door gebruik van cannabinoiden (16/25). Van de 25 positieve proefpersonen hadden er 5 (20%) een BAG (bloedalcoholgehalte) boven 0,2‰. Van de totale steekproef automobilisten (n=22614) had 10% een BAG boven 0,2‰.

De resultaten van deze studie wijzen er op dat druggebruik niet onderschat mag worden. Gebruik van cannabis komt het meest voor. Drugwipe® scoorde qua acceptatie door de automobilisten goed echter de betrouwbaarheid was gering. Triage® en Accusign® gaven wel betrouwbare resultaten (vergl. met EMIT II®) echter de hoge kosten van (panel)sneltesten zijn een belemmering voor grootschalig gebruik.

Tekortkomingen van drugscreening in urine (bij weggebruikers) zijn:

- de procedure van urineafname langs de weg is te ingewikkeld
- een positief resultaat niet wil zeggen dat men onder invloed is van de betreffende drug omdat drugs (+metabolieten) nog lang na gebruik aangetoond kunnen worden.

Pediatrie

094. Procalcitonin and CRP as diagnostic parameters in children suspected for bacterial sepsis

J.C.J.M. SWAANENBURG, A. KOOLMAN, P.J. VISSER-van BRUMMEN, M. VOLMER and A.P. BOS
University Hospital Groningen

Introduction: For therapeutical reasons it is important to diagnose a bacterial sepsis as soon as possible. CRP is commonly used for this purpose. Recently, procalcitonin (PCT) has been introduced as a new marker for the detection of bacterial sepsis.

We investigated the reliability of CRP and PCT for the detection of bacterial invasion in children highly suspected for bac-

terial sepsis.

Patients and methods: Twenty children (ten boys and ten girls; median age 7 months, range 2 days until 4 years) were included in this study.

Blood was taken at admission, and after 24 hours and 72 hours for analysis of CRP, PCT and blood culture as well as urine and cerebrospinal fluid for bacteriological inventarisation. At

discharge, patients were classified as having experienced a bacterial sepsis on basis of positive bacteriological cultures.

CRP was measured with a Behring nephelometer (Dade-Behring, Amersfoort, The Netherlands). PCT was measured with a LUMItest PCT immunoluminometric assay (Brahms Diagnostica, manufactured by Campro Scientific, Veenendaal, The Netherlands) on a LB9507 Luminometer (Berthold, Breda, The Netherlands).

Results: Five patients were diagnosed as having a bacterial sepsis at admission to the hospital. At a cut-off value of 5.5 ng/ml, PCT showed a sensitivity of 1.00 and a specificity of

0.87 with an area under the ROC-curve of 0.96 (95% confidence interval 0.88-1.00). CRP showed at a cut-off value of 30 ng/ml a sensitivity of 1.00 and a specificity of 0.67 with an area under the ROC-curve of 0.91 (95% confidence interval 0.76-1.00). The areas under the curves of PCT and CRP did not show to be statistically different ($p=0.52$).

Conclusion: PCT appeared to be a better discriminator than CRP in pediatric patients suspected for bacterial sepsis, but the difference in diagnostic performance did not show to be statistically significant.

095. Optimization of daily folic acid dose in pediatric patients with sickle cell disease

F.P.L. van der DIJS¹, D.A.J. BROUWER², B. NIESSINK^{1,2}, T.I.C. van der WAL^{1,2}, D.-J. REIJNGOUD³, F.D. MUSKIET⁴ and F.A.J. MUSKIET²

Public Health Laboratory, Curaçao (The Netherlands Antilles)¹, Pathology and Laboratory Medicine² and Laboratory for Metabolic Disorders³ Groningen University Hospital, and Pediatrician (Curaçao)⁴

Patients with sickle cell disease (SCD) have grossly increased erythrocyte (RBC) turnover. Consequently they have higher folic acid need, which becomes e.g. demonstrable by their higher plasma homocysteine (Hcy). Lifetime folic acid supplementation seems advisable to reduce their plasma Hcy and thereby their high risk of endothelial damage. We investigated the optimal daily folic acid dose in 21 SCD patients (10 HbSC; 11 HbSS; median age 12 years, range 7-16), using plasma Hcy as a functional marker. They received during 9 weeks 1 US-RDA vitamin B6 (1.4-2.0 µg/day), 1 US-RDA vitamin B12 (1.4-2.0 µg/day) and step-wise increasing doses

folic acid (400-1000 µg/day; i.e. about 2-10 US-RDA for 7-18 years old girls and boys). Whole blood vitamin B6, serum vitamin B12, serum and RBC folic acid, and plasma Hcy were measured at baseline (P0); after 3 weeks vitamin B6+vitamin B12+400 µg folic acid (P1); after 3 weeks vitamin B6+vitamin B12+700 µg folic acid (P2); and after 3 weeks vitamin B6+vitamin B12+1000 µg folic acid (P3). Results (medians, ranges) are depicted in the Table. Numbers of subjects (in percentage) who exhibited significant individual Hcy decreases or increases (Δ Hcy beyond 2.8 CV_{anal.biol}), compared with the previous sampling point, are depicted in the last two rows.

	P0	P1	P2	P3
Vitamin B6 (nmol/l)	99(62-157)	132(73-230) ¹	154(82-254) ²	161(84-289)
Vitamin B12 (pmol/l)	325(137-1476)	345(176-981)	348(179-779)	370(174-682)
Serum folic acid (nmol/l)	17(9-26)	27(15-33) ¹	32 (24-40) ²	33(25-44)
RBC folic acid (nmol/l)	596 (290-992)	872(301-1801) ¹	1103(328-2435) ²	1504(444-2415) ³
Plasma Hcy (µmol/l)	9.0(6.5-15.4)	8.1(5.2-12.4) ¹	7.0(4.9-11.9) ²	7.0(5.4-11.8)
Number Hcy decrease (%)		43	14	10
Number Hcy increase (%)		0	0	5

Significant by paired Student's t-test corrected for type-1 errors ($p<0.05$); 1: compared with P0; 2: compared with P1; 3: compared with P2.

None of the subjects had baseline circulating vitamin concentrations below our local reference ranges for vitamin B6 (reference range: 55-110 nmol/l), vitamin B12 (120-700 pmol/l) and serum folic acid (4-30 nmol/l). Twenty-four percent had low RBC folic acid (reference: 430-1360 nmol/l) at baseline. Vitamin B6 and serum folic acid increased from P0-P1 and P1-P2. RBC folic acid increased from P0-P1, P1-P2 and P2-P3. Plasma Hcy decreased from P0-P1 (after B6+B12+400 µg

folic acid) and from P1-P2 (after B6+B12+700 µg folic acid). Forty-three percent of the patients showed Hcy decreases from P0-P1, 14% from P1-P2, and 10% from P2-P3. We conclude that a 1000 µg folic acid supplement daily (5-10 US-RDA for 7-18 years girls and boys) is sufficient to maintain plasma Hcy levels at their lowest possible levels in 7-16 years old pediatric SCD patients consuming their usual diet.

Diversen

096. Albumine-kreatinine ratio: enzymatische kreatinine of Jaffé?

A. J. BAKKER, Y. van DIJK, G. A. van den BERG en H. STORM.
Stichting Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden

Inleiding: Voor de screening t.a.v. microalbuminurie wordt gebruik gemaakt van de albumine-kreatinine ratio (ACR). Voor de alkalische picraat methode voor kreatinine zijn talrijke interferenties bekend (o.a. glucose, ketonen en eiwitten). Daarom is onderzocht of het zinvol is voor de screening op microalbuminurie, de alkalisch picraat methode voor kreatinine te vervangen door een enzymatische methode.

Methoden: Kreatinine is gemeten met een kinetische Jaffé procedure (Merck) en met een enzymatische procedure (Roche). Naast een analytische vergelijking van beide methoden, zijn in patiëntenmonsters, aangeboden voor onderzoek op microalbuminurie, de resultaten van beide methoden vergeleken (regressieanalyse volgens Passing en Bablok).

Resultaten: De enzymatische methode heeft een beperkter li-

neariteitsbereik dan de Jaffé procedure (25 mmol/l versus 50 mmol/l) en de tussen-run reproduceerbaarheid van de enzymatische methode is een fractie slechter (alle niveau's: enzymatisch: <2,7%; Jaffé: <2,0%). Voor de urines, aangeboden voor microalbuminurie, is de regressievergelijking: Kreatinine (enzymatisch) = 0,948 x kreatinine (Jaffé) - 0,056; n= 200; r = 0,998. Voor de albumine-kreatinine ratio is de regressievergelijking ACR (enzymatisch) = 1,070 x ACR (Jaffé) - 0,005.

097. A time restricted validation protocol for implementation of COBAS INTEGRA 700 analyzers using the NCCLS guidelines EP5-T2 and EP9-A

H. J.T. RUVEN, D. van LOON and N.C. den BOER

Dept. of Clinical Chemistry, St. Antonius Hospital, Nieuwegein and MESOS Medical Centre, Utrecht, The Netherlands

The implementation of three COBAS INTEGRA 700 analyzers (ROCHE) was recently carried out in accordance with the method validation procedure described in our quality handbook, which is based on the CCKL Code of Practice. We used the implementation of these analyzers to gain experience with the guidelines of the NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), given a restriction in the available time period.

To fulfil all these conditions, a project plan has been worked out by a project team. As required by the method validation procedure, the plan contains the tasks and responsibilities of the team members, aims and time limits for the various parts of the project and, of course, validation protocols. After the performance features of the future methods were set, we decided to evaluate these methods using the NCCLS guide-

Echte uitbijters zijn niet gesignaleerd; het niveau van de enzymatische kreatinine is iets lager dan van de "Jaffé" kreatinine. Hierdoor zal de ACR, indien gebruik gemaakt wordt van een enzymatische kreatinine, ca. 7% hoger komen te liggen.

Conclusie: Voor de screening op microalbuminurie met de albumine-kreatinine ratio lijkt het gebruik van een duurdere enzymatische kreatinine niet nodig.

lines EP5-T2 ('Evaluation and Precision Performance of Clinical Chemistry Devices') and EP9-A ('Method Comparison and Bias Estimation using Patient Samples; Approved Guideline') and, as a reference, evaluation protocols formerly used by us.

We used the guidelines to set up a validation protocol which is designed in such a way that all data, needed for evaluation of the performance features, are collected without compromising the planned time period and staffing.

Before arrival of the first analyzer, the team agreed on the project plan. The COBAS INTEGRA 700 analyzers with 27 methods were implemented on two locations within a time period of ten weeks. Our experience with the two NCCLS guidelines in this setting will be presented.

098. Evaluation of the COBAS Integra HbA1c test from whole blood

J.A.B.M. PEETERS¹, A.B.M. ALBERS¹, M. WANGER² and J. van PELT¹

Department of Clinical Chemistry¹, Hospitals N-Limburg, Venlo/Venray, The Netherlands and Roche Diagnostics², Basel, Switzerland

The COBAS Integra HbA1c test from whole blood (Roche) was compared with the COBAS Integra HbA1c hemolysate test and the Bio-Rad Variant ionexchange chromatography method. During the evaluation a method comparison and a precision, a dilution linearity and a sedimentation experiment were performed. Only fresh drawn samples were used.

Whole blood samples were first analysed with HPLC and then immediately measured on Integra. Pools for the precision study were prepared, aliquoted and stored at 4 °C for daily analysis. Whole blood samples were mixed and analysed immediately.

Method comparison: 100 samples were analysed on HPLC and with the Integra whole blood and hemolysate method. All samples were analysed in duplicate with Integra methods and as singletons with HPLC. The first replicate of each determination was used for the evaluation of the data.

Precision: The study was performed using two controls, Roche HbA1c N and P and two whole blood pools with a normal and a pathological percentage of HbA1c. Samples were measured in duplicate in two independent runs on 20 days. Within-run, day-to-day, run-to-run and total precision were calculated.

Dilution linearity: Two samples with a normal and a pathological HbA1c percentage were used, dilutions of 90% to 10% in 10% steps of the primary samples were prepared using saline. Sample and dilutions were measured in duplicate.

Sedimentation experiment: 14 samples in two batches were mixed thoroughly, placed on the Integra analyser and measured every 10 minutes.

Results and conclusions: Good correlation of the new whole blood application to either HPLC (r=0.977, M2=-0.39 + 1.08 x M1) and hemolysate method (r=0.994, M2=0.56 + 0.96 x M1) could be shown.

	Roche HbA1c N	Roche HbA1c P	Sample low	Sample high
Precision				
Assigned Value (%)	5.4	12.1	-	-
Mean (n=80) (%)	5.48	13.26	5.15	9.71
CV within run (%)	0.96	1.16	1.34	1.42
CV run to run (%)	1.40	1.52	1.17	1.32
CV day to day (%)	1.20	1.49	1.56	1.29
CV total (%)	2.08	2.42	2.37	2.33

The independence of HbA1c percentage from total Hb concentration could be shown. The fraction of glycated hemoglobin can be determined accurately and linearly down to a Hb concentration of about 0.05 mmol/l, which is far below the normal blood concentration of hemoglobin. In the sedimentation experiment three blood samples could not be determined after 20 to 40 minutes. As the results were flagged correctly, no wrong results were obtained. To avoid problems, samples have to be mixed before being placed on the instrument and measured immediately.

099. Storage-stability of serum and plasma samples for immuno-assays on the DPC® Immulite®2000

C.H.H. SCHOENMAKERS, R.C.C. JANSEN, J.J. TREPPELS, A.J.W.P. WILLEMS en J.L.P. van DUIJNHOFEN
Clinical Laboratory, Elkerliek Hospital, Helmond

The storage-stability at 2-8°C of primary tube serum and plasma samples was investigated for the DPC® Immulite®2000 parameters: TSH, T3, fT4, LH, FSH, Prolactine, Ferritine and PSA. *Procedure:* After collection of clot-, gelclot-serum, and heparineplasma samples by venipuncture, a 200 µl portion was separated and stored at -20°C as a reference for test-stability. Samples in primary and secondary (supernatant was separated from blood-cells after centrifugation) tubes were analyzed in

triplicate at three concentrations on seven subsequent days (storage at 2-8°C). On the seventh day the reference portion was thawed and analyzed.

The relative deviation of the results compared to the starting result were plotted against time. The 2x%CV-borders, obtained in routine with standard control material, were used as a cut-off criterion. For this purpose a control concentration was selected that was most close to the sample concentration.

Results of measurements on day 1 (t = 0) and cut-off % CV

Parameter	Unit	Concentration 1				Concentration 2				Concentration 3			
		Clot	GEL clot	Hep.pl	CV	Clot	GEL clot	Hep.pl	CV	Clot clot	GEL	Hep.pl	CV
TSH	mU/l	0.031	0.029	0.031	5	0.552	0.540	0.539	5	2.40	2.33	2.38	5
T3	nmol/l	1.40	1.45	1.35	10	2.40	2.37	2.21	10				
fT4	pmol/l	13.9	15.4	14.8	7	18.0	18.9	18.2	7	39.5	40.9	39.8	4
LH	U/l	1.2	1.2	1.2	7	13.0	12.7	13.1	7	35.8	34.9	34.6	8
FSH	U/l	1.65	1.57	1.61	3	5.12	4.77	4.92	3	112	111	109	4
Prolactine	mU/l	73	75	79	4	162	161	165	4	405	414	404	4
Ferritine	µg/l	22.5	22.5	20.8	8	97.8	98.7	99.8	7	218	214	202	7
PSA	µg/l	0.68	0.67	0.73	6	1.51	1.50	1.49	6	2.25	2.13	2.12	6

Results: For all sample materials PSA results dropped below the -2x%CV-border after two days. For all sample materials the results of the other parameters remained between the 2x%CV-borderlines.

Conclusions: No significant difference between results of clot-, gelclot-serum or heparineplasma samples was detected for all parameters. No significant difference between results of pri-

mary or secondary tubes was detected for all parameters. TSH, T3, fT4, LH, FSH, Prolactine and Ferritine levels in primary tube serum (with and without gel serum separator) and heparineplasma samples are stable up to seven days when stored at 2-8°C. PSA stability is limited to two days regardless of the tube-type.

100. Evaluation of the Immulite 2000

R.J. SLINGERLAND, J. VALKENBURG, A.C.E.M. ROZENDAAL and H.L. VADER
Clinical Laboratories, Sint Joseph Hospital, Veldhoven

Purpose of this study was to evaluate the performance of the Immulite 2000 (DPC) with respect to the TSH, fT4, LH, progesterone, PSA and cortisol assays. Moreover, we also analysed the workflow on the Immulite 2000 in comparison with the Elecsys (Roche) and theoretically with the Centauer (Chiron) on an average day in our hospital.

Intra-assay precision profiles for the analyses were obtained, using pooled patient sera. The intra-assay precision profiles were based on 7 observations at each concentration. To analyse the linearity of the assays (except for the fT4 assay for obvious reasons) we followed the NCCLS-EP6 protocol. The inter-assay precision was determined as described by the NCCLS-EP5 protocol. The workflow analysis was based on 172 patient samples; 215 tests were performed in 5 batches of 58, 21, 23, 61 and 52 tests, respectively.

Except for progesterone, the assays on the Immulite 2000 showed good intra-assay precision. The coefficient of variation at the lowest concentrations remained below 20%. Following the NCCLS-EP6 protocol we did not find a statistically significant linearity for the TSH, progesterone and PSA assay. However, the linearity of these assays was clinically acceptable. The linearity of the LH and cortisol assays was statistically acceptable according to the NCCLS-EP6. Inter-assay CV% of the assays at clinically relevant concentrations were less than 12.9% for TSH, 7.4% for fT4, 5.7% for LH, 9.3% for progesterone, 8.8% for PSA and 8.5% for cortisol. Analysis of the workflow on the Immulite 2000 in comparison

with the Elecsys showed that the Immulite 2000 was comparable in processing time with the Elecsys at a batch-size of about 100 samples. In case of maintenance the quantity of samples may rise considerably giving the Immulite 2000 an advantage over the Elecsys. At the time of testing the Centauer was not available. Therefore, the time the Centauer would need for the same quantity of samples was calculated theoretically based on the assumption that 15 seconds/sample for injection and 20 minutes for incubation would be needed. Most assays on the Immulite 2000 need 30 minutes per analysis (the TSH-assay even 60 minutes). Therefore, in theory, the Centauer is a faster analyser than the Immulite 2000. Moreover, in a general hospital as ours, 50% of the analyses are TSH assays. At this volume of TSH analyses, the Immulite 2000 shows an increase in the processing time due to limited capacity of the incubation-chamber. The Centauer does not have this problem because the same time is needed for each analysis with regard to the tested assays. A rapid TSH-assay (30 minutes), as has been introduced recently for the Immulite 2000, decreases the total processing time considerably and gives the Immulite 2000 a much better processing time as compared to the Elecsys and a slightly higher processing time as compared to the Centauer (in theory). The total hands-on time to analyse the 215 tests was 49 minutes for the Immulite 2000. This was comparable to the time needed for the Elecsys.

The Immulite 2000 is easy to operate.

101. Tijdsrelatie van membraan, plasmatische en mitochondriale veranderingen tijdens apoptose

R. OVERBEEKE¹, I. VERMES¹, C. REUTELINGSPERGER² en C. HAANEN¹

Afdeling Laboratorium, Medisch Spectrum Twente, Enschede¹; Afdeling Biochemie, Universiteit Maastricht²

De tijdsrelatie van de veranderingen in membraanstructuur, mitochondriale transmembraan-potentiaal en intracellulair calcium tijdens apoptose werd onderzocht. Apoptose, oftewel geprogrammeerde celdood, werd geïnduceerd met behulp van bestraling of door incubatie met anti-Fas (anti-Apo-1, anti-CD95) in twee T-lymfoblastaire cellijnen, HSB2 en Jurkat.

De celbiologische veranderingen tijdens apoptose in beide cellijnen werden in de tijd vervolgd m.b.v. drie flowcytometrische technieken waarbij de volgende stoffen werden gebruikt: I. Annexine V/propidiumjodide, II. DiOC₆ en III. Fura red.

I. De annexine V/propidiumjodide bepaling toont de translocatie van fosfatidylserine aan naar de buitenkant van de celmem-

braan. Tegelijkertijd verschaft het propidiumjodide informatie over de integriteit van de membraan.

II. De lipofiele kation-kleurstof DiOC₆ detecteert veranderingen in de mitochondriale membraanpotentiaal. Tijdens apoptose vindt er verlies plaats van het mitochondriale transmembraan potentiaal door opening van de permeabiliteits transitie kanalen. Uit het onderzoek bleek dat verlies aan negatieve mitochondriaal potentiaal iets eerder optreedt dan de expositie van fosfatidylserine op de membraan en verandering in cellulair calcium. De HSB2 cellen blijken gevoeliger te zijn voor bestraling dan Jurkatcellen en HSB2 cellen kunnen niet geïnduceerd worden m.b.v. anti-Fas.

102. Urinestripscreening: het effect van vitamine C gebruik

M.H.M. THELEN, S.A. ALIPUR en A.A. BOUMAN

Afdeling Klinische Chemie, Academisch Ziekenhuis Vrije Universiteit, Amsterdam

Steeds vaker wordt chemische analyse van urine met behulp van teststrips ingezet om het aantal microscopische sediment analyses te beperken. De sensitiviteit van deze zogenaamde stripscreening wordt mogelijk verlaagd door de aanwezigheid van anti-oxidanten in de urine. Vitamine C is zo'n anti-oxidant en wordt door een groeiend aantal mensen in steeds hogere dosering gebruikt. In de huidige studie is het effect van vitamine C op de sensitiviteit van de verschillende testvelden van de strip nader bestudeerd. Daartoe is van 465 urines naast de aangevraagde sediment analyse een chemische analyse (Combur 10, Miditron, Roche Diagnostics) uitgevoerd en de vitamine C concentratie gemeten (Merckoquant ascorbic acid strips, Merck Diagnostics). De sediment uitslag gold als gouden standaard. Urines waarin veel plaveiselcel-epitheel aanwezig was, zijn uitgesloten van de studie. De gemiddelde vitamine C concentratie van de urines bedroeg 446±18 mg/l. 243 Urines hadden een vitamine C concentratie van minstens 500

mg/l, waarvan er 47 zelfs minstens 1000 mg/l vitamine C bevatten. De sensitiviteit van de stripscreening voor erythrocyten bedroeg 100% (295/295) en die voor leukocyten 99% (246/248). De sensitiviteit van de eiwitstrip voor cel- of korrelcilinders bedroeg 95% (52/55) en de sensitiviteit van de strip voor bacteriën (leukocyten en/of nitriet positief) was 92% (197/215). Voor geen van de bepalingen was er een positieve correlatie tussen het aantal vals negatieve uitslagen en de vitamine C concentratie. Door het uitsluiten van urines boven een bepaalde drempelwaarde kon voor geen van de analyses een verdere verbetering van de sensitiviteit voor de stripscreening worden verkregen. Wij concluderen dat ondanks het toenemend vitamine C gebruik door grote delen van de bevolking stripscreening een veilige methode blijft om het aantal microscopische analyses van urinesedimenten te beperken. Het uitzonderen van monsters met een hoge vitamine C concentratie biedt geen verdere verbetering van de sensitiviteit.

103. Referentiepreparaten voor PSA

B.G. BLIJENBERG¹, B.D. van ZELST¹ en F.H. SCHRODER²

Afdeling Klinische Chemie¹ en Afdeling Urologie², Academisch Ziekenhuis Rotterdam, Rotterdam

De standaardisatie van de bepaling van prostaat-specifiek anti-geen (PSA), houdt de wetenschappelijke gemoederen reeds vele jaren bezig. Was het in het begin van de negentiger jaren de Hybritech Tandem-R PSA-bepaling die voor vele fabrikanten van PSA-bepalingsmethoden een richtsnoer was, na de Stanford-conferenties over de standaardisatie van PSA (1992 en 1994) veranderde dit beeld.

De, als gevolg van de Stanford-conferenties ontwikkelde Stanford 90:10 PSA Kalibrator, bestaande uit 90% gebonden en 10% vrij PSA werd, na officiële introductie door de NCCLS in 1997, aanbevolen. In Europa werd een tweede referentiepreparaat ontwikkeld door het communautair referentie bureau (BCR), het Certified Reference Material 613 Prostate Specific Antigen dat alleen vrij PSA bevat en dat vanaf begin 1999 verkrijgbaar zal zijn.

In ons onderzoek werd de kalibratie van drie, recent op de markt verschenen PSA-methoden, getoetst met beide preparaten t.w. IMMULITE 3rd Generation PSA, IMx Total PSA en Elecsys PSA. Deze methoden zijn alle gekalibreerd m.b.v. de Stanford kalibrator. Tevens wordt PSA equimolair gemeten. Daarnaast werden genoemde methoden onderling vergeleken door gebruikmaking van twee serumverzamelingen met PSA-waarden liggend tussen 0 en 25 µg/l.

De resultaten van de kalibratie-experimenten waren als volgt:

1. Stanford 90:10 PSA Kalibrator

IMMULITE: y (=gemeten) = 1,08x (=berekend) - 0,3

IMx: y (=gemeten) = 0,99x (=berekend)

Elecsys: y (=gemeten) = 0,94x (=berekend) - 0,1

2. CRM 613 PSA

IMMULITE: y (=gemeten) = 1,41x (=berekend) - 0,6

IMx: y (=gemeten) = 1,06x (=berekend)

Elecsys: y (=gemeten) = 1,18x (=berekend) + 0,2

De patiëntvergelijkingen gaven de volgende resultaten:

1. $y(\text{IMx}) = 0,86x(\text{IMMULITE}) + 0,1$ (n=104, r=0,970)

2. $y(\text{Elecsys}) = 0,98x(\text{IMMULITE}) + 0,4$ (n= 97, r=0,976)

De resultaten verschilden onderling significant van elkaar. Geconcludeerd kan worden dat uniforme standaardisatie nog geen uitwisselbaarheid van resultaten betekent voor PSA en dat de onderzochte referentiepreparaten zich verschillend gedragen bij de door ons gebruikte methoden.

104. Analytical performance and clinical validation of three Troponin I assays in several patient groups

E.M. van WIJK¹, E. SANDERS¹, M.R.P. BASELIER¹ and G. PRINTZEN²
Ignatius Hospital Breda¹ and Inselspital, Bern, Switzerland²

We studied the analytical and clinical performance of the Abbott AxSYM Troponin I assay in comparison with the Stratus and the Opus Troponin I test (both Dade Behring). Within- and between-run coefficients of variance (CV's) were found to be satisfactory for the three methods at the decision level concentration of 2 µg/l (CV's < 8 %). Reference ranges for the three assays were < 0.6 µg/l (AxSYM), < 1.2 µg/l (Stratus) and < 1.2 µg/l (Opus) respectively. Some false positive results were found in ostensibly healthy subjects with the Opus assay however. Specimens from several groups of non-cardiac patients were investigated. (trauma, haemodialysis, non-cardiac surgery) Again in these groups the Opus assay showed some unexplainable elevated troponin I values, for which no cardiac causes could be established at examination, including at least medical history, electrocardiography, and serial measurements of routine cardiac enzymes. In a large group of samples from AMI patients (n = 180)

according to the WHO criteria, the correlations between the AxSYM assay and the Stratus as well as the Opus assay were good (r = 0.96 and 0.99). Absolute values showed large differences however, slopes being 4.5 and 3.5 respectively. Receiver-Operating Characteristics (ROC) analysis for the diagnosis of AMI was performed for the AxSYM and Stratus assay in comparison with the AxSYM creatine kinase-MB (CK-MB) mass assay. This analysis revealed an area under the curve of 0.946 for AxSYM and 0.862 for Stratus, whereas the CK-MB mass assay showed an area under the curve of 0.781. This indicates a higher diagnostic accuracy for both the AxSYM and the Stratus Troponin I assay as compared to the AxSYM CK-MB mass assay. The diagnostic accuracy of the AxSYM troponin I assay in turn is significantly better than the Stratus troponin I assay. (p = 0.0006)

105. Differences in reference ranges for tests on the Immulite 2000

G. STEEN and A. CASTEL
Clinical Chemistry & Hematology Laboratory, Bronovo Hospital, The Hague

At present the Immulite 2000 (Diagnostic Products Corporation, LA, USA) has been installed in fifteen Dutch laboratories, from which thirteen produce patient results. Contrary to the Immulite (also called Immulite One), it is not possible with the Immulite 2000 to adapt the patient results by means of slope and intercept. As a consequence one should expect the results of the Immulite 2000 in all laboratories to be (much) alike. The same holds for the reference ranges used in those laboratories. In order to be informed about the possible differences in reference ranges, an inquiry has been carried out. The information about reference ranges from thirteen hospital laboratories is presented in tables. A few examples are illustrated in a diagram. If a fourteenth laboratory is mentioned in the diagrams, the results of Vankrieken are presented(1). Our data demonstrate that there are large differences in the reference ranges used for tests on the Immulite 2000. The table illustrates this opinion for LH. The reasons for these discrepancies are not quite clear. Partly they can be explained by

the differences in sources the laboratories used to establish their own reference ranges. In response to the relevant question in the inquiry however a great variety of answers was returned. In our opinion patient care can be significantly improved by harmonizing the reference ranges for the assays run on the Immulite 2000. Harmonized reference ranges will enable clinical chemists as well as physicians to interpret the results of tests in a more unambiguous way. Recently a large scale investigation of reference ranges for fertility assays has been carried out by Vankrieken et al.(1). The results, presented at the Immulite users meeting on November 18th 1998, also strongly support the need to establish harmonized reference ranges for Immulite 2000 tests. We recommend to all Immulite 2000 users to use the reference ranges of fertility assays as reported by Vankrieken, for other assays to use reference ranges described in DPC Info Plus, June 1997: "Immulite referentiewaarden" and for the remaining assays the reference ranges described in the kit inserts.

Table presenting the ranges in lower and in upper limits of the reference ranges as used in thirteen Dutch laboratories

LH (U/l)	Number of	Range in laboratories	Range in lower limit	Reference range upper limit according to Vankrieken
Women, follicular	11	0 - 4	8 - 15	1.1 - 11.6
Women, periovulatory	10	8 - 35	50 - 110	17 - 77
Women, luteal	10	0 - 5	8 - 15	ND - 14.7
Women, postmenopausal	11	10 - 40	40 - 75, or none	11.3 - 39.8
Men	12	0.5 - 3.0	7.4 - 14.0	0.8 - 7.6

Literature

1. Vankrieken L. Presentation on reference values of fertility assays held at the Immulite users meeting, November 18th 1998.

106. Relatieve productiviteits-index als parameter voor het vergelijken van de productiviteit van analyzers

H.A. HENDRIKS en W.M. VERWEIJ
Stichting Artsen Laboratorium, Utrecht

Gestandaardiseerde protocollen voor evaluatie van de analytische performance van analyzers wat betreft specificiteit, gevoeligheid, precisie, interferentie etc. zijn veel gepubliceerd en bediscussieerd. Er is echter veel minder informatie betreffende gestandaardiseerde metingen van "hands-on" tijd voor de verschillende analyzers en de impact van automatiseren op de efficiency van de analytische fase. Workload statistiek is vooral bruikbaar bij evaluatie van veranderingen in benodigde arbeidsuren bij en na het in gebruik nemen van nieuwe apparatuur. De relatieve productiviteits-index is hiervoor een bruikbare parameter. De relatieve productiviteits-index wordt als volgt gedefinieerd:

Relatieve productiviteits-index=aantal rapporteerbare resultaten/"hands-on" tijd (1)

De productiviteit en efficiency van de immunoassay analyzers ACS:Centaur, Elecsys 2010 tandem opstellingen (2 Elecsys 2011 analyzers) en Vitros ECI, is geëvalueerd met behulp van een workload protocol aangeboden voor publicatie bij *Clinical Chemistry* (2).

Bij het vergelijken van werklijsten voor de bindingschemie van de Nederlandse huisartsen- en ziekenhuislaboratoria bleken grote overeenkomsten tussen de frequentie van elke test en de distributie van het aantal testen per buis. Het totaal aan-

tal buizen was de enige factor die sterk varieerde. Bij dit protocol zijn 700 bepalingen uitgevoerd op 400 buizen en 13 verschillende testen. De verdeling van de testen en het aantal aanvragen per buis was een reflectie van de Nederlandse situatie. De productiviteit werd extra onder druk gezet door verdunningen, reflextesten, cito aanvragen en verandering van reagensslotnummer met bijbehorende kalibratie.

De gemeten relatieve productiviteits-indices voor de ACS: Centaur, Elecsys 2010 tandem opstelling en de Vitros ECI zijn respectievelijk 658, 326 en 223 resultaten/operator uur.

Conclusie: met de relatieve productiviteits index kan een indicatie worden gegeven over het benodigde aantal arbeidsuren na het in gebruik nemen van nieuwe apparatuur.

Literatuur

1. Brzezicki L.A. Are you up for the challenge? *Advance for administrators of the laboratory* 1995; 5:57-59
2. Hendriks H.A., et al. Comparison of new generation immunoassay analyzers for analytical performance and processing capacity and efficiency evaluated by means of a standardized workload protocol (Aangeboden voor publicatie).

107. Evaluatie van de validatieprogramma's 'VALAB' en 'LabRespond'

H.J.L.M. ULENKATE¹, W.P. OOSTERHUIS², N. OSMANOVIC² en H.M.J. GOLDSCHMIDT^{1,3}

Centraal Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹, St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg en Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium², Ziekenhuis De Heel, Zaandam. In samenwerking met leden van de werkgroep klinische chemometrie³: M. Volmer, M. van de Horst, R.W. Wulkan, R.N.M. Weijers, J. Dols, C.A.J.M. van Dongen en W. Gengler, J. Hek, T. Dijkstra.

De handmatige validatie van laboratoriumuitslagen is een tijdrovend proces met grote interindividuele verschillen. Het is mogelijk om dit proces te automatiseren, bijvoorbeeld met het computerprogramma 'VALAB'. Wij zijn gestart met het opzetten van het validatieprogramma 'LabRespond'. Het ontwerp kent vijf validatiefilters: administratieve, technische, monster-, patiënt- en klinisch georiënteerde validatie. De laboratoriumuitslagen binnen een patiënt worden multivariaat geëvalueerd met een in te stellen sensitiviteit. 'LabRespond' is volledig transparant wat betreft de toegepaste validatieregels en de aanpassing hiervan. Om de werking te toetsen werden 163 fouten geïntroduceerd in 5421 laboratoriumuitslagen. Een groep klinisch chemici (n=7) valideerde handmatig deze laboratoriumuitslagen in geanonimiseerde cumulatieve rapporten. De con-

sensus van de groep klinisch chemici werd als niet gevalideerd beschouwd wanneer meer dan drie klinisch chemici dezelfde laboratoriumuitslag afkeurden. Dezelfde data werden automatisch gevalideerd door 'VALAB' en 'LabRespond'. We evalueerden het terugvinden van de geïntroduceerde fouten door de klinisch chemici, 'VALAB' en 'LabRespond'.

Resultaten: de groep klinisch chemici: sensitiviteit=43,6%, specificiteit=99,4%; 'VALAB': sensitiviteit=71,8%, specificiteit=88,4%; 'LabRespond' (ingesteld op $\leq 5\%$)= 66,3%, specificiteit=94,9% en 'LabRespond' (ingesteld op $\leq 10\%$)=86,3%, specificiteit=87,2%.

We concluderen, dat de statistische benadering van 'LabRespond' een veelbelovende manier van valideren is.

108. Probleemgericht aanvraagformulier voor laboratoriumonderzoek door huisartsen: landelijke introductie en aanpassing

J.M. PEKELHARING (NVKC), G.J.H. HAAN (SAN), J. van der LAAN (NHG), S.A.J.J. RIKKEN (NHG), W.P.F. RUTTEN (SAN) en L.O.M.J. SMITHUIS (NVKC)
Gemengde Commissie NVKC/NHG/SAN, probleemgericht aanvraagformulier

De Gemengde Commissie is door de drie betrokken verenigingen gezamenlijk ingesteld met o.a. het doel een landelijk voorstel te doen voor een probleemgericht aanvraagformulier voor laboratoriumonderzoek door huisartsen. De eerste versie van het formulier is in 1996 door de drie besturen overgenomen en als aanbeveling aan de leden toegezonden.

De Gemengde Commissie heeft gewerkt aan de herziening van de eerste uitgave van het formulier, op basis van:

- opmerkingen uit het veld
- nieuwe NHG-standaarden
- herziening van bestaande NHG-standaarden
- nieuwe wetenschappelijke inzichten

Een onderdeel van de te presenteren poster is het voorstel van de Commissie voor het "Probleemgericht Aanvraagformulier 2000".

Inmiddels heeft de Gemengde Commissie via een enquête bij de laboratoria geïnventariseerd in hoeverre de aanbeveling is overgenomen. Van de 150 verzonden enquêtes werden 126 exemplaren terugontvangen (84%).

40 Laboratoria hadden een formulier ingevoerd. In een aantal regio's was een gezamenlijk formulier ontwikkeld. Dit leverde 24 verschillende aanvraagformulieren op. Van deze 24 waren er 5 geheel conform de aanbeveling. Een 12-tal had volgens aanbeveling de alfabetische lijst overgenomen.

Een 4-tal had minder dan vijf afwijkingen in de probleemgeoriënteerde groepen. De overige (15) hadden meer dan vier afwijkingen in het formulier. Dit betrof met name de opname (of inhoud) van de kopjes Neonatale Icterus, Appendicitis, Diarree, en Paraproteïnemie.

Van de 57 laboratoria, die het formulier niet hadden ingevoerd, voerden 26 redenen aan van instutionele aard (geen onderzoek voor huisartsen: 15; andere specialismen: 11). Een 7-tal was tevreden over het bestaande formulier, en een 3-tal had problemen met de logistieke verwerking. De overige redenen waren zeer uiteenlopend (geen hoge prioriteit: 6; geen antwoord: 10, etc.). Een 29-tal overweegt invoering in de toekomst.

Op één locatie (Helmond) is nagegaan hoe de verdeling van de aanvragen over de onderdelen van het formulier is verspreid. Het meest werd gebruik gemaakt van het Algemeen Onderzoek (26,3%) gevolgd door Cholesterol (19,5%), Diabetes (5,6%) en Anemie (5,7%). Het aantal indicaties werd op 17% van de formulieren ingevuld.

Elders (bij DCE te Eindhoven) heeft ook een evaluatie plaatsgevonden. Het aantal aanvragers nam toe met 8%. Het aantal aangevraagde testen daalde met 20% ten opzichte van de uitgangswaarde. De meest aangevraagde probleemgeoriënteerde groepen waren: Algemeen Onderzoek (31%), Cholesterol (13,5%) en Diabetes (7,5%).

109. Tripartite evaluation of the analytical performance of the ACS:Centaur immunoassay platform: first results

M.A. BLANKENSTEIN¹, M. van den. BERG¹, J.P.H.M. VOSSSEN¹, E.H. SLAATS², F. HUDIG², H.R.V.J. WALDT², P.H.M. SCHAAP², T. RAMMELOO³, C.J.H.M. van KESSEL³ and M.C.G. SCHOONE-KOEVOETS³
Departments of Clinical Chemistry, University Medical Center Utrecht (azu)¹, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis Amsterdam (olvg)² and St. Franciscus Ziekenhuis Roosendaal (sfz)³

The performance of the ACS: Centaur immunoanalyzer was investigated in three laboratories, using 19 assays: TSH (regular and ultrasensitive); total and free T4; total and free T3; vitamin B12; folate; ferritin; LH; FSH; estradiol; prolactin; cortisol; hCG; PsA; AFP; OV (for determination of CA 125) and BR (for determination of CA 15.3). Intra-assay variation was tested using controls (azu, sfz) and/or patient pools with low, intermediate and high levels of the analytes. Inter-assay variation was evaluated with controls, analyzed in singlicate or duplicate (olvg) for 20 days, using 2 lots of reagent whenever possible. Comparison to methods currently in use was done with a median of 73 regular specimens (range 38-138).

Results: Median inTRA-assay coefficients of variation at the three levels were 2.9% [range 1.3 (fT3_{azu}) - 7.6 (folate_{olvg})]. InTERassay cv's were higher: 5.4% [range 2.5 (T4_{azu}) - 11.4 (folate_{olvg})]. Where interassay variation markedly exceeded intra-assay variation, lot-to-lot differences appeared to con-

tribute substantially to this result. The finding that the readings of the various controls in the ultra-sensitive TSH3 test were 15.4% lower than those in the regular TSH test is causing concern and may indicate calibration differences.

Good correlations were found with assays currently in use: median r=0.981 [range 0.943 (hCG; vs IMx, sfz) - 0.998 (TSH; vs ACS:180SE, olvg)]. Although the median slope of the regression lines (ACS:Centaur=Y) was 0.96, the observed range was rather wide with 0.73 (Vitamin B12; vs DPC Dual-count-SP-boil, olvg) - 1.5 (T3; vs IMx, olvg). Remarkably, also when compared to the ACS:180 considerable differences were observed: FSH: 0.89_{azu}; Folate: 1.17_{azu}. For hCG the high dose hook effect was found to exceed 1,000,000.

Our preliminary conclusion is that in terms of intra- and, more importantly, interassay variation the ACS:Centaur performs adequately. A reduction in inter-assay CV can be obtained by reduction of lot-to-lot variability and probably by improvement of reagent handling.

110. A nation-wide split patient and control sample experiment to check the commutability of control samples

H. BAADENHUIJSEN¹, R.T.P. JANSEN², C. WEYKAMP³, H. STEIGSTRA¹ and A.W.H.M. KUYPERS¹
SKZL/CKCL AZN St Radboud, Nijmegen¹, KCL St Anna Ziekenhuis, Geldrop², SKZL/KCL Streekziekenhuis Kon. Beatrix, Winterswijk³

To study the commutability of control sera with patient sera, a nation-wide experiment was conducted. In total 140 laboratories, consisting of 70 laboratory couples, bilaterally exchanged and analysed a set of 32 patient sera chosen from their daily workload, together and in the same analytical run with eight centrally distributed control sera with variable make-up. The types of test control sera studied were: Basal liquid pool serum without/with additions of enzymes, saliva, glucose, urea, creatinine; commercial lyophilised specimens; frozen or lyophilised samples without/with addition of 10% saccharose as cryoprotectant. The test control sera were sent as a cooled shipment to the participating laboratories with the intention to be analysed the next day.

For each of the 16 routine chemistry parameters 70 regression lines were constructed from the returned patient data sets. For each regression line the location of the test control sera could then be evaluated. Evaluation was carried out by studying the dispersion of the patient results around the calibration line of the respective test control serum as retrospective calibrator.

The following observations were made:

Due to bacterial contamination our efforts to use the native liquid serum as a reference blank failed. The next best reference blank was therefore the native frozen serum.

Saccharose, although very effective in maintaining the nativity of the serum lipoproteins, negatively influences the commutability for analytes Na, K, Ca, Albumin, Urea and Creatinine especially when dissimilar method principles are combined.

Gamma-GT commutability suffers from the addition of non-human additions like the bovine kidney source as used in this experiment.

Commutability of the commercial test sera was distinctly worse than the other sera in the case of the analysis of Ca and Alkaline Phosphatase.

It is unlikely that one and the same calibrator material is fit for calibration of all clinical chemical analytes.