

## Posterabstracts\*

### De bepaling van methylmalonzuur met behulp van capillaire electroforese: Eerste resultaten

F.A.L. van der HORST, H. JONG A LIEM en W.B.M. GERRITSEN

*Vakgroep Klinische Chemie St Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein*

**Inleiding:** Een hoge serumconcentratie of urine-uitscheiding van methylmalonzuur (MMA) is een goede indicator voor een fysiologische Vitamine B12-deficiëntie. Helaas is de bepaling van MMA gecompliceerd en kan slecht in enkele gespecialiseerde centra met behulp van GC-MS worden bepaald. Gelet op de klinische relevantie van MMA is nagegaan of organische zuur met behulp van Capillaire Electroforese (CE) in urine kan worden bepaald. MMA heeft geen fysische eigenschappen waarmee het met voldoende selectiviteit kan worden bepaald. Tevens belemmert de aard van de functionele groepen van MMA een eenvoudige derivatiseringsstap met een chromogeen waarmee MMA kan worden gedetecteerd. Daarom werd een CE-methode opgezet met een indirecte detectiemethode, waarbij gebruik wordt gemaakt van het principe dat MMA kan worden gedetecteerd als gevolg van de verdringing van de chromofoor, ftaalzuur, door MMA in de mobiele fase.

**Methoden:** MMA in urine wordt bepaald na een zure-etherex-

tractie, waarbij dibromobarnsteen zuur als interne standaard wordt toegevoegd. Gebruik werd gemaakt van een Beckman P/ACE 5500 CE-systeem (15 kV) met eCAP-capillair en UV-detector ( $\lambda = 210$  nm).

De geoptimaliseerde mobiele fase bestond uit: 50 mM fosfaatbuffer (pH = 6,25), 0,56 mmol/l CTAB en acetonitril (20 % (v/v))

**Resultaten en discussie:** Met behulp van het geoptimaliseerde CE-systeem kan MMA in urine binnen 6 minuten worden bepaald, waarbij een detectielimiet van ca. 1  $\mu\text{mol/l}$  kan worden gehaald. De variatiecoëfficiënt van de methode is 5,9 % (op 10  $\mu\text{mol/l}$ -niveau). Onder de geoptimaliseerde electroforetische condities is MMA gescheiden van de meest voorkomende en relevante organische zuren.

**Conclusie:** De bepaling van MMA in urine lijkt in principe uitvoerbaar te zijn met behulp van CE. Momenteel wordt de methode verder analytisch en klinisch gevalideerd.

### The prevalence of primary hemochromatosis as an undiagnosed cause of Chronic Fatigue Syndrome

D.W. SWINKELS<sup>1</sup>, L.D. ELVING<sup>2</sup>, N. AALBERS<sup>1,2</sup>, C.M.A. SWANINK<sup>3</sup>, J.W.M. van der MEER<sup>2</sup>

*Departments of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Internal Medicine<sup>2</sup>, and Medical Microbiology<sup>3</sup>, University Medical Center, The Netherlands*

**Introduction:** Purpose of the Study: to determine the prevalence of primary hemochromatosis among patients who have previously been diagnosed with Chronic Fatigue Syndrome (CFS).

**Methods:** For 88 patients with CFS the transferrin saturation was measured in frozen, eight years old blood samples. Patients with elevated transferrin saturation values (female > 40% and male > 45%, n = 19) were requested to provide a new overnight fasting blood sample for a second determination of the transferrin saturation and the measurement of serum ferritin. The DNA was investigated for mutations in the HFE-gene when one of these iron parameters was elevated (serum ferritin: men > 280  $\mu\text{g/l}$ , pre- and postmenopausal women > 80  $\mu\text{g/l}$  and > 190  $\mu\text{g/l}$ , respectively)

**Results and discussion:** Of the 19 patients with an elevated transferrin saturation, 11 patients were willing to provide a new blood sample, of whom six had increased transferrin saturations and two had elevated serum ferritin values. Neither one had both. These eight patients were neither Cys282Tyr

homozygotes nor compound Cys282Tyr-His63Asp heterozygotes. Thus, none of the patients studied in the follow-up fits the phenotypical or genotypical criteria for the diagnosis of primary hemochromatosis. In the eight cases of whom no renewed blood samples could be obtained, the transferrin saturation was > 50% for two of the five men and < 45% for the three female patients. This makes the presence of hemochromatosis very unlikely in six of these eight drop out samples and possible in two. So, out of 88 CFS patients a maximum of two patients could be misdiagnosed as CFS (2.3%; 95 % Confidence Interval 0-5.5%).

**Conclusion:** In a group of 88 CFS patients we could exclude primary hemochromatosis in all but two patients. Although fatigue occurs frequently in hemochromatosis, we conclude that hemochromatosis is not more common in CFS patients compared to a healthy Caucasian control population. Nevertheless, until larger studies are performed, the substantial mortality resulting from hemochromatosis argues for the screening for this disease in patients with chronic unexplained fatigue.

\* Nagekomen niet gepubliceerde abstracts t.b.v. het 54<sup>ste</sup> NVKC-Congres op 11 en 12 april 2001 te Lunteren

## HELLP-syndrome as complication of preeclampsia increases the amount of cell-free fetal and maternal derived DNA in maternal plasma

D.W. SWINKELS<sup>1</sup>, J.B. de KOK<sup>1</sup>, E. WIEGERINCK<sup>1</sup>, P.L.M. ZUSTERZEEL<sup>2</sup> and E.A.P. STEEGERS<sup>2</sup>

*Departments of Clinical Chemistry<sup>1</sup> and Obstetrics and Gynaecology<sup>2</sup>, University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands*

**Introduction:** Median cell-free male fetal DNA in maternal plasma of preeclamptic women is increased fivefold compared with control pregnant women (1). We determined whether the development of HELLP-syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count) in preeclamptic women is accompanied by an even further increase in cell-free DNA.

**Methods:** Three groups of pregnant women, all carrying male fetuses were matched for gestational and maternal age: pregnant normotensive women (n=10), preeclampsia without (n=7) and with HELLP-syndrome (n=10). Real-time quantitative PCR was used to quantify male fetal DNA (the SRY gene on the Y chromosome) and total DNA (fetal and maternal; the albumin gene) in plasma.

**Results and discussion:** The median circulating fetal DNA increased significantly: 88 cell-equivalents(CE)/ml in normotensive women, 298 CE/ml in preeclamptic women and 3104 CE/ml in concurrent HELLP-syndrome. The median

fractional concentration of fetal DNA (SRY/albumin) in the circulation was similar for normotensive (8.5%) and preeclamptic women (7.6%), but decreased significantly for preeclamptic women with HELLP-syndrome (1.4%), as total albumin DNA increased even more, probably due to general tissue destruction in HELLP-syndrome.

**Conclusion:** These findings may prove useful i) to obtain insight in the pathophysiological conditions causing HELLP-syndrome and ii) to predict the development of this severe variant of preeclampsia.

### Literature

1. Lo YMD, Leung TN, Tein MSC, et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 1999; 45: 184-188.

## Breastfeeding, but not formula feeding, increases plasma homocysteine of low-birth-weight infants from day 20 to 40

M.R. FOKKEMA<sup>1</sup>, H.A. WOLTIL<sup>2</sup>, A. SCHAAFSMA<sup>3</sup>, D.A.J. DIJCK-BROUWER<sup>1</sup>, C.M. van BEUSEKOM<sup>3</sup> and F.A.J. MUSKIET<sup>1</sup>

*Department of Pathology and Laboratory Medicine, Groningen University Hospital<sup>1</sup>; Department of Pediatrics, Martini Hospital Groningen<sup>2</sup>; Research and Development, Friesland Dairy Foods, Leeuwarden<sup>3</sup>*

**Introduction:** High plasma homocysteine (Hcy) is associated with endothelial damage. Plasma Hcy in adults depend mainly on nutritional factors, notably folic acid status. We investigated whether breast- and formula-fed low-birth-weight infants (LBW) have different plasma Hcy, and in what time period these differences, if any, developed.

**Methods:** Plasma Hcy of 15 breast- and 53 formula-fed healthy LBW ( $\leq 2,500$  g), mostly preterm, babies were determined at postnatal ages of about 10, 20 and 40 days in a retrospective study design.

**Results and discussion:** Plasma Hcy (mmol/l) of breast-fed babies were  $6.4 \pm 2.6$  (day 10),  $6.7 \pm 2.4$  (day 20) and  $9.1 \pm 2.4$  (day 40). Those of formula-fed babies were  $7.5 \pm 3.2$  (day 10),

$7.3 \pm 2.1$  (day 20) and  $7.4 \pm 1.6$  (day 40). Hcy of breast-fed babies increased from day 20 to 40 ( $p < 0.0001$ ) to reach higher levels than those of formula-fed counterparts at day 40 ( $p = 0.002$ ). Plasma Hcy at day 10 correlated inversely with formula volume, energy and protein intakes (formula-fed infants) and inversely with average protein and energy intakes (breast-fed infants).

**Conclusion:** The consequences of the higher Hcy of breast-fed infants are unknown. The encountered Hcy difference may be caused by the higher folic acid, vitamin B<sub>12</sub>, vitamin B<sub>6</sub> or vitamin B<sub>2</sub> concentrations in formula, and the gradually declining B-vitamin status in lactating women with advancing lactation.

## Fasting and 6h-postload plasma homocysteine as cardiovascular risk factors. No indications for ordering these tests with use of vitamin-optimized cut-off values

M.R. FOKKEMA<sup>1</sup>, D.A.J. DIJCK-BROUWER<sup>1</sup>, J.M. WEIJER<sup>1</sup>, D.-J. REIJNGOUD<sup>2</sup>, J.J. VAN DOORMAAL<sup>3</sup> and F.A.J. MUSKIET<sup>1</sup>

*Department of Pathology and Laboratory Medicine<sup>1</sup>; Laboratory for Metabolic Disorders<sup>2</sup>; Department of Internal Medicine<sup>3</sup>, Groningen University Hospital*

**Introduction:** Hyperhomocysteinemia (HHcy) is a cardiovascular disease (CVD) risk factor. HHcy is defined as an increased fasting and/or 6h post-load homocysteine (Hcy) after an oral methionine tolerance test. Future demonstration of a beneficial effect of Hcy lowering on CVD risk would justify the use of vitamin-optimized cut-off values. We determined plasma Hcy cut-off values at optimized vitamin status and investigated their influence on HHcy prevalence in healthy adults and patients.

**Methods:** 101 healthy adults received folate (5 mg/day) and vitamin B<sub>12</sub> (1 mg/day) during 2 weeks, and the same dosages

folate and vitamin B<sub>12</sub> plus vitamin B<sub>6</sub> (1 mg/kg/day) during the following 2 weeks. Vitamin-optimized cut-off values (i.e. 97.5th percentiles) for fasting and 6h-postload Hcy were calculated at the study end. The consequences of the vitamin-optimized cut-off values for HHcy prevalence were studied in: 1) the group of 101 healthy adults at baseline, and 2) a retrospective cohort of 3,477 suspected HHcy patients at first attendance.

**Results and discussion:** The vitamin-optimized cut-off values were 9.3 (fasting Hcy) and 35.1  $\mu\text{mol/l}$  (6h-postload Hcy). HHcy prevalences in healthy subjects were: 58 (all), 58 (men),

76 (premenopausal women) and 89% (postmenopausal women). For patients these values were: 86, 85, 88 and 86%, respectively. Of the healthy HHcy subjects, 3 (all), 3 (men), 0 (premenopausal women) and 6% (postmenopausal women) could only be diagnosed on the basis of an increased 6h-postload Hcy. For HHcy patients, these figures were 3, 4, 3 and 2%, respectively.

*Conclusion:* Since there is no proof of lower CVD-risk upon

Hcy lowering, and because of the high HHcy pre-test probabilities upon use of vitamin-optimized cut-off values, there are currently no indications for the ordering of Hcy tests for CVD risk assessment. Following definitive proof, HHcy establishment should merely be based on a fasting Hcy. Its ordering is, however, only justified after population-wide B-vitamin supplementation and/or food fortification.

## Determination of the $\alpha$ 1-Antitrypsine genotype by sequencing selected regions of the gene

J.P.M. WIELDERS, B.B. van der MEIJDEN, R. van WIJK en R.J. KRAAIJENHAGEN

*Department of Clinical Chemistry, Eemland Hospital, Amersfoort*

*Introduction:* Deficiency of the protease inhibitor  $\alpha$ 1-Antitrypsine ( $\alpha$ 1AT) leads to lung emphysema in adults or liver pathology at infancy. In 1996 the WHO has advised the set-up of screening methods and registration of patients with aberrant types associated with strongly decreased concentrations. Up till now phenotyping by isoelectric focussing (IEF) is the method of choice for determination of the  $\alpha$ 1AT protein expression. However the information obtained by IEF may be incomplete in relation to the underlying genotype. We present a method for genotyping  $\alpha$ 1AT gene variants based on DNA sequencing of selected regions of the  $\alpha$ 1AT gene.

*Methods:* We selected patients with antigen concentrations less than 1,3 g/l, measured by kinetic nephelometry. From the literature it is known that > 99% of  $\alpha$ 1AT mutations in Caucasians are located in specific regions of the exons 2, 3 and 5 of the gene. Primers were designed to amplify these fragments by means of PCR. Forward and reverse DNA sequencing reactions were carried out and analyzed on an ABI 310 Genetic Analyzer. Genotypes were compared with the IEF results of a skilled external laboratory.

*Results and discussion:* A comparison of part of the results obtained by the classical IEF phenotyping method and our genotyping method is presented in the following table

Phenotype IEF	Genotype PCR Sequencing	
M (4x)	M1/M1	M1/Mheerlen (2x) M1/Q0Bellingham
Z (3x)	Mheerlen/Z (3x)	

These results clearly demonstrate the beneficials of genotyping compared with IEF phenotyping. Especially, the presence of null alleles is easily recognized. Furthermore, we found that the measured antigen concentrations correspond better with the genotypic information than with the IEF phenotype results. *Conclusion:* The results obtained by our sequencing method for genotyping  $\alpha$ 1AT are compatible with the classical IEF method for phenotyping. However genotyping  $\alpha$ 1AT variants provides more relevant information compared to IEF and thus allows a better detection of clinical significant  $\alpha$ 1AT variants.

### Literature

- Wilson Cox D.  $\alpha$ 1-Antitrypsin deficiency in Scriver Ch.R. et al. The metabolic and molecular basis of inherited disease 1995, 4125-58 McGraw-Hil New York

## Invloed van PAI-1 en tPA genpolymorfisme op de D-dimeren concentraties en mortaliteit bij patienten met een verkorte APTT

E. ten BOEKEL en P.C.M. BARTELS

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

*Inleiding:* Klinisch onderzoek heeft aangetoond dat een APTT-waarde van kleiner dan 25 sec resulteert in een verhoogde mortaliteit. Recentelijk is beschreven dat een verkorte APTT een indicatie kan zijn voor een geactiveerd stollingssysteem. Bij tachtig procent van deze patiënten is een verhoogde concentratie van D-dimeren vastgesteld. PAI-1 en tPA zijn betrokken bij de regulatie van het plasma fibrinolytisch systeem. Voor nadere evaluatie van de specifieke invloed van beide eiwitten is het van belang dat onlangs genpolymorfismen werden beschreven: het 4G/5G PAI-1 en I/D tPA-polymorfisme. In vergelijking met het 5G PAI-1 allel, resulteert het 4G PAI-1 allel in een hogere expressie van PAI-1. Het fenotype van I/D tPA-polymorfisme is nog onduidelijk. In dit onderzoek werd bepaald of de genoemde genpolymorfismen de concentratie van D-dimeren en de mortaliteit bij patiënten met een verkorte APTT beïnvloeden.

*Methoden:* 120 patiënten met een APTT < 26 sec. werden onderzocht. De APTT werd bepaald op de ACL 3000 (Instrumentation Laboratory) m.b.v. de ILTEST™ APTT-SP (synthetic phospholipid) kit. De concentratie van D-dimeren werd bepaald m.b.v. de Vidas (bioMérieux). Genotypering van 4G/5G PAI-1 en I/D tPA-polymorfisme werd uitgevoerd m.b.v. PCR-techniek en endonucleasedigestie. De mortaliteit van de patiënten werd tien maanden na detectie van de verkorte APTT geëvalueerd.

*Resultaten en discussie:* Individuen die homozygoot zijn voor het 5G PAI-1 allel (n=26) bleken een mortaliteit te hebben van 28% en homozygoten voor het 4G allel (n=31) een mortaliteit van 12%. 5G-homozygoten vertoonden hogere D-dimeren concentraties dan 4G-homozygoten. Echter, het verschil bleek statistisch niet significant te zijn. Omdat ook tPA-polymorfisme mogelijk de activiteit van het fibrinolytisch systeem beïnvloedt, is het effect van 4G/5G PAI-1 genpolymorfisme tevens onderzocht in individuen met een identiek tPA-genotype.

In een groep individuen met genotype I/D tPA resulteerde het 5G/5G PAI-1 genotype in een significant hogere D-dimerenconcentratie in vergelijking met het 4G/4G PAI-1 genotype. In dezelfde patiëntengroep werd bij individuen met genotype 5G/5G PAI-1 (n= 15) een mortaliteit van 40% gevonden terwijl een mortaliteit van 0% werd gevonden bij individuen met genotype 4G/4G PAI-1 (n=20).

*Conclusie:* In patiënten met een APTT < 26 sec. is het genotype 5G/5G PAI-1 geassocieerd met hogere D-dimerenconcentraties en een hogere mortaliteit dan genotype 4G/4G PAI-1. De relatie tussen de verhoogde D-dimerenconcentratie en de toegenomen mortaliteit is nog onduidelijk en zal in de toekomst verder worden bestudeerd.

## Een patiënt met cryocrystalglobulinemie: een zeldzaam fenomeen

E. ten BOEKEL<sup>1</sup>, W.A.T. SLIEKER<sup>1</sup>, A. KEIJZER<sup>2</sup>, W. BRONSVELD<sup>2</sup> en P.C.M. BARTELS<sup>1</sup>

Laboratorium voor Klinische Chemie, Hematologie en Immunologie<sup>1</sup> en Afdeling Interne Geneeskunde<sup>2</sup>, Medisch Centrum Alkmaar

*Inleiding:* Een 71 jaar oude man bekend met hyperthyreoïdie en multiple myeloma presenteerde zich met uitgebreide purpura aan de extremiteiten in ons ziekenhuis. Gedacht werd aan een cryoglobulinemie bij multiple myeloma. Ondanks behandeling met chemotherapie, prednison en plasmaforese ontstond er een progressieve arteriële insufficiëntie van de linkervoet waarvoor uiteindelijk onderbeenamputatie noodzakelijk was.

*Resultaten en discussie:* Bij opname was er sprake van een lichte anemie met een sterk verhoogde BSE en een M-proteïnemie (12g/l). Het aantal leukocyten in het bloed lag binnen het referentie-interval. Door middel van immunofixatie werd de M-proteïne getypeerd als een monoclonale component van het type IgG1-kappa. Bij beenmergonderzoek werden 85% van de lymfoïde cellen getypeerd als plasmacellen, hetgeen past bij multiple myeloma. In urine werd slechts een spoortje IgG-kappa, maar geen vrije lichte ketens gevonden. Resultaten van overig urine-onderzoek en nierfunctietesten pasten bij een normale nierfunctie.

Vervolgens werd onderzoek naar de aanwezigheid van cryoglobulinen verricht. Direct na bloedafname was er nog geen

precipitaat in het serum aantoonbaar. Enkele uren na incubatie van het serum bij +4 °C werd een grote hoeveelheid neerslag waargenomen. Echter, in tegenstelling tot cryoglobuline, bleek het precipitaat niet op te lossen bij verwarmen tot 37 °C. Het precipitaat was daarentegen wel oplosbaar in PBS. Het precipitaat had een wit gelatine-achtig aspect en bij microscopisch onderzoek waren grote lamelvormige, kristalachtige structuren zichtbaar. Het precipitaat bleek hoofdzakelijk uit eiwit te bestaan. Met behulp van eiwitelektroforese werd vastgesteld dat het precipitaat voor 90% uit monoclonaal IgG1-kappa eiwit en 7% albumine bestond.

*Conclusie:* Het betreft hier een patiënt met cryocrystalglobulinemie. Cryocrystalglobulinemie wordt gedefinieerd als kristalvorming van monoclonale immunoglobulinen 'in vivo'. Het betreft een uiterst zeldzame complicatie van B-cel-lymfoproliferatieve aandoeningen. In tegenstelling tot cryoglobulinen vormen cryocrystalglobulinen geen reversibele neerslag bij een temperatuur van lager dan 37 °C. Depositie van de kristallen is zeer waarschijnlijk de pathogene factor die ten grondslag ligt aan het klinisch beeld van deze patiënt.