

Posterabstracts

Samenvattingen van de posterpresentaties tijdens het 56^e Congres van de Nederlandse Vereniging voor
Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde op 16 en 17 april 2003 te Lunteren

Categorie 1 Analytisch Basistechnieken chemie

1. Lactaatdehydrogenasemeting volgens IFCC-aanbevelingen: onbetrouwbare resultaten in primaire buis met heparineplasma

A.J. BAKKER, B. MIRCHI, A. ZIJLSTRA, J.T. DIJKSTRA, F. REITSMA, H. SYPERDA
St. Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden

Inleiding: Analyse van LD volgens IFCC-aanbevelingen blijkt in tegenstelling tot SFBC en DGKC in Li-heparineplasma een onaanvaardbaar hoge frequentie van extreme duploverschillen te veroorzaken.

Methoden: Analyse van LD is uitgevoerd met Roche Modular Analytics. Voor het verkrijgen van Li-heparineplasma zijn de monsters in Modular Preactalytics (MPA) of off-line gecentrifugeerd. Variaties in centrifugesnelheid, -duur, buistype, heparine-concentratie, menging en plasmaseparator zijn getest. Tevens is de mogelijkheid van monsterverdunding bij de analyse onderzocht. Duploverschillen worden als niet aanvaardbaar beschouwd als het duploverschil groter is dan $0.01 \times 2 \times \sqrt{2} \times$ duplogemiddelde.

Resultaten: De resultaten van de verschillende experimenten zijn in onderstaande tabel samengevat:

| Variabelen | N | Frequentie onaanvaardbaar grote duplo- verschillen |
|----------------------------|-----|---|
| Centrifugatie: | | |
| MPA: 5 min 1800×g | 108 | 24 (22,2%) |
| MPA: 8 min at 1800×g | 91 | 19 (20,9%) |
| Off-line: 10 min at 2500×g | 79 | 14 (18,0%) |
| Off-line: 10 min at 1300×g | 120 | 13 (10,9%) |

| | | |
|------------------------------------|-----|------------|
| Glazen afnamebuis | 148 | 24 (15,6%) |
| Plastic afnamebuis | 148 | 21 (14,1%) |
| Primaire afnamebuis | 101 | 20 (19,8%) |
| Secundair cupje (overgepipetteerd) | 92 | 1 (2,1%) |
| Mengen bij afname | 49 | 8 (16,3%) |
| Niet mengen | 49 | 7 (14,3%) |
| Plasmaseparator type 1 | 63 | 16 (25,4%) |
| Plasmaseparator type 2 | 63 | 13 (20,6%) |
| Heparine plasma: ± 20 U/l heparine | 81 | 25 (20,9%) |
| ± 70 U/l heparine | 84 | 13 (15,5%) |
| ± 140 U/l heparine | 84 | 5 (6,0%) |
| Serum | 114 | 5 (6,0%) |
| EDTA-plasma | 104 | 0 (0,0%) |
| SFBC | 140 | 2 (1,4%) |
| DGKC | 462 | 15 (3,3%) |
| IFCC zonder monsterverdunding | 208 | 60 (28,9%) |
| IFCC met monsterverdunding | 208 | 8 (3,8%) |

Conclusie: De hoge frequentie van onaanvaardbare duploverschillen in heparineplasma lijkt alleen te kunnen worden beïnvloed door de heparineconcentratie te verhogen. Voorverdunding van het monster voor analyse vermindert de frequentie van onaanvaardbare duploverschillen.

2. Analytische prestaties van enkele "point of care testing" glucosemeters

D. TELTING, M. van den BOSCH, A.P.M. SCHELLEKENS
Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina-Ziekenhuis, Eindhoven

Introductie: Momenteel brengen verschillende fabrikanten "point-of-care testing" (POCT) glucosemeters op de markt. Deze POCT-meters zijn toegesneden op het gebruik in de kliniek en beschikken over een "dockingstation" voor het downloaden van QC-gegevens en meetwaarden naar een PC. Wij vergeleken de analytische prestaties van de "Accucheck Inform" (Roche) met de "Precision PCx" (Medisense). Bovendien betrokken wij bij deze evaluatie twee glucosemeters bedoeld voor "thuisgebruik", namelijk de Accu-Chek Compact (Roche) en de OneTouch Ultra (LifeScan). *Methoden:* De precisie van de meters werd bepaald middels een NCCLS EP10 protocol. Bovendien werden de meters vergeleken met één van de laboratoriummethodes (Radiometer, ABL610 bloedgas-analyser met glucose-elektrode) conform een NCCLS EP9 protocol. De invloed van het hematocriet op de meting werd onderzocht door monsters, na verrijking met bloedcellen (centrifugatie), opnieuw te meten op de apparatuur.

Resultaten & conclusie: De Accu-Chek Inform heeft een variatiecoëfficiënt van 3,4% bij 15,7 mmol/l glucose, oplopend tot 10,3% bij 2,6 mmol/l glucose. De Precision PCx heeft een variatiecoëfficiënt van 6,8% (13,7 mmol/l glucose), oplopend tot 11% (2,5 mmol/l glucose). Alle onderzochte meters vertoonden afwijkingen met de laboratoriummethode, deels verklaarbaar door een verschil in kalibratiemethode (plasma- of volbloedkalibratie). De meters werden beïnvloed door het hematocriet en gaven allen verlaagde waarden bij een verhoogd hematocriet. De OneTouch Ultra van LifeScan vertoonde hierbij de grootste beïnvloeding, bij deze meter werd een verschil tot 54% geconstateerd tussen metingen uitgevoerd bij een hematocriet van 0,17 en 0,68. Bij een lage glucoseconcentratie (3,1 mmol/l) werd bij deze meter overigens géén afwijking geconstateerd. Vergeleken met de Accu-check Inform vertoonde de Precision PCx een grotere beïnvloeding (respectievelijk 5% en 31% verlaagd glucose bij hematocriet van 0,60).

3. Analytical evaluation of sample index measurements on Integra 800

M. TRESKES¹, A. MC. CAUGHEY², C.M. WONG-MOO¹, A. GREBE²

Department of Haematology and Clinical Chemistry¹, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam; Roche diagnostics², Mannheim

Introduction: Haemolysis, icterus and lipemia (turbidity) can interfere with clinical chemistry tests. Therefore, it is necessary to monitor the appearance of the plasma or serum samples in an automated, objective and quantitative manner. We have been using "sample indices" on our Hitachi chemistry systems (717 and Modular P) for many years now to detect interfering levels of e.g. bilirubin and turbidity on creatinine and haemolysis on potassium and LDH. Moreover, we correct potassium and LDH up to a certain degree of haemolysis. Thus, we are able to report (earmarked) corrected results, which are clinically acceptable and prevent extra blood sampling and treatment delay, especially in the paediatric and emergency departments. The Integra 800 system, which is used together with a Modular ISE/P800/P800 system, was not

yet able to measure sample indexes of haemolysis, icterus and lipemia. Roche diagnostics has recently developed this application, which we tested in our laboratory.

Methods: Sample indices of 450 plasma samples with different degrees of haemolysis and/or icterus and/or lipemia were determined on Integra 800 and Modular P800. Results were compared using Passing/Bablok correlation analysis.

Results: Haemolytic, icteric and lipemic indexes correlated well and gave similar results up to 400 µmol/l bilirubin, 0.4 mmol/l hemoglobin and 10 mmol/l triglycerides. At high triglyceride concentrations the correlation was poorer.

Conclusion: Sample indexes on Integra 800 can be used to detect potential interference by lipemia, icterus or hemolysis.

4. De HemoCue glucosemeter kan met een acceptabele precisie glucose bepalen bij neonaten

R.W.L.M. NIESSEN, K. DRIESSEN

Rijnland Ziekenhuis, Klinisch Chemisch Laboratorium, Leiderdorp

Inleiding: Vanwege de hoge hematocrieten en de meer rigide erythrocytenmembraan bij bloed van neonaten in vergelijking met bloed van volwassenen schieten POCT-glucosemeters vaak te kort om een betrouwbare glucose bepaling uit te voeren. De HemoCue glucosemeter is uitgetest om te beoordelen of hiermee voldoende vergelijkbare resultaten verkregen kunnen worden in vergelijking met de hemolysaatmethode op de Hitachi-917 (hexokinase methode).

Methoden: Als uitgangsmateriaal wordt gebruik gemaakt van heparinebloed verkregen vanuit een navelstrengpunctie (n=5) en venapunctie bij volwassenen (n=5), wat bij 37°C geplateet wordt totdat de glucoseconcentratie gedaald is tot beneden de 0,5 mmol/l. Vervolgens worden dit uitgangsmateriaal gesplitst in 8 porties waaraan een steeds oplopende concentratie glucose is toegevoegd (max. 4 mmol/l). Het glucose uit de zo verkregen monsters wordt zowel bepaald op de Hitachi-917 als op de HemoCue glucosemeter. De mate van hemolyse in navelstrengbloed en de eventuele invloed op de glucose bepaling is getoetst door met navelstrengbloed twee vries/dooi cycli te

doorlopen en dit te vergelijken met onbehandeld navelstrengbloed (n=3) Vervolgens zijn deze materialen verrijkt met glucose zoals beschreven en is glucose bepaald op zowel Hitachi-917 als de HemoCue glucosemeter

Resultaten: Bij volbloed van volwassenen zijn de glucose-uitlagen verkregen via de Hitachi-917 en de HemoCue glucosemeter in het gebied van 0 tot 4,5 mmol/l goed vergelijkbaar (regressielijn HemoCue=1,007Hitachi-0,076, r=0,982) in tegenstelling tot het navelstrengbloed waarbij de HemoCue significant hogere glucoses bepaald dan de Hitachi-917 (regressielijn HemoCue=1,175Hitachi+0,017, r=0,974). Er wordt geen effect waargenomen op de glucose bepaling van extra vries/dooi cycli van navelstrengvolbloed met de HemoCue glucosemeter.

Conclusie: Hoewel de glucosebepaling in navelstrengbloed van de HemoCue glucosemeter iets hoger uitvalt dan de routine Hitachi-917 kan deze glucosemeter goed ingezet worden bij het bepalen van glucose in bloedmonsters met hoge hematocrieten en meer rigide erythrocytenmembraan (m.n. neonataal bloed).

5. Analytical performance of a kinetic method for lactate dehydrogenase activity in cerebrospinal fluid

E.C. LASES^{1,2}, D. van LOON¹, M. de BIE¹, M.M. VERBEEK³, J.H.H. THIJSSSEN², F.J.L.M. HAAS¹

Department of Clinical Chemistry, St. Antonius Hospital, Nieuwegein¹, Department of Biomedical Analysis, Utrecht University² and Department of Neurology, University Medical Center Nijmegen³, The Netherlands

Introduction: The activity of lactate dehydrogenase (LD) is normally about 15 times higher in serum than in cerebrospinal fluid (CSF), which causes special analytical problems for its detection in the latter body fluid. Problems of precision and sensitivity of the measurements have largely been ignored in the past, and methods originally recommended for use with serum have simply been adopted without consideration on their suitability for CSF. The aim of our study was to implement and validate a kinetic method for the determination of LD activity in CSF.

Methods: We implemented a kinetic method for the measurement of LD activity in CSF on a Cobas Fara II[®] analyzer according to the recommendations of the German Society for Clinical Chemistry (DGKC). The implemented method was validated according to the NCCLS EP5-A and EP9-A guidelines.

Results: The within-run reproducibility (CV) was 1.7 – 9.5% and total reproducibility ranged from 2.6 to 8.7%. All CVs were smaller than 14.5% and thus met the precision requirement as proposed by Tonks. Furthermore, the results of our method and the method performed by the reference laboratory for CSF analysis were highly correlated ($y = 0.94 (\pm 0.01) x - 0.3 (\pm 0.2)$, $S_{yx} = 0.79$ U/L, $r = 0.99$).

Conclusions: Our results show that the implemented kinetic method for the determination of LD activity in CSF is precise and correlates well with the method performed by the reference laboratory for CSF analysis. Our method is thus appropriate and reliable for (patho)physiological research and routine diagnostic procedures.

6. Overestimation of hypoglycemia in infants with a high hematocrit

H. KEMPERMAN, C. VERHULST

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

Introduction: In the WKZ Children's Hospital the bloodgas-analysers were recently equipped with a glucose electrode. Evaluation revealed that it enables a rapid and precise measurement of glucose in a small volume of whole blood collected in a Li-Hep capillary. However, we found incidental cases of hypoglycemia that were not in line with the clinical picture of the infants. Remarkably, most infants with an overestimated hypoglycemia had a high hematocrit.

Methods: To address this observation blood samples were collected in Li-Hep tubes and split into two. Subsequently, removing some of the plasma increased the hematocrit of all duplicate samples. Hereafter each sample was used to fill 7 capillaries and 7 pediatric tubes to be able to follow the glucose consumption in time in capillaries versus pediatric tubes and a normal hematocrit versus an increased hematocrit.

Results: In all cases glucose concentrations declined with

time. Especially in capillaries with a high hematocrit and a low glucose the decrease is dramatic (up to 1 mmol/L within 20 minutes). Surprisingly, this decrease, although still significant, is less dramatic in samples collected in pediatric tubes.

Conclusions: Overestimation of hypoglycemia in pediatric samples with a high hematocrit and collected in capillaries is a serious problem when samples are not directly analyzed. Why the consumption of glucose in capillaries is much higher compared to pediatric tube remains unclear. Possibly the glucose consumption is enhanced by contact activation, which is more efficient in a capillary compared to a tube. An other option is that glucose consumption is higher in capillaries because the exchange surface between erythrocytes and plasma is much larger in horizontally stored capillaries compared to vertically stored pediatric tubes.

7. Het urinesediment: onderbouwing van criteria en concentratiegrenzen van de sedimentenzeef

R.C. EIJKMAN-ROTTEVEEL¹, Y.W.J. SYPKENS², J. van PELT¹

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Afdeling Nierziekten², Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden

Introductie: Bij het kwalitatief urineonderzoek worden de resultaten van urinestripanalyse gebruikt om pathologische urinemonsters te scheiden van de monsters waarbij microscopisch onderzoek "geen bijzonderheden" zou opleveren. In de literatuur is weinig uniformiteit over criteria en concentratiegrenzen waaraan deze zeef zou moeten voldoen. Wij hebben daarom een aantal variaties van een zeef gedefinieerd, geanalyseerd en een keus gemaakt. Hierbij werd gestreefd naar een zo hoog mogelijke negatief voorspellende waarde en zo min mogelijk "onnodig" microscopisch onderzoek.

Methode: Bij 2019 urinemonsters is onderzoek verricht met een fasecontrastmicroscop met X10 en X40 objectieven. Urinestripanalyse werd uitgevoerd met de Combur⁹Test[®] M strips. Er werden criteria gesteld voor een pathologisch sediment als 'gouden standaard'. Vervolgens zijn de stripparameters leukocyten, hemoglobine en eiwit als componenten voor de zeef gekozen, waarbij de concentratiegrenzen gevarieerd werden.

Resultaten: De screeningszeven hadden allen een negatief voorspellende waarde van meer dan 95%. Echter de hoeveelheid urinemonsters met microscopisch vervolgonderzoek verschilde sterk per zeef. Onze keus viel op de zeef met de stripparameters leukocyten en hemoglobine die positief werd vanaf meer dan 25/ μ l. Deze zeef had een negatief voorspellende waarde van 96%, een sensitiviteit van 87%, een specificiteit van 83% en een positief voorspellende waarde van 56%. Van het totale aanbod aan kwalitatief urineonderzoek zou 31% microscopisch vervolgonderzoek krijgen.

Conclusie: Ondanks dat in de literatuur gesproken wordt over eiwit als onderdeel van de sedimentenzeef vonden wij nauwelijks een bijdrage aan het verhogen van de negatief voorspellende waarde, terwijl er beduidend meer microscopie verricht zou moeten worden. In samenspraak met de kliniek is dan ook besloten deze parameter niet mee te nemen in de samenstelling van de zeef.

8. Bepaling van alkalische fosfatase iso-enzymen volgens een nieuwe precipitatietechniek (Sebia)

C.M. HACKENG, B. JONGEN, M.P.J. SCHMITZ, M.P. van DIEIJEN-VISSER

Klinisch Chemisch Laboratorium, academisch ziekenhuis Maastricht

Inleiding: De identificatie van alkalische fosfatase (AF) iso-enzymen is de aangewezen techniek in geval van onverklaard verhoogde AF-serumactiviteit. In het bijzonder bij bot en leverpathologie, primair of ten gevolge van gemetastaseerde tumoren, kan de differentiatie van AF-iso-enzymen bijdragen tot de diagnose. Omdat bot- en lever-AF zich slechts onderscheiden in de mate van posttranslationele glycosylering, migreren zij als één brede band in de agarose gel. In tegenstelling tot lever-AF is bot-AF in sterke mate gesialyseerd, waarvan gebruik wordt gemaakt in verschillende scheidingstechnieken. Om onderscheid te maken tussen bot- en lever-AF wordt veelal neuraminidase gebruikt om sialzuurresiduen te knippen en het elektroforesepatroon te wijzigen. Hiermee zijn bot- en lever-AF niet altijd te onderscheiden. Onlangs heeft de firma Sebia een techniek geïntroduceerd waarbij m.b.v. lectine bot-AF in-gel geprecipiteerd wordt.

Methoden: Na validatie en optimalisering van de Sebia methode is een methodevergelijk gestart tussen de Beckman Iso-pal(neuraminidase) en de Sebia Iso Pal(lectine) Hierna zijn referentiewaarden bepaald (n=80).

Resultaten: Intra- en interassayvariaties lagen voor alle iso-enzymen <7 % (n=7) Een uitstekende correlatie tussen Beckman en Sebia AF-isoenzym bepalingen werd gevonden ($r=0,99$, $y=1,01x - 1,6$) Referentiewaarden zijn <80 U/l (lever), < 55 U/l (bot), <6 U/l (lever2 variant), < 15 U/l (intestinaal) en < 16 U/l (intestinaal variant) Bepaling van placenta AF door hitte inactivatie van de overige enzymen (65 °C) was in sommige gevallen nodig voor een definitieve differentiatie.

Conclusies: De AF-iso-enzym bepaling volgens de methode van Sebia (Hydragel Iso Pal) is een goed bruikbare methode, met goede reproduceerbaarheid. Hij correleert uitstekend met de bepaling volgens Beckman, maar is aanzienlijk eenduidiger in interpretatie.

9. Telling van het aantal leukocyten in gewrichtsvloeistof: telkamer of analyzer?

R. de JONGE¹, M. SMIT¹, R. BROUWER¹, M. FRANKRIJKER-MERKESTIJN¹, R.J.E.M. DOLHAIN², J.M.W. HAZES², A.W. van TOORENENBERGEN¹, J. LINDEMANS¹
Klinische Chemie¹ en Reumatologie², Erasmus MC, Rotterdam

Introductie: Dit onderzoek ging na of het mogelijk is om het aantal leukocyten (WBC) in gewrichtsvloeistof betrouwbaar te meten met een standaard hematologieanalyzer (Sysmex XE-2100) Methoden: Kniepunctaten werden opgevangen in heparinebuizen, goed gemengd en 10 maal verdund in PBS. Het aantal WBC werd geteld met behulp van 1) een standaard (urine)telkamer (KOVA) en een microscoop (referentiemethode) en 2) een hematologie analyzer (WBC-kanaal + DIFF kanaal). De binnendag- en tussendagimprecisie van beide meetmethoden werd bepaald met behulp van een hoge en een lage controle (Quantimetrix) Resultaten en discussie: WBC-telling via het WBC-kanaal van de hematologieanalyzer kwam niet overeen met die van de referentiemethode (WBC-analyzer = 0,03 x WBC-referentiemethode + 0,2; $R^2 = 0,27$) WBC-telling via het DIFF-kanaal daarentegen kwam goed overeen met de referentiemethode (WBC-analyzer = 0,83 x WBC-referentiemethode + 1,0; $R^2 = 0,98$) Er bestond een zeer goede correlatie tussen onverdunde en verdunde WBC-tellingen op de hematologie analyzer (WBC-onverdund = 0,96 x WBC-verdund + 0,2; $R^2 = 1$). De imprecisie van de referentiemethode was groter dan die van de hematologieanalyzer (DIFF kanaal, zie Tabel).

| | Variatiecoëfficiënt (%) | |
|---|-------------------------------|--------------------------------|
| | Level A (560 WBC/ μ l) | Level B (1081 WBC/ μ l) |
| Tussendagimprecisie referentiemethode | 22,4 | 20,3 |
| Tussendagimprecisie Sysmex XE-2100 | 10,0 | 10,0 |
| Binnendagimprecisie referentiemethode | 11,7 | 12,5 |
| Binnendagimprecisie Sysmex XE-2100 | 6,8 | 3,7 |
| Interindividuele variatie referentiemethode | 35,9 | 21,0 |

Conclusie: Meting van het aantal WBC in gewrichtsvloeistof via het DIFF-kanaal van de Sysmex XE-2100 gebeurt betrouwbaar en met een kleinere variatie vergeleken met de referentiemethode.

Basistechnieken hematologie

10. Free light chains in the follow up of multiple myeloma

I.S. KLASSEN¹, M. KOCK-JANSEN¹, R. RAYMAKERS²
Department of Clinical Chemistry¹, Department of Hematology², University Hospital Nijmegen

Introduction: Plasma cells produce light chains in excess to heavy chains. It has been claimed that the measurement of free light chains is a very sensitive tool in the detection and follow up of multiple myeloma. The aim of this study was to compare results of free light chain levels with the bone marrow tumor cells (% malignant cells using PCR) and with M-proteins in serum and urine during treatment of the myeloma. Moreover the performance of the method for measuring free light chains was evaluated.

Methods: The FreeliteTM (TBS Ltd) on a BNII nephelometer (Behring) was used to quantitate levels of free light chains in serum and urine. An allele-specific oligonucleotide (ASO)-PCR was used to quantitate malignant cells. M-protein detection in serum and urine was done with the Sebia system.

Results: In one patient (IgG kappa myeloma, after allo-BMT

and donor lymphocyte infusion) the free light chain concentration, ASO-PCR and M-protein levels followed the same trend. In a second patient ('nonsecretory', after bone marrow transplantation) free kappa levels were increased for at least 1.5 years before monoclonal free light chains are reported in serum and urine by electrophoresis techniques. At that time FreeliteTM reports 170 g/l free kappa. This hits the problem that FreeliteTM can sometimes report unreal levels of free light chains. Linearity of the assay in serum and urine can also be a problem. In 3 out of 8 additional myeloma patients, previously with detectable M-proteins but now negative, increased serum free light chain values were measured.

Conclusion: FreeliteTM can give additional information in some cases, but more information is needed about the behaviour of the free light chains to understand what is measured.

11. Pseudoplaatjes: Een retrospectief onderzoek naar incidentie en interferentie met de automatische trombocytentelling

W. van der MEER, M.H. de KEIJZER
Universitair Medisch Centrum St Radboud, Afdeling Klinische Chemie, Nijmegen

Inleiding: Automatische trombocytentellingen kunnen foutief verhoogd zijn als gevolg van celfragmentatie bij acute leukemie en bij hemolyse. Met name bij acute leukemie kunnen deze celfragmenten (pseudoplaatjes) erg op trombocyten lijken en is met behulp van een automatische celteller geen onderscheid te maken. Microscopisch onderzoek van een bloeduitstrijkje is nodig om eventuele aanwezigheid van pseudoplaatjes te detecteren: bij aanwezigheid van pseudoplaatjes dient het aantal trombocyten gecorrigeerd te worden.

Methoden: K₃EDTA-bloedmonsters werden gemeten op een automatische celteller, een uitstrijkje werd gemaakt en gekleurd met behulp van de May Grünwald-Giemsa kleuring.

Van het bloeduitstrijkje werd een 500-deeltjstelling uitgevoerd, bij aanwezigheid van pseudoplaatjes werd het aantal trombocyten gecorrigeerd.

Resultaten: Van de 169 patiënten met een acute leukemie hadden 43 patiënten (25%) pseudoplaatjes, in 7 gevallen (4%) werden de patiënten gereclassificeerd als patiënten met een verhoogd risico voor bloedingsneiging (trombocyten < 15 x 10⁹/l).

Conclusie: Uit dit onderzoek is gebleken dat de morfologische beoordeling van trombocyten bij patiënten met een acute leukemie een noodzaak is, ook is het wenselijk om een snelle screeningsmethode te ontwikkelen om deze vorm van pseudotrombocytose op te sporen.

12. De antitrombinebepaling in het 24-uurs-pakket op de Sysmex CA 1500

A. LEYTE, H. WINNUBST, J. BUITENHUIS, K. JOOP

Hematologisch Klinisch Chemisch Laboratorium (HKCL), Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam

Introductie. Op het HKCL van het Onze Lieve Vrouwe Gasthuis behoort de bepaling van antitrombine tot het 24-uurs-pakket. Bij het in gebruik nemen van de Sysmex CA1500 als stollingsanalyzer, met daarop o.a. de Berichrom antitrombinebepaling, bleek dit problemen op te leveren: (1) de abnormale controle, 2 maal per 24 uur bepaald, (met een laag antitrombine gehalte) toonde een zeer hoge variatie coëfficiënt voor antitrombine (20-30%). Er werden vooral uitschieters naar te lage waarden (beneden - 3SD) gevonden; (2) mede hierom werd de antitrombine bepaling nog in duplo gedraaid. Hierbij viel in het bijzonder bij patiënten met lage percentages antitrombine op dat de duplo's soms erg slecht uitvielen (verschil tussen beide metingen groter dan 10% van de gemiddelde waarde). Daarbij was de eerste uitslag altijd lager dan de tweede uitslag.

Methode en resultaten. Er is in samenwerking met Dade Behring uitgebreid onderzoek naar de oorzaken van deze problemen gedaan. Dit heeft het volgende opgeleverd: er bestond een grote variabiliteit in de efficiëntie van oplossen van het trombine reagens. Bovendien bleek de stabiliteit on board van dit reagens tegen te vallen. Tenslotte was er sprake van reagens carry over van de PTT naar de antitrombine bepaling (Innovin). Hierop is de werkwijze rondom reagens handling aangepast. Tevens is er een extra spoelstap in de antitrombine bepaling toegevoegd, die inmiddels is verwerkt in de nieuwe applicatiesheet van Dade Behring voor de antitrombine bepaling op de Sysmex CA 1500.

Conclusie. De getroffen maatregelen hebben er toe geleid dat de antitrombine bepaling in het 24-uurs-pakket inmiddels zeer stabiel is en in enkelvoud kan worden gedraaid.

13. Referentiewaarden hemocytometrieparameters voor de Sysmex XE-2100

J.H. KLINKSPOOR, J.B. LOKHOFF, M. SPAANS, J.M. PEKELHARING

Diagnostisch Centrum SSDZ, Reinier de Graaf Groep, Delft

Inleiding: Bij ingebruikname van de Sysmex XE-2100 in ons laboratorium als routinehematologieanalyzer werden de afzonderlijke bepalingen gevalideerd ten opzichte van onze vorige analyzer, de Coulter STKS. De bestaande referentiewaarden voor de hemocytometrie parameters werden gehandhaafd. Doel van deze studie was de referentiewaarden te toetsen en tevens nieuw toe te kennen aan ongerapporteerde parameters.

Methoden: Bij 60 laboratoriummedewerkers (27 mannen, 33 vrouwen) werd EDTA-bloed afgenomen. Hierin werden alle hemocytometrie parameters bepaald en werden de gemiddelde waarden, standaarddeviaties, medianen en de 95% intervallen (2,5-97,5 percentielscore's) berekend.

Resultaten: Voor de volgende parameters werden de bestaande referentiewaarden vergeleken met de 95% intervallen: leukocyten, erythrocyten, Hb, Ht, MCV, trombocyten, reticulocyten (%e), en de differentiatie. Voor de erythrocyten, Hb en Ht werden geslachtsafhankelijke waarden berekend. Over het algemeen kwamen de gemeten 95% intervallen van de vrijwilligers goed overeen met de referentiewaarden, welke meestal

10-20% ruimer gesteld waren. Dit verschil is te verklaren door de beperkte spreiding in leeftijd van de proefpersonen. Opvallendste bevinding was dat bij de mannen de ondergrenzen voor het aantal erythrocyten ($4,3$ vs. $4,4 \cdot 10^{12}/l$), het Hb ($7,9$ vs. $8,4$ mmol/l) en Ht ($0,39$ vs. $0,42$ l/l) lager uitvielen dan verwacht. Daarnaast werden nieuwe referentiewaarden toegekend aan de volgende parameters: MCH, MCHC, RDW, platelet distribution width, mean platelet volume, de platelet/large cell ratio, plateletcrit, reticulocyten (absoluut), immature reticulocyte fraction, en de low/medium/high fluorescence ratio's.

Conclusies: Na ingebruikname van de Sysmex bleek aanpassing van de referentiewaarden voor de hemocytometrie parameters vooralsnog niet noodzakelijk. Nader onderzoek bij een grotere en qua leeftijd bredere groep personen dient te worden verricht naar de geslachtsafhankelijke referentiewaarden voor erythrocyten, Hb en Ht. Het vaststellen van referentiewaarden voor de ongerapporteerde parameters is van nut voor kwaliteitscontrole en bij het beoordelen van patiëntenresultaten.

14. Evaluatie van enkele methoden voor de diagnostiek van lupus-anticoagulans

Y.M.C. HENSKENS, E. MILTENBURG-van der NEUT, A. ABDULLAH, E.J. van den DOOL

Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam, Laboratorium Algemene Klinische Chemie

Inleiding: De diagnostiek voor lupus-anticoagulans (LAC) moet voldoen aan een aantal criteria waaronder het gebruik van LAC-gevoelige testen. In dit onderzoek werden een aantal LAC-gevoelige testen uitgevoerd op de Electra 1600C analyzer (Instrumentation Laboratory) en vergeleken met de testen op een nieuwe stollingsanalyzer (STA-R, Roche Diagnostics). Daarnaast werd de LAC-gevoeligheid van twee APTT reagentia onderzocht.

Methoden: De patiëntenmonsters in dit onderzoek ($n=54$) werden aangeboden met de vraagstelling LAC. Bij de bestaande werkwijze werd de LAC diagnostiek uitgevoerd op een Electra 1600C analyzer (E1600C) d.m.v. twee testen: een "verdunde PT" (dPT) m.b.v. Innovin (Dade Behring) en een "dilute Russell's viper venom test" (dRVVT) m.b.v. LA-SCREEN en LA-CONFIRM (Gradipore). Voor de nieuwe werkwijze werd gebruik gemaakt van PTT-LA en STA-CLOT (Roche) en dRVVT (Gradipore) op STA-R. De APTT werd bepaald m.b.v. ActinFS (Dade Behring) op de E1600C en STA APTT (Roche) op de STA-R.

Resultaten: De analyse van de patiëntenvergelijking (dRVVT LA-SCREEN op E1600C en STA-R) laat de volgende regressielijn zien: $y = 1,4557x + 0,585$ ($r^2 = 0,9187$). Van de 54 patiëntenmonsters met klinische verdenking LAC scoren er 13 negatief en 18 positief met alle testen. De volledig positief scorende monsters vertonen allen een matig (ActinFS) tot sterk (STA APTT) verlengde APTT. Bij de discrepante uitslagen valt op dat de dPT vaak (5 maal negatief en 4 maal positief) de enige afwijkende uitslag geeft.

Conclusies: De dRVVT (LA-SCREEN) op E1600C en STA-R vertoont een goede correlatie.

In ons onderzoek lijkt dPT de minst geschikte methode voor de diagnostiek voor LAC gezien de ongevoeligheid voor LAC en de gevoeligheid voor andere factoren. Bij de duidelijk LAC positieve monsters is de APTT (ActinFS en STA APTT) altijd verlengd.

15. De invloed van de glucoseconcentratie op het meten van de Mean Corpuscular Volume bij de ADVIA-120, Sysmex K-1000 en de Celldyn-4000

R.W.L.M. NIESSEN^{1,2}, E. WES¹, M. TEMMINK¹, K van RIJN²

Diaconessenhuis¹, Klinisch Chemisch Laboratorium, Leiden; Rijnland Ziekenhuis², Klinisch Chemisch Laboratorium, Leiderdorp

Inleiding: Het is bekend dat hyperglycemische bloedmonsters een foutief hoge mean corpuscular volume (MCV) kunnen genereren op hematologie-analysers als gevolg van de osmotische shift die optreedt nadat zo'n monster voor meting opgenomen is door het verdunningsmiddel van de analyser. Wij hebben op de ADVIA-120, Sysmex-K-1000 en de Celldyn-4000 bekeken bij welke glucoseconcentratie het gemeten MCV een onacceptabele afwijking (> 3%) gaat vertonen als gevolg van dit bepalingseffect.

Methoden: EDTA-bloedmonsters, vijf voor de Celldyn-4000 en twaalf voor de ADVIA-120 en Sysmex-K-1000, zijn verrijkt met glucose. Hierbij is elk monster gesplitst in 6 porties waaraan een steeds oplopende concentratie glucose is toegevoegd (max. 75 mmol/l). Van deze monsters is de MCV bepaald op de genoemde hematologie-analysers en tevens de hematocriet met behulp van een hematocrietcentrifuge.

Resultaten: Bij de ADVIA-120, Sysmex-K-1000 en de Celldyn-4000 worden bij glucoseconcentraties hoger dan respectievelijk 30, 60 en 68 mmol/l procentuele afwijkingen in de MCV gevonden van meer dan 3% in vergelijking met het uitgangsmateriaal, waaraan geen glucose is toegevoegd. Toevoeging van de verschillende concentraties glucose heeft geen invloed op de handmatig bepaalde hematocriet bij de gesplitste EDTA-monsters.

Conclusie: Bij de ADVIA-120 dient men bij bloedmonsters met glucoseconcentraties van meer dan 30 mmol/l rekening te houden met foutief verhoogde MCV uitslagen. In de praktijk zal men minder vaak tegen dit probleem aanlopen bij de Sysmex-K-1000 en de Celldyn-4000 daar bij deze analysers dit fenomeen pas optreedt bij glucoseconcentraties boven de 60 mmol/l.

16. Karakterisering van de bepaling van de bezinkingssnelheid van erythrocyten met behulp van de Test-1 van Alifax

J.D. OOSTING, V. PEL, R. GROENEVELT, P. van 't SANT

Klinisch chemisch laboratorium, ziekenhuis Bernhoven, Oss-Veghel

Inleiding: Wij hebben de prestaties van de Test-1 (Alifax S.P.A., Padova, Italië) voor de bepaling van de bezinkingssnelheid van erythrocyten (BSE) onderzocht.

Methoden: De BSE is bepaald volgens de klassieke Westergren methode (gouden standaard) of een geautomatiseerde verkorte Westergren methode (Sedimatic, Becton Dickinson, Meylan, Frankrijk) met citraatbloed (0,129 M Natriumcitraat) en m.b.v. de Test-1 met K3EDTA bloed van 166 patiënten. De test 1 mengt volbloed, zuigt 175 µl op in een capillair en centrifugeert. De dichtheid verandering in de tijd wordt fotometrisch gemeten en via software omgerekend naar een bezinkingsuitslag volgens Westergren. Bij 3 monsters zijn de cellen van het plasma gescheiden en gereconstitueerd tot een hematocriet van 0,1; 0,2; 0,3 en 0,4 l/l en de BSE is bepaald met Test 1 en Westergren methode. EDTA buizen van 23 patiënten zijn 0, 18,

24, 48 en 72 u. bewaard bij 4°C en na 20 min. opwarming tot kamertemperatuur is de BSE bepaald met de Test 1.

Resultaten: De correlatie tussen Test 1 en Westergren (lineaire regressie; Test-1=1,12Westergren+2,6 mm/u.; correlatie coëfficiënt 0,94) en Sedimatic (Passing en Bablok; Test-1=1,14Sedimatic-1,1 mm/u.; correlatie coëfficiënt 0,96) was goed. De totale variatie coëfficiënten van de Test-1 waren (n=10), BSE=15 mm/u., 6,8%; BSE=25 mm/u., 4,2%; BSE=38 mm/u., 3,3% en BSE=77 mm/u., 1,6%. De invloed van de hematocriet op de Test 1 was verwaarloosbaar (stijging <10 mm/u.) terwijl de BSE uitslag met Westergren steeg bij hematocriet <0,4 l/l van 5 naar 20 mm/u., van 2 naar 58 mm/u. en van 50 naar 158 mm/u. De maximaal toelaatbare bewaartermijn bij 4°C was 48 u.

Conclusie: de Test 1 is een snelle robuuste methode om de BSE te bepalen zonder noemenswaardige hematocriëtvloed.

Immunochemie

17. Glazen versus plastic afnamebuizen: invloed op immunochemische bepalingen

E.M.L. SMETS, J.E. DIJKSTRA-LAGEMAAT, M.A. BLANKENSTEIN

Vrije Universiteit medisch centrum, afdeling Klinische Chemie, Amsterdam

Inleiding: Naar aanleiding van de preanalytische automatisering in ons laboratorium willen we overschakelen van glazen op plastic afnamebuizen omwille van een kleiner risico op glasbreuk bij automatisch centrifugeren. Omdat adsorptie aan plastic de resultaten mogelijk beïnvloedt, onderzochten wij het effect van afname in plastic buizen op immunochemische bepalingen.

Methoden: α-Foetoproteïne (AFP), androsteendion, Carbohydrate Antigen (CA) 125, CA15.3, CA19.9, Carcinoembryonisch Antigen, cortisol, C-peptide, ferritine, foliumzuur, Follikel Stimulerend Hormoon, Humaan Choriongonadotropine (hCG), β-hCG, insuline, Insulin Like Growth Factor 1, Luteïniserend Hormoon, oestradiol (aparte assays voor hoge en lage concentraties), osteocalcine, Pregnancy Associated Plasma Protein-A (PAPP-A), prolactine, progesteron, 17-hydroxyprogesteron, Prostaat specifiek Antigen (PsA), Squamous Cell Carcinoma antigen, testosteron, thyreoglobuline, Thyroid Stimulerend Hormoon, vitamine B12, 1-hydroxy- en 1,25-dihydroxy-vita-

mine D, vrij thyroxine en vrij triiodothyronine (vrij T3) werden getest. Hiertoe namen we op hetzelfde moment bloed af van vrijwilligers in glazen en in plastic buizen, beide met gescheiding of werden op concentratie geselecteerde sera in contact gebracht met beide buistypes. De aldus verkregen serumparen werden gemeten in dezelfde run om between-run variatie te elimineren. Met behulp van gepaarde t-testen werden de resultaten geanalyseerd.

Resultaten: We vonden statistisch significante verschillen tussen glas en plastic (P<0,05) bij vrij T3, PsA en PAPP-A. Niet-significante trends (0,05<P<0,12) werden gezien bij CA125, CA15.3, AFP, prolactine, androsteendion en testosteron. Uit de Passing&Bablok-regressieanalyse bleek echter dat de gevonden verschillen klein waren en klinisch niet relevant.

Conclusie: We kunnen voor al onze immunoassays overschakelen op plastic afnamebuizen zonder dat dit implicaties heeft voor de interpretatie van de resultaten.

18. Evaluation of a hs-CRP method on the BN ProSpec

S. ROTHKRANTZ-KOS¹, O. BEKERS¹, A. GUBBELS¹, M. DRENT², M.P.J. SCHMITZ¹, M.P. van DIEIJEN-VISSER¹
Departments of Clinical Chemistry¹ and Respiratory Medicine², University Hospital Maastricht, The Netherlands

Introduction: Implementation of high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) as a routine laboratory parameter is obvious. For the laboratory it is of course most practical to use one CRP method giving reliable results for the whole measuring range. Therefore, we report here the evaluation of a BN ProSpec hs-CRP method, both in the low and high range.

Methods: BN ProSpec hs-CRP from Dade Behring was compared to the existing hs-CRP IMMAGE[®] and Synchron LX[®]20 PRO hs-CRP methods. Agreement among the methods was examined in 521 samples. Reference values were estimated in 291 blood donors.

Results: BN ProSpec was linear down to 0.2 mg/L, whereas linearity of Synchron LX[®]20 PRO and the IMMAGE showed some systematic discrepancies. Over the whole measured range (0.2-250 mg/L), precision (CV) was $\leq 3.7\%$ for BN ProSpec. Both in the low but especially in the high range large discrepancies between methods were observed.

Conclusion: Although acceptable performance was found for the Synchron LX[®]20 PRO and the IMMAGE hs-CRP method, overall the performance of the BN ProSpec hs-CRP method was superior. However, standardization among assays needs further improvement both in the low and high range.

19. Verbeterd de performanceverbetering van de immunoturbidimetrische HbA1c-bepalingen door dagelijkse kalibratie?

E. LENTERS, R. KEMNA, J. SLOOTSTRA, K. MIEDEMA

Klinisch-chemisch laboratorium, Isala klinieken, locatie Weezenlanden, Zwolle

Inleiding: Op een toenemend aantal laboratoria wordt een immunoturbidimetrische bepalingmethode voor HbA1c toegepast. Uit een overzicht van de SKZL blijkt echter dat deze methoden een te hoge binnenlab- en tussenlabvariabiliteit vertonen. Omdat de state-of-the-art VC voor de HbA1c-bepaling ligt op 2,0% of lager, is het effect onderzocht van dagelijkse kalibratie op de binnenlab VC.

Methoden: Vanaf maart 2002 wordt de Roche HbA1c-bepaling (Unimate) op de Modular uitgevoerd als research- en back-up-methode voor de HbA1c-bepaling. In elke serie worden de drie SKZL-controles (ERL Low, Medium en High) ingezet als kalibratoren, waarbij de opgegeven waarden als targetwaarden worden gebruikt. Als controles wordt in elke serie een hoog en laag monster (volbloed bewaard bij -70°C) meegenomen.

Resultaten: Over een periode van 9 maanden is het gemiddelde HbA1c van de beide controles zonder SKZL-kalibratie

op de Modular resp. $5,26 \pm 0,22\%$ ($x \pm 2$ SD) voor de lage controle en $9,95 \pm 0,44\%$ voor de hoge controle. De VC's zijn derhalve 2,07% (Low) en 2,22% (High) terwijl na kalibratie dit verbeterd tot 1,55% (Low) en 1,14% (High). Deze VC's zijn vergelijkbaar met de verkregen VC's op de beide andere HbA1c-methoden, nl. 1,65% (L) en 1,04% (H) op de Primus affiniteitschromatografie en 0,91% (L) en 0,84% (H) verkregen met de TOSOH G7 HPLC.

Conclusie: Dagelijkse kalibratie met de SKZL-kalibratoren verbetert de performance van de immunoturbidimetrische methode voor HbA1c aanzienlijk. Toepassing van deze techniek resulteert in een performance van deze methode overeenkomstig de state-of-the-art en maakt de methode, analytisch gezien, vergelijkbaar met de affiniteitschromatografie dan wel uitwisselingschromatografie.

20. Cortisol extraction from urine using IST Isolute[®] C18 columns

C.H.H. SCHOENMAKERS, C.G.M. SCHEEPENS, Y.M.G. MOL, J.L.P. van DUIJNHOFEN

Clinical Laboratory, Elkerliek hospital, Helmond, The Netherlands

Introduction: The applicability of IST Isolute[®] C18 columns for extracting cortisol from urine was investigated.

Methods: The IST Isolute[®] C18 columns are conditioned with 1.00 ml 100% methanol that is allowed to run through the column for 15 minutes, followed by centrifugation for 1 minute at 200 RPM. Conditioning is completed by a similar step with 1.00 ml Milli Q water. Centrifuged urine is diluted twice with Milli Q water. The diluted urine is applied to the column in two portions of 1.00 ml, with run through time and centrifugation similar to the conditioning of the columns. The column is subsequently washed with 1.00 ml 20% methanol under similar conditions. The cortisol is eluted from the column with two washes of 1.00 ml 100% methanol. The combined eluates are evaporated to dryness and dissolved in 1.00 ml of DPC[®] cortisol diluent and analyzed on the DPC[®] Immulite[®]2000.

Results: Cortisol was extracted from Bio-Rad Lyphochek Quantitative Urine Control Normal (L1U) and a urine pool (L2U). The results obtained were compared to those for Bio-Rad Lyphochek Immunoassay Plus Control Level 1 (L1) and Level 2 (L2).

Table: Comparison of cortisol measurements in urine and plasma

| Material | L1U | L2U | L1 | L2 |
|-----------------|------|------|------|------|
| n | 21 | 21 | 21 | 21 |
| Target assigned | 110 | none | 83 | 552 |
| %CV assigned | 9.8 | none | 16.6 | 12.5 |
| Mean found | 102 | 300 | 89 | 585 |
| %CV found | 14.8 | 13.0 | 9.0 | 9.4 |

Conclusions: The mean value found for L1U is well within the assigned range and the added imprecision by the Isolute[®] C18 column extraction is about 10%. The Isolute[®] C18 column is a practical, non-toxic means of extracting cortisol from urine.

21. Evaluation of the desirable quality specification for imprecision of the Immulite 2000 PSA assay

C. BEIJER, N.G.S. STAM-MORSINK, K.SCHAEKERS

Rijnland Hospital, Department of Clinical Chemistry, Leiderdorp, The Netherlands

Introduction: The desirable quality specification for the imprecision (I) of an assay should be related to the within-subject (CV_w) variation and is presented by $I < 0.5 CV_w$. For PSA in blood CV_w equals 14%, consequently I should be less than 7%. In this study we investigated whether the Immulite 2000 PSA assay fulfils the requirements for the desirable quality specification for imprecision. Additionally we investigated whether the change in lot of PSA reagents contributes significantly to the imprecision of this assay.

Methods: Assays were performed on the Immulite 2000 (DPC, LA, USA). During a 2-year period we assayed 10 different patient samples with the present and the new reagent lot after each change in reagent lot respectively altogether we used 10 different lots of reagents. We used the two-tailed paired t-test to investigate whether the reagents from these two different lots gave similar mean PSA results. Additionally we used PSA cali-

brators (DPC) and commercially available quality control sera to investigate the lot-to-lot variation. We used these latter sera to investigate the overall imprecision during this 2-year period.

Results: The mean PSA concentrations (patient samples) obtained with reagents from 2 different lots do not differ statistically respectively. The lot to-lot variation of the PSA calibrators ranges from 4.9 to 6.4%. The imprecision of this assay obtained with control sera within 1 lot of reagent ranges from 2.64-4.91%, while the overall imprecision obtained with 201 PSA results for each level equals 5.59 (level 1) and 5.05% (level 2) respectively.

Conclusions: We conclude that the Immulite 2000 PSA assay does meet the requirements for the desirable quality specification for imprecision. Additionally we conclude that a change in lot of PSA reagents contributes significantly to the imprecision of this assay.

22. Is er een geschikt alternatief op een immunoassay automaat voor de handmatige totaal testosteron RIA?

R. MAATMAN, E. BRUIJNIS, G. PETERS, A. SCHELLEKENS

Klinisch Chemisch Laboratorium, Catharina-Ziekenhuis, Eindhoven

Inleiding: Voor de overgang van een totaal testosteron (TTe)-RIA zijn de TTe-bepalingen van Abbott op de Architect i2000 en Bayer op de ADVIA Centaur als alternatief vergeleken.

Methoden: De TTe-bepaling werd uitgevoerd met a) een zelf ontwikkelde RIA-methode (antilichamen J. Pratt, met chloroform/ether extractie, ³H-testosteron tracer), b) op de Architect i2000 (CMIA) en c) op de ADVIA Centaur (ILMA), beiden naar voorschrift van de fabrikant. Methode vergelijking is uitgevoerd volgens Passing-Bablok.

Resultaten: Beide automatische bepalingen werden uitvoerig getest via de daarvoor geëigende NCCLS-protocollen. Voor de onderlinge vergelijking werd een EP9-protocol gehanteerd. Bij vergelijking van de RIA (x) bepaling met de Architect (y) bepaling werd een regressievergelijking gevonden $y = 0,11 + 0,93x$ ($r = 0,98$; $n = 106$) Voor mannen $y = -0,4 + 0,95x$ ($r = 0,97$; $n = 43$) en voor vrouwen $y = -0,5 + 1,38x$ ($r = 0,92$; $n = 63$). Monsters van vrouwen, met aanwijzingen voor androgeen excess,

lagen zoals recent aangetoond, afwijkend van de regressielijn. Status onderzoek bevestigde dat uitsluitend een afwijkende testosteron waarde werd gemeten bij vrouwen met klinische verschijnselen van polycysteus ovarium syndroom, hirsutisme of prematuur ovariumfalen. Nader onderzoek naar interfererende steroïden is gestart en resultaten zullen worden getoond. Bij vergelijking van de RIA (x) bepaling met de ADVIA Centaur (y) bepaling werden de volgende vergelijkingen gevonden. Overall $y = 0,06 + 0,83x$ ($r = 0,99$; $n = 136$), mannen $y = 1,63 + 0,87x$ ($r = 0,99$; $n = 27$) en vrouwen $y = -0,11 + 0,96x$ ($r = 0,97$; $n = 109$) Opvallend zijn de goede resultaten bij lage TTe-concentraties.

Conclusie: Zowel de ADVIA Centaur als de Architect i2000 TTe lijken analytisch geschikt voor het bepalen van TTe bij mannen. Voor de meting bij vrouwen gaat de voorkeur uit naar de ADVIA Centaur bepaling aangezien deze ongevoelig lijkt voor interfererende steroïden.

23. Evaluation of the Immulite 2000 homocysteine immunoassay

P. SCHIPPERS, E. BAELEMANS, C. COBBAERT

Amphia Hospital, location Langendijk, Breda, The Netherlands

Introduction: A labor-intensive in-house HPLC method is used in our laboratory to measure homocysteine. We aimed to evaluate an automated alternative immunoassay method on Immulite 2000 (DPC).

Methods: Analytical performance was investigated. Hitherto, a method comparison was performed between HPLC and Immulite 2000, using 85 routine samples. After blood pre-levation (F/ K₂Ox) the samples were centrifuged within 60 minutes at 4 °C and plasma was stored at -20 °C. Samples were analysed in singlicate. A within-run precision profile was determined between 5 and 20 µmol/L, using 5 patient samples and 5 measurements per sample. Total precision was determined according to NCCLS EP-15, using commercial controls. Accordance with SKZL peer group means (HPLC + IMx) was evaluated using value assigned lyophilised human controls.

Results: The method comparison (Immulite 2000 Hcy = 0.880 HPLC - 0.035; $r = 0.953$) displays a significant difference between the two methods ($CI_{slope} = 0.806-0.958$ at $\alpha = 0.05$). Within-run CV_{AS} range between 1.7 and 6.3% at levels between 5.8 and 19.5 µmol/L. Between-run CV_{AS} are 5.60% at 7.2 µmol/L and 5.81% at 16.2 µmol/L. Mean recovery of Immulite 2000 results as compared to SKZL peer group means was 78.1%.

Conclusions: Between-run CV_A of the Immulite 2000 only meets the minimum specifications for allowable CV_A. A standardization difference is revealed as patient results on Immulite 2000 are on average 12% lower as compared to in-house HPLC results ($P < 0.05$), necessitating method dependent reference values. The establishment of an international plasma standard is urgently needed to harmonize Hcy measurements across manufacturers and across laboratories.

Moleculaire technieken

24. Measurement of methylmalonic acid in urine by capillary electrophoresis

D. van LOON, S. AHDOUDI, B. SMALING

Department of Clinical Chemistry, St. Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands

Introduction: Vitamine B₁₂ and folate are two vitamins that have important roles in the transfer of methyl groups between many organic molecules. In 1962, Cox and White showed that the excretion of methylmalonic acid (MMA) was a sensitive index of vitamin B₁₂ deficiency. However, it was not until the late 1980s that the biochemical interaction between vitamin B₁₂ and MMA was understood. MMA concentrations often increase in early stages of vitamin B₁₂ deficiency before measurable decreases in serum B₁₂. Also increased MMA can be found in patients with methylmalonyl CoA mutase deficiency, in renal insufficiency and hypovolemia.

Methods: We implemented a capillary electrophoresis method for the measurement of MMA in the presence of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and phthalic acid on a

Beckman Coulter P/ACE system 5500. The analytical precision of the method was evaluated according to the NCCLS EP15 guideline.

Results: The within-run reproducibility (CV) was 5.4% and total reproducibility 4.8% at a concentration of 56.9 µmol/l MMA. The within-run reproducibility (CV) was 3.4% and total reproducibility 4.5% at a concentration of 930 µmol/l MMA.

Conclusions: Our results show that the implemented method for the determination of MMA in urine is precise. In the near future the measurement of MMA using the capillary electrophoresis must be clinically evaluated to show that it is useful and reliable for routine diagnostic procedures.

25. HPLC electrospray tandem-massspectrometrische bepaling van homocysteïne: een definitieve methode met nieuwe perspectieven

N.G.G.M. ABELING, A.E.M. STROOMER, H. OVERMARS, A.H. van GENNIP¹, M. DURAN

Academisch Medisch Centrum, Laboratorium Genetische Metabole Ziekten, Amsterdam; ¹thans Afd. Biochemische Genetica, Stg. Klinische Genetica Z.O. Nederland, Maastricht

Inleiding: De bepaling van homocysteïne (Hcy) als risicofactor voor vroegtijdig hart- en vaatlijden alsmede als marker voor een (erfelijke) stoornis in het methioninemetabolisme vindt toepassing bij diverse groepen patiënten. Verscheidene chromatografische, spectrofotometrische en immunochemische analysetechnieken zijn voor deze analyse ontwikkeld, waarbij de keuze afhangt van overwegingen als kosten, gebruikersvriendelijkheid, analysetijden etc. Tevens heeft een zeer krachtige analysetechniek, de tandem-massspectrometrie (MS-MS) de laatste jaren zijn intrede gedaan. Wij presenteren een toepassing van genoemde techniek voor meting van homocysteïne in plasma.

Methoden: plasma (50 µl), waaraan toegevoegd gelabelde interne standaard ²H₈-homocysteïne, werd gereduceerd met dithiothreitol en onteiwit met acetonitril. De analyse werd uitgevoerd als multiple reaction monitoring (MRM), waarbij Hcy en ²H₄-Hcy werden gedetecteerd door de overgang van pre-

cursor naar product ion (m/z 136 naar m/z 90, resp. m/z 140 naar m/z 94) Analysetijd was 2,5 min. De resultaten werden vergeleken met die van de klassieke HPLC-methode met fluorescentiedetectie (HPLC-SBDF-methode)

Resultaten: De LC-ESI/MS-MS-methode bleek uitstekend te correleren met de HPLC-SBDF-methode. De meting was lineair van 2 tot 150 µmol/l. De intra- resp. interassayvariatiecoëfficiënten waren 3,6 % en 6,4 % bij fysiologische concentraties.

Conclusie: De massaspectrometrische homocysteïnebepaling kan gezien worden als een absolute methode; daarbij is de voorbereiding alsmede de analysetijd zeer bescheiden. Bovendien is de lineariteit uitgebreider dan bij andere methoden. Uitbreiding van de analyse met belangrijke parameters zoals S-adenosylmethionine en glutathion behoort tot de mogelijkheden.

26. Use of WBC counts as an additive tool in quantitative real time PCR applications

R.A.M. op den BUIJSCH, J.E. de VRIES, P.A.H.M. WIJNEN, J. ten KATE, M.P. van DIEIJEN-VISSER, O. BEKERS

Department of Clinical Chemistry, academic hospital Maastricht

Introduction: The absolute quantification in real time PCR assays relies on positive controls with a precisely known amount of genomic DNA. In most cases UV spectrophotometry is used to obtain this information. One control sample is then serially diluted to obtain a standard curve to estimate the DNA amount of an unknown sample. A method to quantify genomic DNA directly in whole blood has never been reported. In the present study it has been evaluated whether WBC counts can be utilized as an expedient in quantitative real time assays.

Methods: The QIAamp mini blood kit (Westburg) is used to isolate DNA from 30 different whole blood samples with a WBC range from 0.5*10⁹ to 20*10⁹ WBC/l. After DNA isolation, UV spectrophotometry is used to determine the DNA amount in every sample. A sybergreen assay on the Light Cycler (Roche Diagnostics), which amplifies part of exon 7 of

CYP2C9, is used to obtain Ct values of every DNA sample. The DNA amount of all samples is determined by UV spectrophotometry (Pharmacia). WBC counts and DNA concentrations by spectrophotometry are both plotted separately versus its Ct value.

Results: The Ct values show a good correlation with the results of both quantification methods. Melting curves indicate a specific PCR product with a T_m of ± 82 °C. DNA extraction efficiency has been calculated since DNA amounts before (WBC counts) and after (UV spectrophotometry) DNA isolation are known.

Conclusions: WBC counts can be an additive tool besides UV spectrophotometry while information is obtained about the original DNA amount in whole blood samples moreover WBC counts can be used in combination with UV spectrophotometry to calculate the DNA extraction efficiency.

27. Single nucleotide polymorphism analysis of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene in thrombophilia patients and healthy individuals

W.B.M. GERRITSEN¹, S.P. EUWIJK¹, D.H. BIESMA², F.J.L.M. HAAS¹, H.J.T. RUVEN¹

St. Antonius Hospital, Departments of Clinical Chemistry¹ and Internal Medicine², Nieuwegein, The Netherlands

Introduction: The common 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism causes a thermolabile enzyme variant. This variant is associated with moderate hyperhomocysteinemia, and was suggested to be a risk factor for phenotypes as vascular disease, thromboembolism, neural tube defects, repetitive miscarriages and protective effects against colon cancer and acute lymphatic leukaemia. Aim of the study was to answer the question whether other single nucleotide polymorphisms (SNP's) in the MTHFR gene may be supportive in explaining the complex phenotype in thrombophilia patients.

Methods: DNA from 51 thrombophilia patients and 59 healthy

volunteers was subjected to SNP analysis at the promotor region 801 nucleotides (nt.) from exon 1 (dbSNP rs 1931226). We investigated the following transitions: exon 1, 215 G→A; exon 4, 677C→T; intron 6, nt. 30 C→T and nt. 114 G→T; exon 7, 1298A→C; intron 9, nt. 34 G→A; exon 11, 1793 G→A by SSP-PCR. Results were checked for Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). Haplotype frequency and statistical analysis were carried out.

Results and conclusions: The results of the SNP analysis and haplotypes are compared with recently published haplotypes. All data suggest that the C677T alteration took place on a common founder haplotype.

28. Sequencing: niet altijd de gouden standaard!

R.H.N. van SCHAIK, M. van der WERF, I.P. van der HEIDEN, J. LINDEMANS

Afdeling Klinische Chemie, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum Rotterdam

Introductie: Moleculair-biologische diagnostiek berust op het detecteren van mutaties in DNA. Dit kan middels polymerasekettingreactie – restrictiefragmentlengtepolymorfisme (RFLP) assays. Hierbij wordt vaak een mismatch-primer gebruikt die vlak naast de potentiële mutatie bindt. Ter validatie van de PCR-RFLP wordt het verkregen PCR-product gecontroleerd op de aanwezigheid van de betreffende mutatie door middel van sequentieanalyse. Bij de validatie van één van onze assays bleken de resultaten van de PCR-RFLP en de sequentieanalyse niet met elkaar overeen te stemmen.

Doel: Verklaan van de discrepantie tussen PCR-RFLP en de DNA-sequentieanalyse.

Methoden: Genomisch DNA werd geïsoleerd uit bloed met behulp van de MagnaPure (Roche). PCR-reacties voor *CYP3A4*1B* en *CYP3A5*3* werden uitgevoerd met PCR-RFLP-primers, waarna digestie volgde met de betreffende restrictie-enzymen. Het PCR-product werd ook gesequenced. Hetzelfde genomisch DNA werd tevens geamplificeerd met

alternatieve primers, die op een andere plek binnen hetzelfde gen bonden, waarna sequentieanalyse volgde.

Resultaten: Sequentieanalyse van *CYP3A4*1B* PCR-product met alternatieve primers liet zien dat monsters die heterozygoot waren in de PCR-RFLP, ook heterozygoot waren met deze sequentieanalyse. Dit terwijl de sequentieanalyse op PCR-product verkregen met de PCR-RFLP-primers een homozygoot signaal gaven. Ditzelfde fenomeen werd ook waargenomen voor de *CYP3A5*3* assay.

Conclusie: Bij de validatie van PCR-product middels direct sequencing, waarbij de PCR-primers direct naast de te onderzoeken mutatieplaats liggen, moet rekening gehouden worden met onevenredige amplificatie. De oorzaak ligt vermoedelijk in het eerste nucleotide waarmee de primer wordt verlengd: is dit een G/C, dan stabiliseert dit de primer veel beter dan wanneer dit een A/T is. Bij heterozygote monsters kan dit resulteren in het foutief homozygoot typeren middels sequentieanalyse.

29. Plasma, serum en urine als alternatieve bronnen voor genomisch DNA

R.H.N. van SCHAIK, M. van der WERF, M. van FESSEM, I.P. van der HEIDEN, M. van VLIET, J. LINDEMANS

Afdeling Klinische Chemie, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum Rotterdam

Introductie: De moleculaire diagnostiek binnen de klinische chemie krijgt een steeds grotere rol. Genomisch DNA wordt verkregen uit volbloed of wangslimvlies. Bij de toepassing van moleculaire diagnostiek ten behoeve farmacogenetisch onderzoek (vaak retrospectief) blijkt regelmatig dat er geen volbloed (meer) voorhanden is. Wel is er serum, plasma of urine bewaard om geneesmiddelconcentraties in te bepalen.

Doel: Onderzoeken in hoeverre plasma, serum en urine kunnen worden gebruikt voor DNA-diagnostiek.

Methoden: Van 21 patiënten werd volbloed, plasma, serum en urine verzameld en opgesplitst. Materiaal werd 1 nacht opgeslagen bij 4°C of ingevroren. Hierna werd genomisch DNA geïsoleerd met behulp van de MagnaPure (Roche). Vervolgens werd op het geïsoleerde DNA PCR-reacties voor *CYP3A4*3*, *MDR-1 C3435T* en een 5 kb PCR-reactie (*CYP2D6*) uitgevoerd.

Resultaten: Voor de *CYP3A4*3* en *MDR-1* assays gaven zowel plasma als serum in 20/21 monsters (95%) resultaat, zowel voor ingevroren als niet-ingevroren materiaal. Uit de urine-monsters, bewaard bij 4°C, kon in 21/21 (*CYP3A4*3*) en 19/21 (*MDR-1*) gevallen een genotype worden afgelezen. Genomisch DNA, geïsoleerd uit urinemonsters die bij -20°C waren opgeslagen, leverden in 16/21 (*CYP3A4*3*) en 14/21 (*MDR-1*) gevallen een uitslag op. De PCR-reactie die een 5 kb fragment op zou moeten leveren gaf slechts in een enkel monster resultaat.

Conclusie: Serum, plasma en urine kunnen prima worden gebruikt als uitgangsmateriaal voor de isolatie van genomisch DNA, mits de te amplificeren fragmenten niet te groot (enkele kbs) zijn.

Categorie 2 Klinisch Hart- en vaatziekten

30. Relation between the methionine synthase reductase A66G polymorphism, total homocysteine levels and venous thrombosis risk

H. GELLEKINK^{1,2}, L.A.J. KLUIJTMANS¹, H.J. BLOM¹, H. van LITH-ZANDERS¹, M. den HEIJER^{2,3}
Laboratory of Paediatrics and Neurology¹, University Medical Center Nijmegen; Department of Endocrinology² and Epidemiology and Biostatistics³, University Medical Center Nijmegen, The Netherlands

Introduction: Hyperhomocysteinemia is an independent and graded risk factor for arterial vascular disease (AVD) and venous thrombosis. Besides environmental factors, variation in genes encoding key enzymes in homocysteine (Hcy) metabolism may also contribute to mild hyperhomocysteinemia. Methionine synthase reductase (MTRR) catalyses the reductive remethylation of the cobalamin-methionine synthase complex (MS), which renders the enzyme in its active state. Therefore, variation in the MTRR gene may potentially contribute to increase Hcy concentrations and consequently increase the risk for developing AVD or venous thrombosis.

Methods: In this study we examined the relationship between the 66A>G (I22M) polymorphism, total Hcy (tHcy), and the risk for developing recurrent venous thrombosis in a population of 143 RVT patients and 428 apparently healthy control subjects. MTRR genotypes were assessed using a PCR-heteroduplex generator (HG)-based analysis technique.

Results: The genotype distribution in both populations was in Hardy-Weinberg equilibrium, and the MTRR 66G allele frequency was 60% in cases and 57% in controls. In Table 1

the overall effect of the MTRR A66G polymorphism on tHcy levels is summarized.

Table 1. Effect of the MTRR A66G polymorphism on fasting total homocysteine levels

| A66G | N | Mean (SE) ($\mu\text{mol/L}$) | Mean difference (95% CI) |
|------|-----|------------------------------------|-----------------------------|
| AA | 105 | 14.5 (0.5) | Reference |
| AG | 275 | 14.1 (0.3) | - 0.46 (-0.74 to 1.66) |
| GG | 192 | 14.4 (0.4) | - 0.11 (-1.17 to 1.38) |

The relative risk for the MTRR 66GG genotype for RVT was 1.25 (95% CI: 0.72 - 2.16).

Conclusions: The MTRR 66GG genotype seems not to be associated with altered tHcy levels. Because of the large confidence interval, no firm conclusions can be drawn whether the MTRR 66GG genotype increases the risk for developing another venous thrombotic event.

31. Impact of perioperative myocardial infarction on temperature, platelet count and differential leukocyte count of patients just before and after coronary artery bypass grafting

G.A. HARFF¹, C.C.A. VRIJLAND², J.B. DIJKSTRA², M.J.A. van den BOSCH¹, J.P.A.M. SCHÖNBERGER³
Department of Clinical Chemistry¹, Catharina Hospital, Eindhoven; University of Technology², Eindhoven and Department of Cardiothoracic Surgery³, Catharina Hospital, Eindhoven

Introduction: With coronary artery bypass grafting (CABG) a systemic inflammatory response may arise from the combined effects of cardiopulmonary bypass (CPB), surgical trauma, blood transfusion, hypothermia and haemodilution. We tested the hypothesis that the occurrence of a perioperative myocardial infarction (PMI) is an additional factor affecting patients temperature, platelet count, white blood cell count (WBC) and differential leukocyte count.

Patients and methods: Consecutive patients undergoing CABG with the use of CPB were included in our study. This cohort was retrospectively analysed. We compared the median values of temperature, platelet count, WBC and differential leukocyte count (neutrophils, eosinophils, basophils, lymphocytes and monocytes) just before surgery and at 7 h, 13 h, 22 h, 46 h and 142 h after CABG of patients not suffering from a PMI (n=217) and patients suffering from a PMI (n=11).

Results: Higher median values were obtained for the patient group suffering from a PMI compared to the patient group not suffering from a PMI, for the lymphocytes just before surgery, 2.77 /nL and 2.06 /nL respectively, $P=0.0010$ and for the temperature at 7 h, 36.8 °C and 35.8 °C respectively, $P=0.0241$.

Conclusions: Analysis of all patient data showed surprisingly that the preoperative median lymphocytes count for the PMI patient group was significantly elevated compared to the median lymphocyte count of the patients who did not suffer from a PMI. Similar effect was found previously for CRP. The elevated temperature at 7 h may be explained as an effect of an inflammatory response caused by PMI. The occurrence of a PMI was not confirmed to be an additional factor affecting patients haematological cell counts after surgery.

32. In vivo fragmentation of troponin T

J.H.C. DIRIS¹, C.M. HACKENG¹, M-L. BOUMANS², W. TH. HERMENS², M.P van DIEIJEN-VISSER¹
University Hospital Maastricht¹, Department of Clinical Chemistry; Cardiovascular Research Institute Maastricht², Maastricht

Introduction: Several recent publications have reported about the fragmentation of Troponin I but hardly any have reported about the release kinetics of Troponin T. Knowledge about these kinetics could explain why some patients without signs of myocardial damage have elevated levels of Troponin T. Therefore, we have developed a method for the detection and characterization of Troponin T, and if present, its fragments.

Methods: Purification using antibodies specifically against various epitopes of the Troponin T molecule allowed us to use serum samples for the electrophoretic separation. Western blotting and chemo-luminescent detection are used for visual-

ization of the various fragments.

Results: Purification and detection of Troponin T out of serum samples from patients with acute myocardial infarction revealed the presence of fragments. In vitro incubation of spiked human serum showed the appearance of the same Troponin T fragments after 12 hours.

Conclusions: Using immunoprecipitation followed by electrophoresis and western blotting we are able to visualize fragments of Troponin T ranging from 37 to 8 kDa. This method could be used to explain Troponin T release kinetics in patients with renal failure.

33. B-type Natriuretic Peptide (BNP): a marker of cardiac and pulmonary dyspnea

W. de KIEVIET¹, J.M. SCHROEDER-TANKA², E. ten BOEKEL¹, B.T.J. van den BERG³
Clinical Chemistry¹, Cardiology² and Pulmonary Diseases³, Sint Lucas Andreas Hospital, Amsterdam

Introduction: Cardiac or pulmonary diseases can cause acute dyspnea. BNP, a peptide hormone, reflects elevated left ventricular pressure as well as neurohormonal modulation. Measurement of BNP might be useful in discriminating patients with dyspnea due to cardiac or pulmonary disorders. The goal of this pilot study is to determine the value of the BNP level in predicting the outcome of patients with dyspnea admitted to the hospital.

Method: BNP has been measured in whole blood or plasma with a one step fluorescence immunoassay (Triage® BNP test; Biosite, San Diego, USA) in 96 consecutive patients with acute dyspnea, admitted to the emergency department of our hospital and compared with a control group (n=7).

Results: In 55 patients (58%) the diagnosis dyspnea due to congestive heart failure was determined. In 98% of these

patients the BNP level was >100 ng/l. No congestive heart failure was found in 41 (42%) of the patients. 95% of these patients had a BNP level <100 ng/l. The mean BNP of the control group was 5 ng/l.

Conclusions: This pilot study shows that measurement of the BNP levels of patients with acute dyspnea, admitted to the emergency department, is useful in establishing or excluding the diagnosis congestive heart failure. Further studies are necessary to establish sensitivities and specificity's of various cut-off values.

Literature: Maisel AS, et al. Rapid measurement of B-type Natriuretic Peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347: 161-167.

Hematologie

34. Subpopulations of tissue factor-exposing microparticles from platelets and T-cells co-localize leukocytic antigens in uncomplicated human type 2 diabetes

M. DIAMANT¹, R. NIEUWLAND², A.N. BÖING², D.P. SNOEK², J.W.A. SMIT³, J.K. RADDER³, A. STURK²
Departments of Endocrinology, VU University Medical Center¹, Amsterdam and Leiden University Medical Center³, Leiden; Department of Clinical Chemistry², Academic Medical Center, Amsterdam

Introduction: Transfer of tissue factor (TF) by leukocytes or leukocyte-derived microparticles (MP) to platelet-derived MP was demonstrated in vitro. Previously, we isolated TF-exposing subpopulations of in vivo MP of different cellular origin from the circulation of patients with vascular and thromboembolic diseases. In patients with uncomplicated, well-controlled type 2 diabetes mellitus (DMII), we found elevated numbers of TF-exposing MP derived from platelets, T-lymphocytes and granulocytes, as compared to healthy controls. However, the cellular origin of TF exposed on cell-derived MP remains unclear. We examined the cellular origin of TF exposed on platelet- and T-lymphocyte derived MP in DMII patients and controls.

Methods: MP, isolated from citrate-anticoagulated plasma from 6 patients and 5 controls, were stained with annexin V, anti-TF monoclonal antibody plus (i) CD61 (platelets) and CD15 (P-selectin ligand), CD66e (granulocytes) or CD62P

(P-selectin), or (ii) CD4 (T-lymphocytes) and CD11b (leukocytes) and analyzed by flow cytometry.

Results: A median 12.9% of TF-positive MP clustered CD61 and CD15 in patients and 8.9% in controls (P = 0.429). Overall, 35.3% of TF-positive MP from platelets stained for P-selectin. TF-positive MP subpopulations from patients and controls co-localized CD61 and CD66e (38.5% and 27.4%, respectively; P = 0.537). The percentage of TF-positive MP co-localizing CD4 and CD11b was 29.2% in patients and 33.3% in controls (P = 0.662).

Conclusions: The observed transfer of TF from leukocytic MP to platelets observed in vitro may also apply to platelets and other cells such as T-lymphocytes in vivo and this phenomenon may occur in both health and disease. Future studies should elucidate the conditions inducing the transfer of TF as well as the underlying molecular mechanisms.

35. Een patiënt met een zeer sterke verworven factor VIII-remmer: laboratoriumdiagnostische complicaties

A. LEYTE¹, C.M. ECKMANN³, B. de VALK², K.J. ROOZENDAAL^{1,2}
Hematologisch Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Afdeling Interne Geneeskunde, Hematologie², Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam, en Afdeling Bloedstolling³, Sanquin Diagnostiek, locatie CLB, Amsterdam

Introductie: Een man van 90 jaar werd via de SEH opgenomen met recent ontsane forse hematomen en hematurie. Het laboratoriumonderzoek toonde een ernstige anemie, een normaal aantal trombocyten met een normale bloedingstijd. De PTT was niet verlengd, de APTT was sterk verlengd (79,9 s, normaal 23,3 - 30,1). Er was geen sprake van heparinegebruik.

Methode en resultaten: Hierop werd aanvullend stollingsonderzoek ingezet. De gemeten stolactiviteiten van de intrinsieke factoren (VIII, IX, XI, XII) waren alle verlaagd en bleken afhankelijk te zijn van de gebruikte voorverdunding van het patiëntenplasma. Gemiddeld (1:1- 1:2- 1:4): factor VIII 1% (0-1-2%); factor IX 12% (4-9-22%); factor XI 2% (0-1-4%) en factor XII 12% (5-9-23%). Bovendien werd in een 1:1 mengproef van het patiëntenplasma met normaalplasma geen correctie van de APTT verlenging geconstateerd. Verdere mengproeven leverden bij hogere normaalplasmagehaltes een

geringe correctie van de factor IX -, maar niet van de factor VIII-activiteit. Lupus-anticoagulans als oorzaak van de APTT-verlenging kon worden uitgesloten op basis van niet afwijkende screeningstesten. Hoewel van alle intrinsieke factoren de stolactiviteit laag (geremd) leek te zijn, wezen de resultaten van aanvullend onderzoek echter op de aanwezigheid van een remmende antistof gericht tegen slechts een van de intrinsieke factoren: factor VIII. Analyse van de activiteit van factor VIII en factor IX met behulp van de chromogene methode resulteerde in een normale factor IX-activiteit. De chromogene factor VIII-activiteit bleef zeer laag. Er werd een anti-factor VIII-activiteit met een zeer hoge titer (450 Bethesda eenheden per ml) vastgesteld.

Conclusie: Deze antistof blijkt in de factor IX-, XI- en XII-stolbepalingen te hebben gestoord door remming van het in het betreffende deficiënte plasma aanwezige factor VIII.

36. Hemostatische afwijkingen bij patiënten met CVA/TIA

G.A. van den BERG¹, A. ZEINSTRAS¹, H. STORM¹, P. JOOSTEN²

Stichting Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Medisch Centrum Leeuwarden², Leeuwarden

Inleiding: Cerebrovasculaire ziekten komen voornamelijk voor bij de oudere patiënt en de risicofactoren zijn goed bekend. Bij een CVA of TIA op jongere leeftijd speelt vooral een versterkte trombose-eigening een belangrijke rol. Er is gesuggereerd dat mogelijk prothrombine G20210A (FII-mutatie) een genetische risicofactor van betekenis is. In deze studie is bij patiënten met (verdenking op) CVA of TIA en jonger dan 62 jaar naast het gangbare laboratoriumonderzoek bij trombose tevens onderzoek naar FII-mutatie gedaan.

Patiënten en methoden: 49 patiënten zijn geëvalueerd; 16 met CVA (M/V: 9/7, gemiddelde leeftijd: 52,5 jaar), 25 met TIA (M/V: 17/8, gemiddelde leeftijd: 44,2 jaar) en 8 patiënten met een andere diagnose zoals migraine, epilepsie of duizeligheid (M/V: 1/7, gemiddelde leeftijd: 40 jaar). De volgende stollings- en factorenonderzoeken werden uitgevoerd: PT, APTT, proteïne C, vrije proteïne S, ATIII, lupus-anticoagulans, anticardiolipine antistoffen, APC-resistentie (indien positief, fac-

tor V Leiden) en FII-mutatie. Tenslotte zijn tevens de nuchtere homocysteïne-waarden geëvalueerd. **Resultaten:** De incidentie van hemostatische afwijkingen in de CVA-groep is 18,8% (2x factor V Leiden HE, 1x proteïne S-deficiëntie) en in de TIA-groep 32% (2x factor V Leiden HE, 2x FII-mutatie HE, 1x positieve lupus-anticoagulans en 3x anticardiolipine antistoffen). In de restgroep werden geen hemostatische afwijkingen gevonden.

Conclusie: Alleen bij patiënten met TIA zijn mutaties van FII gevonden. De incidentie is 8%. I.v.m. het geringe aantal geëvalueerde patiënten is niet met zekerheid te stellen dat dit significant verschilt van de prevalentie in de bevolking. Hetzelfde geldt voor de incidentie van factor V Leiden (12,5% in de CVA-groep en 8% in de TIA-groep). Opmerkelijk is verder dat bij de helft van de patiënten met CVA en TIA een verhoogde nuchtere homocysteïne-waarde werd gevonden, die merendeels voorkomt uit een relatief vitaminedeficiëntie.

37. The small GTPase Rap1 is activated by fluid turbulence and involved in $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated cell adhesion in human megakaryocytes

K.M.T. de BRUYN*, J. de ROOIJ, F.T.J. ZWARTKRUIS, J.L. BOS

Department of Physiological Chemistry and Centre for Biomedical Genetics, University Medical Centre Utrecht, Universiteitsweg 100, 3584 CG Utrecht, The Netherlands

*Present address: Department of Clinical Chemistry, Rijnstate Hospital, Arnhem, The Netherlands

Introduction: The Ras-like small GTPase Rap1 is activated by a large variety of stimuli in a diversity of cell types, among which are T lymphocytes and platelets. Recently, Rap1 was demonstrated to play an essential role in stimulus-induced activation of integrin LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) and VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) in T lymphocytes. The function of Rap1 in platelets is currently unknown. We have now investigated whether shear stress is a mechanism to activate Rap1. To determine the consequence of Rap1 activation we measured adhesion of human megakaryocytes to fibrinogen, which is mediated by the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, in the presence of inhibitors of Rap1 signalling. In platelets, proper control of $\alpha_{IIb}\beta_3$ is essential for aggregation.

Methods: Rap1 activity was analysed using an activation-specific probe assay followed by Western blotting. We have studied adhesion of DAMI megakaryoblastic cells transiently transfected with Rap1-activating or -inhibiting constructs in an *in vitro* adhesion assay.

Results: In human megakaryocytes and several other commonly used haematopoietic cell lines representing human monocytes, B and T lymphocytes, stress applied by gently tumbling of the samples induced Rap1 activation. This could not be blocked by inhibitors previously shown to affect Rap1 activation, like the intracellular calcium chelator BAPTA-AM and various PKC inhibitors. Also inhibition of actin cytoskeleton dynamics did not influence this activation of Rap1, suggesting the involvement of cell surface receptors. Blocking Rap1 signalling in DAMI megakaryoblasts strongly reduced basal adhesion to immobilised fibrinogen. This inhibition was partially rescued by the phorbol ester TPA, but not by α -thrombin.

Conclusions: We conclude that in megakaryocytes fluid turbulence induces Rap1 activation that controls $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated cell adhesion.

38. Molecular evaluation of the human erythrocyte ankyrin gene in hereditary spherocytosis

H.J. VERMEER¹, J. POSTMA¹, A.P. SPAANS¹, P.F.H. FRANCK¹, G. de KORT²

Leyenburg Hospital¹, Department of Clinical Chemistry, The Hague, The Netherlands and RKZ/JKZ Hospital², Department of Clinical Chemistry, The Hague, The Netherlands

Introduction: Hereditary spherocytosis (HS) is a congenital haemolytic anaemia, the severity of which varies from asymptomatic to severe condition, giving rise to symptoms including icterus, anaemia and splenomegaly. One of the erythrocyte membrane proteins is ankyrin-1 (ANK-1), belonging to a family of proteins coordinating interactions between various integral membrane proteins and cytoskeletal elements. In fact, the most common cause (~35 to 65%) of typical, dominant HS is caused by gene mutations in the erythrocyte isoform (also known as band 2.1, $M_r = 210$ kDa). The ANK-1 gene is composed of 42 exons, and the composite cDNA contains 5636 base pairs (1879 amino acids).

Generally, a broad variety of mutations in the ankyrin gene are described. It is known that missense mutations and mutations in the ankyrin-1 promoter are common in recessive HS, while frameshifts (i.e. small deletions and insertions) and non-

sense null mutations prevail in dominant HS.

Methods: We started a program to analyse genetic mutations in 24 patients suspected to suffer from HS based on measurements of the osmotic fragility of the erythrocytes, peripheral blood smears, chemistry and reticulocytes.

We set up different approaches to identify mutants: 1) screening of all 42 coding exons plus the 5' untranslated/promoter region; 2) Protein Truncation test (PTT) to identify mutations leading to truncated proteins (i.e. *in vitro* transcription and translation of amplified PCR fragments of the ANK-1 gene).

Results and Conclusions: Thus far, we screened 20 coding exons and found in some HS patients known polymorphisms in several exons. Moreover, a new mutation was detected in exon 7. Recently, we started the PTT approach to detect functionally relevant mutations on the protein level.

39. De ijzerstatus van de hemodialyse populatie van het St. Franciscus Gasthuis, Rotterdam

I.M.L.W. KEULARTS¹, M.H. BEUNIS¹, G.P.M. LUIKEN², C.T. op de HOEK², G.C. BRAND³, J.W. JANSSEN¹
Klinisch chemisch hematologisch laboratorium¹, Afdeling Interne Geneeskunde/Hemodialyse², St. Franciscus Gasthuis Rotterdam, Klinisch Chemisch Laboratorium³, Albert Schweitzer Ziekenhuis, locatie Zwijndrecht

Inleiding: Bij alle HD-patiënten van het St. Franciscus Gasthuis werd in een dwarsdoorsnedeonderzoek naast traditionele markers van de ijzerstatus, de sTfR (soluble transferrine receptor) en reticulocyten bepaald. De sTfR is i.t.t. traditionele markers relatief stabiel bij acutefasereacties en zou zodoende beter discrimineren tussen absoluut en functioneel ijzergebrek. Reti's en IRF (*immature reticulocyte fraction*) zijn gevoelige, vroege markers voor de erythropoëtische (re)activiteit van het beenmerg. Na drie maanden zullen genoemde parameters opnieuw gemeten worden om na te gaan (m.n. bij patiënten met een Hb<7,0) of bijstellen van therapie (EPO of ijzerdosering) veranderingen in de ijzerstatus geeft.

Methode: Bij 115 HD-patiënten (56 mannen en 59 vrouwen) werd voor de dialyse Hb, Transferrine(-verzadiging), ferritine, reti's, IRF en de sTfR bepaald. De sTfR werd turbidimetrisch (Mediphos Medical Supplies, Nederland) gemeten op de IMMAGE (Beckman Coulter, Nederland), de reti's en IRF

op de LH-750 (Beckman Coulter, Nederland).

Resultaten: 43 van de 115 HD-patiënten hadden een Hb<7,0 (5,9±0,7 mmol/l) bij een EPO-gebruik van 44±25 ug/week. EPO-gebruik in de groep met Hb>7,0 was vergelijkbaar (41±31 ug/week). HD-patiënten werden naar EPO-gebruik (laag:<40ug/week vs. hoog:>40ug/week) gestratificeerd. Bij vergelijking van Hb<7,0 t.o.v. Hb>7,0 waren de reti's hoger en de TF-verzadiging lager (beide p<0,01) in beide EPO-groepen; ferritine en IRF verschilden niet significant. De sTfR was slechts bij hoog EPO-gebruik significant hoger bij Hb<7,0 vs. Hb>7,0 (2,31 mg/l vs. 1,83 mg/l, p<0,05). Over de gehele groep werd een lineair verband gevonden tussen de reti's en de sTfR (r=0,40).

Conclusie: Bij anemische patiënten is het aantal reti's onafhankelijk van EPO-gebruik hoger dan bij niet-anemische patiënten. Bij een hoog EPO-gebruik is sTfR slechts significant hoger bij Hb<7,0 vs. Hb>7,0.

40. vWF cleaving proteaseremmers: "Balanceren op de multimeren"

J. van der STAPPEN¹, M. de METZ¹, J. KLEIN-GUNNEWIEK¹, M. de BOER², S. JANSSEN²
Klinisch chemisch laboratorium en Interne Geneeskunde¹, Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen

Inleiding: In een periode van 6 weken werd ons ziekenhuis geconfronteerd met 2 gevallen van ernstige trombotische trombocytopenische purpera (TTP). Beide patiënten presenteerden zich met een vrijwel identiek klachtenpatroon en ook de lab-afwijkingen waren in vele opzichten vergelijkbaar. Echter, op twee onderdelen verschilden beide casussen significant van elkaar; casus 1 presenteerde zich in tegenstelling tot casus 2 met een verhoogde CRP en troponine T.

Methode: De diagnose HUS/TTP kon men op grond van deze resultaten bij casus 1 niet snel genoeg met zekerheid stellen. Zowel een sepsis (met DIS en infarct) als een ontspoorde SLE konden nog niet worden uitgesloten. Het starten van een therapie werd uitgesteld omdat behandeling van de sepsis-DIS, SLE of HUS/TTP ernstige gevolgen zou kunnen hebben indien de uiteindelijke diagnose anders zou uitvallen. Vervolgonderzoek werd aangevraagd maar een nieuw groot voorwandinfarct leidde tot het overlijden van patiënte nog voor therapie gestart kon worden.

Casus 2 die zich enige weken later presenteerde werd snel herkend als een TTP en plasma exchange therapie werd vrijwel onmiddellijk gestart. Deze patiënte herstelde langzaam maar gestaag en kon enige weken na opname worden ontslagen.

Conclusie: Het mechanisme waarlangs een TTP zich ontwikkelt is pas enige jaren geleden, met de ontdekking van het enzym vWF Cleaving Protein (vWFCP), bekend geworden. Een aangeboren deficiëntie van dit enzym door een genetische mutatie of een verworven deficiëntie door de ontwikkeling van autoantistoffen tegen vWFCP leiden tot het ontstaan van ultragrote vWF-multimeren in de circulatie. Onder deze omstandigheden treedt massale activatie en aggregatie van trombocyten op. We hebben voor beide casussen achteraf de activiteit van het vWFCP laten bepalen. Bij beide patiënten werden sterk verlaagde (<3% en 8% respectievelijk) enzymactiviteiten gemeten. Op basis van deze laatste gegevens hebben we de diagnose TTP met grote zekerheid kunnen stellen.

41. Een gerandomiseerde vergelijking tussen de CHr en transferrinesaturatie in de dosering van ijzer (iv) en rhEPO in dialysepatiënten

C.M. HACKENG, P.H.M. van der KUY, M.P. van DIEIJEN-VISSER, J.P. KOOMAN
Academisch ziekenhuis Maastricht

Inleiding: Adequate ijzervoorraden zijn een vereiste voor het succes van erythropoëtine(rhEPO)-therapie in hemodialyse (HD)-patiënten. Echter, de inschatting van de ijzerstatus in HD-patiënten blijft een probleem. Het gebruik van de "reticulocyte hemoglobin content"(CHr) zou een reductie van rhEPO-gebruik met 40 % bewerkstelligen, terwijl een andere studie een verlaging in de ijzerbehoefte beschreef. Voordelen van de CHr boven transferrinesaturatie (TS) is de snelle beschikbaarheid en de veronderstelde ongevoeligheid voor ontstekingen. In deze blinde, gerandomiseerde studie werd ijzer gesuppleerd bij HD-patiënten volgens TS of CHr. Primaair doel was een reductie in ijzerdosering ter voorkoming van ijzeroversuppletie. Hiernaast werden een mogelijke verlaging van de rhEPO-behoefte en de relatie van CHr met conventionele ijzerparameters en CRP bekeken.

Methoden: Na een run-in-periode van 2 maanden werden 58 HD-patiënten gerandomiseerd tot intraveneuze ijzertoediening volgens TS of volgens CHr. IJzer-, rhEPO-dosering en CHr werden bestudeerd gedurende een periode van 4 maanden.

Resultaten: Geen verschil in ijzer- en rhEPO-dosering werd gezien gedurende de studie tussen beide groepen. CHr was in sterke mate gecorreleerd aan TS (r=0,36, P<0,0001, n=331), aan % hypochrome cellen (r=0,56, P<0,0001, n=331) en invers gecorreleerd aan CRP (r=-0,47; P<0,0001; n=189). Tussen CHr en serumferritine bestond geen relatie.

Conclusies: In deze studie resulteerde het gebruik van CHr in plaats van TS niet in een verlaagde ijzer- of rhEPO-behoefte bij HD-patiënten. Hoewel CHr wel afhankelijk is van een status van ontsteking, is het een snel beschikbare en bruikbare parameter voor HD-patiënten.

42. Invloed van NSAID's op aspirine bij gelijktijdige inname gemeten met de PFA-100

J. KLEIN GUNNEWIEK¹, A. HOVESTAD-WITTERLAND², M. de METZ¹, E. VOLLAARD²
Afdelingen Klinische Chemie¹ en Klinische Farmacie², Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen

Inleiding: Acetylsalicylzuur (ASA) remt de plaatjesfunctie irreversibel middels acetylering van COX-1, wat leidt tot een sterk verminderde tromboxaan A₂ (TXA₂)-synthese (>95% remming). Ibuprofen, dat sterk aan COX-1 bindt, is eveneens in staat de trombocytenfunctie te remmen. Deze remming is echter reversibel en leidt tot een tijdelijke reductie van TXA₂ met 97%. Onderzoek toont aan dat, bij gelijktijdige inname, ibuprofen in staat is de werking van ASA te antagoneren. In deze studie is het effect van de COX-2 preferentiële NSAID's, meloxicam en nabumeton (respectievelijk 60% en 90% reductie van de TXA₂-synthese) op de werking van ASA bestudeerd met behulp van de PFA-100.

Materiaal en methode: Bij 12 gezonde vrijwilligers zijn 4 therapeutische interventies uitgevoerd met een wash-out periode van tenminste 14 dagen: *i*) éénmalige inname van 160 mg ASA, *ii*) inname van 15 mg meloxicam (5 dagen, éénmaal daags), *iii*) inname van 1 gr nabumeton (5 dagen, tweemaal daags) en *iiii*) éénmalige inname van 400 mg ibuprofen. Bij interventies *ii*, *iii* en *iiii* is op de piekspiegel éénmalig 160 mg

ASA ingenomen. Bloedafname vond plaats voor aanvang, op de piekspiegel van de NSAID's, 1 uur en 24 uur na inname van ASA. Van het afgenomen bloed (0,129 M citraat) werd de closure tijd (CT) met de PFA-100 (CEPI cartridge) in duplo bepaald.

Resultaten: De gemiddelde CT's (referentiewaarde <170 sec) zijn weergegeven in onderstaande tabel.

| NSAID | acetylsalicylzuur | meloxicam | nabumeton | ibuprofen |
|-------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|
| voor | 113 | 114 | 115 | 111 |
| na NSAID | | >157 | 152 | >204 |
| ASA, 1 uur | >202 | >217 | 152 | >220 |
| ASA, 24 uur | >173 | >176 | 147 | 128 |

Discussie: Naast ibuprofen is ook nabumeton in staat ASA te antagoneren wanneer ASA op de piekspiegel van de NSAID's wordt ingenomen.

43. Invloed van NSAID's op aspirine bij gelijktijdige inname gemeten met de TXB₂-productie in trombocyten

M. de METZ¹, A. HOVESTAD-WITTERLAND², J. KLEIN GUNNEWIEK¹, E. VOLLAARD²
Afdelingen Klinische Chemie¹ en Klinische Farmacie², Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen

Inleiding: Acetylsalicylzuur (ASA) remt de plaatjesfunctie irreversibel middels acetylering van COX-1, wat leidt tot een sterk verminderde tromboxaan A₂ (TXA₂)-synthese. Niet selectieve NSAID's zoals ibuprofen, die sterk en irreversibel aan COX-1 binden, zijn eveneens in staat de trombocytenfunctie te remmen. Bij gelijktijdige inname antagoneert ibuprofen daarom de werking van ASA. In deze studie is het effect van de COX-2 preferentiële NSAID's, meloxicam en nabumeton op de werking van ASA bestudeerd door meting van de TXA₂-productie in trombocyten.

Materiaal en methode: Bij 12 gezonde vrijwilligers zijn 4 therapeutische interventies uitgevoerd met een wash-out periode van tenminste 14 dagen: *1*) éénmalige inname van 160 mg ASA, *2*) inname van 15 mg meloxicam (5 dagen, éénmaal daags), *3*) inname van 1 gr nabumeton (5 dagen, tweemaal daags) en *4*) éénmalige inname van 400 mg ibuprofen. Bij interventies *2*, *3* en *4* is op de piekspiegel éénmalig 160 mg ASA ingenomen. Bloedafname (zonder anticoagulans) vond plaats voor aanvang, op de piekspiegel van de NSAID's, 1 uur en 24

uur na inname van ASA. Het bloed stelde 1 uur bij 37 °C voor bepaling van de TXB₂-concentratie in serum als maat voor de TXA₂-productie.

Resultaten: De mediane TXB₂-concentraties (nmo/l) en het percentage remming t.o.v. de uitgangswaarden zijn weergegeven in onderstaande tabel.

| NSAID | geen | meloxicam | nabumeton | ibuprofen |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| voor (uitgang) | 784 (0%) | 860 (0%) | 856 (0%) | 932 (0%) |
| na NSAID | | 311 (60%) | 95 (88%) | 27 (96%) |
| ASA, 1 uur | 13 (98%) | 42 (94%) | 63 (92%) | 27 (95%) |
| ASA, 24 uur | 28 (96%) | 58 (92%) | 168 (80%) | 729 (21%) |

Discussie: Evenals het niet selectieve ibuprofen verminderen de preferentiële NSAID's nabumeton en meloxicam de serum TXA₂-productie en remmen de irreversibele werking van ASA bij inname op de piekspiegel van de NSAID's.

Gynaecologie/verloskunde/perinatologie

44. Verspreiding van erfelijke ziekten door middel van donorsperma in Nederland

P.M.W. JANSSENS

Klinisch Chemisch Laboratorium / Spermabank, ziekenhuis Rijnstate, Arnhem

Inleiding: In Nederland wordt sinds 1992 een limiet van 25 nakomelingen per spermadonor gehanteerd. Dit is om te voorkomen dat nakomelingen van spermadonoren een grotere kans op het aangaan van consanguïne relaties hebben dan willekeurige leden van de bevolking.

Methode: Theoretische beschouwing met overwegingen vanuit genetisch, psychologisch en juridisch perspectief.

Resultaat: Vanuit een populatie-genetisch standpunt gezien heeft verlaging van het aantal nakomelingen per donor alleen tot gevolg dat er meer genetische variatie wordt doorgegeven naar de groep van nakomelingen. Het aantal nakomelingen van spermadonoren over de gehele bevolking genomen is dusdanig klein dat eventuele doorgifte van ongunstige genetische kenmerken op landelijk niveau weinig gewicht in de schaal legt. Gebruikers van donorsperma en hun nakomelingen hebben

geen kennis van de eventueel andere nakomelingen van de donor die voor hen is gebruikt. Voor gebruikers van donorsperma en hun nakomelingen telt -aangenomen dat de kans op inteelt acceptabel laag is- slechts de genetische en microbiële veiligheid van het sperma. Het belang van de donoren, tenslotte, is, rekening houdend met de nieuwe Wet donorgegevens Kunstmatige bevruchting, goed te waarborgen door middel van individuele afspraken tussen spermabanken en donoren.

Conclusie: Er is geen reden voor systematische bijstelling van de limiet van maximaal 25 nakomelingen per spermadonor.

Literatuur: Janssens PMW. Verspreiding van erfelijke ziekten door donorsperma: geen reden voor verlaging van het aantal nakomelingen per donor in Nederland. *Ned Tijdschr Geneesk* 2002; 146: 1215-1218.

45. Is HFE C282Y heterozygosity associated with pre-eclampsia?

F.V. VELZING-AARTS¹, B.G. HEPKEMA², F.P.L. van der DIJS², F.A.J. MUSKIET¹

Pathology and Laboratory Medicine, Groningen University Hospital¹, Transplantation Immunology, Groningen University Hospital² and Analytic Diagnostic Center, Curaçao³

Introduction: The HFE protein plays a key role in the iron sensing mechanism of crypt cells. The mutant C282Y HFE protein interferes with this mechanism, leading to inappropriately high iron absorption and subsequent accumulation of iron in various organs. C282Y homozygosity leads to hemochromatosis and C282Y heterozygosity is regarded as a genetic marker of lifelong moderate iron overload. Iron catalyzes the formation of free radicals, and iron-mediated lipid (e.g. LDL) peroxidation is implicated in atherogenesis. Pre-eclampsia shares common risk factors with atherosclerosis, and increased serum iron, ferritin and percentage transferrin saturation have been reported. In this pilot study, we investigated whether pre-eclampsia might be associated with C282Y. **Material and methods:** Seventy-four women with a history of pre-eclampsia were recruited by retrospective reviewing of hospital records. Pre-eclampsia was defined as a diastolic

blood pressure of ≥ 90 mm Hg in combination with proteinuria (≥ 0.3 mg/l or ≥ 3 g/24 h). Eighty-four women with uncomplicated pregnancies, participating in a study on clinical chemical reference values, served as controls. C282Y genotypes were assessed by PCR amplification of genomic DNA. All women lived in the island of Curaçao, which is inhabited by a population of West-African descent with ample Caucasian admixture. **Result:** Homozygosity for C282Y was not observed. Heterozygosity frequencies amounted to 4.1% (3/74) in women with previous pre-eclampsia and 2.4% (2/84) in controls (not significant).

Conclusions: The low C282Y heterozygosity frequency is in agreement with prevalence data from African populations. Together with the small study numbers, it precludes any firm conclusions. We propose a similar case-control study in populations with high heterozygosity frequency.

46. Plasma soluble transferrin receptor merely reflects iron status in the last trimester of pregnancy

F.V. VELZING-AARTS¹, D.A.J. DIJCK-BROUWER¹, A.S.B. MENSINK^{1,2}, C. RENFURM², F.P.L. van der DIJS², F.A.J. MUSKIET¹

Pathology and Laboratory Medicine, Groningen University Hospital¹ and Analytic Diagnostic Center, Curaçao²

Introduction: Establishment of iron deficiency in pregnancy is troublesome, since pregnancy *per se* alters most iron status indices. Soluble transferrin receptor (sTfR) is a recently recognized iron status parameter that also depends on erythroid mass. We investigated the added value of sTfR for iron assessment in pregnancy.

Material and method: Blood was obtained from 82 apparently healthy pregnant women at gestational weeks (GW) 10, 16, 20, 28, 32 and 36. Plasma sTfR, serum ferritin and serum C-reactive protein (CRP) were analyzed by immunochemical methods. Women with CRP >0.8 mg/l were excluded. Women with ferritin >30 μ g/l at GW 10, 16 and 20 were classified as an adequate group (n=26); those with ferritin ≤ 30 μ g/l as a depleted group (n=10). Analogously, women with ferritin >12 μ g/l at GW 28, 32 and 36 were classified as an adequate group

(n=22); those with ferritin ≤ 12 μ g/l as a depleted group (n=19). Between-group differences were analyzed with the Student's t-test or repeated measures in a general linear model.

Results: GW 10-20: 1) there was no between-group sTfR difference, 2) sTfR was not related to ferritin, and 3) sTfR increased similarly in both groups. GW 28-36: 1) sTfR was higher in the depleted group, compared with the adequate group, 2) sTfR correlated inversely with ferritin, and 3) sTfR increased significantly in the depleted group, but remained virtually constant in the adequate group.

Conclusion: sTfR increase is largely independent of iron status in the first half of pregnancy, but becomes solely dependent on iron status in its second half. sTfR is able to detect iron deficiency beyond the depletion of stores in the second part of pregnancy.

47. Toevoeging van lange keten meervoudig onverzadigde vetzuren aan flesvoeding voor a-termen heeft een positieve invloed op de vloeïendheid van de bewegingen op de leeftijd van 18 maanden

D.A.J. DIJCK-BROUWER¹, H.M. TJOONK², J. WILDEMAN², H. BOUWSTRA³, M. HADDERS-ALGRA³, E.R. BOERSMA², F.A.J. MUSKIET¹

Pathologie en Laboratorium Geneeskunde¹, Academisch Ziekenhuis Groningen; Perinatale Voeding en Ontwikkeling², Kindergeneeskunde/Obstetrie, Academisch Ziekenhuis Groningen; Ontwikkelingsneurologie³, Rijksuniversiteit Groningen

Introductie: Lange keten meervoudig onverzadigde vetzuren (LCP) zijn structurele componenten van de fosfolipiden in de hersenen. De pasgeborene heeft een hoge behoefte aan LCP ten behoeve van de postnatale groei en ontwikkeling van de hersenen.

Doel: In een gerandomiseerde, placebo-gecontroleerde, dubbelblinde studie evalueerden we het effect van LCP-toevoeging aan flesvoeding gedurende de eerste 2 levensmaanden op de neurologische ontwikkeling van a-termen kinderen op de leeftijd van 18 maanden.

Methoden: Honderdvijfendertig kinderen (LCP+ groep) kregen gedurende de eerste 2 levensmaanden een flesvoeding met LCP (0,45 g arachidonzuur en 0,30 g docosahexaeenzuur per 100 g vetzuren). In de daaropvolgende 4 maanden kregen ze dezelfde voeding als de controles (LCP- groep). De LCP-groep (n=157) kreeg gedurende 6 maanden de LCP- flesvoeding. De referentiegroep bestond uit 154 borstgevoede kinderen. De Neurologische Optimaliteits Score (NOS; volgens

Touwen en Hempel) werd bepaald op de mediane leeftijd van 20 maanden (bereik 16-28 maanden). De NOS subscores "vloeïendheid" en "variabiliteit" werden apart beschouwd. SPSS werd gebruikt voor univariate groepsvergelijkingen en de constructie van multivariate lineaire regressiemodellen, waarin voor de belangrijkste maternale en perinatale verstorende factoren werd gecorrigeerd.

Resultaten: Univariate analyse toonde voor géén van de onderzochte parameters een verschil tussen de drie voedingsgroepen. De multivariate regressiemodellen toonden een positief effect van LCP op de vloeïendheid van de bewegingen ($\beta=0,141$; $p=0,04$) ten opzichte van LCP-. Ten opzichte van LCP- had borstvoeding een positief effect op de NOS ($\beta=0,155$; $p=0,048$) en de vloeïendheid van bewegingen ($\beta=0,218$; $p=0,002$).

Conclusie: LCP-toevoeging aan flesvoeding voor a-termen heeft een positieve invloed op de vloeïendheid van de bewegingen op 18 maanden.

48. Usefulness of urinary sugars as markers for intestinal maturation in preterm infants

D.A.J. DIJCK-BROUWER¹, E.J. van der Kroft, E. BIJKERK, C.M. van BEUSEKOM², H.A. WOLTIL³, F.A.J. MUSKIET¹
Pathology and Laboratory Medicine¹, University Hospital Groningen, The Netherlands; Friesland Nutrition Research², Leeuwarden, The Netherlands; Department of Pediatrics³, Martini Hospital, Groningen, The Netherlands

Background: Intestinal maturation, notably increasing lactase activity and decreasing permeability, occurs shortly after birth. Gestational age, polyamines, corticosteroids, and possibly many other factors influence gut maturation. We investigated the usefulness of the urinary lactose/lactulose, lactose/mannitol and lactulose/mannitol ratios, as non-invasive markers of intestinal maturation.

Method: Eight healthy preterm male infants (birth weight 2008±372 g, gestational age 34±2 weeks) received a commercially available formula, with its usual sugar composition. Urine was collected daily during 14 days and weekly up to 6 weeks post-term. Urinary sugars were determined by gas chromatography.

Result: The lactose/lactulose and lactose/mannitol ratios decreased within 14 days to reach stable levels from about 2 weeks. Lactulose/mannitol changes were less pronounced. Neither ratio exhibited relationships with gestational age and birth weight. Interindividual variation was highest from day 0-10 (CV_{mean} 58.8-63.9%) and decreased from 3 weeks onwards (CV_{mean} 38.7-54.4%).

Conclusions: The courses of lactose/lactulose and lactose/mannitol are consistent with increasing intestinal lactase activity. Permeability, as derived from lactulose/mannitol, shows less change within the study period. Large interindividual variation hampers the usefulness of urinary sugars as markers for intestinal maturation.

49. Increased total cell-free DNA in the serum of pregnant women carrying a fetus affected by trisomy 21

J.B. DE KOK¹, K. SPENCER², D.W. SWINKELS¹

Department of Clinical Chemistry¹, University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands, Department of Clinical Biochemistry², Harold Wood Hospital, Romford, Essex, UK

Introduction: Prenatal screening for chromosomal anomalies using a combination of fetal nuchal translucency thickness and maternal serum biochemistry in the first trimester can detect some 90% of cases of trisomy 21 at a 5% false positive rate. A number of possible methods have been suggested for decreasing this false positive rate. One method involves the quantification of cell-free fetal DNA in the maternal circulation. In this study we seek to confirm the recent observation of increased levels of cell-free fetal DNA in maternal serum in trisomy 21 affected pregnancies and also included cell-free total DNA in the analysis.

Methods: DNA was extracted from archived second trimester maternal serum samples collected as part of a prenatal screening program. A total of 10 cases with trisomy 21 male fetuses were compared with 10 controls (male fetuses) with samples matched for duration of storage and gestational age.

Real-time quantitative PCR of the SRY and albumin genes was used to quantify fetal and total DNA, respectively.

Results: The median fetal DNA levels in the group of 10 pregnancies with trisomy 21 were 31.98 cell-equivalents per ml compared with 34.06 in the control group. The difference was not significant. The median total DNA levels in women with a trisomy 21 fetus were significantly higher (p=0.029) than in controls (36152.6 v 5832.81 cell-equivalents per ml).

Conclusions: Although we could not confirm previous studies of an increased amount of fetal DNA in pregnancies affected by trisomy 21, we did find increased levels of total DNA in these pregnancies. Larger studies are needed to elucidate the true value of measurement of fetal and total DNA in maternal serum in the context of prenatal screening for chromosomal abnormalities.

Neurologie/psychiatrie

50. Cerebrospinal fluid choline-containing phospholipids in Alzheimer's disease

C. MULDER¹, L.O. WAHLUND², T. TEERLINK¹, M. BLOMBERG², G.J. van KAMP¹, P. SCHELTENS³, P.G. SCHEFFER¹
VU University Medical Center, Departments of Clinical Chemistry¹ and Neurology³, Amsterdam, The Netherlands and Huddinge University Hospital, Karolinska Institute, Department of Clinical Neuroscience², Section of Geriatric Medicine, Huddinge, Sweden

Introduction: Changed membrane phospholipid composition may be fundamental for neurodegeneration in Alzheimer's Disease (AD). The breakdown of phosphatidylcholine (PC), the major phospholipid, is reflected in the appearance of products such as lyso-PC. The ratio of lyso-PC/PC is regulated by phospholipase A2 and lyso-PC acyltransferase. The activity of phospholipase A2 was significantly decreased in parietal and temporal cortices of patients with AD. In contrast, the activities of lysophospholipid acyltransferase, which recycles lysophospholipids into intact phospholipids, were increased by 50-70% (Ross et al., J Neurochem 1998; 70: 786-793). We hypothesized decreased lyso-PC/PC ratios in CSF of AD patients reflecting altered enzyme activities in vivo.

Methods: Subjects with memory complaints referred to the outpatient clinic went through an extensive dementia investigation including physical examination, MRI, SPECT, neuropsychological and laboratory tests. The final clinical diagnosis was confirmed after 6 months follow-up, resulting in 19 probable AD patients (NINCDS-ADRDA criteria) and 19 age-matched controls. CSF was obtained by lumbar puncture under standardized conditions and stored at -70 °C until processing.

PC and lyso-PC in CSF, expressed in arbitrary units (A.U.), were measured by electrospray ionization tandem mass spectrometry, using di-arachidoyl PC as internal standard.

Results: We found no difference in total PC levels. The lyso-PC levels tended to be lower in AD. Lyso-PC/PC ratios in CSF of AD patients were significantly decreased compared to controls.

| | AD Cases median (range) | Controls median (range) | P |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------|
| PC (A.U.) | 943 (473-1326) | 971 (523-1966) | 0.908 |
| Lyso-PC (A.U.) | 3.4 (0.8-7.5) | 5.4 (1.8-32.5) | 0.109 |
| Lyso-PC/PC ratio (%) | 0.36 (0.17-0.74) | 0.54 (0.25-1.65) | 0.017 |

Conclusion: In agreement with a decreased activity of phospholipase A2 and an increased activity of lysophospholipid acyltransferase we found lower lyso-PC/PC ratios in CSF of AD patients.

51. Effect van rookgewoonte en CYP1A2-genotype op de benodigde dagdosis van clozapine bij mannen en vrouwen

J. van der WEIDE¹, L.S.W. STEIJNS¹, M.J.M. van WEELDEN²
Ziekenhuis St. Jansdal¹, Klinisch Chemisch Laboratorium, Harderwijk, GGz Meerkanten², Ermelo

Inleiding: Patiënten die lijden aan schizofrenie krijgen vaak antipsychotica toegediend. Een veel voorgeschreven antipsychoticum is clozapine. Het is bekend dat bestanddelen uit sigarettenrook inhibitie kunnen veroorzaken van CYP1A2, het metaboliserend enzym van clozapine. Ook zijn er aanwijzingen dat sommige genotypen van CYP1A2 een eiwit produceren wat meer induceerbaar is dan andere genotypen. In deze studie is bepaald in hoeverre rookgewoonte, geslacht en CYP1A2-genotype van invloed zijn op de benodigde clozapine-dagdosis.

Methoden: Van 80 stabiel ingestelde clozapinegebruikers, waarvan routinematig clozapineserumspiegels en CYP1A2-genotype waren bepaald, werd rookgedrag en geslacht in kaart gebracht en in verband gebracht met de dagelijkse clozapine-onderhoudsdosering. De groep bestond uit 51 mannen en 29 vrouwen, waarvan respectievelijk 37 (73%) en 8 (28%) rokers.

Resultaten: De clozapinedosis waarop rokers waren ingesteld bedroeg gemiddeld 382 mg/dag, terwijl niet-rokers gemiddeld 197 mg/dag nodig hadden. Bij rokers was de dosering voor mannen gemiddeld 1,2 maal zo hoog als voor vrouwen, bij niet-rokers hadden mannen gemiddeld een 1,6 maal hogere dosis dan vrouwen. De gemiddelde clozapineonderhoudsdoseringen voor rokers met en zonder het inductiegevoelige mutante CYP1A2-genotype bleken niet statistisch significant te verschillen.

Conclusie: Er bestaat een sterke associatie tussen rookgedrag van een patiënt en de onderhoudsdosering van clozapine waarop hij is ingesteld. Rokers hadden gemiddeld een 1,9 maal zo hoge dagdosis nodig dan niet-rokers, waarbij mannen op een gemiddeld hogere dosering waren ingesteld dan vrouwen. Het genotype van CYP1A2 lijkt niet van invloed op de benodigde clozapinedagdosing.

52. Diagnostic value of serum S-100 levels for paraplegia after thoraco(abdominal) aortic aneurysm surgery

E.C. LASES^{1,2}, F.J.L.M. HAAS¹, H.T.M. ter BEEK³, L.P.H.J. AARTS³, M.A.A.M. SCHEPENS⁴, H.P. SIEGERS⁵, I. van der TWEEL⁶, E.H.J.F. BOEZEMAN⁷

Departments of Clinical Chemistry¹, Anaesthesiology and Intensive care³, Cardiopulmonary Surgery⁴, Neurology⁵ and Clinical Neurophysiology⁷, St Antonius Hospital, Nieuwegein Department of Biomedical Analysis² and Center for Biostatistics⁶, Utrecht University, The Netherlands

Introduction: Paraplegia is still a devastating neurologic complication following thoraco(abdominal) aortic aneurysm (TAA(A)) surgery. The aim of this study was to explore whether serum concentrations of the S-100 protein could be a diagnostic marker for detecting paraplegia after TAA(A) surgery.

Methods: Fifty-nine patients undergoing TAA(A) repair were included in this prospective study. Serum samples were drawn after the induction of anaesthesia and haemodynamic stabilisation, during the cross-clamp period of the critical aortic segment, 5 minutes, 2, 4, 6, 8 and 19 hours respectively after reperfusion. Determinations of S-100 in serum were performed using a LIAISON[®] Random Access Analyser. In all patients recording of myogenic motor evoked potentials (MEPs) following transcranial electric stimulation was carried out. Spinal cord function was expressed as the ratios area under the curve

(AUC) leg / AUC arm of the MEPs (MEP ratios).

Results: At 19 hours after reperfusion serum concentrations of S-100 > 0.6 µg/L had a positive predictive value (PPV) of 50% and a negative predictive value (NPV) of 100% in identifying patients with paraplegia after TAA(A) surgery. The PPV of serum S-100 levels was higher than the PPV of MEP ratios < 50%, which was 33%. The NPV of MEP ratios < 50% was 100% as well. Furthermore, the combination of serum S-100 concentrations > 0.6 µg/l and MEP ratios < 50% had a PPV of 100% and a NPV of 100%.

Conclusions: Our results show that serum S-100 levels have greater diagnostic potential than MEP ratios for identifying patients with paraplegia after TAA(A) surgery. The use of both serum S-100 levels and MEP ratios is of great value for diagnosing paraplegia after this type of surgery.

53. Hyper-phosphorylated tau in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration.

G.J van KAMP¹, N.S.M. SCHOONENBOOM^{1,2}, C. MULDER¹, S. ROSSO³, Y.A.L. PIJNENBURG², J. van SWIETEN³, P. SCHELTENS²

VU University Medical Center, Amsterdam Departments of Clinical Chemistry¹ and Neurology², Department of Neurology³, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

Introduction: In early onset dementia (before 65 yrs), clinical differentiation between Alzheimer's disease (AD) and frontotemporal lobar degeneration (FTLD) may be difficult. Patients often present with comparable clinical symptoms: memory and language disturbances, and executive problems. In an early stage of disease, symptoms may be less obvious and current diagnostic methods less accurate. Hyperphosphorylated tau protein and Amyloid β_{1-42} (A β_{42}) play a pathogenic role in neurodegeneration and can be measured in CSF.

Objective: to investigate the diagnostic value of measuring CSF Thr181-phosphorylated Tau (Ptau-T181) in combination with the current markers CSF total tau and A β_{42} in differentiating AD from FTLD.

Methods: A β_{42} , total-tau, and Ptau-T181 were measured by ELISA (Innogenetics, Ghent, Belgium) in CSF of 20 AD patients, 20 age-matched FTLD patients and 16 age-matched non-demented controls. Patients and controls went through

an extensive dementia investigation including physical examination, MRI, neuropsychological and laboratory tests. Final clinical diagnosis was confirmed after 6 month follow-up.

Results: CSF total tau and Ptau-181 were significantly higher in AD patients compared to FTLD patients (p=0.01 and p<0.001) and controls (p<0.001). CSF Ptau-181 yielded a significantly better discrimination between AD and FTLD patients than CSF total tau. Combining CSF A β_{1-42} and Ptau-181, AD patients were differentiated from FTLD patients with a sensitivity of 95% and a specificity of 90%.

Conclusion: Our results suggest that the combination of CSF Ptau-181 and A β_{1-42} improves (over total-tau plus A β_{1-42}) diagnostic accuracy in differentiating early onset AD from FTLD. However, due to overlapping test results, the value of CSF Ptau-181 alone is limited in individual cases. The overlapping test results of CSF Ptau-181 between AD and FTLD can partly be explained by the neuropathological heterogeneity of FTLD.

54. Concomitant use of serotonergic antidepressants is a risk factor for lithium induced polyuria

K.L.L. MOVIG^{1,2}, R. BAUMGARTEN³, H.G.M. LEUFKENS², J.H.M. van LAARHOVEN⁴, A.C.G. EGBERTS^{1,2}
Hospital Pharmacy Midden-Brabant¹, TweeSteden hospital and St. Elisabeth hospital, Tilburg, The Netherlands; Department of Pharmacoepidemiology and Pharmacotherapy², Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences (UIPS), Utrecht University, The Netherlands; Department of Clinical Chemistry and Haematology³, Atrium Medical Center, Heerlen, The Netherlands; Department of Psychiatry⁴, St. Elisabeth Hospital, Tilburg, The Netherlands

Background: Polyuria is common in bipolar, or manic-depressive patients treated with lithium. However, risk factors for polyuria in patients concomitantly using lithium have not been established. **Aims:** The objectives of the present study were to estimate the prevalence of polyuria associated with the use of lithium and to identify additional risk factors, especially concomitantly used medication, that predispose patients on lithium to develop polyuria.

Method: During a four months period a prospective follow-up study was conducted in an outpatient lithium clinic. 24-h urine was collected from all patients in a standardised way. Polyuria was defined as urine volume greater than 3 liters per 24-h. Risk factors examined included demographic variables, medications and medical (co)morbidities.

Results: Seventy-five lithium patients were included. The prevalence of polyuria among lithium users was 37%. Concomitant use of serotonergic antidepressants among lithium users was strongly associated with polyuria (odds ratio 4.25 [95% CI 1.15, 15.68]) compared with patients not using these agents.

Conclusions: Our data confirm the high prevalence of lithium-induced polyuria. Concomitant use of serotonergic antidepressants and lithium significantly enhances the risk for the occurrence of lithium-induced polyuria. Although limited polyuria is not harmful, it may be quite troublesome for the patient. In many cases cessation of lithium therapy is not a viable alternative because of the difficulty in controlling the manic or depressive symptoms. Physicians should be aware of the increased risk of lithium-induced polyuria upon concomitant serotonergic drug use.

Interne geneeskunde

55. Is there any need for 1,25-(OH)₂ vitamin D3 analysis in hypovitaminosis D?

J.P.M. WIELDERS¹, I. GROOTJANS-GEERTS²

Department Clinical Chemistry¹, Meander Medical Centre, Amersfoort; General Practitioner², Amersfoort

Introduction: we have demonstrated the high prevalence of hypovitaminosis D in veiled women in the Netherlands. Since calcitriol (1,25(OH)₂ vitamin D3) is the active component, we investigated the calcitriol level in women with proven hypovitaminosis D.

Methods: Blood samples of 51 apparently healthy veiled Turkish women were analysed for 25OH vitamin D3 (calcidiol). Samples with proven hypovitaminosis were analysed for calcitriol as well. **Results:** A majority (82%) of these women were severely deficient with calcidiol levels < 20 nmol/l.

However, even at the lowest level of calcidiol, the calcitriol level was always within the reference range.

Conclusion: Hypovitaminosis D is recognised more and more as a serious but easily treatable health problem for risk groups like veiled women and elderly people. We demonstrate that there is no direct need for combined analysis of calcidiol and calcitriol. Even in severe hypovitaminosis D the smallest amount of calcidiol seems to be sufficient for maintaining the calcitriol at normal levels.

56. Diagnostiek en monitoring van inflammatoire darmafwijkingen d.m.v. calprotectine: een nieuwe ster aan het firmament?

F.A.J.T.M. van den BERGH¹, J.J. KOLKMAN², I. VERMES¹

Afdelingen Laboratorium¹ en Interne Geneeskunde², Medisch Spectrum Twente, Enschede

Inleiding: Chronische inflammatoire darmafwijkingen (inflammatory bowel disease, IBD) zoals M. Crohn en colitis ulcerosa worden gekenmerkt door afwisselende periodes van klinisch welbevinden en exacerbaties. Differentiatie tussen actieve ziekte en klachten t.g.v. fibrotische, niet-actieve ziekte vormt een berucht probleem. Geen enkele klassieke laboratoriumbepaling levert voldoende onderscheid. Invasieve, endoscopische methodes vormen nog steeds de gouden standaard; bij M. Crohn is ook dit soms complex vanwege de variabele lokalisatie van het ontstekingsproces. Scintigrafische technieken vormen een weinig aantrekkelijk alternatief. Recent is gebleken dat calprotectine, een calcium- en zinkbindend ontstekings-eiwit met antimicrobiële eigenschappen, een uitstekende maat lijkt te vormen voor diagnostiek en monitoring van IBD.

Methode: D.m.v. een commercieel verkrijgbare ELISA (Eurospital) werd calprotectine gemeten in random feces monsters afkomstig van gezonde vrijwilligers, endoscopisch geclassificeerde patiënten met actieve IBD en IBD in remissie alsmede

patiënten met andere gastro-intestinale afwijkingen. De activiteit van het ziekteproces werd gemonitord o.b.v. klinische klachten en bloedonderzoek.

Resultaten: in een oriënterend vooronderzoek bij 50 patiënten bedraagt de mediane calprotectine waarde bij gezonde vrijwilligers 10 mg/L (n= 7, range 7-30). De calprotectine bij IBD in remissie is 71 mg/l (n=11, range 9-197), bij actieve IBD > 250 mg/l (n= 27, range 219 en hoger) terwijl bij patiënten met overige darmafwijkingen (n=5) intermediaire waarden worden gevonden: gastro-enteritis (143 mg/l), antibiotica-geassocieerde colitis (105 mg/l), bacteriële overgroei (105 mg/l), slokdarmcarcinoom (140 mg/l) en ischemische colitis (10 mg/l). In een grotere reeks patiënten (n=250) blijkt de calprotectinwaarde uitstekend te correleren met de ziekteactiviteit.

Conclusie: Calprotectine in feces lijkt een belangrijke aanwinst in diagnostiek en monitoring van IBD. De grootste potentie ligt wellicht in de eerste screening van onbegrepen buikklachten vanwege de hoge discriminerende waarde tussen M. Crohn en IBS.

57. Per-operatieve intact-PTH-metingen en grafische presentatie tijdens de operatie van de bij schildklieren

C.M. LEM¹, J.C. VERZIJL¹, J.M. PEKELHARING¹, F.A. TJEBBES², D.H. SCHWEITZER³, H.J.L.M. ULENKATE¹
Medische Laboratoria, afd. Klinische Chemie¹, Chirurgie², Endocrinologie³, Reinier de Graaf Groep, Delft

Inleiding: Begin 2002 introduceerden wij op het laboratorium in overleg met de interne/chirurgie een snelle intact-PTH-immunoassay (15 min.). Deze immunoassay heeft tot doel om met een minimale invasieve ingreep de hyperfunctionerende bij schildklier(en) te verwijderen en om de operatietijd en de opnameduur van de patiënt te verkorten.

Methode: Inmiddels zijn 6 patiënten geopereerd onder begeleiding van de per-operatieve turbo PTH-assay (DPC) Tijdens de operatie werden bloedmonsters afgenomen op verschillende tijdstippen. Resultaten werden doorgebeld naar de chirurg en grafisch gepresenteerd. De halfwaardetijd werd op 2 manieren berekend: met de pre-excisiewaarde of de t=0-waarde (post-excisie) als startpunt. **Resultaten:** Alle patiënten hadden vóór de operatie verhoogde PTH- en calciumwaarden. Uitgaande van t=0 als startpunt, hadden alle patiënten een halfwaardetijd tussen 8,2 en 21,4 min. Uitgaande van de pre-excisiewaarde,

hadden vijf patiënten een halfwaardetijd <5 min. en één had 6,1 min. Allen hadden binnen ±10 min. post-excisie van de bij schildklier(en) een PTH-daling >50% ten opzichte van de pre-excisiewaarde. In de literatuur stelt men dat een halfwaardetijd tussen ±1-5 min. of een PTH-daling >50% een goede parameter is voor een geslaagde operatie.

Conclusie: De operatieduur is verkort en de opnameduur is beperkt tot een dagopname. Er is geen duidelijke definitie vastgesteld van de pre-excisie- en de baseline PTH-waarden. De keuze van startpunt beïnvloedt sterk het dalingspercentage en de PTH-halfwaardetijdberekening. Daarom is een algemene standaardisatie van de tijdstippen van bloedafnames en definitie van "pre-excisiewaarde" wenselijk. Pas dan is de per-operatieve PTH-assay een betrouwbaar middel voor het monitoren van succesvol chirurgisch verwijderen van hyperfunctionerende glandulae parathyreoïdeae.

58. Te grote variatie in waarden bij gebruik van de bepaling van cystatine C ter beoordeling van de nierfunctie bij patiënten met veel voorkomende pathologie

R.W. WULKAN, M.J. MANTEL
Medisch Centrum Rijnmond-Zuid, Rotterdam

Inleiding: Er is een stijgende belangstelling voor cystatine C voor het bepalen van de GFR (1). Wij deden een verkennend onderzoek naar deze bepaling.

Methoden: Cystatine C maten we met de methode van Dade-Behring (BNProspec) en creatinine met de HPLC-methode van Spierto (2). Van patiënten werd 24-uurs-urine verzameld. De standaardklaring (gecorrigeerd voor lengte en gewicht) werd berekend.

Resultaten: In een kleine controlegroep bepaalden we het toe te passen referentiegebied. Bij 14 gezonde personen (26-53 jaar) vonden wij voor creatinine resp. cystatine C als 95% referentiewaarden 56-94 µmol/l en 0,55-0,91 mg/l. In een op creatininegehalte geselecteerde groep van 32 patiënten (creatinine: 12 – 511, gemiddeld 153, mediaan 131 en cystatine C: 0,8 – 4,7, gemiddeld 1,84, mediaan 1,5) bepaalden we de creatinineklaring en cystatine C. Er was geen lineaire correlatie

tussen de klaring en cystatine C. Bij klaringen van kleiner dan 70 ml/min waren alle cystatinewaarden groter dan 1. De voor het scheiden van normale en pathologische klaringen toe te passen cutt-off was ongeveer 1,3 mg/l. We deden daarna cystatine-C- en creatininebepalingen bij 21 patiënten met ongedifferentieerde schildklierproblematiek. Wij stelden vast, dat de spreiding van cystatine C-waarden ten opzichte van de spreiding in creatinewaarden bij patiënten veel groter was dan in de controlegroep.

Conclusie: Het gebruik van de bepaling ten behoeve van de diagnostiek bij volwassenen dient te worden afgeraden.

Literatuur

1. Price CP, Finney H. Clin Chim Acta 2000; 297: 55-66.
2. Spierto FW, MacNeil ML, Culbreth P, Duncan I, Burtis CA. Clin Chem 1980; 26: 286-290.

59. Detectie van glomerulaire hematurie met behulp van urineflowcytometrie en sedimentbeoordeling

V. SCHARNHORST, G. COPPENS, F. van der GRAAF
Máxima Medisch Centrum, Klinisch Laboratorium, Veldhoven

Inleiding: Morfologie en grootte van erythrocyten en voorkomen van erythrocytencilinders in urine kunnen aanwijzingen voor de origine van een hematurie geven. In ons laboratorium worden urines met de vraagstelling 'glomerulaire hematurie' onderzocht d.m.v. een uitgebreid sedimentonderzoek. Recent is de urineflowcytometer UF-100 (Sysmex) aangeschaft, die o.a. erythrocyten op volume sorteert en aanwezigheid van (cel)cilinders detecteert.

Methoden: 250 urines met de vraagstelling 'glomerulaire hematurie' zijn d.m.v. een uitgebreid sedimentonderzoek (voorscreening met dipstick, microscopische beoordeling door 2 ervaren analisten) en met de UF-100 geanalyseerd. Indien voldoende urine beschikbaar was, is ook geconcentreerde urine aan de UF-100 aangeboden. M.b.v. beide methoden is getracht

de vraag de bron van de hematurie te beantwoorden. D.m.v. statusonderzoek door de internist-nefroloog werd de klinische diagnose 'glomerulaire hematurie' gesteld dan wel uitgesloten. Sensitiviteit en specificiteit van de laboratoriumdiagnostiek zijn aan de klinische diagnose getoetst. In een tweede deel van de studie wordt m.b.v. kunsturines en natieve urines de invloed van de effectieve osmolaliteit (= osmolaliteit – ureumconcentratie) op de uitslagen van de erythrocytenanalyses bestudeerd.

Resultaten en Conclusies: Sensitiviteit en specificiteit van de laboratoriumdiagnose 'glomerulaire hematurie', gesteld met het sedimentonderzoek en/of flowcytometrische analyse van urine worden gepresenteerd en besproken. Tevens wordt de invloed van de effectieve osmolaliteit op aantal en morfologie van de erythrocyten gepresenteerd.

Oncologie/infectieziekten

60. Diagnostic Accuracy of ACE, sIL2R, hsCRP and SAA in Sarcoidosis

S. ROTHKRANTZ-KOS^{1,4}, M. DRENT^{2,4}, J. de VRIES^{3,4}, M.P. van DIEIJEN-VISSER^{1,4}

Departments of Clinical Chemistry¹ and Respiratory Medicine², University Hospital Maastricht, Dept of Clinical Health Psychology³, Tilburg University, Sarcoidosis Management Center (SMC)⁴, University Hospital Maastricht, The Netherlands

Introduction: Sarcoidosis is a multi-organ inflammatory granulomatous disorder of unknown origin. So far, adequate parameters to monitor disease severity are lacking. Therefore, the aim of this study was to evaluate the clinical usefulness of serological markers of inflammation (high-sensitivity C-reactive protein, hsCRP and serum amyloid A, SAA), T-cell activation (soluble interleukin-2 receptor, sIL2R) and granuloma formation (angiotensin-converting enzyme, ACE) in monitoring pulmonary severity.

Methods: Between 1999-2002, 185 sarcoidosis patients visited the SMC. Seventy-six non-smoking patients (42 untreated and 34 treated) with time since diagnosis ≤ 2 years were selected. ROC-curves were used to compare the diagnostic accuracy of different markers to assess disease severity. Disease severity was determined according to standardized criteria, using lung function test results and exercise tests.

Results: In the untreated group (n=42), ROC curve analysis yielded comparable results (Table).

No significant differences between the areas under the curves (AUC) were found. In the group treated with prednisol

| | Cut-off | Sens (%) | Spec (%) | AUC | p |
|---------------|---------|----------|----------|-------|---------|
| sIL2R (kU/L) | 1035 | 78.6 | 78.6 | 0.888 | <0.0001 |
| ACE (U/L) | 21 | 78.6 | 78.6 | 0.865 | <0.0001 |
| hs-CRP (mg/L) | 3.56 | 71.4 | 67.9 | 0.778 | <0.0001 |
| SAA (mg/L) | 6.69 | 64.3 | 64.3 | 0.753 | 0.0004 |

(n=34), none of the serological markers were able to mark severity. Follow-up of at least one year yielded that only 4.2% of patients with sIL2R<1035 as compared to 17.4% patients with ACE<21 needed treatment. For sIL2R and ACE values above the cut-off value, respectively 55.5% and 36.8% of the patients needed treatment.

Conclusion: Although in the untreated patient group no differences were found between the ROC curves of ACE, sIL2R and the acute phase proteins, initial sIL2R values appeared most appropriate to indicate pulmonary disease severity in sarcoidosis.

61. Correlatie tussen Toll-like receptor (TLR-4) genotypering en infecties met gramnegatieve micro-organismen

R.HULSHOF, F.A.J.T.M. VAN DEN BERGH, I. VERMES

Laboratorium, Medisch Spectrum Twente, Enschede

Inleiding: De response van het immuunsysteem op infectie kent een ingewikkelde genetische achtergrond. Recent is een receptorfamilie beschreven, de Toll-receptoren, die een belangrijke rol spelen in de immuunafweer. Gramnegatieve bacteriën zijn een belangrijke oorzaak voor het ontstaan van sepsische shock. Bij infectie met gramnegatieve bacteriën activeren lipopolysacchariden uit de bacteriecelwand dergelijke Toll-like receptoren (TRL-4), hetgeen uiteindelijk resulteert in de initiatie van immuunafweer. Recent zijn in de literatuur twee polymorfismen van het humane TRL-4-gen beschreven (Asp299Gly en Thr399Ile) die de receptorgevoeligheid voor de lipopolysacchariden verminderd en daarmee tevens een adequate immunrespons. Deze puntmutaties hebben een voorkomen van 6-10% in de Kaukasische bevolking. Bij intensive-care-patiënten van ons ziekenhuis werd gezocht naar de mogelijke correlatie tussen het voorkomen van de Asp299Gly resp. Thr399Ile mutatie en de frequentie van voorkomen van infecties met gramnegatieve bacteriën.

Methode: Een snelle methode voor genotypering op DNA-samples van IC-patiënten werd ontwikkeld d.m.v. real-time PCR op de ABS 7900 (Taqman) thermocycler in combinatie met allele-specifieke hybridisatie. De primers en gelabelde probes, specifiek voor wildtype resp. de beide puntmutaties, werden door de leverancier samengesteld. De resultaten van de genotypering zijn vergeleken met de uitslagen van de microbiologische bloedkweken.

Resultaten: In een oriënterend vooronderzoek bij 48 IC-patiënten werd zesmaal een positieve gramnegatieve bloedkweek gevonden en driemaal een mutatie (Asp299Gly homozygoot 1x, cosegregatie met Thr399Ile 2x).

Conclusie: Een eventueel verband tussen de aanwezigheid van de beide TLR4-polymorfismen en het voorkomen van ontstekingen met gramnegatieve micro-organismen zal worden gerapporteerd. Gevonden mutaties kunnen mogelijk belangrijke aanwijzingen verschaffen voor predispositie van het ontwikkelen van een sepsische shock.

62. Hormonale manipulatie van de celcyclus van humane mammacarcinoomcellen in vitro

Z. ÇİFTÇİ¹, H.R. FRANKE², I. VERMES¹

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Afdeling Verloskunde en Gynaecologie², Medisch Spectrum Twente, Enschede

Inleiding: Uit in-vivo- en in-vitro-studies is gebleken dat bij het gebruik van oestrogenen de kans op het ontstaan van borstkanker stijgt terwijl het gebruik van de combinatie van oestrogenen met progestagenen deze kans juist doet verlagen. Langdurige blootstelling van borstklierweefsel aan oestrogenen kan versterkte proliferatie veroorzaken via veranderingen in de celcyclus. Proliferatie is onder fysiologische omstandigheden in evenwicht met apoptose.

Methoden: 17 β -Oestradiol, dihydrodprogesteron, tamoxifen, medroxyprogesteron acetaat, norethisteron acetaat, progesteron, tibolon en anastrozol werden in een concentratie van 10⁻⁶ M geïncubeerd gedurende 4, 24, 48 en 144 uren in vitro met MCF7, een oestrogeenreceptor-positieve humane borstkanker-

cellijn. Tevens werden combinaties van deze steroïden in gelijke verhoudingen met een concentratie van 10⁻⁶ M uitgevoerd. Om te bepalen of er sprake is van tumorregressie of tumorgroei is gekeken naar de ratio apoptose/proliferatie. Een ratio >1 betekent tumorregressie. Apoptose werd bepaald met flowcytometrie d.m.v. een DNA-fragmentatie assay. Proliferatie werd gemeten met RT-PCR door expressie van mRNA van cycline D1.

Resultaten: Onze in-vitro-studies laten zien dat bepaalde progestagenen na 144 uren (medroxyprogesteronacetaat; ratio 0,5, en norethisteronacetaat; ratio 0,6) de proliferatie van MCF7-cellen stimuleren, terwijl andere progestagenen (progesteron, tibolon, tamoxifen en anastrozol, respectievelijk een ratio van 1,1, 1,4, 5,5 en 1,7) juist apoptose induceren. Dit is tevens

aangetoond voor bepaalde combinaties van oestrogenen en progestagenen.

Conclusie: De resultaten van onze in-vitro-studies maken aannemelijk dat niet alle progestagenen een zelfde effect hebben

op de celcyclus ten gevolge van de veranderingen van de cycline D1-expressie. De combinatie van anti-oestrogenen met deze middelen induceren nog immer apoptose van borstkankercellen in vitro.

63. CellTracks cytometer for detection of circulating tumor cells

A.G.J. TIBBE¹, A. van der KOOI¹, M.R. de GROOT², I. VERMES²

Immunicon Europe Inc & University Twente¹, Enschede and Medisch Spectrum Twente², Departments of Medicine & Clinical Chemistry, Enschede, the Netherlands

Introduction: In patients with carcinomas, tumor cells are shed into the circulation. The number of the circulating tumor cells is low and technology is needed that has sufficient sensitivity and specificity to enumerate and characterize these cells. The CellTracks system was developed to provide an immunophenotype, fluorescence wave forms as well as images of immuno-magnetically enriched tumor cells with an occurrence frequency <1 per ml whole blood.

Methods: 7.5 ml of whole blood of patients having known breast (n=13) or colorectal (n=12) cancers was immuno-magnetically enriched for EpCam positive (epithelial) cells reducing the volume to 320 µl. Fluorescent labels against Cytokeratin and DNA were added. As a negative control a CD45 labelled fluorescent probe against white blood cells was used. This sample was transferred to a measuring chamber, which was inserted in a specially designed strong magnetic

field. The magnetic force aligns the cells on a glass slide. These cells were scanned one by one by a multi-laser scanning system and their fluorescence intensities were measured. As a control samples of healthy volunteers were measured in duplicate. To test the immuno-magnetic collection efficiency a known number of fixed SKBR-3 cells were spiked into blood samples.

Results: In all patients samples tumor cells were detected. The number of tumor cells found ranged from 1-120 per 7.5 ml of whole blood. For the control samples 0-1 positive cells per 7.5 ml have been detected. The overall immuno-magnetic selection and detection efficiency for SKBR-3 cells was > 70 %.

Conclusions: We showed that the novel CellTracks technology has a very high sensitivity and specificity, which is sufficient for the detection of tumor, cells in peripheral blood.

Erfelijke stofwisselingsziekten

64. Aanvullende klinisch-chemische criteria voor de classificatie van de meest voorkomende porfyriën

F.M.J. ZUIJDERHOUDT, J. DORRESTEIJN-de BOK

Deventer Ziekenhuis, Deventer, afdeling klinische chemie

Introductie: Vaak beschikken we slechts over labgegevens om het type porfyrie aan te geven, hetgeen classificatie extra moeilijk maakt. Gebruikmakend van literatuurgegevens en eigen ervaringen uit recente jaren hebben we getracht om enige aanvullende beoordelingscriteria op te stellen.

Methode: We selecteerden patiënten waarbij de diagnose porfyrie en het type van porfyrie met voldoende zekerheid was gesteld. We verzamelden alle relevante uitslagen. Tevens zochten we in de literatuur naar vergelijkbare testuitslagen. We rubriceerden per type porfyrie 1) van HPLC-chromatogrammen de relatieve verhoudingen van de voorkomende pieken per chromatogram, 2) het aantal keer dat concentraties hoger waren dan de bovengrens van de referentiewaarde, 3) de activiteit van porfobilinogeen (PBG-)deaminase in erythrocyten van patiënten met acute intermitterende porfyrie (AIP).

Resultaten: We presenteren voor de meest voorkomende porfyriën 1) schematische chromatogrammen met de relatieve verhouding van de uro-, hepta-, copro I-, copro III- porfyriepieken in urine en copro I-, copro III- en protoporfyrinepieken in feces, 2) tabellen voor te verwachten uitscheidingen van porfyrienes in urine en feces in aantal keren van de bovengrens van de referentiewaarde. 3) Voor AIP tonen we de PBG-deaminase-activiteitsgrenzen voor heterozygote patiënten en de waarde voor een homozygote patiënt aan de hand van de resultaten van positieve en negatieve (patiënten-)controles van de afgelopen jaren.

Conclusie: Gepresenteerde gegevens kunnen helpen bij het interpreteren van labuitslagen voor het vaststellen van het type van porfyrie.

65. Quantitative and compositional study of cardiolipin in platelets by electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS): application to the identification of Barth syndrome patients

F. VALIANPOUR, R.J.A. WANDERS, P.G. BARTH, H. OVERMARS, A.H. van GENNIP

Academic Medical Center, University of Amsterdam, Laboratory Genetic Metabolic Diseases, Emma Children's Hospital and Department of Clinical Chemistry, Amsterdam, The Netherlands

Objective: The analysis of cardiolipin (CL) is usually a burdensome and time-consuming procedure. We present here a simple and rapid method for the quantitative and compositional analysis of CL from platelets. The method was established as a diagnostic tool for the identification of Barth Syndrome (BTHS) patients.

Materials and methods: The CL content of platelets was measured in blood samples of BTHS patients and compared to age-matched non-BTHS patients and adult controls. High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation Mass Spectrometry (HPLC/ESI MS-MS) was used.

Results: Different CL molecular species such as (C18:2)₄-CL

and others were found in platelets. BTHS patients have a specific decrease of tetralinoleyl-CL levels in platelets, (range 0.1-0.5 nmol/mg protein, n=4) as compared to all control groups (2.3-5.5 nmol/mg protein, n=26).

Conclusion: Quantitative and compositional analysis of CL in platelets by the proposed method allows identification of BTHS patients more rapidly than gene analysis or analysis of CL with other methods. The abnormality of CL may explain the abnormal mitochondrial function observed in BTHS. The method may also be used for the compositional analysis of other major phospholipid classes.

66. Sepiapterinereductasedeficiëntie in een patiënt met milde methylmalonacidurie en spastische parese

N.G.G.M. ABELING¹, M. DURAN¹, H.D. BAKKER², A.H. van GENNIP¹, A.G. van CRUCHTEN¹, A.E.M. STROOMER¹, N. BLAU³, B.T. POLL-THÉ²

AMC¹, Universiteit van Amsterdam, Laboratory Genetic Metabolic Diseases, Departments of Pediatrics/Emma Children's Hospital and Clinical Chemistry, Amsterdam, The Netherlands. Laboratory of Chemistry and Biochemistry², University Children's Hospital Zürich, Switzerland

Introductie: Sepiapterinereductasedeficiëntie is een nieuw defect in de biosynthese van BH₄, dat leidt tot een ernstig tekort aan biogene amine neurotransmitters. De eerste, in 2001 beschreven patiënten met deze aandoening presenteerden zich met een DOPA-responsieve dystonie.

Wij presenteren hier een nieuwe casus: een 14-jarig Nederlands meisje, geboren uit consanguïne ouders, dat al jarenlang bekend was met een milde methylmalonacidurie.

Voorgeschiedenis: Destijds werd zij opgenomen vanwege psychomotore retardatie en hypotonie. Bij metabool onderzoek werd alleen een mild verhoogde excretie van methylmalonzuur gemeten, welke persistent, maar niet B12-responsief bleek te zijn. Het neurologische beeld was progressief en bestond uit axiale hypotonie, spastische parese en cerebellaire disfunctie. Vanaf haar 5^e jaar was zij rolstoelgebonden. Reden voor verdere metabole diagnostiek op de leeftijd van 14 jaar was een geleidelijke toename van myoclonieën en met name het optreden van dystonie.

Onderzoek en resultaten: De niveaus van de aromatische neurotransmittermetabolieten in de liquor cerebrospinalis bleken sterk verlaagd te zijn. Daarentegen waren neopterine en biopterine in de liquor licht verhoogd, maar normaal in de urine. Een afwijkende fenylalanine/ BH₄-belastingtest, waarbij een snelle daling van fenylalanine na BH₄-toediening werd gezien, was indicatief voor een defect in de biosynthese van deze cofactor. Vervolgonderzoek van pterinen in liquor liet een verhoging van sepiapterine zien, waarmee de diagnose sepiapterinereductasedeficiëntie kon worden gesteld.

Deze bijzondere aandoening kan behandeld worden met L-DOPA en de eerste behandelingsresultaten zijn zeer bemoedigend.

Conclusie: Deze casus laat zien dat met de nieuwe ontwikkelingen in het metabole onderzoek en zorgvuldige klinische indicatie een nieuw en behandelbaar defect kon worden gediagnosticeerd. De destijds vastgestelde methylmalonacidurie was niet verklarend voor de kliniek en moet als een epifenomeen worden beschouwd.

67. Factoren van invloed op het resultaat van de gaschromatografische analyse van organische zuren in urine

W.C. BOER, S. HARMSSEN, P.M.W. JANSSENS

Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Rijnstate, Arnhem

Inleiding: Vanwege geconstateerde variatie in de respons van met name melkzuur bij gaschromatografische analyse van organische zuren in urine werd nader onderzocht wat de invloed is van verschillende factoren op het kwantitatieve resultaat.

Methoden: De organische zurenanalyse van urine bestaat uit: 1. aanzuren monster, toevoeging zout en interne standaard, ethoximering ketozuren, 2. extractie zuren met ethylacetaat, 3. droogdampen extract, 4. oplossen geëxtraheerde zuren met aceton; overbrenging in GC-vial, 5. droogdampen extract, 6. sylliering, 7. injectie en scheiding met GC/MS. Onderzocht werd de invloed op de uiteindelijke respons van melkzuur en andere organische zuren van: extra toevoegingen aan het monster (stap 1), gebruikte buizen (stap 1), droogdamptijd extracten (stappen 3 en 5) en de tijd tussen sylliering en injectie in GC/MS (stappen 6 en 7).

Resultaten: Toevoeging van ureum en xylose aan een melkzuuroplossing in gedemineraliseerd water leidde tot aanzien-

lijke verhoging van de GC/MS-respons. Voorbewerking van het monster in verschillende buizen had geen effect op de resultaten. Verlenging van de droogdamptijd in stap 3 leidde tot verlaging van de melkzuurrespons. Variatie van de droogdamptijd in stap 5 had geen effect. De respons van andere onderzochte organische zuren werd niet beïnvloed door toevoeging van ureum of variatie van de droogdamptijd. Verlenging van de tijd tussen sylliering en injectie in de GC had hooguit een minimale invloed op de respons van de meeste organische zuren.

Conclusie: Toevoegingen en extracties in de monstervoorbewerking hebben een aanmerkelijke invloed op het kwantitatieve GC/MS-resultaat. Om de resultaten in verschillende urines zo goed mogelijk onderling vergelijkbaar te maken verdient het aanbeveling aan monsters een standaard hoeveelheid ureum toe te voegen en de droogdamptijden van extracten kort en reproduceerbaar te houden.

68. A novel HPLC-based method to diagnose D-bifunctional protein enoyl-CoA hydratase deficiency

J. GLOERICH¹, S. DENIS¹, E.G. van GRUNSVEN¹, G. DACREMONT², R.J.A. WANDERS¹, S. FERDINANDUSSE¹
Laboratory Genetic Metabolic Diseases¹, Departments of Clinical Chemistry and Pediatrics, Emma Children's Hospital, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands; Department of Pediatrics², University of Ghent, Ghent, Belgium

Introduction: D-bifunctional protein (D-BP) plays an indispensable role in peroxisomal β -oxidation and its inherited deficiency in humans is associated with severe clinical abnormalities. Three different subtypes of D-BP deficiency can be distinguished: 1) a complete deficiency of D-BP (type I), 2) an isolated D-BP enoyl-CoA hydratase deficiency (type II) and 3) an isolated D-BP 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (type III). In this study, we developed a method to measure D-BP dehydrogenase activity independent of D-BP hydratase activity to distinguish between D-BP deficiency type I and type II, which until now was only possible by mutation analysis.

Methods: For this assay, the hydratase domain of D-BP was

expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. After a co-incubation of yeast homogenate expressing D-BP hydratase with fibroblast homogenate of patients, using the enoyl-CoA ester of the bile acid intermediate trihydroxycholestanoic acid as substrate, D-BP dehydrogenase activity was measured.

Results: Fibroblasts of patients with a D-BP deficiency type II displayed D-BP dehydrogenase activity, whereas type I and type III patients did not.

Conclusion: This newly developed assay to measure D-BP dehydrogenase activity in fibroblast homogenates provides a quick and reliable method to assign patients with deficient D-BP hydratase activity to the D-BP deficiency subgroups type I or type II.

69. Peroxisome deficiency does not result in deficiency of enzymes involved in cholesterol biosynthesis

S. HOGENBOOM¹, G.J. ROMEIJN², S.M. HOUTEN¹, M. BAES³, R.J.A. WANDERS^{1,2}, H.R. WATERHAM¹
Laboratory Genetic Metabolic Diseases¹, Departments of Pediatrics/Emma Children's Hospital and Clinical Chemistry², Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands; Laboratory of Clinical Chemistry³, University of Leuven, Belgium

Introduction: For many decades it had been assumed that the enzymes involved in cholesterol (isoprenoid) biosynthesis are located in the cytosol and the ER. More recently, however, reports have suggested that also peroxisomes play an important role in the biosynthesis of cholesterol. This latter aspect has been addressed in this study.

Methods: To study the presumed peroxisomal involvement, we compared activities and levels of selected cholesterol biosynthetic enzymes in livers of peroxisome-deficient PEX5 knockout mice and in livers of Zellweger patients to controls. To exclude that genetic differences might influence the activity of selected enzymes, we also determined activities and levels of the enzymes in human fibroblasts of Zellweger patients with defects in different peroxisome biogenesis genes.

Results: We found normal protein levels and activities of all

enzymes measured in livers of the peroxisome-deficient mice and in all human cell lines indicating that mislocalisation of these enzymes to the cytosol does not lead to decreased activity or protein degradation. We re-examined the previously reported deficient enzymes mevalonate kinase and phosphomevalonate kinase in human Zellweger livers and found that these enzymes are inactivated rapidly in a time- and temperature-dependent manner. The normal protein levels indicate that this inactivation is not due to degradation as a result of mislocalisation. Therefore, the deficiencies of these enzymes in livers of Zellweger patients reflect the bad condition of the livers, rather than mislocalisation to the cytosol.

Conclusion: Our data imply that great care should be taken in the interpretation of data obtained in postmortem material. We conclude that peroxisomes are not a prerequisite for cholesterol biosynthesis.

70. Biochemical markers predicting survival in peroxisome biogenesis disorders

J. GOOTJES¹, P.A.W. MOOIJER¹, C. DEKKER¹, P.G. BARTH², B.T. POLL-THE², H.R. WATERHAM¹, R.J.A. WANDERS¹
Laboratory Genetic Metabolic Diseases¹ and the Department of Pediatrics/Emma Children's Hospital², Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: The peroxisome biogenesis disorders represent a genetically heterogeneous group of disorders consisting of at least 11 distinct genetic groups. Zellweger syndrome (ZS) is the prototype of this group of disorders with neonatal adrenoleukodystrophy (NALD) and infantile Refsum disease (IRD) as milder variants. Common to all three disorders are liver disease, variable neurodevelopmental delay, retinopathy and perceptive deafness with onset usually in the first months of life. Since genotype-phenotype studies are complicated by the genetic heterogeneity among PBD patients, we selected another approach, which involves evaluation of the extent of peroxisome dysfunction in skin fibroblasts. The objective of our study was to identify prognostic markers reflecting the extent of peroxisome dysfunction in primary skin fibroblasts from patients with peroxisome biogenesis disorders (PBD).

Methods: Multiple peroxisomal functions including *de novo*

plasmalogen synthesis, DHAPAT activity, C26:0/C22:0 ratio, C26:0 and pristanic acid β -oxidation and phytanic acid α -oxidation were analysed in fibroblasts from a series of patients with defined clinical phenotypes.

Results: A poor correlation with the age of death of each patient was found for *de novo* plasmalogen synthesis, C26:0/C22:0 ratio and phytanic acid α -oxidation. A fairly good correlation was found for pristanic acid β -oxidation, but the best correlation was found for DHAPAT activity and C26:0 β -oxidation. A mathematic combination of DHAPAT activity and C26:0 β -oxidation showed an even better correlation.

Conclusion: DHAPAT activity and C26:0 β -oxidation were found to be the best markers in predicting life expectancy of PBD patients. Combination of both parameters gives an even better prediction. These results contribute to the actual management of PBD patients.

71. Bone metabolism markers in patients with classical galactosemia

M. RUBIO-GOZALBO^{1,4}, J. BAKKER^{2,4}, C. VERMEER³, L. SPAAPEN⁴, P. FORGET¹
Department of Pediatrics¹, Department of Clinical Chemistry², University Hospital Maastricht, Biochemistry³, University of Maastricht, Biochemical Genetics⁴, Stichting Klinische Genetica ZON, Maastricht, The Netherlands

Introduction: Bone mineral density in prepuberal galactosemics has been found decreased.

Aim: To gain insight in the bone metabolism in this group of patients.

Methods: Measurement of mineral homeostasis, bone formation/resorption markers in 10 prepuberal galactosemics under dietary treatment.

Results: Serum concentrations of calcium, phosphate, vitamin D metabolites and parathormone, were within laboratory reference values. No significant differences were found between galactosemics and 19 controls for bone alkaline phosphatase, uncarboxylated osteocalcin and carboxylated osteocalcin. Type I collagen aminotelopeptide (NTX) levels in blood were significantly lower ($p < 0.001$) than in controls (48.3 ± 11.8 and 83.4 ± 30.9 nmol/l respectively). By multiple regression

analysis using NTX as dependent variable and diagnosis and age as independent variables, the NTX values were found to be solely dependent on the diagnosis and independent of age. Urine pyridinoline (PYD) and total deoxypyridinoline (DPD) were not significantly different from the controls.

Conclusions: There is no clear explanation for the decreased bone mineral density. Although NTX was lower than in controls, a decreased bone resorption seems unlikely because other measured bone resorption parameters PYD and DPD were normal. Possibly there is a defect in bone collagen galactosylation in galactosemics. The lower levels of NTX in these patients might be the result of a different *in vivo* catabolism of the abnormal collagen leading to fragments with a distinct immunologic reactivity, which is not recognized with the ELISA test used.

72. Alexander disease: molecular diagnosis

G.S. SALOMONS, S.J.M. van DOOREN, D. BUNEA, M. BRENNER, M.S. van der KNAAP, C. JAKOBS
Departments of Clinical Chemistry¹ and Paediatrics², VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Alexander disease is an autosomal dominant disease that is characterized by leukoencephalopathy with macrocephaly. Until last year the diagnosis was usually set by the non-invasive *in vivo* MRI of brain. The demonstration of Rosenthal fibers, cytoplasmic inclusions in the astrocytes that contain glial fibrillary acidic protein (GFAP) in brain biopsies could confirm the diagnosis. Last year, heterozygous *de novo* mutations in the *GFAP* gene (MIM 137780/203450) were identified in patients with Alexander disease. Here we report our experience with molecular diagnosis of Alexander disease. **Methods:** Seven unrelated patients were studied by DNA sequence analysis in which the diagnosis was set by MRI (MSvdK).

Results: We identified in all patients in the *GFAP* gene a heterozygous mutation, including 4 novel* ones L235*, R239P*, R239C (3 patients), K279E*, E374G*. All mutations are missense mutations that comprise highly conserved amino acids. The mutations could not be identified in any of the parents, indicating that the mutations are *de novo*. However, the mutation might be present in part of the germcells of one of the parents (germinal mosaicism).

Conclusion: molecular analysis can confirm the diagnosis of this autosomal dominant disease by the presence of heterozygous *de novo* mutation. For prenatal diagnosis it is very important to unravel the pathogenic mutation in the index patient, since germinal mosaicism cannot be excluded.

Categorie 3 Bedrijfsvoering Dienstverlening

73. Evaluatie van een anemieprotocol voor eerste en tweede lijn

H.M. DIJSTELBLOEM, F.F. FERNHOUT, R.J. KRAAIJENHAGEN
Laboratorium Klinische Chemie, Meander Medisch Centrum, Amersfoort

Introductie: Anemie is een laboratoriumdiagnose bij uitstek. In ons laboratorium hebben wij daarom een protocol ontwikkeld waarmee de achterliggende oorzaak van een anemie snel en efficiënt kan worden vastgesteld, zowel voor huisarts als specialist.

Methode: Nadat het bestaan van een anemie is bevestigd, worden volgens protocol MCV, BSE en ZPP bepaald. Afhankelijk van deze uitslagen wordt nader onderzoek ingezet naar ijzerstatus, hemolyse, erythropoëse dan wel vitamine B12- / foliumzuurstatus.

Resultaten: In 10 maanden tijd werd ons anemieprotocol bij 2532 patiënten aangevraagd, waarvan 366 maal (14%) door specialisten in huis (52% klinisch, 48% poliklinisch). Bij 1319 patiënten (52%) werd een anemie vastgesteld. De meest voorkomende oorzaken voor anemie waren ijzergebrek (24%) en chronische ziekte (15%). Anemie passend bij vitamine B12-en/of foliumzuurgebrek kwam slechts bij 2% van de patiënten voor. Andere oorzaken voor anemie waren onder andere

thalassemie, hemolyse, nierinsufficiëntie, hyperthyreoïdie en combinaties van verschillende oorzaken. Bij 27% van de patiënten werd een marginaal laag Hb gezien zonder duidelijke afwijkingen, terwijl bij 14% de oorzaak van de anemie niet kon worden vastgesteld.

Conclusie: Het vaststellen van de achterliggende oorzaak van een anemie kan door het laboratorium efficiënt worden uitgevoerd door het hanteren van een analyseprotocol. Een dergelijk protocol voorkomt onnodige diagnostiek bij patiënten zonder anemie, alsmede ondoelmatige diagnostiek bij patiënten met een duidelijke microcytaire of macrocytaire anemie. Omdat het laboratorium zelf reflextesten genereert, wordt de doorlooptijd van de aanvraag bekort en de patiënt minder belast. Een anemie-analyseprotocol is daarmee kosteneffectief voor het laboratorium en draagt bij aan diagnostische en therapeutische besluitvorming, zowel in de huisartsenpraktijk als in de kliniek.

74. Continu klanttevredenheidsonderzoek op de poliklinische bloedafname

R. DRAGT, M. SLINGSCHRÖDER, J. RONDEEL, K. MIEDEMA
Klinisch-chemisch laboratorium, Isala klinieken, Zwolle

Inleiding: Ziekenhuislaboratoria ontwikkelen zich tot klantgerichte organisaties, waarbij het meten van de tevredenheid van de patiënten kan worden gebruikt als input voor beleidswijzigingen. Om te weten hoe de patiënt de service op de poliklinische bloedafname ervaart is echter meer nodig dan een algemene folder. Onderzocht is of een continu klanttevredenheidsonderzoek mogelijk is op de bloedafname.

Methoden: Een aangepaste folder "Heeft u opmerkingen.... laat het ons weten", met een 12-tal vragen, is ontwikkeld in samenwerking met de afdeling Communicatie. Deze wordt elke dag, op beide locaties van de Isala klinieken, bij 2 patiënten uitgezet op momenten welke door de beide LISsen van het KCL *at random* worden bepaald. Hierbij wordt de patiënt, na beëindiging van de bloedafnameprocedure gevraagd of hij/zij mee wil werken en de enquête wil invullen en inleveren.

Resultaten: Sinds de invoering van het systeem op 1 oktober 2002 wordt een responsescore van

- >90% bereikt waarbij als opmerkelijkste resultaten kunnen worden genoemd:
- >80% van de patiënten is door de arts geïnformeerd over de reden van de bloedafname
- 70% van de patiënten zegt onvoldoende te zijn geïnstrueerd hoe nabloeden kan worden voorkomen
- 25% van de patiënten is niet bekend met de wijze waarop hij/zij zal worden geïnformeerd over de uitslagen.

Daarnaast geeft 15-20% van de patiënten aan te lang te moeten wachten, wat aanleiding is om de bezetting op de bloedafname aan te passen. De algemene waardering verschilde niet per locatie. **Conclusie:** Het is mogelijk een continu monitoringssysteem op te zetten betreffende klanttevredenheid op de poliklinische bloedafname. Frequente terugrapportage naar de medewerkers van die afdeling werkt sterk motiverend en vergroot de betrokkenheid bij de logistieke organisatie van die afdeling.

75. Interactie eerstelijnsgezondheidszorg (huisarts) regio Hoogeveen en klinisch-chemisch laboratorium

J.S. KAMPHUIS¹, S. BERENDS¹, J. VELTMAN², R.K.J. HOORN³

Ziekenhuis Bethesda¹, klinisch-chemisch laboratorium, Hoogeveen, Huisartsgroep², Hoogeveen, Diaconessenhuis³, klinisch-chemisch laboratorium, Meppel

Inleiding: Aangezien het klinisch-chemisch laboratorium een belangrijke rol inneemt bij het tot stand komen van een juiste diagnose van o.a. de huisartspatiënt is een goede relatie met de eerstelijnsgezondheidszorg essentieel. Om het contact en de interactie met de huisartsen in onze regio zo optimaal mogelijk te houden wordt hen op verschillende manieren service geboden.

Methode: Jaarlijks wordt met een vertegenwoordiger van alle huisartsengroepen (HAGRO's) het probleemgericht aanvraagformulier besproken. Jaarlijks vindt er met elke HAGRO een overleg plaats waarin aan de hand van de aantallen aanvragen en het aanvraagpatroon het aanvraagbeleid van de individuele huisarts besproken wordt. Vragen die in deze overleggen naar voren komen worden integraal terug gekoppeld naar elke HAGRO. Periodieke rondzending van analysemateriaal vindt

plaats voor de kwaliteitscontrole van testen uitgevoerd binnen de HAGRO.

Resultaten: Een gericht aanvraagbeleid door de huisarts o.a. door intercollegiale sturing met als gevolg minder onnodige (dure) bepalingen. Een aanvraagformulier afgestemd op de hedendaagse diagnostiek en wensen van de huisarts. Continue kwaliteitscontrole van de lokale bepalingen uitgevoerd in de HAGRO, waaronder Hb en glucose.

Conclusie: Een interactief contact met een tevreden huisarts. Het zijn van een voor de eerstelijnsgezondheidszorg kwalitatief hoogwaardig laboratorium (en ziekenhuis) waar de huisarts zijn patiënt voor goede diagnostiek naar verwijst. Continuering van gerichte diagnostiek en goede kwaliteit van de in de HAGRO uitgevoerde bepalingen. Laagdrempelige contacten tussen huisarts en klinisch-chemisch laboratorium.

76. Doorbellen van uitslagen: criteria in verschillende ziekenhuizen

H.J.L.M. ULENKATE¹, C.A.J.M. van DONGEN², W.P. OOSTERHUIS², M. van der HORST³, J. DOLS⁴, M. VOLMER⁵, R.W. WULKAN⁶

RdGG Delft¹, EZ Tilburg², SZ Emmen³, AMC Amsterdam⁴, AZG Groningen⁵, MCR Rotterdam⁶.

Allen zijn leden van de NVKC werkgroep Klinische Chemometrie. Met dank aan: F. ten Bokkel Huinink¹ en W. van Beers¹

Introductie: Naast de elektronische en papieren rapportage bel len laboratoria vaak extreme uitslagen door. Deze dienstverlening vergt een grote tijdsinspanning en verloopt niet altijd optimaal, wat aanleiding was in Delft om de doorbelgrenzen te herzien. Binnen de werkgroep zijn de grenzen geïnventariseerd.

Methode: Frequentiecurven van de bepalingen zijn gemaakt. Daarna zijn in overleg met aanvragers de doorbelgrenzen aangepast, gedifferentieerd naar herkomst en leeftijd. Uitgangspunt was: "doorbelgrens=actiegrens".

Resultaten: In Delft daalde het aantal door te bellen uitslagen van ± 42 naar ± 14 per dag (60%) Grootste daling was bij het Hb: 6 naar 4,5 mmol/l \rightarrow ± 22 naar ± 3 per dag (inclusief bekende Hb's) Op het citostation wordt vanuit MIPS elke 10 minuten een doorbellijst geprint. Binnen de ziekenhuizen van de leden van de werkgroep Klinische Chemometrie bleken er grote verschillen te zijn in de criteria voor het doorbellen.

Conclusie: De doorbelgrenzen zijn extremer in de grotere dan in de kleinere ziekenhuizen. Het aantal speelt hierbij een rol. Het hanteren van de definitie doorbelgrens is actiegrens en het alléén doorbellen van onbekende uitslagen levert een reductie op van het aantal door te bellen uitslagen en is daardoor een verademing voor het laboratorium. In kleinere ziekenhuizen vallen cito's vaak ook onder door te bellen uitslagen, ongeacht de uitslagwaarde. Dit doorbellen van cito's kan bovendien afhankelijk zijn van de rapportage in het ziekenhuis. Als het aantal cito's groot is, is dit een groter probleem dan het doorbellen van extreme uitslagen. Differentiatie van doorbelgrenzen naar leeftijd en herkomst eist automatisch hulp van het LIMS bij het detecteren van over- en onderschreidingen van de grenzen. Het verdient aanbeveling dat de aanvrager zelf bekend en bereikbaar is, zodat deze persoonlijk gebeld kan worden.

77. CF-diagnostiek in het perifere ziekenhuis

J. van der STAPPEN¹, Y. van AARSSSEN¹, C. KLAASSEN¹, P. GERRITS²

Klinisch-chemisch laboratorium¹ en Kindergeneeskunde², Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen

Introductie: Het uitsluiten van cystic fibrose is bij een verdenking op zeer jonge leeftijd geen sinecure. De meeste laboratoria zullen trachten met een zweetproef en/of pancreaselastase in feces de kinderartsen te ondersteunen. De zweetproef is op deze leeftijd echter weinig sensitief.

In het CWZ hebben we 2 jaar terug met deze werkwijze gebroken en zijn we het probleem moleculair-biologisch gaan benaderen. Een belangrijk argument hiervoor was het gegeven dat de onrust die het vermoeden cystic fibrose bij ouders van pasgeborenen teweegbrengt niet te lang mag aanhouden omdat daarmee de relatie met de behandelaar onder druk kan komen te staan.

Methode: Onze werkwijze behelst een snel onderzoek naar de $\Delta F508$ -mutatie waarbij vaak dezelfde dag nog het resultaat van deze analyse gerapporteerd kan worden. Bij een negatieve of heterozygote $\Delta F508$ wordt contact opgenomen met de aan-

vrager om onderzoek naar minder voorkomende mutaties direct dan wel op geleide van aanvullend onderzoek later uit te voeren. Indien de verdenking nog steeds op de voorgrond staat zal in eerste instantie met een 12-mutatie Linear array (Innolipa) naar minder vaak voorkomende afwijkingen worden gezocht. Levert ook dat niets op dan zal het volledige ACMG-panel (33 mutaties) van Roche worden ingezet. Het volledige onderzoek wordt vrijwel altijd binnen een week afgerond. In het uiterst zeldzame geval dat wij geen uitsluitsel kunnen bieden zal een volledige sequentieanalyse worden aanbevolen waarvoor 2 KGC's in Nederland zijn toegerust.

Conclusies: Onze, vooral op service gerichte, moleculaire benadering heeft geresulteerd in een zeer goede relatie met de aanvragende (kinder)artsen en beperkt zich allang niet meer tot ons eigen ziekenhuis.

Point of Care Testing

78. Point-of-Care Activated-Clot-Time Analysers Comparison

R. SLINGERLAND¹, H. de GRAAF², A. de VRIES¹, K. MIEDEMA¹

Department of Clinical Chemistry and Haematology¹; Department of Perfusion², Isala klinieken, Zwolle, The Netherlands

Introduction: In this prospective study we tested 4 different Point-of-Care (POC) Activated-Clotting-Time (celite) analysers.

Methods: In 31 patients (24 males and 7 females), at 7 time-points during coronary artery bypass grafting, measurements were performed. The results were compared to the Coatest (LMW) Heparin determination.

Results: The following correlations were detected between heparin (anti Xa activity) and ACT: $y=0.0058x - 0.42$, $r^2=0.74$, Hemochron 400/401 (rotating magnetic rod); $y=0.0081x - 0.62$, $r^2=0.84$, i-STAT Portable Clinical Analyser (electrochemical detection); $y=0.0069x - 0.58$, $r^2=0.83$, Hemostasis Management System plus (rotating magnetic rod); $y=0.0061x - 0.43$, $r^2=0.73$, Hemochron Response (update of the current 400/401 system).

The various ACT analysers were also compared with each other. The i-STAT, the HMSplus and the Hemochron Response all correlated well with the hemochron 400/401 ($y=0.72+$

27.27 , $r^2=0.81$; $y=0.80+ 43.79$, $r^2=0.79$; $y=0.90+23.39$, $r^2=0.92$, respectively). The HMSplus and the i-STAT correlated very well with each other ($y=1.13x + 7.71$, $r^2=0.92$).

The results obtained with the HMSplus and the i-STAT were most reproducible over the 7 time-points as determined by the absolute variance of the duplo-measurement over the 7 time-points. In general, the ACT-results can deviate considerably between the tested systems (>300 seconds) for a certain time-point per patient. Reference ranges should be different between these POC-ACT analysers. **Conclusion:** The activated clotting time of the HMSplus and the i-STAT showed the best correlation with the heparin-concentration measurement. Both POC-ACT analysers showed better reproducible results compared to the "gold standard" hemochron 400/401. HMSplus and the i-STAT showed excellent correlation with each other.

79. Zelfcontrole op andere plaatsen

R. DOLLAHMOERSID, W. MULLER, E. OOMS, K. MIEDEMA

Klinisch-chemisch laboratorium, Isala klinieken, locatie Weezenlanden, Zwolle

Inleiding: Bloedglucosezelfcontrole is een geaccepteerd en essentieel onderdeel van een succesvolle behandeling van diabetes mellitus. Echter, een toenemende druk vanuit de fabrikant wordt waargenomen om i.p.v. de vingerprik een meting op andere plaatsen op het lichaam, zoals arm, buik en dijbeen, uit te voeren. Omdat diverse onderzoeken hebben uitgewezen dat de bloedglucosewaarden op andere prikplaatsen niet gelijk zijn aan die uit de vinger, is onderzocht of op de hand andere prikplaatsen beschikbaar zijn.

Methoden: Gedurende één maand is bij een 50-tal opeenvolgende patiënten op de diabetespoli een bloedglucosewaarde bepaald in capillair volbloed uit de vinger (BGM én referentiemethode) en uit de muis van de duim en de zijkant van de hand. Bovendien is patiënten gevraagd naar de gevoelde pijnsensatie en is de bloedflow genoteerd.

Resultaten: Er is geen significant verschil geconstateerd tussen de bloedglucosewaarden verkregen van de 3 verschillende prikplaatsen. De verkregen glucoseresultaten ($x \pm 2$ SD) zijn: vinger $8,89 \pm 8,14$ mmol/l, muis $9,12 \pm 8,12$ mmol/l en zijkant $9,16 \pm 8,10$ mmol/l. Wel werd er een zeer verschillende pijnsensatie gerapporteerd, waarbij de vingerprik als minst pijnlijk werd ervaren. Ook de bloedflow bij de vingerprik is superieur t.o.v. de andere prikplaatsen.

Conclusie: Zelfcontrole op andere plaatsen kan niet zonder meer worden toegepast, terwijl het prikken op andere plaatsen van de hand teneinde de vinger te ontzien wel dezelfde resultaten oplevert, maar in ogen van de patiënt pijnlijker is. Bovendien is de bloedflow niet gegarandeerd. De vingerprik blijft derhalve de aanbevolen prikplaats.

80. Ervaringen met AccuChek Inform glucose-POCT in het OLVG

B.A. de BOER, J. van LEEUWEN, E.H.SLAATS

Hematologisch Klinisch Chemisch Laboratorium, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam

Introductie: Sinds 2000 worden in het OLVG decentrale glucoseanalyses uitgevoerd als resultaat van een kwaliteitsproject "Glucosebepaling bij intensieve behandeling van patiënten met diabetes mellitus" van de afdeling Interne Geneeskunde en het laboratorium.

Methoden: De dagelijkse POCT-activiteiten worden gecoördineerd door één van de 4 analisten van het POCT-team van het laboratorium. Instructie aan verpleegkundigen wordt in kleine groepjes gegeven, waarbij aan de hand van een bekwaamheidsformulier met name op het belang van identificatie van patiënt en operator, bloedafname, dagelijkse kwaliteitscontrole en beperkingen POCT-glucosemeetsysteem wordt ingegaan. De POCT-glucosebepaling wordt sinds april 2002 uitgevoerd op AccuChek Inform[®] (ACI, Roche)-glucosemeters, die via het ethernet gekoppeld zijn aan DataCare POC[®]-datamanagementsoftware (Roche), waarin naast de metingen, de glucosemeters, de QC en de operators (verpleegkundigen) beheerd worden. Met POCT-link wordt het DataCare POC[®] HL-7 be-

richt geschikt gemaakt voor verwerking door het LIS van het OLVG (Hiscom).

Resultaten: 14 verpleegafdelingen hebben één of meer ACI's en inmiddels zijn meer dan 490 verpleegkundigen gecertificeerd. Per week worden gemiddeld 1000 metingen verricht, waarbij de patiënt en de operator middels een barcode worden geïdentificeerd. De gemiddelde variatiecoëfficiënt voor de ACI's is 8,7 % bij 3,0 mmol/l en 5,6 % bij 17,0 mmol/l over de laatste 3 maanden. Het POCT-team besteedt wekelijks minder dan 6 uur aan werkzaamheden, waarbij instructie de meeste tijd in beslag neemt. Het systeem wordt met veel enthousiasme door de verpleegkundigen begroet. Zij waarderen de kwaliteitsborging en begeleiding van het laboratorium.

Conclusie: Met behulp van DataCare POC[®] als beheerssysteem en een goede instructie van verpleegkundigen werd een goede kwaliteitsborging van het POCT-glucosesysteem door het laboratorium gerealiseerd.

Kwaliteit/automatisering

81. Samenvatting voorafgaand aan de cumulatieve validatierapportage

C.H.H. SCHOENMAKERS, J.M. JANSEN, W.C.T.M. DONKERS, P.M.P. VIJFEIJKEN, J.L.P. van DUIJNHOFEN
Algemeen Klinisch Laboratorium, Elkerliek ziekenhuis, Helmond

Inleiding: Het doel van de ontwikkelde functionaliteit is sneller de validatierapportage kunnen beoordelen. De patiënten die niet door het validatie-expertsysteem VALAB gevalideerd worden komen in het Labosys-validatierapport. Dit wordt in cumulatieve vorm uitgeprint en daarna beoordeeld.

Methoden: Uit het validatierapport wordt een samenvatting ge-

maakt met daarin alleen de testcodes met een validatievlag uit VALAB of Labosys. Deze samenvatting wordt twee keer afgedrukt voorafgaand aan het validatierapport: een keer in dezelfde volgorde als het cumulatieve validatierapport en een keer gesorteerd op testcode.

Resultaat:

| validatielijst gesorteerd op aanvrager: | | | | datum tijd: 07-01-2002 | | | | |
|---|-------------|------------|----------|------------------------|-----------|----------|------------|------------------|
| aanvr. | pat. nr | naam | lab. nr. | testcode | resultaat | val.vlag | vorig res. | datum vorig res. |
| 1A | 10101012345 | test Lab 1 | 151010 | Glucose | 13,3 | H | | |
| 2B | 10101012347 | test Lab 3 | 151012 | Reuze trombo | aanwezig | A | | |
| 2C | 10101012348 | test Lab 4 | 151013 | Totaal eiwit | 62 | DN | 79 | 30-7-01 |

| validatielijst gesorteerd op testcode: | | | | datum tijd: 07-01-2002 | | | | |
|--|--------|-------------|------------|------------------------|-----------|----------|------------|------------------|
| testcode | aanvr. | pat.nr | naam | lab.nr. | resultaat | val.vlag | vorig res. | datum vorig res. |
| Albumine | 2C | 10101045678 | test Lab 5 | 151010 | 21,6 | L | | |
| Albumine | 1A | 10101045612 | test Lab 6 | 151012 | <8,0 | DNp | 10,1 | 07-8-01 |
| Bili totaal | 3D | 10101012589 | test Lab 7 | 151013 | 15 | S | 6 | 11-8-01 |

Conclusie: Door de combinatie van de validatiesamenvatting en het cumulatieve validatierapport is de benodigde tijd voor het beoordelen van de validatierapportage sterk verkort. Voorheen werd veel tijd besteed aan het zoeken naar de oorzaak van het verschijnen in de cumulatieve rapportage. Door de sa-

menvatting en het cumulatieve rapport naast elkaar te leggen ontstaat een combinatie van snelheid en totaaloverzicht. De samenvatting gesorteerd op testcode biedt snel inzicht bij het vermoeden op het bestaan van een trend bij een individuele test.

82. Valideren in de praktijk: resultaten enquête klinisch-chemische laboratoria

W.P. OOSTERHUIS¹, L. BERTENS¹, H.J.L.M. ULENKATE², C.A.J.M. van DONGEN¹, M. van der HORST³, J. DOLS⁴, M. VOLMER⁵, R.W. WULKAN⁶
EZ Tilburg¹, RdGG Delft², SZ Emmen³, AMC Amsterdam⁴, AZG Groningen⁵, MCR Rotterdam⁶. Behalve L. Bertens zijn allen leden van de NVKC werkgroep Klinische Chemometrie

Introductie: In het laboratoriumproces wordt op verschillende niveaus kwaliteitscontrole uitgevoerd. In de eerste plaats een technisch georiënteerde controle, bijvoorbeeld met behulp van controlemonsters en voortschrijdend patiëntengemiddelde. In de tweede plaats een klinisch georiënteerde controle, waarbij de resultaten in onderlinge context beoordeeld worden. Terwijl vroeger alle resultaten separaat door de laboratoriumleiding werden beoordeeld, is dit door het toegenomen volume nauwelijks meer uitvoerbaar. De werkgroep wilde de huidige praktijk van de kwaliteitscontrole in beeld brengen.

Methode: Een enquête onder de leden van de NVKC.

Resultaten: Ruim 50 laboratoria gaven een respons. Aangezien het laboratoriumautomatiseringssysteem mede bepalend is in de mogelijkheden van kwaliteitscontrole, is hiernaar gevraagd. Bijna 50% heeft Labosys. Interne controles worden meestal door de analist of analist-vakspecialist beoordeeld, veel minder vaak door de hoofdanalist of klinisch chemicus. Ongeveer

60% maakt gebruik van een Levy-Jenningsplot, minder vaak van een voortschrijdend patiëntengemiddelde: 19% (chemie) en 53% (hematologie). Westgard-regels worden in $\pm 60\%$ van de laboratoria toegepast. Automatische validatieregels voor de klinische validatie worden toegepast op basis van: extreemwaarden (60%), deltacheck (32%) en referentiewaarden (19%) Het programma Valab wordt bij 17% van de respondenten toegepast, terwijl twee laboratoria het programma Labrespond gebruiken. In 57% van de laboratoria is een klinisch chemicus/laboratoriumarts bij de validatie betrokken, terwijl in slechts drie laboratoria geen klinische validatie plaatsvindt. Vaak worden ongeautoriseerde uitslagen doorgegeven: cito's (66%), kliniek (47%), polikliniek (28%), huisartsen (6%).

Conclusie: Binnen de laboratoria bestaan veel verschillen wat betreft technische en klinische validatie. De gegevens van deze studie kunnen bijdragen om hierbij tot een uniform beleid te komen.

83. Automated processing of serum indices

N. de JONGE, H.J. VERMEER, E. THOMASSEN

Department of Clinical Chemistry, Leyenburg Hospital, The Hague, The Netherlands

Introduction: Interference by haemolysis, lipemia and bilirubinemia with assays for clinical analytes is a common problem in laboratory medicine. Results may be falsely lowered or elevated or completely flawed due to these indices. In our laboratory, a significant interference occurs approximately 1 in every 100 results. Multichannel chemistry analysers are able to detect and report serum indices. However, notifying a possible interfering serum index still required manual processing of sample and data. Thus far the evaluation of serum indices and its follow up (correction of result, addition of comments, repetition of analysis) was a laborious manual task, prone to errors and omissions.

Methods: Within the framework of the laboratory information system (LIS), we developed an algorithm for the automated processing of serum indices. We programmed procedures for each applicable analyte, with the analytical test result, and test

results for the relevant serum indices as inputs. Output of the procedures are the reportable test result, which may be automatically corrected, commented, or discontinued with notification of the issuing healthcare provider. Results are flagged according to the authorisation system, which is in great part done automatically within the LIS.

Results and Conclusions: The procedures can easily be adopted as knowledge about interference by serum indices develops. The algorithm can easily be translated to any programming language and adopted to other chemistry analysers. Quality has been improved substantially due to the implementation of the automatic processing of serum indices. Every individual test result is now evaluated automatically in real-time, and correct measures are taken if a result is flagged due to an interfering serum index. The algorithm is transparent and an audit trail is generated automatically for every result.

43a. Recurrent acute hemolytic transfusion reactions by anti-Dombrock (a) antibodies, not detected by crossmatching

R. BAUMGARTEN¹, W. van GELDER², R. DINKELAAR², J. van DRUNEN³, R. STRAAT³, E. BECKERS³

Department of Clinical Chemistry & Hematology, Atrium Medical Center, Heerlen¹, Department of Clinical Chemistry & Hematology, Albert Schweitzer Hospital, Dordrecht² and Sanquin Bloodbank Region SouthWest-Rotterdam³, The Netherlands

Introduction: After transfusion of Red Blood Cell (RBC)-units unexplained serious events only rarely occur. We describe a patient in which recurrent haemolytic transfusion reactions remained unexplained despite extensive pre- and posttransfusion work-up. Finally, a plausible cause could be identified.

Case: A 81-year old male was admitted for treatment of bleeding oesophageal varices. Pretransfusion screening identified anti-E and anti-Fy(b) alloantibodies. Administration of two compatible units was uncomplicated. On day 14 a second transfusion was ordered. Pretransfusion screening revealed a third alloantibody (anti-S). Upon infusion of the second selected RBC-unit, the patient developed the classic clinical symptoms of an acute haemolytic transfusion reaction, confirmed by concomitant biochemical changes (rise in serum bilirubin from 5 to 148 µmol/l, LDH from 227 to 825 U/l, undetectable haptoglobin levels and hemoglobinuria). No rise in haemoglobin levels occurred upon transfusion. Extensive posttransfusion testing did not result in identification of an

immunohematological cause. Five months later two similar episodes occurred, again after negative crossmatching with Liss/ Coombs, BSA-IAT and PEG-IAT. Posttransfusion blood samples were tested in the International Blood Group Reference Laboratory in Bristol, U.K. Serological testing revealed an anti-Dombrock (a) antibody. The patient was found to be Do (a-b+).

Conclusion: It is most likely that the described recurrent acute haemolytic transfusion reactions were caused by alloanti-Dombrock (a). These antibodies, which are notoriously weakly reactive in vitro, were not identified during posttransfusion work-up, because commercially available cell panels do not allow for their identification. Selection of Do(a)-negative units by crossmatching failed, indicating that serological methods were not reliable in this case. Recently developed molecular techniques are currently tested for patient identification and donor selection.