

Posterabstracts

Samenvattingen van de posterpresentaties tijdens het 58e Congres van de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde op 21 en 22 april 2005 te Lunteren

Categorie 1 Analytisch

Fotometrie, elektrochemie, sensortechnologie

1. Evaluatie van de Roche Urisys1800 urinestriplezer

M.H.M. THELEN¹, A.A.M. DIETZENBACHER¹, P.H.M. DUURLING¹, W. BECHEL²
Klinisch Chemisch Laboratorium¹, St-Annaziekenhuis Geldrop, Roche Instrument Center², Rotkreuz, Zwitserland

Inleiding: De Urisys 1800 is een nieuwe urinestrip-analyser van Roche die gebruik maakt van de Combur 10 strips en die dient ter opvolging van de Mditron-M. We hebben als participant van een multi-centerevaluatie de analytische kwaliteiten onderzocht en bekeken in hoeverre de beoogde verbetering ook in de praktijk tot zijn recht komen.

Methode: Met diverse controlematerialen is van alle parameters op de Combur 10 strip precisie en kalibratiestabiliteit onderzocht. Door de resultaten van routine monsters bepaald met de Urisys1800 te vergelijken met resultaten bepaald op de Mditron en Urisys1100 is de correlatie met de voorganger en met de back-up analyser onderzocht. Andere deelnemers aan de multicenterstudie hebben de Urisys1800 vergeleken met de Urisys2400, Bayer Clintec500, flowcytometrie en sedimentmicroscopie.

Resultaat: De imprecisie voor zowel controlematerialen als

verse urines was nooit meer dan 5%. In de correlatie met de Mditron-M en Urisys 1100 was meer dan 99% van de meetmunten maximaal 1 uitslagcategorie verschillend van de referentie. Andere centra in de multi-centerevaluatie vonden eveneens een goede correlatie met o.a. microscopie en flowcytometrie. Mede dankzij de touchscreen en intuïtieve menustructuur is de Urisys1800 en verbetering ten opzichte van de Mditron-M. De hostkoppeling is sterk verbeterd. De kalibratiestabiliteit van alle bepalingen was minstens 4 weken.

Conclusie: In onze handen is de Urisys 1800 een goede en robuuste urinestriplezer. Dankzij een goede correlatie met Mditron-M is een overstap soepel en door de goede correlatie met de Urisys1100 is er een eenvoudige back-up mogelijkheid. De verbeteringen in de software leiden tot een gemakkelijk en kort implementatietraject.

2. Method Comparison of Vitros 5,1 FS vs. Vitros 950 and BN ProSpec

W. de KIEVIET, C.A. van KAMPEN, J.C.M. de GROOT, S.J. van GELDORP, D. KEMMING, J. ROOSEN, E. ten BOEKEL
Clinical Laboratory, Sint Lucas Andreas Hospital, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: The Vitros 5,1 FS from Ortho Clinical Diagnostics integrates the multilayer film technology (MicroSlide) and the conventional technology (MicroTip) onto the same platform. To evaluate the performance of the Vitros 5,1 FS analyser, the precision, the linearity of the tests and the comparison of the methods with the Vitros 950 and the Dade Behring BN ProSpec has been investigated.

Methods: Control material from Ortho Clinical Diagnostics and from BioRad were used to calculate the precision within run and from day to day. Linearity testing were done with patient serum samples or with control material. Patient serum samples were analysed on the day of venipuncture or the succeeding day by the Vitros 5,1 FS, the Vitros 950 and the BN ProSpec. The calibration of all methods was performed according to the manufacturer recommendations.

Results: Precision within run showed CV's from 0.4% (Sodium) to 4.1% (ALAT). Precision from day to day showed CV's from 0.5% (Sodium) to 9.9% (Bicarbonate 9.8mmol/l). The regression analysis of the comparison of the methods showed correlations from 0.8957 (Complement C4 measured on Vitros 5,1 FS and Dade Behring BN ProSpec) and 0.9997 (ALAT measured on Vitros 5,1 FS and Vitros 950). Some specific protein tests show differences in calibration.

Conclusion: We obtained good precision results for the Vitros 5,1 FS. The linearity study showed a linear relationship in the concentration range of interest. The preliminary results of the method comparison studies showed a good correlation between the different methods. More results have to be obtained for a definitive conclusion.

3. Hb-Geldrop-St.-Anna, [β 94FG1 (Asp-Tyr)]. Een nieuwe Hb-variant ontdekt bij HbA1c-analyse van een diabetische patiënt

M.H.M. THELEN¹, C.L. HARTEVELD², J.J.A. RUTTEN³, J.G. LEUVERMAN¹, N. AKKERMANS², P. van DELFT², S. ARKESTEIJN², P.C. GIORDANO²

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, St. Annaziekenhuis, Geldrop, Hemoglobinoopathie Laboratorium², Afdeling Humane en Klinische Genetica, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden, Huisarts³, Nuenen

Inleiding: Bij de HPLC-analyse van het HbA1-gehalte van een 56 jaar oude vrouwelijke kaukasische diabetespatiënt hebben wij een nog niet eerder beschreven hemoglobinevariant ontdekt. De aard van de variant is genetisch en fysiologisch in kaart gebracht, waarna de naam Hb-Geldrop St-Anna is toegekend.

Methode: Bij de indexpatiënt en 8 bloedverwanten is hemocytometrie, alkalische en zure Hb-elektroforese uitgevoerd. Bovendien is bij de indexpatiënt door middel van een p50-meting de ligging van de zuurstofdissociatiecurve onderzocht. Door middel van direct sequencing is de aard van de mutatie verder in kaart gebracht.

Resultaat: Familieonderzoek bracht bij 4 van de 8 onderzochte

bloedverwanten dezelfde afwijking aan het licht. Draggers zijn niet anemisch, maar hebben juist een verhoogd erytrocytenaantal, mogelijk ter compensatie van een enigszins linksverschoven zuurstofdissociatiecurve. Geen van de dragers voelt enige beperking bij inspanning. De afwijking in het hemoglobine blijkt een gevolg van een GAC-TAC-transversie in heterozygote vorm op codon 94 van het beta-globinegen.

Conclusie: Op basis van de hemocytometrische en de verhoogde p50 waarde, concluderen we dat Hb-Geldrop-St.-Anna een stabiele Hb-variant met licht verhoogde zuurstofaffiniteit is. Dit past bij het beeld dat eerder beschreven mutaties van hetzelfde codon laten zien.

4. Vergelijking van drie INR-meters voor de thuis-monitoring

R.F.M. OUDE ELFERINK, G. BARLA, M.E.A.W. BEST
LabNoord, Damster Domus, Groningen

Inleiding: Het doel van dit onderzoek is de gebruiksvriendelijkheid en de vergelijkbaarheid van drie INR-meters voor de thuis-monitoring van de coumarinetherapie met de laboratorium bepaling van de INR te toetsen: CoaguChek (Roche), INRatio (Hemosense) en ProTime (IL).

Methode: 60 patiënten voerden met de eigen meter (CoaguChek) een duplo meting uit. Veneus bloed werd afgenomen voor de controle met laboratoriummethode (Tromborel-S, BCS; Dade Behring). Uit een nieuwe vingerprik werden door een laboratoriummedewerker de drie meters getest.

Resultaat: De eigen meter gaf een berekende SD gelijk aan 0.18. Een significant verschil tussen twee metingen is dan 0,5 INR-eenheden. De meting met de ProTime blijkt het meest omslachtig en heeft het meeste monster nodig. Verder was er in 10 % van de gevallen geen resultaat tengevolge van te weinig monster. De CoaguChek heeft een los kwaliteitscontrole monster, terwijl de andere meters een controle op twee niveaus

op iedere strip hebben. Bij de vergelijking van de INR-waarden blijkt de CoaguChek niet significant afwijkend, de INRatio significant hoger en de ProTime significant lager te meten (Tabel 1). De correlatiecoëfficiënt is voor alle meters gelijk n.l. $r = 0,9$. De INRatio heeft een niet lineaire relatie en de ProTime heeft een constante bias van -0.623.

Conclusie: Twee metingen mogen niet meer dan 0.5 INR-eenheden afwijken. De INRatio is het gebruiksvriendelijkste apparaat. De kwaliteit van iedere meting is gewaarborgd door de controle op twee niveaus. De ProTime is complex en zal in de thuissituatie tot problemen leiden. Alleen de CoaguChek gaf vergelijkbare uitslagen als de laboratoriumbepaling. De leveranciers van de twee andere meters kunnen gezien de vergelijkbare correlaties, door het bijstellen van gebruikte algoritmen, alsnog vergelijkbare resultaten produceren als met de klassieke laboratoriumbepaling.

5. An automated method for measuring paraoxonase activity on the Beckman CX4 analyser

H.A.M. VOORBIJ, F. AZOUAGH, M. LANSINK, M. ROEST

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

Introduction: Paraoxonase is a serum esterase (EC 3.1.8.1) that hydrolyses aromatic carboxylic acid esters and organophosphate insecticides (paraoxon) and nerve gases. In the circulation it is present on High Density Lipoproteins (HDL) and participates in the prevention of atherosclerosis by hydrolysing lipid peroxides. Paraoxonase activity can be measured using paraoxon as substrate. Because paraoxon is a rather toxic substrate, we developed an assay on the Beckman CX4 analyser. It is our aim to obtain a high throughput analysis, which is automated, save, accurate and feasible for routine clinical chemistry laboratories.

Methods: The Beckman CX4 was used to develop an automated method for the analysis of paraoxonase activity in

serum. The reproducibility of the new method was evaluated, while the validity of the measurement was analyzed by comparing the paraoxonase activities in forty serum samples with results obtained from conventional paraoxonase activity measurements.

Results: At the optimal parameter settings, the mean within-run and between-run CV was 2.7% and 3.7 % respectively. There was a good correlation with a conventional non-automated method ($r = 0.994$).

Conclusion: The method on the Beckman CX4 showed to be save, accurate and feasible for routine clinical chemistry laboratories.

6. Visual inspection versus spectrophotometry in detecting bilirubin in cerebrospinal fluid

F.H.H. LINN¹, G.J.E. RINKEL¹, A. ALGRA², J. van GIJN¹, H.A.M. VOORBIJ²

Department of Neurology¹, Julius Center for Clinical Sciences and Primary Care², Department of Clinical Chemistry³, University Medical Center Utrecht, the Netherlands

Introduction: If CT scanning is normal in patients suspected of subarachnoid haemorrhage (SAH), lumbar puncture is performed to detect blood pigments in the cerebrospinal fluid (CSF). Bilirubin gives the CSF a yellow colour, and can be found in patients with SAH in the first two weeks after rupture. Spectrophotometry is the gold standard for investigating the CSF, but in practice visual inspection is often used instead. We compared the diagnostic properties of visual inspection and spectrophotometry, in experienced and in inexperienced observers.

Methods: Clinicians and students assessed cerebrospinal fluid (CSF) specimens with seven degrees of extinction between 0.00 and 0.09 at 450-460 nm as 'yellow', 'doubtful' or 'colourless' after random presentation under standard conditions. The assessments were compared with spectrophotometry in that we

assumed 0.05 as the cut-off level for the presence of bilirubin. Results were compared between the two groups and explored by means of Receiver Operating Characteristics (ROC) curves.

Results: All 51 clinicians and 50 of 51 students scored the tubes with extinction of 0.06 or higher as 'yellow' or 'doubtful'. Tubes without any bilirubin were scored as 'yellow' only by three of the students. The ROC curves confirmed that the diagnostic properties of the visual inspection versus the spectrophotometry were slightly better for the clinicians than for the students.

Conclusion: If CSF is considered colourless, the extinction of bilirubin is too low to be compatible with a diagnosis of recent SAH. But if CSF is not considered colourless, spectrophotometry should be performed to determine the level of extinction of bilirubin.

7. Direct sampling from primary barcode labeled pediatric tubes on Vitros chemistry analysers

A.Y. DEMIR, W.W. van SOLINGE, H. KEMPERMAN

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

Introduction: In our laboratory we receive each day approximately 200 pediatric samples for chemistry tests. To evaluate the ability of our Vitros 950 and 250 chemistry analysers to handle and directly sample from primary barcode-labeled pediatric tubes we have used pediatric tubes that were prefixed in a tube extender before sampling.

Methods: For this study 500 µl Capiject Li-heparin pediatric gel tubes (Terumo) prefixed in Microtainer tube extenders (BD) were used. Since the inner diameter of the pediatric tubes is smaller compared to our routine 5 ml Li-heparin tubes, the speed of lowering the sample probe during sampling had to be different. This problem was solved by giving pediatric tubes an electronic flag based on the sample ID which is unique for pediatric samples.

Results: Since 2000 all capillary pediatric samples for chemistry tests were collected in pediatric tubes prefixed in tube

extenders. Due to the tube extenders the outer dimensions of the tubes were comparable to our routine 5 ml tubes and could therefore be centrifuged using standard buckets. Problems with reading of the barcode, placed in the normal vertical way, were not seen. In 2002 the Vitros analysers were integrated into an enGen workcell (TCA) including an entry/exit module to which recently a decapper was added. Again, due to the uniform outer size of both the pediatric and standard tubes the pediatric tubes could be handled by the workcell, including the decapper, without any problems.

Conclusion: The Vitros chemistry analysers integrated in an enGen workcell are capable to handle and directly sample from primary barcode-labeled pediatric tubes. Turn around times were reduced and mistakes due to manual pipetting and sample transfer were eliminated.

8. Betrouwbaarheid van glucosemetingen in het lage concentratiebereik

B.A.C. van ACKER, J. LINDEMANS, B.G. BLIJENBERG

Afdeling Klinische Chemie, Erasmus MC, Rotterdam

Inleiding: Bij evaluatie van glucosemetingen op POCT-apparatuur en chemieanalyzers worden metingen over een groot concentratiegebied bestudeerd. Door het geringe aandeel van monsters met een lage glucoseconcentratie blijven de prestaties in het lage concentratiebereik vaak onderbelicht. Als gevolg daarvan kunnen afwijkingen in het lage gebied onopgemerkt blijven, terwijl juist daar een betrouwbare en snelle meting van glucose van eminent belang is teneinde een hypoglycemie te onderkennen (bv. bij neonatale hypoglycemie, tijdens vastenproeven of insulinetolerantietesten). Daarom hebben wij drie gangbare glucosebepalingen in volbloed vergeleken, waarbij het accent ligt op monsters met een glucoseconcentratie < 4 mmol/l.

Methode: In 142 volbloedmonsters is de glucoseconcentratie gemeten met ABL-725 (Radiometer), HemoCue (HemoCue Nederland B.V.) en Hitachi 917 (hemolysaatglucose, Roche). Bij de statistische bewerking (Passing en Bablok) zijn glucoseconcentraties < 4 mmol/l apart geanalyseerd.

Resultaat: Analyse van glucosemetingen met concentratie

4-20 mmol/l (n=76) leverde de volgende vergelijkingen op: $GLUC-HemoCue = 1,10 * GLUC-Hitachi + 0,3$ en $GLUC-ABL = 1,04 * GLUC-Hitachi + 1,1$. Afwijkende vergelijkingen werden gevonden voor glucoseconcentraties 0,5-4 mmol/l (n=66): $GLUC-HemoCue = 1,00 * GLUC-Hitachi + 1,0$ en $GLUC-ABL = 1,15 * GLUC-Hitachi + 0,1$. De resultaten in het concentratiebereik 0,5-4 mmol/l vertoonden een grote spreiding. Het hematocrietgehalte had geen invloed op de bevindingen. De precisie, gemeten op vier niveaus (1-10 mmol/l), varieerde van 0,8-8,5%.

Conclusie: De resultaten van dit preliminaire onderzoek tonen aan dat uiterste voorzichtigheid moet worden betracht waar het gaat om de uitwisselbaarheid van geaccepteerde glucosebepalingen in volbloed in het lage concentratiebereik. Bij afwezigheid van een referentiemethode voor glucosemeting in volbloed is niet uit te maken welke methode de voorkeur heeft. Mogelijk is het verschil niet aanwezig bij plasmametingen, maar de noodzaak tot centrifugeren daarbij staat een zeer snelle analyse van glucose in de weg.

Hemocytometrie, flowcytometrie, hemostase

9. Evaluatie van de SYSMEX UF100 Urine Analyzer

R.F.M. OUDE ELFERINK, G.J. de JONG
Lab Noord, Martini Ziekenhuis, Groningen

Inleiding: Het doel van dit onderzoek is het urineonderzoek te concentreren op één locatie en het naar een hoger niveau te tillen door kwantitatieve flowcytometrie m.b.v. de SYSMEX UF-100.

Methode: 144 urinemonsters werden 3 achtereenvolgende dagen onderzocht. Conserveermiddelen: Stabilur tabletten en BD-buizen met conserveermiddel. De SYSMEX UF-100 is een urineanalyzer, die flowcytometrisch leukocyten, erythrocyten, epitheelcellen, cilinders en bacteriën kwantitatief detecteert; gevlagd wordt er voor gisten, spermacellen, kristallen, cilinders en tubulus epitheel.

Resultaat: Leukocyten, erythrocyten en epitheelcellen in met Stabilur geconserveerde urines laten met de UF-100 geen significante verschillen zien tussen dag 1, 2 en 3. Bij erythrocytenmeting blijkt dat de waarden op dag 2 en 3 gemiddeld 20% lager zijn. Ook is de spreiding in het lage gebied groot ($r=0,61$). Het aantal cilinders neemt toe met 50% resp. 100% van dag 1

naar dag 2 en dag 3. Ook het aantal bacteriën neemt toe. Bepaling van de leukocyten in urine geconserveerd in BD-buizen levert een slecht resultaat: er vindt een afname in de tijd plaats. Het aantal erythrocyten in BD-buizen neemt op dag 2 toe, op dag 3 is de toename verdwenen. Bepaling van de epitheelcellen laat in BD-buizen significante verschillen zien: toename met 50% resp. 100% van dag 1 naar dag 2 en 3. Het aantal bacteriën verschilt tussen dagen 1, 2 en 3 significant.

Conclusie: BD-buizen kunnen niet gebruikt worden voor het conserveren van urine voor de meting op de UF100. Urines geconserveerd met Stabilur kunnen m.b.t. leucocyten, erythrocyten en epitheelcellen nog 48 uur na inleveren met de UF-100 worden geanalyseerd. De toename van cilinderparameter wordt mogelijk door urinekristallen veroorzaakt. Dit verschijnsel vereist nog nader onderzoek. Bij beide conserveermiddelen wordt bacteriegroei niet volledig geremd: lichte toename na 24 uur.

10. Differentiële beoordeling van bloeduitstrijken met behulp van de Cellavision™ Diffmaster Octavia en de Cellavision™ DM96

H. CEELIE, R.B. DINKELAAR, W. van GELDER

Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium (GKCL) Albert Schweitzer Ziekenhuis en RIVAS Zorggroep Locatie Dordwijk, Dordrecht

Inleiding: Morfologische beoordeling van bloeduitstrijken is een belangrijk diagnosticum, maar kent een lage statistische betrouwbaarheid, vereist bijzondere kennis en is arbeidsintensief. Nieuwe ontwikkelingen op het gebied van geautomatiseerde microscopische beoordeling kunnen een bijdrage leveren aan de verbetering van de kwaliteit en effectiviteit. Twee geautomatiseerde systemen voor microscopische beoordeling: de Cellavision™ Diffmaster Octavia en de Cellavision™ DM96, werden getest.

Methode: Uit het routineaanbod werden 'random' 200 bloeduitstrijken geselecteerd. Elk preparaat werd door 2 analisten uit een gespecialiseerde groep beoordeeld, door classificatie van 200 leukocyten en beoordeling van het erythrocytenbeeld. Hierna werden alle preparaten geanalyseerd op de Diffmaster Octavia en DM96. Beide apparaten leveren een preclassificatie van de bloeduitstrijk met beoordeling van zowel cellen uit de rode als witte reeks (400 cellen). De resultaten werden daarna door een analist waar nodig aangepast en geautoriseerd.

Bovendien werden aspecten als gebruiksgemak, precisie en analysetijd geëvalueerd.

Resultaat: Classificatie van de vijf belangrijkste categorieën leukocyten (monocyten, lymfocyten, neutrofielen, basofielen en eosinofielen) werd door de Diffmaster Octavia en de DM96 bij 89,7 %, respectievelijk 95,1% juist gedaan. Voor de totale populatie cellen was dit 87% respectievelijk 92%. Vergelijking met de resultaten van de handtelling en tussen beide handtellingen onderling zullen worden gepresenteerd. Differentiatie van 400 cellen (inclusief beoordeling erythrocyten) duurde op de Diffmaster Octavia 13,6 minuten/preparaat en op de DM96 3,9 minuten. Het gebruiksgemak van de DM96 was superieur aan dat van de Diffmaster Octavia.

Conclusie: Beide systemen halen een hoge mate van nauwkeurigheid. De DM96 presteert t.o.v. de Diffmaster Octavia op alle gebieden beter en is zeer geschikt voor de (pre)classificatie van leukocyten. De nauwkeurigheid hangt wel af van de aard van de pathologie in de aangeboden preparaten.

11. Neutrophil Responses to Endotoxin Exposure

W. van der MEER¹, C.S. SCOTT², J. KLEIN GUNNEWIEK¹, R.P. PICKKERS³

Department of Clinical Chemistry¹, Radboud University, Nijmegen Medical Center, Abbott Diagnostics² Wiesbaden-Delkenheim, Germany, Department of Intensive Care³, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

Introduction: A central feature of immunity is the recruitment and activation of neutrophils. Activated neutrophils show elevated levels of membrane receptors, such as CD64 (FcγRI), and morphological changes including vacuolation and/or toxic granulation. Additionally, in activated states immature granulocytes may be seen as a result of cytokine stimulation. In this study we investigated the early cellular responses during experimental human exposure to endotoxin.

Methods: This study was ethically approved and informed consent was obtained. 10 healthy volunteers received a single dose intravenous injection of 2 ng/kg E. coli O:113 endotoxin. At subsequent times (1, 2, 4, 6, 12 and 22 hours) blood was

taken for measurements of neutrophil CD64 (nCD64), plasma CRP (turbidimetry), full blood count (FBC, Sysmex XE2100) and microscopic leukocyte differential. nCD64 expression was determined by immunofluorescence with the Abbott CD4000.

Results: Mean nCD64 expression increased within 2 hours from a pre-endotoxin baseline of 109 to 124 arbitrary fluorescent units (AFU). A further increase to 154 AFU was seen after 6 hours and was sustained to 22 hours. CRP increased after 6 hours to 10 mg/L and reached 43 mg/L at 22 hours. The WBC count decreased after 1 hour from $7.2 \times 10^9/L$ to $2.12 \times 10^9/L$, but increased after 2 hours to $5.02 \times 10^9/L$. A similar trend was noted for the immature granulocyte (IG) count.

Band cells were seen after 2 hours, but no toxic changes were observed microscopically during the 22-hour study period.

Conclusion: The first signs of response to endotoxin were

increased band cells and nCD64 expression. As band cell counting is controversial, nCD64 might be a more objective marker for assessing bacterial infections.

12. Flowcytometrische analyse van foetaal hemoglobine

H.J. ADRIAANSEN¹, I. STEEGSTRA¹, A.E.M. WITHAG², A.J.M. HUISJES², K.M. PAARLBERG², J.D.E. van SUIJLEN¹
Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹, Afdeling Gynaecologie en Verloskunde², Gelre Ziekenhuizen, Apeldoorn

Inleiding: Voor het aantonen en kwantificeren van foeto-mater-nale transfusie wordt de Kleihauer-Betke test gebruikt. Deze test is bewerkelijk en de microscopische beoordeling en kwantificering wordt in het algemeen als lastig ervaren. Flowcytometrisch is het mogelijk om HbF-cellen te analyseren. Wij evalueerden de zogenaamde Fetal Cell Count Kit II (IQ-Products, Groningen). Omdat analyse van HbF-cellen ook in het weekeinde kan worden aangevraagd, werd de bepaling geoptimaliseerd, zodat iedere analist de bepaling op de flowcytometer kan uitvoeren.

Methode: Fetal Cell Count Kit II bevat twee monoklonale antistoffen: anti-HbF en anti-carbonanhydrase (anti-CA). De erythrocyten worden vooraf gewassen en gepermeabiliseerd. Onderzocht werden: pre-analytische condities (afname- en bewaarcondities bloed), optimale procedure wat betreft labeling en instelling van de flowcytometer (FACS-Calibur, Becton Dickinson), nauwkeurigheid (verduunningsproeven) en duplicerbaarheid. Tenslotte werd de methode vergeleken met de Kleihauer-Betke test (Immucor).

Resultaat: Flowcytometrische analyse resulteert in duidelijke discrete populaties erythrocyten. Kwantificering is prima mogelijk. Bloed tot 48 uur bij kamertemperatuur bewaard geeft nog goede resultaten. Gelabelde cellen dienen snel te worden gemeten. Ook lage aantallen HbF-cellen (<0,1%) zijn nauwkeurig te kwantificeren. Reproduceerbaarheid is goed. Correlatie met de Kleihauer-Betke (uitgevoerd door een ervaren analist) is goed. Zowel de labelingsprocedure als de meting en analyse op de flowcytometer bleken na optimalisering uitvoerbaar door analisten zonder specifieke ervaring met flowcytometrie.

Conclusie: Flowcytometrische analyse van HbF-cellen middels de Fetal Cell Count Kit II is een prima alternatief voor de Kleihauer-Betke test. Kwantificering ook van lage aantallen foetale erythrocyten is goed mogelijk. De labeling met anti-CA maakt het mogelijk onderscheid te maken tussen foetale HbF-cellen en HbF-cellen van de moeder. Met een strict protocol kan de bepaling ook in het weekend door analisten zonder specifieke flowcytometrie-ervaring worden gedaan.

13. Evaluatie van twee nieuwe functionele bepalingen van de Von Willebrand factor

D. TELTING, J.J.M.L. HOFFMANN

Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina-ziekenhuis, Eindhoven

Inleiding: De diagnostiek van de ziekte van Von Willebrand berust hoofdzakelijk op de bepaling van het Von Willebrand factor antigeen (VWF:Ag) en de ristocetine cofactor activiteit (VWF:RCo). Deze laatste bepaling is technisch lastig en heeft een grote analytische variatie. Recent zijn er alternatieve methoden ter beschikking gekomen. Doel: het evalueren van twee nieuwe bepalingen; een 2-staps collageen bindings Elisa (VWF:CB, Technoclone) en een latex immunoassay met een specifieke monoclonale antistof tegen de bindingsplaats voor glycoproteïne Ib in VWF (HemosIL VWF:act, Instrumentation Laboratory).

Methode: Wij onderzochten 48 plasmamonsters van gezonde personen en patiënten met type 1 ziekte van Von Willebrand. Naast de twee genoemde bepalingen werden VWF:Ag (STA LIA test, Roche) en VWF:RCo (met een aggregometer) geme-

ten als referentie. De binnenrun en totale imprecisie werd gemeten en wij gebruikten voor de methodevergelijking regressieanalyse volgens Passing & Bablok.

Resultaat: In de VWF-CB bepaling was de binnenrun imprecisie (variatioëfficiënt) 4-9% en de totale imprecisie 8-14%. Voor de VWF:act bepaling bedroegen deze 11%, respectievelijk 10-12%. De correlatie van beide nieuwe bepalingen met de VWF:RCo was goed, die met de VWF:Ag bepaling zeer goed.

Conclusie: Beide nieuwe bepalingen hebben goede analytische eigenschappen, zeker in vergelijking met de klassieke aggregatiemethode voor VWF:RCo. Beiden vormen een goed alternatief voor deze functionele VWF bepaling. De bruikbaarheid voor type 2 Von Willebrand dient nog nader onderzocht te worden.

14. Sysmex celteller XE-2100 en leukocyten in CAPD-vloeistof

A. de VRIES, R.J. SLINGERLAND

Klinisch Chemisch Laboratorium, Isala Klinieken, Zwolle, Nederland

Inleiding: Vloeistof afkomstig van continue ambulante peritoneaal dialyse (CAPD) wordt regelmatig onderzocht op de aanwezigheid van leukocyten als maat voor een mogelijke ontsteking/infectie. Doel van dit onderzoek was om de arbeidsintensieve handtelling van leukocyten in CAPD-vloeistof te vervangen door telling verricht met de hematologische celteller XE2100.

Methode: In CAPD-vloeistoffen afkomstig van 100 patienten zijn leukocyten bepaald met de XE2100 hematologie-analyser (Sysmex/Goffin Meyvis, Etten-Leur) in de manuele mode in het WBC/Dif-kanaal. De lage pH (3,4) van de vloeistof in het WBC/BASO-meetkanaal in combinatie met CAPD-vloeistof kan een vals verlaagde leukocyten-getal opleveren door agglutinatie van leukocyten. Microscopisch tellingen volgens de methode van Bürker zijn alleen uitgevoerd indien het leukocytengetal meer dan $0,5 \times 10^9/l$ bedroeg. Via lineaire regressie volgens Passing-Bablok zijn de resultaten met elkaar vergeleken.

Resultaat: De intra-assay-variatie van de leukocyten telling in CAPD-vloeistof gemeten in het WBC/Dif kanaal van de XE-2100 bedroeg 2,2%-3,2%. De lineaire regressie lijn voor de WBC-DIF-kanaal leukocyten telling versus de microscopische telling was $y = 1,23x + 0,012$ en de correlatiecoëfficiënt = 0,98.

Conclusie: De leukocyten telling van het WBC/DIF-kanaal correleert goed met de microscopische telling. De leukocyten concentraties gemeten met de XE2100 zijn gemiddeld iets hoger dan de microscopische telling. Voor het diagnostische doel van de meting, het aantonen van en ontsteking/infectie, is dit niet relevant. De machinale telling op de XE2100 is bovendien beter reproduceerbaar, beter standaardiseerbaar en minder arbeidsintensief is (30 seconden versus 10 minuten m.n. voor CAPD-vloeistoffen met een lage concentratie leukocyten in de buurt van de $0,5 \times 10^9/l$).

15. Analytische evaluatie van het Protime INR-zelfmeetsysteem

J. van de VEN¹, M. RUBENS², M.A. de HAAN², M. DOBBE³, T. WARDENAAR³, P.C.M. BARTELS¹
Laboratorium voor Klinische Chemie, Hematologie en Immunologie¹, Medisch Centrum Alkmaar, Klinisch Chemisch Laboratorium², Rode Kruis Ziekenhuis, Beverwijk, Stichting Artsenlaboratorium en Trombosedienst³, Alkmaar

Inleiding: POCT meters worden ingezet voor INR zelfcontrole en -dosering bij patiënten met orale anticoagulantie therapie. Bij de trombosediensten van Alkmaar en Beverwijk worden sinds 2003 Protime handmeters (Instrumentation Laboratory) uitgegeven aan een groep geselecteerde en speciaal geschoolde patiënten. Hierbij zijn uiteraard de analytische prestaties zoals precisie en juistheid van de handmeters van belang. Deze parameters werden door ons onderzocht.

Methode: Tijdens 'terugkomdagen' werd door patiënten driemaal een vingerprik uitgevoerd waarbij de INR in duplo werd gemeten op de eigen Protime van de patiënt en in enkelvoud op telkens dezelfde Protime van de trombosedienst. Ook werd uit veneus citraatplasma de INR bepaald op de ACL-3000 of ACL-9000 analyser (Instrumentation Laboratory). Daarnaast werd door trombosedienstmedewerksters INR-controlemateriaal (DirectCheck Whole Blood Control, ITCmed) in enkelvoud gemeten op de Protime van de patiënt en de Protime van de trombosedienst.

Resultaat: Vergelijking van de duplo Protime-resultaten met de INR gemeten op de ACL analysers middels lineaire regressie resulteerde in $y=0,66+0,68x$, $R=0,87$ ($n=110$). De variatiecoëfficiënt van de Protime resultaten berekend op basis van duplowaarden was 14% ($SD=0,44$, $n=111$). De variatiecoëfficiënt van controlemateriaal INR's gemeten op verschillende patiëntenmeters en een enkele trombosedienstmeter was resp. 10,9% ($n=39$) en 8,5% ($n=36$).

Conclusie: De overeenkomst tussen de Protime- en ACL-resultaten is matig; de Protime-meter geeft een structurele onderschatting oplopend tot meer dan 1,0 voor waarden boven 5 INR. De precisie laat te wensen over: duploverschillen tot 1,2 INR komen regelmatig voor. De vergelijkbare variatiecoëfficiënt van de patiëntenmeters als groep en de individuele meters impliceert dat variatie vooral voortkomt uit de meetmethode en niet zozeer uit verschillen tussen meters. Deze resultaten vragen om nadere evaluatie omtrent de bruikbaarheid van Protime als zelfmeetinstrument.

16. The course of the automated IG-count on the Sysmex XE-2100 hematology analyzer in septic shock patients

W. van der MEER¹, P. PICKKERS², J. KLEIN GUNNEWIEK¹
Department of Clinical Chemistry¹, Department of Intensive Care Medicine², Radboud University Nijmegen Medical Center, The Netherlands

Introduction: Septic shock is still a major cause of mortality and morbidity in the intensive care unit. Pro-inflammatory cytokines are postulated to play a major role in the pathogenesis of the syndrome. As a consequence of the release of these pro-inflammatory cytokines, immature granulocytes may appear in the peripheral blood stream. In this report, we evaluate the use of automated immature granulocyte count (IG-count) during the course of septic shock. The value of this IG-count is compared to microscopic evaluation and CRP concentration.

Methods: 17 Patients suffering from septic shock caused by pulmonary ($n=8$), intestinal ($n=5$) and urologic ($n=2$) infections or other reasons ($n=2$), were included. The severity of their illness was assessed using the APACHE II score. Immature granulocytes were automatically measured on the Sysmex XE-2100 at 5 time points during 7 days (1,2,3,5 and 7), using

special software developed by the manufacturer (IG-master). A blood film was made and stained according to the May-Grünwald Giemsa procedures.

Results: The mean APACHE II scores of the patients was 21.6 (14-37) and all patients received inotropic/vasopressor therapy. 7 out of 17 patients died. 9 Patients showed a decrease of CRP concentrations within 3 days, combined with an increase of the IG-count after three days. 7 Patients showed a decrease of the CRP within 3 days, combined with decrease of the IG-count. In 1 patient no clear trend was observed. No relationship between the IG-count and microscopic differentiation could be observed.

Conclusion: IG-count increases late in septic shock patients and demonstrate no correlation with microscopic differentiation. This indicates that the role of IG-count is limited in this selected group of critically ill patients.

Categorie 1 Analytisch

Immunoassay, (bloedgroepen-)serologie

17. Verbeterde assay voor fecescalprotectine

G. van der SLUIJS VEER¹, B. van den HOVEN², M.G.V.M. RUSSEL², F.A.J.T.M. van den BERGH¹
Afdelingen Laboratorium¹ en Interne Geneeskunde² Medisch Spectrum Twente, Enschede

Inleiding: Calprotectine, een ontstekings-eiwit met antimicrobiële eigenschappen, bepalen wij t.b.v. diagnostiek en monitoring van chronische inflammatoire darmafwijkingen (IBD). Differentiatie tussen actieve ziekte en klachten t.g.v. fibrotische, niet-actieve ziekte vormt een berucht probleem. Calprotectine is bruikbaar vanwege de hoge discriminerende waarde tussen M.Crohn en IBS, maar met name ook voor onderscheid tussen actieve en niet-actieve IBD en monitoring van het ontstekingsproces [1]. Een eigen ELISA-methode werd ontwikkeld voor de verwerking van de sterk toegenomen aantallen samples.

Methode: Een time-resolved fluoroimmunoassay op de Delia® is opgezet en vergeleken met de tot nu toe gehanteerde commerciële verkrijgbare immunoassay (Calprest, Eurospital SpA, Triest, Italië). Via een eerste, gecoate antistof wordt calprotectine geïmmobiliseerd en vervolgens gedetecteerd met een tweede, europium-gelabelde antistof. Als standaard wordt een uit granulocyten geïsoleerd extractieproduct gebruikt, afgeijkt op de standaard uit de commerciële kit. Tevens werd de extractiemethode qua samenstelling geoptimaliseerd.

Resultaat: De extractiebuffer werd geoptimaliseerd door toevoeging van ureum, $CaCl_2$ en citraat. Mede door optimale keuze van de verdunning, werd de lineariteit vergroot. Hierdoor kan het aantal metingen in meerdere verdunningen worden gereduceerd tot 10% van onze metingen. De reproduceerbaarheid is vergelijkbaar met de bestaande methode. Ook de correlatie is uitstekend. Intestinaal bloedverlies blijkt te resulteren in wisselend verhoogde calprotectine waarden, wat niet kan worden toegeschreven aan de bloedbimenging als zodanig. Ontsteking lijkt hierbij een rol te spelen.

Conclusie: De verbeterde extractiemethode leidt tot hogere recovery van de fecescalprotectine. De eigen ontwikkelde assay is aanzienlijk goedkoper en vertoont een betere lineariteit dan de bestaande commerciële methode. Naar de oorzaak van de door intestinale bloeding geïnduceerde calprotectineverhoging wordt momenteel gezocht.

Literatuur: Van den Bergh et al. Ned Tijdschr Geneesk 2003; 147: 2360-5

18. Effects of processing and storage conditions on CSF Amyloid- β (1-42) and Tau concentrations: implications for use in clinical practice

N.S.M. SCHOONENBOOM^{1,2,*}, C. MULDER^{2,*}, H. VANDERSTICHELE³, E.J. van ELK², A. KOK², G.J. van KAMP², Ph. SCHELTENS¹, M.A. BLANKENSTEIN^{2*}, EQUAL CONTRIBUTION
Alzheimer Center and Department of Neurology¹, and Department of Clinical Chemistry², VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; Innogenetics NV³, Ghent, Belgium

Introduction: Reported concentrations of amyloid- β (1-42) (A β 42) and tau in cerebrospinal fluid (CSF) differ among reports. We investigated the effects of storage temperature, repeated freeze/thaw cycles, and centrifugation on the concentrations of A β 42 and tau in CSF.

Methods: Stability of samples stored at -80°C was determined by use of an accelerated stability testing protocol according to the Arrhenius equation. A β 42 and tau concentrations were measured in CSF samples stored at 4, 18, 37, and -80°C. Relative CSF concentrations (%) of the biomarkers after one freeze/thaw cycle were compared with two, three, four, five, and six freeze/thaw cycles. In addition, relative A β 42 and tau

concentrations in samples not centrifuged were compared with samples centrifuged after 1, 4, 48 and 72 h.

Results: A β 42 and tau concentrations were stable in CSF when stored for a long period at -80°C. CSF A β 42 decreased with 20% during the first two days at 4, 18, and 37°C compared with -80°C. CSF tau decreased after storage for 12 days at 37°C. After three freeze/thaw cycles CSF A β 42 decreased 20%. CSF tau was stable during six freeze/thaw cycles. Centrifugation did not influence the biomarker concentrations.

Conclusion: Repeated freeze/thaw cycles and storage at 4, 18, and 37°C influence the quantitative result of the A β 42 test. Preferably, samples should be stored at -80°C immediately after collection.

19. A novel time resolved fluorometric assay of anoikis using Europium-labelled annexin V in cultured adherent cells

P. ENGBERS-BUIJTENHUIJS^{1,2}, M. KAMPHUIS¹, G. van der SLUIJS VEER¹, C. HAANEN¹, A.A. POOT², J. FEIJEN², I. VERMES^{1,2}

Department of Clinical Chemistry¹, Hospital Group Medisch Spectrum Twente, Faculty of Science and Technology, Polymer Chemistry and Biomaterials Group², University of Twente, Enschede, The Netherlands

Introduction: Adherent cells are dependent for survival from continuous engagement of cellular integrins to the extra cellular matrix. Detachment of adherent cells from the matrix induces almost immediately apoptosis, a phenomenon designated as 'anoikis' or homelessness (1). Anoikis is of pertinent relevance to tissue homeostasis. We developed a new very sensitive method to analyse anoikis in adherent cell cultures using the principles of the DELFIA assays (2).

Methods: A new and sensitive method to analyse apoptosis and anoikis of adherent cell types using a time resolved fluorometric DELFIA assay with Europium-labelled Annexin V was developed. Anoikis was induced with tumor necrosis factor- α /cycloheximide and three cell fractions of the cell cultures were prepared and analysed. Fraction 1 consisted of adherent cells, analysed while growing on their support (without detachment by trypsinisation). Fraction 2 contained detached cells

due to anoikis (floating cells) and fraction 3 contained apoptotic bodies. Both fractions 2 and 3 were present in the culture medium and were isolated by differential centrifugation.

Results: TNF- α treatment of three different types of adherent cell cultures induced a significant increase of the amount of floating cells (anoikis) and apoptotic bodies compared to control cell cultures. Also in the adherent cell fractions a small amount of apoptosis was observed.

Conclusion: The novel time resolved assay provides the ability to analyse the cell death cascade in adherent cell cultures of the same sample at the same time in a sensitive and reproducible way. According to our knowledge this is the first direct quantitative technique to measure anoikis in adherent cell cultures.

Literature: 1. Frisch et al. *J Cell Biol* 1994, 124: 619. 2. Hemmilä et al. *Anal Biochem* 1984, 137: 335.

20. External Quality Control of Cerebrospinal Fluid Markers for Alzheimer's Disease

M.A. BLANKENSTEIN¹, A. KOK¹, G.J. van KAMP¹, N.S. SCHOONENBOOM², Ph. SCHELTENS², K. BLENNOW³
Departments of Clinical Chemistry¹ and Neurology², VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands, Department of Clinical Neuroscience³, Sahlgrenska University Hospital, Mölndal, Sweden

Introduction: Amyloid β 1-42 (A β), Tau (tTau) and phosphorylated Tau-181 (pTau) are gradually being accepted as biomarkers for Alzheimer's disease (AD). Measurement of these proteins is typically performed in cerebrospinal fluid (CSF), in the absence of reliable methods for their detection in more accessible body fluids. Different marker levels are reported by different groups, pre-analytical factors have been investigated (1), but QC programmes are currently lacking. This investigation was performed to compare results of different laboratories and to establish the feasibility of an international QC scheme for AD markers.

Methods: CSF specimens with three different levels of the analytes were distributed to 15 laboratories worldwide involved in AD biomarker measurements, which agreed to participate. Laboratories were asked to report their assay results, information on the assay used and the condition in which the specimens arrived.

Results: Three months after dispatch of the specimens 11 laboratories reported their results. Five measured all three markers, six measured one or two analytes. Sometimes a lack of sample was reported. Coefficients of variation for A β were 20.3, 52.5 and 27.9% at mean levels of 511, 393 and 755 pg/ml respectively (n=9). For Ttau the CV's were 7.9, 28.6 and 15.4% at 878, 389 and 219 pg/ml respectively (n=7). For pTau at 107, 49 and 35 pg/ml the CV's were 12.1, 9.6 and 16.0% for 7 laboratories. One laboratory reported extremely differing results which were excluded from the present report.

Conclusion: Although CSF marker results differed considerably between laboratories, the preliminary results of this study are encouraging. It is concluded that establishment of an international quality assessment schedule for AD markers in CSF is feasible.

Literature: Schoonenboom et al: *Clin Chem* 2005 In Press

Chromatografie: HPLC, GC, CE

21. Automated on-line SPE HPLC measurement of 5-hydroxyindoleacetic acid in urine; method validation and application to the study of serotonin metabolism in autism

E.J. MULDER¹, A. DUINKERKEN-OOSTERLOO², G.M. ANDERSON³, E.G. de VRIES⁴, R.B. MINDERAA¹, I.P. KEMA²

Child and Adolescent Psychiatry¹, Department of Pathology and Laboratory Medicine², University Hospital Groningen, The Netherlands, Child Study Center³, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA, Department of Medical Oncology⁴, University Hospital Groningen, The Netherlands

Introduction: Quantification of 5-hydroxy-3-indoleacetic acid (5-HIAA) in urine is useful in diagnosing and notably follow-up of patients with carcinoid tumors and in the study of serotonin metabolism in a variety of disorders. We developed an automated method to measure urinary 5-HIAA and compare urinary 5-HIAA, urinary serotonin, and plasma tryptophan levels in groups of autistic patients with high and normal platelet serotonin.

Methods: Urine was prepurified by automated on-line solid-phase extraction (SPE) using Hysphere Resin SH SPE cartridges containing strong hydrophobic polystyrene resin. The analyte (5-HIAA) and internal standard (5-hydroxyindole carboxylic acid, 5-HICA) were eluted from the SPE cartridge and subsequent separation and detection were performed by reversed-phase HPLC combined with fluorometric detection in a total cycle time of 20 min. Urinary excretion of 5-HIAA and serotonin, and plasma tryptophan levels, were compared across groups of autistic patients with high (≥ 4.5 mmol/L,

N=10) and autistic patients with normal (< 4.5 mmol/L, N=10) platelet serotonin.

Results: Within-series and between-series CVs for 5-HIAA in urine ranged from 1.3-3.9% and 3.2-7.6%, respectively. The internal standard (5-HICA) and 5-HIAA measurement were recovered in high yield (79.0%-95.3%). Results obtained by the automated method were highly correlated ($r=0.988$) with those observed using an established ether-extraction method. Urinary excretion of 5-HIAA did not differ significantly between autistic patients with high and normal platelet serotonin. No significant correlations were observed between urinary 5-HIAA, urinary serotonin, plasma tryptophan and platelet serotonin.

Conclusion: The method described reduces analytical variation and the hands on time per analyses compared to the manual ether-extraction method. The results indicate that the platelet hyperserotonemia of autism is not due to increased production of serotonin.

22. Determination of glutamate and γ -aminobutyric acid in cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection

E.C. LASES^{1,2}, C. van den OEVER^{1,2}, N.A. van ZUIJLEN-FRIJNS¹, R.A.A. MAES², F.J.L.M. HAAS¹

Department of Clinical Chemistry¹, St. Antonius Hospital, Nieuwegein; Department of Biomedical Analysis², Utrecht University, The Netherlands

Introduction: Glutamate and γ -aminobutyric acid (GABA) are important neurotransmitters in the human central nervous system. The aim of this study was to develop and validate an analytical method for the determination of these amino acids in cerebrospinal fluid (CSF). Reported concentrations vary between 0.03 and 7 μ M.

Methods: The analytical technique was based upon a two-buffer high-performance liquid chromatographic procedure using fluorimetric detection of pre-column derivatized amino acids with o-phthalaldehyde. CSF samples were deproteinized with perchloric acid before analysis.

Results: The retention times of glutamate, GABA, and the internal standard norvaline were 5.1, 17.1, and 26.4 min respectively. The investigated amino acids were well separated from

other CSF constituents. One single analysis was completed within 45.0 min. The limit of detection proved to be 8 nM for glutamate and 4 nM for GABA. The calibration curve for glutamate was linear over the range of 0.022 – 9 μ M, while for GABA it was linear at 0.0125 – 9 μ M. The intra-day and inter-day relative standard deviations for both amino acids in CSF were less than 2.0% and 7.5%, respectively. Mean recovery was 102% for glutamate and 100% for GABA.

Conclusion: Our results show that the developed method for the determination of glutamate and GABA in CSF is sensitive, linear, and reproducible. Our method is thus appropriate for measurement of the expected CSF concentrations and reliable for (patho)physiological research and diagnostic procedures.

23. CDT analysis by capillary electrophoresis on SEBIA's Capillarys, first impressions

J.P.M. WIELDERS, R. te STROET

Department of Clinical Chemistry, Meander Medical Centre, Amersfoort, the Netherlands

Introduction: CDT (carbohydrate deficient transferrin) has proven to be a valuable biomarker for alcohol abuse and is used in primary and secondary medical care, in treatment of alcoholics and in driver license juridical procedures. The great number of methods and applications, each with its own characteristics and reference interval, makes a method standardization obligatory. Candidate reference methods are HPLC and CE (capillary electrophoresis). We tested a new CE method with emphasis on proficiency and robustness.

Methods: Intra and inter run precision profiles were determined for the %CDT CE kit from SEBIA (Brussels) run on their Capillarys capillary electrophoresis equipment. Samples used were anonymous leftovers from patient samples or sample poles. SEBIA %CDT results were compared with AXIS %CDT.

Results: SEBIA's Capillarys processes 7 samples at the same time within about 10 minutes. We found an inter run precision (CV) of 9 % at the upper level of normality and 4 % for pool of samples from alcoholics. Genetic variants like B1C, B2C and CD were easily recognized as will be shown. In a correlation study based on 100 samples with the AXIS method we found $\text{Capillarys \%CDT} = 1,33 \text{ AXIS \%CDT} - 2,0$ which is very similar to the results of an earlier correlation in our lab between the HPLC method versus the AXIS method.

Conclusion: Absence of manual pre-analytical treatment, high throughput and easy operation are favorable aspects of this CE method. Precision is within the desired range for clinical and juridical use in the Netherlands.

24. Glaasje op? De waarde van de CDT-bepaling via geautomatiseerde capillaire elektroforese

J.M. PEKELHARING, E. SANINA, J. de WINTER, H. BEKENES
Medische Laboratoria, Reinier de Graaf Groep, Delft

Inleiding: Onder invloed van alcohol wordt door de lever het eiwit transferrine minder compleet van koolhydraatketens voorzien. Dit blijkt uit een toename van het zgn. CDT (carbohydrate-deficient transferrin): met name de 0-sialo- en 2-sialo-fractionen (0+2-ST). Tot op heden wordt dit gekwantificeerd met behulp van de %CDT-bepaling van de firma Axis-Shield, waarbij CDT wordt gescheiden van de rest van het transferrine met een microkolommetje. Deze bepaling staat echter ter discussie vanwege de beperkte gevoeligheid, en het voorkomen van fout-positieven en fout-negatieven. Mogelijk wordt o.a. enig 3-sialotransferrine meegemeten. HPLC- en capillaire elektroforese (CE) scheidingstechnieken zouden beter scoren. **Methode:** Wij onderzochten de waarde van de geautomatiseerde Analis CE-scheidingsmethode, uitgevoerd op de Beckman MDQ. Serummonsters werden verkregen van gezonde, werkende personen met zelf-opgegeven alcohol-inname. Het

%-age 0-, 2-, 3- en 4-sialo-transferrine werd vastgesteld. Tevens werden monsters met bekende verhoogde %CDT-waarden met de CE geanalyseerd.

Resultaat: Reproduceerbaarheid van de %CDT (0+2-ST) bepaling: VC within-run 1,9%, between-run 3,4%. De referentiewaarde voor mannen is: <2,97%, vrouwen: <1,46%. Er is nauwelijks verschil tussen de groep zelfverklaarde geheelonthouders en de groep sociale drinkers. Er werd geen leeftijdsafhankelijkheid gevonden. De %CDT (0+2-ST) uitslag is (onder de 10 à 20 eenheden alcohol per week) onafhankelijk van de (zelfopgegeven) alcohol-inname. De %CDT (0+2-ST) relatie met Axis-Shield (AS) %CDT-methode is: $CE = 1,17(AS) - 1,85$ ($r^2 = 0,86$). Transferrine varianten worden duidelijk gedetecteerd.

Conclusie: Gesteld kan worden, dat de CDT-bepaling middels capillaire elektroforese een goed alternatief lijkt voor de bestaande methode, als primaire assay of als bevestigingstechniek.

Categorie 1 Analytisch

Vlamfotometrie, AAS, massaspectrometrie

25. Evaluation of the microheterogeneity of transthyretin reference standard materials by MALDI-TOF-MS

D. de BOER, M.M. ERPS, K.W.H. WODZIG, M.P. van DIEIJEN-VISSER
Department of Clinical Chemistry, University Hospital Maastricht, The Netherlands

Introduction: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) is able to detect proteins in complex mixtures in the presence of an excess of salts and buffer components. This study describes the microheterogeneity of transthyretin (TTR) by MALDI-TOF-MS. The relevance of this study is the need for methods that can distinguish TTR variants in the diagnosis of ovarian cancer [1] and amyloidosis [2] and evaluate TTR reference standard materials for quality assessment [3].

Methods: Reference TTR standard materials were measured by low resolution MALDI-TOF-MS analysis (PBS IIc analyzer, Cipergeren) on a gold chip ProteinChip® array (Cipergeren). Pure standards were analyzed directly without removing salts and buffer components, while standards, which were part of a mixture of proteins, were treated by centrifugal ultrafiltration to remove high mass proteins (Centricon® YM-50, Millipore). All standards were also measured after reduction with dithiothreitol to convert

modified TTR variants with a disulfide bridge into the native TTR variant. Assignment of the TTR variants to the peaks in the mass spectra was based on the measured m/z values after two point internal calibration. The overall mass accuracy was determined as the mean mass accuracy of 4 different spot measurements.

Results: The intra- and interassay overall mass accuracy was < 0,03%. Although the mass resolution was not sufficient to distinguish all TTR variants, significant differences were observed between the profiles of TTR variants of some reference standard materials.

Conclusion: MALDI-TOF-MS can provide in a simple way detailed analytical information about proteins. TTR reference standard materials have a heterogeneous composition, which may differ from material to material.

Literature: [1] Zhang et al. Cancer Research 2004;64:5882. [2] Clin Chem 2004;50:1544. [3] Clin Chem Lab Med 2001;39:1129.

26. A selective and fast method for the determination of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in plasma by stable-isotope dilution LC-ESI-MS/MS

H. GELLEKINK¹, D. van OPPENRAAIJ-EMMERZAAL¹, A. van ROOIJ¹, E. A. STRUYS³, M. den HEIJER², H. J. BLOM¹
Laboratory of Pediatrics and Neurology¹, Department of Endocrinology and Department of Epidemiology and Biostatistics², Radboud University Medical Center, Nijmegen, Metabolic Unit, Department of Clinical Chemistry³, VU University Medical Center Amsterdam, The Netherlands

Introduction: It has been postulated that changes in S-adenosylhomocysteine (AdoHcy), a potent inhibitor of transmethylation, provides a mechanism via which homocysteine causes its detrimental effects. We aimed to develop a rapid and sensitive method to measure AdoHcy and its precursor S-adenosylmethionine (AdoMet).

Methods: We used stable-isotope dilution electron spray injection liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) for the determination of AdoMet and AdoHcy in plasma. Acetic acid was added to prevent AdoMet degradation. Phenylboronic acid containing solid-phase extraction (SPE) columns were used to bind AdoMet, AdoHcy and their internal standards AdoMet-d5 and AdoHcy-d3 and for rapid sample cleanup. Separation and detection was achieved by using an HPLC C-18 column directly coupled to the LC-MS/MS.

Results: The method was linear over a range of 10-800nmol/L for AdoMet and 5-400 nmol/L for AdoHcy ($r > 0,999$). In

plasma samples, the inter assay CV for AdoMet and AdoHcy were 3.9% and 8.3%, respectively, and the intra assay CV were 4.2% and 6.7%, respectively. Mean recovery for AdoMet was 94.5% and 96.8% for AdoHcy. The detection limits were 5 and 3.0 nmol/L for AdoMet and AdoHcy, respectively (signal-to-noise ratio >5). AdoMet was found to be unstable but immediate acidification of the samples with acetic acid prevented AdoMet degradation. In a group of controls with a mean plasma total homocysteine concentration of 11.2 nmol/L, mean plasma AdoMet and AdoHcy were 94.5 nmol/L and 12.3 nmol/L, respectively.

Conclusion: Stable-isotope dilution LC-ESI-MS/MS allows a sensitive and rapid determination of AdoMet and AdoHcy. No metabolite derivatization is needed while the SPE columns enable a simple cleanup step. The instability of AdoMet is a serious problem and can be prevented by direct acidification of the samples.

27. MDR1 and CYP450 gene polymorphisms and 12 hr AUC pharmacokinetics of tacrolimus

R.A.M. op den BUIJSCH¹, O. BEKERS¹, M. CHRISTIAANS², L. STOLK³, S. CHEUNG², J. van HOOFF², M.P. van DIEIJEN-VISSER¹, J.E. de VRIES^{1,4}

Departments of Clinical Chemistry¹, Internal Medicine², Clinical Pharmacy³, Biochemical Genetics⁴, University Hospital Maastricht, The Netherlands

Introduction: There is a great inter- and inpatient variability in the oral pharmacokinetics of tacrolimus. Both polymorphisms of the P-glycoprotein system (MDR-1), regulating the uptake of tacrolimus, and of the Cytochrome P450 enzyme system (CYP3A4, CYP3A5), regulating the elimination of tacrolimus, may be of importance. CYP3A, but not MDR-1, influences the trough level (C₀), but there is no information on their relationship with AUC, C_{max} and T_{max}.

Methods: In 38 patients with a stable tacrolimus trough-level a 12 hour time-concentration profile of tacrolimus was performed. Genotypes were determined with the use of real-time PCR Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) assays on the LightCycler. The influence of polymorphisms of MDR-1 (C3435T), CYP3A4 (A-392G) and CYP3A5 (A6986G) on the dose-normalised (dn) AUC (ng·h/mL per mg/kg), C_{max} (ng/mL), T_{max} (h), and C₀ (ng/mL per mg/kg) was analysed by non-parametric statistics (Kruskal-Wallis).

Results: The allelic frequency distribution of the MDR-1 genotype is in agreement with literature, while the frequency of the CYP3A5 AG allele is high compared with the literature. Patients with the MDR-1 CC genotype had the lowest dnAUC and C_{max}, as would be predicted. The differences were not statistically significant with the number of patients included. Both CYP3A4 and CYP3A5 exhibited a significantly effect on the pharmacokinetics of tacrolimus. Because of the strong correlation between them we have combined the two CYP3A genotypes. Between the CYP3A genotypes there are clinically very important differences of more than two-fold in dnAUC and even more in dnC₀.

Conclusion: MDR-1 polymorphism has no significant relationship with the tested parameters. Polymorphisms of the CYP3A genes are related to differences in AUC but not in C_{max} or T_{max}.

28. Pyruvate kinase regulatory element 1 (PKR-RE1) mediates hexokinase gene expression in K562 cells

K.M.K. de VOOGHT¹, R. van WIJK¹, B.A. van OIRSCHOT¹, G. RIJKSEN², W.W. van SOLINGE¹

Department of Clinical Chemistry¹, Department of Hematology², University Medical Center, Utrecht, The Netherlands

Introduction: Recently, we established the functional importance of PKR-RE1, a transcriptional regulatory element in the erythroid-specific promoter of the human pyruvate kinase gene (PKLR). PKR-RE1 mediates the effects of factors necessary for regulation of pyruvate kinase expression during red cell differentiation and maturation. We hypothesized this element to be of functional importance in hexokinase (HK1) gene expression.

Methods: The core binding site of PKR-RE1 and DNA-protein interaction at the erythroid-specific promoter of HK1 were studied using Electrophoretic Mobility Shift Assay's (EMSA) with nuclear extracts from human K562 erythroleukemia cells. Functional studies were performed using transient transfection of HK promoter constructs in K562 cells.

Results: EMSA with wild type and mutant PK probes indicated that the core binding motif of PKR-RE1 involves the

CTGTC motif at nucleotides -85 to -81, relative to the translation initiation codon of PKLR. Evaluation of the erythroid-specific promoter of HK1 revealed the presence of a similar CTGTC binding motif. EMSA with wild type and mutant PK and HK promoter probes demonstrated that this CTGTC motif in both the PKLR and HK1 promoter mediates binding of the same protein. Subsequent in vitro transfection studies revealed that substitution of the guanine base of the CTGTC motif (-259G>C) led to strong down-regulation of the HK1 promoter, as demonstrated by an approximately 90% decrease of promoter strength in K562 cells.

Conclusion: In the present study we provide evidence that DNA-protein interaction at PKR-RE1 involves the CTGTC motif, and that this regulatory element also mediates HK1 gene expression in K562 cells. We postulate a more general role of PKR-RE1 in erythroid-specific gene expression.

29. Validation of the LightCycler-Apo E Mutation Detection Kit using Hybridization Probes for the genotyping of the Apolipoprotein E point mutations (C3932T) and (C4070T)

N.E. AJUBI, D. BOYMANS, A. WOLTHUIS

Stichting KCL, Department of Clinical Chemistry, Leeuwarden, The Netherlands

Introduction: Apolipoprotein E (Apo E) plays a major role in the metabolism of chylomicrons and very-low-density lipoprotein remnants. The gene for apo E is polymorphic, and this variation seems to be a major determinant of susceptibility to coronary artery disease. Conversely, a particular polymorphism in the apo E gene has been associated with an increased risk for Alzheimer's disease. The most common alleles encode for three major apo E isoforms: apo E4, apo E3, and apo E2. Traditionally, apo E genotyping has been performed using conventional PCR followed by enzymatic digestion of amplicons. This is a time consuming process, which sometimes yields unsatisfactory results. The purpose of this study was to evaluate the Roche Apo E genotyping kit using real-time PCR.

Methods: We evaluated the LightCycler apo E kit by comparing genotyping results from 20 DNA samples that were initially de-

termined using PCR followed by RFLP. DNA was isolated from whole blood using High Pure Template Kit (Roche). PCR-RFLP was performed as previously described. Fragments were separated on 4.0% agarose gel, and visualized using ethidium bromide. Real-time PCR analysis was done using the LightCycler Apo E Mutation detection kit followed by melting curve analysis.

Results: We genotyped 20 DNA samples and found all common allele combinations (E4/E4, E4/E3, E4/E2, E3/E3, E3/E2, and E2/E2). Comparison between PCR-RFLP and the LightCycler apo E genotyping method yielded complete concordant results.

Conclusion: LightCycler Apo E mutation detection kit is a robust method which yields results within 45 minutes run time. Conventional PCR-RFLP has an average assay time of 1.5 days, and often produces poor results. We feel that the LightCycler method is an attractive alternative for Apo E genotyping.

30. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) haplotype 5 predisposes to fibrotic sarcoidosis

A. KRUIT¹, J.C. GRUTTERS², J.M.M. van den BOSCH², H.J.T. RUVEN¹

Department of Clinical Chemistry¹, Department of Pulmonology², Heart Lung Centre Utrecht, St. Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands

Introduction: Sarcoidosis is a systemic disease of unknown cause and is characterized by the presence of noncaseating granulomas in one or multiple organs [1]. The formation of angiotensin II, a potent vasoconstrictor as well as a fibroblast growth factor, is thought to be modulated by a homologue of ACE, called ACE2 [2]. Theoretically, when ACE levels are elevated, as often seen with sarcoidosis, ACE2 could mitigate the profibrotic effects of Ang II formation. ACE2 may play an important role in the tapestry of events that lead to pulmonary fibrosis in a subset of sarcoidosis patients. We postulate that the predilection to develop fibrotic sarcoidosis is genetically determined.

Methods: Seven ACE2 single nucleotide polymorphisms (SNP) were investigated for association with either sarcoidosis susceptibility or fibrotic development in a group of Dutch sar-

coidosis patients. Male and female patients were analyzed separately, since the ACE2 gene is located on the X-chromosome. **Results:** No differences were found between healthy controls and sarcoidosis patients of either gender with respect to allele, genotype and haplotype distributions. Haplotype 5 carriage was higher in male patients with fibrosis (carrier frequency: 0.27) compared to males without fibrosis (0.03); $p = 0.01$; $pc = 0.08$, odds ratio (OR) = 11.4. Females showed a similar trend, albeit not significant: 0.12 vs. 0.03, $p = 0.37$, OR = 3.3. **Conclusion:** The combination of SNPs in haplotype 5 suggests that the genetics of ACE2 may predispose to developing fibrosis in male sarcoidosis patients.

Literature: 1. Newman, L.S. et al. Sarcoidosis. *N Engl J Med*, 1997. 336(17): 1224-34. 2. Donoghue, M. et al. *Circ Res*, 2000. 87(5): E1-9.

31. Toepassing van RhD-Multiplex-PCR bij discrepantie in de RhD-bepaling

R.J. KRAAIJENHAGEN, B. van der MEIJDEN, J. PRINS

Afdeling Klinische Chemie, Meander Medisch Centrum, Amersfoort

Inleiding: De genen die coderen voor het eiwit dat het rhesus(D)-bloedgroepsysteem uitmaakt zijn tegenwoordig goed bekend. Uit de bloedgroeps-serologie is bekend dat er verschillende rhesus(D)-subtypen zijn, aangeduid als rhesustype D-I tot D-VI. De RhD-antigenen met zwakke expressie binnen deze heterogeniteit gaven vroeger aanleiding tot de definitie van het zwakke rhesusantigeen D^u. Met DNA-technieken kan tegenwoordig de heterogeniteit in kaart worden gebracht. Wij hebben een studie gedaan naar de moleculaire variatie die kan worden gevonden bij patiënten die voorheen bij ons bekend waren met de rhesusbloedgroep D^u.

Methode: Van DNA uit perifere witte bloedcellen is een multiplex PCR-reactie uitgevoerd met 6 RhD-specifieke primersets

om de exonen 3,4,5,6,7 en 9 te amplificeren. Alle primers waren specifiek voor RhD aan hun 3' einde.

Resultaat: Van de 21 onderzochte patiënten waren er 16 voorheen getypeerd als Du en 5 als rhesus(D)-negatief terwijl zij bij later onderzoek als rhesus(D) zijn afgegeven. Bij 12 patiënten werd geen deletie gezien, 2x werd een deletie gevonden van exon 4/5 en 7 keer een deletie van exon 9. Geen duidelijk verschil werd gezien tussen de Du's versus de RhD-negatieven die later als RhD-positief werden getypeerd.

Conclusie: Er is in onze groep onderzochte personen geen duidelijke samenhang met de vroegere serologische rhesusstatus en de moleculaire variatie in het rhesus(D)-gen.

32. Hemoglobinopathiën van de α -globinegenen

J. PRINS¹, B. van der MEIJDEN¹, E.A.W. BLOKLAND¹, W.W. van SOLINGE²

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Meander Medisch Centrum, Amersfoort, Centraal Diagnostisch Laboratorium², Universitair Medisch Centrum Utrecht

Inleiding: Hemoglobinopathiën vormen een heterogene groep erfelijke aandoeningen, veroorzaakt door mutaties die leiden tot een gereduceerde of afwezige synthese van één van de globinegenen (thalassemiën) of tot de synthese van globine ketens met een structurele verandering (Hb-varianten). Binnen ons laboratorium is het gebruikelijk om, indien bij capillaire elektroforese van hemoglobine een structuur variant of een verhoogd percentage HbA₂ wordt gezien, in eerste instantie een sequentieanalyse van het β -globinegen wordt uitgevoerd. Indien er een verdenking bestaat op α -thalassemie wordt gescreend op aanwezigheid van de meest frequent voorkomende β -globinegendeleties (namelijk de $-\alpha 3.7$, $-\alpha 4.2$, $-(\alpha)20.5$, $--SEA$, $--MED$; uitgevoerd op het UMCU). Indien deze werkwijze geen verklaring geeft voor de bevindingen, worden sequentieanalyses van de $\alpha 1$ - en $\alpha 2$ -globinegenen uitgevoerd.

Methode: Genomisch DNA werd geïsoleerd uit volbloed met behulp van Puregene (Gentra Systems). De coderende delen

van de $\alpha 1$ - en $\alpha 2$ -globinegenen kunnen elk met behulp van één primer paar geamplificeerd worden. Sequentieanalyse wordt uitgevoerd met behulp van een ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) om puntmutaties te identificeren welke aanleiding kunnen geven tot het ontstaan van α -thalassemiën en Hb-varianten.

Resultaat: Er is via de beschreven procedure bij acht individuen een sequentieanalyse uitgevoerd van de α -globinegenen. Tot dusver zijn hierbij twee Hb-varianten (HbG-Philadelphia en Hb-Stanleyville-II) en tweemaal dezelfde α -thalassemie (IVS-1 nt 116 a''g mutatie in het $\alpha 2$ -globinegen) aangetroffen.

Conclusie: Ook puntmutaties in de α -globinegenen kunnen aanleiding geven tot het ontstaan van Hb-varianten of α -thalassemiën. Sequentieanalyse van deze genen kan in voorkomende gevallen een verklaring geven voor de klinische en/of laboratoriumbevindingen.

33. Molecular diagnostics in α 1AT deficiency

J.P.M. WIELDERS, B.B. van der MEIJDEN, J. PRINS

Department of Clinical Chemistry, Meander Medical Centre, Amersfoort, The Netherlands

Introduction: The WHO demands national registration of patients with severe α 1AT (α 1 Antitrypsin) deficiencies to facilitate early diagnosis and appropriate treatment. Although α 1AT deficiency is one of the most common genetic diseases, it is seldom diagnosed before clinical symptoms have developed. At present, diagnostic work-up generally implies antigen quantification and occasionally IEF phenotyping. We have developed a work-up including sequencing the α 1AT-gene in severe α 1AT deficiency, enabling an optimal approach for risk inventory of the patient and its family.

Methods: For 643 patients presented to our laboratory by paediatricians and pulmonologists during the last 5 years, we measured the antigen concentration by immunonephelometry calibrated on CRM 470. Whenever α 1AT was <1.0 g/L, amplification and sequencing of (parts of) the α 1AT-gene was

performed using an ABI 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Results: In 92 patients having a α 1AT concentration <1.0 g/L, we found the following mutant alleles S, Z, Mheerlen, Mpalermo, Mprocida, M6passau, Mwurzburg, Q0bellingham plus two previously unknown null-alleles. By decreasing the cut-off to 0.7 g/L we still detected all clinical relevant mutant alleles especially the homozygotes or the compound heterozygotes.

Conclusion: Genotyping the α 1AT-gene for α 1AT-concentration <0.7 g/L identifies all individuals homozygous or compound heterozygous for clinical relevant mutations in the α 1AT-genes, a condition associated with lung emphysema in adults and severe liver cirrhosis in children. Our work-up could also be beneficial in screening patients with severe asthma or COPD, as suggested by the WHO.

34. Normalisatie van genexpressie metingen in tumorweefsels: vergelijking van 13 huishoudgenen

J. de KOK, R. ROELOFS, B. GIESENDORF, T. FEUTH, D. SWINKELS, P. SPAN

Afdeling Klinische Chemie, Endocrinologie en Biostatistiek, UMC St Radboud, Nijmegen

Inleiding: Kwantitatieve RT-PCR op RNA uit tumormateriaal is een veelgebruikte methode voor de identificatie van genen waarvan de expressie kan correleren met diagnose of prognose. Interpretatie van verschillen in genexpressie vereist correctie voor verschillen in RNA-hoeveelheid, RNA-kwaliteit en reverse-transcriptase-efficiëntie tussen de weefsels. In vele studies wordt voor deze normalisatie de expressie van een enkel huishoudgen gebruikt. Hierbij wordt er vanuit gegaan dat de huishoudgenexpressie stabiel is tussen tumor- en normale cellen. Echter, voor geen enkel huishoudgen is dit onomstotelijk bewezen. Willekeurig gebruik van deze genen kan leiden tot foutieve conclusies en niet te vergelijken resultaten tussen verschillende onderzoeken. Als beste alternatief voor

normalisatie wordt momenteel de gemiddelde expressie van meerdere huishoudgenen gebruikt.

Methode: In onze studie hebben we de genexpressie van 13 veelgebruikte huishoudgenen gemeten in 80 normale en tumorweefsels van darm, borst, prostaat, blaas en huid. Principale componentanalyse werd gebruikt om expressiepatronen te analyseren.

Resultaat: Deze aanpak identificeerde hypoxanthine ribosyltransferase (HPRT) als beste individuele huishoudgen. Dit gen kan worden gebruikt ter vervanging van de gemiddelde expressie van 13 verschillende huishoudgenen.

Conclusie: Wij bevelen het toekomstige gebruik van HPRT aan ter standaardisatie van kwantitatieve genexpressie metingen in kankeronderzoek.

35. DNA-diagnostiek alfa-thalassemie; nog meer kwaliteit

J. DANNEBERG, H. EIDHOF, N. SCHAAPHERDER, A. MARTENS

Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuisgroep Twente, Almelo

Inleiding: Bij de diagnostiek van alfa-thalassemie wordt vaak gebruik gemaakt van multiplex PCR. De multiplex primermix bestaat uit een cocktail van 12-14 primers. Ondanks dat de primermix wordt bewaard bij -20 °C lopen de resultaten van de PCR in de loop van de tijd terug; de verwachte banden worden zwakker terwijl de primerband in intensiteit toeneemt. Tevens bestaat er in geval van een homozygoot resultaat onvoldoende controle op een vals-positieve bevinding t.g.v. een PCR-probleem.

Methode: Naast de gebruikelijke werkwijze werd voorafgaand aan de multiplex PCR de primermix eerst 5 min. bij 98°C gedenuatureerd. De resultaten van de beide vormen van PCR werden met elkaar vergeleken. Ter controle van een homozygoot resultaat werd een primerpaar ontwikkeld dat hecht binnen de breekpunten van de alfa-3.7 en alfa-4.2 deletie; dit gebied zal bij alle deleties verdwijnen.

Resultaat: Vijf minuten denaturatie bij 98 °C van de primermix voorafgaand aan de PCR geeft verbetering van resultaat;

de verwachte banden zijn duidelijk zichtbaar terwijl de primerband nauwelijks waarneembaar is. Deze resultaten zijn reproduceerbaar ongeacht de tijd van invriezen c.q. herhaaldelijk invriezen/ontdooien van deze mix. De controle-PCR gaf in alle heterozygote afwijkingen altijd een bandje te zien terwijl bij homozygoot materiaal deze altijd ontbrak.

Conclusie: Vijf minuten denatureren van de multiplex primermix voorafgaand aan de PCR voor alfa-thalassemieonderzoek geeft zeer goed afleesbare resultaten vrijwel zonder het ontstaan van een primerband. Dit ongeacht de tijd van invriezen van de primermix of het herhaaldelijk invriezen/ontdooien van deze mix. Een controle-PCR in geval van een homozygoot testresultaat is een betrouwbare bevestiging van deze testuitslag. Met name gezien de soms ingrijpende consequenties is een extra bevestiging zeker op zijn plaats.

Literatuur: GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Z84721 (HSGG1) Z69706 (HSCOS12)

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

H.J. VERMEER, J. POSTMA, A.P. SPAANS, G. de KORT, P.F.H. FRANCK

HagaHospital, Department of Clinical Chemistry and Hematology, 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 (band 2.1, Mr=210 kDa). The ANK-1 gene is composed of 42 exons, and the composite cDNA contains 5636 base pairs (1879 amino acids). 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 and nonsense null mutations prevail in dominant HS.

Methods: We started a program to analyse genetic mutations in 30 patients with suspected HS. We set up two approaches to identify mutants in order to develop a sensitive screening strategy for suspected HS patients: 1) sequencing of all 42 coding exons plus the 5' untranslated/promoter region; 2) comparison of genomic DNA and cDNA for common ANK1 polymorphisms.

Results: We screened 40 coding exons. Beside common polymorphisms we found two new missense mutations: exon 12 (R426W) and exon 34 (Y1386H). Furthermore we found one stop mutation in exon 37 (R1488X) and two previously described mutations in the ankyrin-1 promoter.

Conclusion: As a screening strategy we started a comparison of polymorphisms in exon 26 and 39 of genomic DNA and cDNA to identify reduced expression of mRNA. Polymorphisms in exon 26 and 39 are frequent in our patient population (80%).

37. A newly identified deletion at the alpha-globin locus removing the promoter region of the alpha1 gene

J. POODT¹, H. HAGENAARS¹, H. MARTENS², M.J. BERNSEN¹, I.B.B. WALSH², A.B. MULDER², B. FELIX-SCHOLLAART³, M.H.A. HERMANS¹

Multidisciplinary Laboratory for Molecular Diagnostics¹ and Laboratory for Clinical Chemistry and Hematology², Jeroen Bosch Hospital, 's Hertogenbosch, General practitioner³, Vught, The Netherlands

Introduction: The most common causes of alpha-thalassemia are deletions that remove a part, one or both of the functional alpha-globin genes. We here report the identification of a new deletion in the alpha-globin gene. A 25-year-old pregnant woman presented with slightly decreased MCV value (76 fl) and normal erythrocyte value (4.0x10¹²/l). Iron deficiency was excluded. HPLC analysis indicated no Hb variants, and the presence of normal HbA₂ concentration (3.0%) excluding α -thalassemias.

Methods: Genomic DNA was isolated from blood cells. Described PCR methods were used for detection of alpha1 and alpha2 genes, MED, SEA, 20.5, 3.7 and 4.2 deletions.

Results: Alpha1 and alpha2 genes were present and the MED, SEA, 20.5, 3.7 and 4.2 deletions were absent. However, the presence of an additional band of unexpected size in one of the PCR's suggested a genomic polymorphism. Sequencing of this

PCR product revealed a 970 bp deletion (36599 until 37568; sequence GI:14523048), together with a 3 bp insertion. The deleted region encompasses the entire promoter region of the alpha1 gene, including the "CAAT" and "ATA" box, a number of putative SP1 sites, and 26 bp encoding the 5' end of the mRNA. To investigate whether the deletion was germline 4 family members were analysed. Three of them carried the deletion.

Conclusion: We have identified a new alpha1 globin gene deletion, probably disrupting expression of alpha1. Theoretically, this newly identified alpha -alpha⁹⁷⁰ allele resembles both the -alpha3.7 and -alpha4.2 alleles in that in all three cases just one functional alpha-globin gene remains. The four patients that carry the alpha -alpha⁹⁷⁰/alpha alpha genotype exhibit MCV-values in the range of 73-77 fl. This might well be due to the "970 deletion".

38. Efficiënt DNA-onderzoek naar alfa-thalassemie

Y.M.G. SCHMIDT, R. HERMSEN, J. HUBERS, N. TIEMENS, P.M.W. JANSSENS

Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Rijnstate, Arnhem

Inleiding: Bij DNA-onderzoek in Arnhem naar thalassemie werden de afgelopen 8 jaar bij 25,2 % van de onderzochte patiënten deleties gevonden - merendeels kleine deleties (-a/aa + -a/aaa 16,4%; -a/-a 5,2%), incidenteel grote deleties (-/aa SEA en MED 3,5%) (1). Tot voor kort werden de grote deleties (SEA, MED, 20.5) in aparte PCR-reacties onderzocht en de kleine deleties (-a 3.5, 3.7, 4.2, 5.0) met restrictie-enzymkartering/Southern-blot-hybridisatie (1). Onlangs vervingen wij dit door een one-tube multiplex-PCR-methodiek. Hiermee kunnen met specifieke primers in één PCR-reactie de zeven meest voorkomende deleties tegelijk worden opgespoord (2).

Methoden: De gepubliceerde methode (2) pasten wij aan door: 1) verhoging van de DNA-concentratie (isolatie m.b.v. spin kolom uitgaande van 1 ml bloed, opgenomen in 75 μ l Tris-EDTA [EDTA 0,1 mmol/l of lager]; 10 μ l hiervan gebruikt in 50 μ l PCR-reactie), 2) verhoging van de primerconcentratie in PCR-reacties (0,5 μ mol/l primer i.p.v. 0,2 μ mol/l), 3) maximaal 2 po-

sitieve controlemonsters samen in één PCR-reactie (controle I: -a3.7/-a4.2, controle II: SEA/aa, controle III: mengsel MED/aa + a20.5/aa), 4) weglaten van de LIS-primers ter controle van de PCR-reactie (uit op gel zichtbare wildtype/deletiebandjes blijkt afdoende of de PCR reactie werkt), 5) verlaging van de agar-gel concentratie tot 1 %, elektroforese 2 u. 10 V/cm. De gepubliceerde (2) temperaturen voor de PCR-reactie, gecontroleerd met een temperatuurgradiënt, bleven onveranderd.

Resultaat: Na beschreven aanpassingen kregen we bruikbare multiplex-PCR-reactieproducten, goed zichtbaar op gel, voor patiëntenmonsters en controles.

Conclusie: Multiplex-PCR is een goede, efficiënte methode voor DNA-onderzoek naar alfa thalassemie.

Literatuur: 1. Schmidt YMG, Hemsens R, Hubers J, Willekens FLA, Janssens PMW. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2004; 29: 335. 2. Tan ASC, et al. Blood 2001; 98: 250-251.

Overigen

39. Preanalyse van foliumzuur en vitamine B12

K.E.E. TICHEM¹, M.J.W. JANSSEN^{1,2}

St. Jans Gasthuis¹, Klinisch Chemisch & Hematologisch Laboratorium, Weert, Laurentius Ziekenhuis², Centraal Klinisch Chemisch & Hematologisch Laboratorium, Roermond

Inleiding: Vele laboratoria hanteren speciale bewaarcondities voor sera waaruit foliumzuur en/of vitamine B12 bepaald moeten worden. Gangbare handboeken (1, 2) geven aan dat de monsters beschermd moeten worden tegen licht en dat sera direct na centrifugeren ingevroren moeten worden. In de wetenschappelijke literatuur is hierover echter weinig bewijs te vinden.

Methode: Een poolserum, verdeeld in 42 porties, is blootgesteld aan 6 verschillende bewaarcondities. Bij elke bewaarconditie horen 7 meetpunten (t=1, 2, 4, 8, 24, 48 en 72 uur). De bewaarcondities zijn combinaties van licht/donker en -20 °C/ 4 °C/ kamertemperatuur. De bereiding van het poolserum (bloedafname, centrifugeren en verdelen) is zo snel als mogelijk uitgevoerd waarbij het materiaal continu beschermd

is gebleven tegen licht. De metingen zijn uitgevoerd met een Immulite2000 systeem van DPC.

Resultaat: Foliumzuur is stabiel gedurende 24 uur onder alle bewaarcondities. Als het serum bewaard wordt bij kamertemperatuur, zowel in licht als donker, is foliumzuur gedurende 48 uur stabiel. Vitamine B12 is stabiel gedurende 72 uur onder alle bewaarcondities.

Conclusie: Voor onze praktijkvoering geldt: blootstelling van serum aan licht gedurende 48 uur heeft geen effect op de foliumzuur- en vitamine-B12-concentraties. Er is geen noodzaak om sera direct na centrifugeren in te vriezen.

Literatuur: 1. Burtis et al. (ed.). Tietz textbook of clinical chemistry. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1999.2. Diagnostisch Kompas. 3rd ed. College voor zorgverzekeringen, 2003.

40. Do we measure bilirubin correctly anno 2004?

J.J. APPERLOO, F. van der GRAAF, V. SCHARNHORST, H.L. VADER

Department of Clinical Chemistry, Maxima Medical Centre, Veldhoven, The Netherlands

Introduction: We were confronted with repeated discrepancies, some even exceeding 100 $\mu\text{mol/l}$ (measured values ~ 300 and $400 \mu\text{mol/l}$, respectively), between serum bilirubin concentrations measured in our laboratory (equipped with a 'dry-chemistry' analyzer) and in another laboratory (equipped with a 'liquid-chemistry' analyzer) of a patient who had undergone liver transplantation. We aimed at unraveling these remarkable discrepancies, particularly realizing that clinical decision values in case of neonatal conjugated hyperbilirubinaemias rely on accurate bilirubin measurements.

Methods: Human (adult and neonatal) patient samples with total bilirubin concentrations spanning a range from about 10 to $400 \mu\text{mol/l}$, as well as the bilirubin reference material SRM916 (added to human serum matrix), were measured both on a number of 'dry'- versus 'liquid-chemistry' analyzers and using a Jendrassik-Grof reference method.

Results: We observed 30% discrepancies between 'liquid-

chemistry' and 'dry-chemistry' analyzers regarding the determination of total bilirubin in human adult serum samples, which appear to be consistent with a 20% overestimation and 10% underestimation relative to a Jendrassik-Grof reference method, respectively. In contrast, SRM916, which was recently recommended as being the most suitable material for attaining interlaboratory agreement, shows very good agreement on both types of analyzers as well as 100% recovery with respect to the reference method. Although we do not have an explanation yet for the different recoveries of human serum bilirubin versus SRM bilirubin, we show that the 'liquid' versus 'dry' bilirubin discrepancies seem to originate in the presence of either conjugated or delta-bilirubin.

Conclusion: Our observations make clear that good interlaboratory (or: inter-analyzer) agreement between bilirubin reference materials does not guarantee the same for bilirubin concentrations in human serum samples.

41. Evaluatie van Sebia IEF-methode voor detectie van oligoklonale IgG-banden in liquor

E. ten BOEKEL, D. REUVERS, W. de KIEVIET

Sint Lucas Andreas Ziekenhuis Amsterdam

Inleiding: Analyse van oligoklonale IgG-banden (OCBs) in liquor is van belang voor het stellen van de diagnose multiple sclerose (MS) (sensitiviteit $>90\%$). Oligoklonale banden kunnen ook voorkomen bij enkele andere neurologische ziekten. Iso-elektrische focusering (IEF) is de meest sensitieve methode voor detectie van OCBs. Sebia heeft in 2004 een IEF-methode voor detectie van OCBs op de markt gebracht. De methode omvat IEF in combinatie met immunofixatie met peroxidase-gelabeld anti-IgG. Wij hebben de nieuwe Sebia IEF-methodiek geëvalueerd.

Methode: Vijftig ingezonden liquores en sera van verschillende patiënten werden geanalyseerd op aanwezigheid van OCBs met behulp van de Hydrigel CSF Isofocusing kit op Sebia Hydrasys elektroforeseapparatuur. De liquor werd beoordeeld als positief indien in de liquor één of meerdere extra IgG-banden t.o.v. het serum werd(en) gevonden.

Resultaat: Van de 50 onderzochte liquormonsters werden 13 patiënten positief voor OCBs bevonden. Van deze 13 is bij 10 patiënten de diagnose "MS" (5x) of "waarschijnlijk MS" (5x) gesteld. Drie MS-patiënten vertoonden één extra IgG-band en 7 MS-patiënten vertoonden meerdere extra IgG-banden in de liquor. Bij de overige drie gevallen werden OCBs aangetoond zonder dat de diagnose MS kon worden vastgesteld. Twee van deze patiënten hadden neurologische afwijkingen zonder duidelijke diagnose en één patiënt werd gediagnosticeerd als "mogelijk MS".

Conclusie: De nieuwe Sebia IEF-methode voor het aantonen van OCBs in liquor is snel en eenvoudig uitvoerbaar. Onze resultaten suggereren dat de methode een hoge sensitiviteit voor MS heeft.

42. Differentiating transudative from exudative pleural effusion: what should we measure?

M.P.G. LEERS, H. KLEINVELD, V. SCHARNHORST

Dept of Clinical Chemistry & Hematology, Atrium Medical Center, Heerlen, The Netherlands

Introduction: Pleural effusions are classified into transudates and exudates based on criteria developed already 30 years ago, i.e. Light's criteria: pleural fluid LDH, fluid to serum LDH-ratio and fluid to serum total protein-ratio. In this study the diagnostic accuracy and the quality of these primary investigations were examined, next to a few other possible markers.

Methods: Of 183 consecutive patients with pleural effusion, serum and pleural fluid were analysed for LDH, total protein and albumin. In addition in pleural fluid also cholesterol, albumin, glucose, pH and cell count were measured.

Results: Of the 183 effusions studied, 40 were transudates and 143 were exudates. The accuracy of Light's criteria (92%) was

significantly higher than that showed by the individual biochemical assays. Next to LDH and fluid to serum LDH ratio, cholesterol appeared a good marker for differentiating exudates and transudates (sensitivity 78%, specificity 100%). The combination of these three measurements achieved a higher overall accuracy (sensitivity 95%, specificity 100%, positive predictive value (PPV) of 100% and a negative predictive value (NPV) of 85%) than the original Light's criteria (sensitivity 98%, specificity 73%, PPV of 93% and a NPV of 91%).

Conclusion: Routine measurement of pleural fluid LDH and cholesterol, next to the calculation of fluid to serum LDH ratios will aid in differentiating exudates from transudates.

43. Cystatin C can be measured reliably in capillary blood samples

S.A.R. KORT¹, A.A. BOUMAN¹, M.A. BLANKENSTEIN¹, A. BÖKENKAMP²

Departments of Clinical Chemistry¹ and Pediatrics², VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: In recent years, Cystatin C has shown to be a promising alternative to serum creatinine, the established parameter of renal function. In contrast to creatinine, capillary blood sampling has not been validated for Cystatin C. Especially in young children, capillary sampling is often preferred over venipuncture. However, capillary blood is not always suitable for all biochemical parameters because it is a mixture of venous and arterial blood and occasionally interstitial or intracellular fluid. Different studies have demonstrated that Cystatin C concentrations were comparable in most body fluids. We therefore hypothesized that Cystatin C might also be measured reliably in capillary instead of venous blood samples.

Methods: Cystatin C was measured in paired blood samples collected by venipuncture and capillary puncture from forty-one adult volunteers. Analysis was done in serum using a com-

mercially available particle-enhanced immunonephelometric assay on a BN Prospec nephelometer (Dade Behring).

Results: Capillary Cystatin C concentrations ranged from 0.579 to 0.862 mg/L (median 0.727) and venous Cystatin C from 0.584 to 0.873 mg/L (median 0.714). Passing and Bablock regression was $y = -0.0255 + 1.0357x$ (y =capillary; x =venous). The mean difference between both methods by Bland-Altman analysis was 0.006 mg/L (95 % CI -0.053 to 0.064 mg/L) with no evidence for a concentration-related bias. The paired t-test showed a t value of 1.189 (n.s.).

Conclusion: For serum Cystatin C no systematic deviation between venous and capillary blood samples could be demonstrated under the conditions used and the concentrations studied. These findings indicate that Cystatin C can be measured reliably in serum samples, obtained by capillary finger puncture.

44. Geneesmiddelbepalingen op de Beckman Coulter Immage

D. HARDEMAN¹, C. STUART², C. BERGSTRA¹, S. DRUKKER¹, B. REIDSMA¹

Laboratorium voor Klinische Chemie¹, Klinische Farmacie², Antonius Ziekenhuis, Sneek

Inleiding: De Beckman Coulter Immage kan zowel (rate-) nefelometrische als turbidimetrische bepalingen uitvoeren. De Immage wordt voornamelijk voor eiwitbepalingen gebruikt, maar kan m.b.v. rate-inhibitienefelometrie en 'near infrared particle immuno-assay' (NIPIA; digoxine) ook geneesmiddelenconcentraties meten. Zeven geneesmiddelbepalingen op de Immage werden vergeleken met de Abbott TDx.

Methode: De within- en between-run-reproduceerbaarheid werden bepaald, door op twee verschillende niveaus 20 maal achtereen respectievelijk op achtereenvolgende dagen controlemonsters te bepalen. Voor de correlatiestudies werden serum-patiëntenmonsters gebruikt die tegelijkertijd werden geanalyseerd op beide systemen.

Resultaat: De within- en between-run-reproduceerbaarheid bleven op de geteste niveaus binnen de door de firma opgegeven specificaties. De regressieanalyse (Excel) met de TDx-bepalingen leverde de volgende resultaten op: carbamazepine, $y=0,931x-0,177$ ($r=0,949$); digoxine, $y=1,027x-0,264$ ($r=0,978$);

gentamycine, $y=1,108x-0,180$ ($r=0,965$); phenobarbital, $y=1,069x-3,249$ ($r=0,989$); phenytoïne, $y=0,975x-0,637$ ($r=0,990$); theophylline, $y=0,866x+1,131$ ($r=0,981$); valproïnezuur, $y=0,945x+4,066$ ($r=0,985$).

Conclusie: De geteste geneesmiddelbepalingen op de Immage vertonen een goede correlatie met de TDx-bepalingen. De digoxinebepaling vertoont door de grote asafsnede, in het lage gebied een substantiële afwijking; daarom zijn voor deze bepaling correctiefactoren in de Immage ingesteld. De gentamycinebepaling rapporteert geen uitslagen < 0,5 mg/l, waardoor bij uitslagen onder deze grenswaarde de klaring van dit geneesmiddel niet berekend kan worden. Het laboratorium maakt sinds juni 2001 gebruik van de Immage. In de KKG- en SKML-rondzendingen worden bevredigende scores behaald, waarbij wel moet worden opgemerkt dat er geen andere Immage gebruikers voor geneesmiddelbepalingen zijn en dus vergeleken wordt met de TDx uitslagen.

45. A quantitative appraisal of the interference by icodextrin metabolites on point-of-care glucose analyzers

J.J. APPERLOO, H.L. VADER

Department of Clinical Chemistry, Maxima Medical Centre, Veldhoven, The Netherlands

Introduction: In case of peritoneal dialysis, the glucose-polymer 'icodextrin' is frequently added to the dialysis fluid in order to prolong the effective ultrafiltration-time. It was shown previously, that icodextrin partly enters the bloodstream via the lymphatic system and that icodextrin-metabolites, like maltose and maltotriose, lead to falsely elevated glucose concentrations in some point-of-care glucose analyzers. From literature, it is not evident yet which POC glucose-analyzers suffer from interference and to what extent. We intended to show a relationship between the (enzymatic) method of glucose determination and the occurrence of interference by icodextrin metabolites.

Methods: The effect of interference has been investigated for 10 POC glucose-analyzers, both by analyzing the blood of peritoneal dialysis patients and by an in-vitro investigation of concentration-dependent effects by maltose and maltotriose.

Results: None of the analyzers using glucose oxidase as an

enzyme, appears to experience interference. Glucose dehydrogenase, in contrast, is in all cases but one hindered by interference. The enzyme glucose-dye-oxido-reductase (GDO) is only present in one analyzer, and lacks specificity in that case. It is shown that the recognition of maltose as a substrate for the relevant non-specific enzymes is roughly the same as that of glucose. In some cases the interference even exceeds equimolarity. This might be rationalized by the fact that maltose is a glucose-dimer. Maltotriose generally shows a slightly smaller degree of interference than maltose, consistent with an apparently less favorable 'fit' in the active site of the enzyme.

Conclusion: We demonstrate that particularly analyzers based on the bacterially-produced enzyme glucose dehydrogenase lack specificity, and that interference takes place in an approximately equimolar fashion in relation to the quantities of maltose, maltotriose and perhaps higher oligomers present.

46. Nieuwe methode voor detectie van oligoklonale IgG-banden in liquor en serum (Sebia) versus referentiemethode

J.S. KAMPHUIS, T. DRAPER-LORIST, J. JASPERS, J.D.E. van SUIJLEN

KCHL, Gelre ziekenhuizen, Apeldoorn en Zutphen

Inleiding: In het kader van vervanging van de huidige vroege methode voor detectie van oligoklonale banden in liquor/serum is gekozen voor het valideren van de methode van Sebia versus een referentiemethode.

Methode: Zestien bekende liquor/serum (L/S) paren, gekregen van de afdeling Neurologie van het UMCN St. Radboud te Nijmegen (referentielaboratorium) zijn geanalyseerd middels de vernieuwde iso-electrische focusering (IEF)-techniek (+ directe kleuring) van de firma Sebia. Verkregen resultaten zijn vergeleken met die van het referentielaboratorium, die verkregen zijn via IEF + immunoblotting. Apparatuur: Sebia: Hydrys (incl. Dynamic Mask)

Resultaat: Bij de vergelijking van onze resultaten met die van het referentielaboratorium bleek dat 6 van de 16 resultaten verschillend waren. In de referentiemonsters waren volgens het referentielaboratorium geen oligoklonale IgG-banden aantoonbaar, terwijl ons resultaat 'spiegelbeeld patroon' (extra

banden in zowel L als S) was. Oorzaak van de discrepanties was de lastige beoordeling door de te hoge achtergrondkleuring. De andere 11 monsters (alle met pathologische resultaten) gaven in de vergelijking geen discrepanties te zien. Bij de vergelijking van de Sebia-methode met de huidige Paragon-methode (elektroforese + directe kleuring) bleek de Sebia-methode beduidend gevoeliger te zijn. Waar in enkele gevallen de Paragon-methode geen afwijkingen liet zien, bleek de Sebia-methode duidelijke pathologie aan te tonen.

Conclusie: Met de invoering van de Sebia-methode is de gevoeligheid voor het aantonen van oligoklonale banden in L en S sterk toegenomen. Vergelijking met de referentiemethode laat zien dat er geen pathologie wordt gemist, echter een geïntegreerd diagnostisch oog zeer gewenst is. Aanpassing van de Sebia-methode heeft inmiddels geleid tot minder achtergrondkleuring en een betere scheiding van de eiwitten, met als gevolg een betere beoordeling.

47. Pediatric Tube Direct Sampling by the Abbott Architect Integrated ci8200 Chemistry / Immunochemistry Analyser

M.W. RAUTENBERG, J.J. HEUNKS, R.H. STOKWIELDER, W.W. van SOLINGE, H. KEMPERMAN

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

Introduction: In this study the ability of the Abbott Architect ci8200 to handle and directly sample from primary barcode labeled pediatric tubes was evaluated. Therefore we determined the dead volume of the standard sample cup and subsequently evaluated the ability of the Architect ci8200 to sample from 5 different brands of pediatric tubes to a dead volume of 50 µl.

Methods: For the sample cups an aspiration error was generated by requesting more replicates of tests than theoretically possible in the defined sample volume. The sample volume left in the cup at that point was calculated. For the 5 different lithium heparine gel tubes, containing a sample volume enough for exactly 10 tests plus 50 µl dead volume, 10 repetitive tests were requested.

Results: The mean calculated dead volume of the sample cup

was 20 µl (range 12-30 µl). For the chemistry assays the percentage of short sample errors ranged from 9% of the assays for the best performing tube to 57% for the poorest performing tube. For the immunoassays these percentages ranged from 0.1% to 0.3%. No wrong result was produced without a flag.

Conclusion: The dead volume of the standard sample cup is less than the 50 µl claimed by the manufacturer. The dead volume in all tested pediatric tubes is more than 50 µl for the chemistry assays. For the immunoassays the dead volume is 50 µl or less in all types of tube. By using the best performing tube, the Architect ci8200 is capable of handling and directly sampling from pediatric tubes with a dead volume of approximately 50 µl. In addition, no wrong result was produced without a flag.

48. Blue Native Gel Electrophoresis and mass spectrometric identification of Multi-Protein Complexes in bovine retinal pigment epithelial cells

K.J.H. VANHOUTTE, B.P.M. JANSSEN, M.A. GERRITS, J.J.M. JANSSEN

Dept. of Ophthalmology, Nijmegen Center for Molecular Life Sciences UMC St. Radboud, Nijmegen, The Netherlands

Inleiding: Specialized metabolic processes in the cell are often organized in subcellular compartmentalized Multi-Protein Complexes. Interestingly, in retinal pigment epithelial (RPE) cells, recent proteomics studies support the presence of retinoid processing complexes dedicated to visual pigment regeneration. Here we applied a proteomics approach to analyse these complexes in their native configuration.

Methode: Multi-protein complexes in bovine RPE microsomes were resolved by nondenaturing Blue Native (BN) gel electrophoresis. Peptides were extracted from excised Coomassie Blue stained protein bands and analysed with a high throughput nano-LC system, online coupled to an LTQ FT ICR Mass spectrometer (Nijmegen Proteomics Facility). Peptide mass lists were used to search the NCBI protein database. Western analyses of identified proteins were done after second dimension SDS Gel Electrophoresis.

Resultaat: Visual inspection of the BN gel revealed 11 promi-

nent BN protein complexes with an apparent mass < 1 MDa. In these complexes 11-cis-retinol-dehydrogenase (RDH5) consistently colocalizes with a RPE-specific 65 kDa protein (RPE65) and Retinal G-protein-coupled Receptor (RGR). These findings were corroborated by Western analysis. Interestingly, other retinoid binding proteins, like cRALBP, LRAT and RDH11 did not appear in all complexes. In addition, the MS analysis disclosed unexpected new candidate retinoid binding proteins.

Conclusie: Our data support the hypothesis of stable interacting retinoid processing proteins in the RPE. The identified proteins in the complexes corroborate previous interaction studies. Further investigations will evaluate the physiological significance of putative new interaction partners. Our proteomics approach opens a challenging perspective to study the patho-physiological signature of supramolecular complexes in the retina, complementing the genomic profile.

49. Bepaling van de serumindices op de chemieanalysers ADVIA1650 (Bayer) en de INTEGRA800 (Roche)

P. VERSCHUURE, B.S. JAKOBS, A.A.J. van LANDEGHEM

Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium en Trombosedienst, Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg

Inleiding: In de organisatie van het KCHL hebben we te maken met 3 locaties waar twee verschillende chemieanalysers gebruikt worden: de ADVIA1650 (Bayer) op de locatie Elisabeth ziekenhuis en de INTEGRA800 (Roche) op de locaties Tweesteden ziekenhuis Tilburg en Waalwijk. De klinisch-chemische testen kunnen gestoord worden door hemolyse, lipemie en/of bilirubinemie. De beïnvloeding kan leiden tot vals-verhoogde of -verlaagde testresultaten.

Methode: We hebben op beide chemieanalysers de interferenties bepaald op de verschillende klinisch-chemische testen volgens het NCCLS-protocol EP7-P. Mengsersa van gezonde vrijwilligers, poliklinische en klinische patiënten zijn gebruikt. Een interferentie wordt als significant beschouwd als de waarde meer dan twee maal de biologische variatie (of de 'state-of-the-art'-variatie als deze groter is) van de oorspronkelijke waarde afwijkt. Indien de biologische variatie groter is dan 12,5% zal worden uitgegaan van een significant effect als

de totale afwijking meer is dan 25%. Tenslotte is gekeken of de afwijking ook klinisch relevant is.

Resultaat: Bovenstaande beslisgrenzen resulteren in: 9 bepalingen die gestoord worden door hemolyse (ADVIA1650 en INTEGRA800), 4 (ADVIA1650) of 6 (INTEGRA800) door lipemie en 3 door icterie (ADVIA1650 en INTEGRA800). Gezien de lineaire interferentie op de bilirubinebepaling bij hemolyse is gekozen voor het doorgeven van een gecorrigeerde uitslag voor neonatale monsters.

Conclusie: 1. Ondanks dat op beide apparaten zoveel mogelijk dezelfde methode wordt gebruikt zijn er toch een aantal verschillen gevonden in de interferentie. 2. Indien een lineair verband is aangehouden in de interferentie kan men er voor kiezen de uitslag gecorrigeerd door te geven. 3. Bijsluiters van firma's geven te weinig informatie over de beslisgrenzen voor interferentie. 4. De verwerking van de serumindices kan geautomatiseerd verlopen. In het Elisabeth ziekenhuis is dit middels Centralink reeds gerealiseerd.

50. Belang van preanalytische fase op PTH-uitslagen na reïmplantatie bij schildklier in arm

J.A. REMIJS¹, E.A. PROPER¹, G. KOLSTERS², L.D. DIKKESCHEI¹

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Interne Geneeskunde², Isala Klinieken, Zwolle

Inleiding: Bij patiënten met hyperparathyroïdie kan het hyperplastische bij schildklierweefsel chirurgisch verwijderd worden. Reïmplantatie in de onderarm van het geresecteerde bij schildklierweefsel is een toegepaste techniek om fysiologische regeling van de calciumhuishouding te garanderen.

Methode: Wij presenteren een 41-jarige man met tertiaire hyperparathyroïdie ten gevolge van chronisch nierfalen. Na geleidelijke progressieve nierfunctiestoornis van het eerste niertransplantaat was de patiënt voor dialyse geïndiceerd. In deze fase werden de bij schildklieren verwijderd en partieel geïmplanteerd in de rechterarm. Sedert een tweede niertransplantatie heeft de patiënt een stabiele nierfunctie. Ondanks de bij schildklierextirpatie werden wisselend sterk verhoogde en normale [PTH] gemeten. Deze waarden waren onverenigbaar met de calciumconcentratie en een niet-verhoogde botturnover.

Resultaat: Eventuele analytische factoren in de PTH-immunochemische-bepaling, zoals: high-dose-hook-effect, PTH-gerelateerd peptide, kruisreagerende antistoffen en heterofiele antilichamen, werden uitgesloten. Hiervoor werden de [PTH]

middels drie verschillende methodieken bepaald. Echter, dit methodevergelijkend onderzoek leverde geen verklaring op voor de wisselende PTH-uitslagen. Verschillen in bloedafname: uit de rechterarm (plaats van implantaat) of de linkerarm (geeft informatie over systeem [PTH]) bleek uiteindelijk de verklaring te zijn. De [PTH] gemeten in het plasma afgenomen uit de linkerarm was: 4,1 pmol/L (ref. 1,0-6,5 pmol/L), terwijl uit de rechterarm [PTH]: 235 pmol/l werd gemeten. De verhoogde [PTH] die wij bij deze patiënt soms hebben gemeten, moeten zijn veroorzaakt door meting in het afvloedtraject van de geïmplanteerde bij schildklier in de rechteronderarm.

Conclusie: Sterk wisselende [PTH] bij een patiënt na niertransplantatie en parathyroïdectomie en partiële reïmplantatie in de rechteronderarm worden verklaard door grote verschillen in [PTH] in bloed, afgenomen uit de rechter- of linkerarm. Hieruit blijkt het belang van de preanalytische fase op de uitslag van [PTH] bij patiënten met een in de arm geïmplanteerde bij schildklier.

51. Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid: comparative study of different methods

S. ROTHKRANTZ-KOS¹, V. KLEIJNEN¹, C.M. HACKENG², R. HUPPERTS³, M. P. J. SCHMITZ¹, M. P. van DIEIJEN-VISSER¹

Depts. of Clinical Chemistry¹ and Neurology³, University Hospital Maastricht, Dept of Clinical Chemistry², Sint Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein, The Netherlands

Introduction: Two isoelectrofocussing (IEF) methods and a high resolution routine electrophoresis method were compared for their ability to detect intrathecally synthesized IgG in multiple sclerosis (MS) and in other nervous system disorders.

Methods: Method comparison for detection of oligoclonal bands in cerebrospinal fluid was performed in matched serum/cerebrospinal fluid (CSF) samples from 93 patients, 47 with MS and 46 with various non-inflammatory nervous system disorders. An IEF-immunofixation method from SEBIA, IEF-immunoblotting method (HELENA) and a routine agarose gel electrophoresis (AGE) (Beckman) were compared.

Results: At least two CSF-restricted oligoclonal bands (OCB) were found in respectively 36, 39, 41 of 47 (sensitivities in %: 77, 83, 60) patients with MS using SEBIA, HELENA and AGE. OCB's were found in 5, 4, 17 (specificities in %: 89, 91, 98 for SEBIA, HELENA and AGE) patients with other non-inflammatory nervous system disorders. The AUC±SE for the different methods were as follows: 0.920±0.031 for HELENA, 0.882±0.037 for SEBIA and 0.862±0.039 for HRE.

Conclusion: Both IEF methods are statistically comparable in detecting OCB's and showed higher sensitivities in the detection of oligoclonal bands as compared to HRE.

52. Interferenties in de enzymatische methode voor creatininebepaling

B.A.C. van ACKER¹, B.G. BLIJENBERG¹, M. DURAN², J. LINDEMANS¹, J.G.M. HUIJMANS²
Afdeling Klinische Chemie¹, Afdeling Klinische Genetica², Erasmus MC, Rotterdam

Inleiding: De enzymatische creatininebepaling wordt beschouwd als superieur aan de Jaffé-methode door de geringere mate van interferentie. Aanleiding voor dit onderzoek vormde de opmerkelijk lage concentratie creatinine in urine, enzymatisch gemeten, bij patiënten met alkaptonurie, een erfelijk defect in het tyrosinemetabolisme. De referentiemethode (HPLC) leverde een aanzienlijk hoger creatinine op. Urine van patiënten met alkaptonurie wordt gekenmerkt door verhoogde concentraties homogentisinezuur en wordt verzameld in bokaalen waaraan 5 gram vitamine C is toegevoegd. Het doel van de huidige studie was om na te gaan in welke mate homogentisinezuur, vitamine C en andere stoffen storen in de enzymatische bepaling van creatinine.

Methode: Aan een waterige oplossing van creatinine werden bekende concentraties toegevoegd van stoffen die mogelijk interfereren met de enzymatische bepaling van creatinine: homogentisinezuur (0-60mM), vitamine C (0-30mM), gentisinezuur (0-35mM), creatine (0-40mM), guanidinoazijnzuur (0-20mM) en sarcosine (0-40mM). De creatinineconcentraties werden enzymatisch (Hitachi 917, Roche), met een Jaffé-methode (Synchron LX 20 PRO, Beckman Coulter) en met de HPLC-referentiemethode gemeten.

Resultaat: Vitamine C, creatine, sarcosine en guanidinoazijnzuur interfereerden niet met een van bovengenoemde methoden. Homogentisinezuur gaf een exponentiële daling van de enzymatisch gemeten creatinineconcentratie tot 15% van de uitgangswaarde. Een bifasische reactie werd waargenomen voor creatinine-Jaffé: overschatting (tot 15%), gevolgd door onderschatting (tot 22%). Toevoeging van gentisinezuur, een afbraakproduct van acetylsalicylzuur, in klinisch relevante hoeveelheden veroorzaakte geen interferentie. Slechts farmacologische hoeveelheden resulteerden in een geleidelijke onderschatting van zowel de enzymatisch gemeten creatinine (tot 28%) als creatinine-Jaffé (tot 10%).

Conclusie: Gezien de sterk negatieve interferentie van homogentisinezuur met de enzymatische creatininebepaling, wordt deze methode afgeraden bij patiënten met alkaptonurie. Vitamine C, creatine, guanidinoazijnzuur, sarcosine en klinisch relevante concentraties gentisinezuur interfereerden niet met de enzymatische meting van creatinine.

Categorie 2 Bedrijfsvoering

Dienstverlening, doorlooptijden, workflowanalyse

53. Procescapaciteit en efficiëntie van allergiebepalingen op diverse automaten

H.A. HENDRIKS^{1,2,3}, F.A.L. van der HORST², W.M. VERWEIJ¹

SALTRO¹, Utrecht, Klinisch Chemisch Laboratorium², St. Antonius Ziekenhuis Nieuwegein, Klinisch Chemisch Laboratorium³, St. Lucas Andreas Ziekenhuis, Amsterdam

Inleiding: De laatste paar jaren is er een aantal volledig geautomatiseerde allergieanalysers op de markt gekomen. Er is een aantal studies geweest die de analytische kenmerken van deze analyzers in beeld hebben gebracht (1, 2). Veel minder informatie is beschikbaar met betrekking tot de efficiëntie en productiviteit van de analyzers. Gebruik makend van gestandaardiseerde productiviteitsparameters vergeleken we de procescapaciteit en efficiëntie van allergiediagnostiek op drie analyzers.

Methode: De efficiëntie en procescapaciteit van de ADVIA Centaur (A), Immulite 2000 (B), UniCAP 1000 (C) zijn gemeten met de productiviteitsparameters beschreven door Hendriks et al. (3). Twee standaard werkloadprotocollen zijn gebruikt. Het eerste protocol (allergie protocol), bevatte alleen allergieaanvragen en werd gebruikt voor alle drie analyzers (A, B, C). Het tweede protocol (gemengd protocol passend bij een groot ziekenhuis), bevatte zowel immunochemie als allergiebepalingen en werd toegepast op analyzers A en B.

Resultaat: De 'throughput' voor het allergieprotocol was 77, 74 en 90 testen/uur voor respectievelijk analyzer A, B en C. De RPI(15) was respectievelijk 886, 815 en 471 testen/analistuur en de RPI(25) was 372, 325 en 360 testen/analistuur. De 'throughput' voor het gemengde protocol was respectievelijk 130 en 58 testen/uur voor analyzer A en B. De RPI(10) was 613 en 439 testen/analistuur.

Conclusie: Door een gestandaardiseerde methode voor de evaluatie en vergelijking van procescapaciteit en efficiëntie toe te passen is het mogelijk om instrumentplanning op een wetenschappelijke manier te benaderen. Alle drie analyzers zijn arbeidsefficiënt en hebben vergelijkbare RPI-waarden. Er zijn echter verschillen in de processtijd en 'throughput' voor de drie analyzers.

Literatuur: Williams. J Allergy Clin Immunol 2000; 105:1221-30. Ricci. Allergy 2003; 58: 38-45. Hendriks et al. Clin Chem 2000, 46:105-11

54. Evaluatie beantwoording publieksvragen op de website van de NVKC

J.D.E. van SUIJLEN¹, M.H.M. THELEN¹, C. SWIJNENBURG², C. RUITER^{1,2}
Commissie PR en Communicatie¹, NVKC-bureau²

Inleiding: Sinds anderhalf jaar wordt in de rubriek Publieksinformatie op de NVKC-site aan het publiek de service geboden om vragen te stellen aan een deskundig forum, bestaande uit de Werkgroep Publieksvragen, onderdeel van de Commissie PR en Communicatie. De werkgroep telt 20 NVKC-leden die volgens een vastgesteld protocol de publieksvragen beantwoorden.

Methode: De vragensteller dient naast de vraag, naam, leeftijd en geslacht aan te geven. Tevens wordt gevraagd of toestemming wordt verleend voor anonieme publicatie van vraag en antwoord op de site. De vraag dient binnen 3 werkdagen beantwoord te worden door de deskundige van dienst. De overige leden van de werkgroep hebben gelegenheid achteraf op de antwoorden te reageren; zulks binnen een afgesloten forum met als doel de kwaliteit van de antwoorden te optimaliseren. Ten behoeve van deze evaluatie zijn de gegevens van vragenstellers en aard en inhoud van de vragen nader geanalyseerd.

Resultaat: In de afgelopen 1,5 jaar zijn er totaal 224 vragen gesteld, waarbij het aantal vragen per week geleidelijk toeneemt. De meeste vragen waren van labtechnische aard (waarom nuchter, hoe werkt het, etc), daarnaast werden vragen gesteld naar aanleiding van uitslagen, over referentiewaarden, afkortingen, medische terminologie en opleiding. Het aantal vragen van louter klinische aard is beperkt. De meest voorkomende inhoudelijke thema's zijn (top 10 in volgorde van meest gestelde vragen) schildklier, alcohol en drugs, glucose en diabetes, allergie, maligniteiten, trombose, bloedgroepen, DNA-onderzoek, geslachtsziekten en vitamines.

Conclusie: De Commissie PR en Communicatie vindt dat de service in een behoefte voorziet. De vragen hebben voornamelijk betrekking op laboratoriumonderzoek en wat daar bij komt kijken. Daarbij is het een prima etalage en stimulans om de klinisch-chemische expertise aan het grote publiek te tonen.

Categorie 2 Bedrijfsvoering

Kwaliteit, referentiewaarden

55. Regionaal QC-programma ten behoeve van klinisch-chemisch onderzoek

D. van LOON, H.J.T. RUVEN, E.M.A. WERKMAN
Afdeling Klinische Chemie, St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein

Inleiding: Samenwerkingsverbanden tussen klinisch-chemische laboratoria zijn tegenwoordig niet meer weg te denken. Daarnaast zien we dat patiënten zich bewegen tussen de verschillende ziekenhuizen. Een afstemming van de analysesystemen met als doel hetzelfde meetresultaat (antwoord) te kunnen geven aan de aanvragende arts/specialist is om de genoemde redenen zeer wenselijk.

Methode: Om een afstemming van resultaten van klinisch-chemische metingen te bereiken is gebruik gemaakt van de resultaten van rondzendingen. In deze rondzendingen worden gepoolde plasma's, afkomstig van patiënten, verstuurd naar de deelnemende laboratoria. Per parameter worden in vier poolsera met uiteenlopende analytische concentratie vijf metingen verricht aan de te bepalen grootte. Aan de hand van een vergelijking tussen de analysesystemen met een referentiemeetsysteem (Pentra 400, enzymactiviteitsmetingen volgens IFCC-methode, herleiding op IRMM CRM's of een vergelijking met

erkende referentie-instituten) worden per routineanalysesysteem de prestaties beoordeeld aan de hand van de gemiddelden per pool, regressieanalyses en beoordelingen volgens de 6-sigmascoring. De beoordeling van de resultaten wordt na bespreking met de participanten gebruikt als stuurmiddel.

Resultaat: Het doel om de resultaten van klinisch-chemisch onderzoek te harmoniseren middels rondzendingen is bereikt door aanschaf van gelijke analysesystemen en gebruik te maken van dezelfde batch reagentia en kalibratoren. Deze systemen worden herleid op een gemeenschappelijk referentiesysteem.

Conclusie: De beoordeling van de routinesystemen laat aan de hand van een 6-sigmascoring zien dat de verschillende laboratoria een klinisch gelijk antwoord kunnen leveren aan de aanvragende arts/specialist. De resultaten van de rondzendingen laten tevens zien dat een introductie van een gemeenschappelijke set aan referentie-intervallen een volgende (logische) stap is.

56. Vaststelling van hemocytometrische referentie-intervallen in het kader van regionale harmonisatie

D. van LOON, F.J.L.M. HAAS
Klinisch Chemisch Laboratorium, St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein

Inleiding: In het kader van een regionaal programma voor harmonisatie van klinisch-chemische onderzoeksresultaten zijn de referentie-intervallen vastgesteld voor hemocytometrisch onderzoek.

Methode: Voor het vaststellen van de referentie-intervallen is gebruik gemaakt van materiaal afkomstig van 400 donoren (200 mannen en 200 vrouwen). Uit deze materialen zijn de gangbare hemocytometrische parameters gemeten met behulp van een LH755 van Coulter Beckman. Van deze resultaten zijn de gemiddelden, de mediaanwaarden, de standaarddeviaties en de 5, respectievelijk 95 percentielwaarden berekend.

Resultaat: Van alle parameters zijn de referentie-intervallen vastgesteld. Voor een aantal parameters worden afwijkende intervallen verkregen ten opzichte van de huidige. Met name voor het hemoglobinegehalte wordt een verlaging van het interval gevonden met ongeveer 0,4 mmol/l. De nieuwe intervallen zijn vervolgens gecombineerd met resultaten van maand-

gemiddelden gedurende een periode van drie jaar (controle op drift) als ook met resultaten van een regionale rondzending hemocytometrie en de enquêteresultaten van de SKML. Ook de gegevens van twee andere medische laboratoria in de directe omgeving laten voor de verdeling van de hemoglobineconcentraties van de patiëntenpopulaties (middels een Bhat-tacharya-berekening) geen verschillen zien met onze gegevens.

Conclusie: De nieuw vastgestelde intervallen voor de hemocytometrische parameters laten voor de hemoglobine- en hematocrietwaarden een verlaging zien ten opzichte van de huidige intervallen, die eveneens zijn bepaald met donor materiaal, maar slechts afkomstig van 50 mannen en 50 vrouwen. Onze conclusie is dat er geen verschuiving heeft plaatsgevonden in de patiëntresultaten maar dat de huidige referentie-intervallen destijds te hoog zijn ingeschat

57. Gemiddelde HbA1c als prestatie-indicator in de gezondheidszorg?

R.C. EIJKMAN-ROTTEVEEL, B.E.P.B. BALLIEUX, J. van PELT

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden

Inleiding: In oktober 2003 werd in 'Medisch Contact' aangekondigd, dat ziekenhuizen de kwaliteit van zorg toetsbaar gaan maken middels een basisset prestatie-indicatoren, opgesteld door de Inspectie voor de Gezondheidszorg (IGZ) (1, 2). De prestatie-indicatoren moeten voldoen aan een aantal voorwaarden (3). De indicator moet een directe relatie hebben met aspecten van de zorg waarvoor in Nederland kwaliteitsverbetering is gewenst en de benodigde gegevens moeten gemakkelijk verkrijgbaar zijn. Een van de voorgestelde prestatie-indicatoren is de "gemiddelde HbA1c-waarde van patiënten binnen de geïntegreerde diabeteszorg".

Methode: In de toelichting over het gebruik van het gemiddelde HbA1c is geen rekening gehouden met analytische, biologische en interlaboratoriumvariatie. Laatstgenoemde heeft op het gemiddelde HbA1c de meeste invloed. Ook verschillen in samenstelling van de patiëntenpopulaties spelen een rol. Moeilijk in te stellen patiënten zullen frequenter vervolgd worden en onevenredig op het HbA1c-gemiddelde drukken. Daarnaast ontbreken statistische gegevens, zoals de grootte

van de groep, de standaarddeviatie van het gemiddelde HbA1c en de scheefheid van de verdeling.

Resultaat: Binnen de academische centra varieert, voor zover bekend, het gemiddelde HbA1c van 6,8 tot 8,1. Uit de SKML-enquetes kan berekend worden, dat de interlabvariatie ongeveer 5% is bij een HbA1c van 7. Dit geeft een kritisch verschil van 0,9 voor het gemiddelde HbA1c, uitgaande van vergelijkbare patiëntenpopulaties. Een waarde van bijvoorbeeld 7,3 is dus niet significant verschillend van 6,8.

Conclusie: Zonder gedegen kennis van de verschillende bronnen van variatie kunnen verschillen tussen HbA1c-gemiddelden niet op een juiste manier worden geïnterpreteerd. Overigens is deze parameter wel uitermate geschikt om veranderingen binnen het eigen zorgproces te vervolgen.

Literatuur:

1. Y. Meijerink et al. Medisch Contact 2003, 58: 40; 1531-1534.
2. www.IGZ.nl bij Prestatie-indicatoren, aanbiedingsbrief 2004.
3. M. Berg et al. Medisch Contact 2003, 58: 40; 1535- 1538

Categorie 2 Bedrijfsvoering

'Human resource management'

58. 'Psychologisch contract' als basis voor medewerkersontwikkeling

F.M. VERHEIJEN, E. SCHEPPINK, F.D. POSMA

Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuisgroep Twente, Almelo

Inleiding: De ziekenhuisgroep Twente is een fusieziekenhuis tussen het Twenteborg ziekenhuis en het SMT. Na de fusie waren er gevoelens van onvrede bij medewerkers. Deze zijn in het begin van 2003 geanalyseerd door groepsgesprekken met alle medewerkers. Verbeterpunten waren: 1) Onvoldoende draagvlak beleid. 2) Onvoldoende communicatie. 3) Onvoldoende ontwikkeling. Naar aanleiding hiervan is een meerjarentraject gestart. De uitwerking en resultaten zijn hieronder beschreven.

Methode: De aanpak van het traject bestond uit: a) De beleids-cyclus kent een aantal kritische succesfactoren. Het opstellen gebeurt bottom-up met brainstormsessies voor medewerkers. Het jaarplan is af voordat POP-gesprekken plaatsvinden. b) Er is een communicatieplan gemaakt waardoor beleid vaak ter discussie staat. c) Er is een nascholingsprogramma gemaakt. d) De groep leidinggevendenden die jaargesprekken houden is

vergroot. e) Er is gekozen voor een coachende manier van leidinggeven.

Resultaat: Na een volledige cyclus is er geëvalueerd. 1) Het draagvlak voor de meerjarenbeleidsplannen is gegroeid. 2) De participatie van medewerkers in projecten en ontwikkelingen binnen het laboratorium is vergroot (>95%) en beter in beeld. 3) Doordat het aantal medewerkers per leidinggevende kleiner is geworden is er meer persoonlijke aandacht.

Conclusie: Door het beleid in te bedden in de structuur van de organisatie is het gelukt om een reële invulling te geven aan persoonlijke ontwikkeling. Persoonlijke ontwikkeling die ook aansluit bij de organisatiebelangen, vertaald als 'het psychologisch contract'. Communicatie vanuit leidinggevende naar medewerkers verdient continu aandacht. De coachende stijl van leidinggeven zal zich in de komende jaren verder moeten bewijzen.

Automatisering, dataverwerking

59. Codering voor materiaalsoort en monsterrouting binnen buistypering en monsternummer; het op juiste wijze benutten van de gerobotiseerde preanalyse

J.C. FISCHER

Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam

Inleiding: De koppeling van preanalytische, naast analytische, automaten aan het laboratoriuminformatiesysteem (LIS) betekent een verdere verwevenheid van de informatisering met de logistiek van patiëntmateriaal binnen het laboratorium. Dit stelt eisen aan de systematiek van buistypering en monsternummer. Ook moet rekening worden gehouden met de informatiebehoefte van medewerkers bij de bloedafname en bij de handmatige behandeling van patiëntmateriaal. Hoewel de voorgestelde systematiek gebaseerd is op de functionaliteit van LABZIS2 kan de basisgedachte ook worden gebruikt bij een ander LIS.

Methode: Alle beschikbare bepalingen werden opgedeeld in pakketten en aan elk pakket werd een unieke buistypering toegekend. Er werd een 4-karaktercode gebruikt. De buistypering verschijnt op de prikopdracht en helpt de medewerker bij het kiezen van de juiste buizen bij de bloedafname.

Resultaat: De typering is als volgt opgebouwd: 2de positie: het anticoagulans/materiaal (H=heparine, S=serum, U=urine, etc);

3de positie: het buisvolume (bijv. 4= 4,5 ml); 4de positie: opmerking (G=gelbuis, X=geen gelbuis, A=afdraaien, N=niet afdraaien). De 1ste positie werd gebruikt om de buistypering met een willekeurige letter uniek te maken binnen het LIS. Aan het oorspronkelijke 7-cijferige monsternummer zijn 2 extra cijfers toegevoegd die binnen de lokale programmatuur van de grote automaten de eenduidige koppeling maken met de buistypering. Dit geeft op de etiketten de volgende informatie: 1ste extra cijfer: anticoagulans (1 t/m 4: heparinegelbuis, 5 t/m 8: serumgelbuis, 9: geen gelbuis); 2de extra cijfer: eindbestemming van het materiaal binnen of buiten het laboratorium (bijv. 0: LAKC sectie Chemie; 4: Laboratorium Endocrinologie, etc.). Per eindbestemming konden daarmee 4 heparinegelbuizen en 4 serumgelbuizen worden gedefinieerd. Dit blijkt in de praktijk ruim voldoende om alle bepalingen onder te kunnen brengen.

Conclusie: Het systeem is inmiddels meer dan een jaar, succesvol, operationeel.

Hart- en vaatziekten, atherosclerose

60. High acute-phase response in women with a history of severe preeclampsia

B.B. van RIJN^{1,2}, M. ROEST², J.G. van der BOM³, H.W. BRUINSE¹, A. FRANX⁴, H.A.M. VOORBIJ²

Division of Perinatology and Gynaecology¹ and Research Laboratory of the Department of Advanced Clinical Chemistry², University Medical Center Utrecht, Utrecht, Department of Clinical Epidemiology³, Leiden University Medical Center, Leiden, Department of Obstetrics and Gynaecology⁴, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

Introduction: It has been hypothesized that an aggravated generalized inflammatory response towards pregnancy plays a key role in the development of preeclampsia. C-reactive protein (CRP) is an acute-phase protein and a sensitive marker of low-grade intravascular inflammation. We examined differences in acute-phase response after administration of an influenza vaccine in women with a history of severe preeclampsia, as compared to women with a history of normal pregnancy.

Methods: As cases we recruited 40 women with a history of severe preeclampsia (onset <34 weeks) and as controls 24 women with a history of only uncomplicated pregnancies. The cases and controls received an influenza vaccine at least 12 weeks after pregnancy and venous blood samples were col-

lected before, at 1 day and at 3 days after vaccination for measurement of inflammatory markers. High-responders were identified by a rise in CRP from baseline to the mean of day 1 and 3 by at least 0.5 mg/L, corresponding to the upper quartile of the distribution.

Results: Medians (interquartile range) of baseline CRP levels were 1.55 (0.77 – 4.16) in the preeclampsia group and 0.82 (0.50 – 3.16) in the controls. Twenty-one (53%) of the cases showed a high response to vaccination, as compared to five (21%) of the controls (chi-square $p < 0.05$).

Conclusion: This in vivo experiment strongly supports the hypothesis that a high acute-phase response to inflammatory stimuli contributes to the development of preeclampsia.

61. Ischemia-modified albumin (IMA) is increased in normal pregnancy and preeclampsia

B.B. van RIJN^{1,2}, A. FRANX³, J.M. SIKKEMA¹, H.J.M. van RIJN², H.W. BRUINSE¹, H.A.M. VOORBIJ²

Division of Perinatology and Gynaecology¹ and Research Laboratory of the Department of Advanced Clinical Chemistry², University Medical Center Utrecht, Utrecht, Department of Obstetrics and Gynaecology³, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

Introduction: Ischemia-modified albumin (IMA) is a new highly sensitive marker of myocardial ischemia. Currently, no information is available on maternal IMA levels during normal and complicated pregnancy. Preeclampsia is associated with ischaemia and increased formation of free radicals in the placenta. We therefore hypothesized that production of IMA may occur in preeclamptic pregnancy.

Methods: Serum IMA and serum albumin concentrations were assessed in 12 patients with preeclampsia, 12 gestational-age matched normal pregnant controls, and 12 age matched non-pregnant controls. IMA was measured by the albumin cobalt binding (ACB) test. Mean serum levels were compared between groups by the students t-test and corrected for serum albumin levels by multivariate logistic regression analysis.

Results: Mean IMA levels were elevated in normal pregnant

controls (107.3 U/mL, 95%CI 102.5 to 112.01) as compared to non-pregnant controls (94.5 U/mL, CI 89.4 to 99.6; $p = 0.015$). In patients with preeclampsia, IMA levels were similar to normal pregnant controls (109.7 U/mL, CI 102.2 to 117.2; $p = 0.65$). Also, no significant difference in mean IMA levels was observed between preeclamptic women who delivered small-for-gestational-age infants ($N = 4$, 99.0 U/mL, CI 87.9 to 110.1; $p = 0.13$) and preeclamptic women without fetal growth restriction, or normal pregnant controls.

Conclusion: Serum IMA, which has been advocated as a clinical marker of myocardial ischemia, appears to be elevated during normal pregnancy. We found no significant association between raised IMA levels and preeclampsia, with or without fetal growth restriction.

62. Evidence for a critical role of the modifying subunit of glutamate-cysteine ligase in homocysteine pathophysiology

S.G. HEIL¹, L.A.J. KLUIJTMANS¹, A.S. de VRIESE⁵, M. den HEIJER^{2,3}, R. PFUNDT⁴, H.J. BLOM¹
Laboratory of Pediatrics and Neurology¹, Department of Endocrinology² and Department of Biostatistics and Epidemiology³, Department of Human Genetics⁴, Radboud University Nijmegen Medical Center, The Netherlands, Renal Unit⁵, University Hospital Gent, Belgium

Introduction: Hyperhomocysteinemia (HHcy) is associated with impaired endothelium-dependent vasodilatation and an increased risk of atherosclerosis and thrombosis. Despite intensive research, the pathophysiology of this association remains conjectural.

Methods: Female Wistar rats were fed a methionine enriched / low B vitamin diet to induce HHcy (n=8) or standard rodent chow (n=8) for 8 weeks. RNA was isolated from aorta, amplified and labeled using T7-based RNA amplification, and subsequently hybridized to a 5K oligonucleotide array. The results of the micro array analysis were confirmed by application of real-time quantitative PCR using SybrGreen. Levels of total homocysteine, cysteine, g-glutamylcysteine, glutathione and cysteinylglycine were measured by HPLC analysis in serum of HHcy and control rats.

Results: We show that the modifying subunit of glutamate-cysteine ligase (GCLM) was up-regulated in aorta of hyperhomocysteinemic rats, which was confirmed by real-time quantitative PCR (2.7-fold, P = 0.03). Glutamate-cysteine ligase is the rate-limiting enzyme of glutathione synthesis. Application of HPLC analysis showed that total glutathione levels were increased in serum of HHcy rats, which strongly correlated with GCLM mRNA expression in aorta of HHcy and control rats (Rs = 0.79, P = 0.004) and with total homocysteine levels in HHcy rats (Rs = 0.86, P = 0.007).

Conclusion: These findings suggest that GCLM is up-regulated to compensate for the adverse oxidative effects of elevated homocysteine on the vascular wall, and thus describe a previously undefined role for GCLM in the pathophysiology of hyperhomocysteinemia.

63. Oxidative Stress of the aged myocardium during CABG, the pump full size, mini or off, blood-or crystalloid cardioplegia

W. B. GERRITSEN¹, W.P. van BOVEN², D.S. BOSS¹, P. FRIEDMAN³, H. van SWIETEN², F.J. HAAS¹
Department of Clinical Chemistry¹, Thorax Surgery², Anesthesiology³, Sint Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands

Introduction: Arresting the aged myocardium during CABG is prone for contractile dysfunction. Myocardial oxidative stress as a result of reperfusion injury is a known causative factor. In an attempt to find the most protective strategy for the aged myocardium, we studied myocardial oxidative stress during four routinely used techniques to accomplish CABG: CCABG (Full size extra corporeal circulation (ECC), with cold crystalloid cardioplegia), BCABG (full size ECC with warm blood cardioplegia), MCABG (a mini ECC with warm blood cardioplegia) and off-pump CABG (OPCAB).

Methods: The aortic root coronary sinus gradient (Ao-Cs) of markers for oxidative stress and anti oxidant activity were measured during CABG in 40 consecutively operated patients who were 70 years or older. Malondialdehyde concentrations were used as a representative of oxidative stress, allantoin/uric acid ratios (A/U ratio's) as a representative of anti-oxidant activity in this study.

Results: During CCABG, Ao-Cs gradient of malondialdehyde was significantly increased during all reperfusion time points. During CCABG Ao-Cs gradient of A/U ratio's increased toward 54% ten minutes after reperfusion. During BCABG, MCABG and OPCAB Ao-CS of malondialdehyde concentrations was significant, although the trend was less steep. During BCABG, MCABG and OPCAB Ao-CS of U/A ratios remained below detection level during all reperfusion time points.

Conclusion: These results suggest a mild Ao-Cs gradient of oxidative stress and of anti-oxidant activity shortly after cross clamping during BCABG, MCABG and OPCAB as compared to CCABG in the older myocardium. Although these results do not correlate with any observed clinical outcome, biochemical data show differences in myocardial protection in favour of techniques using warm blood cardioplegia or OPCAB.

64. The effect of statin therapy on plasma high-density lipoprotein cholesterol levels is modified by paraoxonase type-1

T.M. van HIMBERGEN^{1,2}, L.J.H van TITS², J. de GRAAF², A.F.H. STALENHOF², M. ROEST¹, H.A.M. VOORBIJ¹
Research laboratory of the department of Clinical Chemistry¹, UMC Utrecht, Utrecht, The Netherlands, Department of Medicine², Division of General Internal Medicine, UMC Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands

Introduction: Statins reduce low-density lipoprotein cholesterol and can raise high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C). Paraoxonase type 1 (PON1) is an HDL bound enzyme, which associates with variations in plasma HDL-C. The inter-individual variation of PON1 levels is mainly caused by a common genetic variant (polymorphism) at position -107, a cysteine (C) to threonine (T) transition (-107C>T), in the promoter region of the enzyme. where the -107C isoform is associated with the highest concentrations of the enzyme. It is our aim to study the effect of paraoxonase on changes of HDL-C during statin therapy.

Methods: In 134 patients with familial hypercholesterolemia (FH) the PON1 status was determined at baseline with (1) PON1 -107C>T and 192Q>R genotype, (2) PON1 levels and (3) PON1 diazoxonase and arylesterase activity.

Results: The -107C>T and 192Q>R genetic variants tended to

influence HDL-C increment (P = 0.07 and P = 0.08 respectively), whereas, PON1 levels and activities significantly modified the HDL-C increment (P = 0.002 for PON1 levels and arylesterase activity and P = 0.001 for diazoxonase activity). The effects were even more evident among subgroup classifications based on PON1 status and baseline HDL-C concentrations: the HDL-C increment was more pronounced in subgroups of -107CT/TT or 192QR/RR combined with the low baseline HDL-C group (+13.9 percent or +0.11 mmol/L, 95% CI's 0.08 to 0.14, P < 0.001, respectively +15.4 percent or +0.12 mmol/L, 95% CI's 0.09 to 0.16, P < 0.001). In contrast, the -107CC or 192QQ genotype in combination with high baseline HDL-C, did not show a significant increase of HDL-C.

Conclusion: PON1 status in conjunction with baseline HDL-C levels predicts HDL-C increment due to statin therapy in patients with FH.

65. The contribution of plasma vWF concentrations, plasma fibrinogen concentrations and several genetic determinants involved in platelet aggregation to the risk of CVD

M. ROEST¹, A. BARENDRECHT¹, M. BOTS², P.H.M. PEETERS², Y.T. van der SCHOUW², H.A.M. VOORBIJ¹
Research Laboratory of the Department of Clinical Chemistry¹, The Julius Center for Health Sciences and Primary Care², University Medical Center Utrecht, the Netherlands

Introduction: Arterial and venous thrombosis are major causes of morbidity and mortality in the developed countries. We hypothesize that increased vWF and fibrinogen levels and genes coding for increased adhesion and activation of platelets increase the risk of arterial and venous thrombotic events.

Methods: The study is based on a cohort of 17,357 women, aged 49 to 70 years, who were followed from 1993 to 1999. During this period there were 98 Myocardial Infarction end points and 52 venous thrombotic events. The relation of plasma vWF and fibrinogen concentrations, blood group genotype and mutations in the gene of alfa2beta1, GPVI, GPIb and alfaIIb-beta3 to arterial and venous thrombosis is studied using a case cohort analysis including all investigated cases and 1467 women, who were randomly sampled from the entire cohort.

Results: Women with blood group A or B have 17% increased vWF concentrations, a 1.8 fold (95% CI: 1.0-3.3) increased incidence of IHD and a 2.7 fold (95% CI: 1.1-6.7) increased incidence of venous thrombosis when compared with women, who have blood group OO genotype, independent of plasma vWF concentrations or any other risk factor of CVD. The other determinants of platelet aggregation are not associated with the incidence of thrombosis.

Conclusion: Blood group ABO genotype is an independent determinant of both IHD and venous thrombosis. There is no strong evidence that vWF and fibrinogen levels nor the other genetic markers of platelet aggregation are important determinants of CVD.

66. The added predictive value of C-reactive protein

J.G. van der BOM^{1,2}, Y.T. van der SCHOUW¹, K.G.M. MOONS¹, M. ROEST³, D.L. van der A¹, M.L. BOTS¹, D.E. GROBEE¹, H.A.M. VOORBIJ³

Julius Center for Health Sciences and Primary Care¹, University Medical Center Utrecht, Department of Clinical Epidemiology², Leiden University Medical Center, Research laboratory of Clinical Chemistry³, University Medical Center Utrecht, The Netherlands

Introduction: It has been suggested that measurement of plasma CRP improves the assessment of absolute risk for cardiovascular disease, particularly in intermediate risk individuals. We compared estimated and observed risks of cardiovascular events with and without the use of plasma CRP in a cohort of women free from cardiovascular disease.

Methods: Between 1993 and 1997 15,848 women aged 49-70 years and free from cardiovascular disease were enrolled in the Dutch Prospect-EPIC cohort and followed for 4.4 years (range 0.1 to 6.6). At enrollment, women filled in questionnaires and blood samples were collected. For laboratory assessments a case-cohort study was performed among all 382 cases of an incident coronary event or stroke (cardiovascular events, CVD) and a ten percent random sample of the cohort. Framingham risk scores (FRS) were calculated for all subjects.

Results: CRP was an independent predictor of CVD events. FRS score predicted a high (>20 %) ten-year risk for 341 of the 15,848 women; 71 (20.8%) of them had a CVD event during follow-up. FRS score predicted an intermediate (10-20%) ten-year risk for 3108 of 15,848 women; 138 (4.4%) of these women had a CVD event during follow-up. CRP levels were translated into absolute risk. First we added points for intermediate and high CRP levels. This did not improve risk prediction. Second, subtracting points for low CRP levels marginally improved risk prediction.

Conclusion: Using CRP values as commonly suggested may lead to misclassification and possibly over-treatment of a considerable amount of patients. Whether and how CRP levels should be incorporated into currently used CVD prediction models needs to be established.

67. P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction

P.M. van der ZEE¹, É. BIRÓ², Y. KO², R.J. de WINTER¹, C.E. HACK³, A. STURK², R. NIEUWLAND²
Department of Cardiology¹ and Laboratory of Experimental Clinical Chemistry², Academic Medical Center, Amsterdam, Department of Immunopathology³, Sanquin Research at the CLB, and Department of Clinical Chemistry³, VU Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

Inleiding: Platelet activation plays a pivotal role in the development of cardiovascular diseases. Platelet-derived microparticles (PMP) are generally considered to reflect platelet activation. We studied whether PMP subpopulations reflect platelet activation and are related to systemic coagulation activation and inflammation.

Method: Using flowcytometry we analyzed microparticles (MP) from resting and activated platelets in vitro, as well as plasma MP from patients with stable angina, peripheral arterial disease (PAD), myocardial infarction (MI; non-ST-elevation (NSTEMI) and ST-elevation (STEMI)) and older age- and sex-matched and young healthy subjects (n=10 for all groups, except NSTEMI: n=11) for PMP exposing P-selectin or CD63. Plasma levels of soluble (s) P-selectin were determined (ELISA). The association between PMP subpopulations, coagulation activation (prothrombin fragment (F1+2) and thrombin-antithrombin complexes (TAT)) and inflammation (C-reactive protein (CRP)) was studied.

Resultaat: PMP increased upon platelet stimulation by calcium ionophore A23187 (2.5 µM; p<0.001) but not by thrombin-receptor activating peptide (TRAP, 15 µM; p>0.05). Subpopulations exposing P-selectin or CD63, however, increased after treatment with both A23187 (p<0.001 for both) and TRAP (p<0.001 and p<0.01, respectively), parallel to the exposure of these markers on platelets. Total circulating MP and PMP were comparable in all groups. Compared to young subjects, the P-selectin-exposing subpopulations increased in older subjects (p=0.02), and further increased in NSTEMI (p=0.007) and STEMI (p=0.045). CD63-exposing subpopulations increased in PAD (p=0.041), NSTEMI (p=0.001) and STEMI (p=0.049). Prior aspirin use in NSTEMI (n=5) and STEMI (n=5) did not affect the subpopulation size. Subpopulations exposing P-selectin or CD63 correlated with each other (r=0.581; p<0.001), but neither correlated with the plasma sP-selectin, F1+2, TAT or CRP concentrations.

Conclusie: PMP subpopulations are a plasma marker of platelet activation, even in patients using aspirin.

68. NT-proBNP concentrations and renal function

J.A. BAKKER¹, R.R.J. van KIMMENADE², Y.M. PINTO², M.P. van DIEIJEN-VISSER¹
Depts. Clinical Chemistry¹ and Cardiology², University Hospital Maastricht, The Netherlands

Introduction: In the last decade brain natriuretic peptide (BNP) and the N-terminal part of the prohormone (NT-proBNP) have become the standard for the biochemical determination of congestive heart failure (CHF). Although much is clear about how BNP and NT-proBNP are released, less is known about the way BNP and, in particular, NT-proBNP are cleared from the body. The clearing of NT-proBNP is thought to be by glomerular filtration. This raises the question whether renal failure results in elevated NT-proBNP concentrations. In this study we investigated the relationship between NT-proBNP concentrations and creatinine clearance, the latter as a indication for glomerular filtration rate.

Methods: Three groups were studied: controls, hypertensive patients without a recorded cardiac history and patients with CHF (ejection fraction <40%). NT-proBNP was measured with an ECLIA method (Elecys, Roche), creatinine was determined using a Synchron LX-20 (Beckman). Creatinine clearance was

calculated using the creatinine concentrations in serum and 24-hrs urine collections.

Results: NT-proBNP concentrations in plasma in the CHF group were, as expected, significantly higher compared to both the hypertensive and control group: 1159±1269, 45.1±53.2 and 48.1±65.0 pmol/l respectively. The same was the case with plasma creatinine concentrations: 251±226, 95±39 and 134±110 respectively. The creatinine clearance in the CHF group was also significantly lowered compared to the other groups: 30.5±27.4, 97.0±44.4 and 78.5±42.2 ml/min respectively, although in all groups there was a large variation. Plotting creatinine clearance against serum NT-proBNP concentrations showed no clear relationship.

Conclusion: Elevated NT-proBNP concentrations in patients with diminished renal function reflect cardiac failure rather than be caused by the decreased glomerular filtration rate.

69. Cell-derived microparticles contain caspase 3 in vitro and in vivo

M.N. ABIDHUSSEIN¹, R. NIEUWLAND¹, C.M.HAU¹, L.M. EVERS², E.W. MEESTERS³, A. STURK¹
Departments of Clinical Chemistry¹ and Experimental Vascular Medicine², Academic Medical Center of the University of Amsterdam, Department of Internal Medicine³, Slotervaart Hospital, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Microparticles (MP) from endothelial cells (EMP) circulate in disease states, but the processes underlying their release are unclear. We investigated whether adherent (viable) or detached (apoptotic) endothelial cells are the possible source of EMP in vitro, i.e. under control and interleukin (IL)-1 α activation conditions, and in vivo.

Methods: Adherent and detached endothelial cells, and EMP, were isolated from human umbilical vein endothelial cell cultures (n=6), treated without or with IL-1 α (5 ng/mL; 24 h). Cell fractions were analyzed by flow cytometry for annexin V binding, propidium iodide (PI) and caspase 3 staining (n=3). Caspase 3 in EMP was studied using Western blot (n=6) and flow cytometry (n=6). Plasma from healthy subjects and SLE patients (both n=3) were analyzed for caspase 3-containing (E)MP.

Results: Detached but not adherent cells double stained for

annexin V and PI, confirming the apoptotic conditions of the detached cells and the viable nature of the adherent cells. Caspase 3 was solely present in the detached cells and procaspase 3 in the adherent cells. EMP contained caspase 3 regardless of the exposure of IL-1 α -induced adhesion receptors on the EMP. Counts of EMP and detached cells, but not adherent cells, highly correlated (r=0.959, P<0.0001). In vivo circulating MP from nucleated (endothelial cells, monocytes) and anucleated cells (platelets, erythrocytes) contained caspase 3.

Conclusion: EMP contain caspase 3 and may be mainly derived from detached (apoptotic) endothelial cells in vitro. The presence of caspase 3 in MP from anucleated cell types, however, suggests that its presence may not necessarily be related to apoptosis in vivo but may be associated with caspase 3 activation unrelated to apoptosis.

Categorie 3 Klinisch

Endocrinologie en intermediaire stofwisseling

70. Macroprolactinemia: the consequences of a laboratory pitfall

E. TOLDY¹, Z. LOCSEI², G.L. KOVACS^{1,3}, I. VERMES⁴
Central Laboratory¹, 1st Department of Medicine², Markusovszky Teaching Hospital of County Vas, Szombathely, Institute of Diagnostics and Management³, University of Pécs, Hungary and Departments of Clinical Chemistry, Medisch Spectrum Twente Hospital Group⁴, Enschede, The Netherlands

Introduction: Prolactin (PRL) circulates in three major molecular sizes. The biggest is the macroprolactin (bbPRL) with reduced bioactivity. The relative proportion of the different forms of PRL molecules may be quite different from patient to patient. The immunoassays have variable reactivity with bbPRL, therefore its presence should be considered in order to differentiate of macroprolactinemia (MPRL) from true hyperprolactinaemia (tHPRL).

Methods: 1015 patient sera with >700 mU/L PRL levels were selected and the fraction of bioactive PRL was also measured following polyethylene glycol (PEG) precipitation in the supernatant using an electrochemiluminescence (ECLIA, Elecys 2010, Roche) assay. The analytical and clinical validity of the PEG method were studied. In the second investigation period the degree of non-specific precipitation was measured in samples containing human recombinant PRL standard (3rd IRP WHO reference, Roche). "Free-prolactin" values were

calculated and the correlations were evaluated with known clinical and MRI findings.

Results: Relevant (recovery >40%) bbPRL was present in 21-23% of sera. Morphological abnormalities in pituitary imaging in the tHPRL patients were significantly more frequent (22-35%) compared to the MPRL (5-10%) group. The occurrence of galactorrhea, and infertility appeared much more often in the tHPRL patients. The MPRL and tHPRL occurred simultaneously in 15-28% of the patients. The prevalence of MPRL increases in women with advancing age (<30years: 14%, 30-45 years: 23%, >45years: 37%, P<0.001).

Conclusion: This finding supports the view that screening for macroprolactinemia may help avoid unnecessary and expensive radiological investigations and bromocriptine therapy. The joint occurrence of MRPL with tHPRL is a very important finding that should be considered in the clinical practice and the concept of "free-PRL" should be interpreted for the clinicians.

71. Een genetisch polymorfisme in CYP3A7 veroorzaakt 48% reductie in serum-DHEAS-spiegels

R.H.N. van SCHAIK¹, P. SMIT², M. van der WERF¹, A.W. van den BELD², J.W. KOPER², J. LINDEMANS¹, H.A.P. POLS², A.O. BRINKMANN³, F.H. de JONG², S.W.J. LAMBERTS²
Afd. Klinische Chemie¹, Interne Geneeskunde², Reproductie & Ontwikkeling³, Erasmus MC Rotterdam

Inleiding: Cytochroom P450 3A7 (CYP3A7) komt in principe alleen tijdens de foetale periode tot expressie. Recentelijk is een promotervariant ontdekt (CYP3A7*1C), waarbij een deel van de promotor van CYP3A4 voor het CYP3A7 gen terecht is gekomen. Aangezien CYP3A4 na de geboorte wel tot expressie komt, hebben individuen met het CYP3A7*1C-polymorfisme waarschijnlijk ook CYP3A7-enzymactiviteit.

Methode: Met behulp van PCR-RFLP is een assay voor CYP3A7 opgezet en gevalideerd middels sequencing. De frequentie van dit polymorfisme is bepaald in 500 kaukasiërs. Vervolgens zijn 208 ouderen (leeftijd 53-82 jaar; 98 mannen, 110 vrouwen) van de Rotterdam Studie (populatie-gebaseerde cohortstudie) geanalyseerd, en is het genotype vergeleken met de spiegels van het endogene CYP3A7 substraat DHEA(S).

Resultaat: Het CYP3A7-polymorfisme werd bij 6,4% van de kaukasische groep gedetecteerd (allen heterozygoot), wat resulteert in een allelfrequentie van 3,2%. In de Rotterdam Studie hadden heterozygote dragers van het CYP3A7*1C allel een significant lagere DHEAS-spiegel vergeleken met wild typen ($1,74 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$ versus $3,33 \pm 0,2 \mu\text{mol/l}$; $p=0,02$). Serum-androsteendion-, -estradiol-, -testosteron- en -IGF-1-spiegels correleerden niet met CYP3A7*1C-genotype.

Conclusie: Van de kaukasische bevolking draagt 6,4% het CYP3A7*1C-allel. Dragerschap impliceert CYP3A7-enzymactiviteit na de geboorte, wat zich vertaalt in 48% lagere DHEAS-serumspiegels. De endocriene implicaties hiervan dienen nader onderzocht te worden.

72. The effect of two consecutive mixed-meals on the numbers, cellular origin and phospholipid composition of cell-derived microparticles in healthy adults

M.E. TUSHUIZEN^{1,2}, E.G.H. PEYPERS^{1,2}, D.P. SNOECK^{1,2}, F.J. HOEK², A. STURK², R.J. HEINE¹, R. NIEUWLAND², M. DIAMANT¹

Department of Endocrinology / Diabetes Centre¹, Laboratory Experimental Clinical Chemistry², Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Blood cells and endothelial cells release microparticles (MP). MP membranes contain phospholipids, including phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylserine (PS), cholesterol and cell-specific proteins, such as glycoprotein IIIa. MP facilitate coagulation and elevated levels occur in patients at risk of thromboembolic events and cardiovascular disease. Since the postprandial state is associated with processes relevant to the development of atherosclerosis, we determined MP numbers, cellular origin, composition and function in healthy adults that received 2 high-fat meals.

Methods: Insulin-sensitive males ($n=12$) were studied during 2 visits, in random order. At visit A, subjects received two mixed-meals (50 g fat, 55 g carbohydrates, 30 g proteins) as a breakfast and 4 h later as lunch. During visit B, subjects fasted for 10 h. Blood samples were collected before and at 2, 4, 6 and 8 h after the first meal, to assess plasma glucose, insulin,

lipids and MP. MP were analyzed by flowcytometry, their lipid composition by hpTLC and procoagulant properties in a fibrin generation assay.

Results: During visit A, plasma glucose, triglyceride and insulin levels increased, especially after the second meal, as compared to baseline and visit B (both $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,01$, respectively). Platelet-derived MP constituted 88-98% of total MP. The overall increase in MP numbers was higher at visit A ($p<0,05$). Erythrocyte-derived MP increased upon each meal (both $p<0,01$). The overall phospholipid content of MP increased at visit A versus B ($p<0,02$), particularly PC ($p<0,02$), whereas cholesterol remained constant. Fibrin generation was unaffected.

Conclusion: The postprandial state affects the phospholipid composition of MP and the release of MP from erythrocytes, but not the ability of MP to support coagulation.

Categorie 3 Klinisch

Bloedvorming, bloedstolling, transfusie

73. Evaluatie van twee beslisbomen voor anemiediagnostiek

W.P. OOSTERHUIS¹, M. van der HORST², C. van DONGEN¹, H.J.L.M. ULENKATE³, M. VOLMER⁴, R. WULKAN⁵
Alle auteurs zijn lid van de werkgroep Klinische Chemometrie. St. Elisabeth Ziekenhuis¹, Tilburg, Schepers Ziekenhuis², Emmen Reinier de Graaf Groep³, Delft, Academisch Ziekenhuis⁴, Groningen, Medisch Centrum Rijnmond Zuid⁵, Rotterdam

Inleiding: Anemiediagnostiek lijkt zich in het bijzonder te lenen voor een geprotocolleerde benadering. Recent zijn er een tweetal algoritmes gepubliceerd (1). Beide schema's vertonen aanmerkelijke verschillen. Er is weliswaar veel theoretische onderbouwing van de richtlijnen, maar een experimentele toetsing ervan in de praktijk ontbreekt. Ook elders is ervaring opgedaan met de anemieanalyse met behulp van een beslisboom (2). In ons onderzoek werd de toepasbaarheid van de twee eerste schema's prospectief onderzocht en onderling vergeleken.

Methode: Patiënten: 133 patiënten die via huisartsen bij het laboratorium van het St. Elisabeth Ziekenhuis te Tilburg ($n=103$) en het Schepers Ziekenhuis te Emmen ($n=30$) werden aangemeld voor bepaling van een anemieprotocol. Laboratoriumonderzoek: alle bepalingen die in de beslisbomen voorkomen werden bij elke patiënt uitgevoerd, uitgezonderd Hb-elektroforese en beenmergonderzoek. De huisartsen werden benaderd voor klinische gegevens.

Resultaat: IJzerebrek en B12-deficiëntie zijn niet de meest voorkomende diagnoses, zoals in de NHG-standaard staat vermeld. Meestal is de anemie normocytair ($\pm 80\%$): als anemie bij een chronische aandoening of zonder duidelijke oorzaak. $\pm 20\%$ heeft een verhoogd kreatinine.

Conclusie: In beide schema's blijven veel patiënten moeilijk in te delen. Het NHG-protocol is niet sluitend, zodat een groot aantal patiënten ($\pm 50\%$) niet ingedeeld kan worden. De bepaling van kreatinine komt ten onrechte niet voor in het protocol van de NHG. Bepaling van hypersegmentatie in het kader van B12-deficiëntie (protocol DK3) is onpraktisch en zal zelden zo worden uitgevoerd. De schema's suggereren ten onrechte dat de diagnose van elke anemie via een schema kan worden gesteld, en missen de conclusie "anemie met een onduidelijke oorzaak" (2).

Literatuur: 1) Van Wijk MAM, Mel M, Muller PA et al. NHG-Standaard Anemie. Huisarts Wet 2003; 46: 21-9. 2) Kraaijenhagen RJ. Anemieanalyse. Analyse 2002; 133-137.

74. P450-polymorfisme en de dosisbehoefte aan orale antistolling

J.W.P.H. SOONS¹, S.L.J. WIJERS¹, H.L. VADER²

Klinisch Laboratorium¹, St. Annaziekenhuis, Geldrop, Klinisch Laboratorium², Maxima Medisch Centrum, Veldhoven

Inleiding: De interindividuele variatie in de dosisbehoefte aan orale anticoagulantia kan mogelijk veroorzaakt worden door de genetische variatie in de cytochroomP450-iso-enzymen. Er is vrij weinig bekend over de effecten van deze polymorfismen op de anticoagulantia die in Nederland gebruikt worden. Deze studie beschrijft de effecten van CYP2C9*2 en -3, CYP2C19*2 en CYP3A4*1B op de dosisbehoefte aan acenocoumarol en fenprocoumon.

Methode: 164 trombosedienstpatiënten zijn geïncludeerd. 121 gebruikten fenprocoumon en 43 gebruikten acenocoumarol. Van alle patiënten is het genotype bepaald voor CYP2C9*2 en *3, CYP2C19*2 en CYP3A4*1B. De genotypering is uitgevoerd met de PCR-RFLP-methode. De PT-INR is bepaald op een STA-Compact met TT-reagens. De dosisbehoefte van een jaar is gemiddeld en voor de studie genormeerd op de laatst verkregen PT-INR. De op deze wijze verkregen gemiddelde en genormeerde dosisbehoefte van de patiënt is vergeleken met het populatie gemiddelde.

Resultaat: De gevonden allelfrequenties zijn voor CYP2C9*1, *2, *3 respectievelijk 82%, 12% en 6%; CYP2C19*1, *2 respectievelijk 85% en 15%; CYP3A4*1, -1B respectievelijk 96% en 3,7%. Voor CYP2C9*2 en *3 zijn, vergeleken met het wild type, verlaagde waarden in de dosisbehoefte voor fenprocoumon (14% en 21%) en acenocoumarol (33% en 54%) gevonden. De andere onderzochte polymorfismen tonen geen invloed op de dosisbehoefte.

Conclusie: De significant lagere dosisbehoefte voor acenocoumarol en mogelijk fenprocoumon bij patiënten met het polymorfisme CYP2C9*2 of *3 is waarschijnlijk klinisch relevant. Het betrekken van het genotype bij het doseren van de anticoagulantia kan een nauwere instelling tot gevolg hebben. Over- en onderdosering zal zich hierdoor minder vaak voordoen bij trombosedienstpatiënten. Een studie in een grotere patiëntenpopulatie is hiervoor noodzakelijk.

75. Eén of twee hematologische maligniteiten?

J.W. SMIT^{1,2}, A.C. MULLER KOBOLD³, H. PIERSMA², R. BEKKEMA³, J.E.J. GUIKEMA³, G.W. van IMHOFF³, J.C. KLUIN-NELEMANS³

LabNoord¹, Martiniziekenhuis², Academisch Ziekenhuis³, Groningen

Inleiding: Het aantonen van hematologische maligniteiten (acute en chronische leukemieën, NHL) begint in het laboratorium met celtellers en microscopisch onderzoek. Een definitieve diagnose volgt na immunofenotyperingsonderzoek, waarbij het monoklonale karakter en/of het subtype kan worden vastgesteld. Soms komt het voor dat hierbij twee celpopulaties worden aangetoond, of dat er in de tijd een (andere?) maligniteit ontstaat. Is er dan sprake van één of van twee klonen? Hier worden 5 cases gepresenteerd. DNA-analyse van de celpopulaties, verkregen d.m.v. FACS, kan deze vraag beantwoorden.

Methode: Cases

1. B-CLL: CD19, CD20zw, CD5+, CD23, kappa zw, IgMzw, IgDzw (kleincellig) en een B-cel NHL: CD19st, CD20st, kappa, IgMzw, IgGzw (grootcellig)
2. B-CLL: lambda, IgM, IgD en B-CLL: lambda, IgA, IgD
3. B-CLL: kappa, IgM, IgD en B-CLL: lambda, IgM, IgD
4. T-PLL: CD4+, CD8zw+ en T-PLL: CD4-, CD8-
5. Mastocytose (mestcellen CD117++, CD25+ en/of CD2+) en AML (blasten CD117+, CD34+)

Aanvullend onderzoek

De subpopulaties werden m.b.v. FACS (Calibur, BD) geschei-

den. DNA werd geïsoleerd. Bij de B-cel-maligniteiten gevolgd door PCR voor het IgH-hypervariabele CDR3-gebied: CDR3-lengteanalyse m.b.v. capillaire gelelektroforese. Bij de T-PLL werd een Southern-blotanalyse verricht naar het TCR-ketens. In het geval van de patiënt met mastocytose en AML werd met behulp van PCR in combinatie met RFLP de aanwezigheid van c-kit mutatie (Asp-816 -> Val) aangetoond.

Resultaat:

Patiënt 1: B-CLL en B-NHL: één kloon.

Patiënt 2: B-CLL en B-CLL: één kloon.

Patiënt 3: B-CLL en B-CLL: twee klonen.

Patiënt 4: T-PLL en T-PLL: één kloon.

Patiënt 5: Mastocytose en AML: één kloon.

Conclusie: In onze benadering van de diagnostiek van hematologische maligniteiten wordt een bepaalde volgorde gehanteerd: cytometrie, morfologie, immunofenotypering. Meestal is dit voldoende voor de juiste diagnose. Echter zoals hier gepresenteerd kan vervolgonderzoek m.b.v. FACS- en DNA-analyse extra informatie verschaffen omtrent de oorsprong van verschillende maligne populaties.

76. Case report: een bijzonder geval van neonatale allo-immuuntrombocytopenie

C.M. HACKENG¹, J.C. SCHIPPER², P. van der BURG³, A.M. VLIAGER², F.J.L.M. HAAS¹, L. PORCELIJN³

Eenheid Klinische Chemie¹, Afdeling Kindergeneeskunde², St Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein, Stichting Sanquin Diagnostiek³, Amsterdam

Inleiding: In onze kliniek werd een meisje à terme geboren met een geboortegewicht van 4010 gram. Over het gehele lichaam waren petechiën, purpura en ecchymosen zichtbaar. Opvallend was een trombocytentel van 8 G/l. Differentiaal-diagnostisch werd gedacht aan een neonatale allo-immuun trombocytopenie (NAITP), infectieuze trombocytopenie en synthese stoornis bij trisomie 21

Methode: HPA-antistoffen zijn bepaald met behulp van MAIPA- en PIFT-technieken.

Resultaat: Moeder en kind zijn beide A-positief. De DAGT van het kind was negatief. Trombopoëtine was normaal. "Single-donor"-trombocyten waren niet voorradig gezien tijdstip en spoedeisend karakter. Daarom is 5-donorenconcentraat toegediend waardoor het trombogetal steeg naar 32 G/l. Bij een transfusiedrempel van 20 G/l was zij na 2 dagen weer transfusie-behoefte. Op twee eenheden single-donor-trombocyten had zij resp. een increment van 4 en 2 G/l. Op 5-donorenconcentraat

steeg zij naar 64 G/l. NAITP was werkdiagnose. Op dag 5 werd bekend dat de moeder antistoffen tegen humaan plaatjesantigeen (HPA)-3a en HPA-5b heeft. Uit HPA-genotypering bleek moeder homozygoot HPA-3b en HPA-5a te zijn, terwijl vader heterozygoot voor beide loci is. Genotypering van de patiënt wees uit dat zij HPA-3a3b en homozygoot HPA-5a is. Op HPA-3A- en HPA-5B-negatieve trombocyten had zij een increment tot boven de 200 G/l, in 5 donaties. Vanaf dag 36 waren haar HPA3A-antistoffen uit de circulatie verdwenen, waardoor zij binnen acht dagen steeg naar waarden rond 300 G/l.

Conclusie: Hoewel maternale HPA-5b-antistoffen niet symptomatisch waren werd hiermee wel rekening gehouden bij het zoeken naar een donor. Bij NAITP kan trombocytencentraat te prefereren zijn boven single donor. Als geschikte donoren voorhanden zijn dient toch terughoudend getransfundeerd te worden, omdat transfusie de trombopoëtinespiegels verlaagt en daarmee autologe productie remt.

77. PROS1 Mutation in a Dutch patient suffering from thrombosis

J. POODT¹, A.B. MULDER², M.A. KARIMAN², J.F.M. PRUIJT³, M.H.A. HERMANS¹

Jeroen Bosch Hospital, Multidisciplinary Laboratory for Molecular Diagnostics¹, Laboratory for Clinical Chemistry and Hematology² and Department of Hematology³, 's-Hertogenbosch

Introduction: PROS1 encodes protein S (PS), a vitamin K-dependent plasma protein that inhibits blood clotting by serving as a cofactor for activated protein C. The thrombotic risk associated with PS deficiency may vary according to underlying genetic defect.

Methods: Total and free PS antigen and PS activity were assessed in members of a family with a history of deep venous thrombosis and pulmonary embolism, using plasma assays (Diagnostica Stago). RNA was isolated from the proband thrombocytes and cDNA was generated using gene-specific primers.

Results: In most of the affected family members total PS antigen levels were normal to borderline, whereas free PS antigen and PS activity levels were reduced to 21% and 24% of normal, respectively. Sequencing of PROS1 mRNA revealed heterozygosity for a T to G mutation resulting in 467Val?Gly. The

amounts of 467Gly and 467Val mRNA were equivalent indicating that both alleles are likely to be similarly expressed. Sequencing genomic DNA confirmed the heterozygous presence of the mutation in exon 13.

Conclusion: We found a 467Val?Gly PROS1 mutation in the proband with a personal and family history of thrombosis. Previously, exactly the same mutation has been found in two apparently unrelated Dutch PS deficient families¹. The mutation either causes the PS deficiency or is a marker closely linked to the genetic defect responsible for the deficiency. Extension of PROS1 analysis of the family members of the herein described proband and functional studies of the Val467Gly protein will shed further light on the impact of Val467Gly on PS function.

Literature: 1 E. Gomez et al, *Thromb Haemost.* 1995, 73: 750.

78. Risico op bloedingen in patiënten met CYP2C9*2 of *3 allelen bij coumarinetherapie

R.H.N. van SCHAIK¹, L.E. VISSER^{2,3}, M. van VLIET¹, P.H. TRIENEKENS⁴, P.A.G.M. de SMET⁵, A.G. VULTO³, A. HOFMAN², C.M. van DUIJN², J. LINDEMANS¹, B.H.Ch. STRICKER²

Afd. Klinische Chemie¹, Farmacoepidemiologie Unit Interne Geneeskunde en Epidemiologie & Biostatistiek², Ziekenhuisfarmacie³, Erasmus MC Rotterdam, Stichting Trombosedienst en Artsenlaboratorium Rijnmond⁴, Afd. Klinische Farmacie⁵, Universitair Medisch Centrum St. Radboud, Nijmegen

Inleiding: Het belangrijkste enzym in het metabolisme van coumarines is cytochroom P450 2C9 (CYP2C9). De variant-allelen CYP2C9*2 en *3 coderen voor enzymen met verminderde enzymactiviteit. Er zijn aanwijzingen dat patiënten met CYP2C9-variantallelen een lagere onderhoudsdosering van anticoagulante therapie behoeven. Het risico op bloedingen in patiënten met CYP2C9-variantallelen is echter nog onvoldoende onderzocht.

Methode: In een populatie-gebaseerde cohort studie werden 996 patiënten gegenotypeerd voor CYP2C9*2 en *3 middels een TaqMan-assay. Alle patiënten zijn opgenomen die gestart zijn met acenocoumarol of fenprocoumon in de periode 1 januari 1991 – 31 december 1998, en waar INR-data beschikbaar van waren. Patiënten werden gevolgd tot het optreden van bloedingen, het einde van behandeling, overlijden of het

einde van de studieperiode. 'Proportional hazard'-regressie-analyse werd gebruikt om het risico op bloedingscomplicaties te berekenen in relatie tot CYP2C9-genotype, waarbij werd gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht, target-INR, INR, tijd tussen INR-metingen en gebruik van aspirine.

Resultaat: De 996 patiënten hadden een gemiddelde follow up van 481 dagen; 311 (31,2%) had tenminste 1 variant CYP2C9-allel terwijl 685 (68,8%) het wildtypegenotype hadden. Patiënten op acenocoumarol met een variant-CYP2C9-allel hadden een significant verhoogde kans op een grote bloeding (HR 1,83; 95% CI: 1,01-3,32). In patiënten op fenprocoumon werd deze relatie niet gezien.

Conclusie: Dragerschap van een CYP2C9-variantallel geeft een verhoogde kans op een grote bloeding bij antistolling-therapie met acenocoumarol, maar niet bij fenprocoumon.

Categorie 3 Klinisch

Infectie, afweer, allergie

79. Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry: Discovery of biomarkers useful in the diagnosis and follow-up of sarcoidosis

J.A.P. BONNS¹, K.W.H. WODZIG¹, M. DRENT², M.P. van DIEIJEN-VISSER¹

Departments of Clinical Chemistry¹ and Respiratory Medicine, Sarcoidose Management Center², University Hospital Maastricht, The Netherlands

Introduction: Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease that primarily affects the lungs and the lymphatic system. In young adults, pulmonary sarcoidosis is the second most common respiratory disease after asthma. The cause of the disorder is still unknown. Sarcoidosis is characterised by its pathological hallmark, the noncaseating granuloma. Till now there is no good marker for both diagnosis and prognosis of sarcoidosis. Aim of the present study is detection of potential protein biomarkers for the diagnosis of sarcoidosis and to find out if these potential biomarkers can differentiate sarcoidosis from diseases with a similar clinical presentation.

Methods: For the identification of sarcoidosis biomarkers, a modified method was used. Filtrated and dialyzed serum of 16 sarcoidosis patients and 16 healthy control persons was added on normal phase ProteinChip arrays (NP20). Proteins showing highly significant differences in peak intensity (Mann-Whitney Wilcoxon test (U-test)) were used for tree-building algorithms

to obtain the best classification models with Ciphergen Patterns software.

Results: For both the filtrated and dialyzed serum, one peak was found to discriminate sarcoidosis of control samples, namely m/z 2454 Da and m/z 4288 Da for respectively filtrated and dialyzed serum. Both peaks were down regulated in sarcoidosis and gave sensitivities of 100% for sarcoidosis and controls in the learn set. A 10-fold cross validation was performed with resulting sensitivities for respectively filtrated and dialyzed serum of 100% and 94% for sarcoidosis and 88% and 94% for healthy controls.

Conclusion: This study acts as a proof-of-principle for the use of SELDI-TOF in the investigation of sarcoidosis. Further research is needed to detect specific sarcoidosis biomarkers to discriminate sarcoidosis from other inflammatory diseases, eventually followed by implementation of a quantitative assay.

80. Complement-C3- en -C4-metingen bij gecementeerde en ongecementeerde totale heupprothesen

J.W. SMIT¹, M. de JONGE², A.F. KLEINHERENBRINK², R.F.M. OUDE ELFERINK¹, J.J.A.M. van RAAIJ²
LabNoord¹, Afdeling Orthopedie², Martini Ziekenhuis, Groningen

Inleiding: Bij totale heupprothese treedt bij 5-10 % van de patiënten een complicatie op. De belangrijkste complicatie is een infectie. Infecties treden vaker op bij gecementeerde heupen. In de literatuur wordt gesuggereerd dat methylmetacrylaat, dat als cement wordt gebruikt, het complementsysteem activeert. Vraagstelling orthopedie: activeert cement het complementsysteem?

Methode: Pilot met twee groepen patiënten: 1. Heupprothese met cement: man 2, vrouw 23. Gemiddelde leeftijd 72,2 jaar (62-81) 2. Heupprothese zonder cement: man 4, vrouw 4. Gemiddelde leeftijd 60,4 jaar (57-66). Laboratoriumbepalingen: C3- en C4-metingen met applicatie op de Beckman Coulter Synchron LX.

Resultaat: Complementmetingen van 4 controlemonsters van verschillende niveaus waren overeenkomstig de opgegeven targetwaarden.

Referentiewaarde (n=15): C3 128,8 (65,6-192); C4 24,7 (11,7-37,0)

Complementmetingen bij patiënten, gemiddelden in mg/dl:

Patiënten + cement (N=25):

	preOK	1 uur postOK	24 uur postOK
C3:	120,3	92,1	98,4
C4:	24,1	18,2	18,9

Patiënten - cement (N=8):

	preOK	1 uur postOK	24 uur postOK
C3:	115,7	88,9	98,1
C4:	26,2	19,5	21,5

Activeert cement het complementsysteem? Geen verschillen +/- cement voor C3 en C4. In beide patiëntengroepen dalen de complementspiegels tijdens de OK, daarna stijgen de spiegels weer; na 24 uur zijn de uitgangswaarden niet bereikt. Bij meting van totaal eiwit en albumine blijkt dat deze stoffen dezelfde kinetiek vertonen.

Conclusie: C3- en C4-metingen m.b.v. de Beckman Coulter Synchron-applicatie lijken goed mogelijk, en te gebruiken in de diagnostiek. LabNoord-referentiewaarden zijn overeenkomstig die uit de literatuur. Resultaten controlemonsters liggen voor vrijwel alle monsters binnen de grenzen. Geen verschillen +/- cement voor C3 en C4. C3- en C4-concentraties veranderen na correctie voor eiwitconcentraties niet. Mogelijk zijn de bepalingen van C3 en C4 te ongevoelig en zijn eventueel andere complementeiwitten, zoals C3a en C5a, gevoeliger parameters.

81. Time related associations between urine hepcidin, serum iron and plasma cytokine levels after LPS injection in man

E.H.J.M. KEMNA¹, R.P. PICKKERS², D.W. SWINKELS¹

Department of Clinical Chemistry¹, Department of Intensive Care Medicine², Radboud University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

Introduction: Hepcidin is a small, cysteine-rich cationic peptide, produced by hepatocytes. It is expected to be the key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. In turn, hepatic hepcidin expression is regulated by hypoxia, anemia, iron stores, and inflammation. The present study aims to confirm previous findings of IL-6 on the effect of inflammation on iron regulation in human in vivo studies by using lipopolysaccharide (LPS) as a more upstream inflammation activator. Therefore, in an experimental in vivo human endotoxemia model, we studied the time related associations between serum iron, urine hepcidin and different plasma cytokines.

Methods: 10 healthy subjects received a bolus of 2 ng/kg body weight Escherichia coli 0113 LPS intravenously. Blood and urine samples were taken before LPS infusion and serially thereafter at regular time intervals up to 22 hours. Iron para-

meters and urine creatinine were determined using a routine chemistry analyser (Aeroset). Plasma interleukin levels were measured, using simultaneous Luminex Assay. Urinary hepcidin assay was performed at UCLA, CA, USA 1.

Results: From t= 0 to t=6 hours after LPS injection, urine hepcidin levels increase significantly (p < 0.05) whereas from t= 0 to t= 22 hours serum iron values decrease (p < 0.05). Results of plasma cytokine measurements and the relationship with hepcidin urine levels will be presented.

Conclusion: Results from this human in vivo study confirm the data from previous studies with IL-6 in that LPS initiates a time related simultaneous increase of urine hepcidine and decrease of serum iron levels in man. These results may contribute to the design of therapy of the anemia of inflammation.

Literature: 1. Nemeth et al. J Clin Invest 2004, 113: 1271-1276.

82. Effect of inflammatory attacks in the classical type hyper-IgD syndrome on immunoglobulin D, cholesterol and parameters of the acute phase response

A. SIMON¹, J. BIJZET, A. MANTOVANI¹, J.W. van der MEER¹, J.P. DRENTH¹, H.A.M. VOORBIJ²

Department of General Internal Medicine¹, University Medical Centre St Radboud, Nijmegen, Research Laboratory of the Department of Clinical Chemistry², University Medical Centre Utrecht, The Netherlands

Introduction: Classical type hyper-immunoglobulin D (IgD) syndrome (HIDS) is an hereditary auto-inflammatory disorder, characterized by recurrent episodes of fever, lymphadenopathy, abdominal distress and a high serum concentration of IgD. It is caused by mevalonate kinase deficiency. **OBJECTIVE:** To further characterize the acute phase response during fever attacks in HIDS in order to improve diagnosis.

Methods: Twenty-two mevalonate kinase-deficient HIDS patients were included. Blood samples were drawn during and in between febrile attacks, and concentrations of C-reactive protein (CRP), ferritin, procalcitonin, pentraxin 3, IgD and cholesterol in several lipoprotein fractions were determined.

Results: The marked acute phase response at the time of a fever attack in classical type HIDS is reflected by a rise in CRP accompanied by a moderate but statistically significant

rise in procalcitonin and pentraxin 3. In only two of 22 patients, procalcitonin concentration rose above 2 ng mL(-1) during fever attack, compatible with the noninfectious nature of these attacks. Ferritin does not reach the high concentrations found in adult-onset Still's disease. Despite the defect in mevalonate kinase, a component of cholesterol metabolism, serum cholesterol did not change during attacks. IgD concentration is elevated regardless of disease activity, although there is appreciable variation during life. Its role in HIDS remains unclear.

Conclusion: The combination of high CRP concentration plus procalcitonin concentration <2 ng/mL in a symptomatic HIDS patient might indicate a febrile attack without (bacterial) infection; this observation warrants further investigation for its usefulness as a marker in clinical practice.

83. Effect of gender, ethnicity and genotype on interpatient variability in the pharmacokinetics of efavirenz

P.W. SCHENK¹, D.M. BURGER², I.P. van der HEIDEN¹, C.J.L. la PORTE², M.E. van der ENDE¹, P. GROENEVELD³, C. RICHTER⁴, P.P. KOOPMANS², F.P. KROON⁵, H. SPRENGER⁶, J. LINDEMANS¹, R.H.N. van SCHAIK¹
Erasmus MC University Medical Center Rotterdam¹, University Medical Center Nijmegen / Nijmegen University Center for Infectious diseases², Isala Hospital Zwolle³, Rijnstate Hospital Arnhem⁴, Leiden University Medical Center⁵, University Hospital Groningen⁶, The Netherlands

Introduction: The pharmacokinetics of the HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz is characterised by large interpatient variability, which frequently leads to sub-therapeutic (<1.0 mg/L) or toxic (>4.0 mg/L) efavirenz plasma levels. We investigated a range of factors possibly underlying the interpatient variability of efavirenz plasma levels.

Methods: In this retrospective multicenter study, efavirenz plasma levels were measured in 255 patients included in the national Therapeutic Drug Monitoring service. For all measurements, information on gender, age, body weight, length, race, time between sampling and last intake, and hormonal contraceptive use was recorded. In addition, subjects were genotyped for the single nucleotide polymorphism CYP2B6 C1459T, which corresponds to the Arg487Cys amino acid change and decreased CYP2B6 activity, using PCR-RFLP. Differences in plasma levels between

subgroups were compared by ANOVA and regression analysis.

Results: In a multivariate analysis, gender, time after intake and ethnicity were significantly associated with the efavirenz plasma level. The mean plasma level (\pm SD) in females was 4.0 ± 3.2 , versus 2.8 ± 1.7 mg/L in males ($P < 0.001$). Mean efavirenz plasma levels in Asians ($n=10$), blacks ($n=84$) and Caucasians ($n=161$) were 3.3 ± 1.6 , 3.8 ± 3.0 and 2.8 ± 1.6 mg/L, respectively ($P=0.003$). There was no significant influence for body weight or contraceptive use, and we did not find a relationship between the C1459T polymorphism in the CYP2B6 gene and alterations in efavirenz plasma levels in 228 samples where DNA could be amplified.

Conclusion: Gender and race are important factors determining the interpatient variability in efavirenz plasma levels. In this study, there was no effect of the CYP2B6 polymorphism C1459T.

Categorie 3 Klinisch

Nierziekten

84. Elucidating the mechanism of Lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus

I. WILTING^{1,2}, R. BAUMGARTEN³, K.L.L. MOVIG⁴, J. van LAARHOVEN⁵, A. J. APPERLOO⁶, W.A. NOLEN⁷, E.R. HEERDINK¹, A.C.G. EGBERTS^{1,2}

Department of Pharmacoepidemiology and Pharmacotherapy¹, Institute for Pharmaceutical Sciences, Utrecht University, Hospital Pharmacy² TweeSteden Hospital and St Elisabeth Hospital, Tilburg, Hospital Atrium Medical Center³, Heerlen, Department of Clinical Pharmacy⁴, Medisch Spectrum Twente, Enschede, Department of Psychiatry⁴, Department of Nephrology⁵, St. Elisabeth Hospital, Tilburg, Department of Psychiatry⁷, Academic Hospital, Groningen, The Netherlands

Introduction: Acquired nephrogenic diabetes insipidus (NDI), defined by renal inability to concentrate urine in response to vasopressin (AVP), is a complication in about 12-54% of lithium users. Concentration of urine is initiated through AVP-induced cAMP-mediated phosphorylation of subapically located Aquaporin-2 (AQP2) molecular waterchannels in kidney collecting duct cells. Subsequent fusion of AQP2 molecules with the apical membrane renders these cells water permeable. Upon AVP-stimulation part of cAMP and AQP2 is excreted into urine. Previous research has shown that lithium-induced NDI correlates with low AQP2 levels in urine. We studied if low urinary AQP2 levels in lithium-acquired NDI can be attributed to direct toxicity of lithium on the AQP2-gene or molecule or whether it is caused by decreased cAMP levels.

Methods: We conducted a cross sectional study in a cohort of patients under chronic lithium treatment: 10 patients with polyuria (24-hour urinary volume > 3L) and 10 patients with-

out polyuria. We monitored the kidney's response (rise in osmolality, urinary cAMP and AQP-2) to waterloading (minimal renal stimulation) followed by administration of AVP (maximal stimulation). Urine was collected from 2 hours before until 4 hours after AVP administration. A linear regression analysis was performed for difference between minimal and maximal reached urine cAMP and maximal reached urine osmolality.

Results: The rise in cAMP was found to correlate ($r^2 = 0.784$) to maximal reached urine osmolality. Overall, due to inter-individual variability, no significant relation could be found for rise in AQP-2 and maximal reached urine osmolality. On an individual basis however low cAMP levels corresponded to low AQP-2 levels in urine.

Conclusion: Our study shows that in humans an impaired AVP-induced cAMP production is causative for lithium induced NDI.

85. Het gebruik van reticulocytenindices bij diagnostiek van ijzer- en EPO-therapie bij dialysepatiënten

J. de JONGH-LEUVENINK, C. BEERENHOUT, K. MORET

Klinisch Chemisch Laboratorium, Maxima Medisch Centrum, locatie Eindhoven

Inleiding: Dialysepatiënten worden vaak behandeld met erythropoetine (EPO) en ijzer (Venofer). Hierbij wordt volgens het protocol van de Dialyse Groep Nederland (DGN) gedoseerd op geleide van het ferritine en het % transferrine saturatie. Recent zijn nieuwe parameters beschikbaar om ijzertekort en respons op ijzertherapie te vervolgen zoals CHR en % hypochrome erythrocyten. Het doel is van deze studie om de diverse reticulocytenindices en de bestaande erythrocytenparameters te vervolgen bij de patiënten van de dialyseafdeling om een bruikbaar protocol te formuleren. Met een dergelijk protocol wordt nagestreefd dat het Hb rond 7,2 mmol/l is en het ferritine tussen 250 – 400 ug/l. Op deze manier zijn mogelijk minder laboratoriumbepalingen nodig en gebruik van EPO en ijzer efficiënter.

Methodie: Bij alle patiënten van de dialyseafdeling zijn gedurende 6 maanden elke maand normale controles voor hemato-

logie en ijzer geprikt en daarbij zijn de reticulocytenindices meegenomen en het CRP. De hematologische parameters zijn gemeten met drie celltellers namelijk Gen S (Beckman-Coulter), XE 2100 (Goffin Meyvis), Advia 120 (Bayer).

Resultaat: Wat direct opvalt, is dat er weinig patiënten zijn met een ijzergebrek. Wel meerdere met ijzerstapeling. De resultaten worden ingedeeld per patiëntengroep naar waarden van ferritine en % transferrinesaturatie. Meerdere parameters (MRV, Ret-He, CHR, Rsf) of combinaties hiervan zijn bij bepaalde patiëntengroepen van voorspellende waarde. Er zijn geen opvallende verschillen aangetoond tussen de verschillende celltellers.

Conclusie: De reticulocytenindices, wel of niet in combinatie met de erythrocytenparameters, zijn goed bruikbaar bij specifieke patiëntengroepen om de respons op therapie of ijzerstapeling te voorspellen.

86. Activatie van trombocyten en vorming van trombine tijdens hemodialyse

M. SCHOORL, P.C.M. BARTELS, M. SCHOORL
Laboratorium voor KCHI, Medisch Centrum Alkmaar

Inleiding: Tijdens hemodialyse (HD) vindt intensief contact plaats tussen bloed en de kunstnierenmembraan. Contact kan leiden tot activatie van trombocyten en het genereren van trombine.

Methode: Het onderzoek is gericht op de vraag of de wijze van antistolling tijdens hemodialyse van invloed is op de mate van activatie. CD62p en plaatjesfactor 4 (PF4) komen vrij uit de alfa-granula van de trombocyten. Bij activatie van trombine komen protrombinefragment 1 en 2 (F1+2) en soluble glycoproteïne V (sGPV) in toenemende mate voor in plasma. Acht patiënten werden gedialyseerd op een F-60-membraan. Achtereenvolgens zijn heparine (2000-3500 IU + continu tijdens HD 1000 IU/uur), LMWH (fragmin, 2000-5000 U) en tri-natriumcitraat (continu) als anticoagulans gebruikt. Tijdens behandeling is bloed afgenomen op t=0, 5, 30, 60 en 150 minuten.

Resultaat: Het percentage CD62p-positieve trombocyten stijgt bij gebruik van heparine en LMWH op analoge wijze van

20±10% (Xgem.± SEM) op t=0 naar 40±12% op t=5 en 50±10% op t=30 minuten. De PF4-concentratie stijgt van 20±5 kIU/l op t=0 naar 100±10 kIU/l op t=5 minuten. In een later stadium neemt PF4 weer af naar 50±12 kIU/l op t=150 minuten. Tijdens citraatdialyse is er geen enkele toename van CD62p en PF4. De concentratie sGPV stijgt van 48±16 kIU/l op t=0 naar 60±20 kIU/l op t=150 minuten. De plasmaconcentratie van F1+2 blijft constant. Verhoogde concentraties F1+2 op t=0 (3,3±0,5 nmol/l) wijzen op een verhoogde stollingsneiging als gevolg van het voortdurend genereren van trombine gedurende de frequente HD-sessies.

Conclusie: Gebruik van heparine of LMWH heeft geen effect op de snelheid en de mate van stollingsactivatie. Citraatdialyse resulteert in een verminderde activatie van trombocyten, terwijl generatie van trombine analoog aan heparine en LMWH geschiedt.

87. CYP3A4*1B-genotype is geassocieerd met verhoogde orale cyclosporineklaring in nier- en harttransplantatie patiënten

R.H.N. van SCHAIK¹, D.A. HESSELINK², T. van GELDER³, A.H.M.M. BALK⁴, I.P. van der HEIDEN¹, M. van der WERF¹, T. van DAM², W. WEIMAR², R. MATHOT³

Afd. Klinische Chemie¹, Interne Geneeskunde², Ziekenhuisfarmacie³, Cardiologie⁴, Erasmus MC Rotterdam

Inleiding: Het gebruik van cyclosporine als therapie bij transplantatie wordt bemoeilijkt door de vele bijwerkingen, de nauwe therapeutische breedte en de uitermate hoge variabiliteit in farmacokinetiek. Ten behoeve van de behandeling van cyclosporine wordt 'therapeutic drug monitoring' uitgevoerd teneinde de effectiviteit van therapie te vergroten en de bijwerkingen te verminderen. Farmacogenetica zou een bijdrage kunnen leveren aan het bepalen van de juiste startdosering van cyclosporine bij transplantatiepatiënten. Cyclosporine wordt voornamelijk gemetaboliseerd door CYP3A4/5, maar is ook een substraat van de 'multi drug transporter' MDR-1 (P-glycoproteïne; ABCB1). Deze enzymen worden gecodeerd door genetisch polymorfe allelen.

Methode: Van 151 nier- en harttransplantatiepatiënten werden de cyclosporine-farmacokinetische parameters beschreven middels populatiefarmacokinetiek, gebruik makend van non-lineaire 'mixed-effects modeling' (NONMEM) op basis van

een tweecompartimentsmodel met eerste-orde-absorptie en eliminatie. Alle patiënten werden gegenotypeerd voor CYP3A4*1B en *3, CYP3A5*3 en *6, en MDR-1 3435C>T.

Resultaat: De geschatte interpatiëntvariabiliteit in orale klaring (Cl/F) was 28%. De orale klaring was 13% (95% CI: 8-18%; p<0,05) hoger in kaukasiërs vergeleken bij Afrikanen en Aziaten. In CYP3A4*1B-dragers bleek de klaring (Cl/F) van cyclosporine 9% hoger vergeleken met CYP3A4*1/*1-patiënten, onafhankelijk van etniciteit of gewicht (95% CI: 1-17%; p<0,05). Er werd geen effect van CYP3A5 of MDR-1 genotype gevonden.

Conclusie: CYP3A4*1B-dragers hebben een significant hogere orale cyclosporineklaring vergeleken bij wildtypen. Echter, dit verschil is dusdanig klein dat genotypering ten behoeve van cyclosporinetherapie waarschijnlijk geen bijdrage aan de therapie zal kunnen leveren.

Categorie 3 Klinisch Gynaecologie/obstetrie

88. High contents of both docosahexaenoic and arachidonic acids in milk of women consuming fish from lake Kitangiri (Tanzania). Targets for infant formulae close to our ancient diet?

R.S. KUIPERS¹, M.R. FOKKEMA¹, E.N. SMIT¹, J. van der MEULEN², E.R. BOERSMA³, F.A.J. MUSKIET¹

Pathology and Laboratory Medicine¹, Logistics coordinator, Haren², Retired Professor of Pediatrics³, Groningen University Hospital, The Netherlands

Introduction: Current recommendations for arachidonic (AA) and docosahexaenoic (DHA) acids in infant formulae are based on milk of Western mothers. Validity may be questioned in view of the profound dietary changes in the past 100 years. Hominin evolution occurred in the proximity of East-African freshwater lakes and rivers and early homo sapiens had higher intakes of AA and DHA from a predominantly lacustrine-based diet. In search of the milk AA and DHA contents of our African ancestors we investigated the milk of 29 healthy lactating women living in Doromoni near lake Kitangiri (Tanzania).

Methods: Five mL mature milk (>10 days) was collected by manual expression. Fatty acids in milk and local fish were determined by capillary gas chromatography with flame ionization detection.

Results: The women consumed sunflower oil-fried local fish as only animal lipid sources, maize and local vegetables.

Doromoni milk had high contents of AA (median 0.70 mol%), DHA (0.75) and eicosapentaenoic acid (EPA, 0.17), and low AA/DHA ratios (median 0.91; 0.55-2.61). This composition tracks down to consumption of fish with high AA and DHA contents, and AA/EPA ratios. Human milk fatty acid relationships from our historical worldwide database revealed that disparities between the Doromoni diet and the presumed ancient diet (i.e. higher carbohydrate and linoleic acid intakes) are unlikely to have affected their milk AA and DHA contents.

Conclusion: AA and DHA contents of Doromoni milk may be close to that of early homo sapiens, because of the similarity of their life-long consumption of East-African lacustrine-based foods. Milk AA, DHA and EPA contents of Doromoni women might provide us with clues to optimize infant formulae and perhaps the milk of Western women.

89. Plasma choline, betaine and their relation to plasma homocysteine in normal pregnancy

F.V. VELZING-AARTS¹, P.I. HOLM, M.R. FOKKEMA¹, F.P.L. van der DIJS³, P.M. UELAND², F.A.J. MUSKIET¹
Pathology and Laboratory Medicine¹, Groningen University Hospital, The Netherlands, Locus for Homocysteine and Related Vitamins², University of Bergen, Norway, Clinical Chemical Laboratory³, Medical Center Haaglanden, The Hague, The Netherlands

Introduction: Plasma levels of total homocysteine (tHcy) decrease during pregnancy. This reduction has been investigated in relation to folate status, but the possible involvement of betaine and its precursor choline is unknown. We investigated the courses of plasma choline and betaine during normal human pregnancy and studied their relations with plasma tHcy.

Methods: The study population comprised 50 women of West-African descent. The majority took folic acid on an irregular basis. Blood samples were obtained monthly, with initial sampling at gestational week 9 (GW 9) and last sampling approximately 3 months post partum.

Results: Plasma choline [geometric mean (95% reference interval) in micromol/l] increased continuously during pregnancy, from 6.6 (4.5-9.8) at GW 9 to 10.8 (7.4-15.7) at GW 36. Plasma betaine (in micromol/l) decreased in first half of

pregnancy, from 16.3 (8.5-31.2) (GW 9) to 10.3 (6.5-16.3) (GW 20) and remained constant thereafter. We confirmed a gestational age related reduction of plasma tHcy. Lowest levels were reached in second trimester. An inverse relationship between plasma tHcy and betaine was observed from GW 16, while the inverse relationship between plasma tHcy and folate attenuated. Multiple regression analysis showed that plasma betaine was a strong predictor of plasma tHcy from GW 20 onwards.

Conclusion: The steady increase of choline throughout gestation may ensure choline availability for placental transfer with subsequent use by the growing fetus. Betaine becomes a remarkably strong predictor of tHcy during the course of pregnancy. The present findings emphasize the importance of choline and betaine status during normal human pregnancy.

90. Screening cord blood from high-risk pregnancies for hemoglobinopathies and major deletion-type alpha-thalassemias. Seven years experience in the Groningen University Hospital

F.A.J. MUSKIET¹, J.W. SMIT², H. LANDMAN³, R.Y.J. TAMMINGA⁴, J.P. HOLM⁵
Pathology and Laboratory Medicine¹, Groningen University Hospital, Laboratory North², location Groningen Martini Hospital, Gynecologist, Curaçao³, Department of Pediatrics, division of Pediatric Oncology/Hematology⁴, Obstetrics and Gynecology⁵, Groningen University Hospital, The Netherlands

Introduction: Postpartum screening for sickle cell disease (SCD: HbSS, HbSC, beta-thalassemia-S) enables early, evidence based, institution of prophylactic measures to reduce mortality rate from splenic sequestration and pneumococcal septicemia-meningitis. Cord blood screening of babies born to high-risk couples is operational in our hospital since 1997. The study aim was to evaluate for strategy adjustment.

Methods: Hemoglobin (Hb) phenotypes and major deletion-type alpha-thalassemia genotypes (--SEA, --MED, -a3.7, -a4.2, -a20.5) were determined with Hb-profiling (FPLC) and gap-PCR.
Results: The dataset (n=1374) contained 1 HbSS (-a3.7/-a3.7), 1 HbSC (aa/aa), 2 HbAA (--SEA/-a3.7, i.e. 'HbH'), 2 HbAA (--SEA/aa), 1 HbAA (--MED/aa), 10 HbAA (-a3.7/-a3.7), 1 HbAS (-a3.7/-a3.7), 1 HbAC (-a3.7/-a3.7) and 1 HbAA (-a4.2/-a3.7). HbAS (mean 2.84%) and -a3.7/aa (15.07%) frequencies were stable over the past 7 years. At least one of the parents of HbAS or -a3.7/aa babies had roots in notably West-Africa (pre-

sent domiciles in Netherlands-Antilles and Surinam included) or Central-Africa (Congo, Zaire, Angola). Babies with HbAE (0.87%) had at least one parent with roots in Asia (notably Indonesia) and those with HbAC (0.95%) in W-Africa (especially Curaçao). Gestational age dependency of HbBarts in HbAA babies with aa/aa or -a3.7/aa was negligible. Babies carrying -a3.7/aa genotypes had higher HbBarts from 25 weeks, but values overlapped with those of aa/aa. HbBarts>2.0% and MCV>95 fL cut-offs provided 100% sensitivity and 97.5% specificity for the detection of 14 HbAA babies with 1-2 alpha-genes among 1258 HbAA babies with 3-5 alpha-genes.

Conclusion: Present strategy for neonatal SCD detection is justified in view of UK recommendations (0.7-1.5% HbAS prevalence for universal screening). Hb-profiling together with alpha-thalassemia genotyping of babies with HbBarts>2% and MCV>95 fL is adequate for counseling of major hemoglobinopathies and alpha-thalassemias.

Categorie 3 Klinisch

Neurologie, psychiatrie, KNO en oogheekunde

91. The transmethylation cycle in the brain of Alzheimer patients

C. MULDER¹, N.S.M. SCHOONENBOOM², E.E.W. JANSEN¹, N.M. VERHOEVEN¹, G.J. van KAMP¹, C. JAKOBS¹, Ph. SCHELTENS²
Departments of Clinical Chemistry¹, and Neurology², VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: S-adenosylmethionine (SAM) is a broad one-methyl donor and involved in many transmethylation reactions. The demethylated product, S-adenosylhomocysteine (SAH), can be hydrolysed yielding homocysteine. Homocysteine is remethylated to methionine by transfer of a methyl group from 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) in a process requiring vitamin B12 and folic acid as cofactors. Methylation of the promoter of prenilin 1 (PS1) may prevent increased A β (1-42) formation by silencing the gene. Homocysteine accumulation, frequently observed in plasma of AD patients may lead to decreased SAM production, hypomethylation of the promoter of PS1, overexpression of PS1, and consequently increased A β (1-42) formation.

Methods: Thirty patients who fulfilled the NINCDS-ADRDA criteria for 'probable' AD and twenty-eight age-matched nondemented controls were recruited. Patients and most controls went through an extensive dementia investigation. CSF was

obtained by lumbar puncture and after centrifugation stored at -80 °C until assayed. 5-MTHF was determined by HPLC with electrochemical detection. Methylmalonic acid (MMA), a marker of B12 deficiency, SAM and SAH were assayed by stable isotope dilution tandem mass spectrometry. Non-parametric statistics were applied for calculation of the results.

Results: In CSF we found no statistical differences between AD patients and controls for 5-MTHF, MMA, SAM, SAH levels and the SAM/SAH-ratio.

Conclusion: CSF concentrations of the assayed metabolites 5-MTHF, MMA, SAM and SAH of AD patients are not different from age-matched controls, suggesting that the methionine-homocysteine cycle in the brain of AD patients is not altered. SAM/SAH ratios in CSF of AD patients and age-matched controls is the same, indicating no changes in PS1 methylation and expression of the gene.

92. Low vitamin B6 levels are associated with white matter lesions in Alzheimer's disease

C. MULDER¹, Ph. SCHELTENS², F. BARKHOF³, C. GUNDY⁴, A.A. VERSTRAETEN⁵, F.E. de LEEUW^{2,6}
Alzheimer Unit and Department of Clinical Chemistry¹, Alzheimer Center and Department of Neurology^{2,6}, Department of Radiology and Image Analysis Center³, Department of Clinical Epidemiology and Biostatistics⁴, Department of Obstetrics and Gynaecology⁵, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; Department of Neurology⁶, University Medical Center St. Radboud, Nijmegen, The Netherlands

Introduction: Vitamin B6 is important in the transsulfuration pathway that may effectively catabolize the potentially toxic excess of homocysteine, which is not required for methyl transfer. Low levels of vitamin B6 are related to cognitive decline, however the underlying mechanism is not known. Since low levels of B6 are also related to vascular disease we studied the relation between vitamin B6 levels and the presence of white matter lesions (WML) on MRI in patients with Alzheimer's Disease (AD).

Methods: We included 123 patients who visited our outpatient memory clinic between 1997 and 2002. A diagnosis of 'probable' AD was based upon the NINCDS-ADRDA criteria. All patients underwent a standardized work-up that included blood tests, neuropsychological examination and MRI. Plasma vitamin B6 levels were determined by measurement of plasma

pyridoxal-5-phosphate applying HPLC using precolumn derivatization with semicarbazide and fluorescence detection. The overdispersed Poisson regression model was applied to investigate the dependency of WML on the reciprocally transformed vitamin B6 concentration.

Results: We found a relation between periventricular and subcortical WML and the reciprocal plasma vitamin B6 concentration, after adjusting for confounders.

Conclusion: The implication of our findings is that nutritional depletion of vitamin B6 could increase vascular burden in elderly demented people. These results may provide a rationale for intervention studies examining the effect of vitamin B6 supplementation on vascular changes in the brain in relation to the incidence and course of dementia and AD.

93. Determination of a triplet of C-terminally truncated A β species in CSF in Alzheimer's disease: more of the same?

N.S.M. SCHOONENBOOM^{1,2,*}, C. MULDER^{2,*}, G.J. van KAMP², S.P. MEHTA³, Ph. SCHELTENS¹, M.A. BLANKENSTEIN², P.D. MEHTA³. * Equal contribution
Alzheimer Center and Department of Neurology¹, Department of Clinical Chemistry², VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, Department of Developmental Neurobiology, Division of Immunology³, Staten Island, New York, USA

Introduction: Various C-terminally truncated amyloid- β peptides (A β) are linked to Alzheimer's disease (AD) pathogenesis. The three most well known C-terminally truncated A β peptides are A β 38, A β 40 and A β 42.

Methods: Thirty AD patients and 26 non-demented controls were recruited at the Alzheimer Center of the VUMC, Amsterdam. All AD patients underwent a standardized investigative battery. Diagnosis of probable AD was made by exclusion according to the NINCDS-ADRDA criteria. Levels of A β 38, A β 40 and A β 42 were measured in CSF by an in-house double antibody sandwich ELISA developed by Mehta.

Results: CSF A β 42 was decreased in AD, while CSF A β 38 and A β 40 levels were similar in AD and controls. All three A β peptides were interrelated, particularly CSF A β 38 and A β 40 (R=0.89, P<0.001).

Conclusion: The diagnostic accuracy of CSF A β 42 was not different from the A β 42/A β 40 and A β 42/A β 38 ratios. The A β 42/A β 40 and A β 42/A β 38 ratios are considered to give information about the disease progression, typically in the early stage of disease, as the cerebral deposition of A β 42 probably starts already before the disease becomes clinically overt. It would be of interest to investigate the ratio of A β 42 to A β 40 and A β 38 in a group of patients with preclinical AD or mild cognitive impairment, followed longitudinally, in order to obtain information about the predictive value of the combination of these C-terminally truncated A β species as well as their value in disease progression rather than the presence of the disease.

94. Platelet serotonin and gut permeability in children with pervasive developmental disorders in Curaçao

R.F.J. KEMPERMAN^{1,2}, F.D. MUSKIET³, I.P. KEMA¹, R. BISCHOFF², F.A.J. MUSKIET¹
Department of Pathology and Laboratory Medicine¹, Groningen University Hospital, Department of Analytical Biochemistry², University Center for Pharmacy, Groningen, The Netherlands, Department of Pediatrics³, St Elisabeth Hospital, Curaçao

Introduction: Autism is a severe pervasive developmental disorder (PDD) linked by some to gastrointestinal (GI) disorders. Increased gut permeability, as established with the differential sugar absorption test (DSAT), was reported in 43% of PDD children [1]. Approximately 28% of PDD children has increased platelet (PLT) serotonin (5HT) [2]. Since PLT-5HT derives mainly from the gut, we investigated whether the subgroup of PDD children with increased PLT-5HT is identical to the one exhibiting abnormal DSAT results.

Methods: The DSAT was performed in 24 PDD patients [75% male; median age 10.7 years (2.9-18.6)] living in Curaçao. We collected urine for sugar profiling (N=23) with capillary gas chromatography and isolated PLT-rich EDTA-plasma (N=23) for profiling of indoles by HPLC.

Results: Platelet serotonin (median 3.4 nmol/109 platelets; range 2.0-7.1) was elevated (i.e. >5.4) in 4 patients (range: 5.7-7.1). None of the patients [lactulose/mannitol (L/M) ratio;

median 0.017 mol/mol (0.008-0.035)] had increased gut permeability (i.e. L/M ratio >0.090). There was no correlation between PLT-5HT and the urinary L/M-ratio. According to the parents 13/23 (57%) patients had one or more symptoms of GI disorders.

Conclusion: Increased PLT-5HT in PDD could not be explained by abnormal gut permeability. The number of PDD children with hyperserotonemia (17%) was low compared with reports of others (28%), and in contrast to a previous report none of the presently studied PDD children had increased gut permeability. Further studies are needed to elucidate the origin of hyperserotonemia in PDD. It is conceivable that higher PLT-5HT in PDD is rather related to gut motility than to gut-permeability.

Literature: 1. D' Eufemia et al. Acta Paediatr 1996, 85: 1076.
2. Mulder et al. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 2004, 43: 491

95. Differences and similarities between two frequently used CSF Amyloid-β42 assays

N.S.M. SCHOONENBOOM^{1,2*}, C. MULDER^{2*}, H. VANDERSTICHELE³, Y.A.L. PIJNENBURG¹, G.J. van KAMP², Ph. SCHELTENS¹, P.D. MEHTA⁴, M.A. BLANKENSTEIN^{2*} Equal contribution
Alzheimer Center and Department of Neurology¹, Department of Clinical Chemistry², VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; Innogenetics NV³, Belgium; Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, Department of Developmental Neurobiology, Division of Immunology⁴, Staten Island, New York, USA

Introduction: Differences in absolute concentrations and clinical performance of cerebrospinal fluid (CSF) amyloid-β42 (Aβ42) between laboratories is partly attributable to the antibodies selected for the assay. We compared Aβ42 levels and diagnostic accuracy of two frequently applied Aβ42 assays in the same CSF samples.

Methods: Aβ42 levels were measured in CSF of 39 Alzheimer's disease (AD) patients, 24 patients with frontotemporal lobar degeneration (FTLD) and 30 controls. One ELISA used the monoclonal antibodies 3D6 and 21F12 directed against amino acids 1-6 of the N-terminal part and amino acids 36-42 of the C-terminal part of Aβ42 (Aβ(1-42)). The other ELISA used the monoclonal antibody 6E10 specific to an epitope present on 1-16 amino acid residues of the N-terminal part and the polyclonal antibody R165 directed

against amino acids 33-42 of the C-terminal part of Aβ42 (Aβ(N-42)).

Results: Absolute concentrations of CSF Aβ(1-42) and Aβ(N-42) were comparable in all CSF samples. In AD versus controls sensitivity and specificity values for CSF Aβ(1-42) and Aβ(N-42) were equal; Aβ(1-42): sensitivity 90% and specificity 93%; Aβ(N-42): sensitivity 90% and specificity 87%. A slightly better differentiation of AD from FTLD was obtained comparing CSF Aβ(N-42) with CSF Aβ(1-42) (area under the ROC curve Aβ(1-42)= 0.77, 95%CI 0.64-0.90 and Aβ(N-42)= 0.87, 95%CI 0.76-0.97, P=0.045).

Conclusion: Both Aβ42 assays provided equal diagnostic accuracy comparing AD with controls. Further studies are needed to investigate the involvement of the different forms of Aβ42 in AD and FTLD patients.

96. Imipramine pharmacokinetics in depressed patients is dependent on CYP2D6 functional gene dose

P.W. SCHENK¹, M. van FESSEM¹, M. van VLIET¹, J. LINDEMANS¹, T. van GELDER², R.A.A. MATHOT², A.G. VULTO², J. VERPLOEGH³, J.A. BRUIJN³, R.H.N. van SCHAIK¹.
Department of Clinical Chemistry¹, Department of Hospital Pharmacy², Department of Psychiatry³, Erasmus MC University Medical Center Rotterdam, The Netherlands

Introduction: The tricyclic antidepressant imipramine has a narrow therapeutic window, yet a 50-fold variation in plasma levels is found when it is administered in a standard dose. This pronounced variation may be related to polymorphisms in the CYP2C19 and CYP2D6 genes. CYP2C19 converts imipramine to its active metabolite desipramine, which is then converted to inactive 2OH-desipramine by the action of CYP2D6.

Methods: We studied the effect of CYP2C19 and CYP2D6 genotype on imipramine and desipramine steady-state kinetics in a large group (n=178) of depressed patients. After imipramine application, dose, weight and sex were recorded, and steady-state imipramine and desipramine plasma concentrations were monitored. Patients were genotyped for CYP2C19*2 and CYP2D6*3, *4, *5, *6, *9, *10 and *41, tested for possible CYP2D6 gene duplications, and assigned functional gene doses.

Results: Desipramine and imipramine + desipramine steady-state plasma concentration/mg/kg and imipramine dose requirement significantly depended on CYP2D6 genotype (ANOVA, P<0.0001). Median imipramine dose requirement was 1.5, 2.0, 2.6, 3.0, 3.8 and 4.6 mg/kg body weight in carriers of 0, 0.5, 1, 1.5, 2 and >2 active CYP2D6 genes, respectively.

Conclusion: High antidepressant plasma levels may cause an enhanced drug exposure and risk of adverse drug reactions in patients with a reduced number of active CYP2D6 alleles. In contrast, enhanced elimination of the active imipramine metabolite desipramine may result in subtherapeutic drug concentrations and poor response in carriers of functional CYP2D6 gene duplications. Testing for polymorphisms in the CYP2D6 gene may help to identify slow and fast imipramine responders, allowing for faster achievement of predefined blood levels, reduced hospitalisation, and a decreased number of adverse drug reactions.

97. Elevated plasma homocysteine levels in multiple sclerosis

M.R. FOKKEMA¹, G.S.M. RAMSARANSING², A. TEELKEN², A.V. ARATJUNYAN³, J.H.A. de KEYSER²
Department of Pathology and Laboratory Medicine² and Department of Neurology¹, Academisch Ziekenhuis Groningen, The Netherlands, Laboratory of Perinatal Biochemistry³, D.O. Ott Research Institute, Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russia

Introduction: High homocysteine is associated with an increased risk of neurodegenerative disease, such as Alzheimer and Parkinson's disease. Elevated plasma homocysteine levels have also been observed in multiple sclerosis (MS) patients, but results are inconsistent.

Methods: We measured plasma total homocysteine, serum vitamin B12 and folate, and whole blood vitamin B6 concentrations in 88 patients with MS (28 benign course, 37 secondary progressive, 23 primary progressive) and compared these with previously established levels of 57 sex- and age-matched healthy controls. In patients, we additionally measured whole blood vitamin B2, serum interleukin-12 (IL-12) and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), leukocyte nitric oxide (NO) production, and serum total oxidant activity.

Results: No differences existed in homocysteine, B-vitamins, IL12, TNFalpha, NO production and total oxidant activity between the 3 MS subgroups. Homocysteine was related to B6,

B12 and folate (controls and patients), but not to B2, IL-12, TNF-alpha, NO production and total oxidant activity (patients). Mean plasma homocysteine was higher in patients (13.8±4.9 μmol/l, 34% >15 μmol/l) than in controls (10.1±2.5 μmol/l, 2% >15 μmol/l; p<0.0001). The difference remained after controlling for B6, B12, folate, age, gender and creatinine. Although no differences were observed in circulating B-vitamins between patients and controls, high proportion patients had B12 (13%), folate (13%) and B-2 (40%) below reference values, with highest proportions in clinical progressive subgroups.

Conclusion: Elevated plasma homocysteine in MS is unrelated to disease course, inflammatory activity and oxidative stress. It does not seem to be caused mainly by B-vitamin deficiency. High homocysteine is not expected to be a favorable condition in MS, since it is associated with myelin damage by hypomethylation and possibly with concomitant cardiovascular disease.

Oncologie

98. FLT3 status in a patient with a CD 117 positive T-ALL

V. SCHARNHORST¹, J. WALSH¹, V. van der VELDEN², H. BEVERLOO², A. LANGERAK²

Atrium Medical Center¹, Heerlen, The Netherlands, Erasmus University Medical Center², Rotterdam, The Netherlands

Introduction: Activating mutations in the FLT3 gene are common in acute myeloid leukemia while they are rarely found in acute lymphoblastic leukemia (ALL). Recently, a subset of three out of 69 adult T-ALLs were found to be CD 117+, all three carried mutations in FLT3 (1). This finding is of potential therapeutic significance since inhibitors of FLT3 tyrosine kinase activity are available. We here report on the FLT3 status in a patient diagnosed with a CD 117+ T-ALL.

Methods: Bone marrow was analyzed by routine morphological, cytochemical and cytogenetic methods. In addition, exon 11, 12 en 20 of FLT3 were tested for the presence of known activating mutations. Multiparameter flowcytometry was carried out with a BD flowcytometer.

Results: The bone marrow showed 70% blasts without cytochemical evidence of myeloid differentiation. By flowcytome-

try the blasts were positive for CD 34 (partially), 117, 2, 5, 7, 13, 19 (partially), 56, cyCD 3 and negative for TdT, MPO, HLADR, CD 1a, 4, 8, 10, 33, 65, smCD3 and CD135 (FLT). Cytogenetics revealed a complex karyotype with 3 balanced translocations and an interstitial deletion in chromosom 5. Activating mutations in FLT3 were absent.

Conclusion: This case describes a patient with a CD 117+ T-ALL that does not have FLT3 mutations. Thus, mutations in FLT3 are not necessarily present in all CD 117+ positive T-ALLs. FLT3 mutation and expression status must be established in patients with CD117+ T-ALL prior to treatment with FLT3 kinase inhibitor.

Literature: 1. Paietta et al. Blood 2004, 104: 558.

99. Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia

R. de JONGE¹, W. TISSING², J.H. HOOIJBERG³, B.D. van ZELST¹, G. JANSEN⁴, G.J.L. KASPERS³, G.J. PETERS⁵, R. PIETERS², J. LINDEMANS¹

Clinical Chemistry¹, Pediatric Oncology/Hematology², Erasmus MC, Rotterdam; Pediatric Oncology/Hematology³, Rheumatology⁴, Medical Oncology⁵, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

Inleiding: The folate status may modulate the risk of childhood ALL. We investigated the presence of common polymorphisms in genes involved in folate metabolism, which may influence the susceptibility to ALL.

Method: DNA was isolated from 245 pediatric ALL patients (cases) at the time of diagnosis and from 184 pediatric patients treated for non-hematological diseases (controls). Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR 677C>T, MTHFR 1298A>C), methionine synthase (MTR 2756A>G), methionine synthase reductase (MTRR 66A>G), methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFD1 1958G>A), serine

hydroxymethyl transferase (SHMT1 1420C>T), thymidylate synthase (TS 2R3R), and the reduced folate carrier (RFC 80G>A) were detected by PCR-RFLP or real-time PCR.

Resultaat: In ALL patients, an increased occurrence was observed of the RFC 80GA variant (odds ratio [OR]=1.55; 95% confidence interval [CI], 1.01-2.39; p=0.05) and the RFC 80AA variant (OR=1.78; 95%CI, 1.02-3.09; p=0.04). Likewise, the SHMT1 TT genotype showed an OR of 1.96 (95%CI, 0.93-4.12; p=0.08).

Conclusie: The RFC 80A allele or the SHMT1 TT genotype are associated with increased risk of ALL.

100. CYP2C19-genotype voorspelt duur van respons op tamoxifen bij gemetastaseerde borstkanker

R.H.N. van SCHAIK¹, E. TEULING², I. van der HEIDEN¹, M. van FESSEM¹, I. van STAVEREN², M. van VLIET¹, M. LOOK², J. KLIJN², J. FOEKENS², J. LINDEMANS¹, E. BERNIS²

Afd. Klinische Chemie¹ en Medische Oncologie², Erasmus MC Rotterdam

Inleiding: Resistentie ten aanzien van anti-oestrogenen is een van de belangrijkste problemen bij de behandeling van borstkanker. De omzetting van het anti-oestrogeen tamoxifen naar het 100x actievere 4OH-tamoxifen wordt voornamelijk gekatalyseerd door cytochrom P450 2D6 (CYP2D6), waarbij ook CYP2B6, CYP2C9 en CYP2C19 een rol spelen. Het grootste gedeelte van het tamoxifen wordt echter omgezet in het veel minder actieve N-desmethyltamoxifen door CYP3A4/5. Genetische polymorfismen in deze enzymen, met name in CYP2D6, zouden een effect kunnen hebben op de respons op therapie

Method: Genotyperingsassays (PCR-RFLP) werden opgezet en gevalideerd voor CYP2D6*3, *4, *5, *6, CYP2B6*5, CYP2C9*2, *3, CYP2C19*2, *3, en CYP3A5*3. Van 282 retrospectief verzamelde primaire monsters van borstkankerpatiënten met gemetastaseerde ziekte werden genotyperingen uitgevoerd, en vergeleken met respons op tamoxifen (55x re-

spons, 113x 'stable disease' >6 maanden, 21x 'stable disease' <6 maanden, 93x progressieve ziekte). Geen van de patiënten kreeg aanvullende adjuvante therapie.

Resultaat: CYP2D6 'poor metabolizer' fenotype (n=21) correspondeerde niet met respons op tamoxifen. Ook CYP2C9*2 of *3 (n=109) 3A5*1 (n=41) en 2B6*5-carriers (n=52) vertoonden geen correlatie met respons. Het CYP2C19*1/*1 (n=196) fenotype daarentegen bleek significant gecorreleerd met een kortere tijd tot tumorprogressie ('hazard ratio' 0,64, 95% CI: 0,47-0,87; p=0,004).

Conclusie: Onze data wijzen uit dat de tijd dat patiënten voordeel hebben van tamoxifentherapie (dus tijd tot ongevoelig worden van de tumor voor tamoxifen) langer is voor dragers van CYP2C19 variantallelen. Deze observatie zou impliceren dat de tijd dat de tumor kan worden behandeld met tamoxifen, mogelijk verlengd zou kunnen worden door remming van CYP2C19-enzymactiviteit.

101. Moleculaire mechanismen voor etnische verschillen in metabolisme van irinotecan: impact van de ABCG2 421C>A-variant

R.H.N. van SCHAIK¹, B. CHOWBAY², J. LI³, Q-Y ZHOU², E-H. TAN², R.H. MATHIJSEN⁴, J. VERWEIJ⁴, A. SPARREBOOM⁵, S.D. BAKER³

Afd. Klinische Chemie¹ en Medische Oncologie⁴, Erasmus MC Rotterdam, The Netherlands, National Cancer Centre Singapore², Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Centre Johns Hopkins³ Baltimore MD³, National Cancer Institute Bethesda MD⁵, USA

Inleiding: De 'ATP-binding cassette transporter' ABCG2 is een effluxpomp die betrokken is bij de excretie van de irinotecanmetabolieten SN-38 en SN-38G via de gal. Irinotecan (CPT-11) wordt gebruikt bij de behandeling van ovarium- en colonkanker. Het wordt omgezet via carboxylesterase naar SN-38, dat om zijn beurt wordt geglycuronideerd door UGT1A1 tot SN-38G. SN-38 is de metaboliet die voornamelijk verantwoordelijk wordt gehouden voor de bij irinotecantherapie optredende bijwerking van beenmergsuppressie.

Methode: Een TaqMan-assay werd opgezet en gevalideerd middels sequencing voor het 421C>A polymorfisme van ABCG2. Zestig personen (29 Aziaten en 31 kaukasiërs) kregen een 90 minuten durend intraveneus infuus van irinotecan.

Voor dosering gecorrigeerde irinotecan-farmacokinetiekparameters en ABCG2-genotype werden bepaald.

Resultaat: Het variant allel ABCG2 421C>A kwam frequenter voor bij Aziaten dan bij kaukasiërs (allelfrequentie 29% versus 11%; $p < 0,05$). Kaukasiërs hadden een lagere SN-38G AUC ($2,7 \pm 1,7$ versus $20,4 \pm 10,7$ h $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$; $p < 0,0001$). In de 21 patiënten met tenminste 1 ABCG2 421C>A variant allel was de gemiddelde SN-38G AUC 174% ten opzichte van de 39 patiënten met de wildtypesequentie ($p < 0,05$).

Conclusie: Het ABCG2 421C>A-genotype verklaart deels de geobserveerde verschillen in irinotecanmetabolisme tussen Aziaten en kaukasiërs.

Categorie 3 Klinisch

Acute zorg, IC, toxicologie

102. De waarde van het routinematig meten van de sepsismarkers 'lipopolysaccharide-binding protein' (LBP) en interleukine 6 (IL-6) op de Intensive Care (IC)

A.K. BOER¹, S. AL ALI², R. HULSHOF¹, H.H. SAALMANN¹ en I. VERMES¹

Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Intensive Care², Medisch Spectrum Twente, Enschede

Inleiding: Sepsis is de belangrijkste doodsoorzaak op de IC. Afhankelijk van de mate van sepsis varieert de mortaliteit van 20% tot 60%. De kosten om septische IC-patiënten te behandelen beslaan ongeveer 1% van het totale Nederlandse gezondheidszorgbudget. De noodzaak om sepsis vroegtijdig op te sporen, wordt bovendien onderstreept door het feit dat de begintijd van behandeling bepalend is voor de prognose. Een serummarker om sepsis vroegtijdig op te sporen zou dus van grote klinische en financiële waarde kunnen zijn. Twee mogelijke kandidaten zijn de sepsismarkers LBP en IL-6.

Methode: Gedurende drie maanden werd de mate van sepsis van alle IC-patiënten per dag gedocumenteerd. Bovendien werd bij deze patiënten de ochtendconcentraties van LBP en IL-6 gemeten.

Resultaat: Wanneer de LBP en IL-6 concentraties per patiënt tegen de tijd worden uitgezet, zijn de concentraties tijdens sepsisperiodes vaak hoger dan tijdens niet-sepsisperiodes. Dergelijke concentratiestijgingen correleren echter niet rechtstreeks

met de mate van sepsis. Bovendien zijn de concentraties tijdens niet-sepsisperiodes sterk individu-afhankelijk. Wanneer de gegevens middels een ROC-curve worden geanalyseerd, worden voor LBP en IL-6 statistisch significante oppervlaktesonder-de-curve gevonden van respectievelijk 0,68 en 0,59. De optimale afkapwaarden om een septische patiënt van een niet-septische patiënt te onderscheiden ligt voor LBP bij 92 mg/l en voor IL-6 bij 140 ng/l. De bijbehorende positief-voorspellende-waardes zijn respectievelijk 58% en 47%, terwijl de negatief-voorspellende-waardes respectievelijk 74% en 70% zijn.

Conclusie: Alhoewel de ROC-curves een significante correlatie laten zien tussen de ochtendconcentraties LBP/IL-6 en een eventuele septische episode gedurende de rest van de dag, heeft alleen LBP een uiterst geringe voorspellende waarde voor het opsporen van sepsis bij IC-patiënten. De lichaamstemperatuur levert bijvoorbeeld meer informatie op dan LBP of IL-6.

Categorie 3 Klinisch

Erfelijke stofwisselingsziekten

103. A pivotal role for β -aminoisobutyric acid in dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency

A.B.P. van KUILENBURG¹, A.E.M. STROOMER¹, H. van LENTHE¹, N.G.G.M. ABELING¹, A.H. van GENNIP²

Laboratory Genetic Metabolic Diseases¹, Academic Medical Center, Amsterdam, Dept. Biochemical Genetics², Maastricht University Hospital, Maastricht, The Netherlands

Introduction: Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) catalyzes the first step of the pyrimidine degradation pathway in which uracil and thymine are catabolised to β -alanine and the R-enantiomer of β -aminoisobutyric acid, respectively. The S-enantiomer of β -aminoisobutyric acid is derived from the catabolism of valine. It has been suggested that an altered homeostasis of β -alanine might underlie the clinical abnormalities encountered in patients with a DPD deficiency.

Methods: The determination of β -alanine and β -aminoisobu-

tyric acid was performed with dual-column reversed-phase HPLC. Separation of the R- and S-enantiomers of β -aminoisobutyric acid was performed by gas chromatography.

Results: Only a slightly decreased concentration of β -alanine was present in the urine and plasma whereas normal levels of β -alanine were present in the CSF of patients with a DPD deficiency. The mean concentration of β -aminoisobutyric acid was approximately 2 to 3-fold lower in CSF and urine of patients with a DPD deficiency. Strongly decreased levels (10-fold) of

β -aminoisobutyric acid were present in plasma of DPD patients. Surprisingly, urine samples from DPD patients contained significant amounts of R- β -AIB ($58 \pm 36\%$).

Conclusion: The metabolism of β -alanine-containing peptides, such as carnosine, may be an important factor involved in the

homeostasis of β -alanine in patients with DPD deficiency. Under pathological conditions, the catabolism of valine can result in the production of significant amounts of β -aminoisobutyric acid. Furthermore, significant crossover exists between the thymine and valine catabolic pathways.

104. Novel diagnostic parameters for AADC deficiency in general metabolic urine screening

N.G.G.M. ABELING¹, J.E. ABDENUR², L. JORGE³, N. CHAMOLES³

Lab Genetic Metabolic Diseases¹, Dept of Clinical Chemistry, Academic Medical Centre, University of Amsterdam, The Netherlands, Division of Metabolism², PSF Children's Hospital of Orange County, Orange, USA, Foundation for the Study of Neurometabolic Disease³, Buenos Aires, Argentina

Introduction: Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) deficiency in most cases is a treatable defect in the biosynthesis of the neurotransmitters dopamine and serotonin. Until now the only way to detect this disorder in general metabolic screening was to detect vanillic acid (VLA) in GC-MS analysis of organic acids. Because of the sometimes only small increase of VLA, and/or insufficient analytical sensitivity AADC deficiency is probably often missed.

Methods: Cases: The first case was a boy with hypotonia, hypoglycemia and metabolic acidosis detected at 13 days of age, by organic acids (OA) analysis of urine. The second case(s) were two brothers, both with dystonia, and oculogyric crises in one, detected at ages of 6, resp. 10 years of age, in whom the

diagnosis had been missed in OA, but eventually established by the finding of elevated L-DOPA and dopamine in urine. **Methods:** GC-MS of organic acids after ethoximation, HPLC-ECD of L-DOPA and dopamine.

Results: In the first case the urinary OA profile not only showed elevated VLA, but also vanilpyruvic acid, N-acetylvanilalanine and N-acetyltyrosine. The brothers appeared to have hyperdopaminuria in addition to clearly elevated L-DOPA.

Conclusion: The cases we present clearly demonstrate the additional value of the newly discovered diagnostic parameters, providing new chances for detection of AADC deficiency.

105. Putative tryptophan hydroxylase deficiency and dysfunction of the hypothalamo-hypophysial axis

J. de VRIES^{1,2}, H. VLES³, M. RUBIO-GOZALBO^{1,4}, W. GERVER⁵, J. WEBER³, N. ABELING⁶, L. SPAAPEN¹, P. MENHEERE², A. van GENNIP¹

Dept. of Biochem. Genetics¹; Dept. of Clin. Chemistry²; Dept. of Pediatric Neurology³; Dept. of Pediatrics⁴; Pediatric Endocrinology⁵, Academic Hospital Maastricht; Dept. of Genetic Metabolic Diseases⁶, Academic Medical Centre, University of Amsterdam, The Netherlands

Inleiding: Casus: After an uneventful history, our patient developed at the age of 1.5 years a progressively abnormal behavior, apathy, lethargy, weight increase, increased transpiration, hypothermia, increased need of sleep and dysarthry with an abnormal gait, indicating a hypothalam syndrome. **Objective:** Is an inborn error of metabolism involved in the hypothalam syndrome?

Method: Analyses of hormones and neurotransmitter-catabolites in CSF, serum and urine.

Resultaat: The levels of the gonadotrophins LH and FSH in serum were increased; TSH concentration was elevated but FT4 was normal. The levels of 5-HIAA and 5-OH-tryptophan

in CSF were decreased with normal levels of HVA and MHPG. The urinary excretion of 5-HIAA was normal. This suggests a deficiency of cerebral tryptophan hydroxylase. It might diminish the cerebral production of serotonin and, subsequently, of melatonin, because serotonin is the precursor metabolite for melatonin. Indeed, serial measurements of melatonin in saliva showed consistently low melatonin concentrations and a disturbed circadian rhythm.

Conclusie: A putative deficiency of cerebral tryptophan hydroxylase seems to disturb serotonergic pathways and leads to a dysfunction of the hypothalamo-hypophysial axis.

106. A neonate with recurrent vomiting having deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase

W. BRUSSEL¹, W. RUITENBEEK², A.B.P. van KUILENBURG³, P.M.W. JANSSENS⁴

Department of Pediatrics¹ and Clinical Chemistry², Hospital Rijnstate, Arnhem, Laboratory of Pediatrics and Neurology², UMC Nijmegen, Laboratory for Genetic Metabolic Diseases³, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) is a rare inborn error of pyrimidine metabolism. To date, only about a fifty patients are known worldwide. The clinical picture varies and is not yet settled. Most patients are diagnosed at the age of 1-3 years. We present a patient diagnosed 8 weeks postpartum.

Methods: The patient (female), delivered after an uncomplicated pregnancy, had good Apgar scores and normal birth weight. Noted were a tent-shaped mouth and thick hair. The first 3 days there was some agitation, choking and vomiting. Six weeks later the patient presented again with vomiting and insufficient weight gain. Standard laboratory investigations, EEG, gastroscopia and distal oesophagus biopsies were normal.

Results: Metabolic screening of urine showed a significantly increased excretion of uracil ($1008 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine; ref.

$10-50$) and thymine ($568 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine; ref. about < 50), with no further abnormalities. This suggested deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), which was confirmed by enzyme analysis in leukocytes (patient: activity $< 0.01 \text{ nmol}/\text{mg}/\text{h}$; controls: $9.9 \pm 2.8 \text{ nmol}/\text{mg}/\text{h}$).

Conclusion: Many patients with DPD-deficiency have convulsions and mental retardation, some show microcephaly, feeding difficulties, autism, hypertonía. Our patient only showed feeding difficulties. This may be related to the young age at diagnosis. Of note is that the patient described has a 6 yr old half-sister with growth retardation, spasticity and mental retardation and a 9 yr old half-brother being autistic. Further family investigations and observation of the development of the patient may shed more light on the relation of clinical symptoms and DPD-deficiency. DPD-deficiency may present in newborns with vomiting as main symptom.

107. Plasma acylcarnitines and CPT-2 deficiency

R.J. SLINGERLAND^{1,2}, J.P.N. RUITER², M. de VISSER², L.J.M. SPAAPEN³, D. SKLADAL⁴, J.O. SASS⁵, R.J.A. WANDERS², M. DURAN²

Isala Klinieken¹, Zwolle, Academic Medical Center², Amsterdam, Academic Hospital Maastricht³, The Netherlands, University Children's Hospital of Innsbruck⁴, Austria, Universitäts Klinikum⁵, Freiburg, Germany

Introduction: Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT-2) deficiency may have an adult presentation characterized by exercise intolerance, myopathy, and rhabdomyolysis.

Methods: The primary diagnosis is usually made by analysing plasma long-chain acylcarnitines by tandem mass spectrometry and should be confirmed by measuring CPT-2 activity in lymphocytes or fibroblasts. The value of urine dicarboxylic acids is still a matter of debate. Recently, the (C16+C18:1)/C2 acylcarnitine ratio has been suggested to discriminate between CPT-2 deficiencies and non-specific alterations of serum acylcarnitines.

Results: Our three CPT-2 deficient patients had an abnormal (C16+C18:1)/C2 acylcarnitine ratio (0.08-0.49 vs. controls

0.01-0.05) in accordance with the finding of Gempel et al. However, we encountered six patients with CPT-2 like symptoms having an abnormal (C16+C18:1)/C2 ratio of 0.11-0.35 in spite of a normal CPT-2 activity in lymphocytes 14.7-28.8 nmol/min/mg protein vs controls 14.9± 3.8 (mean ± sd, n = 52). Repeated urine organic acid analyses in one of our CPT2 deficient patients failed to show dicarboxylic aciduria.

Conclusion: We conclude that the predictive value of the (C16+C18:1)/C2 acylcarnitine ratio is limited; confirmatory enzyme analyses are always needed.

Literature: K. Gempel et al, JIMD 25 (2002) 17-27.

108. Inhibition of the isoprenoid biosynthesis pathway as therapeutic option for mevalonate kinase deficiency

M.S. SCHNEIDERS, R.J.A. WANDERS, H.R. WATERHAM

Laboratory Genetic Metabolic Diseases, Dept. of Pediatrics and Clinical Chemistry, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Hyper-IgD and periodic fever syndrome (HIDS) and mevalonic aciduria (MA) are two autosomal recessively inherited autoinflammatory disorders both caused by a deficient activity of the enzyme mevalonate kinase (MK) due to mutations in the encoding MVK gene. MK is an enzyme of the isoprenoid biosynthesis pathway, which is tightly regulated to allow a constant production of the various isoprenoid molecules and to avoid over-accumulation of toxic intermediates. This regulation includes feedback regulation by end products, achieved predominantly through repression of transcription of the genes encoding the enzymes involved in isoprenoid biosynthesis. We here report that specific enzyme inhibitors of the pathway lead to increased MVK gene transcription and, as a consequence, increased MK enzyme activity in fibroblasts of MK deficient patients.

Methods: Primary skin fibroblasts of MK-deficient patients were incubated with inhibitors of HMG-CoA reductase or squalene synthase after which the effect on MK activity (enzyme assays), MK protein (immunoblotting) and MVK gene transcription (quantitative PCR) in the cells was determined.

Results: Treatment of MK-deficient cell lines with the two enzyme inhibitors lead to increased MK activities, paralleled by increased MK protein levels and enhanced MVK gene expression. As MK catalyzes the rate-limiting step in MK-deficient cells, this increase will result into an increased flux through the isoprenoid biosynthesis pathway.

Conclusion: In vitro manipulation of the isoprenoid biosynthesis pathway with specific enzyme inhibitors leads to an increase of residual MK activity and may provide a therapeutic option for treatment of patients MK deficiency.

109. X-linked dominant conradi-Hunerman syndrome due to single gene mosaicism in a male patient

H.R. WATERHAM^{1,2}, J. KOSTER^{1,2}, M.C.E. JANSWEIJER¹, J.H. SILLEVIS SMITT³, R.J.A. WANDERS^{1,2}, M. DURAN², R.C.M. HENNEKAM¹

Depts. of Pediatrics¹, Clinical Chemistry², Dermatology³, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Conradi-Hünemann syndrome, also known as X-linked dominant chondrodysplasia punctata 2 (CDPX2; MIM 302960), is characterized by a bilateral, asymmetric expression of various skeletal and skin abnormalities, including chondrodysplasia punctata (epiphysic stippling), shortening of long bones and ichthyosis. The disorder is caused by a deficiency of the sterol delta8-delta7 isomerase due to mutations in the EBP gene on chromosome Xp11.22-23. As a consequence of this enzyme deficiency, patients have elevated plasma levels of cholesta-8(9)-en-3β-ol but usually normal levels of cholesterol. Since the disorder is recognized almost exclusively in females it has been assumed to be lethal in males. We here confirm CDPX2 in a 24-old male patient 20 years ago diagnosed with CDPX2 on the basis of his clinical presentation.

Methods: Sterol analysis of plasma and cultured fibroblasts was performed by GC-MS. Sequence analysis of coding exons

and flanking intronic sequences of the EBP gene was performed with fluorescent terminator sequencing.

Results: The patient is severely mentally and developmentally retarded and has a variety of skeletal (polydactyly, dwarfism, scoliosis, unilateral rhizomelic shortening) and skin abnormalities. Sterol analysis in plasma and cultured skin fibroblasts of the patient revealed elevated levels of cholesta-8(9)-en-3β-ol. Surprisingly, mutation analysis of the EBP gene revealed apparent heterozygosity for a 429delG mutation although the patient's karyotype was 46,XY. The different ratios of mutated versus wild-type allele in lymphocyte and fibroblast DNA indicate that the patient is mosaic for a single somatic mutation in the EBP gene.

Conclusion: Although a few male patients with CDPX2 have been reported, this is by far the oldest male patient with CDPX2 identified to date.

110. Omega-oxidation of phytanic acid: a new strategy to treat Refsum's disease?

J.C. KOMEN, M. DURAN, R.J.A. WANDERS

Departments of Clinical Chemistry and Pediatrics, Emma Children's Hospital, Laboratory for Genetic Metabolic Diseases, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Adult Refsum Disease (ARD) is characterized by deficient peroxisomal alpha-oxidation, which is caused by mutations in the gene coding for phytanoyl-CoA hydroxylase in the majority of ARD patients. As a consequence, phytanic acid accumulates in tissues and body fluids, which is the main biochemical marker for ARD and believed to be the major cause of the pathology of the disease. The symptoms include retinitis pigmentosa, peripheral neuropathy, and cerebellar ataxia. Treatment of ARD consists of a diet low in phytanic acid. This study focuses on an alternative route of phytanic acid degradation, i.e. omega-oxidation.

Methods: Human liver microsomes were incubated in a standard reaction medium supplemented with NADPH and phytanic acid followed by determination of the amount of omega-OH-phytanic acid by GC-MS.

Results: The first step in omega-oxidation is hydroxylation at

the omega-end of the fatty acid. In order to study this first step, the formation of hydroxylated intermediates was studied in human liver microsomes incubated with phytanic acid and NADPH. Two hydroxylated metabolites of phytanic acid were identified using gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) analysis, viz. omega- and (omega-1)-hydroxyphytanic acid (ratio of formation 20:1). Formation of the two hydroxylated phytanic acid analogues was NADPH dependent, linear in time up to 60 min, and linear with the amount of protein until 1 mg/ml.

Conclusion: These results indicate that phytanic acid undergoes omega-hydroxylation in human liver microsomes. Upregulation of this alternative omega-oxidation pathway may decrease phytanic acid levels in ARD patients and can therefore be considered as a new approach in the treatment of the disease.

111. Identification of fatty aldehyde dehydrogenase in the breakdown of phytol to phytanic acid

D.M. van den BRINK, J.N.I. van MIERT, G. DACREMONT, J. RONTANI, G.A. JANSEN, R.J.A. WANDERS

Departments of Clinical Chemistry and Pediatrics, University of Amsterdam, Academic Medical Center, Emma Children's Hospital, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Phytanic acid is a branched chain fatty acid that plays a role in a number of metabolic disorders. In Refsum Disease, an accumulation of phytanic acid caused by a defective breakdown is thought to be the direct cause of disease. Treatment of patients therefore consists of prescribing a diet low in phytanic acid. However, a natural source of phytanic acid that has been largely overlooked is its precursor, phytol, which is abundantly found in nature as part of the chlorophyll molecule. Therefore, we studied the metabolism of phytol, of which little is known in humans.

Methods: Human skin fibroblasts from control subjects and Sjögren-Larsson Syndrome (SLS) were incubated with phytol followed by GC/MS-analysis of the cell lysates.

Results: Upon analysis by GC-MS of fatty acids in human

fibroblasts cultured in the presence of phytol, phytanic acid was identified as an intermediate of the conversion of phytol to phytanic acid. This conversion most likely involves two subsequent enzymatic reactions catalyzed by an alcohol dehydrogenase and an aldehyde dehydrogenase. Fibroblasts derived from patients suffering from Sjögren-Larsson Syndrome (SLS), characterized by a deficiency of fatty aldehyde dehydrogenase (FALDH), were found to be deficient in the production of phytanic acid when cultured in the presence of phytol. In addition, fibroblast homogenates of these patients, incubated with phytol in the presence of NAD⁺ did not produce any phytanic acid.

Conclusion: Our results provide unequivocal evidence for the involvement of FALDH in the breakdown of phytol.

112. Megaloblastic anemia in combined methylmalonic aciduria (MMA) and homocystinuria (HC) due to a defect in cobalamin metabolism

B.S. JAKOBS¹, G.B. van den BERG¹, A.R.C. LAARMAN², P.J. van DIJKEN², L. KLUITMANS³, H. BLOM³, E. MORAVA⁴, J. SMEITINK⁴, M. de VRIES⁴, A.A.J. van LANDEGHEM¹

Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium en Trombose dienst¹, Department of Pediatrics², St Elisabeth Hospital, Tilburg, Laboratory of Pediatrics & Neurology³, Department of Pediatrics⁴, UMC Nijmegen, The Netherlands

Introduction: Cobalamin C (cblC) disease, the most frequent variant, is an autosomal recessive defect of cellular cobalamin (cbl) metabolism which is characterized by methylmalonic aciduria and homocystinuria. The majority of patients are diagnosed in the first year of life with failure to thrive, seizures, psychomotor delay and hematological problems. In a few older patients progressive dementia has been described as the presenting finding.

Methods: Here, we describe a 14 year old girl, daughter of healthy consanguin parents. The girl was admitted to the hospital with complaints of fatigue, reduction of appetite, enuresis nocturna and she started to have learning difficulties.

Results: Eye examination was unremarkable, EEG and brain

MRI were normal. Laboratory investigation revealed an increased MCV (114), decreased Hb (5.5 mmol/L), with normal to elevated B12 and folate levels. Bone marrow biopsy showed a megaloblastic anemia; there was no indication for myelodysplasia or a congenital dyserythropoietic anemia. Metabolic investigation showed a methylmalonic aciduria and homocystinuria. Plasma free homocysteine was increased with low plasma methionine.

Conclusion: Complementation analysis in fibroblasts confirmed the clinical diagnosis of cblC disease. Treatment can consist of daily oral carnitine, folate, pyridoxine and intramuscular vitamin B12.

Overigen

113. Pneumoproteins as a lung specific biomarker of alveolar permeability in conventional on pump CABG versus Mini-ECC, a pilot study

W.B. GERRITSEN¹, W.J. van BOVEN², D.S. BOSS¹, J.C. GRUTTERS³, H.J. RUVEN¹, F.J. HAAS¹
Department of Clinical Chemistry¹, Department of Cardio-Thoracic Surgery², Department of Pulmonology³ St Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands

Introduction: Despite improvements of the heart-lung machine (HLM), oxidative stress and subsequent alveolar damage still occur after conventional on-pump coronary artery bypass grafting (CCABG). In an attempt to further improve the conventional HLM a mini- extra corporeal circuit (MECC) was introduced. The lung specific biomarkers CC16 and KL-6 are applied in this study to quantify alveolar dysfunction in both techniques. Under normal conditions the pneumoproteins CC16 and KL-6 are present in the bronchial tree. The release of these proteins in the bloodstream is associated with increased permeability of alveolar membranes.

Methods: In a prospective observational setting the concentration of CC16 and KL-6 are measured during and after 10 consecutive CCABG's and 10 consecutive CABG operations using MECC (MCABG's). These pneumoproteins are measured after induction of anesthesia, before clamping of the ascending aorta, after un-

clamping of the aorta, on arrival at the intensive care unit and the following days until discharge. Peri- and postoperative shunt fractions and clinical observations were monitored simultaneously.

Results: The Student-T test showed significantly reduced concentrations of CC16 early after MCABG as compared to CCABG group (P=0,033). KL-6 showed no consistent pattern during both treatment modalities. Early after CCABG shunt fractions tended to show reduced oxygen transport over the alveolar membrane as compared to MCABG.

Conclusion: CC16 appears to be a useful biomarker for alveolar permeability during coronary artery bypass grafting. Alveolar permeability is significantly reduced during MCABG. Early postoperative alveolar shunt fractions and oxygen gradients show a consistent pattern with a tendency towards impaired alveolar function in CCABG as compared to MCABG in the early postoperative phase.

114. Synovial microparticles from arthritic patients modulate chemokine and cytokine release by synoviocytes

R.J. BERCKMANS¹, R. NIEUWLAND¹, M.C. KRAAN², M.C.L. SCHAAP¹, D. POTS², T.J. M. SMEETS²,
A. STURK¹, P.P. TAK²

Departments of Clinical Chemistry¹ and Clinical Immunology and Rheumatology² of the Academic Medical Center of the University of Amsterdam, Amsterdam

Introduction: Synovial fluid from patients with various arthritides contains procoagulant, cell-derived microparticles. Here we studied whether synovial microparticles modulate the release of chemokines and cytokines by fibroblast-like synoviocytes (FLS).

Methods: Microparticles, isolated from synovial fluid of rheumatoid arthritis (RA) and arthritis control (AC) patients (n=8 and n=3, respectively), were identified and quantified using flow cytometry. Simultaneously, arthroscopically guided synovial biopsies were taken from the same knee joint as the synovial fluid. FLS were isolated, cultured, and incubated in the absence or presence of autologous microparticles for 24 h. Subsequently, cell-free culture supernatants were collected and concentrations of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, interleukin (IL)-6, IL-8, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) were determined.

Results: Consistent with previous observations, synovial fluid from all RA as well as AC patients contained microparticles of monocytic and granulocytic origin. Incubation with autologous microparticles increased the levels of MCP-1, IL-8 and RANTES in 6 out of 11 FLS cultures, and IL-6, ICAM-1 and VEGF in 10 cultures. Total numbers of microparticles correlated with the IL-8 (r=0.91, p<0.0001) and MCP-1 concentrations (r=0.81, p<0.0001), as did the numbers of granulocyte-derived microparticles (r=0.89, p<0.0001 and r=0.93, p<0.0001, respectively). In contrast, GM-CSF levels were decreased.

Conclusion: These results demonstrate that microparticles may modulate trigger the release of chemokines and cytokines by FLS, and therefore may play a role in synovial inflammation and angiogenesis.

115. Verhoogde troponine-T-concentratie bij een statine-geïnduceerde myositis

J.M.W. van den OUWELAND¹, J.H.C. DIRIS²

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Clinisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen; Klinisch Chemisch Laboratorium², Academisch Ziekenhuis Maastricht

Inleiding: Een 73-jarige man met diabetes presenteert zich bij de cardioloog in verband met persisterende spierklachten tot een half jaar na het staken van statines. Ter uitsluiting van een cardiale origine van de hyper-CK-emie (2084 U/l) wordt een troponine T (TnT) bepaald die onverwacht verhoogd blijkt (0.34 µg/l). Herhaalde metingen (na 5 dagen en 2 maanden) leveren identieke TnT-waarden op (0,32 µg/l). Nierfunctie is normaal, ECG is niet afwijkend. Er bestond twijfel over de juistheid van de TnT-waarde.

Methode: Naast verdunnings- en mengproeven werd serum geïncubeerd met heterofiele 'blocking tubes' ter uitsluiting van HAMA's. TnT-fragmenten werden met behulp van immunoprecipitatie en Western blotting zichtbaar gemaakt. Daarnaast werd in serum troponine I, CK-MB massa en CK-iso-enzymen bepaald.

Resultaat: HAMA's waren niet aantoonbaar. Western-blotanalyse laat zien dat TnT-fragmenten aanwezig zijn in het serum. TnI, zowel gemeten op Abbott's AxSym als op DPC's Immulite 2000, is echter negatief. CK-MB/CK is 4,6%, macro-CK niet aantoonbaar.

Conclusie: Bij deze patiënt met polymyositis is wel TnT maar niet TnI aantoonbaar. Bij ongeveer 40% van de patiënten met polymyositis en/of dermatomyositis blijkt TnT, maar niet TnI, verhoogd (1, 2). Het is vooraansnog onduidelijk of het TnT van cardiale of skeletspierorigine is. Mogelijk is sprake van subklinisch cardiaal lijden (ondanks negatieve TnI) of van repressie van cTnT in regenererende skeletspier.

Literatuur: 1. Erlacher P et al. Clin Chim Acta 2001; 306: 27-33.
2. White GH, Tideman PA. Clin Chem 2001; 47: 1130-1.