

12. Westrup B. Newborn Individualized Developmental Care and Assessment Program (NIDCAP) - family-centered developmentally supportive care. *Early Hum Dev.* 2007; 83: 443-449.
13. Schoenmakers CHH, Hurkx GAP, Janssen PGJ, Duinhoven JLP van. Evaluatie van de BiliCheck transcutane bilirubineanalyser. *Ned Tijdschr Klin Chem* 2002; 27: 43-44.
14. Beck M, Kau N, Schlebusch H. Transcutaneous bilirubin measurement in newborn infants: evaluation of a new spectrophotometric method. *Arch Dis Child* 2003; 88: F350.
15. Namba F, Kitajima H. Utility of a new transcutaneous jaundice device with two optical paths in premature infants. *Pediatr Int* 2007; 49: 497-501.
16. Bhutani VK, Johnson LH. Urgent clinical need for accurate and precise bilirubin measurements in the United States to prevent kernicterus. *Clin Chem* 2004; 50: 477-480.
17. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. *Pediatrics* 2004; 114: 297-316.
18. Conceptrichtlijn Hyperbilirubinemie CBO: http://www.cbo.nl/product/richtlijnen/folder20021023121843/con_hyperbil_08.pdf/view

Summary

Korver CRW, Tel RM. Transcutaneous bilirubin measurements in newborns can avoid the need for invasive blood tests. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2008; 33:158-162.

The usefulness of transcutaneous bilirubinometry in avoiding the need for invasive blood tests was evaluated in newborns with hyperbilirubinemia (98% Caucasian), admitted to neonatal or maternal ward. Children <24 hours of age and patients under phototherapy were excluded from the study. During sixteen months, 216 frontal transcutaneous measurements in triplo were performed in 166 children. Transcutaneous bilirubin measurements generally underestimated total serum bilirubin levels. By using a cut-off value of 45 $\mu\text{mol/L}$ under phototherapy-limit to determine the necessity of additional blood testing, sensitivity and negative predictive value for the institution of phototherapy were maximal with a specificity of 0.14. In 80% of cases blood sampling could be avoided or postponed without the risk of missing children in need for phototherapy. Transcutaneous bilirubinometry is a rapid, reliable and patient-friendly procedure. Possibilities for screening purposes by midwives and nursing staff are promising.

Keywords: hyperbilirubinemia; phototherapy; transcutaneous bilirubinometry; neonatology

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2008; 33: 162-165

Aantonen van chylomicronen in pleuravocht

H. RUSSCHER, B.A.C. van ACKER, J.G. BOONSTRA en Y.B. de RIJKE

Chylothorax is het aanwezig zijn in de thoraxholte van chylusvocht dat voornamelijk bestaat uit triglyceriden in de vorm van chylomicronen. Het melkachtige aspect van het pleuravocht is de eerste aanwijzing voor het bestaan van een chylothorax. Een triglyceridegehalte >1,24 mmol/l ondersteunt de diagnose; bij een waarde tussen 0,56 en 1,24 mmol/l zal het aantonen van chylomicronen de diagnose bevestigen. De richtlijn 'Niet-maligne pleuravochten' van de Nederlandse Vereniging van Artsen voor Longziekten en Tuberculose (NVALT) stelt dat dit dient te gebeuren met een lipoproteïne-elektroforese. Deze methode is echter arbeidsintensief, voor overige indicaties obsoleet geraakt en niet beschikbaar op elk laboratorium. In dit artikel wordt de 'afdraaimethode' beschreven als goedkoper, eenvoudiger en sneller alternatief, waarbij gebruik gemaakt wordt van de eigenschap dat chylomicronen gaan drijven als het pleuravocht met hoge snelheid wordt gecentrifugeerd.

Trefwoorden: chylothorax; chylus; chylomicronen; lipoproteïne-elektroforese

Ongeveer één of twee keer per maand wordt op de receptie van ons laboratorium een potje afgegeven dat pleuravocht met een melkachtig aspect bevat, hetgeen zou kunnen passen bij een chylothorax. Omdat het melkachtige aspect van het pleuravocht ook kan passen bij een pseudochylothorax of de aanwezigheid van celdebris, is laboratoriumdiagnostiek nodig om het bestaan van een chylothorax vast te stellen.

Men spreekt van een chylothorax wanneer er chylus in de thoraxholte aanwezig is door een laesie van de ductus thoracicus, die chylus vervoert naar de linker vena subclavia. Chylus is lymfevocht dat rijk is aan triglyceridenrijke chylomicronen afkomstig van de twaalfvingerige darm. Oorzaken van een laesie kunnen worden ingedeeld in traumatisch en niet-traumatisch (zie tabel 1), waarbij, respectievelijk, een maligne lymfoom en chirurgie het meeste voorkomt (1). Een chylothorax wordt meestal rechtszijdig gezien, omdat het grootste gedeelte van de ductus in de rechterhemithorax ligt. Echter, wanneer er schade is bij de uitmonding in de vena subclavia, zal een linkerchylothorax gevonden worden (2-4). Chylothorax is geassocieerd met significante morbiditeit en mortaliteit (1). Pseudochylothorax komt voor bij patiënten met verdikte en soms verkalkte pleura bij wie sprake is van chronisch pleuravocht als gevolg van tuberculose of reuma (1). Door

Afdeling Klinische Chemie, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum Rotterdam, Rotterdam

hoge cholesterolconcentraties kan het aspect van dit pleuravocht hetzelfde zijn als bij chylothorax, maar in tegenstelling tot chylus is het triglyceridegehalte laag (<0,56 mmol/l) (5).

De richtlijn 'niet-maligne pleuravochten' van de Nederlandse Vereniging van Artsen voor Longziekten en Tuberculose (NVALT) geeft aan dat chylothorax in het laboratorium bevestigd dient te worden door in het afgedraaide pleuravocht de concentratie van triglyceriden te bepalen (5). Triglyceriden concentraties boven 1,24 mmol/l wijzen vrijwel zeker (>99% kans) op chylothorax, terwijl concentraties lager dan 0,56 mmol/l vrijwel zeker (>95% kans) wijzen op pseudo-chylothorax (6). Als de concentratie triglyceriden tussen 0,56 en 1,24 mmol/l ligt, moet volgens de richtlijn een lipoproteïne-elektroforese ingezet worden, waarbij de aanwezigheid van chylomicronen bewijzend is voor chylothorax. Hoewel dit een uitstekende techniek is om de aanwezigheid van chylomicronen aan te tonen (6), is lipoproteïne-elektroforese arbeidsintensief en voor overige indicaties inmiddels obsoleet geraakt. Weinig laboratoria zullen deze methode dan ook tot hun beschikking hebben, terwijl een tijdige terugrapportage omtrent de diagnostiek van chylus gewenst is. Uitstellen van chirurgisch ingrijpen kan leiden tot een infectie van de chylothorax, waarna heroperatie bemoeilijkt wordt en postoperatieve morbiditeit en mortaliteit kan toenemen. In dit artikel laten wij zien dat er als vervanging van de lipoproteïne-elektroforese een relatief eenvoudig alternatief -de 'afdraaimethode'- voor handen is om de diagnose chylothorax te bevestigen of uit te sluiten en welke bovendien uitvoerbaar is in elk laboratorium.

Tabel 1. De etiologie van chylothorax (overgenomen uit (1))

<i>Congenitaal</i>	
	Congenitale lymfatische malformaties
	Geboortetrauma
<i>Trauma</i>	
	<i>Iatrogeen</i>
	Operatie in thoraxgebied
	Operatie in hoofd-nekgebied
	Abdominale lymfeklierdissectie
	<i>Niet-iatrogeen</i>
	Penetratie
	Compressie
<i>Niet-traumatisch</i>	
	<i>Maligniteit</i>
	Lymfoom
	Gemetastaseerd carcinoom
	Kaposi-sarcoom
	<i>Infectieus</i>
	Tuberculose
	Filariasis
	Trombose van de vena subclavia
	Mediastinale bestraling
	Pancreatitis en pancreaspseudocysten
	Hypothyreoïdie
	Nefrotisch syndroom

Materialen en Methodes

Materiaal, patiënten en vrijwilligers

Om de lipoproteïne-elektroforese te vergelijken met de afdraaimethode zijn gedurende 1,5 jaar 15 pleuravochten, die ingestuurd werden met vraagstelling 'Chylus?', en sera van 10 vrijwilligers (nuchter en 90 minuten na het eten van een vetrijke lunch) met beide technieken geanalyseerd. De vetrijke lunch bestond uit een kop soep, een broodje met twee kroketten en een beker melk en bevat ongeveer 40 gram vet, wat overeenkomt met ongeveer 50% van de dagelijks aanbevolen hoeveelheid (zie www.caloriechecker.nl). Indien de triglyceridenconcentratie in de sera hoger was dan 1,24 mmol/l werd het serum 1:1 of zonodig 1:2 verdund met fysiologisch zout (0,9% NaCl), zodat een eindconcentratie werd verkregen tussen de 0,56 en 1,24 mmol/l.

Aantonen chylomicronen met behulp van lipoproteïne-elektroforese

De lipoproteïne-elektroforese werd uitgevoerd met gebufferde agarose-gels (8 g/l, pH 7,5) op een semi-automatisch Hydrasis-instrument van Sebia (Issy-les-Moulineaux, Frankrijk) volgens de gebruiksaanwijzing van de Hydragel 7 Lipo + Lp(a) kit. De lipoproteïnen werden na scheiding gedurende 5 minuten gekleurd met een sudanzwartoplossing. Om het teveel aan zwarte kleurstof te verwijderen werd de agarosegel 5 minuten ontkleurd met ethanol (45%), vervolgens afgespoeld met gedestilleerd water en gedroogd. De lipoproteïnen, inclusief de chylomicronen die op het applicatiepunt achterbleven, werden densitometrisch gekwantificeerd.

Aantonen chylomicronen met behulp van de afdraaimethode

Het pleuravocht en de stolbuizen werden gecentrifugeerd gedurende 10 min bij 1370xg. Omdat tijdens deze centrifugeerstep chylomicronen al kunnen gaan drijven werd het supernatant overgepipetteerd naar een secundaire buis en gehomogeniseerd middels op de hand mengen. Vervolgens werd de triglyceridenconcentratie bepaald. Het supernatant werd vervolgens verdeeld over twee buizen en nogmaals gecentrifugeerd (10 min, 12300xg). De buisjes werden behoedzaam uit de centrifuge genomen om te voorkomen dat, bij aanwezigheid van chylomicronen, het romige laagje dat op de vloeistof ligt, verstoord werd en de chylomicronen zich weer zouden mengen met de onderstaande vloeistof. Door met de pipetpunt in een vloeiende beweging door het romige laagje heen te steken werd uit beide buizen het grootste deel van de onderstaande vloeistof opgezogen en overgepipetteerd naar schone buizen. Omdat aan de buitenkant van de pipetpunt chylomicronen kunnen blijven kleven werd bij het overpipetteren getracht om met de pipetpunt niet de binnenwand van de schone buis aan te raken. In het materiaal in de twee schone buisjes werd wederom de triglyceridenconcentratie bepaald. Wanneer de variatiecoëfficiënt tussen de duplo's kleiner was dan 5% werden de gemeten triglyceridenconcentraties gemiddeld. Als dit niet het geval was, hetgeen waarschijnlijk te wijten was aan een pipetteerfout of

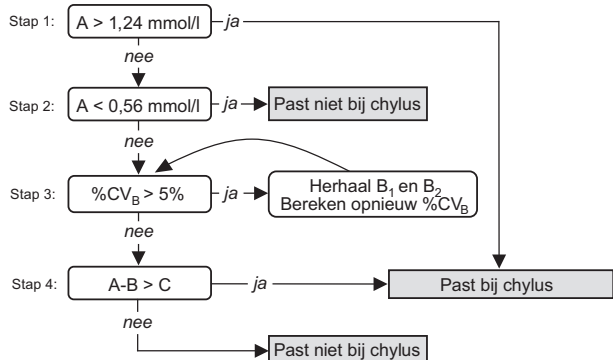
onzorgvuldig overpipetteren, werd de laatste centrifugestap herhaald. Met behulp van een stroomschema (zie figuur 1) werd bepaald of het triglyceridengehalte voor centrifugatie bij 12300xg significant hoger was dan er na. Als dit het geval was werd de vraagstelling 'chylus' bevestigd; in het andere geval werd gerapporteerd "chylomicronen niet aanwezig".

Gevoeligheid van de afdraaimethode

Met behulp van lipoproteïne-elektroforese kunnen kleine concentraties chylomicronen worden aangetoond. Om te onderzoeken of de afdraaimethode dezelfde gevoeligheid heeft, werden sera gebruikt met een aflopende concentratie triglyceriden in de vorm van chylomicronen, door chylomicronenrijk serum te verdunnen met chylomicronendeficient serum. Het chylomicronen-deficiente serum werd gemaakt door het rijke serum te centrifugeren (10 min, 12300g) en vervolgens de onderstaande vloeistof te nemen.

Resultaten en discussie

Gedurende 1,5 jaar werden in ons laboratorium 15 thoraxvochten aangeboden die met zowel de lipoproteïne-elektroforese als de afdraaimethode geanalyseerd zijn op de aanwezigheid van chylomicronen. Voor deze 15 thoraxvochten leidde analyse met behulp van de afdraaimethode tot dezelfde conclusie als bij gebruikmaking van de lipoproteïne-elektroforese. Volgens de criteria in stap 1 en 2 van het stroomschema (figuur 1) kon voor 12 patiënten feitelijk al zonder nadere diagnostiek chylothorax bevestigd (patiënt 1,2 4-8, 11, 13-15) of uitgesloten (patiënt 3) worden. Nadere analyse was alleen geïndiceerd voor drie vochten (patiënt 9, 10

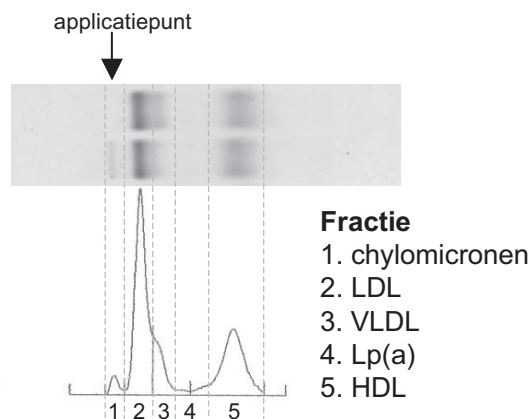


Figuur 1. Algoritme dat leidt tot conclusie of thoraxvocht chylomicronen bevat. **A:** triglyceridenconcentratie in thoraxvocht gecentrifugeerd bij 1370g gedurende 10 minuten. **B₁ en B₂:** triglyceridenconcentraties (duplo) in thoraxvocht gecentrifugeerd bij 12300xg gedurende 10 minuten. **B:** gemiddelde van B₁ en B₂. **C:** discriminant of A significant verschilt van B (>2SD van A). $C = 2\sqrt{2} * \%CV_{TGL} * (A/100)$. $\%CV_{TGL}$: (variatiëcoëfficiënt van de triglyceridenbepaling op routinechemieanalyse). $\%CV_B$: $[(B_1 - B_2) / \sqrt{2}] \times 100\%$.

Een triglyceridenconcentratie in thoraxvocht na centrifugeren (1370g, 10 minuten) van meer dan 1,24 mmol/l ondersteunt de diagnose chylothorax/chylus, terwijl een concentratie minder dan 0,56 mmol/l deze uitsluit. Bij een triglyceridenconcentratie tussen 0,56 en 1,24 mmol/l worden de eventueel aanwezige chylomicronen onder hoge snelheid uit het materiaal gecentrifugeerd. Alleen een significante afname van de triglyceridenconcentratie in supernatant in vergelijking met uitgangsmateriaal bevestigt de aanwezigheid van chylomicronen.

en 12), met triglyceridenconcentraties tussen 0,56 en 1,24 mmol/l. Dit aantal was echter te minimaal om te concluderen dat de lipoproteïne-elektroforese vervangen kan worden door de afdraaimethode. Ter aanvulling zijn daarom chylomicronen-deficiente (nuchter) en chylomicronenrijke (na vetrijke lunch) sera gebruikt van 10 vrijwilligers (zie methoden). Deze sera zijn verdund, zodat de triglyceridenconcentratie tussen 0,56 en 1,24 mmol/l viel en er een gelijkmatige verdeling was in deze range. Na analyse met zowel de lipoproteïne-elektroforese als de afdraaimethode werden in de sera die nuchter afgenomen waren geen chylomicronen aangetoond, terwijl in sera afgenomen na een vetrijke lunch wel chylomicronen aangetoond werden (data worden niet gepresenteerd). Deze resultaten laten bovendien zien dat met deze afdraaimethode chylomicronen niet alleen in pleuravocht, maar ook in serum en ongetwijfeld ook in andere vochten aangetoond kunnen worden. Voor het aantonen van chylomicronen in de circulatie kan beter gebruik worden gemaakt van plasma omdat hierin in tegenstelling tot serum geen vetrijke partikels verdwijnen door insluiting in het stolsel.

Voor de interpretatie van de triglyceridenconcentraties verkregen in de verschillende stappen van de afdraaimethode, dient het stroomschema zoals weergegeven in figuur 1 gevolgd te worden. Er wordt beoordeeld of de concentratie na hard centrifugeren nauwkeurig bepaald is (stap 3) en significant verschilt (stap 4) van het uitgangsmateriaal. Omdat voor het opzuigen van de onderstaande vloeistof met de pipetpunt door het romig laagje gestoken moet worden, kan vanwege mee-opgezogen chylomicronen, de triglyceridenconcentratie van de onderstaande vloeistof vals-verhoogd zijn. Deze bepaling wordt daarom in duplo uitgevoerd, waarbij geconcludeerd wordt dat er geen fout is opgetreden en deze centrifugeerstep niet herhaald hoeft te worden als de variatiecoëfficiënt lager is dan 5%. In stap 4 wordt bepaald of de afname in triglyceridenconcentratie door centrifugatie significant is, wat gedefinieerd wordt als $(2\sqrt{2}) \times$ de totale variatie. De totale variatie (CV_t) wordt bepaald door de analytische (CV_a) en intra-individuele variatie (CV_i): $CV_t = \sqrt{[(CV_a)^2 + (CV_i)^2]}$. Omdat in hetzelfde materiaal wordt



Figuur 2. Chylomicronen blijven achter op het applicatiepunt wanneer de verschillende fracties van cholesterol gescheiden worden d.m.v. agarosegelelektroforese. De verschillende fracties worden gekwantificeerd d.m.v. densitometrische scanning.

Tabel 2. De gevoeligheid van de afdraaimethode vergeleken met de lipoproteïne-elektroforese. A, B en C: zie figuur 1; CR: chylomicronenrijk serum; CD: chylomicronen-deficiënt serum CM: chylomicronen

Verhouding CR:CD	Afdraaimethode					Lipoproteïne-elektroforese		
	A mmol/l	B mmol/l	A-B mmol/l	C	A-B>C?	CM aanwezig?	% lipoproteïne op applicatiepunt	CM aanwezig?
10: 0	1,2	0,60	0,60	0,09	ja	ja	4,3	ja
5: 5	0,89	0,63	0,26	0,07	ja	ja	2,9	ja
2: 8	0,70	0,59	0,11	0,05	ja	ja	1,7	ja
0: 10	0,59	0,61	-0,02	0,05	nee	nee	0	nee

gemeten is de vergelijking niet afhankelijk van de CV_i , waardoor de CV_i identiek is aan de CV_a . Op onze chemieanalyser geldt voor de triglyceridenbepaling in het gebied tussen 0,56 en 1,24 mmol/l een analytische variatiecoëfficiënt van 2,75%, hetgeen betekent dat bij een afname door centrifugatie van 0,1 mmol/l er al een significant verschil is (bij 0,65 mmol/l is dit slechts 0,05 mmol/l) en geconcludeerd kan worden dat er in het pleuravocht trygliceriden in de vorm van chylomicronen aanwezig zijn.

Om te onderzoeken of deze gevoeligheid in de praktijk gehaald wordt, werden sera gebruikt met een aflopende concentratie triglyceriden in de vorm van chylomicronen. In deze experimentele opzet konden minimale hoeveelheden chylomicronen zowel met de afdraaimethode als met de lipoproteïne-elektroforese aangetoond worden (zie tabel 2), waaruit geconcludeerd werd dat met de afdraaimethode een absolute triglyceridendaling van slechts 0,1 mmol/l goed meetbaar is.

In de literatuur wordt gesuggereerd om het aantal leukocyten in het pleuravocht te meten teneinde chylothorax te diagnosticeren, waarbij een concentratie van $>10^9$ leukocyten per liter en $> 80\%$ lymfocyten suggestief is voor chylus (7). Omdat deze methode minder sensitief is en op de routinehematologieanalysers het leukocytengetal foutief verhoogd kan zijn door interferentie van de lichtverstrooiing door chylomicronendeeltjes (8), moet deze methode alleen als verduidelijking naast de triglyceridenbepaling gehanteerd worden.

Ook parenterale voeding (TPV) kan incidenteel in de pleuraholte terechtkomen. De triglyceridenconcentratie is in dergelijke situaties hoog en neemt eveneens af na centrifugatie. Om te voorkomen dat er in zulke gevallen foutief geconcludeerd wordt dat de patiënt chylothorax heeft zal een glucose en/of kalium bepaling gebruikt kunnen worden. Interpretatie dient gedaan te worden in het licht van de TPV samenstelling, maar meestal zullen de glucose- en kaliumconcentratie dusdanig hoog zijn dat dit niet kan passen bij de biologische samenstelling van lymfe (9).

Referenties

- Garcia-Zamalloa A, Ruiz-Irastorza G, Aguayo F.J, Gurutxaga N. Pseudochylothorax. Report of 2 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1999; 78: 200-207.
- Hillerdal G. Chylothorax and pseudochylothorax. *Eur Respir J* 1997; 10: 1157-1162.
- Agrawal V, Doelken MD, Sahn, SA. Seat belt-induced chylothorax, A cause of idiopathic chylothorax? *Chest* 2007; 132: 690-692.
- Nair SK, Petko M, Hayward MP. Aetiology and management of chylothorax in adults. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007; 32: 362-369.
- Richtlijn Niet-maligne pleuravocht; Nederlandse Vereniging van Artsen voor Longziekten en Tuberculose vastgesteld op de ledenvergadering van 14-10-2005.
- Staats BA, Ellefson RD, Budahn LL, Dines DE, Prakash UB, Offord K. The lipoprotein profile of chylous and nonchylous pleural effusions. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 700-704.
- Büttiker V, Fanconi S, Burger R. Chylothorax in children: guidelines for diagnosis and management. *Chest* 1999; 116: 682-686.
- Creer MH, Ladenson J. Analytical error due to lipemia. *Lab Med* 1983; 14: 351-355.
- Wolthuis A, Landewé RBM, Theunissen PHMH, Westerveld LWJMM. Chylothorax or leakage of total parenteral nutrition. *Eur Respir J* 1998; 12: 1233-1235.

Summary

Russcher H, Acker BAC van, Boonstra JG, Rijke YB de. Demonstration of chylomicrons in pleural fluid. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk.* 2008; 33: 162-165.

Chylothorax is a disease where chyle accumulates within the chest cavity. A pleural fluid-triglyceride level exceeding 1.24 mmol/L suggests chylous effusion, whilst a triglyceride level of less than 0.56 mmol/L rules it out. Pleural fluids with triglyceride levels between 0.56 and 1.24 mmol/L must be analysed on the presence of chylomicrons by performing lipoprotein-electrophoresis. This method however, is laborious, expensive and not available in all diagnostic laboratories. Therefore, in this article, an alternative method is presented which is based on the fact that chylomicrons will float after high-speed centrifugation, causing a decrease in triglyceride concentration of the pleural fluid.

Keywords: chylothorax; chyle; chylomicrons; lipoprotein-electrophoresis