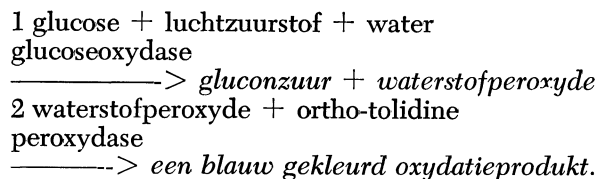


# Storende invloeden bij de enzymatische reacties op glucose in de urine\*

DOOR DR H. H. KREUTZER, BIOCHEMICUS EN H. J. H. KREUTZER, CHEMISCH STUDENT

In de korte tijd sinds de industrie rolletjes (TesTape) of reepjes (Clinistix) papier in de handel heeft gebracht, die met een aantal reagentia zijn geïmpregneerd, zodat zij kunnen dienst doen voor een uiterst snelle en eenvoudige reactie op glucose in urine, is er een vrij uitgebreide literatuur verschenen (*Verschure, Schlesinger, Free*), waaruit blijkt, dat deze strips voor het beoogde doel bruikbaar zijn en verschillende voordelen bieden. Hier en daar, voor zover ons bekend slechts terloops, komt men mededelingen tegen over eventuele vals positieve reacties en over stoffen, die de reactie kunnen storen en die in de urine kunnen voorkomen. Deze mededelingen zijn niet steeds even overtuigend. Het leek ons daarom de moeite waard een onderzoek in te stellen naar stoffen, die deze reactie zouden kunnen storen. Bij de beschrijving en bespreking van onze proeven\*\* kunnen wij het best uitgaan van de principes waarop deze methode berust.

De strips bevatten een mengsel van twee enzymen (glucoseoxydase en peroxydase) en ortho-tolidine. In TesTape bevindt zich bovendien een gele kleurstof. Bij aanwezigheid van glucose treden, als men zo'n strip in de te onderzoeken urine dompelt en haar dan aan de invloed van de lucht blootstelt, twee reacties op:



Wij hebben ons nu af te vragen:

- is de methode specifiek, dat wil zeggen, zal zij nooit positief verlopen als er in de onderzochte urine geen glucose aanwezig is?;
- is zij gevoelig genoeg om ook geringe hoeveelheden glucose aan te tonen en aldus mogelijk een lichte vorm van diabetes te doen ontdekken?;
- is zij niet té gevoelig, waardoor ook in urines van

\* Uit het laboratorium van de R.K. Ziekenverpleging te Hilversum.

\*\* Bij het merendeel van onze proeven hebben wij gebruik gemaakt van Clinistix-strips, bij enkele van TesTape en Uristix. Een vergelijking van deze stroken lag niet in onze bedoeling. Voor het ter beschikking stellen van de stroken zijn wij de N.V. Will Pharma (Clinistix en Uristix) en Eli Lilly International Corp. (TesTape) zeer erkentelijk.

volkomen gezonde personen een positieve reactie kan optreden?;

- d kunnen er in normale of pathologische urinemonsters stoffen voorkomen, die de reactie remmen of haar zo ongevoelig maken, dat zij ondanks de aanwezigheid van glucose negatief uitvalt?;
- e indien het antwoord op een der bovenstaande vragen zo luidt, dat de betrouwbaarheid van de methode niet in alle gevallen vaststaat, is het dan mogelijk, de reactie op een andere wijze uit te voeren, waardoor zij wel betrouwbaar wordt?

a *Is de methode specifiek?* Het is opvallend, dat in de literatuur algemeen als een der voordelen van deze methode wordt genoemd, dat zij specifiek zou zijn omdat zij op enzymreacties berust, terwijl men uit de reactievergelijkingen met één oogopslag kan zien, dat zij niet specifiek kan zijn.

Wij moeten hier onderscheid maken tussen de eerste en de tweede van beide bovengenoemde reacties. Enzymen plegen in hoge mate kieskeurig te zijn ten aanzien van de stoffen, die zij helpen omzetten; glucoseoxydase is op deze regel geen uitzondering: alleen glucose (en zelfs alleen de  $\beta$  vorm van glucose) wordt omgezet.\* De tweede reactie echter, de indicatorreactie, waarbij het waterstofperoxyde, dat bij de eerste reactie is ontstaan, ortho-tolidine oxydeert tot een blauwe kleurstof, is uit de aard der zaak onspecifiek, in zoverre als zij ook zal verlopen, als er waterstofperoxyde in het te onderzoeken monster aanwezig is. Bovendien is het helemaal niet vanzelfsprekend, dat alleen waterstofperoxyde tot de oxydatie van ortho-tolidine in staat is. Dit blijkt inderdaad niet het geval te zijn: verschillende andere oxydatiemiddelen kunnen dit doen. Men kan zich hiervan in de keuken overtuigen door in een zeer verdunde oplossing van bleekwater (dat hypochloriet bevat) of van Persil (waar perboraat in zit) met Clinistix of TesTape te reageren; men krijgt een positieve reactie „op glucose” en kan op het reepje TesTape zelfs aflezen, dat er bijvoorbeeld 2 procent glucose in deze oplossingen zit. In het laboratorium kan men andere oxydatiemiddelen onderzoeken; wij kregen positieve reacties met broomwater, chloorwater, kaliumbichromaat; kaliumjodaat en salpeterzuur echter reageerden negatief.

\* Volledigheidshalve zij vermeld, dat *Bayne* twee zeer nauw met glucose verwante stoffen noemt (2-deoxyglucose en 2-hydroxyglucose, die eveneens, doch in geringer mate, door glucoseoxydase worden omgezet. Daar deze stoffen echter nooit in urine zijn aangetroffen, is dit slechts van theoretisch belang.

De stroken reageren zeer gevoelig op sommige van deze oxydatiemiddelen! Terwijl een glucose-oplossing minstens circa 10 mg procent glucose moet bevatten om een positieve reactie te geven, reageert een waterstofperoxyde-oplossing van 0,2 mg procent reeds positief en eveneens een bleekwaterverduunning van 1:2.000, overeenkomend met 2 mg procent actief chloor!

Zuiver chemisch gesproken is de methode dus allesbehalve specifiek voor glucose. In de klinisch-chemische praktijk zou zij niettemin wel specifiek voor glucose kunnen zijn, als men haar alleen toepast bij het urineonderzoek en als de stoffen, die een vals-positieve reactie kunnen veroorzaken, noch in normale, noch in pathologische urine voorkomen. Toevallig — of als men wil gelukkig — is dit inderdaad het geval; het voorkomen in urine van zulke oxydatiemiddelen is nooit beschreven en ook niet te verwachten. Alles wijst er dus op, dat men terecht uit de positieve uitslag van een Clinistix- of TesTape-reactie in urine mag concluderen, dat deze urine glucose bevat. Dit is echter, het zij nogmaals betoogd, niet vanzelfsprekend, doch toevallig; het is geen verdienste van de methode, maar van onze stofwisseling.

*Frazer* wijst op de mogelijkheid van vals-positieve reacties, als er in het vat, waarin de urine is opgevangen of naar het laboratorium gebracht, sporen zijn achtergebleven van reinigingsmiddelen, die oxydatiemiddelen, zoals perboraat of hypochloriet bevatten. Wij hebben er ons proefondervindelijk van overtuigd, dat dit gevaar niet erg groot is. Bij hypochloriet bleek, dat de geur van deze stof nog waarneembaar is in een zodanige verduunning dat de reactie al lang negatief is; bichromaatverduunningen reageren al negatief, als hun gele kleur nog zichtbaar is; alleen bij zeer slordig spoelen zou het denkbaar zijn, dat er een positieve reactie optreedt. Men kan dit overigens moeilijk als een onvolkomenheid van de methode duiden; het is eveneens denkbaar, dat de jampot of de limonadefles, waarin sommige patiënten hun urine ter onderzoek aanbieden, nog resten glucose bevat. In zo'n geval zou men zelfs niet van een vals positieve reactie, maar van een vals positieve urine moeten spreken.

*Van Everdingen* noemt hypochloriet en soda als oorzaak van vals negatieve reacties; wat hypochloriet betreft is er kennelijk sprake van een drukfout, daar hij elders terecht zegt, dat hypochloriet een positieve reactie geeft. Met soda hebben wij noch een positieve reactie, noch een remming gevonden.

*b Is de methode voldoende gevoelig?* Proeven met een reeks oplossingen van glucose van afnemende concentratie wezen uit, dat een oplossing, die ongeveer 10 mg procent (= 0,01 procent) glucose bevat, duidelijk positief reageert met Clinistix, terwijl een oplossing, waarin zich minder dan ongeveer 3 mg procent glucose bevindt, een negatieve reactie vertoont. Oplossingen, waarvan de concentratie tussen deze twee grenzen ligt, geven nog wel een blauwe kleur, maar deze is veel bleker en komt langzamer op.

Men is geneigd uit het bovenstaande te concluderen, dat de methode zeker gevoelig genoeg zal zijn, doch ziet dan over het hoofd, dat geenszins vaststaat, dat de gevoeligheid in waterige oplossingen van glucose en in urine dezelfde is. Zoals wij onder c en d nader zullen aantonen, blijkt dit inderdaad niet het geval te zijn: elke urine bevat, hoewel in

wisselende hoeveelheden, stoffen, die de reactie remmen.

Men kan, om uit te maken of de methode voor het urineonderzoek voldoende gevoelig is, ook een andere weg kiezen, namelijk in een groot aantal urine-monsters zowel de enzymatische reactie als de gebruikelijke reductieproeven doen en de uitkomsten vergelijken. Dit is door verschillende onderzoekers gedaan; op de meest uitgebreide schaal door *Free* c.s., tot wier publikatie wij ons hier zullen beperken. Zij onderzochten onder andere urinemonsters van 2.075 willekeurige ziekenhuispatiënten, zowel volgens Benedict als met Clinistix. In 1.423 gevallen gaven beide proeven een negatieve uitkomst; in 552 gevallen toonde de Benedictreactie een spoor reductie aan, terwijl de Clinistixproef negatief was. Schrijvers konden nu aantonen, door met deze monsters een aantal andere proeven te doen, dat dit verschil in uitkomst niet te wijten was aan een geringere gevoeligheid van de enzymatische reactie, doch dat de reductie was teweeggebracht door andere stoffen dan glucose: Clistinix was dus duidelijk specifiek. In 36 gevallen tenslotte verliep de Clinistix-reactie positief, terwijl de reductieproef negatief uitviel; dit wijst op een hogere gevoeligheid van de Clinistixreactie. Deze en soortgelijke onderzoeken wettigen de conclusie, dat de enzymatische reactie gevoeliger is dan die van Benedict en Fehling.

Wat de praktische betekenis van deze conclusie betreft, zij gewezen op het onderzoek van *Mulder en Van de Weg*, die bij een bevolkingsonderzoek onder andere 20 grensgevallen van diabetes, 20 lichte gevallen en 4 gevallen van een gestoorde bloedsuikercurve tijdens de zwangerschap opspoorden en er hiervan respectievelijk 6, 4 en 2 niet gevonden zouden hebben, als zij op grond van de negatieve reductieproef de betreffende personen, in wier urine Clinistix een positieve uitslag gaf, niet nader zouden hebben onderzocht.

*c Is de methode niet té gevoelig?* Het is denkbaar, dat de methode zo gevoelig is, dat zij reeds positief kan uitvallen in de urine van normale personen. Zoals bekend, is de terugresorptie van glucose door de niertubuli niet volledig en mag dus het voorkomen van een spoor glucose in urine fysiologisch genoemd worden. Helaas bestaat er in de literatuur geen eenstemmigheid over de concentratie van glucose in normale urine. *Peters en Van Slyke* geven op „20 mg procent”, *West en Todd* „140 mg per etmaal”, *Cantarow en Trumper* „minder dan 500 mg per etmaal”, *Thomson en King* „niet meer dan 1 g per etmaal”. Waarschijnlijk liggen aan deze cijfers bepalingen ten grondslag, die met een of andere reductiemethode verricht zijn en dus betrekking hebben op de som van glucose en andere reducerende stoffen. In een recent onderzoek met een chromatografische methode, waardoor hij de verschillende suikers afzonderlijk kon bepalen, vond *Apthorp* veel lager waarden, namelijk 1-12 mg procent met een gemiddelde van 4,3 mg procent.

Als men zich op deze laatste cijfers baseert, kan men direct zeggen, dat de fysiologische glucosurie geen positieve Clinistixreactie kan veroorzaken;

hiervoor is immers minstens 10 mg procent glucose nodig. Houdt men de oudere cijfers voor de juiste, en denkt men niet aan remmende stoffen, dan zou men tot de conclusie kunnen komen, dat elke urine positief moet reageren. Daar dit beslist niet het geval is, moeten ofwel de oudere cijfers te hoog zijn, ofwel moet elke urine remmende stoffen bevatten.

Dat dit laatste inderdaad het geval is, konden wij door twee reeksen van proeven aantonen. In de eerste voegden wij aan 1 ml van een 20 mg procent glucoseoplossing 1 ml water toe; de concentratie werd dus 10 mg procent; de Clinistixreactie bleek positief te verlopen. Verdunden wij echter 1 ml van dezelfde 20 mg procent glucoseoplossing met telkens 1 ml van 25 willekeurige urinemonsters (die negatief reageerden op glucose) dan verliep in al deze 25 gevallen de reactie negatief, hoewel ook deze verdunningen 10 mg procent glucose (zelfs iets meer) bevatten.

Vervolgens hebben wij aan een aantal urinemonsters van gezonde personen bekende hoeveelheden glucose toegevoegd en onderzocht wat de minimale glucoseconcentratie was, waarbij Clinistix positief reageerde. Deze grensconcentratie bleek uiteen te lopen, doch was steeds aanmerkelijk hoger dan 10 mg procent; als voorbeeld noemen wij de uitkomsten met urinemonsters van zeven proefpersonen (dezelfde, waarop wij later terugkomen): er moest, om een positieve Clinistixreactie te krijgen, aan deze monsters respectievelijk 70, 40, 80, 40, 80, 180 en 60 mg procent glucose worden toegevoegd.

Uit deze cijfers blijkt, dat zelfs als men de boven aangehaalde hogere cijfers voor de fysiologische concentratie van glucose in urine aanvaardt, de gevoeligheid van de Clinistixreactie niet groot genoeg is, om deze fysiologische glucose in urine aan te tonen. Daar bovendien de kans op een vals-positieve reactie in urine verwaarloosbaar klein is (stoffen, die deze zouden kunnen veroorzaken, komen in urine niet voor) mag men concluderen, dat elke positieve Clinistixreactie bewijst, dat er méér dan de normale hoeveelheid glucose in de betreffende urine aanwezig is en dus een indicatie is voor een nader onderzoek.

*d Vals-negatieve reacties.* Het is geenszins vanzelfsprekend, dat men ook het omgekeerde mag zeggen, namelijk dat een negatieve Clinistixreactie bewijst, dat er niet méér dan de normale hoeveelheid glucose in de urine aanwezig is. Theoretisch kan de reactie gestoord worden, met andere woorden kan er een vals-negatieve reactie optreden, door verschillende oorzaken:

- 1 bedorven of minder gevoelig geworden strips;
- 2 een temperatuur of pH, waarbij de enzymen niet of in veel geringere mate werkzaam zijn;
- 3 stoffen, die de enzymen „vergiftigen”;
- 4 stoffen, die het gevormde peroxyde ontleden.

ad 1 Als de strips te lang aan het daglicht of aan een vochtige omgeving zijn blootgesteld, loopt hun gevoeligheid sterk terug.

ad 2 Geheel in overeenstemming met de gegevens uit de literatuur vonden wij, dat temperatuurverschillen tussen  $\pm 15^\circ$  en  $37^\circ$  en verschillen in pH tussen  $\pm 4$  en  $8$  geen invloed hadden op de gevoeligheid van de reactie.

ad 3 Daar het bekend is, dat vele enzymen uitermate gevoelig zijn voor sporen van zware metalen, HCN en andere „enzymvergiftigen” en daar met name sporen van zware metalen in urine kunnen voorkomen hebben wij de invloed van enkele van deze stoffen nagegaan. Hoewel er bij „hoge” concentraties (van de orde van enkele honderden mg procent) een geringe remming van de reactie in een 100 mg procent glucoseoplossing viel waar te nemen (met zilver-, koper- en kwikzouten en met HCN) bleken de sporen, die in urine zouden kunnen worden verwacht, geen enkele invloed op de reactie uit te oefenen. De gebruikelijke onteiwitting van urine met een hoge concentratie aan loodacetaat bleek geen remming te veroorzaken.

ad 4 Van de stoffen, die waterstofperoxyde kunnen ontleden, dient volledigheidshalve allereerst het enzym katalase te worden genoemd. Merkwaardig genoeg komt dit enzym als verontreiniging in de strips voor, waarmee wij de reactie uitvoeren; de gewone handelspreparaten van glucoseoxydase bevatten katalase. Dit enzym maakt de reactie ongevoeliger, omdat het een deel van het gevormde waterstofperoxyde ontleedt. In hoeverre de aanwezigheid (in vrij grote hoeveelheden) van katalase in erythrocyten en andere cellen (die in het sediment kunnen voorkomen) een rol speelt, is ons niet bekend.

Van veel groter belang zijn reducerende stoffen. De tweede reactie, die bij deze methode plaats vindt, is een oxydatie-reductieproces, waarbij het waterstofperoxyde (onder invloed van het enzym peroxydase) het ortho-tolidine oxydeert tot een blauw gekleurde verbinding of, wat op hetzelfde neerkomt, waarbij het reductiemiddel ortho-tolidine waterstofperoxyde reduceert tot water, waarbij het zelf in een blauwe stof overgaat. Het ligt voor de hand, dat ook andere reductiemiddelen, al naar de mate van hun reducerend vermogen, met ortho-tolidine kunnen concurreren en aldus het optreden van de blauwe kleur verhinderen.

Om dit nader te onderzoeken, hebben wij aan oplossingen, die respectievelijk 100 en 200 mg procent glucose bevatten verschillende hoeveelheden van enkele reductiemiddelen toegevoegd en telkens in de aldus verkregen mengsels de Clinistixproef verricht. De resultaten waren als volgt:

	ascorbinezuur; clin	hydrochinon; clin	ferro-ammoniumsulfaat; clin	formaldehyde; clin	natriumsulfiet; clin
100 mg% glucose	32 mg% + 46 mg% —	7,5 mg% + 12,5 mg% —	175 mg% + 400 mg% —		80 mg% + 105 mg% —
200 mg% glucose	70 mg% + 100 mg% —	10 mg% + 25 mg% —	400 mg% + 700 mg% —	3.000 mg% + 6.000 mg% —	100 mg% + 130 mg% —

Uit deze cijfers blijkt, dat alle door ons onderzochte reductiemiddelen, hoewel in zeer verschillende mate, de reactie remmen.

Het is bekend, dat er in normale en pathologische urine een aantal stoffen voorkomt, die reducerende eigenschappen bezitten. Van deze stoffen hebben wij ascorbinezuur gekozen voor een meer uitgebreid onderzoek, onder andere omdat Free c.s. vermelden, dat enkele urinemonsters, waaraan zij vrij veel (350-800 mg procent) glucose hadden toegevoegd, doch die niettemin een negatieve Clinistixreactie vertoonden „had extremely high concentrations of ascorbic acid”. Ook *Comer* noemt de remmende werking van ascorbinezuur en geeft zelfs een cijfer: 0,05 procent ascorbinezuur remt de reactie in een 0,1 procent oplossing van glucose.

Wij bereidden een glucoseoplossing van bekende sterkte, verdeelden deze over een aantal buizen en voegden aan elke buis een andere hoeveelheid ascorbinezuur toe. Daarna deden wij in elk mengsel de Clinistixreactie, die wij als volgt aflazen: trad er binnen 1 minuut géén blauwe kleur op, dan noemden wij de uitkomst negatief; trad er een blauwkleuring op, die binnen een halve minuut begon en na 1 minuut duidelijk was, dan noteerden wij een positieve uitkomst; met  $\pm$  gaven wij aan, dat de kleur pas later dan na een halve minuut begon op te komen en na 1 minuut nog slechts licht was en meestal ook vlekkelig. Wij geven toe, dat er in deze beoordeling een subjectief element zit en dat er kleine verschillen optreden, als men de reactie niet telkens op precies dezelfde manier uitvoert; deze verschillen gaven echter hoogstens reden tot twijfel tussen + en  $\pm$  of tussen — en  $\pm$ .

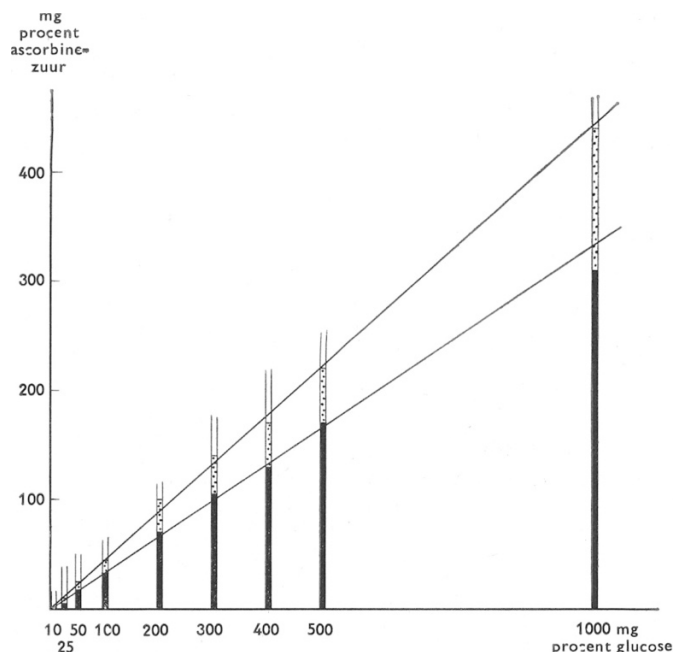
Een voorbeeld van zo'n reeks volgt:

concentratie aan glucose	concentratie aan ascorbinezuur	uitkomst van de reactie
200 mg procent	50 mg procent	+
idem	60	+
idem	70	+
idem	80	$\pm$
idem	90	$\pm$
idem	100	—
idem	110	—

Op dezelfde wijze onderzochten wij oplossingen, die respectievelijk 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 en 1.000 mg procent glucose bevatten. De uitkomsten zijn in figuur 1 weergegeven.

Er blijkt een lineair verband te bestaan tussen de concentraties aan glucose en die aan ascorbinezuur, zowel bij volledige als bij gedeeltelijke remming. Iedere glucoseoplossing reageert negatief met Clinistix, als er ascorbinezuur aan is toegevoegd in een circa 0,4 keer zo hoge concentratie. Dit geldt ook nog voor hogere concentraties aan glucose: een 10 procent oplossing geeft, als men er circa 4,4 procent ascorbinezuur aan toevoegt, met deze (zo gevoelig!) methode een negatieve uitkomst.

*Teller* vermeldt, dat ook urinezuur de reactie sterk



Figuur 1. Uitkomsten van de Clinistixreactie in mengsels van glucose en ascorbinezuur. Zwart: positieve reactie; gestippeld:  $\pm$  reactie; wit: negatieve reactie. De uitkomst van de proef met 10 mg procent glucose kon op deze schaal niet worden weergegeven; zij luidt: met 1 mg procent ascorbinezuur +; met 2 mg procent ascorbinezuur en meer: —.

zou storen. In een oplossing van 20 mg procent glucose, waaraan wij stijgende hoeveelheden urinezuur (met wat loog op pH 7 gebracht) toevoegden, bleef de Clinistixreactie positief tot een concentratie van 60 mg procent urinezuur; bij hogere concentraties (wij gingen tot 200 mg procent) werd de kleur van de strips groenachtig blauw, maar een negatieve reactie trad niet op. Als wij urinezuur toevoegden aan mengsels van glucose en ascorbinezuur werden dezelfde uitkomsten verkregen als wanneer aan deze mengsels geen urinezuur was toegevoegd, alleen waren ook hier de positieve strips in de oplossingen met urinezuur wat groenig van kleur. Een remmende werking van urinezuur, die in de praktijk van betekenis zou zijn, volgt dus uit onze proeven niet.

Tenslotte hebben wij aan glucoseoplossingen nog toegevoegd: 500 mg procent kreatinine, 1 procent natriumsalicylaat of 1 procent ureum dan wel ze verzadigd met toluol, chloroform of thymol. In alle gevallen vonden wij eenzelfde gevoeligheid als in even sterke glucoseoplossingen.

Omdat andere suikers, waarvan bekend is, dat zij weliswaar met Clinistix negatief reageren, doch een positieve reductieproef geven, uit hoofde van hun reducerende eigenschappen mogelijk de enzymatische reactie zouden kunnen remmen, hebben wij mengsels van glucose en respectievelijk fructose, galactose en lactose onderzocht; de gevoeligheid van de reactie bleek echter door deze suikers niet te worden beïnvloed.

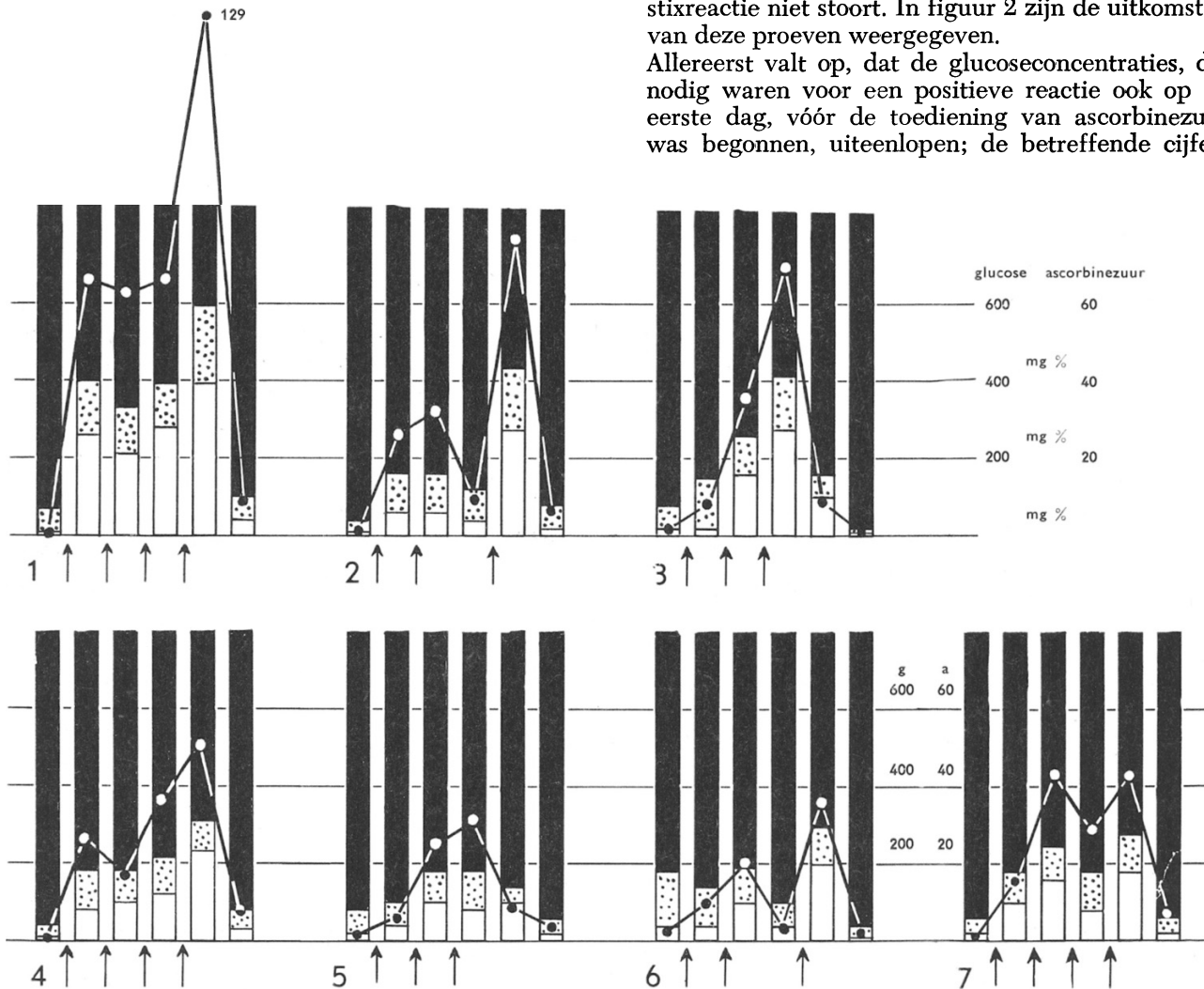
De enige door ons onderzochte stof, die een sterk

remmende werking uitoefende en die in urine verwacht kan worden, was dus ascorbinezuur. Het ascorbinezuurgehalte van urine loopt sterk uiteen en is voornamelijk afhankelijk van de verzadigingstoestand van de weefsels en van de opname van dit vitamine met het voedsel. Concentraties, die bij onze proeven in vitro een zodanige remming uitoefenden, dat de reactie er aanmerkelijk minder gevoelig door werd, zijn zeker denkbaar, vooral bij personen, die verzadigd zijn en bij hen, die een grote dosis hebben geslikt.

Om na te gaan, in hoeverre dit invloed heeft op de betrouwbaarheid van een negatieve uitkomst van de Clinistixproef hebben wij aan zeven gezonde proefpersonen enkele avonden achtereen een dosis van 1 gram ascorbinezuur toegediend en de volgende dag in een willekeurige urineportie, die vóór de middag

geloosd was, de gevoeligheid van de Clinistixreactie nagegaan. Hiertoe voegden wij aan 10 ml urine bekende hoeveelheden van een glucoseoplossing toe en reageerden na elke toevoeging met Clinistix. Wij konden gemakkelijk de glucoseconcentraties berekenen, waarbij de reactie +, ± en — was. Nagenoeg tegelijkertijd met deze proef titreerden wij de urine met dichloorfenol-indofenol, waardoor wij de concentratie aan ascorbinezuur konden bepalen. Omdat wij zoveel mogelijk de omstandigheden wilden nabootsen, waaronder urinemonsters in het laboratorium op glucose onderzocht worden, hebben wij geen enkele maatregel genomen om oxydatie van het ascorbinezuur tegen te gaan; wij onderzochten sommige porties, direct nadat zij waren geloosd, andere enkele uren later. In de laatste zal ongetwijfeld een deel van het ascorbinezuur geoxydeerd zijn tot dehydroascorbinezuur, dat bij de titratie met dichloorfenolindofenol niet wordt bepaald en waarvan aangenomen mag worden, dat het ook de Clinistixreactie niet stoort. In figuur 2 zijn de uitkomsten van deze proeven weergegeven.

Allereerst valt op, dat de glucoseconcentraties, die nodig waren voor een positieve reactie ook op de eerste dag, vóór de toediening van ascorbinezuur was begonnen, uiteenlopen; de betreffende cijfers



Figuur 2. Concentraties aan glucose in urinemonsters, die een negatieve (wit), een ± (gestippeld) en een positieve (zwart) reactie gaven. Elke groep van zes kolommen geeft de uitkomsten weer van het onderzoek van de urinemonsters van dezelfde proefpersoon op zes achtereenvolgende dagen. Met

pijlen is aangeduid, op welke avonden zij 1 gram ascorbinezuur slikten. Door de kolommen heen lopen lijnen, die de punten verbinden, welke het gehalte aan ascorbinezuur weergeven.

zijn reeds eerder in dit artikel genoemd. Bij alle proefpersonen is de eerste dag na het slikken van vitamine C de gevoeligheid van de Clinistixreactie duidelijk verminderd; bij nummer 1 zelfs in sterke mate; bij allen is bovendien de concentratie aan ascorbinezuur toegenomen. Bij de meesten neemt deze concentratie in de volgende dagen nog verder toe; bij allen daalt zij sterk op de dag, nadat geen ascorbinezuur meer was ingenomen. Opvallend is, dat de vermindering van de gevoeligheid van de Clinistixreactie parallel loopt met de stijging van het gehalte aan ascorbinezuur; met name blijkt dit bij proefpersoon 2 en 6, die beiden een avond vergaten, hun tabletjes in te nemen; prompt daalde de volgende dag het ascorbinezuurgehalte en steeg de gevoeligheid van de glucosereactie.

De maximale concentratie aan glucose, waarbij in onze proeven een negatieve Clinistixreactie optrad, bedroeg niet minder dan 390 mg procent. De betreffende proefpersoon (nummer 1) was blijkbaar tevoren met ascorbinezuur verzadigd (hoewel zijn urine de eerste dag slechts weinig van deze stof bevatte); de concentraties aan ascorbinezuur in zijn urineporties werden bijzonder hoog. Maar ook van de zes anderen waren er vier, bij wie in minstens een der urineporties gedurende de proef een glucosegehalte van 200 mg procent niet ontdekt zou zijn, als men hierop met Clinistix zou hebben gereageerd. Als men bedenkt, dat wij doelbewust hebben afgezien van een poging om record-uitkomsten te krijgen (dan hadden wij alle urineporties onmiddellijk na het lozen, vóór er enig verlies aan ascorbinezuur kon zijn opgetreden, moeten onderzoeken en van elke proefpersoon méér dan één portie moeten nakijken, om die met de hoogste uitkomsten te vinden) en verder, dat onze dosis ascorbinezuur wel hoog was, maar beslist niet hoger dan die, welke sommige patiënten, al dan niet op advies van de arts, plegen te slikken, in de hoop „een opkomend griepje te onderdrukken”, moet men tot de conclusie komen, dat er zich in de praktijk gevallen kunnen voordoen, waarbij een duidelijke glucosurie niet ontdekt zal worden, als men uitsluitend met deze „zo gevoelige” strips reageert. Men zou dus onzes inziens de patiënt, wiens urine men op deze wijze onderzoekt, uitdrukkelijk moeten vragen of hij kort tevoren vitamine C heeft geslikt.

Ook (of speciaal) bij keuringen zij men dit gevaar van vals-negatieve uitkomsten indachtig; het bleek in onze proeven zeer eenvoudig te zijn een niet eens zo geringe hoeveelheid suiker in de urine te maskeren door de volkomen legale handelwijze van het slikken van enkele tientallen tabletjes vitamine C! Wij menen, dat uit deze proeven nog een andere conclusie te trekken is. Terwijl men in een waterige oplossing van glucose uit het optreden van een  $\pm$  reactie kan concluderen, dat het glucosegehalte ongeveer tussen 3 en 10 mg procent ligt, laat een dergelijke uitkomst (die wij opzettelijk niet met de

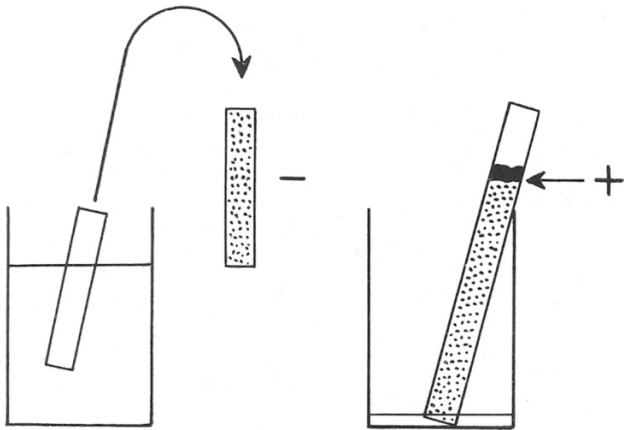
deze reactieuitkomst theoretisch en in figuur 2 hoe zij in de praktijk bij alle mogelijke concentraties aan glucose kan optreden. Terecht waarschuwt dan ook de fabrikant van Clinistix tegen het trekken van enige kwantitatieve conclusie uit de intensiteit van de blauwe kleur; helaas doet de vervaardiger van Tes-Tape dit niet, met het gevolg, dat men bij het urineonderzoek dan ook herhaaldelijk een grote discrepantie zal tegenkomen tussen de glucoseconcentraties, die men op de strip heeft afgelezen en die, welke men op grond van een ander onderzoek (Fehling; polarimeter) in dezelfde urine vindt. Dat bij onderzoek van een waterige glucoseoplossing met Tes-Tape de aflezing van de kleurenschaal aardig klopt, zegt niets omtrent de bruikbaarheid van deze schaal bij het urineonderzoek.

Bij enkele proeven met Uristixstrips (gecombineerde strips voor het onderzoek op eiwit en glucose), waarmee ook een schatting van het glucosegehalte mogelijk zou zijn, vonden wij, in overeenstemming met onze verwachtingen, eveneens nu en dan grote verschillen.

De remmende werking van ascorbinezuur berust zeker niet alleen op het wegvangen van waterstofperoxyde. Als men de gewone benzidineractie (die op eenzelfde beginsel berust als de tweede fase van de enzymatische reactie op glucose) uitvoert in een bloedverdunding, die net nog even rose is, krijgt men een sterk positieve uitkomst; heeft men echter tevoren 1 mg ascorbinezuur (= 1/176 mmol) toegevoegd, dan verloopt zij negatief, hoewel er 1 ml 3 procent peroxyde (=  $\pm$  1 mmol, dus een enorme overmaat) aanwezig is. In de literatuur wordt vermeld, dat ascorbinezuur de werking zowel van glucoseoxydase als van peroxydase remt, dat peroxydase de oxydatie van ascorbinezuur door peroxyde sterk bevordert (*Keilin en Hartree*) en dat ook benzidine deze oxydatie, zij het in geringe mate, versnelt (*Lyr*). In het simpele reepje wit papier, dat in een suikerurine blauw wordt, spelen zich dus zeer gecompliceerde reacties af.

*e Zijn er variaties in de uitvoering mogelijk, die de reactie altijd betrouwbaar maken?* Wij hebben in het bovenstaande enkele foutenbronnen naar voren gebracht, die de op zich zo waardevolle enzymatische reactie op glucose in bepaalde gevallen onbetrouwbaar maken. Als men wil zoeken naar mogelijkheden om deze foutenbronnen te elimineren, wordt men gehandicapt door de eis, dat de reactie eenvoudig moet blijven, omdat anders haar grootste voordeel boven andere verloren zou gaan.

Allereerst bestaat het gevaar, dat men soms een glucosurie over het hoofd kan zien, als de onderzochte urine veel remmende stoffen (ascorbinezuur en misschien andere, door ons niet onderzochte) bevat. Behalve dat men de patiënt kan vragen, of hij de laatste dagen misschien ascorbinezuur geslikt heeft, kan men gebruik maken van de eigenschap, dat dezelfde stoffen, die door hun reducerende eigenschappen de enzymatische reactie remmen, de uitslag van de reductieproeven versterken. Vindt men in een urine, die een negatieve Clinistixreactie vertoonde eveneens een negatieve uitkomst met de Fehling- of Benedictproef, dan weet men zeker, dat



Met TesTape kan men door een kunstgreep de invloed van remmende stoffen (althans van ascorbinezuur) soms uitschakelen. Van mengsels van glucose en ascorbinezuur, die negatief reageerden, als wij er op de gebruikelijke wijze een stukje TesTape (of een Clinistixstrip) indompelden, brachten wij een kleine hoeveelheid op de bodem van een penicillineflesje. In dit flesje staken wij een reepje TesTape van circa 10 cm, zodat het ene einde net in de vloeistof stak en lieten dit reepje zich langzaam volzuigen. Er trad een duidelijk positieve reactie op, doch alleen op die plaats in het papier, waar de vloeistof het verst omhoog was gestegen. Klaarblijkelijk verplaatsten de glucose- en de ascorbinezuurmoleculen zich niet met dezelfde snelheid. Ook als men de TesTapereactie op de gewone wijze uitvoert, doch een vrij lang reepje neemt en dit alleen met het onderste stuk in de urine dompelt, kan men soms eenzelfde effect waarnemen: alleen of vooral vlak bij de plaats, waar men het reepje in de vingers had en waar het zich dus volgezogen heeft, treedt een blauwe kleur op. Mogelijk heeft de fabrikant hetzelfde voor ogen, als hij adviseert, steeds de donkerste plaats van het papier af te lezen. Wij vonden met TesTape ook in enkele urinemonsters positieve reacties, als wij een lang reepje met urine lieten volzuigen, terwijl dezelfde monsters negatief reageerden, als wij zuinigheidshalve een zo kort mogelijk reepje vrijwel geheel in de urine dompelden. Met Clinistix is een dergelijke scheiding tussen glucose en remmende stoffen niet mogelijk; met de losse reepjes TesTape (die niet meer in de handel zijn), die uit dunner papier bestaan, gaat het beter dan met het dikkere papier van de rollen.

Terwijl het bij een eerste onderzoek van een patiënt of bij een keuring vooral van belang is, dat men weet óf er glucose in de urine zit, zal men bij het controleren van een al dan niet behandelde diabeticus bovendien een indruk willen hebben van de hoeveelheid glucose in de urine. Hiertoe is de enzymatische methode beslist minder bruikbaar dan de reductieproeven, waarbij men een duidelijk verschil waarneemt tussen een spoor glucose, een half procent of drie procent. Het blauw gekleurde papiertje zegt alleen, dát er glucose is, maar het kan evengoed

60 mg procent als 3 g procent zijn. Om snel enig idee te krijgen van de hoeveelheid glucose zou men twee wegen kunnen bewandelen:

- 1 verdun in een reageerbuis een deel urine met ongeveer tien delen leidingwater en herhaal de Clinistixreactie; valt zij nu negatief uit, dan bevatte de urine slechts weinig glucose. Ook als de reactie nu  $\pm$  geworden is, mag men deze conclusie trekken, want de remmende stoffen zijn ook circa elf keer verdund;
- 2 voer de reactie op de gebruikelijke wijze uit en dompel de strook, als zij blauw geworden is, in een vers bereide oplossing van ongeveer 100 mg procent ascorbinezuur (bijvoorbeeld 1 tabletje vitamine C in 50 ml leidingwater). Als de blauwe kleur nu verdwijnt, was er minder dan circa 500 mg procent glucose aanwezig; als zij blijft bestaan, méér.

Als curiositeit willen wij vermelden, dat wij er in geslaagd zijn, door met behulp van een aangepunte lucifer op Clinistixstrips met ascorbinezuuroplossingen te schrijven „< 1%”, deze tekens wit op een blauwe ondergrond te zien verschijnen, als wij zulke strips in oplossingen dompelden, die minder dan circa 1 procent glucose bevatten. Zoals te verwachten was, is deze behandeling echter niet reproduceerbaar en lukt het meestal niet.

**Samenvatting en conclusies.** De enzymatische reactie op glucose in urine met behulp van geïmpregneerde stroken papier biedt door haar extreme eenvoud met name aan de huisarts grote voordelen. Over het algemeen zal deze reactie betrouwbare resultaten opleverden, al dient tegen een kwantitatieve interpretatie met nadruk te worden gewaarschuwd. Theoretisch bestaan er echter vele mogelijkheden, dat de reactie gestoord wordt en dus tot foutieve uitkomsten aanleiding geeft. Het gevaar voor vals-positieve uitkomsten lijkt in de praktijk uiterst gering; dat voor vals-negatieve daarentegen bestaat wel degelijk.

Hoewel wij alleen in ascorbinezuur een stof vonden, die een sterk remmende invloed uitoefent, is het zeer wel mogelijk, dat er ook andere zijn, die eenzelfde effect uitoefenen.

Juist omdat de uitvoering van deze reactie zo uiterst eenvoudig is lijkt het van belang, dat degene, die haar toepast, op de hoogte is van de bijzondere gecompliceerdheid van de chemische achtergrond en zich realiseert, dat foutieve uitkomsten mogelijk zijn.

- Apthorp, G. H. (1957) *J. clin. Path.* 10, 84.  
 Bayne, S. (1958) *Lancet* I, 283.  
 Comer, J. P. (1956) *Ann. Chemistry* 28, 1748.  
 Everdingen, W. A. G. van (1959) *huisarts en wetenschap* 2, 202.  
 Frazer, S. C. (1958) *Lancet* I, 166.  
 Free, A., E. Adams, M. L. Kercher, H. Free en M. Cook (1957) *Clin. Chem.* 3, 163.  
 Keilin, D. en E. F. Hartree (1955) *Biochem. J.* 60, 310.  
 Lyr, H. (1956) *Planta med.* 48, 239.  
 Mulder, J. D. en E. van de Weg (1958) *huisarts en wetenschap* 2, 66.  
 Teller, J. D. (1956) *Abstr. Pap. Amer. chem. Soc.* 130th Meeting, 69.  
 Schlesinger, F. G., J. C. M. Verschure en P. A. M. van der Vegt (1958) *Ned. T. Geneesk.* 102, 754.  
 Verschure, J. C. M. (1958) *huisarts en wetenschap* 1, 194.