

concentrations showed similar increases in NHBD kidney perfusates over a 4 h machine perfusion period. The activities of each marker were increased in discarded versus transplanted kidneys, with H-FABP concentration having the tendency to be the most sensitive marker (3). Based on these findings, the conclusion was reached that next to donor age, donor medical history, macroscopic appearance, warm ischemic time and *ex vivo* perfusion, biomarkers like H-FABP represent useful pre-transplant indicators of the suitability of NHBD kidneys for transplantation (3). L-FABP as marker for human ischemic injury has only recently been evaluated (10). Urinary L-FABP levels from human renal transplants showed a significant correlation with peritubular capillary blood flow and ischemic time of the transplanted kidney (11). These data showed that L-FABP could be a sensitive and predictive early biomarker of acute ischemic injury.

Conclusion

H- and L-FABP appear to be useful markers for rapid detection and monitoring of renal injury enabling better monitoring of patient treatment and status of kidney viability. As renal disease also appears to be an independent risk factor for cardiovascular disease (CVD), earlier detection by these biomarkers can stratify treatment and reduce death by CVD. The use of H-FABP as plasma marker for cardiac injury has already been recognized (3) while especially urinary L-FABP indicates to be a promising and useful marker for renal injury.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2009; 34: 251-254

References

1. Glatz JF, van der Vusse GJ. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res* 1996; 35: 253-82.
2. Maatman RG, van Kuppevelt T, Veerkamp J. Two types of fatty acid-binding protein in human kidney. Isolation, characterization and localization. *Biochem J* 1991; 273: 759-766.
3. Pelsers MM, Hermens WT, Glatz JFC. Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. *Clin Chim Acta* 2005; 352: 15-35.
4. Kamijo A, Kimura K, Sugaya T, et al. Urinary fatty acid-binding protein as new clinical marker for the progression of chronic renal disease. *J Lab Clin Med* 2004; 143: 23-30.
5. Kamijo A, Sugaya T, Hikawa A, et al. Clinical evaluation of urinary excretion of liver-type fatty acid-binding protein as marker for monitoring chronic kidney disease: a multicenter trial. *J Clin Lab Med* 2005; 145: 125-33.
6. Pelsers MMAL, Davies D. Fatty acid-binding protein: a new biomarker of nephrotoxicity in the rat (abstract). In: Abstract Book to the 4th international conference on lipid binding proteins, Maastricht the Netherlands, 2001.
7. Kamijo A, Sugaya T, Kimura K. Urinary fatty acid-binding protein in renal disease. *Clin Chim Acta* 2006; 374: 1-7.
8. Kamijo A, Sugaya T, Hikawa A, et al. Urinary liver-type fatty acid-binding protein as a useful biomarker in chronic kidney disease. *Moll Cell Biochem* 2006; 284: 175-82.
9. Kievit JK, Pelsers MMAL, Daemen MARC, Buurman WA, Kootstra G, et al. Quantification of early ischemic renal injury in the rat using fatty acid-binding protein (abstract). In: Abstract Book of the European Meeting on Biomarkers of Organ Damage and Dysfunction, Cambridge UK, April 3-7, 2000:107.
10. Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, et al. Renal L-type fatty acid-binding protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2894-902.

Vitamine-B12-bepaling: probleem opgelost!

A.P. van ROSSUM^{1,2}, F.M. VERHEIJEN³, J.M.T. KLEIN GUNNEWIEK⁴, A. CASTEL¹ en M.A. FOURAUX³

Inleiding

Onderzoek naar de totale vitamine-B12-concentratie in bloed (cobalamine) is een veelvuldig voorkomende bepaling in klinisch-chemische laboratoria. De nauwkeurigheid van de vitamine B12-bepaling is al jaren onderwerp van discussie. Met name in het lage, klinisch-relevante gebied, kennen alle beschikbare *in vitro*-diagnostische testen een grote variatie. De variaties in het normale bereik zijn aanzienlijk geringer.

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Ziekenhuis Bronovo, Den Haag¹; Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden²; Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium (GKCL), Albert Schweitzer Ziekenhuis, Dordrecht & Beatrix Ziekenhuis, Gorinchem³; Afdeling Klinische Chemie, Universitair Medisch Centrum St Radboud, Nijmegen⁴

E-mail: m.fouraux@asz.nl

Ondanks de diagnostische beperkingen blijft de bepaling van vitamine B12 de belangrijkste biochemische screeningsmarker voor vitamine-B12-deficiënties (1). Patiënten met vitamine-B12-concentraties lager dan 150 pmol/l worden in het algemeen geduid als vitamine-B12-deficiënt, terwijl een deficiëntie onwaarschijnlijk wordt geacht bij patiënten met concentraties boven de 221 pmol/l (2, 3). Echter, een vitamine-B12-concentratie van <150 pmol/l in bloed houdt niet altijd in dat er sprake is van een vitamine-B12-deficiëntie op weefselniveau (4) en vitamine-B12-concentraties tussen de 150 en 221 pmol/l zijn lastig te interpreteren (2, 3). Dergelijke concentraties behoeven dan ook een aanvullende methylmalonzuur(MMA)- of totaal-homocysteïne(tHcy)bepaling ter uitsluiting dan wel bevestiging van een vitamine-B12-deficiëntie (1, 3, 5).

Siemens Healthcare Diagnostics (Siemens) heeft door de jaren heen vitamine-B12-assay's op de markt ge-

bracht voor verschillende platforms zoals de Immulite 2000 (IML2000) en de Immulite 2500 (IML2500). Eerder publiceerden wij al over problemen bij de overgang van de IML2000 naar de IML2500 (6, 7). In 2005 introduceerde Siemens een vitamine-B12-bepaling voor de IML2500. Deze IML2500-bepaling zou volgens de technische specificaties vergelijkbare resultaten genereren ten opzichte van de IML2000 bepaling (8). De laboratoria van de auteurs evalueerden vervolgens de IML2500-assay volgens CLSI EP-10 en EP-9. Hierbij werden variatiecoëfficiënten (VC's) gevonden die in overeenstemming waren met de geclaimde specificaties van de fabrikant (7). Regressieanalyse van de IML2500 ten opzichte van de IML2000 liet een klein maar acceptabel verschil zien tussen beide assay's. In bovengenoemde laboratoria werd de vitamine-B12-bepaling na overleg met de kliniek overgezet van de IML2000 naar de IML2500. Spoedig na introductie van de IML2500 assay werden de laboratoria door klinici benaderd met de vraag of er problemen waren met de vitamine-B12-bepaling. Er werden naar de mening van de klinici frequenter dan voorheen vitamine-B12-concentraties lager dan 150 pmol/l gerapporteerd. Zoals vermeld in de vorige publicatie (4) analyseerde het GKCL retrospectief de interne en externe kwaliteitscontroles in de periode januari 2005 tot maart 2006 (in het GKCL werd de IML2500 medio 2005 geïntroduceerd). Deze analyse liet geen bijzonderheden zien. Daarentegen liet het patiëntmaandgemiddelde een significante daling zien van 350 pmol/l in januari 2005 naar 310 pmol/l in maart 2006. Overeenkomstig was het percentage patiënten met vitamine-B12-concentraties kleiner dan 112 pmol/l gestegen van 1 naar 6 procent in die periode. MMA- en tHcy-concentraties waren echter normaal bij een selectie van deze patiënten, suggestief voor foutief-verlaagde vitamine-B12-concentraties. Vervolgens werd een uitgebreide analyse uitgevoerd, die liet zien dat de vitamine-B12-bepaling op de IML2500 met name onder de 150 pmol/l een juistheidprobleem kent. Daarnaast was de dupliceerbaarheid van sommige metingen onacceptabel (VC's tot 33%). Deze problemen werden met Siemens besproken, waarop Siemens de IML2500-bepaling heeft aangepast. In deze publicatie beschrijven wij de analytische evaluatie van deze nieuwe vitamine-B12-bepaling.

Methode

De aangepaste vitamine-B12-bepaling (IML2500 PEO, 'project evaluation only') is in de deelnemende laboratoria vergeleken met de oorspronkelijke vitamine-B12-test op de IML2000. Voor de vergelijking zijn op de verschillende laboratoria patiëntensera ge-

selecteerd met vitamine-B12-concentraties onder de 150 pmol/l (per laboratorium circa 200 patiëntensera). Daarnaast is de IML2500-PEO-bepaling vergeleken met de IML2500-assay en een vitamine-B12-bepaling op de Centaur CP (Siemens). Teneinde ook de presaties van de IML2500-PEO-bepaling in het concentratiegebied boven de 150 pmol/l te meten zijn 30 patiëntensera met vitamine-B12-concentraties boven de 150 pmol/l gemeten op de IML2500 PEO, IML2000 en Centaur CP. Regressieanalyse vond plaats middels Passing-Bablok (Analyse-it) en correlatieanalyse volgens Pearson (Analyse-it). Dupliceerbaarheid van de aangepaste IML2500 PEO-bepaling werd berekend uit de metingen volgens CLSI EP-9. Patiëntmaandgemiddelden van de vitamine-B12-bepaling zijn na introductie van de aangepaste bepaling in het GKCL vergeleken met de patiëntmaandgemiddelden van vóór de introductie van de IML2500.

Resultaten

Methodevergelijking van de aangepaste IML2500-PEO-bepaling liet een goede vergelijkbaarheid bij lage vitamine-B12-concentraties (rondom 150 pmol/l) zien ten opzichte van de IML2000. Een representatieve vergelijking met 172 patiëntensera liet geen significante afwijking van de IML2500-PEO zien ten opzichte van de IML2000 assay (IML2500 PEO = 0,97 (IML2000) + 0,96; $r = 0,89$), zie tabel 1 en figuur 1. Ook de vergelijking tussen de IML2000 en IML2500-PEO met patiëntensera met hogere vitamine-B12-concentraties (gemiddeld 320 ± 136 pmol/l; IML2000) was goed (IML2500-PEO = 0,96 (IML2000) - 7,7; $r = 0,98$; $n = 30$). In het lage concentratiegebied (< 150 pmol/l) liet de niet-aangepaste IML2500-assay opnieuw lagere resultaten zien in vergelijking tot de IML2000-assay (IML2500 = 1,07 (IML2000) - 35,97; $r = 0,89$). De Centaur CP liet daarentegen enigszins hogere resultaten zien in het concentratiegebied onder 150 pmol/l ten opzichte van de IML2000, terwijl vergelijkbare resultaten werden gegenereerd boven 150 pmol/l; zie tabel 1 en figuur 1. Een vergelijking met hogere vitamine-B12-concentraties (320 ± 136 pmol/l, IML2000) liet een significante afwijking zien van de Centaur CP ten opzichte van de IML2000 en dus ook IML2500-PEO (Centaur CP = 0,72 (IML2000) + 55; $r = 0,97$; $n = 30$). Dupliceerbaarheid van de IML2500-PEO liet een gemiddelde VC van 3,1% (range 0,0 - 11,3%) zien (concentratierange 119,5 - 599,5 pmol/l). Op basis van deze analytische specificaties werd de IML2500-PEO-vitamine-B12-assay als een acceptabele, verbeterde bepaling beoordeeld en werd de bepaling door Siemens geïntroduceerd in de markt. Analyse van

Tabel 1. Resultaten van de methodevergelijking met de Immulite 2000 bij lage vitamine-B12-concentraties (153 ± 44 pmol/l, IML2000). Regressieanalyse werd gedaan volgens Passing-Bablok, correlatieanalyse volgens Pearson. CI = confidence interval.

	Helling (95% CI)	Snijpunt y-as (95% CI)	Correlatie (95% CI)
Immulite 2500	1,07 (0,99 - 1,16)	-35,97 (-49,39 - -23,85)	0,89 (0,86 - 0,92)
Immulite 2500 PEO	0,97 (0,88 - 1,06)	0,96 (-12,85 - -13,86)	0,89 (0,85 - 0,92)
Centaur CP	0,85 (0,78 - 0,93)	32,85 (21,79 - 43,44)	0,87 (0,82 - 0,90)

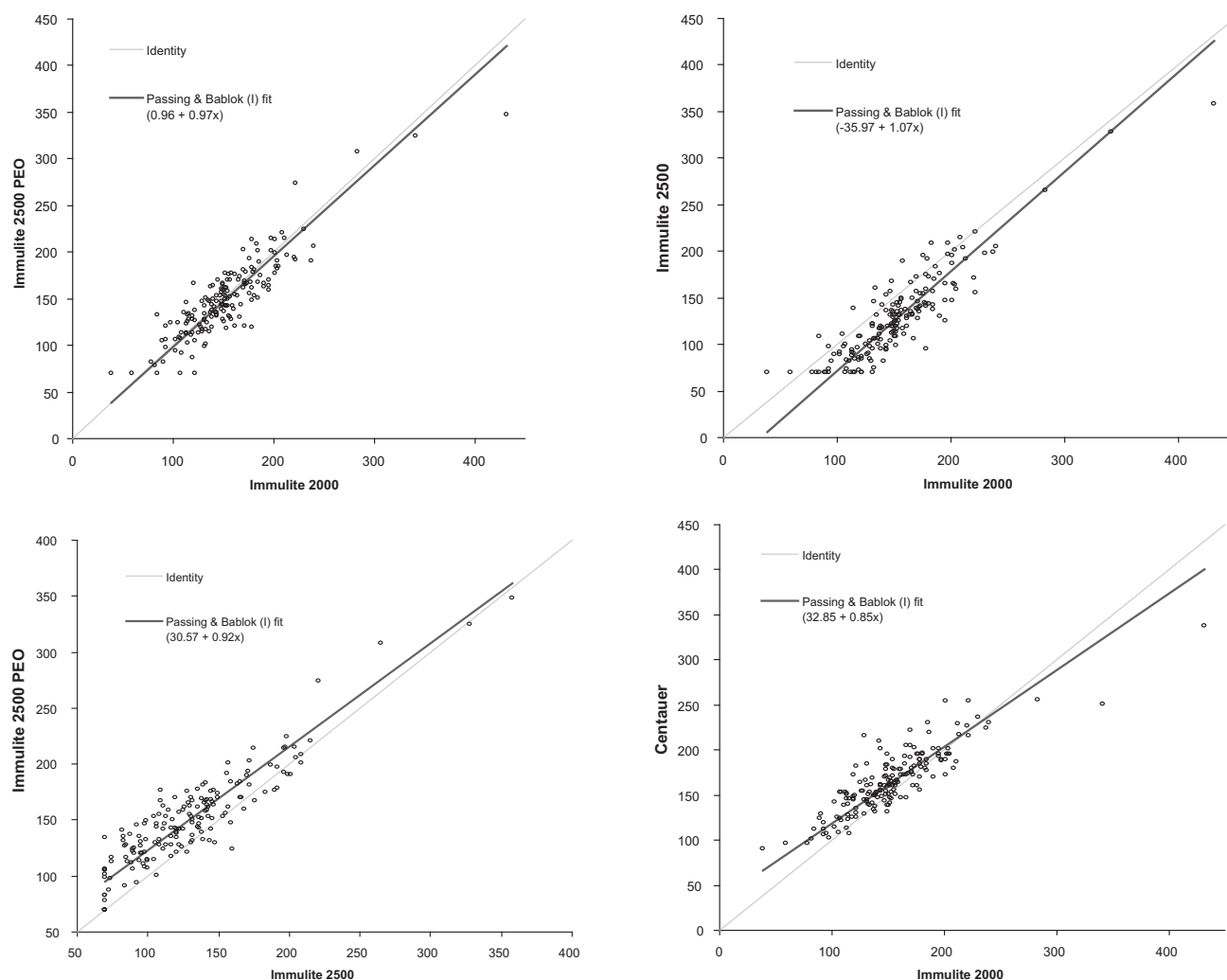
de patiëntmaandgemiddelden van de vitamine-B12-bepaling, uitgevoerd met de IML2500-PEO-bepaling liet een stijging naar 345 pmol/l zien binnen het GKCL (~1500 patiënten/maand), ten opzichte van 310 pmol/l ten tijde van de oude IML2500-bepaling. Hiermee zijn de patiëntmaandgemiddelden terug op het oude niveau van 350 pmol/l ten tijde van de IML2000. Eveneens is het percentage patiënten met vitamine-B12-concentraties kleiner dan 112 pmol/l gereduceerd van 6% naar 1-2%.

Discussie en conclusie

Wij rapporteren over de verbetering van de vitamine-B12-bepaling op de IML2500. Samenwerking tussen onze laboratoria en Siemens heeft geresulteerd in een verbeterde IML2500-vitamine-B12-assay, waarbij de eerdere problemen met de bepaling zijn opgelost. Het blijft echter de vraag wat de problemen van de eerste IML2500-vitamine-B12-test heeft veroorzaakt. Alle Immulite vitamine-B12-bepalingen maken gebruik van drie incubatiecycli. In de eerste incubatiestap worden endogene vitamine-B12-bindende eiwitten gehydrolyseerd in een alkalisch milieu en worden intrinsic-factor(IF)-blokkerende antilichamen geïnactiveerd. In de tweede stap gaat het vrijgekomen vitamine B12 een competitie aan met het op partikels geïmmobiliseerde

vitamine B12 voor het 'hog (varken) intrinsic factor' (HIF). In de laatste stap wordt vervolgens alkalisch-fosfatase-gelabeld anti-HIF toegevoegd, waarna ongebonden conjugaat wordt weggewassen en substraat wordt toegevoegd. Bij de overgang van de IML2000 naar de IML2500 zijn deze incubatiecycli gehalveerd van dertig naar vijftien minuten. Verbetering van de assay zou volgens Siemens liggen in de optimalisatie van de concentraties blokkerende agentia in het reagens. Blokkerende agentia als cobinamide worden toegevoegd aan het reagens om enerzijds het vitamine B12 vrij te maken van de endogene bindende eiwitten en anderzijds om reassociatie van het vrije vitamine B12 aan endogene binders te voorkomen. Het is voorstelbaar dat door de verbeterde saturatiestap met cobinamide meer vrij vitamine B12 overblijft voor binding aan het HIF en zodoende hogere vitamine-B12-resultaten genereert.

Onze bevindingen tonen aan dat niet blind kan worden vertrouwd op interne en externe kwaliteitscontroles. Ten eerste, omdat de meeste commercieel verkrijgbare kwaliteitscontroles de hydrolysestap van de bepaling niet goed testen. Deze controles zijn namelijk gebaseerd op niet-natieve en/of niet-humane componenten, waarbij het totale vitamine B12 al als vrij vitamine B12 aanwezig is. Ten tweede, omdat de gebruikte



Figuur 1. Methodevergelijking van de verschillende vitamine-B12-bepalingen.

externe kwaliteitscontroles niet de gehele range van vitamine-B12-concentraties bevat. Met name rondom het klinische beslispunt van 150 pmol/l zijn geen kwaliteitscontrolemonsters beschikbaar. Een essentiële aanvulling op de kwaliteitscontroles zijn, naast het routinematig meten van humane plasmapools rondom het klinische beslispunt, ook het regulier monitoren van de patiëntmaandgemiddelden. Als laatste maakt deze publicatie duidelijk dat communicatie tussen het laboratorium, de kliniek en de fabrikant van essentieel belang is geweest voor zowel de kwaliteitsborging als verbetering van de kwaliteit van deze bepaling.

Dankwoord

De auteurs danken dhr. P. Meeuwissen van Siemens Healthcare Diagnostics voor de goede samenwerking.

Referenties

- 1 Hvas AM, Nexø E. Diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency--an update. *Haematologica* 2006; 91: 1506-1512.
 - 2 Matchar DB, McCrory DC, Millington DS, Feussner JR. Performance of the serum cobalamin assay for diagnosis of cobalamin deficiency. *Am J Med Sci* 1994; 308: 276-283.
 - 3 Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP, Allen RH. Diagnosis of cobalamin deficiency: II. Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 1990; 34: 99-107.
 - 4 Stabler SP. Screening the older population for cobalamin (vitamin B12) deficiency. *J Am Geriatr Soc* 1995; 43: 1290-1297.
 - 5 Wiersinga WJ, Hoekstra JBL, de Rooij SEJA, Huijmans JGM, Fischer JC. De diagnostiek van vitamine-B12-deficiëntie herzien. *Ned Tijdschr Geneesk* 2005; 149: 2789-2794.
 - 6 Fouraux MA, Verheijen FM, de Kluis M, Klein Gunnewiek JMT. Onverwachte problemen bij de vitamine B12 bepaling. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2008; 33: 170-172.
 - 7 Vlasveld LT, van 't Wout JW, Meeuwissen P, Castel A. High measured cobalamin (vitamin B12) concentration attributable to an analytical problem in testing serum from a patient with pernicious anemia. *Clin Chem* 2006; 52: 157-158.
 - 8 Siemens Medical Solutions Diagnostics. Immulite 2500 Vitamin B12 PILKVB-8;2006-12-29.
- Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2009; 34: 254-255

Spermatozoa detection and counting on chip

L.I. SEGERINK, R.J. RATERINK, A.J. SPRENKELS, I. VERMES* and A. van den BERG

Introduction

Semen analysis is usually one of the first tests performed for detecting the cause of infertility of a couple. Therefore the man has to collect his semen in a special container and deliver it within one hour of collection to the hospital. The parameters determined with a semen analysis are the morphology and motility of the spermatozoa in the semen, as well as the concentration. The haemocytometer is the gold standard for concentration determination (1), but this labour intensive method is in larger laboratories replaced by an expensive computer assisted semen analysis system. Another way that gives an estimation of the spermatozoa concentration uses flow-cytometry (2, 3), while antibody binding (4) and fluorescence labelling (5) are used to determine the concentration of progressive motile spermatozoa ($>5\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). None of these approaches assess the concentration of spermatozoa without the use of an expensive system, labour intensive handling and sample preparation. Furthermore, due to intra-individual variation, the result of a single test is not reliable and at least three tests have to be done (6). To

make the determination of spermatozoa concentration more objective, cheaper and more patient friendly a lab-on-a-chip is developed. The possibility to detect spermatozoa on chip using electrical impedance measurements is investigated. Results of preliminary experiments showed that the conductivity of semen was not correlated with spermatozoa concentration, possibly due to a very low volume fraction of spermatozoa (0.1% for $20\cdot 10^6\text{mL}^{-1}$). Therefore the cells are counted in a much smaller volume using a microchannel.

Method

Electrical impedance measurements are used to detect spermatozoa. A difference in conductivity between the spermatozoon and the surrounding medium is necessary for detection. When a spermatozoon passes the electrode pair (figure 1C), a change in the electrical impedance can be detected. Using this method, the spermatozoa can be counted and when the volume of the introduced semen is known, the concentration can be calculated. A glass-glass chip has been produced consisting of a microchannel with electrodes (figure 1A). The microchannel, with a depth of 20 μm , tapers at the electrode area, resulting in a channel width of 42 μm . Two planar platinum electrodes span the microchannel with an interelectrode distance of 30 μm .

For the experiments, the chip was fitted on an inverted microscope (Leica DM IRM) with a camera. The electrical impedance was measured with a home

*BIOS, the Lab-on-a-Chip Group, MESA⁺ Institute for Nanotechnology, University of Twente, Enschede; *Department of Clinical Chemistry, Medisch Spectrum Twente, Enschede*

E-mail: L.I.Segerink@ewi.utwente.nl