

Posterabstracts

Samenvattingen van de posterpresentaties tijdens het 61^e Congres van de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde op 24 en 25 april 2008 te Lunteren

Categorie 1: Analytisch

Fotometrie, elektrochemie, sensortechnologie

1. Quantification of urinary uric acid excretion by LC-MS/MS; comparison with other methods

M. van der HAM¹, B.H.C.M.T. PRINSEN¹, I.M.L.W. KEULARTS³, J. BIERAU³, N. VERHOEVEN¹, L. DORLAND³, R. BERGER¹, T.J. de KONING¹, M.G.M. de SAIN-van der VELDEN¹

Department of Metabolic and Endocrine Diseases¹, University Medical Centre Utrecht, Utrecht, Department of Clinical Chemistry², Meander Medisch Centrum, Amersfoort, Department of Clinical Genetics³, Maastricht University Hospital, Maastricht

Introduction: Urinary uric acid (UUA) is a diagnostically important biomarker for screening on defects in the purine metabolism. Increased as well as a decreased excretion of UA are observed in several diseases involving purine metabolism. A LC-MS/MS method for quantification of UUA was developed, validated and compared with three other assays for UUA quantification.

Methods: UA was analyzed after sonication, dilution and centrifugation of urine samples. 1,3-15N₂-UA was used as internal standard. LC-MS/MS was performed in negative electrospray ionization mode with multiple reaction monitoring of transitions m/z 167.0 \leq 124.0 (UA) and m/z 169.0 \leq 125.0 (15N₂-UA). Results from LC-MS/MS, HPLC-PDA and two enzymatic (uricase) methods were compared. Interference of ascorbic acid was studied.

Results: Limits of detection and quantification of UUA were 0.2 and 0.6 μ mol/L, respectively. Intra- and inter assay varia-

tions of UUA were 3.6% and 7.0%. Linearity was tested from 0-830 μ mol/L ($r^2=0.9993$). Results on UA of LC-MS/MS versus HPLC-PDA were comparable ($r^2=0.9886$) as well as results from the two uricase assays ($r^2=0.9038$); large discrepancies, however, were observed in comparing the results from the uricase assays and LC-MS/MS. Urine samples from patients with a defect in purine metabolism and a fructose-1,6-biphosphatase deficiency were analyzed with LC-MS/MS and results were compared with age-related reference values. Ascorbic acid gave a major interference in the uricase assays but no interference in the LC-MS/MS method.

Conclusion: The LC-MS/MS method developed for routine determination of UUA proved to be rapid, robust and sensitive and more specific than the widely accepted uricase enzymatic based methods. Age-related reference values for urinary UA were determined and could improve diagnostic efficacy.

2. Neonatale screening nieuwe stijl en het belang van direct enzymonderzoek in lymfocyten om onderscheid te maken tussen terecht- en fout-positieven

R.J.A. WANDERS, J.P.N. RUITER, M. DOOLAARD, N.G.G.M. ABELING, M. DURAN, A.B.P. van KUILENBURG, W. KULIK, H.R. WATERHAM

Afdeling Klinische Chemie en Kindergeneeskunde, Lab Genetische Metabolische Ziekten, Academisch Medisch Centrum Amsterdam

Inleiding: Per 1 januari 2007 is de neonatale screening in Nederland uitgebreid met een groot aantal "nieuwe" ziekten. Een algemeen erkend probleem is het voorkomen van foutpositieven. Om die reden hebben wij gezocht naar een methode die simpel en snel onderscheid maakt tussen terecht- en foutpositieven.

Methode: Lymfocyten worden door middel van dichtheidsgradient centrifugatie geïsoleerd, waarna de activiteit van de verschillende enzymen direct (met behulp van spectrotometrie) of indirect (incubatie, gevolgd door bepaling van het product van de enzymreactie met behulp van HPLC, wel of niet gekoppeld aan tandem-MS) gemeten wordt.

Resultaat: In de voorbije periode hebben wij een groot aantal aanvragen gehad in het kader van de neonatale screening nieuwe stijl, waarbij het met name ging om vraagstellingen in

het kader van galactosemie (n = 91), biotinidase deficiëntie (n = 22) en MCAD deficiëntie (n = 16). Wat betreft galactosemie kan gezegd worden dat er slechts één patiënt met een volledige deficiëntie werd gevonden, met daarnaast veel (n = 39) partiële deficiënties, die waarschijnlijk geen klinische consequenties hebben. Voor wat betreft biotinidase deficiëntie werd ook één volledige deficiëntie gevonden, met daarnaast veel (n = 15) partiële deficiënties. Elf van de 16 patiënten, ingestuurd voor MCAD-deficiëntie, bleken inderdaad deficiënt.

Conclusie: In alle gevallen, behalve aanvragen voor wat betreft LCHAD MTP-deficiëntie, leidde directe analyse van het betreffende enzym tot eenduidige conclusies omtrent het wel of niet deficiënt zijn van een bepaalde patiënt. Geconcludeerd wordt dat directe enzymanalyse in lymfocyten goed onderscheid kan maken tussen terecht en fout positieven.

3. Morfologische beoordeling van cellen in diverse lichaamsvloeistoffen met behulp van digitale microscopie

W. van GELDER, R.B. DINKELAAR

*Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium Dordrecht & RIVAS zorggroep Gorinchem,
Albert Schweitzer Ziekenhuis*

Inleiding: Morfologische analyse van cellen in lichaamsvochten zoals pleuravocht, BAL-vloeistof, ascitesvocht en CAPD-vloeistof stelt extra eisen aan de expertise van analisten. Het morfologisch spectrum van cellen in lichaamsvloeistoffen is uitgebreider dan in liquor en bovendien heeft de centrifugatietechniek (cytospins) invloed op de morfologie. Het softwareprogramma dat samen met Cellavision werd ontwikkeld voor analyse van liquormonsters op het digitale microscopysysteem DM96, werd in dit onderzoek ook getest op zijn bruikbaarheid voor analyse van andere lichaamsvloeistoffen.

Methode: De DM96 is een digitaal microscopysysteem uitgerust met beeldherkenningssoftware om cellen in cytospin-preparaten automatisch te klassificeren. Het systeem werd getest met cytospin-preparaten van 71 lichaamsvloeistoffen van diverse oorsprong, conform het protocol EP9A. Elk monster werd tweemaal - onafhankelijk van elkaar - handmatig geanalyseerd, waarbij per analyse 200 cellen werden geclasseerd. Elk monster werd ook tweemaal geanalyseerd op de DM96 waarbij 200 cellen per analyse werden geclasseerd

(preclassificatie). Postclassificatie correctie werd verricht door dezelfde analisten. Het systeem ontwikkeld is voor analyse van liquormonsters, heeft het systeem geen scoremogelijkheid voor mesotheelcellen. Deze cellen zijn voor dit onderzoek in de categorie "other cells" geplaatst.

Resultaat: In totaal werden 54774 leukocyten in 71 monsters geanalyseerd. Het systeem scoorde 88% van de cellen direct goed. Lineaire regressie analyse van manuele en DM96 tellingen van de monsters resulteerde voor de preclassificatie in regressie coëfficiënten $y > 0.89x$ ($r^2 > 0.90$) voor de categorieën neutrofielen, lymfocyten en macrofagen en voor postclassificatie $y > 0.94x$ en $r^2 > 0.94$. De categorieën eosinofielen en "other cells" scoren lager.

Conclusie: De DM96 is in staat gangbare celcategorieën (neutrofielen, lymfocyten, macrofagen) in lichaamsvloeistofmonsters adequaat en snel te analyseren, kwalitatief vergelijkbaar met de resultaten van ervaren analisten.

Literatuur: H. Ceelie et al, J. Clin Pathol 2007; 60: 72-79

4. pH in pleura: de bloedgasanalyser als gouden standaard

J.A. RIEDL¹, M. van de WERKEN², S.T. IJPMA¹, P.B. BERENDES^{1,2}

Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Albert Schweitzer Ziekenhuis, Dordrecht, Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium², Beatrixziekenhuis, Gorinchem

Inleiding: Het is al langer bekend dat het meten van pH in pleuravochten met een pH-meter of indicator strips minder nauwkeurig is dan het meten van de pH in pleuravochten m.b.v. een bloedgasanalyser. Echter, wegens vrees voor verstopping weigeren veel ziekenhuislaboratoria de pH in pleuravochten met een bloedgasanalyser te meten.

Methode: pH metingen op een pH-meter en een bloedgasanalyser werden vergeleken. Daarnaast werd de pH van monsters voor en na filtratie vergeleken op een bloedgasanalyser.

Resultaat: Van 26-5-2004 t/m 15-6-2005 (Beatrixziekenhuis, Gorinchem) werd de pH in pleuravochten gemeten met een Hamilton Biotrode. De gemiddelde pH van de 75 monsters bedroeg 8.0 en waarden ver buiten de fysiologisch mogelijke range werden gemeten. Tussen 29-6-2005 t/m 28-12-2006 werd de pH gemeten m.b.v. een NPT-7 bloedgasanalyser. Deze bloedgasanalyser werkt met disposable cartridges. De kliniek levert pleuravocht voor pH

metingen af in een - na afname - direct afgedopte bloedgasspuit. De gemiddelde pH van de 79 pleuravochten in de periode met de bloedgasanalyser bedroeg 7.4, een waarde overeenkomend met de literatuur. Vanwege de vrees voor verstopping van bloedgasanalyzers, die niet met disposable cartridges werken, werd onderzocht of filtratie (Filcons, 70µm) van pleuravochtsamples invloed had op de pH. Twintig pleuravochten werden met en zonder filtratie gemeten op de NPT-7 bloedgasanalyser. Na verwijdering van twee uitbijters, bleek de gemiddelde pH zonder filtratie 7,34 te bedragen en 7,4 met filtratie.

Conclusie: Vanwege de grote verschillen met andere methoden dient de pH in pleuravochten op een bloedgasanalyser gemeten te worden. Filtratie van pleura-monsters heeft weinig invloed op de gemeten pH en alle pleuravochten worden tegenwoordig snel gefilterd en direct aan de bloedgasanalyser (ABL-700) in het Albert Schweitzerziekenhuis in Dordrecht aangeboden.

5. CLSI-validatieprotocol voor de COBAS C111: EP5 en EP9 validatie van een klein formaat chemieanalyser

C. RAMAKERS, A. MELISSEN, C. BAX, R. TRIEPELS, G. van den BERG

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg

Inleiding: De Cobas C111 van Roche Diagnostics is een klein formaat chemieanalyser die voor beperkte diagnostiek op onze locatie in Waalwijk zal worden ingezet. De Cobas C111 zal na een goedgekeurde validatieprocedure ter vervanging dienen voor de Cobas Integra 800 en zal uitsluitend worden ingezet voor de bepalingen ureum, creatinine, natrium, kalium, glucose, totaal bilirubine, ASAT, ALAT, alkalische fosfatase, GGT, LDH en creatine kinase (CK). De Cobas C111 maakt gebruik van dezelfde reagentia als de Cobas Integra 800.

Methode: De COBAS C111 is mbv twee CLSI geaccordeerde protocollen gevalideerd: een EP5 protocol voor de complexe precisie en een EP9 voor de methodevergelijking (vergelijking met de Integra 800). De EP5 validatie van een bepaling zal worden goedgekeurd mits deze minimaal voldoet aan de door de fabrikant gestelde testspecificaties (within-run en total imprecision). De EP9 validatie van een bepaling wordt goedgekeurd wanneer

de gevonden methodeverschillen niet meer dan 10% bedragen. Voor de bepalingen Na en K is deze limiet op 4% gesteld.

Resultaat: EP5 complexe precisieMuv de hoge concentratiepool ureum voldoen alle bepalingen op drie niveaus (Laag – Midden – Hoog) aan de criteria zoals die aan de validatie gesteld zijn. EP9 methode vergelijkingAlle bepalingen voldoen aan de gestelde validatiecriteria. De nieuwe referentiewaarden zoals die voor de Cobas C111 zijn berekend verschillen klinisch gezien niet significant van onze huidige (regionale) referentiewaarden. Aanpassing van de referentiewaarden is niet noodzakelijk.

Conclusie: Uit de validatieprocedure blijkt dat zowel op precisie (EP5) als methodevergelijking (EP9) de COBAS C111 een solide klein formaat chemieanalyser is. Voor de geplande transitie van onze locatie in Waalwijk van een routine-laboratorium naar een cito-laboratorium met een beperkt diagnostisch pakket is de COBAS C111 uitermate geschikt.

6. Isolated hyperamylasemia in a patient treated with hydroxyethyl starch: analytical interference?

H. CHON¹, H.A.M. VOORBIJ¹, R. BRAAMS², H. KEMPERMAN¹

Department of Clinical Chemistry and Haematology¹, UMC Utrecht, Utrecht; Department of Intensive Care Medicine², UMC Utrecht, Utrecht

Introduction: A critically ill 54-year old female recovering from lung transplantation was treated with hydroxyethyl starch (HES) for correction of colloid osmotic pressure. Laboratory results revealed a ≥20 times increase in amylase activity without signs of pancreatitis or parotitis. We investigated whether an aberrant amylase isotype or analytical interference by HES or its metabolites caused this unexplained hyperamylasemia.

Methods: Plasma and urinary amylase and lipase activities were measured on the routine DxC800 analyzer (Beckman Coulter). Serum was analyzed for amylase isoenzymes by gel electrophoresis. Control plasma samples were spiked with HES or maltose to investigate the analytical interference of these agents.

Results: Lipase activity was not increased making pancreatitis unlikely. Electrophoretic investigation of amylase isoenzymes revealed a normal pattern and activity of the different isoenzymes. Thereby, urinary amylase activity was greatly increased,

contradicting macroamylasemia. The addition of HES to control plasma had no effect on the measured amylase activity. In contrast, the addition of maltose caused a dose-dependent linear increase of the amylase activity.

Conclusion: The increased urinary amylase and normal serum isoenzyme pattern ruled out macroamylasemia. However, the activities of the different isoenzymes were not in line with the >20-fold increase of total amylase activity in plasma. Therefore, the possible analytical interference of HES and its metabolite maltose, which is an intermediate in this amylase activity assay, was investigated. Surprisingly, the addition of maltose resulted in a dose-dependent increase in plasma amylase activity, strongly suggesting that analytical interference by the HES metabolite maltose was the major cause of hyperamylasemia. Therefore, the evaluation of isolated hyperamylasemia in patients treated with HES should include knowledge of the amylase assay and its possible interference by maltose.

Hemocytometrie, flowcytometrie, hemostase

7. Detection of shortened activated partial thromboplastin times: an evaluation of different commercial reagents

E. ten BOEKEL, M. BÖCK, G.J. VRIELINK, R. LIEM, H. HENDRIKS, W. de KIEVIET

Department of Clinical laboratory, Sint Lucas Andreas Hospital, Amsterdam

Introduction: Abnormally shortened activated partial thromboplastin times (aPTT) are associated with significantly increased risk of thrombotic disorders and in-hospital mortality. Shortened aPTTs have been related to increased levels of factor (F) VIII and thrombin-antithrombin complex (TAT). In the current study, four different commercial aPTT reagents were evaluated for their performance to detect shortened aPTTs.

Methods: aPTT of 400 patients was determined using Actin-FS (Dade Behring), APTT-SP (Instrumentation Laboratory), Automated-APTT (bioMerieux) and Platelin-LS (bioMerieux) reagents. FVIII, FIX, FXI and TAT levels were measured in shortened and normal aPTT samples.

Results: An association between shortened aPTTs and elevated levels of coagulation factors (FVIII, FIX and FXI) and throm-

bin generation (TAT) was found with all tested aPTT reagents. Method-comparison studies demonstrated good agreement between Instrumentation Laboratory and bioMerieux reagents. However, 53 to 59% of the patients with a shortened aPTT measured with Actin-FS reagent was determined as a normal aPTT with APTT-SP, Automated-APTT and Platelin-LS reagents. These patients had increased levels of FVIII, FIX and FXI and moderately increased levels of TAT.

Conclusion: Overall, an acceptable agreement between the different commercial reagents was found with respect to detection of short aPTTs. However, a disparity between some of reagents existed. Actin-FS reagent appeared to be more sensitive in inducing shortened aPTT reactions than APTT-SP, Automated-APTT and Platelin-LS reagents.

8. Het effect van M-proteïne op de bezinking

M.T.M. RAIJMAKERS, P.H.M. KUIJPER, D.L. BAKKEREN, H.L. VADER

Klinisch Laboratorium, Máxima Medisch Centrum, Veldhoven

Inleiding: Het meetprincipe van de Alifax Test-1 is zodanig verschillend van de klassieke Westergren methode, dat de invloed van een M-proteïne mogelijk anders kan zijn. De doelstelling van dit onderzoek was om het effect van M-proteïnes op deze bezinkingsmethoden te vergelijken.

Methode: Bij patiënten, bekend met een M-proteïne (n=142), werd de bezinking gemeten volgens de Westergren methode en met de Alifax Test-1. De correlatie (Passing-Bablok) en het verschil (Bland-Altman) tussen beide methoden werd onderzocht en vergeleken met die van een algemene ziekenhuispopulatie. In een subgroepenanalyse, op basis van het type M-proteïne werd gekeken naar de kwalitatieve (concordantie) en kwantitatieve (lineaire regressie) effecten van de aanwezigheid van een M-proteïne.

Resultaat: De correlatie tussen beide methoden is slechter bij patiënten met een M-proteïne ($y = 0,67x + 3,3$) in vergelijking met

die van een algemene ziekenhuispopulatie ($y = 0,96x + 0,2$). Dit wordt veroorzaakt door grote verschillen tussen beide methoden in het hoge gebied (>50 mm na 1 uur). Hoewel de concordantie tussen beide methoden goed is (IgA (100%), IgM (89%) en IgG (88%)), is het kwantitatief effect groot. Opvallend is hierbij dat er bij de Westergrenbezinking wel een concentratieafhankelijkheid van M-proteïnes is van met name het type IgM (RC 3,5 (98%CI 2,6 – 4,4) met $r^2 = 0,67$), die niet aanwezig is voor de Alifax Test-1 (RC 0,6 (-0,2 – 1,5) met $r^2 = 0,07$).

Conclusie: De aanwezigheid van een M-proteïne leidt in beide methoden in ongeveer 72% van de patiënten tot een verhoogde bezinking. Echter de absolute waarden gemeten met de Alifax Test-1 liggen lager dan die gemeten volgens het principe van Westergren. De sterk verhoogde bezinking, die als typisch werd beschouwd bij Kahler-patiënten, zal daardoor minder vaak gezien worden.

9. Acute impairment of red blood cell haemoglobinisation in subjects with community-acquired pneumonia

M. SCHOORL, P.C.M. BARTELS

Department of Clinical Chemistry, Haematology & Immunology, Medical Center Alkmaar

Introduction: In case of anaemia of inflammation cytokines and cells of the reticuloendothelial system induce changes in iron homeostasis and impaired proliferation of erythroid progenitor cells. To decrease activity of inflammation, iron regulatory proteins reduce intracellular iron availability. Reticulocyte haemoglobin content (RET-He) ought to be a parameter for monitoring short term deteriorations in iron supply for haemoglobinisation. Hepcidin, a liver-derived peptide regulator of iron homeostasis, is assumed to be a key mediator concerning hypoferremia in inflammation. To stimulate hepcidin production, IL-6 acts directly on hepatocytes. Hepcidin acts as a negative regulator of intestinal iron absorption and macrophage iron release. Hepcidin prohormone is a 60-amino acid peptide which has been cleaved from the hepcidin precursor peptide.

Methods: In 75 patients with community-acquired pneumonia RET-He and hepcidin prohormone are monitored during two weeks after starting antibiotics treatment. To evaluate activity of inflammation, C-reactive protein is(CRP) established.

Results: RET-He results (presented as mean \pm SEM) demonstrate an immediate decline from 1810 ± 26 aMol at day 1 to 1744 ± 16 aMol at day 2-3. From day 4 an ongoing increase in RET-He is observed (1803 ± 27 aMol) amounting to levels within the reference range at day 13 (1997 ± 22 aMol). Hepcidin prohormone results are within the reference range (60-160 μ g/L). Hepcidin prohormone slightly increase from day 1 (105 ± 4 μ g/L) until day 4 (119 ± 3 μ g/L) after which results return to initial values. CRP decreases at day 1, 2-3 and 13 from 243 ± 14 mg/L to 153 ± 8 mg/L and 16 ± 4 mg/L.

Conclusion: Decrease of RET-He after onset of pneumonia reflects acute reduction of haemoglobinisation due to iron depletion. Concerning clinical interpretation evaluation of longitudinal hepcidin prohormone concentrations does not yield any additional value.

Literature: Andrews NC. J Clin Invest 2004; 113: 1251-3

10. Een robuuste methode voor de analyse van de prognostische marker ZAP-70 bij chronische lymfatische leukemie

H.J. ADRIAANSEN¹, M.W.M. van den BEEMD², D. TIELEMANS³, D.F.T. PICCINOTTI¹, J.A. REMIJN¹, A.W. LANGERAK³

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹, Gelre Ziekenhuizen, Apeldoorn en Zutphen, Afdeling Immunologie, BD Biosciences Immunocytometry Systems^{2,3}, Woerden, Erasmus MC, Rotterdam

Inleiding: ZAP-70 positiviteit is prognostisch ongunstig bij patiënten met chronisch lymfatische leukemie (CLL). Een CLL is positief indien minimaal 10% of 20% van de leukemiecellen ZAP-70+ is. De expressie is zwak en het plaatsen van de marker tussen negatief en positief is lastig. De referentiepopulatie betreft T-cellen (ZAP-70 positief) of normale B-cellen (ZAP-70 negatief). Wij maken gebruik van de gemiddelde fluorescentie-intensiteit (MFI) van CLL-cellen. Deze MFI wordt gerelateerd aan de MFI van T-cellen.

Methode: Permeabilisatie: BD lysing solution. Labeling met vijf monoklonale antistoffen (BD): CD3FITC + CD5FITC / ZAP-70PE / CD45 PerCP / CD19APC. Meting FACS-Calibur (BD). Gating: CD3+/CD5+ T-cellen en (CD5+),CD19+ B-cellen. Binnen beide populaties wordt de MFI voor ZAP-70 bepaald. Ratio MFI T-cellen / MFI B-cellen wordt berekend. In twee laboratoria werden in totaal 75 CLL monsters en 45

controles gemeten. De IgHV-mutatiestatus werd bepaald bij 51 van de geteste CLL-patiënten.

Resultaat: Bij 45 gezonde controles bleek de ratio MFI T-cellen / MFI B-cellen gemiddeld 2,47 (standaardafwijking 0,243). Hierop werd voor ons platform de afkapgrens vastgesteld op een ratio van 1,99. Alle controles zijn daarmee ZAP-70 negatief. Een CLL is ZAP-70 positief indien de ratio $<1,99$. 37 van de 75 CLL (=49%) waren ZAP-70 positief en 38 van de 75 CLL (=51%) waren ZAP-70 negatief. Van de 51 leukemieën waarbij de IgHV-mutatiestatus werd bepaald, correleerde in 73% (37/51) de ZAP-70 expressie met de IgHV-mutatiestatus (i.e. IgHV-ongemuteerd met ZAP-70 positief en IgHV-gemuteerd met ZAP-70 negatief).

Conclusie: ZAP-70 is goed te labelen en te meten met behulp van flowcytometrie. De ratio MFI T-cellen / MFI B-cellen is een eenvoudige en robuuste methode om te bepalen of de CLL-cellen ZAP-70 positief zijn.

11. Vaststelling referentiewaarden totaal leukocyten en absolute leukocytendifferentiatie voor kinderen en volwassenen

K.C.A.M. NABBE, J. RUINEMANS-KOERTS, F.L.A. WILLEKENS

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Alysis Zorggroep, Ziekenhuis Rijnstate, Arnhem

Inleiding: In de Klinisch Chemische Regio Kring Gelre bestaat de behoefte om de referentiewaarden voor de leukocytendifferentiatie vooral voor de peuter- en kinderleeftijd af te stemmen.

Methode: Over een periode van 5 jaar zijn alle patiëntmonsters waarvan een leukocytendifferentiatie (XE2100) en CRP/ BSE door de huisarts zijn aangevraagd verzameld. Alleen leukocytendifferentiagegevens van monsters met een normale CRP en BSE, een som van 100% voor de procentuele differentiatie (neutro, lymfo, baso, eo, mono) en zonder flags, werden meegenomen in de analyse. Uit deze dataset werd voor de absolute differentiatie een 95% interval voor diverse leeftijdscategorieën vastgesteld. Referentiewaarden zijn samengesteld door vergelijking van deze resultaten met gepubliceerde referentiewaarden voor de totale leukocyten en absolute leukocytendifferentiatie.

Resultaat: Gepubliceerde referentiewaarden (1-3) (diverse

hematologieautomaten) voor diverse leeftijdscategorieën zijn met name voor de totale leukocyten, absolute neutrofielen en lymfocyten op het 97,5 percentiel lager dan de oude gegevens (microscopische differentiatie). In één publicatie blijken de leukocyten licht te dalen in de kinderleeftijd om vervolgens weer te stijgen, hetgeen ook uit onze eigen patiëntendata bleek. Ook voor de neutrofielen bleek deze trend waarneembaar. In onze populatie dalen op oudere leeftijd de leukocyten en neutrofielen weer. De 97,5% percentiel voor de leukocyten voor volwassenen is voor onze huisartsenpopulatie hoger dan de meeste gepubliceerde data voor een “gezonde” populatie.

Conclusie: Bovengrens van referentiewaarden voor mn. leukocyten en neutrofielen is afhankelijk van de gekozen referentiepopulatie. Gegevens van onze huisartsenpopulatie komen in het algemeen goed overeen met literatuurgegevens voor de totale leukocyten en leukocytendifferentiatie.

12. Trombocytentellingen vergeleken: kwantitatieve en kwalitatieve vergelijking

J.A. BAKKER, H. van der DUSSEN, Y.M.C. HENSKENS

Hematologisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Maastricht

Inleiding: Verschillende meetmethodes worden gebruikt voor de telling van trombocyten in EDTA volbloed, waarbij voor iedere methode voor- en nadelen zijn beschreven. Met name wanneer het aantal trombocyten $<20 \times 10^9/L$ is, is een juiste telling van belang in verband met de medische handelingen die hiermee verbonden zijn.

Methode: Gedurende 10 dagen werden monsters welke in de routine patiëntenzorg werden aangeboden voor celtelling en differentiatie van het bloedbeeld, geanalyseerd op 4 hemocytometers: Beckman Coulter LH750, Siemens Advia 2120, Abbott Cell-Dyn Sapphire, Sysmex XE-5000. De kwantitatieve uitslagen van de trombocytentellingen werden met elkaar vergeleken. Daarnaast werden ook de monsters waarbij door een van de apparaten een melding werd gegenereerd van afwijkende trombocyten microscopisch bekeken op afwijkende trombocyten
Resultaat: 3000 monsters werden geanalyseerd en de uitkomsten van de verschillende apparaten werden met elkaar verge-

leken: de verschillende meetmethodes bleken vergelijkbaar. In het gebied van trombocyten $<20 \times 10^9/L$ werd met alle meetmethodes met dezelfde nauwkeurigheid gemeten. Als gouden standaard werd hierbij gebruik gemaakt van een trombocyten meting met CD61 (Abbott CellDyn Sapphire). Bij statische verwerking volgens Passing en Bablok lag de correlatie met de CD61 methode tussen de 0,86 en 0,95 voor de verschillende analysers. Het aantal meldingen bij de tellingen $<20 \times 10^9/L$ bedroeg slechts 5, echter over het gehele gebied bedroeg het aantal meldingen 70. Meldingen van afwijkende trombocyten waren niet eenduidig bij de verschillende analysers.

Conclusie: In het kwantitatief meten van trombocyten is er geen tot weinig verschil tussen de geteste analysers. In de rapportage van kwalitatieve verschillen, dwz. reuzentrombocyten en trombocytenaggregaten, blijkt dat de regels voor de detectie hiervan per apparaat verschillen.

13. Length of sedimentation reaction in blood: a comparison of the Ves-matic Cube 200 with the autocompact Starrsed and Sedimatic 100 systems

K.M.T. de BRUYN, J. de NOOIJER-de JONG, N.M. KUIJPERS, W. van ERK

Department of Clinical Chemistry, Medical Centre Rijnmond-Zuid, Rotterdam

Introduction: The length of sedimentation reaction in blood (LSRB) is frequently determined to assess the presence or intensity of an inflammatory process or disease. Recently, the Ves-matic Cube 200 was introduced. This analyser is able to determine the LSRB directly by using tubes containing EDTA anti-coagulated blood samples. The aim of this study was to characterize this method by comparing it to the Autocompact Starrsed and Sedimatic 100 analyzers, both of which use a Westergren-based measurement principle. Additionally, correlation between fibrinogen and the LSRB values from these methods was investigated.

Methods: Paired samples were selected and used for comparison between Autocompact Starrsed, Sedimatic 100 and Ves-matic 200 methods ($n=280$; 160 samples originating from patients with rheumatoid diseases). Fibrinogen was measured in citrate samples using a turbidimetric method.

Results: Relation Autocompact Starrsed (y) with Sedimatic-100 (x): $y = 0.78x + 2.6$; $r = 0.94$. Relation Ves-matic Cube 200 with Sedimatic-100: $y = 0.79x - 0.51$; $r = 0.87$. Relation Ves-matic Cube 200 with Autocompact Starrsed: $y = 0.95x - 1.84$. The Ves-matic Cube 200 generated for 11 patients falsely low LSRB values, as compared to the other two methods and the clinical information. The Sedimatic-100 LSRB showed best correlation with the fibrinogen content: $y = 0.023x + 3.11$; $r = 0.61$. For the Autocompact Starrsed this relation was: $y = 0.027x + 3.09$; $r = 0.55$, for the Ves-matic Cube 200: $y = 0.016x + 3.51$; $r = 0.40$.

Conclusion: The Autocompact Starrsed showed better analytical and clinical agreement with the Sedimatic-100 than the Ves-matic-Cube 200. The Ves-matic Cube 200 generated 4% falsely low LSRB values. This finding seems to indicate that further analytical finetuning of the Ves-matic Cube 200 might be required.

14. Spurious platelet count caused by apoptosis

W. van der MEER¹, A. van HEIJST², F. WAGENER³, C. SCHOLTUS⁴, R. BAUMGARTEN⁴, E.C. van DONGEN-LASES¹

Department of Clinical Chemistry¹, Department of Pediatrics², Department of Pharmacotoxicology³, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, Department of Clinical Chemistry⁴, Hospital Gelderse Vallei, Ede

Introduction: Automated hematology analyzers are able to measure platelet counts with great accuracy and precision. In certain cases, however, platelet clumps, platelet satellitism, giant platelets or fragments of erythrocytes or leukocytes may cause an erroneous platelet count. Here we present the first human case of spurious platelet counts caused by apoptosis.

Methods: The patient is a male newborn, born at a gestational age of 41 weeks with suspicion of sepsis and deteriorating clinical conditions on day 3. Because of respiratory insufficiency on day 6, he was admitted to a level 3 neonatal ICU where he developed multi-organ failure and generalized convulsions and died despite intensive support. Clinical chemistry data demonstrated increased ASAT, ALAT, ammonia and lactate levels. In addition, both the patient and his mother were positive for herpes simplex virus type-1. Hematology parameters were performed on a Sysmex XE-2100. Microscopical examination of

blood smears was carried out after staining according to the May-Grünwald Giemsa method and 500 particles were counted. Caspase 3/7 was determined by a fluorometric assay.

Results: Microscopical analysis of blood smears showed that about 80% of the particles counted as platelets by the hematology analyzer were pseudoplatelets. The automated platelet count of $64 \times 10^9/L$ should be corrected to a true platelet count of $13 \times 10^9/L$, corresponding to a severe bleeding risk. Morphological analysis suggested the presence of apoptotic bodies. Indeed, the serum of the patient had a greatly enhanced activity of caspase 3/7 corroborating the presence of apoptotic cells.

Conclusion: This study presents the first human case of spurious platelet counts because of apoptosis, but also emphasizes the importance of verifying the results of an automated hematology analyzer with analysis of blood smears in some specific cases.

15. Morfologische beoordeling van cellen in liquormonsters met behulp van digitale microscopie

W. VAN GELDER, R.B. DINKELAAR

Albert Schweitzer Ziekenhuis, Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium Dordrecht & RIVAS zorggroep Gorinchem

Inleiding: Morfologische analyse van cellen in liquor behoort tot het 24-uurs dienstpakket van de meeste laboratoria. Het morfologisch spectrum van cellen in liquor is beperkt, maar analyse van dit materiaal wordt bemoeilijkt door: (i) beperkte beschikbaarheid van materiaal, (ii) snelle afbraak van cellen in liquor en (iii) veranderde celmorphologie door gebruik van centrifugatietechniek (cytospins). In samenwerking met het zweedse bedrijf Cellavision is een softwareprogramma ontwikkeld voor het digitale microscopsysteem DM96, waarmee liquormonsters automatisch kunnen worden geanalyseerd.

Methode: De DM96 is een digitaal microscopsysteem bestaande uit een computergestuurde microscoop, digitale camera en beeldherkenningssoftware om cellen in liquormonsters automatisch te kunnen klassificeren. Het systeem werd getest met cytospinpreparaten van 57 liquormonsters conform het NCCLS protocol H20A. Elk monster werd tweemaal - onafhankelijk van elkaar - handmatig geanalyseerd door 2 mensen uit een team van 8 gespecialiseerde morfologisch analisten, waarbij per analyse 200 cellen werden geclasseerd. Elk monster werd

ook tweemaal geanalyseerd op de DM96 waarbij 200 cellen per analyse werden geclasseerd (preclassificatie). Postclassificatie correctie werd verricht door dezelfde analisten.

Resultaat: In totaal werden 26681 leukocyten in 57 liquormonsters geanalyseerd. Het systeem scoorde 91% van de cellen direct goed. Lineaire regressie analyse van manuele en DM96 tellingen van liquormonsters resulteerde voor de preclassificatie in regressie coëfficiënten $y > 0,84x$ ($r^2 > 0,82$) voor de categorieën neutrofielen, lymfocyten en macrofagen en voor postclassificatie $y > 0,98x$ en $r^2 > 0,92$. De categorieën eosinofielen en "other cells" scoren lager.

Conclusie: De DM96 is in staat gangbare celcategorieën (neutrofielen, lymfocyten, macrofagen) in liquormonsters adequaat te analyseren, kwalitatief vergelijkbaar met de resultaten van ervaren analisten. De liquormodule biedt een oplossing voor snelle en adequate afhandeling van morfologische liquordiagnostiek.

Literatuur: H. Ceelie et al, J. Clin Pathol 2007: 60; 72-79

Immunoassay, (bloedgroepen)serologie

16. Evaluatie van de analytische prestaties van de Cobas 6000 analyzer met nadruk op juistheidverificatie

A. J. van GAMMEREN, N. van GOOL, M. J. M. de GROOT, C. M. COBBAERT
Klinische Chemie en Hematologie, Amphia Ziekenhuis Breda

Inleiding: Consolidatie van routine-analyzers is een voortschrijdende ontwikkeling in de klinische chemie. Omdat kwaliteit in ons laboratorium voorop staat, werden de analytische prestaties van Cobas 6000 (Roche Diagnostics), een kandidaat voor de vervanging van de huidige Hitachi 917 chemieanalyzers én voor de consolidatie van immunochemie, voor 31 chemieparameters en 18 immunoassays geëvalueerd. Naast precisie en methodevergelijkingen werd ook juistheid onderzocht. Tevens werd de IVD/98/79 EC conformiteit beoordeeld op grond van traceerbaarheid van meetresultaten naar erkende internationale referentiesystemen (www.bipm.org).

Methode: Evaluatie van precisie, juistheid, lineariteit en correlatie met huidige methodieken werd uitgevoerd volgens CLSI protocollen EP5, EP9 en EP10. Precisie werd getoetst t.o.v. de door de fabrikant geclaimde precisie en t.o.v. medisch vereiste precisie gebaseerd op biologische variatie. Voor chemieparameters werden recovery en lineariteit geverifieerd m.b.v. commuteerbare SKML referentiematerialen. Voor immunochemieparameters werden de resultaten vergeleken met de methodegroepen uit de SKML rondzendingen.

Resultaat: Alle chemie- en immunochemieparameters voldeden aan de precisie criteria, m.u.v. Na⁺ en foliumzuur (CVs: 0,6-4,4% voor chemieparameters en 0,8-5,8% voor immunochemieparameters). Correlaties met bestaande methoden waren >0,975, behalve bij Mg²⁺ en 6/18 immunochemieparameters. De 24 chemie bepalingen voldeden aan bias criteria of konden door minimale aanpassing van de kalibratie aan de criteria voldoen.

Conclusie: Gezien de excellente precisie en de vergelijkbare resultaten voor de meeste parameters wordt geconcludeerd dat Cobas 6000 een geschikt werkstation is voor consolidatie chemie-immunochemie. Voor de chemieparameters zijn de Cobas resultaten uitwisselbaar met Hitachi resultaten; tevens is traceerbaarheid naar "een standaard van hogere orde" geborgd. Significante methodeverschillen bij 33% van de immunochemieparameters illustreren de noodzaak tot ontwikkeling van internationale referentiesystemen t.b.v. harmonisatie van meetresultaten. De ontwikkeling van deze laatste zal standaardisatie van immunoassays én kwaliteit van patiëntenzorg verbeteren.

17. Evaluation of special blood collection tubes for homocysteine measurement on AxSYM, Immulite and LC-MS/MS systems

A.O. de GRAAF¹, R. de JONGE², M.H. VELMANS¹, M.J.W. JANSSEN¹

Laboratory of Clinical Chemistry and Hematology¹, VieCuri Medical Center, Venlo; Department of Clinical Chemistry², Erasmus MC, Rotterdam

Introduction: To prevent in vitro increase in total homocysteine concentration, samples are placed on ice followed by centrifugation immediately after collection. However, this procedure is impractical in routine blood collection and unsuitable for studies and out-of-hospital facilities. There are several commercially available blood collection tubes that are claimed to stabilise homocysteine concentrations at room temperature for longer periods of time.

Methods: We evaluated homocysteine stability in blood samples collected in acidic citrate (Sarstedt), homocysteine Z-gel (Sarstedt) and EDTA-sodiumfluoride (Becton-Dickinson) tubes

stored at room temperature for 0, 8 and 24h. We also investigated the bias in these tubes by comparing homocysteine levels in patient samples collected in standard tubes (serum or EDTA) with those in special tubes. Homocysteine was determined on AxSYM, Immulite and LC-MS/MS.

Results: The three special tubes show less in vitro increase in homocysteine concentration than in standard tubes. Samples in homocysteine Z-gel and acidic citrate tubes can be stored at room temperature for more than 8h without significant increase (< 12%) in homocysteine concentration. Comparison of patient samples shows slopes < 1.0 for all special tubes versus

standard tubes on all three methods. Correlation factors range from R=0.94 on Immulite to R=0.99 on LC-MS/MS, with similar correlation factors for the different tubes on each system. **Conclusion:** We conclude that acidic citrate and homocysteine Z-gel tubes can be used in routine laboratory testing of homocysteine without special pre-analytical measures, like

storage on ice and rapid centrifugation. Homocysteine levels from special tubes show high correlation with standard tubes on different systems. Method-specific correction factors should be introduced to compensate for lower homocysteine results in special tubes.

18. Correlation of the Diasorin 25-OH Vitamine D Total assay and Cobas 6000 Vitamine D3 (25-OH) assay with a HPLC-UV reference method

F.A.L. van der HORST¹, P.M.M. van HAARD¹, Y. van LEUSDEN¹, J. van de VEN², J.P.M. WIELDERS³

Department of Clinical Chemistry¹, Reinier de Graaf Group, Delft, Department of Clinical Chemistry², Medical Centre Haaglanden, The Hague, Department of Clinical Chemistry³, Meander Medical Centre, Amersfoort

Introduction: Based on the prevalence of hypovitaminose D, it can be reasoned to determine 25(OH) vitamin D, 25-OHVD, in risk groups [1]. Here we present the correlation of two recently released highly automated 25-OHVD assays, the Diasorin 25-OH Vitamine D Total assay and Cobas 6000 Vitamine D3 (25-OH) kit with a HPLC-UV reference method [2].

Methods: Serum samples (n=100) were analysed for 25-OHVD with a HPLC-UV technique. The good performance of the HPLC-UV was confirmed by means of the UK-DEQAS LC-MS results. After storage at -20 °C, samples were reassayed with Roche and Diasorin assays. The between-lot reproducibility was determined using routine quality control samples.

Results: The following correlations were established by using Passing & Bablok and expressed as mean and 95 % confidentiality interval (CI).

The inter-assay reproducibility of the assays were (expressed as

CV % (at level)) as follows for Diasorin: 23.0 % (10.5 nmol/l), 7.6 % (49.8 nmol/l) and 6.1 % (96 nmol/l), for Roche: 15% (54.5 nmol/l), 8 % (87.1 nmol/l) and 8 % (148.5), respectively.

Conclusion: Both immunoassays perform well in routine settings and had acceptable correlation with the HPLC-UV reference method.

	Slope(CI)	Intercept [nmol/l](CI)
Diasorin - HPLC-UV	0.81 (0.72-0.89)	-0.88 (-4.25-2.25)
Roche - HPLC-UV	0.93 (0.83-1.06)	1.37 (-1.35-7.00)
Roche - DiaSorin	1.11 (0.99-1.30)	4.65 (-2.60-9.58)

Literature:

- Wielders et al. Ned Tijdschr Geneesk 2006; 150(9): 49-52;
- Zerwekh. Ann Clin Biochem 2004; 41: 272

19. Vitamine-B12-bepaling: routine-specialiteit?!

M.A. FOURAUX^{1,2}, F.M. VERHEIJEN^{1,2}, M. KLUIS³, J.M.T. KLEIN GUNNEWIEK⁴

GKCL¹, Albert Schweitzer ziekenhuis & Beatrix ziekenhuis, Dordrecht²; KCL³, Ikazia ziekenhuis, Rotterdam, Afdeling Klinische Chemie⁴, UMC Radboud, Nijmegen

Inleiding: Vitamine B12 (VB12) wordt routinematig binnen klinisch chemische laboratoria gemeten. Hiervoor wordt binnen de laboratoria van de auteurs gebruik gemaakt van een competitieve immunoassay van de firma Siemens Medical Solutions Diagnostics op het Immulite 2000/2500 platform. Vanuit de klinieken werd er getwijfeld aan de juistheid van deze bepaling, met name in het gebied lager dan 150 pmol/l. Er werd naar mening van de clinici frequent een VB12-deficiëntie gerapporteerd, niet in overeenstemming met het klinisch beeld.

Methode: De VB12-bepaling is geëvalueerd aan de hand van resultaten van interne en externe kwaliteitscontroles, analytische prestaties (EP10 evaluatie en duplometingen) en correlatiestudies. Bij de correlatiestudie is gekeken naar de correlatie tussen de VB12 op de Immulite 2000 en de Immulite 2500 met behulp van patiëntmonsters. Ook is retrospectief gekeken naar patiëntmaandgemiddelen.

Resultaat: De kwaliteitscontroles lieten geen duidelijke afwij-

kingen van de VB12-bepaling zien. Zowel de EP10 evaluatie als de duplometingen van patiëntenmonsters daarentegen lieten grote variatie zien in het gebied lager dan 150 pmol/l. De correlatiestudie liet zien dat de Immulite 2500 circa 30 pmol/l lagere VB12-uitslagen genereert dan de Immulite 2000. Dit in tegenspraak met resultaten van de fabrikant. De maandgemiddelden bleken rond de 350 pmol/l (~1450 patiënten/maand) te liggen, maar waren in de periode van de twijfel gedaald naar ~310 pmol/l. Dit resulteerde in een stijging van het relatieve aantal VB12's kleiner dan 112 pmol/l van 1-2% naar 5-6%.

Conclusie: Deze beschrijving maakt duidelijk dat het monitoren van patiëntgemiddelden naast het bepalen van kwaliteitscontroles essentieel is om afwijkingen van een test te signaleren. De discrepantie tussen de sterk afwijkende maandgemiddelden en de niet-afwijkende kwaliteitscontroles ligt mogelijk in het feit dat de kwaliteitscontroles vaak VB12 bevatten zonder bindende eiwitten.

20. New insights in exercise-induced cardiac troponin T and I release using highly sensitive immunoassays

A.M.A. MINGELS¹, L.H.J. JACOBS¹, E.C.H.J. MICHELSEN², J.C.J.M. SWAANENBURG², W.K.W.H. WODZIG¹, M.P. van DIEIJEN-VISSE¹

Department of Clinical Chemistry VieCuri Medical Centre², Department of Clinical Chemistry and Haematology, University Hospital Maastricht¹, Venlo

Introduction: Exercise-induced release of cardiac biomarkers is common, but clinical implications are still unexplained. Here, we evaluated troponin elevation after marathon running using recently developed highly sensitive troponin T (TnT) and I (TnI) immunoassays.

Methods: Serum samples and runner characteristics were collected from 85 marathon runners before-race, <1 h post-race and for 23 runners the day after. TnI was measured on the Immulite-2000 (Siemens) and on the Architect-i2000SR (Abbott). TnT was determined using the 4th generation TnT and the pre-

commercial hsTnT assay (Roche). We established the precision profile and 99th percentile for hsTnT and the Architect-TnI. The diagnostic cut-off for AMI was set for the Immulite-TnI at 0.7 µg/L (10% CV), for the Architect-TnI at 32 ng/L (10% CV), for hsTnT at 18 ng/L (99th percentile), and for TnT at 0.03 µg/L (10% CV). In addition, NT-proBNP, CK, albumin, creatinine and cystatin-C were determined.

Results: According to the hsTnT assay, pre-race troponin concentrations were all in the reference range (3.8-5.0 ng/L). After the marathon 85% of the runners showed elevated troponin which remained elevated in 17% of the samples after one day.

The Architect-TnI found pre-race levels elevated in 2.4% of the runners, after the race in 47% and the day after in 17%. When using the Immulite-TnI and the TnT assay, post-race concentrations were above the cut-off for only for 20% and 1.2% of the runners and troponin was not detectable in samples before the race and the day after.

Conclusion: For the most sensitive troponin assay, hsTnT from Roche, 85 % of the runners showed elevations above the cut-off for AMI, estimated according to the recent guidelines. Clinical implications of these elevations need further investigation.

21. Analytical evaluation of Vidas B.R.A.H.M.S Procalcitonin versus Kryptor B.R.A.H.M.S Procalcitonin sensitive assay

M. SCHOORL, M. KOPPES, P.C.M. BARTELS

Department of Clinical Chemistry, Haematology & Immunology, Medical Center Alkmaar

Introduction: Procalcitonin (PCT) is secreted by several cell types and organs as a response to bacterial infections. PCT increases within 3 hours after bacterial infection, reaching maximum values after 6-12 hours. With a short in-vivo half-time of PCT amounting to 24 hours PCT appears to be one of the best biological markers in screening and monitoring bacterial infections.

Methods: In this study the performance of Vidas B.R.A.H.M.S PCT assay is compared with Kryptor B.R.A.H.M.S PCT Sensitive assay. The Vidas assay (ELFA method) is an automated test on the Vidas immunoanalyzer enabling quantitative measurement of PCT in the range from 0.05 µg/L up to 200µg/L. The Kryptor assay is a homogeneous immunoassay (sandwich principle) using TRACE technology enabling quantitative measurement of PCT in the range from 0.02-1000 µg/L. The study is performed in 492 serum samples of 94 subjects with common

acquired pneumonia. Severity of illness was determined with Curb-65 scores, ranging from 0 till 4.

Results: Linear regression analysis show Vidas Procalcitonin = 1.40 Kryptor Procalcitonin Sensitive – 0,03 with a correlation coefficient r=0.979. In addition, the discriminative ability of both methods was assessed at four relevant threshold levels with respect to clinical interpretation and sepsis. Antibiotics therapy is prescribed using a combination of the clinical score and procalcitonin result >0.25 µg/L. Procalcitonin <0.25 µg/L with Curb65 scores > 2 are established in 15.4% and 16.0% of the subjects using the Vidas or Kryptor method, respectively.

Conclusion: If cut-off values of 0.25 and 2.0 µg/L are used, Vidas procalcitonin detect 6% more in the risk range for starting antibiotic treatment and 15% more in the risk range for sepsis compared with Kryptor Procalcitonin Sensitive.

22. Evaluatie van de Galileo Echo in een kinderziekenhuis

H. RUSSCHER, Y.B. de RIJKE

Afdeling Klinische Chemie, Erasmus MC-Sophia Kinderziekenhuis, Rotterdam

Inleiding: In ons transfusielaboratorium worden immunohematologische testen uitgevoerd op pediatrische en obstetrische monsters, waarvoor we de prestaties van de Galileo Echo, de nieuwste volautomatische tafelmodel analyzer van Immucor Gamma, hebben beoordeeld.

Methode: De uitkomsten van screening/detectie irregulaire antistoffen (negatief:positief=100:100) zijn vergeleken met die verkregen met de Autovue (Ortho-Clinical Diagnostics). Hiernaast zijn uitkomsten van overige routinematische testen vergeleken met de kolomtechniek van DiaMed-ID. Tevens is de automatische interpretatie van resultaten, hoeveelheid EDTA-bloed nodig voor de testen en de efficiëntie van het apparaat geëvalueerd.

Resultaat: Resultaten verkregen met 50 pediatrische monsters (50 ABO-Rh(D), 20 Rhesus/Kell-fenotypering), 50 obstetrische monsters (50 ABO-Rh(D), 20 Rhesus/Kell-fenotypering, 50 kruisproeven, 20 DAT) en 50 erytrocytentconcentraten (ABO controle) vertoonden geen discrepanties met DiaMed-ID. De sensitiviteit voor klinisch belangrijke antistoffen was vergelijkbaar met die van de Autovue (respectievelijk 92,5% en 93,4%),

terwijl dit voor de overige antistoffen respectievelijk 80% en 100% bedroeg. Opvallend bij de Echo is de reactiesterke welke bij aanwezigheid van irregulaire antistoffen meestal maximaal is zonder nuance voor homozygote/heterozygote antigenexpressie en antistoftiter. Bij chimerismen wordt niet gewaarschuwd voor dubbele celpopulaties. Sterke IgM-antistoffen storen de testen. De Echo kan testen direct uitvoeren uit EDTA-microtainers gebruikt in een kinderziekenhuis. De minimale hoeveelheid EDTA-bloed voor een neonatale bloedgroep en Rhesus/Kell-fenotypering is 100 µl; voor een screening is minimaal 500 µl (Ht < 0,45 l/l) nodig. De Echo heeft continue toegang, goede mogelijkheden tot cito-uitvoering en gebruikersvriendelijke software.

Conclusie: De Galileo Echo is gebruikersvriendelijk met een hoge sensitiviteit in de detectie van klinisch relevante antistoffen. Alle immunohematologische testen worden betrouwbaar uitgevoerd. Het wordt wel als een gemis ervaren dat dubbelpopulaties van erytrocyten moeilijk te visualiseren zijn. Hiernaast worden warme irregulaire antistoffen die ook vaak als IgM-type voorkomen niet altijd gedetecteerd.

23. Evaluatie van de immunohematologische analyser Echo Galileo (ImmucorGamma)

F.A. LINDEBOOM, J. van OSANEN, G. van HARMELEN, M.H. BEUNIS
Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium, Sint Franciscus Gasthuis, Rotterdam

Inleiding: Geautomatiseerde systemen voor het opsporen van antistoffen en het bepalen van bloedgroepen kunnen een bijdrage leveren aan het voorkomen van transfusiereacties en daar door de veiligheid van de patiënt verbeteren. De Echo Galileo is gebaseerd op de microtiterplaattechniek. Dit onderzoek had twee onderzoeks vragen: 1. Hoe is de kwaliteit van de Echo-Galileo in vergelijking met de kaartjes methode van Diamed? 2. Hoe voldoet de Echo-Galileo in de praktijk?

Methode: Gedurende één maand werden alle aanvragen simultaan uitgevoerd op de Echo Galileo en met de buisjes methode dan wel kaartjesmethode van Diamed. 473 bloedgroepen en antistof screens, 55 CcEeK typeringen, 151 bloedgroepcontroles van bloedeenheden, 18 kruisproeven, 65 Directe Antiglobuline Tests en 42 sera bekend met antistoffen in Diamed werden bepaald in de Echo Galileo. Bij discrepanties werd ook de PEG-methode toegepast.

Resultaat: Bij de antistofscreen en de antistofidentificatie waren

er enkele verschillen. Tweemaal was de Echo positief terwijl de Diamed kaartjes negatief bleven (anti-M antistof). Daarentegen miste de Echo tweemaal een anti-Kell antistof, eenmaal een zwakke anti-S antistof, een anti-D profylaxe en twee aspecifieke reacties. Bij de bloedgroepen en de CcEeK-typeringen waren geen discrepanties. In twee DAT's was de Echo positief waar de Diamed methode een negatieve uitslag gaf. Nadeel is dat de Echo alleen IgG antistoffen kan aantonen en dus geen C3d, IgA of IgM. Bij de kruisproeven miste de Echo driemaal een anti-M antistof. Daarentegen werd wel een anti-Fy(a) gedetecteerd die in de Diamed kaartjes onopgemerkt bleef.

Conclusie: Wij zijn positief over de kwaliteit van de Echo wat betreft de basisbepalingen (bloedgroepen en antistof screens). In de praktijk is er het gemis van enkele specifieke mogelijkheden. Het voorkomen van software problemen moet worden verholpen.

Chromatografie: HPLC, GC, CE

24. A fast liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of total homocysteine and methylmalonic acid

C. HEMPEN¹, H. WANSCHERS², G. van der SLUIJS VEER¹

Laboratory¹, Medisch Spectrum Twente Hospital, Enschede, Laboratory², Hospital Group Twente, Almelo

Introduction: Homocysteine (HCy) is generally analyzed as a predictor of cardio vascular disease. Methylmalonic acid (MMA) is an indicator of methylmalonaciduria. HCy and MMA are both indicators of Vitamin B12 deficiency. The simultaneous measurement of MMA and HCy would therefore be efficient. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry seems a good technique to achieve this consolidation.

Methods: The reducteur tris-(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride (TCEP) is added to plasma. Deproteinization of plasma is performed by ultracentrifugation. 10 µL of the filtrate are injected. The LC separation of (underivatized) analytes was carried out on a reversed-phase C18 column (Varian, ChromSpher) by isocratic elution using a mobile phase consisting of methanol (5%) and 2.33 mL/L formic acid in water (95%). All MS investigations were carried out with a turbo ion spray source, which was operated in both positive and negative ion modes

under multiple reaction monitoring (MRM) conditions. The 4 minute runs are therefore divided into three periods. Apart from MMA and HCy, methionine (check on a possible oral load), homocystine (check on the reduction step) and succinic acid (check on obligatory LC separation) are monitored.

Results: The method shows low detection limits, good reproducibilities and good correlations with standard techniques for HCy respectively MMA. Succinic acid, an isomer of MMA with identical fragmentation, is well separated from this analyte by LC.

Conclusion: Due to a rapid and simple sample clean-up, short run times and because of the applied feature of dividing the LC/MS run into several periods based on the preferred ionization conditions, the new method enables a fast, sensitive and selective determination of the analytes. It can routinely be applied in a clinical chemistry lab.

25. The silent haemoglobin- α -chain variant Hb Riccarton [α 51(CE9)Gly->Ser] may affect HbA1c determination on the HLC-723 G7 analyzer

J.M.W. van den OUWELAND¹, H. van DAAL¹, C.H. KLAASSEN¹, Y. van AARSSEN¹, C.L. HARTEVELD², P.C. GIORDANO²

Department of Clinical Chemistry¹, Canisius-Wilhelmina Hospital, Nijmegen, Hemoglobinopathies Laboratory, Department of Human and Clinical Genetics², Leiden University Medical Center Leiden

Introduction: Structural haemoglobin variants can affect the accuracy of HbA1c testing and represent the most common pitfall in the determination of HbA1c. We here describe the characterization of an α chain variant in diabetic patients as the cause of an abnormal presentation of the HbA1c fraction on the HLC-723 analyzer.

Methods: HbA1c analysis was performed using various HPLC-based HbA1c analyzers and by immunoassay. Alpha-globin mutation analysis was performed by GAP-PCR and DNA sequencing.

Results: The peak partially overlapping HbA1c in the chromatogram represents the glycated fraction of the silent α chain variant Hb Riccarton [α 51(CE9)Gly->Ser]. This aberrant peak

is uniquely identified by the HLC-723 instrument as it is not observed on other HPLC-based HbA1c analyzers. Depending on the total area, the HLC-723 may fail properly integrating both glycated Hb fractions, resulting in a falsely low HbA1c result. The variant was confirmed in samples from other diabetic patients with identical chromatographic patterns.

Conclusion: The silent α chain variant Hb Riccarton [α 51(CE9)Gly->Ser] leads to an abnormal chromatographic presentation on the HLC-723 analyzer with a risk of erroneous HbA1c determination. Manual validation of chromatograms to detect abnormalities caused by Hb variants is important to prevent incorrectly produced HbA1c results from being reported.

Vlamfotometrie, AAS, massaspectrometrie

26. Measurement of cortisol in saliva using automated online solid-phase extraction HPLC isotope-dilution tandem mass spectrometry

W.H.A. de JONG, J.W. BRINKMAN, J.C. van der MOLEN, I.P. KEMA

Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands

Introduction: Nighttime salivary cortisol is suggested as useful diagnostic test for Cushing's syndrome. Moreover, this test is frequently used as a biochemical marker in the assessment of stress. However, the presently used immunoassays for the measurement of cortisol are cumbersome and time-consuming. Furthermore, due to the low molecular weight of the analyte, these methods are highly influenced by cross-reactivity and change in antibody. Aim was to develop a rapid, sensitive, and selective automated method for cortisol in saliva.

Methods: We used online solid-phase extraction coupled with HPLC-isotope dilution-tandem mass spectrometry (XLC-MS/MS). Saliva (250 µL) was prepurified by automated online-phase extraction, using Hysphere C18 HD cartridges (Spark Holland). Chromatographic separation of the analyte and deuterated analogs was achieved by using a C8 XBridge column (Waters Co.) using an acidic/organic gradient. Mass spectro-

metric detection was performed in the multiple reaction monitoring mode using a quadrupole tandem mass spectrometer with positive electrospray ionization.

Results: Total run-time including sample clean-up was 7 minutes. Intra- and interassay analytical variation varied from 3.5 to 8.0% and 7.9-9.4%, resp. Linearity in the 0 to 60 nmol/L calibration range was excellent ($r^2 > 0.99$). Absolute recovery for cortisol was >85.0%. LLOD was <0.03 and LLOQ was 0.30 nmol/L, respectively. Re-use of cartridges was possible three times. Saliva samples were stable for one week at both 4 and 10 degrees Celsius.

Conclusion: The measurement of salivary cortisol is emerging as the simplest approach in the diagnosis of Cushing syndrome and the monitoring of stress. This automated high-throughput XLC-MS/MS application for the assessment of cortisol in saliva is a reproducible, highly specific, linear method with short analysis time and low variable costs.

27. Bloodspot assay for Barth Syndrome using HPLC-tandem Mass Spectrometry

W. KULIK¹, H. van LENTHE¹, F.S. STET¹, R.H. HOUTKOOPER¹, H. KEMP², J.E. STONE³, C.G. STEWARD³, R.J. WANDERS¹, F.M. VAZ¹

University of Amsterdam, Laboratory Genetic Metabolic Diseases, Department of Clinical Chemistry¹, Academic Medical Center, Amsterdam, Department of Biochemistry², Southmead Hospital, Bristol, UK, Department of Pediatric Oncology/Haematology³, Royal Hospital for Children, Bristol, UK

Introduction: Barth syndrome (BTHS) is a serious X-linked metabolic multisystem disorder which is characterized by cardiomyopathy, neutropenia, myopathy and growth delay. Since early diagnosis and appropriate treatment are of key importance for the survival of affected boys we developed a biochemical screening method for BTHS in bloodspots based on the analysis of the monolysocardiolipin/cardioliplin ratio.

Methods: ¼-inch punches of dried bloodspots on Guthrie cards of BTHS patients and controls were extracted with chloroform/methanol. Extracts were dried (60°C, N2) and reconstituted in CHCl3/MeOH/H2O (50:45:5 v/v/v, 0.1% NH3 (25%)). HPLC-MS/MS analysis was performed with a normal phase HPLC column and MRM transitions for monolysocardiolipin (MLCL) and cardiolipin (CL) with a total runtime of 10 min. The ratio of MLCL and CL was used as screening parameter.

Results: All BTHS patients (n=31) had a monolysocardiolipin/cardioliplin ratio >0.40 and all controls (n=215) had a monolysocardiolipin/cardioliplin ratio <0.23. Using a cutoff point of 0.30, a blind test of 206 samples (199 controls, 7 BTHS) had a sensitivity and specificity of 100%. Bloodspots could be stored at 4°C or room temperature for >1 year without affecting the test outcome. Three original neonatal Guthrie cards of BTHS patients taken 3.6-5.8 years previously were correctly identified as positive for BTHS.

Conclusion: HPLC-MS/MS analysis of dried bloodspots qualifies as an unambiguous screening test for BTHS with the potential for rapid screening of neonates suspected of having BTHS making remote and retrospective diagnosis accessible for a disease which is almost certainly under-diagnosed.

28. Urinary 5-HIAA Measurement Using Automated On-Line Solid-Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

W.H.A. de JONG¹, K.S. GRAHAM², E.G.E. de VRIES³, I.P. KEMA¹

Department of Pathology and Laboratory Medicine¹, University of Groningen, University Medical Center, Waters Corporation², Manchester, UK, Department of Medical Oncology³, University Medical Center, Groningen

Introduction: Quantification of 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) in urine is useful for diagnosis and follow-up of patients with carcinoid tumors and for monitoring serotonin (5-hydroxytryptamine) metabolism in various disorders. We describe an automated method (XLC-MS/MS) that incorporates on-line solid-phase extraction (SPE), high performance liquid chromatography (HPLC) and tandem mass spectrometric (MS/MS) detection to measure urinary 5-HIAA.

Methods: Automated pre-purification of urine was carried out with HySphere-Resin GP® SPE cartridges containing strong hydrophobic polystyrene resin. The analyte (5-HIAA) and internal standard (isotope-labeled 5-HIAA-d2) were, after elution from the cartridge, separated by reversed-phase HPLC and detected with tandem MS. Total cycle time was 4.5 min.

Results: 5-HIAA and its deuterated internal standard (5-HIAA-d2) were retained on and eluted from the SPE cartridges in high yields (81.5-98.0%). Absolute recovery was 96.5%-99.6%. Intra- (n = 20) and inter-assay (n = 15) CVs for the measurement of 5-HIAA in urine in three concentration levels ranged from 0.8%-1.4% and 1.7%-4.2%, respectively. For urine samples from patients (n = 78) with known or suspected metastatic carcinoid tumors, results obtained by XLC-MS/MS were highly correlated ($r^2 = 0.99$) with the routinely used fluorometric method.

Conclusion: This XLC-MS/MS method demonstrated lower imprecision and time per analysis (high-throughput) than manual solvent extraction methods and higher sensitivity and specificity than non-mass spectrometric detection techniques.

29. State-of-the-art-bepaling van testosteronconcentraties in serum met behulp van LC-MS/MS

H.N. BUI, E.A. STRUIJS, F. MARTENS, W. de RONDE¹, C. JAKOBS, M.A. BLANKENSTEIN, H.M. DIJSTELBLOEM
Afdeling Klinische Chemie en Afdeling Endocrinologie¹, VU medisch centrum, Amsterdam

Inleiding: Huidige commerciële assays voor testosteron gemeten met radioimmunoassays (RIA) of enzymimmunoassays (EIA) presteren onvoldoende in serummonsters van vrouwen en kinderen. Met name bij vrouwen worden lage concentraties doorgaans overschat. Bovendien kunnen deze assays gevoelig zijn voor interferentie door andere steroïdhormonen. Dit kan aanleiding geven tot een verkeerde diagnose of behandeling. Wij ontwikkelen daarom een gevoelige, specifieke LC-MS/MS-methode voor het bepalen van testosteronconcentraties.

Methode: Testosteron verkregen uit 200 µl serum van mannen en vrouwen wordt gederivatiseerd. Monsters worden in duplo geanalyseerd op een API 4000 HPLC tandem-MS met electrospray in positieve modus bij een injectie overeenkomend met 40 µl serum.

Resultaat: De ontwikkelde meetmethode maakt het mogelijk

om specifiek en reproduceerbaar testosteronconcentraties te meten tot 0,1 nmol/l met een variatiecoëfficiënt van 10%. Bij 1 nmol/l kent de LC-MS/MS een variatiecoëfficiënt van <10%, terwijl de RIA op dit niveau ruim boven de 10% uitkomt. Daarnaast is de meetmethode minder vatbaar voor interferentie door andere steroïdhormonen dan de huidige immunoassays.

Conclusie: Gevoeligheid en specificiteit van deze ontwikkelde LC-MS/MS-methode voldoen aan de normen die gesteld werden aan meting van testosteron in serummonsters van vrouwen, kinderen en mannen die lijden aan hypogonadisme. Hoewel deze LC-MS/MS-methode momenteel redelijk arbeidsintensief en daardoor kostbaar is, wordt gewerkt aan het automatiseren van een belangrijk deel van de handelingen. Bovendien heeft deze meetmethode de potentie om in één bepaling de concentraties van meerdere steroïdhormonen tegelijkertijd te meten.

Moleculaire biologie

30. MUC1 568 A/G specific serum CA 15-3 levels in healthy Dutch women

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

Departments of Clinical Chemistry¹ and Pulmonology², Centre for Interstitial Lung Diseases, St. Antonius Hospital, Nieuwegein

Introduction: Cancer Antigen 15-3 (CA 15-3) is a mucin-like glycoprotein, namely MUC1, that is widely used as a tumor marker for monitoring treatment and recurrence of invasive breast cancer [1-3]. Recently, we reported an association between 568 A/G MUC1 SNP and variation of serum levels of KL-6, another MUC1 assay [4], in healthy individuals [5]. The observation that the SNP accounted for a significant portion of the variation of circulating KL-6 serum levels in individuals prompted us to investigate whether serum levels of CA 15-3 are equally affected by the 568 A/G polymorphism in healthy women.

Methods: Blood samples were obtained from 210 healthy females. Serum CA 15-3 levels were measured and related to the previously determined MUC1 568 A/G genotypes.

Results: CA 15-3 levels between females grouped according

to the 568 genotype were significantly different (mean ± SD; 95%CI (U/ml)): AA (10.9 ± 3.8 : 10.0 – 13.5), AG (15.9 ± 5.0 : 14.9 – 16.9) and GG (19.0 ± 5.6 : 17.5 – 20.9), $p < 0.0001$.

Conclusion: The MUC1 568 A/G polymorphism strongly determines serum CA 15-3 levels in healthy women. The diagnostic value of CA 15-3 might perform better when the MUC1 568 A/G polymorphism is considered.

Literature:

1. Berruti et al. Eur J Cancer 1994 ; 30A (14): 2082-4
2. Lauro et al. Anticancer Res 1999 ; 19 (4C): 3511-5
3. Molina et al. Anticancer Res 1999 ; 19 (4A): 2551-5
4. Kohno et al. Jpn J Clin Oncol 1998 ; 18 (3): 203-16
5. Janssen et al. Am J Respir Cell Mol Biol 2006; 34 (4): 496-9

31. Real time PCR Quantification of gene fusions in detecting Minimal Residual Disease on the LightCycler 480

A.L.M. STRUNK, A.P. ABBES, H. ENGEL

Department of Clinical Chemistry, Isala Clinics, Zwolle

Introduction: Real time quantitative PCR is an approved technique in detecting gene fusions and Minimal Residual Disease (MRD) in leukemia due to its high reproducible sensitivity (1). The most common gene fusions in leukemias are BCR-ABL, PML-RAR, AML1-ETO, CBFb-MYH11 and MLL-AF4 and protocols are described by the Europe Against Cancer (EAC) program (2). After diagnosis of a specific gene fusion, patients can be monitored for progress and treatment of the disease.

Methods: In this study we set up a real time PCR to detect different fusion genes on the LightCycler 480 Real Time PCR System (Roche Diagnostics). The same protocol was set up on the 7500 Fast PCR system (Applied Biosystems). Both instruments were validated for all fusion genes.

Results: On both instruments reproducible results were ob-

tained, and a sensitivity of 10-4 was reached for all fusion genes except PML-RAR with a sensitivity of 10-3 on the LightCycler 480 as well on the ABI 7500 Fast. Efficiencies of standard curves of plasmids and cell line dilutions are within a range of 1.96 ± 0.08 .

Conclusion: A fast and reliable method has been developed to detect different fusion genes on the LightCycler 480. Results meet with the criteria given by the MODHEM and the sensitivity to detect 1 malignant cell in 10.000 normal cells can be reached.

Literature:

1. Jansen et al., Ned. Tijdschr. Hematologie, 2005; 2.
2. Gabert et al, Leukemia 2003; 17: 2318-57.

32. Molecular genomics as an aid in confirmation of renal genetic disorders

A.L.M. STRUNK¹, A.P. ABBES¹, H. JOOSTEN², J.R. BEUKHOF², H. ENGEL¹

Department of Clinical Chemistry¹ and Department of Internal Medicine and Nephrology², Isala Clinics, Zwolle

Introduction: Recently, the knowledge of renal disorders has been extended. In families with distinct symptoms and heredity, it is easy to diagnose a genetic renal disorder. Occasionally however we encounter familial renal disease, with renal insufficiency and undersized kidneys without prominent typical features. In this case molecular genetics can help to identify genetic defects in kidney diseases (1-4). Recognition is necessary, having important consequences for prognosis, treatment and heredity. We differentiate the following autosomal dominant disorders: Medullary Cystic Disease (MCD), Glomerulocystic Kidney Disease (GCKD) and Nail-patella syndrome. Autosomal recessive disorders should also be considered like Nephronophthisis and Primary Oxalosis.

Methods: Eight patients were differentiated in autosomal dominant- (UMOD-, HNF1 β - and LMX1b-gene) or autosomal recessive disorders (NPHP1, 2, 3, 4-, AGXT-gene) and accessory genes were sequenced. Real-time PCR Quantification was performed for the NPHP1-gene, to detect deletion of the complete NPHP1-gene.

Results: Mutations were detected in four patients. The first patient showed a heterozygous Thr62Pro mutation in the UMOD-gene. The second patient had a homozygous deletion of the NPHP1-gene. Another patient had a heterozygous NPHP1 deletion, whereas the other allele was affected with a Gly342Arg mutation. The last patient showed several previously described (3)homozygous mutations on the AGXT-gene: Pro11Leu, Gly-170Arg, Ile340Met and was heterozygous Val336Asp.

Conclusion: Molecular genetics can help in giving the final answer in renal disorders. In our study it was possible to diagnose four patients with respectively Medullary Cystic Disease, Nephronophthisis and Primary Oxalosis.

Literature:

1. Hart et al, J. Med. Genet. 2002 Dec; 39(12): 882-92
2. Bingham et al, Am. J. Hum. Genetics 2001; 68: 219-224
3. van Woerden et al, Ned. Tijdschrift Geneesk. 2006; 29 juli: 150 (30)
4. H. Olbrich et al, Nature genet. 2003; 34(4): 455-9

33. A DNA isolation method for pharmacogenetic testing with buccal swabs

P.A.H.M. WIJNEN¹, M. DRENT², M.P. van DIEIJEN-VISSEN¹, O. BEKERS¹

Clinical Chemistry Department¹, Respiratory Medicine Department², University Hospital Maastricht, Maastricht

Introduction: Recently we compared a whole blood DNA isolation method to two dried blood spot (DBS) DNA isolation methods using capillary blood.(1) Although needing less blood and being less invasive, the patient is still subjected to a needle. To overcome this drawback we have used this DBS isolation protocol for buccal swabs.

Methods: Capillary blood samples were obtained by finger prick, applying blood to sampling paper, and buccal swabs by rubbing a sterile cotton stick against the inside of the subjects' cheek.In the laboratory a 3 mm disk was cut out of the sampling paper or the tip was cut off the cotton stick. Additionally the 3 mm paper disk or the cotton tip was placed into a cup, adding 500 μ l sterile water and vortexed 3 times during 5 seconds. The water was pipetted off. After adding 200 μ l 10 % Chelex-100 solution, the cup was placed in a water bath at 95 °C for 30 minutes. Finally, this solu-

tion was pipetted into a new cup, and the DNA is ready for use.

Results: Real-time PCR results obtained for both sample types corresponded completely with results obtained using a commercial DNA isolation kit.Additionally DNA yields were measured, resulting in mean concentrations of 16.1 ng/ μ l (12.8–19.4, n=25) for DBS and 70.2 ng/ μ l (57.3–83.1, n=25) for buccal swabs, respectively.

Conclusion: The DNA isolation method described can be used for DBS as well as for buccal swabs prior to pharmacogenetic testing.Especially the non-invasive buccal swabs combined with this low-cost DNA isolation method appears to be a good alternative for commercial DNA isolation kits and invasive sampling methods.

Literature: Wijnen et al. Clin Chim Acta 2007; in press

34. Real-Time Mutation Scanning of the Human DPYD Gene

M. de METZ, Y. van AARSSEN, L. van SCHOONHOVEN, C.H.W. KLAASSEN

Department of Clinical Chemistry, Canisius Wilhelmina Hospital, Nijmegen

Introduction: 5-FU is the most commonly administered cytostatic in colorectal cancers. The rate limiting step in 5-FU metabolism is performed by the enzyme dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD). Approximately 1% of all patients suffers from extreme (sometimes fatal) toxicity of this drug as a result of being partially DPD deficient. The DPYD*2A variant is responsible for ~50% of all DPD deficiencies. Several other mutations may be responsible for 5-FU toxicity in DPYD*2A negative individuals.
Methods: A real-time PCR based on hybridization probes was developed for rapid identification of the DPYD*2A variant and compared to a previously used PCR-RFLP approach. We are validating a recently developed high resolution melting (HRM) assay in order to screen the entire coding region of the DPYD gene in clinically manifest DPD deficient patients that are negative for the DPYD*2A variant.

Results: Real-time detection of the DPYD*2A variant yielded superior results compared to the PCR-RFLP assay and enables rapid identification of individuals at risk at 5-FU intoxication. Preliminary results using the HRM assay enables rapid identification of exons with nucleotide sequence variations relative to a wild-type reference in DPYD*2A negative individuals.

Conclusion: The real-time DPYD*2A PCR assay is a rapid, reliable and cheap method for the identification of patients that are at risk at developing 5-FU toxicity prior to administration of 5-FU based chemotherapy. Rapid mutation scanning of the DPYD gene using HRM is a feasible approach for identification of other DPYD variants in patients that suffered from 5-FU toxicity.

35. Jak2-diagnostiek: één jaar later

J. PRINS¹, M.A. FOURAUX¹, H. KOOIJMAN¹, M.D. LEVIN²

Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Interne Geneeskunde², Albert Schweitzer Ziekenhuis, Dordrecht

Inleiding: De diagnostiek van Polycythemia Vera (PV) en Essentiële Trombocytose (ET) is, ondanks diverse richtlijnen en criteria, lastig. De aanwezigheid van de verworven V617F-mutatie in het JAK2-gen wordt gebruikt als additioneel criterium in deze diagnostiek.

Methode: In het afgelopen jaar is van patiënten met een klinische verdenking op PV (hemoglobine > 10,6 / 9,9 mmol/l voor m/v) of ET (trombocyten > 600x10E9/l) in perifeer bloed via een allele-specifieke PCR-methode de aan- of afwezigheid van de V617F-mutatie in het JAK2-gen aangetoond. Retrospectief is gekeken of er verschillen bestaan in de hematologische parameters tussen de JAK2-mutatie positieve en negatieve PV of ET verdachte patiënten.

Resultaat: Van 51 patiënten met verdenking PV en 37 patiënten met verdenking ET is de JAK2-genstatus bepaald. In de PV-verdachte patiënten werd geen verschil in de hemoglobineconcentratie gevonden tussen de 19 Jak2-positieve patiënten en 32 Jak2-negatieve patiënten (10,5±1,2 mmol/l vs 11,0±0,8 mmol/l).

Wel werden significant hogere trombocyten- en leucocytenwaarden gevonden in de Jak2-positieve patiënten (454±220 / 13,3±6,0x10E9/l vs 223±65 / 8,5±3,0x10E9/l). Ook de trombocytenwaarden van de ET-verdachte patiënten zijn vergelijkbaar (812±201x10E9/l vs 826±337x10E9/l) voor respectievelijk de 18 Jak2-positieve patiënten en 19 Jak2-negatieve patiënten. Bij de Jak2-positieve patiënten werden wel hogere hemoglobine- en leucocyten-waarden geconstateerd (8,6±1,1 mmol/l / 13,2±7,8x10E9/l vs 7,7±1,5 mmol/l / 11,2±4,3x10E9/l).

Conclusie: Uit de resultaten blijkt dat met name bij hoge hemoglobine-waarden het vaststellen van de Jak2-genstatus in de praktijk een prominente plaats inneemt bij de differentiatie van patiënten met PV versus andere oorzaken van hemoglobinemie. Daarbij blijkt, overeenkomstig de literatuur, de aanwezigheid van de Jak2-V617F mutatie invloed te hebben op meerdere cellen in het perifere bloed.

Literatuur: Koene et al. Ned Tijdschr Geneeskd 2007; 151: 1784-7

Overigen

36. Vergelijking van de motiele recovery van verschillende semenopwerktechnieken ten behoeve van intra-uteriene inseminatie (IUI)

F.M. VERHEIJEN^{1,2}, C. KENTIE-de GRAAF¹, G. LEENHEER-van LEERDAM¹, M. van de WERKEN¹, K. STERKENBURG², M.A. FOURAUX^{1,2}

GKCL^{1,2}, Albert Schweitzer ziekenhuis, Dordrecht, GKCL, Beatrix ziekenhuis, Gorinchem, KCL², Ikazia Ziekenhuis, Rotterdam

Inleiding: Het aantal zwangerschappen na IUI was in 2006 lager dan voorgaande jaren in zowel het ASz/Beatrix ziekenhuis als het Ikazia ziekenhuis. Mogelijk is dit te wijten aan de invoering van nieuwe semenopwerkingstechnieken in 2006. Retrospectief zijn de nieuwe methoden, te weten "Sil-Select" (GKCL) en "Sperm Tec" (Ikazia ziekenhuis), met de oorspronkelijk gebruikte opzwemtechniek vergeleken.

Methode: Indicatoren om de prestaties van verschillende opwerktechnieken te kunnen beoordelen zijn niet veel beschreven. In deze studie is gekozen om de motiele recovery van alle methoden te bepalen. De motiele recovery wordt gedefinieerd als het percentage van de VCM (volume x concentratie x % motiele fractie (A+B)) na en voor opwerking.

Resultaat: De opzwemtechniek (jaar 2004 en 2005) en de Sperm Tec-techniek laten vergelijkbare gemiddelde motiele recovery's zien van respectievelijk, 19,2%, 19,7% en 16,8% met standaarddeviaties van respectievelijk 23%, 26% en 21%. De Sil-Select methode laat een gemiddelde motiele recovery zien van 31,9%, waarbij opgemerkt dient te worden dat de spreiding van 40,9% bij deze methode beduidend hoger is.

Conclusie: Deze retrospectieve analyse laat zien dat er geen aanwijzingen zijn dat het gedaalde aantal zwangerschappen na IUI te wijten is aan de invoering van een nieuwe semenopwerktechnieken. De lage motiele recovery's die zijn gevonden (16,8%-31,9%) zijn wel een reden om kritisch naar de opwerktechnieken te kijken en deze te optimaliseren.

37. Glycosylated hemoglobin from dried blood spots; validation and patient satisfaction

M.R. FOKKEMA, A.J. BAKKER, J. KOOISTRA, S. de VRIES, M. FORTUIN, A. WOLTHUIS
Stichting Klinisch Chemisch Laboratorium, Medical Centre Leeuwarden, Leeuwarden

Introduction: HbA1c measurements form an integral part of diabetes follow-up. This study evaluates HbA1c measurements collected as dried blood spots on filter paper and compares filter HbA1c contents (capillary blood) with HbA1c contents in venous blood. Patient satisfaction was evaluated through a questionnaire.

Methods: Filterpaper method performance was assessed by comparing HbA1c results of EDTA-anticoagulated venous blood samples obtained via the filterpaper method with results obtained with freshly hemolyzed blood. Adult patients visiting the outpatient clinic for HbA1c analyses were recruited for evaluation of home sampling with the filterpaper method. Three blood samples were obtained from each patient. Laboratory personnel took a capillary blood sample for the filterpaper method as well as a venous EDTA-anticoagulated blood sample. The participants were asked to take another capillary blood sample at home and to send the dried filter back to the laboratory on

the day of sampling. Patients also received a questionnaire with questions regarding patient satisfaction. Samples were analyzed shortly after arrival with an immunoturbidometric HbA1c assay (Roche Diagnostics).

Results: Optimal elution of HbA1c was determined at 1 hour at RT and stability of filter HbA1c was estimated at at least 5 days. Within- and between-filter variation coefficients were 1.1% and 1.8%, respectively. Filter HbA1c highly correlated with whole blood HbA1c (Filter=0.987*venous- 0.011, r=0.987). Ninety-three patients participated in the home sampling evaluation study. Laboratory and home filter HbA1c were comparable to venous HbA1c, biases were -0.025 (ns) and +0.011 (ns), respectively. Ninety-seven percent responded that home sampling was easy and 83% would like the filter method to be brought in practice.

Conclusion: Home HbA1c sampling on filter paper is a good sampling alternative for HbA1c analysis.

38. Correlation and performance of the Axis-Shield and the Dade-Behring N-Latex methods for %CDT in the follow-up of drunk-driving

J.P.M. WIELDERS¹, F.J.M. BERGKAMP², J.M. PEKELHARING³

Medial Hoofddorp², Meander Medisch Centrum Amersfoort¹, Reinier de Graaf SSDZ, Delft³

Introduction: Carbohydrate Deficient Transferin (%CDT) is an important biomarker for alcohol abuse, e.g. in the follow up of drunk-driving and in driver licence regranting. We compared the more specific N-Latex with Axis-Shield method, the preferred test for the CBR (Dutch statutory body administering driving tests) in samples requested by the CBR.

Methods: The Axis-Shield method, using ionexchange chromatography separation of CDT and non-CDT fractions and Dade-Behring's direct competitive immunonephelometric N-Latex method were performed according to the manufacturers instructions at three different laboratories. Axis-Shield results used are the mean of a duplo analysis. Patients: 406 serum samples of succeeding requests in CBR follow-up procedures.

Results: Passing Bablok regression: N-Latex = 0.197 + 0.561 Axis. The 95% confidence limits for the slope were 0.520 – 0.600. No significant deviation from linearity was found.

We examined by means of SEBIA capillary electrophoresis (CE) 79 samples out of the 406, either being outside the 95% regression confidence interval, or discrepancies in being above the respective upper limits. In the discrepancy group ($n = 72$), we found 14 samples with elevated trisialofraction ($> 5\%$ with CE), 4 samples with di-trisialobridging and 2 transferrin variants, leading to false-high or false-low Axis-Shield results.

Conclusion: The N-Latex %CDT method shows a linear correlation with the Axis-Shield %CDT method. Discrepancies in elevated results between the two methods or outliers were in most cases explained by erroneous Axis-Shield results. Based on these results we recommend the use of the N-Latex %CDT method in forensic testing for alcohol abuse.

Literature: Delanghe et al. Clin Chem 2007; 53: 1115-21.

39. Rabdomolyse; (on)mogelijkheid van kwantitatieve myoglobinebepaling in urine op een viertal platforms

H. de WAARD, P. van 't SANT

Laboratorium Klinische Chemie en Hematologie, Jeroen Bosch Ziekenhuis, 's-Hertogenbosch

Inleiding: Weefselverval bij rabdomolyse wordt gekenmerkt door hoge myoglobineconcentraties in plasma. Overschrijding van de nierdrempel leidt tot myoglobinurie. Door precipitatie van myoglobine, oxidatieve schade en vasoconstrictie kan acuut nierfalen ontstaan (1,2). Hoewel de literatuur niet eenduidig is over de prognostische waarde van myoglobine in urine op het risico van acuut nierfalen (3-9), wordt deze bepaling regelmatig aangevraagd. Ondanks deze verschillende opvattingen is het algemene beeld dat een myoglobinebepaling in urine alleen zinvol is bij een kwantitatieve bepaling. Gezien het feit dat acuut handelen gewenst is, geniet het de voorkeur dat deze bepaling zo spoedig mogelijk na de aanvraag uitgevoerd wordt. Op veel laboratoria is dit niet mogelijk en worden monsters verstuurd.

Methode: In deze studie is de bruikbaarheid van de myoglobine STAT kit –een myoglobinebepaling voor serummonsters- op de Elecsys 1010 (Roche) onderzocht voor myoglobinebepalingen in urine. Gezien de gerapporteerde instabiliteit van myoglobine in zure urine (6) is onderzoek verricht naar de invloed van pH van de urine en van bewaarcondities op de stabiliteit van myoglobine in urine.

Resultaat: Hieruit bleek dat zowel pH(veranderingen) als ook bewaartemperatuur een significante invloed heeft op de geme-

ten myoglobineconcentratie met de Elecsys, waardoor dit platform niet bruikbaar is. Een tweede fase van onderzoek richt zich op de vergelijking van de myoglobinebepaling in urine op drie andere platforms (Integra700(Roche), BN-prospec(Dade-Behring), AeroSet(Abbott)).

Conclusie: De invloed van de urine-pH en bewaartemperatuur op de myoglobinstabiliteit is aangetoond. Uit de tweede fase van het onderzoek moet blijken of een van deze analysemethoden geschikt(er) is voor de kwantitatieve bepaling van myoglobine in urine in zowel verse als opgestuurde (bewaarde) urine monsters.

Literatuur:

1. Slater et al. J Am Coll Surg 1998; 186: 693-716
2. Moore et al. JBC 1998; 273: 31731-7
3. Feinfeld et al. Clin Nephrol 1992; 38: 193-5
4. Kim. Korean Med Sci 1996; 11: 324-46
5. Loun. Am J Clin Pathol 1996; 105: 479-86
6. Wu et al. Clin Chem 1994; 40: 796
7. Laios et al. Ann Clin Lab Sc 1995; 25: 179-84
8. Leppalainen. Crit Care Med 2002; 30: 2212-2230
9. Janssens. NTKCL, 2001; 26: 41-3

40. Evaluatie van de Iris iQ200 en de Sysmex UF1000 als screenende analyzer in de diagnostiek van glomerulaire hematurie en bacteriurie

M.A.C. BROEREN, F. van der GRAAF, D.L. BAKKEREN, H.L. VADER
Klinisch Laboratorium, Máxima Medisch Centrum, Veldhoven

Inleiding: Er is een beperkt aantal geautomatiseerde urineanalyzers op de markt. Wij hebben de performance van de Iris iQ200 en de Sysmex UF1000 onderzocht bij de vraagstelling glomerulaire hematurie en bacteriurie.

Methode: Totaal 139 monsters met de vraagstelling 'glomerulaire hematurie' zijn microscopisch beoordeeld op de aanwezigheid van ery- of erybevattende cilinders. De monsters zijn tevens geanalyseerd op de iQ200 en UF1000, waarbij is onderzocht hoe goed deze analyzers in staat zijn de positieve monsters te identificeren. Van 150 monsters met de vraagstelling 'urineweginfec tie' is het aantal bacteriën op beide analyzers gemeten en is dit aantal vergeleken met het resultaat van een urinekweek.

Resultaat: Van de 139 monsters bleken 21 monsters ery- of erybevattende cilinders te bevatten. Met de gebruikte reviewcrite-

ria kon de UF1000 17 van de 21 monsters identificeren, terwijl de iQ200 11 van de 21 monsters identificeerde (sensitiviteit 81 respectievelijk 52%). Het aantal vals positieven bij de UF1000 was echter hoger, zodat de specifiteit lager was dan bij de iQ200 (72% respectievelijk 78%). Door de screening uit te voeren in combinatie met de Miditron kan de sensitiviteit verhoogd worden. Van de resultaten van de bacterietelling zijn ROC-curves gegenereerd. Hieruit blijkt dat de UF1000 een grotere AUC heeft dan de iQ200 (0,80 respectievelijk 0,70).

Conclusie: Onder de gebruikte reviewcondities lijkt voor het detecteren van ery- of erybevattende cilinders de UF1000 sensitiever te zijn, terwijl de iQ200 een hogere specifiteit heeft maar hierdoor vaker een glomerulaire hematurie mist. De bacteriedetectie van de UF1000 is beter dan die van de iQ200.

41. Can the Alifax-Test1EC be used to measure the Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) in rheumatoid arthritis patients?

M. LEVITUS¹, A. PELLICIA², M. HARDEMAN³, R. van de STADT², A.A. BOUMAN¹

Department of Clinical Chemistry¹, VU Medical Center, Amsterdam, Department of Clinical Chemistry², Jan van Breemen Institute, Amsterdam, Department of Physiology³, Amsterdam Medical Center, Amsterdam

Introduction: Rheumatoid arthritis (RA) is one of the most prevalent autoimmune diseases, which is characterized as a chronic inflammation disease. Treatment of this disease is monitored the DAS28 score, which is used to assess disease activity. A high disease activity score (above 3.2) indicates anti-TNF therapy might be started, while a low disease activity score (below 3.2) does not indicate this kind of therapy. The DAS28 is calculated using the number of swollen and painful joints, the VAS and the erythrocyte sedimentation rate (ESR), which is based on the gold standard Westergren method. Since this is an laborious and time consuming method, other methods have become available to measure an ESR. One of these methods is the Alifax-Test1EC apparatus.

Methods: We compared the measured ESR by the Alifax-Test1EC and the Westergren method and we also compared the subsequently calculated DAS28 among 218 RA patients.

Results: We found a poor correlation between the ESR measured by the Alifax-Test1EC compared to the Westergren method, but, surprisingly, we found a very good correlation between the DAS28 using either the Alifax-Test1EC or the Westergren method. This difference in results is probably due to the logarithmic function of the ESR in the DAS28.

Conclusion: These results suggest that although the Alifax-Test1EC does not correlate well for the ESR with the Westergren method, it is useful for determining the DAS28 in RA patients.

Literature

1. Mäkinen et al. J Rheumatol 2007; 34: 1
2. Rindfleisch et al. Am Fam Physician 2005; 72: 1037
3. Oosting et al. Ned Tijdschr Klin Chem 2003; 28: 197

42. Evaluation of the i-STAT point-of-care analyzer in critically ill adult patients

J. KLEIN GUNNEWIEK¹, J. STEINFELDER-VISSLER², J. TEERENSTRA³, P. WEERWIND⁴

Departments of Clinical Chemistry¹, Extra-Corporeal Circulation², and Epidemiology, Biostatistics and Health Technology Assessment³, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, Department of Cardiothoracic Surgery⁴, University Hospital Maastricht, Maastricht

Introduction: Point-of-Care Testing (POCT) has been developed to provide improvement in convenience, patient care, and turn-around-time. Therefore, POCT is an attractive instrument in acute patient care. Several studies showed a good correlation between the i-STAT (blood gas, electrolytes, and hematocrit) and conventional methods using samples derived from patients during physiologically normal conditions. However, the patient populations used in these studies are not comparable to our intensive care (ICU) and cardiopulmonary bypass (CPB) patients among which large ranges of hematocrit and blood gas values are observed. In this study, we evaluate the use of the i-STAT device among our ICU and CPB patients using the CPB and non-CPB mode options.

Methods: During a three-month period, 48 arterial whole blood samples from patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass (CPB) and 42 blood samples from non-cardiac critically ill patients were included. Samples were

analyzed on the i-STAT (CPB mode in cardiac patients and non-CPB in ICU patients) and laboratory analyzers (RapidLab 865/Sysmex XE-2100) to compare for blood gas, electrolytes and hematocrit.

Results: Bland-Altman analysis showed that pO₂ values in both CPB and non-CPB mode were 10% lower (pO₂ >10 kPa). Hematocrit values beneath 25% showed an underestimation up to 2.2% among ICU patients using the non-CPB mode. This phenomenon was not observed when the hematocrit was measured using the CPB mode.

Conclusion: The i-STAT seems to be suitable to analyze electrolytes, blood gases, and hematocrit in our ICU and CPB patients. However, the discrepancy in hematocrit bias between different patient populations illustrates that accuracy established in one patient population cannot be extrapolated automatically to other patient populations.

43. Accuracy of bedside-glucose measurements in critically ill patients

J. KLEIN GUNNEWIEK¹, C. HOEDEMAEKERS², M. PRINSSEN¹, J. WILLEMS¹, J. van der HOEVEN²

Departments of Clinical Chemistry¹, Intensive Care Medicine², Radboud University Medical Centre, Nijmegen

Introduction: A nurse-driven insulin infusion algorithm is frequently used to induce and maintain strict glucose control among ICU patients. Point-of-care Testing (POCT) glucose devices can be helpful in such an insulin protocol. Studies assessing the accuracy of POCT glucometry in the ICU setting have revealed conflicting results. Aim of our study was to determine the accuracy of three different glucose POCT devices in critically ill ICU patients in our hospital.

Methods: Glucose measurements (duplo) using the plasma calibrated Accu-Chek (Roche) and Rapidlab 860 (Bayer Diagnostics) were performed on 193 arterial blood samples from ICU patients. This experiment was repeated (n=80) using Accu-Chek, Hemocue, Precision (Abbott) and RapidLab 860. Paired samples were evaluated using the ISO criteria: glucose values >4.1 mmol/l should be within 20% of reference values, and glucose values Δ 1 mmol/l should be within 0.8 mmol/l of reference values.

Results: Comparison between Accu-Chek and Rapidlab 860 (n=193) showed a good correlation. However, strong inaccuracy was observed in n=14 of critically ill, hemodynamically unstable patients (mean difference 1.9 mmol/l, range 1.1 to 3.5 mmol/l). Of all measurements 13.7% did not meet the ISO criteria. All discrepant measurements showed falsely elevated glucose levels. In the additional experiment, paired samples from the Accu-Chek, Hemocue and Precision failed the ISO criteria in 9/82 (11.0%), 4/82 (4.9%) and 11/82 (13.4%) of cases, respectively. All discrepant Accu-Chek and Hemocue measurements and 50% of discrepant Precision measurements resulted in falsely elevated glucose levels.

Conclusion: None of the tested POCT glucose devices completely met the ISO criteria. We therefore state that POCT glucose devices should not be used in critically ill patients.

44. Daily variation of serum hepcidin levels in healthy controls

J.J.C. KROOT, J.M.M. LAARAKKERS, S.M. KLAVER, E.H.J.M. KEMNA, J.L. WILLEMS, D.W. SWINKELS
Department of Clinical Chemistry, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen

Introduction: Variations in serum hepcidin levels may be due to diurnal variation. More insight in this variation is essential to assess optimal sampling conditions for hepcidin measurements in clinical studies.

Methods: Therefore, we determined serum iron parameters and serum hepcidin levels for 24 healthy controls (11 men and 13 women) at four different relevant time points (overnight fasted at 8.30am, 11am, 1.30pm and 4pm) during the day. Hepcidin levels were quantitatively measured by our recently updated surface-enhanced laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) method exploiting an internal standard.

Results: We observed a significant increase in hepcidin levels ($p<0.001$), and a decrease in both iron concentration ($p<0.001$) and transferrin saturation ($p<0.001$) in the course of the day. Inter-subject variation in hepcidin levels is lowest for the overnight fast-samples taken at 8.30am.

Conclusion: These results implicate that the practice of restricting collections for hepcidin measurements to a specific time of day, preferably fasted, decreases the influence of the within-subject biological variation and consequently improves the reliability of the test result. Hence, for hepcidin measurements in clinical studies and for diagnostic purposes we recommend to take blood samples after an overnight fast.

45. Vergelijking van ethanol-zelftestmeting met behulp van de AL7000 alcohol-ademtester en de standaard plasma-ethanolbepaling

S. de LATHOUDER, F.A.L. van der HORST, J.M. PEKELHARING
Reinier de Graaf Groep/SSDZ, Afdeling Klinische Chemie, Delft

Inleiding: De hedendaagse consument kan uit een groot scala van zelftesten kiezen. De betrouwbaarheid van deze testen is vaak onduidelijk. In deze studie zijn de uitkomsten van een alcohol ademtester (DAISY AL7000) vergeleken met de referentiemethode, het alcoholpromillage in bloed.

Methode: De proefpersonen ($n=3$) hebben verschillende hoeveelheden alcohol gedronken. Na enkele consumpties wordt het alcoholpromillage gemeten op meerdere momenten. Plasma alcohol concentraties worden gemeten met de ethanol bepaling op de architect ci8200 (Abbott) in Na-F bloed, verkregen door venapunctie. De ademtest met de AL7000 (Alcoscan) wordt uitgevoerd tijdens of direct voor de venapunctie. Twintig minuten na de laatste alcohol inname wordt drie keer de alcohol concentratie bepaald in uitademingslucht, waarbij een tussentijdse pauze van 1 minuut wordt aangehouden. De Passing en Bablok methode is gebruikt voor het vergelijken van de methodes.

Resultaat: De resultaten van de eerste blaastest liggen gemiddeld 20% hoger dan die van de volgende twee bepalingen ($P<0,05$). De resultaten van de 2e en 3e blaastest zijn statistisch niet verschillend van elkaar. Een gemiddelde van de twee blaastesten is vergeleken met het promillage in het bloed. De volgende relatie is gevonden (gemiddelde (95% CI): Helling 0,915 (0,571-1,200), Intercept: -0,002 (-0,163-0,258)).

Conclusie: Bij gebruik van deze alcohol ademtester dient de eerste uitslag niet gebruikt te worden, de reden hiervoor is vooral onduidelijk. Een gemiddelde van de 2e en 3e blaastest heeft een goede correlatie met het alcohol promillage in bloed. Hieruit zou de conclusie getrokken kunnen worden dat de resultaten van de alcohol ademtest een goede indicatie kunnen geven van de waarden die in het bloed gemeten worden.

Categorie 2: Bedrijfsvoering

Dienstverlening, doorlooptijden, workflowanalyse

46. The universality of universal carriers of specimen

M. de GRAAF, A.M.J. KOOIJMAN-BUITING
Saltro, Utrecht

Introduction: Since 1999 Saltro uses so-called universal 5-position carriers and rack handlers for transporting tubes to the chemistry, immunochemistry and coagulation analyzers. A peri analytic system (Olympus OLA 2500 HS) places the tubes into the specimen carrier. These carriers are set upon a so called "Integra rack handler". The handle of these can be put down. This is necessary to prevent crashing of the OLA robot arm. Saltro changed in 2007 to a set of new coagulation (from Roche to Roche) and chemistry systems (from Roche to Siemens) with the restriction that the "Integra" rack handler and the 5-position rack could be used on these systems.

Methods: A project with Siemens and with Roche was set up with these goals: 1. An "Integra" rack handler fits at the instrument (Roche Sta-r Evolution and Siemens Advia 2400); 2. The "Integra" rack handler is filled with Roche 5 position racks.

Results: The Siemens Advia 2400 is adapted to fit a modified "Integra" rack handler. It uses Roche 5-position racks, the same as the former Integra 800. Roche especially modified Stago-rack handlers to fit into the OLA and into the Roche Sta-r Evolution analyzer.

Conclusion: The agreements in the NCCLS standard (AUTO1-A) are not strict enough. A sufficient agreement for an universal rack is lacking. A so-called universal 5-position rack (proposed to be the standard) is not universal. Not even within one platform. Many adaptations are needed to the instruments and/or to the rack handlers to fit the wanted racks.

Literature: NCCLS. Laboratory Automation: Specimen Container/Specimen Carrier; Approved Standard. NCCLS document AUTO1-A (ISBN 1-56238-427-9)

47. Buiten winnen is binnen beginnen!

M. SCHOORL, P.C.M. BARTELS

Laboratorium voor Klinische Chemie, Hematologie & Immunologie Medisch Centrum Alkmaar, Alkmaar

Inleiding: Concurrentie tussen laboratoria wordt in toenemende mate merkbaar. Marktwerking in de sector draagt er toe bij dat laboratoria zich meer en meer profileren om zich van elkaar te onderscheiden. Het verwerven van de gunst van klanten richt zich voornamelijk op prijs en kwaliteit van producten in combinatie met hoogwaardige dienstverlening. Meerwaarde wordt toegevoegd door subjectieve ervaringen die men voor onderscheiden categorieën klanten creëert. Klantgroepen van het laboratorium betreffen o.a. medisch specialisten, huisartsen en patiënten. Dit besef en het consequent ernaar handelen kenmerkt de kwaliteit van de performance van een organisatie. Klanten hebben in toenemende mate behoefte aan maatwerk. Men doet een beroep op de unieke combinatie van de professional met zijn specifieke expertise en eigen persoonlijkheid. De professional acteert steeds meer als gesprekspartner bij contacten met klanten. Dienstverlening van de laboratoriumorganisatie ontwikkelt zich dientengevolge in sneltempo tot persoongebonden business.

Methode: Bij professionals is vooral de competentiekennis ontwikkeld. Een jaar lang werd systematisch aandacht besteed aan marketing en cliëntoriëntatie.

Resultaat: Het imago van een organisatie wordt voornamelijk bepaald door het niveau van cliëntgerichtheid. Een klantvriendelijke houding alleen is in dit verband niet voldoende. Uit een werkconferentie met vertegenwoordigers van verschillende klantgroepen en enkele geledingen van de laboratoriumorganisatie is een sterkte-zwakte analyse vervaardigd.

Conclusie: De laboratoriumorganisatie kan meerwaarde bieden op het gebied van korte wachttijden, snelle doorlooptijden, innovatie, consultatie en interpretatie. De laboratorium professional dient bij voorkeur te veranderen van een vakdeskundige in een relatiebeheerder. Een themabijeenkomst met leveranciers heeft geresulteerd in een professionele aanpak van accountmanagement en bewustwording van de noodzaak voor een cultuurverandering om van een resultaatgerichte naar een klantgerichte (vraaggestuurde) laboratoriumorganisatie te groeien.

Literatuur: Den Engelsen et al. Marketing voor zorgverleners. 2007. ISBN 978-90-313-4970-8

48. Procesoptimalisatie in het laboratorium middels Lean/Six-Sigma

J.M.W. van den OUWELAND¹, J.B. de KOK²

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen, Klinisch Chemisch Laboratorium², Deventer Ziekenhuis, Deventer

Inleiding: Lean/six-sigma is een door Toyota ontwikkelde verbetermethodiek die zich richt op het reduceren van verspilling, ter maximalisering van activiteiten met toegevoegde waarde en verminderen van fouten. Het doel van het project was het stroomlijnen van de procesgang van klinische monsters op het laboratorium.

Methode: Allereerst werd een overzicht gemaakt van de procesgang middels een flow-chart onder vermelding van alle overdrachtsmomenten. Het monsteraanbod per tijdseenheid werd geregistreerd om piektijden te identificeren. Per bepaling (stolling, chemie, hemocytometrie) werd de totale doorlooptijd van binnenkomst van monsters (10-20) op het laboratorium tot aan de rapportage in het ZIS gemeten, alsmede de (wacht)tijd per procesonderdeel.

Resultaat: De workflow-analyse bracht een aantal kritische

stappen aan het licht die een nadelig effect hadden op de totale doorlooptijd, of die veel variatie in het proces veroorzaakten. Op grond hiervan zijn enkele verbetervoorstellingen doorgevoerd: scheiding monsters kliniek van polikliniek, eenduidig centrifugeprotocol voor stolling en chemie, tijdig bijvullen van reagens, klinische validatie binnen 2 uur na rapportage in het ZIS (conform de validatieprocedure bij spoedaanvragen). De gemiddelde doorlooptijden waren bij start van het project 52, 65 en 93 min voor hemocytometrie, stolling en chemie, respectievelijk. Na doorvoeren van de verbeteringen zijn ze met respectievelijk 38, 20, en 54% gereduceerd.

Conclusie: Lean/six-sigma is een waardevol instrument om procesgang op het laboratorium te optimaliseren, waarbij zowel een totale reductie van doorlooptijden alsook een reductie in de spreiding is gerealiseerd.

49. 24-uursurines, kan het ook anders?

L.S.M. BOESTEN, J. van PELT

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden

Inleiding: Voor de meeste analyses in urine wordt 24-uurs urine nog steeds als meest betrouwbaar beschouwd, maar hieraan kleven ook nadelen. Naast het feit dat het compleet verzamelen een moeilijke taak is, is het transporteren van en het werken met de bokalen bezwaarlijk voor patiënten, medewerkers van de transportdienst en het laboratorium. Jaarlijks worden binnen het LUMC 27.500 24-uurs urines geanalyseerd. Patiënten van de afdeling Nefrologie zijn al geruime tijd gewend aan het zelf bemonsteren van 24-uurs urines en het laboratorium ontvangt enkel een representatief monster. Wij hebben hiermee goede ervaringen, echter wanneer een patiënt twee bokalen per 24 uur verzamelt, mengt de patiënt een willekeurige hoeveelheid uit beide bokalen. De vraag is of het op deze wijze bemonsteren betrouwbare resultaten geeft.

Methode: Ter evaluatie van deze methode werd van alle in twee bokalen aangeleverde 24-uurs urines een monster uit iedere bokaal genomen en dit in de juiste verhouding gemengd en één

door willekeurige hoeveelheden uit beide bokalen te mengen. In alle monsters werd albumine, calcium, chloor, creatinine, fosfaat, kalium, magnesium, natrium, totaal eiwit, ureum en urinezuur bepaald.

Resultaat: In totaal werden 76 monsterparen verzameld en geanalyseerd. Methode vergelijking volgens Passing-Bablok liet voor alle parameters geen significant verschil zien tussen mengen via de willekeurige mengmethode en mengen volgens de reguliere methode.

Conclusie: Willekeurige bemonstering van twee bokalen 24-uurs urine geeft dezelfde resultaten als de reguliere methode. Deze resultaten ondersteunen een nieuw traject waarbij de patiënten zelf het totale volume noteren, een monster nemen van hun 24-uurs urine en dit monster afleveren bij het ziekenhuis. Dit is patiëntvriendelijker en het reduceert de fysieke belasting voor medewerkers van de transportdienst en het laboratorium.

Point-of-care testing

50. Kwaliteit van de glucosemeting

N. de JONGE, J. SLINGER, G. de KORT, P.F.H. FRANCK

Klinisch Chemisch en Hematologische Laboratorium, HagaZiekenhuis, Den Haag

Inleiding: In januari 2007 heeft de Inspectie voor de Gezondheidszorg naar aanleiding van meldingen over foutieve resultaten van glucosebepalingen die werden uitgevoerd met Point-of-Care meters aandacht gevraagd voor de kwaliteit van de glucosebepaling in ziekenhuishuizen. Genoemde foutieve resultaten betroffen ernstige discrepancies, die bijzonder ernstige gevolgen kunnen hebben voor de patiënt. Naar aanleiding van deze incidenten rijst ten eerste de vraag hoe goed een bepaling moet zijn en ten tweede de vraag hoe de geschiktheid van een bepaling vervolgens kan worden vastgesteld. Deze vragen worden aan de hand van het voorbeeld van de glucosebepaling nader uitgewerkt.

Methode: Het toepassingsgebied van de glucosebepaling is breed en omvat vrijwel het gehele meetbereik van deze bepaling. Per toepassing (diagnostiek, instellen en controle therapie) kunnen verschillende acceptatiecriteria worden geformuleerd. Deze acceptatiecriteria worden uitgedrukt als "total allowable

error" (Tea), welke is opgebouwd uit de testkarakteristieken bias (systematische afwijking van de gehanteerde methode ten opzichte van de referentiemethode), analytische variatie en pre-analytische variatie.

Resultaat: Voor de glucosebepaling wordt een "total allowable error" tussen de 5 en 15% als acceptabel gezien. De mate waarin een methode voldoet aan het acceptatiecriterium kan worden uitgedrukt als "process capability" (Cpk). Een Cpk<1 is niet aanvaardbaar, Cpk tussen 1 en 2 redelijk en Cpk>2 goed. Voor elke combinatie van Tea en testkarakteristieken kan de Cpk worden berekend.

Conclusie: Uit deze berekeningen blijkt dat de voor de behandeling van diabetes patiënten zowel patiëntenmeters, POCT-apparatuur als laboratoriumapparatuur geschikt zijn. In het lage, respectievelijk hoge meetgebied zijn patiëntenmeters en POCT-apparatuur minder betrouwbaar.

51. Pre-analytisch handelen Onontbeerlijk Cruciaal bij glucoseTesten

R.C.R.M. VOSSEN, I.K. FRINGS-MIOCH, B.A.P.M. BOONEN, M.E.P. SLOBBE-van DRUNEN, B.A.C. van ACKER, J. ten KATE

Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium, Maaslandziekenhuis, Sittard

Inleiding: Op vele verpleegafdelingen in het Maaslandziekenhuis werden glucosebepalingen uitgevoerd door geïnstrueerde verpleegkundigen met losse POCT glucosemeters. Bij de implementatie van aan het LIS gekoppelde POCT glucosemeters (Accuchek-Inform, Roche) op 2 afdelingen werden onverwacht onacceptabele discrepancies van glucoseuitslagen tussen POCT en laboratorium methode geconstateerd. Dit is gemeld aan de Inspectie Gezondheidszorg (IGZ) en gaf aanleiding om de POCT glucosemetingen op alle verpleegafdelingen te stoppen, hetgeen grote logistieke en personele problemen opleverde.

Methode: Na eigen onderzoek en overleg met collega laboratoria werd een belangrijke rol toegedicht aan niet-protocolair pre-analytisch handelen van de verpleging. In nauwe samenwerking met Roche werd daarop besloten de gekoppelde POCT meters versneld te implementeren op alle verpleegafdelingen (POCT monitoring), met een verplicht scholingsprogramma (certificaat) en jaarlijkse BIG toetsing (via e-learning module).

Resultaat: Analyse van het probleem bracht ziekenhuisbreed 34 glucosediscrepancies aan het licht (> 25% verschil), gemid-

deld 11 per maand, met een gemiddeld glucose verschil POCT versus laboratorium methode van 6,6 mmol/l (range 1,8 – 21,7). Bijvoorbeeld: POCTglucose 14,2 versus labglucose 1,2 mmol/l. Scholing van 600 verpleegkundigen en implementatie van 25 Accuchek-Informs resulteerde in een sterke verbetering: 4 discrepantiemeldingen in 6 maanden.

Conclusie: Landelijk leidde de IGZ-melding tot belangrijke aanbevelingen rond POCT glucose management in ziekenhuizen. Onze eigen ervaringen tonen dat: 1) POCT glucose op verpleegafdelingen niet meer terug te trekken is zonder grote logistieke en personele consequenties, 2) continue POCT schooling ondergewaardeerd wordt, maar zeer cruciaal blijkt, 3) een goed patiëntveiligheid management systeem leidt tot structurele zorgverbetering. Deze casus illustreert verder de impact van niet-protocolair pre-analytisch handelen op de (on)brouwbaarheid van POCT glucose uitslagen en benadrukt de belangrijke rol die is weggelegd voor laboratorium professionals bij POCT monitoring.

52. Validatie en klinische evaluatie van POCT-glucosemetingen bij neonaten

J.H. HOOIJBERG¹, G.J. BLOK², I. KNOBBE², P.C.M. BARTELS¹, F.P.W. TEGELAERS¹

Laboratorium voor KCH¹, Kindergeneeskunde/Neonatologie², Medisch Centrum Alkmaar, Alkmaar

Inleiding: POCT glucose metingen dragen bij aan adequate diagnostiek en behandeling van hypoglycemie. Over diagnose en behandeling van neonatale hypoglycemie bestaat controverse (1-2). Veelal wordt hierbij een opinion-based klinische beslisgrens gehanteerd van 2,6 mmol/l glucose in plasma. Een juiste interpretatie van deze grens stelt hoge eisen aan de kwaliteit van de meetmethode. Omdat het meetresultaat bepalend is voor de behandeling, werd hier een technische validatie van POCT-apparatuur retrospectief geëvalueerd met de behandelaar. Klinische consequenties van implementatie werden hierbij geanalyseerd.

Methode: In bloedmonsters (n=48) uit hielprikken bij neonaten (tot 7 dagen oud) werd de plasma glucoseconcentratie bepaald

m.b.v. POCT (AccuChek Inform, Roche Diagnostics) en een conventionele laboratoriummethode (Beckman Coulter LX20-PRO, glucose oxidasemethode). Een methodevergelijking werd uitgevoerd m.b.v. Passing & Bablok en Bias analyse volgens CLSI EP09 richtlijnen.

Resultaat: Passing & Bablok analyse resulteerde in $y = 0,97x + 0,38$ (95% CI voor de helling: 0,86-1,14). De POCT-methode had een positieve bias van 0,35 mmol/l (95% CI: 0,23-0,48 mmol/l) ten opzichte van de laboratoriummethode. Bij 10% van de metingen lag de POCT-waarde boven de klinische beslisgrens van 2,6 mmol/l, terwijl het bijbehorende laboratoriumresultaat onder deze grens lag. Omdat dit consequenties kan hebben voor behandeling, werd de validatie geëvalueerd

met de behandelaar. Vraagstelling hierbij was of de beslisgrens aangepast diende te worden bij toepassing van POCT. Besloten werd de POCT-methode vrij te geven onder de volgende voorwaarden: 1) Klinische beslisgrens POCT-glucose houden op 2,6 mmol/l. 2) POCT-glucose < 3,0 mmol/l bevestigen met een cito laboratoriummeting.

Conclusie: De retrospectieve evaluatie met de behandelaar had een belangrijke toegevoegde waarde in de vrijgifte van POCT glucosemetingen bij neonaten.

Literatuur:

1. Lucas et al. Br Med J 1988; 297: 1304.
2. Cornblath et al. Pediatrics 2000; 105: 1141

Kwaliteit, referentiewaarden

53. Controle van de harmonisatie van enzymbepalingen in de regio Limburg ‘5 years after’

E.C.H.J. MICHIELSEN¹, O. BEKERS², H.A. KLEINVELD³, B.A.C. van ACKER⁴, A.J.M. NAUS^{5,6},
J.C.J.M. SWAANENBURG¹

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹, VieCuri, Medisch Centrum voor Noord Limburg, Venlo en Venray, Klinisch Chemisch Laboratorium², Academisch Ziekenhuis Maastricht, Maastricht, Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium³, Atrium Medisch Centrum, Heerlen en Brunssum, Klinisch Chemisch Laboratorium⁴, Maaslandziekenhuis, Sittard, Centraal Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium⁵, Laurentius Ziekenhuis, Roermond, Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium⁶, Sint Jans Gasthuis, Weert

Inleiding: In 2002 is in de regio Limburg gestart met de harmonisatie van de enzymbepalingen voor ASAT, ALAT, AF, GGT, LD en CK door gebruik te maken van de “Kalibratie 2000” standaard van de SKML. Hiermee zijn voor elke bepaling factoren ingesteld zodat dezelfde uitslagen werden verkregen, onafhankelijk van analyser of bepalingsmethode. Tegelijkertijd werden in alle ziekenhuizen binnen de gehele regio dezelfde referentiewaarden gehanteerd. In 2003 werd de harmonisatie voor het eerst gecontroleerd. Daarna zijn enkele laboratoria overgegaan op andere analysers en daarom werd in 2007 wederom een controlleronde georganiseerd.

Methode: In het laboratorium van VieCuri werden tien representatieve serum pools samengesteld uit routine patiëntenmonsters. Deze pools werden ingevroren bij -20°C en verzonden naar de deelnemende laboratoria. Hier werden ze overnacht bij 4°C bewaard en de volgende ochtend met de routinebepalingen in duplo geanalyseerd op alle aanwezige analysers.

Resultaat: Van de enzymbepalingen correleerden CK en AF het best met de consensuswaarde van de serum pools met een maximale afwijking van respectievelijk 3% en 5%. De ASAT en ALAT bepalingen hadden de grootste afwijking van het consensusgemiddelde (15% en 13%) bij een activiteit van respectievelijk 26 U/l en 11 U/l. Boven de referentiewaarden bleef de maximale afwijking van het consensusgemiddelde onder de 8% en 10%. Voor de overige enzymen was de onderlinge overeenstemming van de verschillende analysers zeer acceptabel (afwijking < 10%).

Conclusie: De maximale afwijking van het consensusgemiddelde valt voor alle enzymbepalingen ruim binnen de analytisch en klinisch relevante grenzen. Op basis van de resultaten van deze rondzendung bleken de resultaten tussen de diverse ziekenhuizen nog steeds vergelijkbaar. De harmonisatie van de enzymbepalingen in de regio Limburg voldoet na 5 jaar nog steeds aan de vooraf gestelde criteria.

54. Start van een kwaliteitsprogramma met externe rondzendung voor interpretatie van laboratoriumuitslagen

W.P. OOSTERHUIS¹, M. van der HORST², J.E. KOOTSTRA-ROS³, D. van LOON⁴, H.J.L.M. ULENKATE⁵, R.W. WULKAN⁶

Atrium Medisch Centrum¹, Heerlen, Scheper Ziekenhuis², Emmen, Ziekenhuisgroep Twente³, Almelo, Sint Antonius Ziekenhuis⁴, Nieuwegein, ZorgSaam Ziekenhuis⁵, Terneuzen, Medisch Centrum Rijnmond-Zuid⁶, Rotterdam

Inleiding: Interpretatie van uitslagen en consulteren wordt wel gezien als de core-business van de klinisch chemicus/laboratoriumarts. De werkgroep Klinische Chemometrie van de wetenschapscommissie werkt aan het ontwikkelen van systemen voor autorisatie en automatische detectie van afwijkende combinaties van uitslagen. Hiermee heeft de laboratoriumspecialist een hulpmiddel bij interpretatie van uitslagen en het geven van gericht advies aan de aanvrager. Om een beeld te vormen van de wijze van interpreteren van uitslagen door verschillende laboratoria is in 2007 op proef een rondzendung verzorgd.

Methode: De rondzendung bestond uit testuitslagen van geanonimiseerde patiënten, voorzien van enige klinische informatie. De deelnemers (n=26) werden verzocht aan te geven 1) de interpretatie van de uitslagen 2) een eventueel advies voor aanvullende testen om de diagnostiek te completeren. De verwerking van resultaten werd uitgevoerd door de conclusies en opmerkingen van de deelnemers te rubriceren (1). De uitslagen werden geanonimiseerd aan de deelnemers verzonden.

Resultaat: Er zijn in 2007 vier casussen verzonden met een gemiddelde respons van 20% (aantal respondenten, aantal juiste interpretatie vermeld): 1. patiënt met steato-hepatitis bij metabool syndroom (n=4, 0); 2. syndroom van Gilbert (n=6, 6); 3. anemie bij mogelijk ijzergebrek en gestoorde nierfunctie (n=6, 4); 4. thalassemie en ijzerstapeling (n=7, 4). De juiste waarschijnlijkheidendiagnose werd gemiddeld in 61% (14/23) vermeld. Er was grote variatie in de interpretatie en gegeven adviezen.

Conclusie: De eerste resultaten van deze rondzendung laten een grote variabiliteit zien in de interpretatie van uitslagen. Activiteiten gericht op systematische verbetering, zoals deze externe rondzendung van testuitslagen, lijken hierbij aangewezen. In 2008 zal de werkgroep deze rondzendung in groter verband voortzetten.

Literatuur: GS Challand et al. Ann Clin Biochem 2007; 44: 101

55. 6-Sigma en validatie van apparatuur

D. van LOON, H. RUVEN, H. van SCHAIK

Klinisch Chemisch Laboratorium, St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein

Inleiding: Het valideren van grote chemiesystemen blijkt vaak een langdurige en kostbare exercitie waarbij gebruik gemaakt wordt van evaluatieprotocollen van het CLSI. Volgens de norm worden de criteria waaraan het analysesysteem moet voldoen, de wijze waarop de parameters getest worden en de frequentie van herhalen, door de gebruiker bepaald (eventueel in overleg met de firma). Onderscheid wordt gemaakt tussen installatiekwalificatie, operationele kwalificatie en uitvoeringskwalificatie. Per methode worden voor iedere parameter (juistheid, precisie, etc) eigen criteria vastgesteld. Uitgaande van gerenommeerde leveranciers en geaccepteerde analysemethoden kan het vaststellen van de criteria gebaseerd zijn op bekende literatuurgegevens zoals biologische variaties, TEa en door de leverancier beschreven analytische variatiecoëfficiënten waardoor het toepassen van de CLSI protocollen doelmatiger wordt.

Methode: Per parameter is, uitgaande van de TEa, en de VCa, de sigma-score berekend, uitgaande van een bias gelijk aan 0.

Slechts de parameters met een sigma-score < 3 zijn geëvalueerd met een EP5 en eventueel een EP9. Indeling van de parameters in sigma-klassen levert de bewakingsregels voor de interne QC en de te behalen kwaliteitsdoelen.

Resultaat: Slechts 8 van de 32 parameters scoorde op basis van de literatuurgegevens een te verwachten sigma-score <3. De analytische prestaties (VCwithin en VCtotaal) van deze parameters zijn vervolgens vastgesteld volgens de evaluatieprotocollen EP5 en EP9. Bij hogere sigma-scores zijn de parameters alleen vergeleken met behulp van metingen (in 5-voud) in 4 poolsera.

Conclusie: Twee grote analysesystemen (COBAS 6000) zijn vrijgegeven voor gebruik na slechts 2,5 maanden waarbij 70% minder testen zijn uitgevoerd. Het vaststellen van de controle regels en de frequentie van herhalen per parameter betekent minder verbruik van controlematerialen door minder onterecht afgewezen controle resultaten.

56. Geen goede commuteerbaarheid van de ASAT-bepaling in SKML-rondzendingen

N.C.J. de WIT, N.P. van 't SANT

Laboratorium voor Klinische Chemie en Hematologie, Jeroen Bosch Ziekenhuis, 's-Hertogenbosch

Inleiding: Deelnemen aan kwaliteitsrondzending is van groot belang voor het vaststellen van de juistheid van laboratorium-bepalingen. In ons laboratorium hebben we getracht de oorzaak van een constante afwijking in ASAT SKML-uitslagen te achterhalen voor de Abbott AeroSet. De SKML enquête toont een negatieve afwijking van de ASAT-waarde bij lage concentraties. De regressielijn is constant in alle enquêtes en is $y = -13 + 1,057 x$.

Methode: De uitslagen van de SKML-enquêtes van 2005, 2006 en het eerste kwartaal van 2007 zijn geanalyseerd met Analyse It voor zowel de Abbott AeroSet als de Roche Integra. Daarnaast is de ASAT in 35 patiëntenmonsters gemeten op beide apparaten om verschillen in apparatuur uit te sluiten. Vervolgens is voor alle chemie-analysers in Nederland die deelnemen aan de SKML-enquête het ASAT-intercept berekend.

Resultaat: Uit onze resultaten van de SKML-enquêtes blijkt een

duidelijk verschil tussen de Integra en de AeroSet. In tegenstelling tot de AeroSet vertoont de Integra geen negatief intercept. Het meten van de 35 patiëntenmonsters bevestigde dat er geen significante verschillen zijn tussen de apparaten. Een probleem met de commuteerbaarheid van de SKML-monsters voor de ASAT-bepaling is een mogelijke verklaring voor de verschillen in de SKML-enquête uitslagen. Uit verdere analyse van de gemiddelde intercept voor alle analysers in Nederland blijkt dat de gemiddelde intercept voor de ASAT-regressielijn voor zowel de Abbott AeroSet (-5,7) als de Abbott Architect (-8,7) verschilt van de overige apparatuur (rond de 0).

Conclusie: Uit onze analyse blijkt dat de SKML-monsters geen goede commuteerbaarheid hebben met betrekking tot de ASAT. De SKML heeft voor 2008 wijzigingen aangebracht in de monsters om dit probleem te ondervangen. De uitkomsten hiervan worden momenteel geanalyseerd.

57. Self-tests make you ill: an illustration with results from the population-based Nijmegen Biomedical Study

D.W. SWINKELS¹, F. de VEGT², M. den HEIJER³, S.M. KLAVER¹, B. FRANKE⁴, L.A.L.M. KIEMENEY², A.L.M. VERBEEK²

Department of Clinical Chemistry¹, Department of Epidemiology and Biostatistics², Department of Endocrinology³, Department of Human Genetics⁴, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen

Introduction: There is an increasing number of self-tests available. The chance of having at least one deviant level increases with multiple tests at the same time. We illustrated how many subjects have blood values beyond the reference levels when fifteen serum parameter tests are performed simultaneously in a general population.

Methods: The Nijmegen Biomedical Study is a large age and sex stratified random sample of 21,756 adult inhabitants from Nijmegen. They received a postal questionnaire on life style and medical history, which was filled out by 9,350 subjects. 6,330 Subjects also donated non-fasting serum and whole blood samples. Serum levels for fifteen parameters in five categories (lipid metabolism, kidney function, iron metabolism, thyroid function and inflammation) were measured. For each parameter we calculated the proportion of subjects with serum levels beyond the laboratory reference values.

Results: In total, 5,860 subjects (93%) had at least one abnormal serum parameter. 1,742 Subjects (28%) had four or more deviating levels. Most abnormal serum levels were observed for triglycerides (45%), total cholesterol (38%), HDL-cholesterol (33%), ureum (26%) and transferrin saturation (22%). In a healthy subgroup of 2,855 subjects (without self-reported cardiovascular-, kidney-, thyroid- or iron disorders) these percentages were still high with 42%, 36%, 32%, 18% and 23%, respectively, and 91% of them had at least one abnormal serum parameter.

Conclusion: In this study we showed that in case of 15 simultaneous laboratory tests, almost all subjects (93%) in a random sample of the general population have at least one serum parameter level outside the reference values. With the growing market for self-tests, subjects should be informed clearly about their pros and cons.

Automatisering, dataverwerking

58. www.HuisartsenQC.nl; een website t.b.v. de uitvoering van de externe kwaliteitscontrole van POC-meters in de 1e-lijnsgezondheidszorg

M. van der HORST, H. SOPPE, J.M. WIJNHOLDS, J.G.J. POUWELS
Afdeling Klinisch Chemisch Laboratorium, Scheper Ziekenhuis, Emmen

Inleiding: Voor zover er sprake is van externe kwaliteitscontrole van POC apparatuur in de 1e lijns gezondheidszorg wordt deze vaak lokaal geïnitieerd en georganiseerd door de klinisch-chemische laboratoria, waarbij veel administratieve handelingen moeten worden verricht.

Methode: Het KCL van het Scheper Ziekenhuis te Emmen heeft in samenwerking met de laboratoria van de ziekenhuizen in Meppel, Hardenberg en Hoogeveen en studenten van de Hogeschool Drenthe een web-applicatie opgezet voor de externe kwaliteitscontrole van bedsiteometers van met name huisartsen. Het betreft hier rondzendingen voor de glucose- en Hb-meting. Voor het ontwikkelen van de applicatie is gebruik gemaakt van: J2EE, EJB3.0, JFreeChart. De applicatie maakt gebruik van: JBoss, Oracle, JAAS, MD5 en BASE64, SSL.

Resultaat: Veel van de noodzakelijke arbeidsintensieve administratieve handelingen vinden plaats op de website of via de daaraan gekoppelde e-mail. Op dit moment nemen vier zieken-

huizen deel aan het project (123 praktijken). De communicatie met de deelnemer verloopt via mail. Een rondzing bestaat uit 4 fases: 1) aankondigingsmail deelnemers, voorbereiding monsters en verzending; 2) metingen uitvoeren en uitslagen in systeem invoeren door deelnemers – herinneringsmail aan deelnemers die nog geen resultaten hebben ingevoerd; 3) statistische bewerking door beheerder(s); 4) mail naar deelnemers dat resultaten beschikbaar zijn. Youdenplots, box-whisker-plots, beschrijvende statistiek en adviezen zijn opvraagbaar op de website, ook van voorgaande rondzendingen. Het systeem is eenvoudig uit te breiden met meerdere analyses (numeriek) en deelnemers/ziekenhuizen.

Conclusie: De ontwikkelde website maakt de organisatie en de afhandeling van een rondzing t.b.v. de 1e lijns gezondheidszorg beduidend minder arbeidsintensief en zal daardoor leiden tot een grotere continuïteit.

Overigen

59. Reflective testing – Positive effects on patient management

J.F.W. KEUREN, H.A. KLEINVELD, W.P. OOSTERHUIS
Afdeling Klinische Chemie, Atrium Medisch Centrum, Heerlen

Introduction: Reflective testing is the process by which laboratory specialists use their judgement to add further tests and comments to help the physician to establish a diagnosis. Reflective testing is not commonly performed in Dutch laboratories. We started reflective testing in June 2006. In a previous survey our general practitioners (GP) favoured the concept of reflective testing. This study investigates whether this procedure influences the diagnostic and treatment process.

Methods: Two hundred successive historical patient records with added tests and comments were sent to the GP concerned (n=89). A questionnaire was added on which the GP could indicate how the reflective testing procedure had influenced patient management.

Results: A total of 113 (57%) responses were received from 58 GPs (65%). There was a positive influence on patient manage-

ment in 51% of the cases. Positive influence was subdivided into faster diagnosis/treatment (44%), adaptation of medication (24%), earlier referral to specialist (15%), additional diagnostics (11%), prevention of diagnostics (7%) and other effects (20%). In 48% of the returned cases there had been no influence on patient management, although the additional information was found useful in almost all of these cases (98%). With one patient (1%), the GP felt that our service had a negative influence on his patient management.

Conclusion: The outcome of this survey again underscores that additional support of adding on tests and comments to lab results by laboratory staff is welcomed by GPs. Moreover, according to GPs reflective testing leads in the majority of cases to improvement of the diagnostic and treatment process.

Categorie 3: Klinisch

Hart- en vaatziekten, atheroscleroze

60. Myocardial oxidative stress, and cell injury comparing three different techniques for CABG; a pilot study

W.B.M. GERRITSEN¹, W.J.P. van BOVEN², A.H.G. DRIESSEN², H.P.A. van DONGEN³, D. van LOON¹, H.J.T. RUVEN¹
Departments of Clinical Chemistry¹, Cardiothoracic Surgery², and Anaesthesiology³, St. Antonius Hospital, Nieuwegein

Inleiding: Oxidative stress as a result of reperfusion injury is a known causative factor of contractile dysfunction of the heart. During and after coronary bypass surgery, the heart contributes substantially to the generation of reactive oxygen species. In a pilot study the myocardial performance of the newly introduced mini circuit CABG (MCABG) was prospectively compared to off-pump CABG (OPCAB) and conventional CABG (CCABG), our gold standard.

Methode: Thirty patients scheduled for CABG with the intention to treat three-vessel disease were randomly assigned for CCABG, MCABG or OPCAB. Perioperatively, malondialde-

hyde (MDA) and the allantoin/uric acid ratio (A/U ratio) as markers of respectively oxidative stress and antioxidant activity were measured simultaneously in the ascending aorta (Aa) and the coronary sinus (Cs). Additionally peripheral (Aa) blood levels HFABP, Troponin T, CPK and CKMB as markers of myocardial injury were obtained.

Resultaat: MDA levels were significantly higher in the Cs than in the Aa samples for the CCABG and the OPCAB group. Besides this, the CCABG group had significantly higher MDA levels in the Cs as well as in the Aa compared to the MCABG group respectively to the OPCAB group. At all timepoints the A/U ra-

tio in the CCABG group remained significantly higher in both sample types compared to the MCABG and the OPCAB group. Postoperative myocardial injury was significantly lower in the MCABG group than in the CCABG and in the OPCAB group.

Conclusie: Oxidative stress parameters in the coronary sinus

were consistently higher than in the peripheral blood, indicating the heart as a large contributor to oxidative stress. The best-preserved myocardium was observed in the MCABG study group indicated by the lowest heart enzyme measurements and oxidative stress parameters.

61. Limited value of N-terminal proBNP testing in the initial management of patients with acute dyspnea

C. COBBAERT¹, N. van der BURG-de GRAAUW², C. MIDDELHOFF³, T. BANTJE⁴, C. van GULDENER²
Departments of Clinical Chemistry¹, Internal Medicine², Cardiology³, Pulmonology⁴, Amphia Hospital, Breda

Introduction: Brain natriuretic peptide and its inactive counterpart NT-pro-BNP can help to identify or rule out heart failure in patients presenting with acute dyspnea. It is not well known whether measurement of these peptides can be omitted in certain patient groups.

Methods: We conducted a prospective observational study of 221 patients presenting with acute dyspnea at the emergency department. The attending physicians estimated the probability of heart failure by clinical judgement. NT-proBNP was measured, but not reported. An independent panel made a final diagnosis of all available data including NT-proBNP level and judged whether and how NT-proBNP would have altered patient management. Statistical analysis was done using SPSS. Independent predictors of additive value of NT-proBNP were selected using backward stepwise logistic regression.

Results: NT-proBNP levels were highest in patients with heart failure, alone or in combination with pulmonary failure. Additive value of NT-proBNP was present in 40 of 221 (18%) of the patients, and it mostly indicated that a more intense treatment for heart failure would have been needed. Clinical judgement was an independent predictor of additive value of NT-proBNP with a maximum at a clinical probability of heart failure of 36%. Other independent predictors of additive value of NT-proBNP were COPD, hypertension, abnormal ECG, age and plasma glucose levels.

Conclusion: NT-proBNP measurement has limited value in most patients presenting with acute dyspnea and can be reserved for those in whom clinical probability of heart failure is >50%.

62. Circulating oxidized LDL: determinants and association with brachial flow mediated dilation

L.P. van der ZWAN¹, T. TEERLINK¹, J.M. DEKKER², R.M.A. HENRY³, C. JAKOBS¹, R.J. HEINE⁴,
C.D.A. STEHOUWER³, P.G. SCHEFFER¹

Metabolic Unit, Department of Clinical Chemistry¹, VU University Medical Center, Amsterdam, Department of Internal Medicine, EMGO Institute², Academic Hospital Maastricht³, Department of Endocrinology/Diabetes Center, VU University Medical Center⁴, Amsterdam

Introduction: Circulating oxidized LDL (oxLDL) levels are strongly correlated to LDL-cholesterol and apolipoprotein-B100 (apoB100), making it difficult to disentangle their independent contributions to cardiovascular risk. We have explored the determinants of oxLDL and the relation between oxLDL and flow-mediated dilation (FMD) of the brachial artery to investigate whether the oxLDL/LDL-cholesterol and oxLDL/apoB100 ratios are more informative than the separate variables.

Methods: FMD of the brachial artery and plasma concentrations of oxLDL, LDL-cholesterol, and apoB100 were measured in 624 elderly men and women, participating in the Hoorn Study, a population-based cohort study.

Results: OxLDL was strongly correlated with apoB100 ($r=0.82$, $P<0.001$) and LDL-cholesterol ($r=0.67$, $P<0.001$). Other major independent determinants of oxLDL were sex, HDL cho-

lesterol, and LDL particle size. Of these variables, only LDL particle size was an independent determinant of the oxLDL/LDL-cholesterol and oxLDL/apoB100 ratios. LDL-cholesterol and apoB100 concentrations were not significantly associated with FMD. After adjustment for age, sex, glucose tolerance status, and Framingham risk score, the oxLDL/apoB100 ratio was negatively related to FMD ($P=0.017$). This association was weaker for the oxLDL/LDL-cholesterol ratio ($P=0.062$) and absent for oxLDL level ($P=0.27$).

Conclusion: Circulating oxLDL levels are strongly associated with LDL particle number. Moreover, the oxLDL/apoB100 ratio, and to a lesser extent the oxLDL/LDL-cholesterol ratio, are related to a functional measure of atherosclerosis and may therefore be the preferred way to express the amount of oxidized LDL.

63. Effects of Diabetes Mellitus on platelet reactivity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel

E.H.A.M ELSENBERG^{1,2}, J.W. van WERKUM¹, Y. TOPCU¹, S. POSTMA^{1,2}, J.C. KELDER¹, J.M. ten BERG¹,
C.M. HACKENG²

Department of Cardiology¹ and Department of Clinical Chemistry², St. Antonius Hospital, Nieuwegein

Introduction: Conflicting reports have indicated that diabetic patients exhibit a higher platelet reactivity after aspirin and clopidogrel therapy compared to non-diabetics. The present study is the first in which platelet reactivity in diabetic and non-diabetics is assessed with two different methods to measure platelet function: "gold standard" light-transmission aggregometry (LTA) and the point-of-care VerifyNow® P2Y12 assay.

Methods: Blood was drawn for platelet function testing from 443 consecutive patients (87 diabetics and 356 non-diabetics) who were on dual antiplatelet therapy. Platelet function para-

meters of LTA included ADP-induced maximal and late platelet aggregation. For the VerifyNow® these were ADP+PGE1-induced P2Y12-reaction units (PRU) and thrombin receptor-activating peptide induced platelet reactivity (BASE).

Results: With LTA, ADP-induced "peak" aggregation was significantly higher in diabetics compared to non-diabetics (48 ± 13 versus 44 ± 13 for 5 mmol/L ADP, $p=0.0084$ and 65 ± 12 versus 60 ± 13 for 20 mmol/L ADP, $p=0.0008$, respectively). Similarly, there was a significant difference in ADP-induced "late" aggregation between diabetics and non-diabetics (24 ± 17 ver-

sus 19±16 for 5 mmol/L ADP, p=0.0071 and 52±21 versus 41±23 for 20 mmol/L ADP, p<0.001, respectively). With the VerifyNow®P2Y12 assay, the mean±SD of the P2Y12 (PRU) was significantly higher in diabetics as compared to non-diabetics (217±63 versus 189±70, p=0.0009). The BASE value was also significantly higher in diabetics as compared to non-diabetics (296±47 versus 271±48, p<0.0001).

64. Cangrelor enhances P2Y12 inhibition and decreases interindividual variability in the magnitude of residual platelet reactivity

H.J. BOUMAN^{1,2}, J.W. van WERKUM¹, S. POSTMA^{1,2}, E.H.A.M. ELSENBERG^{1,2}, J.M. ten BERG¹, C.M. HACKENG²
Department of Cardiology¹ and Department of Clinical Chemistry², St. Antonius Hospital, Nieuwegein

Introduction: Inadequate levels of platelet inhibition during percutaneous coronary intervention is associated with an impaired clinical outcome. Cangrelor (The Medicines Company), an intravenous reversible P2Y12-inhibitor is currently being tested in phase-3 clinical trials. The aim of the present study was to compare the magnitude of residual platelet reactivity in clopidogrel pre-treated patients before and after the in vitro addition of a subtherapeutic dosage of cangrelor.

Methods: Blood samples were drawn from clopidogrel and aspirin pre-treated patients undergoing elective PCI (n=39). Platelet function analysis with "classical" light transmittance aggregometry (both "peak" aggregation and residual aggregation [at 6 min]) was performed before and after the in vitro addition of a subtherapeutic concentration of cangrelor (0.25 µM) to platelet rich plasma (PRP). After an incubation period of 5 minutes, platelet aggregation was induced by 5 and 20 µM ADP.

Conclusion: Our results indicate an overall higher post-treatment platelet reactivity in diabetics versus non-diabetics. This is due to an impaired clopidogrel response as well as a higher pre-existent platelet reactivity. More aggressive antithrombotic therapy may therefore be beneficial and warrants further investigation.

Results: The in vitro addition of a subtherapeutic concentration cangrelor to the blood from clopidogrel pre-treated patients caused an additional reduction of ADP-induced platelet aggregation. For ADP concentrations of 5 and 20 µM, peak aggregation showed a decrease of 70 and 85 % respectively (p<0.0001 for both concentrations of ADP), while late aggregation was almost completely inhibited (p 0.003 and 0.0002). Furthermore, interindividual variation in residual ADP-induced platelet reactivity in clopidogrel pre-treated patients was greatly reduced by the addition of cangrelor.

Conclusion: We demonstrate that the in vitro addition of a subtherapeutic dosage of cangrelor to PRP of clopidogrel pre-treated patients causes an additional reduction of ADP induced residual platelet reactivity. Moreover, cangrelor was able to diminish the interindividual variation seen with clopidogrel inhibited platelet reactivity.

65. Assessing different determinants of platelet function as potential risk factors for coronary stent thrombosis: a case-control study

S. POSTMA^{1,2}, J.W. van WERKUM¹, E. PARLAK^{1,2}, H.J. BOUMAN^{1,2}, E.H.A.M. ELSENBERG^{1,2}, J.M. ten BERG¹, C.M. HACKENG²
Department of Cardiology¹, Department of Clinical Chemistry², St Antonius Hospital, Nieuwegein

Inleiding: Stent thrombosis (ST) is a serious complication of percutaneous coronary intervention (PCI) with stenting. In the present study we evaluated the contribution of various determinants of platelet function to the occurrence of ST in a large group of patients

Methode: Various determinants of platelet function were measured before and 6 h after a 600 mg loading dose of clopidogrel in clopidogrel naive (n = 33) and clopidogrel treated (n= 27) patients with a history of a ST. A group of clopidogrel naive (n=20) and clopidogrel treated (n=20) patients undergoing elective PCI served as a control group. All patients were also on aspirin therapy. Aspirin resistance and both pre- and post treatment reactivity were measured with VerifyNow® assays and light transmittance aggregometry (LTA). Responsiveness to clopidogrel was defined as the absolute change in platelet reactivity index (PRI) as measured with the flowcytometric VASP

assay and the absolute change in aggregation as measured with the VerifyNow® P2Y12 assay and LTA.

Resultaat: Both pre-treatment- and post-treatment reactivity in clopidogrel naive and clopidogrel treated patients were not significant different between the cases and controls (p>0.20 for all comparisons). Responsiveness to clopidogrel therapy was not significant different between cases and controls when measured with any of the three platelet function assays (p>0,15 for all comparisons). Aspirin resistance was more frequently present in patients with a ST compared with control patients (for LTA: 28/60 (46.7%) versus 9/40 (22.5%), p = 0,0090, for the VerifyNow aspirin assay: 11/60 (18.3%) versus 1/40 (2.5%), p=0.0151).

Conclusie: Aspirin resistance but not pre- or post-treatment hyperreactivity or impaired responsiveness to clopidogrel appears to be associated with the occurrence of ST.

66. Impaired bioavailability of clopidogrel in patients with a ST-segment elevation myocardial infarction

C.M. HACKENG¹, J.W. van WERKUM², A.A.C.M. HEESTERMANS², D. TAUBERT³, T.H. SEESING^{1,2}, N. van BECKERATH⁴, E. SCHÖMIG³, F.W.A. VERHEUGT⁵, J.M. ten BERG²
Department of Clinical Chemistry¹ and Department of Cardiology², St Antonius Hospital, Nieuwegein, Department of Pharmacology, University Hospital, University of Cologne³, Germany, Department of Cardiology, Deutsches Herzzentrum and Medizinische Klinik rechts der Isar⁴, Technische Universität München, Munich, Germany, Department of Cardiology, UMC Nijmegen⁵, Nijmegen

Introduction: Clopidogrel reduces recurrent ischemic events in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI). However, there are no data on pharmacokinetics and the magnitude of platelet inhibition in response to a high loading dose of clopidogrel in STEMI patients.

Methods: We used liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine the pharmacokinetic response to a 600 mg loading dose of clopidogrel in two groups of patients: STEMI patients (n=11) and controls (n=10). ADP-induced aggregation with light transmission aggregometry was performed

to determine absolute change in aggregation from baseline. **Results:** The maximal concentration (Cmax) and area under the curve (AUC) of unchanged clopidogrel, its inactive carboxyl metabolite and its active thiol metabolite were significantly lower in STEMI patients as compared to healthy volunteers (all comparisons $P<0.01$). Additionally, there was a trend for a delayed time-to-maximum plasma concentration for all three substances in STEMI patients. The conversion-ratio's of clopidogrel into its inactive carboxyl and active thiol metabolite were not significantly different between STEMI patients and

controls. Regression analysis revealed a strong correlation between the reduction in platelet aggregation and the Cmax value of the active metabolite ($r=0.823$ for 5 $\mu\text{mol/L}$ ADP; $P=0.006$ and $r=0.791$ for 20 $\mu\text{mol/L}$ ADP; $P=0.011$)

Conclusion: Although large clinical trials have demonstrated the effectiveness of clopidogrel therapy in STEMI, our results clearly demonstrate that clopidogrel bioavailability in STEMI is significantly impaired as compared to controls. Large clinical trials are needed to define the optimal dosing of clopidogrel in STEMI

Endocrinologie en intermediaire stofwisseling

67. The low-dose adrenocorticotropic hormone stimulation test for the diagnosis of adrenal dysfunction: analysis of 220 consecutive tests performed over a period of 3 years

R.K. SCHINDHELM¹, A.A.M FRANKEN², P. H. P. GROENEVELD², J.M.M. RONDEEL¹

Department of Clinical Chemistry¹, Department of Internal Medicine², Isala Clinics, Zwolle

Introduction: The low-dose (1 μg) adrenocorticotropic hormone (ACTH) stimulation test is used for the detection of primary or prolonged secondary adrenocortical insufficiency, correlates well with the insulin-induced hypoglycaemia test and is a sensitive test for mild forms of primary adrenal insufficiency. In the present study we assessed the prevalence and results of the various indications of the ordered ACTH-stimulation tests that were performed over a period of three years at our laboratory.

Methods: We analyzed 220 consecutive ACHT-stimulation tests. All tests were performed at the Department of Clinical Chemistry by one of the laboratory physicians according to protocol. Cortisol was measured by a solid-phase competitive chemiluminescent enzyme immunoassay (IMMULITE 2000 Cortisol, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, USA), with intra- and inter-assay CVs of <10%, before, and 20 and 30 minutes after intra-venous injection of 1 microgram tetracosactide (Synacthen®).

Results: We excluded patients on estrogen therapy (n=20) and patients with unknown or missing information regarding the reason why the test was ordered (n=25). Of the remaining 175 patients (69% women, aged 50±16 years), fatigue (54%), adrenal function following pituitary surgery (9%) and hypotension (8%) were the most prevalent indications. Severe adrenal dysfunction (cortisol<0.10 $\mu\text{mol/L}$) was diagnosed in 7%. In the group of patients with fatigue (n=95; 73% women, aged 48±16 years), 13% of the tests had abnormal responses, and no differences with respect to age and sex-distribution were observed between those with and without abnormal responses (both $P>0.05$).

Conclusion: Fatigue was the most prevalent indication of the performed ACHT-stimulation tests; 13% of tests with that particular indication showed abnormal responses. Further studies should establish the diagnostic value of the ACTH-stimulation test in patients with fatigue.

68. Cytochrome P450 2C9 *2 and *3 polymorphisms and the dose and effect of sulfonylurea in type 2 diabetes mellitus

R.H.N. van SCHAIK¹, M.L. BECKER², L.E. VISSER^{2,3}, P.H. TRIENEKENS⁴, B.H. STRICKER²

Departments Clinical Chemistry¹, Epidemiology & Biostatistics², Hospital Pharmacy³, Stichting Trombosediens en Artsenlaboratorium Rijnmond⁴, Erasmus MC, Rotterdam

Introduction: Sulfonylurea are mainly metabolised by the cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) enzyme. The CYP2C9*2 and *3 allelic variants encode enzymes with less enzymatic activity and are thus correlated with elevated levels of sulfonylurea, as demonstrated in healthy volunteers. In this study, the effect of these variants is described for patients with diabetes mellitus, treated with sulfonylurea

Methods: All patients with incident diabetes mellitus starting on sulfonylurea therapy in the Rotterdam Study, a population based cohort study of 7,983 elderly people, were included. CYP2C9 genotyping was performed for the *2 and *3 variant allele using TaqMan analysis. The associations between CYP2C9 polymorphisms and prescribed doses of sulfonylurea, and change in glucose levels after start of sulfonylurea therapy, were assessed.

Results: The study population consisted of 67.6% CYP2C9*1/*1

individuals, 18.5% heterozygotes and 4% compound heterozygotes/homozygote variants were detected. In CYP2C9*3 carriers using tolbutamide, the prescribed dose was significantly lower ($p=0.009$) compared to patients with the CYP2C9*1/*1 genotype. No significant differences were found in tolbutamide users with the CYP2C9*1/*2 or CYP2C9*2/*2 genotype compared to CYP2C9*1/*1 patients or in patients using other sulfonylurea. In CYP2C9*3 carriers, the mean decrease in fasting serum glucose levels after start of tolbutamide therapy was larger than in patients with the CYP2C9*1/*1 genotype, although not statistically significant.

Conclusion: Patients with diabetes mellitus who are carrier of a CYP2C9*3 allele may require lower doses of tolbutamide to regulate their serum glucose levels compared to patients with the wild type genotype. Consequently, CYP2C9*3 carriers may have a higher risk of hypoglycemia after starting treatment.

Bloedvorming, bloedstolling, transfusie

69. First mutation in the red blood cell-specific promoter of hexokinase and a novel missense mutation cause hexokinase deficiency and mild haemolysis

K.M.K. de VOOGHT¹, W.W. van SOLINGE¹, A.C. van WESEL¹, S. KERSTING², G. RIJKSEN¹, R. van WIJK¹

Department of Clinical Chemistry and Haematology¹, Laboratory for Red Blood Cell Research, Department of Clinical Haematology², University Medical Center Utrecht, Utrecht

Introduction: Hexokinase (HK) is one of the key enzymes of glycolysis and catalyzes the phosphorylation of glucose to glucose-6-phosphate. HK-I is encoded by the HK-I gene (HK1), and the predominant isozyme in human tissues. Red blood cell-specific hexokinase (HK-R) is a HK isozyme that is transcribed from HK1 by use of an erythroid-specific promoter. The aim of this study was to investigate the molecular basis for HK deficiency in a patient with chronic haemolysis.

Methods: Promoter studies were performed using transient transfection of HK promoter constructs in human K562 erythroleukemia cells. DNA-protein interaction at the promoter of HK was studied using Electrophoretic Mobility Shift Assay's (EMSA) with K562 nuclear extracts.

Results: On the paternal allele we identified two novel mutations in cis in the erythroid-specific promoter of HKI: -373A>C and -193A>G. Transfection of HK promoter reporter gene

constructs showed that the most upstream -373A>C mutation was non-functional in vitro. In contrast, the -193A>G mutation reduced promoter activity to 8% of normal. Hence, it is the first mutation to specifically affect HK-R specific transcription. EMSA and supershift experiments showed that binding of c-jun to an AP-1 binding site was disrupted by the -193A>G mutation. On the maternal allele we identified a novel missense mutation in exon 3: c.278G>A, encoding an arginine to glutamine substitution at residue 93, affecting both HK-1 and HK-R. In addition, this missense mutation was shown to compromise normal pre-mRNA processing.

Conclusion: We postulate that reduced erythroid transcription of HK1 together with aberrant splicing of both HK-I and HK-R collectively results in hexokinase deficiency and mild chronic hemolysis.

70. Het gebruik van de 4-5-6-flexinorm in het MMC; een overzicht

M.T.M. RAIJMAKERS, F. van der GRAAF

Klinisch Laboratorium, Máxima Medisch Centrum, Veldhoven

Inleiding: Een erytrocytentransfusie is een redelijk veilige procedure, maar transfusiereacties of antistofvorming zijn niet zeldzaam. Een goede bewaking van de indicatie, bijvoorbeeld met de AZG 4-5-6-flexinorm, voor het geven van bloedproducten is belangrijk. De doelstelling van dit onderzoek was om de transfusie van erytrocytenconcentraten in het MMC te toetsen aan deze richtlijn.

Methode: Uit de database van het laboratoriuminformatiesysteem zijn van alle erytrocytentransfusies in de eerste 6 weken van 2007 de volgende parameters verkregen: alle Hb-uitslagen, het aantal leukocytvrije erytrocytenconcentraten en patiënt gerelateerde parameters. De juistheid van de indicatie volgens de AZG-4-5-6-flexinorm is getoetst door te kijken naar leeftijd, Hb voor / na transfusie en de aanwezigheid van comorbiditeit, waarvoor gebruik is gemaakt van laboratorium uitslagen en klinische informatie. Vervolgens is iedere erytrocytentransfusie geklassificeerd in één van de drie volgende categorieën: (1) zeer waarschijnlijk conform de AZG-4-5-6-flexinorm, (2) co-

morbideit onbekend of twijfelachtig, (3) zeer waarschijnlijk niet conform de AZG-4-5-6-flexinorm.

Resultaat: In de onderzoeksperiode werden in totaal 487 erytrocytentransfusies aan 230 patiënten gegeven, waarbij 982 leukocytvrije erytrocytenconcentraten werden gebruikt. Een groot gedeelte van de erytrocytentransfusies (81%) lijkt conform de AZG-4-5-6-flexinorm gegeven te worden, terwijl bij een klein aantal (12%) een onjuiste indicatie lijkt te ontbreken. De belangrijkste redenen hiervoor waren een Hb >6 mmol/l (32%) en het ontbreken van een (geldige) indicatie (23%). Opvallend was dat in een aantal gevallen (19%) een eerste erytrocytentransfusies conform de AZG-4-5-6-fexinorm werd gegeven, maar dat een juiste indicatie bij een volgende erytrocytentransfusie ontbrak.

Conclusie: De resultaten laten zien dat 81% van de erytrocytentransfusies voldoen aan de AZG-4-5-6-flexinorm, maar dat bij 12% van de erytrocytentransfusies lijkt te worden afgewezen van de in de AZG-4-5-6-flexinorm vermelde indicatie.

71. Plasmatransfusies: doen we het goed?

P.M. WETZER, N.C.V. PEQUERIAUX

Laboratorium Klinische Chemie en Hematologie, Jeroen Bosch Ziekenhuis, 's-Hertogenbosch

Inleiding: Een aantal jaren geleden hebben we de 4-5-6-regels voor de toediening van EC's geïntroduceerd. Controle hiervan vindt regelmatig plaats met behulp van indicatoren. Tegelijkertijd is de CBO richtlijn voor de toediening van FFP's (indicaties en controle met behulp van stollingsonderzoek) geïntroduceerd. Doel: Controle van het toepassen van de CBO Richtlijn bloedtransfusie bij transfusie met FFP's.

Methode: We hebben een retrospectief onderzoek uitgevoerd gedurende een periode van 5 maanden voor de transfusies met FFP's. In die periode hebben we alle aanvragen gecontroleerd op de volgende indicatoren: het aangeven van de indicatie voor transfusie bij de aanvraag, het volgen van de indicatiestelling volgens de CBO Richtlijn, het monitoren door middel van stollingsonderzoek en het niet toedienen van bestelde eenheden.

Resultaat: Er zijn 95 aanvragen gedaan waarbij 272 eenheden

zijn toegediend: 61 aanvragen (151 eenheden) voor de snijdende specialismen en 34 aanvragen (121 eenheden) voor de niet-snijdende specialismen, met name de intensivisten. Het aangeven van de indicatie wordt nauwelijks gedaan, de indicatiestelling wordt in ruim 25% van de aanvragen niet gevuld, stollingsonderzoek vooraf en achteraf wordt respectievelijk in 51% en 63% uitgevoerd, het aantal bestelde FFP's dat verloren gaat is 5,2 %.

Conclusie: In ruim 25% van de gevallen is de CBO richtlijn niet gevuld, dit betreft vooral de snijdende specialismen. In de overige 75 % word volgens de CBO richtlijn getransfundeerd. Er worden nog steeds te veel FFP's ten onrechte toegediend. Worden FFP's als volume-expander gebruikt? Gezien de belasting voor donor en ontvanger is het noodzakelijk regelmatig het gebruik van FFP's te controleren en de kliniek aan te spreken op hun medisch handelen.

72. Reductie van onnodige transfusie van erytrocytenconcentraat door striktere naleving van de 4-5-6-flexinorm

J.W.M. HOLTKAMP^{2,3}, A.M. van den BOOGAARD-van der MAAT¹, R. GEELEN-GEBOERS¹, A.L.M. KERREMANS³, J.L.P. van DUIJNHOVEN¹

Algemeen Klinisch Laboratorium¹, Elkerliek Ziekenhuis, Helmond, Afdeling Interne Geneeskunde², Catharina Ziekenhuis, Eindhoven, Afdeling Interne Geneeskunde³, Elkerliek Ziekenhuis, Helmond

Inleiding: De CBO-richtlijn bloedtransfusies beveelt de 4-5-6-flexinorm aan om onnodige bloedtransfusies en daarmee de kans op transfusiecomplicaties te beperken. In de praktijk blijkt dat de flexinorm niet altijd strikt wordt nageleefd. Globale schatting gebaseerd op het posttransfusie-hemoglobinegehalte toonde dat er in 2006 in een perifeer ziekenhuis met 494 bedden minimaal 1050 eenheden erytrocytenconcentraat (EC) onnodig werden getransfundeerd. Doel: Het bereiken van tenminste 50% reductie van onnodige erytrocytenconcentraat-transfusies door de 4-5-6-flexinorm te promoten.

Methode: Prospectieve pilot-studie waarin door intensievere controle op de uitgifte van EC's een striktere naleving van de 4-5-6-flexinorm werd nagestreefd. Feedback werd gegeven wanneer te royaal EC's werden besteld ten opzichte van het nagestreefde hemoglobinegehalte volgens de flexinorm, of wanneer de indicatie voor afwijken van de 4-5-6-flexinorm niet goed onderbouwd was. De studie werd uitgevoerd op de afdeling orthopedie en interne geneeskunde in één perifeer zie-

kenhuis, in de periode van mei tot en met september 2007 en vergeleken met dezelfde periode in 2006.

Resultaat: De interventie door een gemotiveerde aanvraag en feedback leidde vaker tot navolging van de 4-5-6-flexinorm (2006: $70 \pm 3,9\%$ vs. 2007: $83 \pm 3,2\%$, $p < 0,001$) en een relatieve reductie van het aantal onnodig getransfundeerde EC's van 51,3% (2006: $21,9 \pm 3,7\%$ vs. 2007: $10,7 \pm 3,5\%$, $p < 0,002$). Geschat op basis van het aantal uitgegeven EC's in 2006 komt dit overeen met ruim 380 eenheden en een kostenreductie van bijna € 73.000.

Conclusie: Door middel van een gemotiveerde aanvraag en actieve terugkoppeling naar de aanvrager kan ruim 50% reductie van onnodige transfusies van EC's worden bereikt. Dit leidt tot meer veiligheid voor patiënten en een aanzienlijke kostenbesparing.

Literatuur: CBO Richtlijn Bloedtransfusie 2004. Van Zuiden Communications B.V. ISBN: 90-8523-010-1.

73. Indicatiestelling pre-operatief type&screenbeleid op basis van transfusierisico en risico op antistoffen

J.E. KOOTSTRA-ROS¹, J. GERRITS¹, A.T. RHEINECK LEYSSIUS², A.H.L. MULDER¹

Klinisch Laboratorium¹, Afdeling Anesthesiologie², Ziekenhuisgroep Twente, Almelo/Hengelo

Inleiding: Voor electieve OK's met een reële kans op transfusie wordt in ons ziekenhuis bij patiënten pre-operatief een type&screen beleid gevuld, zodat bloedgroep en eventuele antistoffen bekend zijn bij eventuele transfusie. Een transfusierisico $>1\%$ wordt hierbij als uitgangspunt genomen. In deze studie is de afweging welke ingrepen in aanmerking komen voor T&S beleid onderbouwd door het risico op een transfusiereactie bij achterwege laten van T&S te schatten. Dit risico is afhankelijk van het transfusierisico en de a priori kans op aanwezigheid van irreguliere antistoffen bij verschillende patiëntengroepen.

Methode: Van alle verrichtingen gedurende 1 jaar ($n=27010$) is het aantal patiënten dat werd geopereerd en het transfusierisico vastgesteld. Daarnaast werd per type verrichting bepaald bij hoeveel patiënten irreguliere antistoffen aangetoond werden en voor welk deel dit specifiek om (de meest voorkomende) C,D,E en/of K-antistoffen ging.

Resultaat: Mochten patiënten, die niet in T&S protocol vallen, toch cito bloed nodig hebben, dan is er een kans dat zij, voor ons onbekende, antistof(fen) hebben. Uit de analyse bleek het gemiddelde risico voor de gehele OK-populatie hierop 1%, uitgaande van ccddee- en kk-bloed. Gecombineerd met een T&S drempel van 1% betekent dit dat bij deze OK's bij minder dan 1:10.000 ingrepen een onbekende patiënt met antistoffen bloed nodig heeft. In geval van spoed wordt dan mogelijk incompatibel bloed gegeven met risico op een transfusiereactie. Er zijn echter verschillen in patiëntengroepen. Patiëntengroepen met een hoger percentage antistoffen moeten al bij een lager transfusierisico in aanmerking komen voor T&S, terwijl dit voor patiëntengroepen met een lager percentage antistoffen omgekeerd is.

Conclusie: Op grond van transfusierisico en kans op aanwezigheid van irreguliere antistoffen uitgesplitst naar verrichtingen kan een meer specifiek T&S beleid gevolgd worden.

74. Sterk verhoogde INR-waarden met recombinant STA® Neoplastin R reagens vergeleken met STA® Hepato Quick reagens bij nieuw in te stellen trombosedienstpatiënten met vitamine-K-antagonisten

J.A. REMIJN, S. LUCAS, B. WILDEBOER, H.J. ADRIAANSEN

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Gelre Ziekenhuizen, Apeldoorn/Zutphen

Inleiding: De International Normalized Ratio (INR) wordt binnen ons laboratorium bepaald met het STA® Hepato Quick (HQ) reagens op de STA-R® (Roche Diagnostics, Mannheim). Met het verschijnen van een nieuw recombinant PT reagens, het STA® Neoplastin (NP), en een vermeende verhoogde gevoeligheid van dit reagens voor stollingsfactor VII, was onze interesse gewekt of deze gevoeligheid consequenties heeft op de INR van nieuw in te stellen trombosedienst patiënten met antistollingsmedicatie. Omdat factor VII nl. de kortste halfwaardetijd heeft van de vitamine K afhankelijke stollingsfactoren, zal vitamine K antagonerende medicatie als eerste te detecteren zijn via stollingsfactor VII.

Methode: Bij 30 nieuw aangemelde trombosedienst patiënten werd gedurende 3 weken na start van antistolling de INR bepaald met HQ en vergeleken met recombinant NP. Daarnaast werd bij 20 stabiel ingestelde trombosedienst patiënten (INR: 1,8 – 4,0) eveneens een vergelijking verricht.

Resultaat: Bij 20 (van 30) patiënten werden hogere INR waarden gevonden met recombinant NP vergeleken met HQ. Een representatief patroon was dat enige dagen na start van de antistollingsmedicatie de INR bepaald met recombinant NP gemiddeld 56 % hoger was dan met HQ. De correlatiecoefficient van een lineair fit van de INR waarden bepaald met beide reagentia was: 0,684 ($y = 1,8592x - 0,9783$). Daarentegen werd bij stabiel ingestelde patiënten (INR: 1,8 – 4,0) een goede correlatie (0,901) gevonden ($y = 1,0153x - 0,0784$).

Conclusie: Bij stabiel ingestelde trombosedienst patiënten wordt een prima correlatie tussen beide reagentia gevonden. Bij nieuw in te stellen patiënten worden met het recombinant NP reagens echter veel hogere INR waarden gemeten dan met het HQ reagens. Dit is van invloed op de vervolgdosering van de antistollingsmedicatie en op de duur waarin een stabiel antistollingsniveau wordt bereikt.

75. PAGAS: Project of Anemia analyses from the General practitioner to the Albert Schweitzer hospital

G.H.M. TAX¹, J. DROOGENDIJK², M-D. LEVIN², R. BEUKERS³, P. BERENDES¹

Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Afdeling Interne Geneeskunde², Afdeling MDL-ziekten³, Albert Schweizerziekenhuis, Dordrecht

Inleiding: Het PAGAS-project is opgestart om het diagnostisch proces bij de anemische patiënt (mannen > 18 jaar en vrouwen > 50 jaar) te verbeteren en gastro-enterologische tumoren sneller te diagnosticeren. Het PAGAS-project is een samenwerkingsproject tussen huisarts, laboratoriumspecialist, MDL-arts en internist-hematoloog.

Methode: De huisarts meldt zich via internet aan als deelnemer van het PAGAS-project (www.PAGAS.nl). Bij anemische patiënten van "PAGAS-huisartsen" wordt een uitgebreide laboratoriumanalyse uitgevoerd (o.a. Hb, MCV, RDW, ferritine, transferrine, ijzer, ijzerverzadiging, TIJBC, foliumzuur, vitamine B12, CRP). Aan de hand van de laboratoriumuitslagen wordt door de laboratoriumspecialist de differentiaal diagnose van de anemie en bijbehorend advies gegeven. De MDL-arts biedt de mogelijkheid om iedere patiënt met een nieuw ontdekte ijzergebreksanemie binnen 4 weken te scopiëren (gastro- en colonoscopie). De internist-hematoloog geeft advies en beheert het project.

Resultaat: Het PAGAS-project is gestart op 01 januari 2007. Drieënzestig huisartsen zijn inmiddels als PAGAS-deelnemer aangemeld. Tot nu toe werden bloedmonsters van 728 patiënten ingestuurd. IJzergebreksanemie werd bij 63 mannen (ferritine < 25 ug/l) en 80 vrouwen (ferritine < 20 ug/l) gevonden. In de eerste 11 maanden zijn 19 gastro- en colonoscopieën uitgevoerd via deze route (een substantieel deel van de ijzergebreks-patiënten wordt nog steeds via klinische opname of poliklinisch gescopieerd). Hierbij werd gevonden: coecumcarcinoom (2), oesofagitis (1), angiodysplasie (2), maagpoliep (1) en status na B2 maagresectie (1).

Conclusie: Met de resultaten van het PAGAS-project wordt het inzicht in de diagnostiek en behandeling van een patiënt met anemie in de huisartspraktijk vergroot (zie abstract transferrine). Wij hopen de verschillende oorzaken van ijzergebrek eerder te achterhalen om m.n. de prognose van gastro-intestinale tumoren (oorzaak van ca 15% van de ijzergebreksanemie bij ouderen) te verbeteren.

76. Hoezo, verhoogd transferrine bij ijzergebreksanemie?

G.H.M. TAX¹, J. DROOGENDIJK², M-D. LEVIN², R. BEUKERS³, P. BERENDES¹

Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Afdeling Interne geneeskunde², Afdeling MDL-ziekten³, Albert Schweizerziekenhuis, Dordrecht

Inleiding: Volgens de NHG-standaard 'anemie' en het alternatief stroomschema voor het laboratoriumonderzoek bij anemie (NTvG 2007) wordt de diagnose 'ijzergebreksanemie' gesteld op basis van: a) het ferritine en/of b) de combinatie van een laag serumijzer en een verhoogd transferrine. Een absoluut afkappunt van de laatste parameters wordt niet opgegeven.

Methode: In het kader van het transmurale PAGAS project is bij 728 anemische patiënten oa het Hb, MCV, RDW, ferritine, transferrine, serumijzer, vitamine B12 en foliumzuur bepaald. De patiënten zijn onderverdeeld in anemie met ijzergebrek (ferritine <20 ug/l vrouwen en <25 ug/l mannen) en anemie zonder ijzergebrek en vergeleken v.w.b. transferrine (g/l) (WHO-criteria). ROC-curves zijn gemaakt, waarbij ijzergebrek zeer strikt is gedefinieerd als ferritine <15 ug/l (NHG-standaard). IJzergebrek is uitgesloten bij ferritine >100 ug/l.

Resultaat: Bij ijzergebrek is de gemiddelde transferrinewaarde

3,22 g/l (2,24-4,20 -/+2SD) en 2,22 g/l (1,31-3,12 -/+2SD) zonder ijzergebrek. Beide Gausse-curves overlappen bij transferrinewaarden tussen 2,0 g/l en 3,5 g/l. Een transferrine van 4,1 g/l - het afkappunt in de NHG-standaard (diagnostisch kompas) - heeft een specificiteit van 100%; de sensitiviteit is met 6,7% laag. Een hogere sensitiviteit (24,8%) wordt - met behoud van de maximale specificiteit - gevonden bij 3,6 g/l. Het afkappunt met de hoogst mogelijke specificiteit (94%) en sensitiviteit (95,2%) ligt bij 2,6 g/l. De "Area Under the Curve (AUC)" is bij de verschillende ROC-curves (hoog naar laag): transferrine 0,98, TIJBC 0,98, ijzerverzadiging 0,91, MCV 0,87, RDW 0,79 en serumijzer 0,78.

Conclusie: Uit deze studie blijkt dat men bij een anemische patiënt ijzergebrek moet overwegen bij transferrinewaarden vanaf 2,6 g/l. Het serumijzer heeft slechts een diagnostisch toegevoegde waarde, wanneer deze als TIJBC en/of ijzerverzadiging in de anemie analyse wordt betrokken.

77. Transfunderen, vandaag of wachten tot morgen?

S.A.G.M. BACKES-SILLEKENS, M.E.P SLOBBE- van DRUNEN, A.M.P. DEMANDT, R.M.J. HENDRIKS, F.P.J. PETERS, R.C.R.M. VOSSEN

Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium, Maaslandziekenhuis, Sittard

Inleiding: Het Maaslandziekenhuis is een middelgroot op-leidingsziekenhuis waarin jaarlijks ca. 4100 bloedtransfusies gegeven worden. Het percentage transfusies in de avond en nachtdienst is met 40% erg hoog. In een studie is daarom het transfusiebeleid van twee verpleegafdelingen nader onderzocht.

Methode: Bij twee afdelingen Interne Geneeskunde (oncologie en maag-, darm-, leverziekten) is in een prospectieve studie van begin tot eind 2006 het tijdstip van transfunderen en toepassing van de 4-5-6 transfusietrigger bij de indicatiestelling nader geanalyseerd. Gedurende deze periode heeft twee keer bijscholing plaatsgevonden aan verpleging en arts-assistenten door de hemovigilantie consultant. Een onderverdeling is gemaakt in dagdienst 08:00-17:00, avonddienst 17:00-23:00 en nachtdienst 23:00-8:00 uur.

Resultaat: De 4-5-6 transfusietrigger wordt bij ± 90% van de transfusies toegepast. Van de transfusies in de avond en nachtdienst is 50% terecht in die periode gegeven. De ontrechte gegeven trans-

fusies bleken vooral toe te schrijven aan logistieke vertragingen, zoals het op een laat tijdstip aanvragen van Hb en kruisbloed, vertraging in het analyseren van kruisbloed, en het laat ophalen van bloedproducten. Opvallend was een duidelijke verschuiving naar overdag transfusies suggestief optredend na de scholingen.

Conclusie: Logistieke vertraging blijkt de grootste veroorzaaker van de vele transfusies in de avond en nachtdienst. Periodieke aandacht hiervoor lijkt dit te verbeteren. Voor een goede logistiek zijn de volgende punten belangrijk: 1) gedegen kennis van transfusieprotocollen is nodig bij zowel analisten als verpleging. 2) verpleging dient duidelijke instructies te krijgen van behandelend arts m.b.t. urgente van transfusies. 3) laboratoriumuitslagen dienen tijdig inzichtelijk te zijn op de afdeling. Deze studie toont de belangrijke rol van de hemovigilantie consultant bij verbeteringen in de transfusieketen (inventarisatie van problemen, (tijds)bewaking van de transfusieketen, scholing).

78. Directe coombs in navelstrengbloed bij moeders met bloedgroep O pos: zin of onzin?

M.L. KINGMA¹, G.A.E. PONJEE²

Afdeling Kindergeneeskunde¹ en Klinische Chemie², Medisch Centrum Haaglanden, Den Haag

Inleiding: Het beleid ten aanzien van screening op antistoffen bij de pasgeborenen wisselt sterk in Nederland. In het MCH is het goed gebruik om de directe coombs (DAT) uit te voeren in het navelsteng-bloed van alle pasgeborenen waarvan de moeder bloedgroep O heeft in het kader van de vroegtijdige opsporing van een mogelijk ABO-antagonisme. Het doel van de studie was om na te gaan wat de voorspellende waarde is van de DAT bij pasgeborenen van O positieve moeders voor fototerapie of wisseltransfusie.

Methode: Er werd een retrospectief onderzoek verricht in de eigen patientenpopulatie. In de periode van 1-1-2007 en 20-8-2007 werden 1005 kinderen geboren. In ongeveer 500 gevallen werd de directe coombs uitgevoerd. Van 260 kinderen waarvan de moeder O pos was, konden de gegevens worden achterhaald.

Resultaat: Tweeenvijftig van de 260 pasgeborenen hadden een

positieve DAT (20%). Hiervan werden 13 kinderen behandeld met fototerapie (25%). Geen van de pasgeborenen kreeg een wisseltransfusie. Van de overige 208 babies met een negatieve DAT kregen 7 babies fototerapie (3,4%). 8 kinderen werden opgenomen op dag 1; 5 kinderen op dag 2. Van de kinderen met de negatieve DAT en fototerapie werden 2 kinderen opgenomen op dag 2, de overige kinderen na de tweede dag.

Conclusie: Een positive DAT bij O pos moeders bleek in 25% van de gevallen te leiden tot fototerapie. Meer dan de helft van de kinderen werd direct op dag 1 opgenomen. Wisseltransfusies waren niet geïndiceerd. Of dit beleid daadwerkelijk leidt tot een reductie van het aantal wisseltransfusies zal in de toekomst worden uitgezocht door de vergelijking van data met deze van een naburig ziekenhuis waar geen routinematische coombstest wordt uitgevoerd.

79. Een Nederlandse familie met zowel beta- als delta-thalassemie

P. ENGBERS-BUIJTENHUIJS, F.A.J.T.M. van den BERGH, J. SLOMP

Afdeling Klinisch Chemisch Laboratorium, Medisch Spectrum Twente, Enschede

Inleiding: In Nederland is door de VHL een protocol geschreven voor diagnostiek van hemoglobinopathie dragerschap ten behoeve van preventie. Dit abstract beschrijft een casus waarbij, door strikte hantering van het protocol, een niet eerder beschreven combinatie van mutaties is gevonden. Een tweearig meisje van Nederlandse afkomst presenteerde zich bij de huisarts met een flinke verkoudheid. Uit bloedonderzoek bleek dat zij een laag MCV en relatief hoog aantal erytrocyten had ($Q\text{-index} < 13$) zonder dat er sprake was van (ijzergroeps)anemie. Hierop adviseerde het laboratorium de huisarts om bij een volgend bloedonderzoek tevens hemoglobinopathieonderzoek te laten uitvoeren.

Methode: Onderzoek naar alfa-thalassemie werd gedaan met behulp van DNA analyse waarbij werd gekeken naar de 7 meest voorkomende deleties. HPLC werd gebruikt voor onderzoek naar beta-thalassemie en hemoglobinopathie. Sequentie analyse werd uitgevoerd op het hemoglobinopathieën laboratorium van het LUMC.

Resultaat: Er werd geen deletie gevonden in het alfa-globine gen. Bij de patiënt werd een verhoogd percentage HbF maar een normaal percentage HbA2 aangetoond. Met sequentie analyse van het beta-globine gen werd een mutatie gevonden (HBBc.-140c>t). De gevonden heterozygote beta-thalassemie geeft een verklaring voor het microcytaire bloedbeeld en het verhoogde percentage HbF maar niet voor het normale percentage HbA2. Uit nader sequentie onderzoek bleek dat de patiënt tevens heterozygoot is voor de mutatie HBDc.82g>t p.Ala28Ser van het delta-globine gen. Dit verklaart het normale percentage HbA2 bij de beta-thalassemie dragerschap van de patiënt.

Conclusie: Door het standaard basisprotocol van de VHL voor laboratorium diagnostiek van hemoglobinopathie dragerschap te hanteren, is een niet eerder beschreven combinatie van mutaties van het beta- en delta globinegen ontdekt.

Infectie, afweer, allergie

80. TPMT, MDR-1 and CYP3A5*3 genotype frequencies in lung transplantation patients

H.J.T. RUVEN¹, V.H.M. DENEER², D.A. van KESSEL³, J.M.M. van den BOSCH³

Departments of Clinical Chemistry¹, Clinical Pharmacy², and Pulmonology³, Centre for Interstitial Lung Diseases, St. Antonius Hospital, Nieuwegein

Introduction: In contrast to other solid-organ transplants, i.e. kidney, genotype frequencies of SNPs in genes of lung transplantation patients have been less extensively studied leaving the possibility of suboptimal pharmacogenetic screening strategies. Functional SNPs encoding thiopurine methyltransferase (TPMT), MDR-1 and CYP3A5*3 have therefore been determined in a group of lung transplantation patients in order to assess whether SNP frequencies are deviant from the average population.

Methods: The frequencies of four allelic TPMT variants, e.g. *2, *3A, *3B and *3C, two SNPs (G2677T/A and C3435T) in the MDR-1 gene and A6986G in CYP3A5 have been established

in 70 lung transplantation patients using the LightCycler and restriction fragment analysis on agarose gel electrophoresis.

Results: SNP frequencies in lung transplantation patients were not different from the average Dutch population. Haplotype analysis has been carried out in order to visualize specific linkage patterns between SNPs.

Conclusion: With respect to the three genes and the studies SNPs, pharmacogenetic screening strategies for lung transplantation patients can be based on SNP frequencies in the average population. As established, genotype frequencies did not differ between patients and control group.

81. Leukocyte subset cell count variation can directly affect calcineurin activity measurement

H.H. van ROSSUM¹, F.P.H.T.M. ROMIJN¹, N.P.M. SMIT¹, J.W. de FIJTER², J. van PELT¹
Departments of Clinical Chemistry¹ and Nephrology², Leiden University Medical Center, Leiden

Introduction: Immune suppression in allograft recipients has to be balanced in order to prevent acute graft rejection and side effects such as infections and malignancies. For calcineurin (CN) treated patients, immunological monitoring of CN activity constitutes a novel and innovative approach to optimize the therapeutic index. We investigated the effect of sample composition variation on leukocyte CN activity measurement.

Methods: 25 renal transplant recipients were monitored for leukocyte CN activity, full blood CsA concentration and leukocyte cell counts. Blood was taken before graft implantation and without Cyclosporin A (CsA) therapy, one day before transplantation with CsA therapy and 5 days after transplantation. Monocyte, granulocyte, CD4+ T cell, CD8+ T cell, B cell and

NK cell specific CN activities and CsA inhibition sensitivities were determined in vitro.

Results: Leukocyte CN activity was significantly inhibited after drug intake, but there was a high variation in leukocyte cell counts and sample composition. Cell specific CN activity varied between cell types ranging from 650 ± 230 to 166 ± 26 pmol / min / 10^6 cells (mean \pm SD) for monocytes and CD4+ T cells, respectively. CsA IC₅₀ values ranged from 15 to 78 µg/L for monocytes and B cells, respectively.

Conclusion: Inter- and intra-individual variation in leukocyte subset cell counts influence measured CN activity independent of CsA concentration. Cell specific enzyme activities are required in order to optimize the specificity of the methodology.

82. 100 maanden allergiediagnostiek regio Midden Holland 1999-2007

G.W.A. LANSBERGEN¹, E. van LEER², P.J.M.J. KOK¹
Afdeling Klinische Chemie¹ en Kindergeneeskunde², Groene Hart Ziekenhuis, Gouda

Inleiding: Het Groene Hart Ziekenhuis heeft een adharentie van ca. 200.000 inwoners in de regio Midden Holland. Dit onderzoek is een evaluatie van 100 maanden allergiediagnostiek van IgE specifieke immunoglobulinen bij volwassenen en kinderen, in de periode van 1999 t/m 2007.

Methode: Bij 35.479 patiënten (waarvan 15.287 kinderen <18 jaar) van zowel huisartsen als specialisten is gedurende de onderzoeksperiode specifiek IgE gemeten. Middels een screening is er getest op een mix van voedsel en/of inhalatieallergenen (Immunocap fx5, Phadiatop Inhalatiescreen, Phadiatop Infant), waarna er bij positiviteit (>klasse2) werd uitgesplitst.

Resultaat: Van alle patiënten >4 jaar was gemiddeld 38% (9346/24.281) gesensibiliseerd voor inhalatieallergenen via de Phadiatop Inhalatiescreen, waarbij geen discrepanties werden gevonden voor volwassenen en kinderen. Hiervan was er specifieke sensibilisatie voor huisstofmijt (64%), grasollen (47%), berkenollen (32%) en honden- en kattenroos (24%). Van alle patiënten <4 jaar was gemiddeld 40% (450/1132) gesensibili-

seerd voor zowel inhalatie- als voedsallergenen. Hiervan was er specifieke sensibilisatie voor huisstofmijt (40%), koemelk (26%), grasollen, kattenroos, pinda en kippenei-eiwit (20%), en hondenroos (15%). Van alle patiënten >18 jaar was gemiddeld 4,2% (25/595) gesensibiliseerd voor voedsallergenen. Hiervan was er specifieke sensibilisatie voor pinda (87%), tarwe (80%), soja (57%), koemelk (29%), kippenei-eiwit (22%) en kabeljauw (8%). Van alle patiënten <18 jaar was gemiddeld 16% (166/1064) gesensibiliseerd voor voedsallergenen. Hiervan was er specifieke sensibilisatie voor pinda (56%), tarwe (29%), soja (26%), koemelk (45%), kippenei-eiwit (39%) en kabeljauw (2,9%).

Conclusie: Sensibilisatie voor voedsallergenen komt minder frequent voor t.o.v. inhalatieallergenen, en bij volwassenen minder dan bij kinderen. Sensibilisatie voor kabeljauw werd het minst vaak gezien (59/1659). Wellicht moet kabeljauw in de Immunocap fx5 vervangen worden door een frequenter voorkomend voedsallergeen, zoals bijvoorbeeld een noot.

83. Waarde van het microscopisch urinesediment bij de diagnose urineweginfectie bij kinderen

H.E. van INGEN¹, W.J. den OUDEN², J.M. van DUIN³
Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Kindergeneeskunde², Medische Microbiologie³, Ruwaard van Putten Ziekenhuis, Spijkenisse

Inleiding: In ons ziekenhuis is het urine sediment als vervolgonderzoek op een positieve stick voor de meeste specialismen afgeschaft. Er is relatief weinig literatuur over de waarde van een microscopisch sediment in de diagnostiek van het urineweg infect bij kinderen. Daarom is besloten voor de pediatrie bij een positieve stick een urine sediment uit te voeren en dit retrospectief te beoordelen.

Methode: Van 209 aanvragen voor urine stick en sediment werd het sediment beoordeeld indien de stick positief was voor leukocyten, erytrocyten of eiwit. De kinderarts bepaalde of Gramprepataat en urinewekweek geïndiceerd waren. De microbioloog bepaalde a.d.h.v. kliniek, Gramprepataat en kweek of de diagnose urineweg infect gesteld kon worden. Zij was geblindeerd voor de uitslagen van stick en sediment. Retrospectief werden specificiteit, sensitiviteit, NPV en PPV berekend voor leukocyten en nitriet met de stick en leukocyten en bacterieën in het sediment.

Resultaat: 209 aanvragen werden verzameld. Bij 103 aanvragen waren Gram en kweek beschikbaar. Een urineweg infect werd vastgesteld bij 23; 74 waren negatief; 6 niet te classificeren. De sensitiviteit voor stick leuko, stick nitriet, leuko sediment en bacterieën sediment was 0,74; 0,30 ; 0,57 ; 0,70. De specificiteit was 0,86; 0,99; 0,91; 0,73. PPV was 0,45; 0,94; 0,65; 0,44. NPV was 0,90; 0,82; 0,87; 0,89. De combinatie van significante leukocyturie in het sediment (>20/microliter) met negatieve stick op leukocyten kwam bij 1 aanvraag (0,5 %) voor. Deze patient had geen urineweg infect.

Conclusie: Uit deze studie komen sterke aanwijzingen dat het urinesediment geen meerwaarde heeft t.o.v. bepaling van leukocyten en nitriet met een stick. Gezien dit resultaat dient een prospectieve studie uitgevoerd te worden.

Literatuur: Huicho et al, Paediatr Infect Dis J 2002; 21: 1

84. The occurrence of CFTR mutations in patients with bronchiectasis

C.H.M. van MOORSEL¹, D.A. van KESSEL¹, J.C. GRUTTERS¹, H.J.T. RUVEN², J.M.M. van DEN BOSCH¹
Departments of Pulmonology¹ and Clinical Chemistry², St. Antonius Hospital, Nieuwegein

Introduction: Homozygosity or compound heterozygosity for mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene causes cystic fibrosis. Carriership of such mutations is known to be harmless or even advantageous protection against infections. However, CFTR mutation carriership has been shown to have health implications in later life, especially concerning lung function and chronicity of lung infections. Contradictory results have been published on the occurrence of CFTR mutations in patients with bronchiectasis. Several papers have shown that an increase of mutations was found, up to 60%, while others find 0 to 4% mutation carriers (which does not deviate from the expected population frequency). One of the flaws of this research is that only the most frequent mutation or mutations in a population are being studied. We have started a study investigating 36 CFTR mutations and the polythymidine tract variation in patients with bronchiectasis.

Methods: Selection of patients with bronchiectasis and CFTR mutation analysis using LightCycler (Roche) and Inno-Lipa (Innogenetics).

Results: So far, 22 patients have been screened and 3 mutations (13.6%) have been found. The difference with the expected population frequency of CF mutations (3.3%) is significant (Fisher exact p=0.05). One patient carried the R117H mutation and two of the patients carried the R1162X mutation. Both these mutations have very low expected frequencies in the Dutch population (0.003 and 0.001 respectively).

Conclusion: We believe that mutations in the CFTR gene predispose to the development of bronchiectasis. Enlargement of the patient population in the future should unveil whether this is primarily due to specific, rare CFTR mutations.

Nierziekten

85. Impact of changing PTH assay on dialysis patients

M.J.W. JANSSEN¹, M.H. VELMANS¹, S.G.J. JEUKEN-MERTENS², A.J. LUIK², W.H.M. van KUIJK²
Laboratory of Clinical Chemistry and Haematology¹, Department of Nephrology², VieCuri Medical Centre, Venlo

Introduction: PTH is measured in dialysis patients to guide management of secondary hyperparathyroidism (SHP). Recently, we introduced an automated method (Siemens Immulite 2000 iPTH) for determination of PTH in routine clinical practice. Historically, a manual method (IDS OCTEIA iPTH) was used. Both methods pretend to be fully comparable with the Nichols Allegro iPTH assay upon which the NKF/K-DOQI bone metabolism guidelines, with an optimal PTH of 16-33 pmol/L, are based.

Methods: Method comparison by Deming regression was performed on randomly selected patient samples. Routinely, we monitored the group of chronic haemodialysis patients in our hospital every three months with plasma PTH, serum albumin-corrected total calcium, serum phosphate and the calcium phosphorous product. Average population size was 80 patients.

Results: Method comparison between Immulite (y) and OCTEIA (x) revealed a slope of 2.4 and an intercept of 0.2 (n=53, R=0.977). After the switch in PTH assay, mean PTH in the group of dialysis patients shifted from 18 to 53 pmol/L. The percentage of patients with PTH values in the ranges Δ, 16-33 and >33 pmol/L shifted from 66, 18, 16% to 13, 28, 59%, respectively. Mean calcium, phosphate and calcium phosphorous product did not change significantly in this period.

Conclusion: A drift in OCTEIA and /or Immulite PTH assays has occurred. The described change in PTH assay has major implications for the individual dialysis patient with respect to medical treatment of SHP. Depending on the PTH assay used, opposite therapeutic strategies are chosen for a single patient. International effort has to be taken to standardise PTH assays and subsequently re-evaluate the NKF/K-DOQI guidelines.

86. Evaluatie gebruik 4-v-MDRD-formule

K. MOHRMANN, J.W. JANSSEN, M.H. BEUNIS

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboaratorium, Sint Franciscus Gasthuis, Rotterdam

Inleiding: Voorjaar 2006 zijn we gestart met de rapportage van de berekende klaring volgens de 4-v-MDRD formule. De berekende klaringen van het eerste half jaar hebben we vergeleken met de tegelijkertijd gemeten 24-uurs creatinine klaring.

Methode: Uitslagen van 24-uurs creatinine klaringen met bijbehorende berekende klaringen volgens de 4-v-MDRD formule (n=1258) zijn verzameld. Bij patiënten met 3 of meer aanvragen (n=125) is de spreiding binnen de klaringen berekend. Bij een groep (n=33) is met behulp van lengte en gewicht de genormaliseerde 24-uurs creatinine klaring berekend en het absolute verschil met de berekende klaring bepaald.

Resultaat: In de totale groep gaf een vergelijking tussen gemeten en berekende klaringen een brede spreiding. Echter bij patiënten met 3 of meer aanvragen was bij 74% de spreiding binnen de berekende klaring minder dan 2% en bij 94% minder

dan 5%. Bij de 24-uurs creatinine klaring was dit bij 49% minder dan 2% en bij 78% minder dan 5% (n =125). Het absolute verschil tussen de berekende en de genormaliseerde 24-uurs creatinine klaring was bij 58% van de patiënten 5 tot -5 ml/min/1,73 m² en 88% was 10 tot -10 ml/min/1,73m² (n=33). Het verschil tussen de berekende en gemeten klaring leek per patient constant.

Conclusie: Per patient wordt een lage spreiding binnen zowel de 24-uurs creatinine klaring als de berekende klaring (4-v-MDRD) gevonden. Onze resultaten suggeren dat er een patiënt afhankelijk constant verschil tussen de 24-uurs creatinine en de berekende klaring bestaat. Dit betekent dat, een grote groep patiënten, na het vaststellen van het verschil door de meting van één 24-uurs creatinine klaring, gecontroleerd kan worden met een berekende klaring totaal daarin verandering optreedt.

87. Cardiac biomarkers in dialysis patients: variations during a six month follow up

L.H.J. JACOBS¹, J. van de KERKHOF², A.M.A. MINGELS¹, V.W.C. KLEIJNEN¹, W.K. WODZIG¹, J.P. KOOMAN², M.P. van DIEIJEN-VISSE¹

Department of Clinical Chemistry¹, Department of Internal Medicine, Division of Nephrology², University Hospital Maastricht, Maastricht

Inleiding: Numerous studies have shown elevated levels of cardiac biomarkers in patients suffering from end stage renal disease (ESRD). However, few have assessed whether or not these levels vary over time. This study investigated the biological variation of several (cardiac) biomarkers during a six month longitudinal study in a cohort of ESRD patients. In addition, we compared the performance of two recently developed highly sensitive troponin assays in measuring these variations.

Methode: Blood samples from forty-four ESRD patients undergoing dialysis were drawn every two months over a period of six months. Additional samples were collected when patients were admitted to the hospital. Biomarkers studied included: hsTnT (pre-commercial high-sensitive troponin T assay, Roche diagnostics), TnI (Abbott Architect STAT TnI), BNP (Shiono-RIA), TnT and NT-proBNP (Roche elecsys). Troponin reference decision-limits were set at 0.016 µg/l for hsTnT (99th

percentile), and at 0.032 µg/l and 0.03 µg/l for TnI and TnT respectively (10% CV level)

Resultaat: Biomarker concentrations varied widely during six months of follow up. Mean and median within-patient variability during the follow-up period was: 0.056, 0.021 µg/l (hsTnT); 0.057, 0.018 µg/l (TnI); 227, 99 pmol/l (BNP) and 5412, 1091 pmol/l (NT-proBNP). Troponin measurements during the first visit showed that TnT, hsTnT and TnI levels were elevated in 48%, 100% and 27% of all cases, respectively. During the 6 month follow-up the number of patients showing elevated concentrations on at least one occasion was 84%, 100% and 41% for the aforementioned assays.

Conclusie: Measuring serum concentrations of biomarkers in ESRD patients in a longitudinal way reveals large temporal intra individual variations. In addition, the number of patients showing increased troponin levels varies widely across the different assays.

Neurologie, psychiatrie, KNO en oogheelkunde

88. Cerebrospinal fluid anti-myelin antibodies are related to MRI measures of disease activity in multiple sclerosis

M.H.J. VOGT², C.E. TEUNISSEN¹, E. IACOBÄUS³, D.A.M. HEIJNEN¹, E.C.W. BREIJ¹, T. OLSSON³, L. BRUNDIN³, J. KILLESTEIN¹, J. ten KATE², C.D. DIJKSTRA¹

Department of Molecular Cell Biology and Immunology¹, VU University Medical Center, Amsterdam, Department of Clinical Chemistry and Haematology², Maasland Hospital, Sittard, Department of Clinical Neuroscience³, Neuroimmunology unit, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Introduction: Autoreactive anti-myelin antibodies have been extensively studied as potential biomarker to monitor disease activity or progression in MS patients. However, recent studies reported contrasting results with respect to the presence of anti-myelin protein antibodies in Multiple Sclerosis (MS) and their relation with disease activity. This may be due to the heterogeneous specificity of autoantibodies in MS and the inability of most methods to detect pathogenically relevant antibodies. Here, myelin particles were used to detect anti-myelin antibodies in cerebrospinal fluid (CSF) of MS patients. Subsequently, their relation with MRI parameters was evaluated.

Methods: Anti-myelin IgG antibody reactivity was determined in CSF of MS patients (n=82) and clinically isolated syndrome (CIS) patients (n=37) using a novel flow cytometry-based assay. In addition, CSF of patients with other neurological diseases (OND, n=17), inflammatory neurological diseases (IND, n=21) and healthy controls (HC, n=22) was tested.

Results: Compared to HC, increased anti-myelin IgG antibody reactivity was most frequently found in CSF of CIS patients (46%, p=0.002), relapsing-remitting (RR) MS patients (69%, p<0.001) and secondary progressive (SP) MS patients (66%, p<0.001), together constituting 85 % of all positive CSF samples. In contrast, elevated anti-myelin IgG antibody responses were present in a minority (12%) of the primary progressive (PP) MS patients and IND patients (30%), marginally present in healthy controls (5%) and absent in OND patients (0%). Most strikingly, anti-myelin IgG antibody reactivity was related to the number of T2 lesions on brain MRI in CIS and relapse-onset MS patients ($r = 0.37$, $p = 0.007$).

Conclusion: CSF anti-myelin IgG antibodies are promising, specific biomarkers in CIS and relapse-onset MS and correlated to MR measures of disease.

89. I. Six years experience with biochemical Alzheimer's disease diagnostics

C. MULDER¹, F.H. BOUWMAN², W.M. van der FLIER², A. KOK¹, E.J. van ELK¹, Ph. SCHELTENS², M.A. BLANKENSTEIN¹

Departments of Clinical Chemistry¹ and Neurology², Alzheimer Center, VU University Medical Center, Amsterdam

Introduction: Pathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD) are senile plaques (SP) and neurofibrillary tangles (NFT), demonstrated post-mortem in brain. The definite diagnosis of AD can only be made at autopsy. To improve the ante-mortem diagnostic accuracy of AD, biochemical parameters in cerebrospinal fluid (CSF) reflecting SP, hydrophobic Abeta(1-42) (Abeta42), and NFT, total tau (Tau) and hyperphosphorylated tau (Ptau) have been employed. The robustness in time of these biomarker assays was evaluated.

Methods: We included 379 subjects, referred to our outpatient memory clinic from January 2001 till January 2007. Diagno-

sis of AD was made in multidisciplinary setting according to the NINCDS-ADRDA criteria (n=248). When clinical investigations were normal, patients were considered to have subjective complaints (n=131). The team involved in the diagnostic work up was blinded to results of CSF analyses and vice versa. For quantification of Abeta42, Tau, and Ptau, ELISAs of Innogenetics (Ghent, Belgium) were applied. The six years were divided into four periods of 18 months, and sensitivities, specificities, and cut-off values were compared. Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were drawn by plotting the true-positive rate (sensitivity) against the false-positive rate

(100-specificity). Applying a sensitivity of 85%, according to the Reagan Consensus Report, we calculated for each period the corresponding specificities and cut-off values (Medcalc V 4.30 Software (Mariakerke, Belgium).

Results: During the four time intervals, at fixed sensitivity of 85%, the specificity for Abeta42 ranged 76%-93%, for Tau

62%-84%, and for Ptau 38%-80%. The cut-off values ranged for Abeta42 493-553 ng/L, for Tau 317-387 ng/L, and for Ptau 47-57 ng/L.

Conclusion: Despite the variation over six years CSF biomarkers appear to be useful for the diagnosis of AD.

90. Tyrosine Hydroxylase Deficiency: the spectrum of its clinical, biochemical, and mutational characteristics in a series of 36 patients

M.M. VERBEEK^{1,3}, M.A.A.P. WILLEMSEN², R.A. WEVERS^{1,3}

Departments of Neurology¹ and Pediatric Neurology², Laboratory of Pediatrics and Neurology³, Radboud University Nijmegen Medical Centre

Introduction: Tyrosine hydroxylase (TH) catalyzes the conversion of L-tyrosine to L-dopa. TH deficiency (THD) is an autosomal recessive condition due to mutations in the TH gene. Originally, THD was reported as a l-dopa responsive extrapyramidal movement disorder. THD is diagnosed by neurotransmitter analysis in cerebrospinal fluid (CSF), and mutation analysis of the TH gene. THD has been reported in less than 25 patients worldwide. In this study we aim to provide the first large review on the clinical, biochemical, and mutational characteristics of THD.

Methods: In our laboratory we have a longstanding tradition on CSF neurotransmitter analysis and TH gene mutation analysis. An extensive questionnaire was sent to the physicians from all THD patients (n=36) diagnosed.

Results: It seemed appropriate to lump the phenotypical vari-

eties at presentation into three major groups: [1] infantile or childhood onset progressive ‘isolated extrapyramidal movement disorder’, [2] more complex phenotype with earlier onset, originally described as ‘neonatal encephalopathy’, and [3] ‘intermediate phenotype’. Cerebral imaging studies were generally normal. CSF homovanillic acid concentrations were always decreased, and lowest values were found in group [1]. Mutation analysis revealed many different mutations. Depending on the phenotype, the response to l-dopa varied from excellent to none.

Conclusion: Based on our extensive experience with this large group of THD patients, we conclude that this disorder does not comprise a homogeneous group, but can be differentiated into various subtypes, that differ in clinical presentation, chemical characterization and response to therapy.

91. CSF neurofilament protein analysis in the differential diagnosis of ALS

M.M. VERBEEK^{1,3}, T.S.M. REIJN¹, J. SCHELHAAS^{1,2}, W.F. ABDO¹

Department of Neurology¹, Netherlands ALS Center², Laboratory of Pediatrics and Neurology³, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen

Introduction: Cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers have been studied to differentiate between patients with Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and neurological controls, but not in comparison to clinically more relevant disorders mimicking ALS.

Methods: In this retrospective study, CSF concentrations of various brain-specific proteins were analyzed in patients with ALS (n= 32) and ALS-mimic disorders (n= 26).

Results: CSF concentrations of neurofilament light (NFL) and heavy chain (NFH_p35) were significantly higher in patients with ALS than in patients with an ALS-mimic disorder, however with maximum sensitivity and specificity of 80%. We nei-

ther observed differences in general CSF parameters (glucose, leukocyte count, total protein, lactate, and the CSF/serum albumin ratio) nor in other brain-specific proteins (including tau protein, phosphorylated-tau (Thr181) protein, amyloid beta42 protein, glial fibrillary acidic protein, S-100b, neuron-specific enolase and myelin basic protein).

Conclusion: Although CSF concentrations of neurofilaments are higher in patients with ALS, the diagnostic accuracy for differentiating ALS from ALS-mimic disorders is insufficient. Our results suggest that, in the clinical work-up of patients suspected of ALS, CSF analysis is of limited value as diagnostic tool.

92. Diagnostic accuracy of ELISA and xMAP technology for analysis of amyloid β 42 and tau proteins

M.M. VERBEEK^{1,3}, T.S.M. REIJN^{1,2,3}, M. OLDE RIKKERT^{2,4}, W.J.A. van GEEL³, D. de JONG¹

Department of Neurology¹ and Alzheimer Centre Nijmegen², Laboratory of Pediatrics and Neurology³, Department of Geriatric Medicine⁴, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen

Introduction: Cerebrospinal fluid (CSF) concentrations of amyloid β 42 (A β 42) peptides and tau proteins may serve as biomarkers for Alzheimer disease (AD). Recently, the xMAP technology has been introduced as an alternative to ELISA for measurement of these markers.

Methods: We used xMAP assays and ELISA to analyze CSF concentrations of A β 42, total tau (t-tau), and tau phosphorylated at threonine 181 (p-tau181) in samples from 69 patients with Alzheimer disease, 26 patients with vascular dementia, and 55 controls without neurological disorders.

Results: High CV values (> 28%) for the ratio of xMAP:ELISA were observed for each biomarker, indicating that a constant

correction factor cannot be applied to recalculate xMAP results into ELISA results. When a combination of CSF markers was used, the sensitivity, specificity, and area under the ROC curves for xMAP assays and ELISAs were not significantly different in differentiating Alzheimer disease patients from vascular dementia patients and controls.

Conclusion: Results obtained with xMAP assays cannot be recalculated to those from the ELISAs by the use of a constant conversion factor. With the use of analysis of a combination of A β 42, t-tau, and p-tau in CSF, however, differentiation of clinical groups is equivalent when either xMAP technology or conventional ELISA is used.

93. Proteomic profiling of cerebrospinal fluid to detect potential biomarkers for multiple sclerosis

B. PULINX¹, A.C. DUBBELMAN², J.A.P. BONS¹, M.P. van DIEIJEN-VISSE¹, R.M.M. HUPPERTS³, W.K.W.H. WODZIG¹

Department of Clinical Chemistry, Technical University Eindhoven², Department of Biomedical Engineering University Hospital Maastricht¹, Department of Neurology, Maaslandziekenhuis³, Sittard

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune inflammatory disease of the central nervous system, characterized by destruction of myelin sheaths [1]. The molecular mechanisms underlying MS remain poorly understood and the cause remains elusive. Even with magnetic resonance imaging and cerebrospinal fluid (CSF) studies, the diagnosis of MS is still based on clinical criteria [2]. The aim of the present study is to detect protein biomarkers for the diagnosis and prognosis of MS. These biomarkers can also provide insight into the mechanisms of MS.

Methods: To detect MS specific biomarkers, proteomic profiles of CSF samples from 5 relapsing remitting (RR-) MS patients and 5 control subjects were compared using surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) and two-dimensional gel electrophoresis (2-DE).

Results: Three peaks were significantly different in peak intensities between the control and RR-MS group. One peak at

m/z 6215 was significantly up-regulated in RR-MS patients compared to control subjects, without overlap. Using the 2-DE technology, seven protein spots were found to be significantly altered in the CSF and five of them were successfully identified. One protein, identified as immunoglobulin G light chain, was up-regulated in RR-MS patients. Six proteins were down-regulated and four of them were identified as isoforms of clusterin, with a molecular weight varying between 36-38 kDa and an iso-electric point varying between 4.8 - 5.2.

Conclusion: The preliminary data of this pilot study suggest that clustering and the peak at m/z 6215 are interesting proteins for further biomarker studies in CSF or serum of MS patients.

Literature:

1. Ota et al. Nature 1990; 346: 183-187.
2. Triulzi et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1998; 64 (Suppl 2): 1-92.

94. II. Six years experience with biochemical Alzheimer's disease diagnostics

C. MULDER¹, N. VERWEY², F.H. BOUWMAN², W.M. van der FLIER², A. KOK¹, E.J. van ELK¹, Ph. SCHELTENS², M.A. BLANKENSTEIN¹

Departments of Clinical Chemistry¹ and Neurology², Alzheimer Center, VU University Medical Center, Amsterdam

Introduction: To investigate the usefulness of Abeta(1-42) (Abeta42), total tau (Tau) and hyperphosphorylated tau (Ptau) as diagnostic biomarkers in cerebrospinal fluid (CSF). This may improve the ante-mortem diagnostic accuracy of Alzheimer's Disease (AD).

Methods: We included 379 subjects referred to our outpatient memory clinic from January 2001 till January 2007. Diagnosis of AD, which was blinded to the results of the CSF, was made in a multidisciplinary meeting by exclusion according to the National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) criteria. 131 subjects with subjective complaints were classified as controls and 248 subjects as AD patients. For quantification of Abeta42, Tau, and Ptau we applied EILISA kits of Innogenetics (Ghent, Belgium). Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were drawn by plotting

the true-positive rate (sensitivity) against the false-positive rate (100-specificity). Applying a sensitivity of 85%, according to the Reagan Consensus Report, we calculated the corresponding specificities and cut-off values. Correlations were calculated by Spearman. (Medcalc V 4.30 Software (Mariakerke, Belgium).

Results: At fixed sensitivity of 85% is the overall specificity for Abeta42 is 83% (95%CI: 76%-89%), for Tau 78% (95%CI: 70%-85%), and for Ptau 68% (95%CI: 60%-77%). The cut-off values were for Abeta42 550 (95%CI: 531-570) ng/L, for Tau 375 (95%CI: 325-405) ng/L, and for Ptau 52 (95%CI: 48-56) ng/L. A plot of Tau or Ptau vs Abeta42 discriminates controls from AD patients. However, Tau and Ptau are highly correlated (0.89) for AD patients as well as controls.

Conclusion: CSF biomarkers appear to be useful for the diagnosis of AD. Determinations might be limited to Abeta42 and Tau, or Abeta42 and Ptau.

95. CSF levels of PSA and PSA-ACT complexes Alzheimer Disease

S.D. MULDER¹, H. HEIJST¹, C. MULDER¹, H.M. DIJSTELBLOEM¹, C.E. HACK², M.A. BLANKENSTEIN¹, R. VEERHUIS¹

Alzheimer Center Department of Clinical Chemistry¹, VU University Medical Center, Crucell², Leiden

Introduction: Alpha1-antichymotrypsin (ACT) is found in amyloid plaques of Alzheimer's disease (AD), but not in other types of amyloid. AD patients have higher cerebrospinal fluid (CSF) levels of ACT than controls. The exact role of ACT in AD is not clear, ACT functions as a serine protease inhibitor and is able to form complexes with, and to inactivate serine proteases. Prostate specific antigen (PSA) is a serine protease mainly found complexed to ACT in serum. Aim of this study was to determine if PSA is the target protease of ACT in AD brain and if PSA-ACT complex levels in CSF can be used as biomarker for AD.

Methods: Levels of ACT and PSA-ACT in CSF and serum samples of AD patients (n= 16), mild cognitive impaired (MCI) subjects (n= 19) and controls (n=12) were determined by sandwich ELISA. Total PSA was determined in a competitive im-

munoassay and albumin with nephelometry in an array protein system. Statistical analysis was performed using SPSS software 15.0 and Medcalc V 4.30 Software (Mariakerke, Belgium).

Results: ACT-PSA complexes, and total PSA, were detectable in CSF of most male, but of only few women. PSA levels in CSF and serum highly correlated ($r=0.88$; $p<0.001$) and Passing and Bablock regression analysis showed no deviation from zero regarding the intercept. Moreover, no indications for the presence of PSA in brain tissue were found by immunohistochemical analysis. CSF levels of either ACT, PSA or PSA-ACT did not differ between AD, MCI and control groups.

Conclusion: PSA in CSF is not locally produced in the brain, but derived from the blood. Furthermore, PSA-ACT complexes are not suitable as a biomarker in AD.

96. Correlation of the CYP2D6*4 polymorphism with dose, switching and discontinuation of antidepressant use

R.H.N. van SCHAIK¹, M.J. BIJL², L.E. VISSER², M. van FESSEM¹, A. HOFMAN³, A.G. VULTO², T. van GELDER²,

J. LINDEMANS¹, B.H. STRICKER³

Departments Clinical Chemistry¹, Hospital Pharmacy², Epidemiology & Biostatistics³, Erasmus MC, Rotterdam

Introduction: Many antidepressants are metabolized by CYP2D6. The CYP2D6*4 allele represents the main genetic polymorphism in Caucasians, encoding reduced enzymatic activity. This potentially leads to increased toxicity. Most clinical studies investigating the association between CYP2D6 genotype and antidepressant use suffer from small number of patients. The current study examines the influence of the CYP2D6*4 polymorphism on tolerability of antidepressants in a large population-based cohort.

Methods: The study investigated 1.198 elderly Dutch (Rotterdam Study) who received their first antidepressant prescription between 1991 and 2005. Binary logistic regression was performed to study the association between CYP2D6*4 and switching to another antidepressant, or discontinuation of therapy within 45 days. Statistical analysis was performed using t-tests and repeated measurements analyses

Results: In users of tricyclic antidepressants (TCAs), the risk of switching to another antidepressant was significantly higher in poor metabolizers (PM; CYP2D6*4/*4) compared with extensive metabolizers (EM; CYP2D6*1/*1) individuals: adjusted OR 5.77 (95% CI 1.59, 21.03; P = 0.01). In SSRI users there was no significant difference (OR 0.91; 95% CI 0.20, 4.15; P = 0.90). Heterozygous patients did not have an increased risk of switching in either TCA or SSRI users. The mean TCA dose was significantly lower in PMs compared to EMs at the third and fourth prescription (difference 0.11 DDD, P = 0.03). In SSRI users the difference in mean dose between PMs and EMs was significant at the third prescription (0.17 DDD; P = 0.02).

Conclusion: The risk of switching to another antidepressant in TCA users is higher in CYP2D6 PMs compared to EMs. This is not found for SSRI users. The maintenance doses of antidepressants were significantly lower in PMs.

Oncologie

97. The value of an artificial neural network in the decision-making for prostate biopsies

R.P. MEIJER¹, E.F.A. GEMEN², I.E.W. van ONNA³, J.C. van de LINDEN⁴, H.P. BEERLAGE¹, G.C.M. KUSTERS²

Department of Urology¹, Laboratory of Clinical Chemistry and Haematology² and Laboratory of Pathology⁴, Jeroen Bosch Ziekenhuis, 's-Hertogenbosch, Department of Urology, University Medical Center³, Utrecht

Introduction: In the majority of the patients that are subjected to prostate biopsies, no prostate carcinoma (PCA) is found. It is important to prevent unnecessary biopsies since serious complications may occur. To evaluate the use of an artificial neural network in the outpatient-clinical setting we performed a prospective study.

Methods: Included were all patients, who underwent transrectal ultrasound-guided prostate biopsies (June06-June07) tPSA between 2-20 µg/L. Excluded were patients treated with 5-alpha-reductase-inhibitors. The following variables were used: age, tPSA, free PSA, prostate volume, digital rectal examination. The patients were divided into two groups according to their tPSA level (2-10 µg/L and 10-20 µg/L). The ANN Prostataclass from the Urology Department of the Universitätsklinikum-Charité Berlin was used with either a specificity of 95% (tPSA 2-4 µg/L)

or a sensitivity of 95% (tPSA 4-20 µg/L). The predictions of ANN were compared to the pathology results of the biopsies.

Results: 156 patients were included, with an average age of 63 years (range 49-80). Mean tPSA value was 9.3 µg/L (range 2.7-20). Overall PCA was diagnosed in 53 patients, whereas the ANN predicted 'no risk' in 19 of these patients (36%). In the ranges of both tPSA 2-10 µg/L and tPSA 10-20 µg/L, the ANN showed a positive predictive value of 46%. The specificity of the ANN for the ranges tPSA 2-10 µg/L and tPSA 10-20 µg/L was 74% and 41% respectively.

Conclusion: The ANN resulted in a false negative rate of 36%, missing PCA in 19 patients. An over 50% false-positive rate resulted in unnecessary biopsy-procedures in 40 patients. This ANN is insufficient to predict the risk of presence of PCA reliably, for use in an outpatient-clinical setting.

98. Multiparameter flow cytometric analysis of lymphomas: a complementary technique in the diagnostic work-up of these entities

M.P.G. LEERS¹, P.L.H.M.H. THEUNISSEN², N. van de VIJVER², R. CLARIJS², M. NAP²

Department of Clinical Chemistry & Hematology¹, Department of Pathology², Atrium Medical Center Parkstad, Heerlen

Introduction: Surgical biopsy examination completed with immunohistochemistry is at the moment the gold standard for lymphoma diagnostics. The aim of the present study was to evaluate the complementary role of multiparameter flow cytometry in diagnosis and classification of lymphomas.

Methods: From fresh, unfixed lymph node samples suspected for lymphoma, a representative piece was processed for flow cytometric immunophenotyping. The remaining part was routinely processed and analysed by the pathologists. The fresh piece was processed for a 6-color, 8-parameter flow cytometric analysis (FCM) using a fixed 6-tube panel. Both groups of investigators were blindly from the results of each other.

Results: There were 45 consecutive samples included in this study. Cases were classified as reactive (n= 7), small lymphocytic lymphoma (n=2), follicular lymphoma (n= 12), mantle cell lymphoma (n= 3), diffuse large B-cell lymphoma (n= 5), Hodgkin lymphoma (n= 10), T-cell rich B-cell lymphoma

(n=1), peripheral T-cell lymphoma (n=1), nodal marginal zone B-cell lymphoma (n=1) and lymphoma due to metastatic adenocarcinoma (n=3). In 41 out of 45 patients, results of histopathology and FCM complemented each other well. In one patient, there was a major diagnostic discordance: a peripheral T-cell lymphoma versus a reactive lymphoma. Another diagnostic discordant lymphoma concerned a T-cell rich B-cell lymphoma (flow cytometric interpreted as a reactive lymphoma). The other 2 cases concerned sampling errors due to extracapsularly localised pathological processes.

Conclusion: Multiparameter flow cytometric analysis combined with morphology is an accurate and complementary technique in the diagnosis and classification of B-cell non-Hodgkin lymphomas, as well as for Hodgkin lymphomas. Flow cytometric immunophenotyping offers rapid and sensitive detection of many antigens for which antibodies may not be available for routinely processed formalin-fixed, paraffin embedded samples.

99. Circulating PSA-containing macrophages as a possible target for the detection of prostate cancer: a three-colour/five-parameter flow cytometric study on peripheral blood samples

M.P.G. LEERS¹, M. NAP², R. HERWIG³, K. DELAERE⁴, F. NAUWELAERS⁵

Department of Clinical Chemistry & Hematology¹, Department of Clinical Pathology², Atrium Medical Center Parkstad, Heerlen, Department of Urology³, Medical University Vienna, Austria, Department of Urology⁴, Atrium Medical Center Parkstad, Heerlen, The Netherlands, BD Biosciences⁵, Erembodegem, Belgium

Introduction: A major problem with the use of serum prostate-specific antigen (PSA) in predicting prostate cancer risk is the considerable diagnostic uncertainty. The purpose of the study was to: (1) detect circulating macrophages which have phagocytised fragments (e.g. PSA) of prostate tumour cells, and (2) determine if the number of these circulating PSA-containing macrophages can help differentiating between benign and malignant prostate disease.

Methods: From a 3 ml peripheral blood sample, mononuclear cells (PBMCs) were isolated and collected. After labelling the macrophages with CD14-APC and CD16-FITC, phagocytised PSA was detected by incubating the cells with a PE-conjugated PSA MoAb using a Fix&Perm strategy. Flow cytometric analysis was performed.

Results: A significant difference was observed in the number of activated macrophages (CD14+/CD16+) between malignant

conditions ($28.8\% \pm 13.0\%$) and benign conditions ($17.3\% \pm 6.8\%$) ($p < 0.0001$). Furthermore, a significant increase was detected in the number of PSA-containing macrophages in patients with prostate cancer ($17.7\% \pm 12.3\%$) vs. patients with a benign disorder ($3.6\% \pm 1.9\%$) ($p < 0.0001$). Additionally, a significant increase was found between patients with a localised ($10.5\% \pm 3.4\%$) vs. a metastasized prostate carcinoma ($26.3\% \pm 14.3\%$) ($p = 0.0002$).

Conclusion: A new method is presented for the detection of circulating PSA-containing macrophages using a flow cytometric assay of peripheral blood samples. This method can be suitable for differentiating between prostate cancer and benign conditions, potentially even providing a distinction between low-risk and more aggressive prostate cancer. This new concept of the assay can also be used for other kinds of tumours by replacement of PSA by other relevant tumour markers in combination with activated macrophages.

100. Hyperlipidemia and falsely lowered sodium concentration in patients treated by allogeneic stem cell transplantation

P.W. SCHENK, J.G. BOONSTRA

Department of Clinical Chemistry, Erasmus MC - Daniel den Hoed Cancer Centre, Rotterdam

Introduction: Case studies have shown that extreme hyperlipidemia causing (pseudo)hyponatremia may be a complication of allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT). Possible aetiologies include medication and chronic liver graft-versus-host disease (GVHD; ref). Here we present three new cases of severe hyperlipidemia and (falsely) lowered plasma sodium associated with non-liver GVHD.

Methods: Medical history and medication were carefully examined. Plasma sodium concentrations were measured by indirect and direct potentiometry on an Integra 800 analyser (Roche Diagnostics) and ABL-805-FLEX blood gas analyser (Radiometer), respectively. Plasma lipid indices and concentrations were measured on the Integra.

Results: All cases had a history of myeloid leukaemia for which allo-SCT was part of the treatment. Medication included cyclosporine, mycophenolate, sirolimus, tacrolimus and/or prednisolone. CASE I was a 37-year-old woman with grade IV skin and gastro-intestinal GVHD. At one point, plasma sodium was

141 mmol/L by indirect and 147 mmol/L by direct potentiometry, at a lipid index of 3084 (reference value Δ), triglycerides >9 mmol/L, bilirubin 212 μ mol/L and grossly elevated liver enzymes. CASE II was a 42-year-old man with sodium 137 mmol/L by indirect and 141 mmol/L by direct measurement; lipid index 717, triglycerides 6.5 mmol/L, bilirubin 27 μ mol/L, and liver enzymes mildly elevated. He died from gastro-intestinal GVHD. CASE III was a 52-year-old man with biopsy-proven chronic gastro-intestinal GVHD. Plasma sodium was 133 and 134 mmol/L (indirect and direct potentiometry, respectively); lipid index 236, cholesterol 9.8, and triglycerides 7.3 mmol/L.

Conclusion: These cases underline the prominence of hyperlipidemia and (falsely) lowered plasma sodium after allo-SCT and illustrate the association with non-liver GVHD. This combination may be more common than previously anticipated.

Literature: Turchin et al. Bone Marrow Transplant 2005; 35: 85-89.

101. The detection of transketolase TKTL1 inside activated macrophages offers new diagnostic opportunities for the detection and monitoring of malignant processes

M.P.G. LEERS¹, M. KERENS¹, M. NAP²

Department of Clinical Chemistry & Hematology¹, Department of Pathology², Atrium Medical Center Parkstad, Heerlen

Introduction: Recently, a novel transketolase-like enzyme called TKTL1 has been described. TKTL1 upregulation in tumors leads to enhanced, oxygen-independent glucose usage and lactate-based matrixdegradation. Strong TKTL1 protein expression was correlated to invasiveness and to poor patients outcome. Tumors demonstrate continuous turnover of cells, after which these cells/parts of them will be phagocytized by macrophages. The goal of this study is to determine if TKTL1 in activated macrophages (AM) can be reliably measured in patients with TKTL1-overexpressing tumors.

Methods: Blood samples were taken from healthy persons (n=21) as well as from patients with benign as wells as malignant tumor processes (n= 53). From this blood sample, mononuclear cells (PBMCs) were isolated and collected. After labelling

macrophages with CD14-APC and CD16-FITC, intracellular TKTL1 was labeled. Flow cytometric analysis was performed.

Results: There was no significant difference in the fraction of TKTL1-containing AM between healthy persons (mean $8.2\% \pm 2.9\%$) and patients with benign disorder (mean $9.4\% \pm 4.1\%$). The fraction TKTL1-containing macrophages was significant increased ($p < 0.0001$) in patients with a malignancy (mean $24.8\% \pm 18.3\%$) compared to healthy persons. This increase was also significant comparing it with patients with a benign disorder ($p < 0.0001$). In 19 out of 32 patients with a malignancy this fraction was more than 15%. These patients had also a tumor which showed overexpression of TKTL1.

Conclusion: A new method is presented for the detection of circulating TKTL1-positive macrophages using a flow cyto-

metric assay of peripheral blood samples. This method can be suitable for differentiating between malignant and benign conditions. Because more than 50% of malignant tumors shows

overexpression of TKTL1, the concept of this assay can be used for monitoring these patients receiving therapy for a TKTL1-overexpressing tumor.

102. Casus: multidisciplinaire diagnostiek en follow-up van een patiënt met acute myeloïde leukemie (AML-M4eo)

J. de JONGH-LEUVENINK¹, M.H.A. HERMANS², N.C.V. PÉQUÉRIAUX¹

Laboratorium voor Klinische chemie en Hematologie¹, Moleculaire Diagnostiek², Jeroen Bosch Ziekenhuis, 's Hertogenbosch

Inleiding: Een 21-jarige man werd opgenomen met opgezette klieren in de oksel en de hals. Laboratoriumonderzoek liet een forse leucocytose zien van $144 \cdot 10^9/l$ met 83% blasten. Er was sprake van een acute leukemie. Beenmergonderzoek en chromosomaal onderzoek werden ingezet. Morfologisch was er sprake van een acute myeloïde leukemie met verhoogd aantal eosino-fiele granulocyten met basofiele korreling. Dit beeld past bij een AML-4eo. Moleculaire diagnostiek, cytogenetica en immuno-fenotyping bevestigden deze diagnose met een cytogenetische afwijking, inversie 16.

Methode: Patiënt werd in studieverband behandeld en na de eerste inductie kuur was er sprake van remissie. De hoeveelheid CBFb-MYH11 fusietranscript (als gevolg van inv 16) werd ver-

volgd in beenmergspiraat later in perifeer bloed. Na circa 8 maanden bleek dat de hoeveelheid fusietranscript in perifeer bloed begon te stijgen en na afname van beenmerg bleek er sprake te zijn van een AML4-eo recidief met 6% blasten.

Resultaat: Patiënt met een AML-4eo volgens WHO een AML met cytogenetische afwijking werd gediagnosticeerd lokaal en vervolgd tijdens behandeling met moleculair biologische technieken. Dit resulteerde in het vroegtijdig herkennen van een recidief. Deze mutatie staat bekend als prognostisch gunstig.

Conclusie: Door AML patiënten op deze wijze te vervolgen kan eerder herkend worden dat er sprake is van een recidief en adequate worden gehandeld.

103. Evaluatie van flowcytometrische analyse van gefixeerde lymfklierbiopen

H.H.M. EIDHOFF¹, J. van BAARLEN², R.W.L.M. NIJESSEN¹

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Ziekenhuisgroep Twente, Laboratorium Pathologie Oost-Nederland², Almelo, Enschede

Inleiding: Bij lymfoomvraagstellingen analyseert de patholoog biopen m.b.v. histo- en immunohistochemische kleuringen. De intensiteit van immunohistochemische kleuringen is soms lastig te beoordelen waardoor aanwezigheid van monoclonaliteit of specifieke CD-markers niet altijd goed is vast te stellen, dit in tegenstelling tot flowcytometrische analyse. Onderzocht is of flowcytometrische analyse op gefixeerd lymfoommateriaal een toegevoegde diagnostische waarde heeft.

Methode: Van 51 ongefixeerde biopen met lymfoomvraagstelling is een 2 mm groot fragment mild gefixeerd in een formaldehyde/PBS oplossing, waarna binnen 48 uur een op juiste concentratie celsuspensie flowcytometrisch geanalyseerd werd met een screenend 5-kleuren panel. Markerverlies is gedurende 7 dagen vervolgd op controlepreparaten.

Resultaat: Bij houdbaarheidstesten bleven celconcentraties en percentage lymfocytensubpopulaties gedurende 7 dagen constant, terwijl fluorescentie-intensiteit van enkele antistoffen

wel verminderde. De lymfklierbiopen werden als volgt door de patholoog uitgeboekt: 18 reactief, 16 NHL, 10 HL en 7 niet-hematologisch. De toegevoegde waarde van de flowcytometrische analyse lag in het ondersteunen van het reactieve beeld (afwezigheid van monoclonaliteit), en bij NHL in het aantonen van clonaliteit (B-NHL) en subtypering.

Conclusie: Als gevolg van mild fixeren en bewaren van het biopsiemateriaal treedt slechts gering markerverlies op, echter niet leidend tot onderwaardering van expressie. Op deze manier kan materiaal ook na 48 uur goed flowcytometrisch geanalyseerd worden. Hoewel veelal de pathologische analyse voldoende conclusief bleek, bleek een toegevoegde waarde van de flowcytometrische analyse bij intensiteitsbepaling van aankleuringen, enkele specifieke markers (CD5, CD10, CD23), bevestigen van onverwachte immunohistochemische bevindingen (CD15 bij een T-ALCL), samengesteld lymfoom (kleincellig B-celllymfoom en klassiek Hodgkinlymfoom) en monoclonaliteits-analyse.

104. The clinical impact of the new PSA WHO standardisation on prostate biopsy rates and prostate cancer detection

R.H.N. van SCHAIK¹, F.H. JANSEN², M. ROOBOL², C.H. BANGMA²

Departments Clinical Chemistry¹ and Urology², Erasmus MC Rotterdam

Introduction: The WHO-96/670 reference preparation for total PSA was introduced to improve the interchangeability of the various tPSA assays. However, clinicians may be unaware that the replacement of their historical tPSA standard with the WHO calibration causes a shift in mass units, posing substantial problems in interpreting tPSA results. Our aim was to investigate the relationship between the Hybritech and WHO-96/670 calibration and to assess the impact of the WHO calibration on prostate cancer (PCa) detection.

Methods: tPSA was determined in 106 serum samples using both Beckman Coulter Access Hybritech and WHO 96/670 calibrations. The established relationship between both standards was used for an in silico experiment in a cohort of 2,283 unscreened asymptomatic men. Differences in prostate biopsy rates, PCa detection and PCa characteristics of the missed cancers were calculated while maintaining a biopsy threshold of 4.0 ng/mL for both calibrations.

Results: A linear relationship between the tPSA Hybritech and WHO-96/670 calibrations was observed, resulting in a 20% decrease in tPSA values when the WHO-96/670 standard was used. Application of the WHO-96/670 calibration on the cohort of unscreened men resulted in a 32% decrease in the number of prostate biopsies and a 31% increase in missed cancers when compared with the original Hybritech calibration. Biopsy and PCa detection rates were similar after correcting the biopsy threshold for the WHO-96/670 standard, according to the linear relationship between the two calibrations.

Conclusion: The present study shows that if the threshold for prostate biopsy is not adapted, the application of the WHO-96/670 standard for tPSA significantly decreases PCa detection, with potential consequences at the level of the individual patient.

Acute zorg, IC, toxicologie

105. Modification of treatment based on laboratory results: Agranulocytosis with a relative eosinophilia as a side effect of anti-psychotics

N.A. BOTTA¹, M.A.A. ENGELS², J.E. de VRIES^{2,3}

Department of Clinical Pharmacology¹, Clinical Chemistry and Hematology², St. Jans Gasthuis Hospital, Weert,
Department of Clinical Chemistry and Hematology³, Laurentius Hospital, Roermond

Introduction: A routine hematology request showed an unusual combination of a severe agranulocytosis ($0.02 \times 10^9/L$; ref > $1.5 \times 10^9/L$) with a relative large number of eosinophils ($0.37 \times 10^9/L$; ref < $0.6 \times 10^9/L$) and a normal total white blood count ($3.2 \times 10^9/L$; ref > $3.1 \times 10^9/L$).

Methods: Full blood count was performed with a Cell-Dyn 4000.

Results: A literature search revealed an association of treatment with antipsychotics and agranulocytosis combined with eosinophilia (1). Our patient (female, 82 y.) was treated with haloperidol. The hospital pharmacist was notified and immediately informed the patient's physician. Prescription of haloperidol was terminated. A routine hematology white blood cell count and differentiation was again requested after two days. Agranulocytosis was still present but less severe ($0.71 \times 10^9/L$).

The number of eosinophils was marginally decreased ($0.28 \times 10^9/L$). At that moment, a bacterial infection of the bladder was also present. Hence, whether the increase in the number of granulocytes is due to the termination of haloperidol prescription or to the bacterial infection is difficult to tell. However, the full blood count was completely normalised ten days after withdrawal of haloperidol.

Conclusion: This casus illustrates the importance of a close collaboration between the clinical chemist, the hospital pharmacist and the physician for an optimal treatment of the patient.

Literature :

1. Ames et al. J Clin Psychiatry. 1996; 57: 579.
2. Deel IB1 Haldol, Janssen-Cilag: <http://www.cbg-meb.nl/IB-teksten/>

106. Zoals het klokje thuis tikt, tikt het nergens

A.A.A. van der LINDE¹, C. LEWISZONG-RUTJES¹, A. VERRIPS², J.W.J. van der STAPPEN³, G.P.J.M. GERRITS¹
Afdeling Kindergeneeskunde¹, Kinderneurologisch centrum², Afdeling Klinische Chemie³, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen

Inleiding: Een 11-jarig meisje werd opgenomen met 7 weken bestaande klachten van rugpijn, anorexie, gewichtsverlies, confabulaties en vreemd gedrag. Bij lichaamelijk onderzoek was er sprake van een tremor, cachexie, hypertensie, bradyfrenie en bizarre gedrag. Het tandvlees was fors ontstoken en alle gebits-elementen van de mandibula zaten los. Haar handen waren erythemaous en lieten desquamatie zien, haar vingertoppen waren roze. Differentiaal diagnostisch werd gedacht aan een vasculitis of encefalitis, intoxicatie, auto immuunstoornis of een ruimte innemend proces.

Methode: Aanvullend laboratoriumonderzoek liet aanwijzingen voor een infectie zien (CRP 98 mg/l, leukocyten $17,5 \times 10^9/L$, bezinking 11 mm/uur), de achtergrondactiviteit van het EEG was opvallend traag, zonder irritatieve fenomenen. Een cerebrale CT en MRI scan toonde geen afwijkingen.

Resultaat: Tijdens opname verloor patientje een zestal gebits-

elementen. Hierna werd er gedacht aan een kwikintoxicatie wat bevestigd werd door de aanvullende anamnese: 8 weken voor opname was er een kwikhoudende thermostatische klok kapot gevallen. Moeder had de kwikbolletjes met een stofzuiger opgezogen. De waarschijnlijkheidsdiagnose kwikintoxicatie werd gesteld en er werd direct gestart met chelatie-therapie, aanvankelijk intraveneus, later oraal. De diagnose werd bevestigd met het bepalen van de kwikconcentratie in de urine (1).

Conclusie: Een gedegen anamnese is cruciaal in het diagnostisch traject van complexe morbiditeit waarbij met name gedragsveranderingen verwijzen naar een mogelijke kwikintoxicatie.

Literatuur:

1. Clin Pediatr (Phila) 2007; 46(9): 844-6.
2. Epub 2007 Jul 19. Mercury intoxication: lack of correlation between symptoms and levels. Gattineni et al.

107. Cyanose bij een pasgeborene

H.M. BRANTJES¹, L.E.M. NIERS², P.A.W.A. RENARDEL de LAVALETTE², D. van LOON¹, H.J.T RUVEN¹
Afd. Klinische Chemie¹, Kindergeneeskunde², St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein

Inleiding: Een pasgeborene werd opgenomen op de afdeling neonatologie met een onbegrepen cyanose. Initieel werd gedacht aan een neonatale infectie, met een krappe zuurstofsaturatie van 92% die niet verbeterde bij toediening van zuurstof. Er was geen sprake van dyspneu en mogelijke oorzaken als sepsis of cardiale afwijkingen werden uitgesloten. Onder verdenking van methemoglobinemie werd in een arterieel bloedgas 33% methemoglobine aangetoond. De neonaat werd overgeplaatst naar de NICU van een academisch centrum, waar de methemoglobinemie normaliseerde.

Methode: Zuurstofsaturatie (sO_2Hb) en -fractie (fO_2Hb) werden gemeten door middel van pulsoximetrie en co-oximetrie.

Resultaat: Als oorzaak van een verworven methemoglobinemie dient aanwezigheid van oxiderende stoffen overwogen te worden. Het is bekend dat gebruik van prilocaine en verwante stof-

fen kunnen leiden tot methemoglobinemie. In dit geval is toediening van prilocaine aan de moeder durante partum de enige aanwijzing voor het ontstaan van de methemoglobinemie bij de pasgeborene. Tevens illustreert de casus het belang van het bepalen van fractie zuurstofgebonden hemoglobine (fO_2Hb) naast de zuurstofsaturatie (sO_2Hb). Immers, de saturatie wordt berekend op een wijze waarbij de dysfunctionele vormen van hemoglobine niet meegenomen worden, waardoor bij aanwezigheid van methemoglobinemie de zuurstofbindende capaciteit van het hemoglobine wordt overschat.

Conclusie: Significante methemoglobinemie bij een pasgeborenen door toediening van prilocaine aan de moeder gedurende de partus. Rapportage van de fO_2Hb naast sO_2Hb blijft aanbevolen om mogelijke aanwezigheid van dyshemoglobines vroeg te herkennen.

108. Opioid analgesia in neonates and infants depends on COMT and OPRM1 genotype

R.H.N. van SCHAIK¹, S.H.P. SIMONS², M. van der WERF¹, M. van DIJK², H.J. DUVENVOORDEN⁴, C.D. van der MAREL², J.K. ZUBIETA^{5,6}, R.A. van LINGEN⁷, D. TIBBOEL², J. LINDEMANS¹, J.N. van den ANKER^{3,8,9}
Departments of Clinical Chemistry¹, Pediatric Surgery², Pediatrics³ and Medical Psychology⁴, Erasmus MC - Sophia Children's Hospital, Rotterdam, The Netherlands, Departments of Psychiatry and Radiology⁵ and Mental Health Research Institute⁶, University of Michigan, USA, Department of Pediatrics⁷, Division of Neonatology, Isala Clinics, Zwolle, The Netherlands, Division of Pediatric Clinical Pharmacology⁸, Children's National Medical Center, Washington DC, USA, Departments of Pediatrics⁹, Pharmacology and Physiology, George Washington University School of Medicine and Health Sciences, Washington DC, USA

Introduction: Neonates and infants show large inter-individual differences in morphine requirements for adequate analgesia. This requirement is currently determined based on visual analog scale (VAS) scores obtained by trained nurses. Because of the harmful effects of overdosing or undertreatment, predictive factors for morphine requirement in this important group of young patients are potentially of great clinical value. As genetic studies on morphine requirements in neonates and infants are currently not available, the potential role of genotyping for single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the μ -opioid receptor (OPRM1) and the catechol-O-methyltransferase (COMT) genes was investigated with respect to morphine requirement.
Methods: 385 patients from three prospective randomized controlled trials were included: (I) Continuous morphine versus placebo in ventilated newborns, (II) Continuous morphine with/without acetaminophen supplementation after major surgery

in infants <1 year, (III) Continuous versus intermittent morphine after surgery in infants <3 years. DNA was analyzed for OPRM1 118A>G (asn40asp) and COMT val158met polymorphisms. Morphine dosing was tailored to the infants' individual needs as assessed by validated pain assessment scores taken by trained nurses.

Results: Additional morphine was positively correlated with the 118G (40asp) OPRM1 allele (OR=6.1; 95% CI 1.35-27.4; p=0.019) and negatively correlated to the 158met COMT allele (OR=0.19; 95% CI 0.043-0.87; p=0.032).

Conclusion: This is the first study investigating the impact of OPRM1 and COMT genes on morphine requirements in infants and newborns. Both OPRM1 and COMT genetic polymorphisms changed significantly the morphine requirements in this group of patients, indicating the potential contribution of genetics in predicting inter-individual differences in opioid analgesia.

Erfelijke stofwisselingsziekten

109. Neonatale screening nieuwe stijl en het belang van direct enzymonderzoek in lymfocyten om onderscheid te maken tussen terecht- en fout-positieven

R.J.A. WANDERS, J.P.N. RUITER, M. DOOLAARD, N.G.G.M. ABELING, M. DURAN, A.B.P. van KUILENBURG, W. KULIK, H.R. WATERHAM
Afdeling Klinische Chemie en Kindergeneeskunde, Lab Genetische Metabole Ziekten, Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam

Inleiding: Per 1 januari 2007 is de neonatale screening in Nederland uitgebreid met een groot aantal "nieuwe" ziekten. Een algemeen erkend probleem is het voorkomen van foutpositieven. Om die reden hebben wij gezocht naar een methode die simpel en snel onderscheid maakt tussen terecht- en foutpositieven.

Methode: Lymfocyten worden door middel van dichtheidsgradient centrifugatie geïsoleerd, waarna de activiteit van de verschillende enzymen direct (met behulp van spectrofotometrie) of indirect (incubatie, gevolgd door bepaling van het product van de enzymreactie met behulp van HPLC, wel of niet gekoppeld aan tandem-MS) gemeten wordt.

Resultaat: In de voorbije periode hebben wij een groot aantal aanvragen gehad in het kader van de neonatale screening nieuwe stijl, waarbij het met name ging om vraagstellingen in het kader van galactosemie (n = 91), biotinidase deficiëntie (n=22)

en MCAD deficiëntie (n = 16). Wat betreft galactosemie kan gezegd worden dat er slechts één patiënt met een volledige deficiëntie werd gevonden, met daarnaast veel (n = 39) partiële deficiënties, die waarschijnlijk geen klinische consequenties hebben. Voor wat betreft biotinidase deficiëntie werd ook één volledige deficiëntie gevonden, met daarnaast veel (n = 15) partiële deficiënties. Elf van de 16 patiënten, ingestuurd voor MCAD-deficiëntie, bleken inderdaad deficiënt.

Conclusie: In alle gevallen, behalve aanvragen voor wat betreft LCHAD MTP-deficiëntie, leidde directe analyse van het betreffende enzym tot eenduidige conclusies omtrent het wel of niet deficiënt zijn van een bepaalde patiënt. Geconcludeerd wordt dat directe enzymanalyse in lymfocyten goed onderscheid kan maken tussen terecht en fout positieven.

110. Identification and cloning of a novel splice variant of the creatine transporter gene SLC6A8

C. MARTÍNEZ MUÑOZ, E.H. ROSENBERG, C. JAKOBS, G.S. SALOMONS
Department of Clinical Chemistry, Metabolic Unit, VU University Medical Center, Amsterdam

Introduction: SLC6A8 deficiency is caused by mutations in the X-linked creatine transporter gene (SLC6A8, CTR1), which lead to cerebral creatine deficiency, mental retardation, speech and language delay, autistic-like behavior and epilepsy. Insight in the mechanisms how the transporter is regulated is largely unknown and could be of importance for the development of successful treatment strategies of SLC6A8 deficiency. In 1995 a novel splice variant of SLC6A8 (CTR2) with unknown function was reported by Barnwell and coworkers (Barnwell et al., 1995). We thought to investigate whether this mRNA could represent a regulator of CTR1.

Methods: We investigated by RT-PCR whether the CTR2 mRNA was present in primary fibroblasts from different non-SLC6A8-deficient subjects using specific CTR2 primers.

Results: Surprisingly, we did not find the expected CTR2 mRNA, instead we found a shorter mRNA which we named CTR4. CTR4 was also expressed in different human tissues, including brain and skeletal muscle. The 5' UTR sequence of CTR4 was identified using the Smart TM Race cDNA amplification kit (Clontech). The CTR4 mRNA contains intron 4 and exons 5 to 13 including the 3' UTR of the SLC6A8 sequence. Using the NCBI open reading frame (ORF) finder program a shorter ORF 100 %

homologous to SLC6A8 was found, which predicts a truncated CTR1 protein, comprising only 5 transmembrane domains of CTR1. We cloned CTR4 as a fusion protein with EGFP. CTR4-

EGFP protein could be detected by Western Blot analysis.

Conclusion: Currently we are investigating the function of CTR4 and its putative effects on CTR1.

111. Detection of low-level somatic and germline mosaicism by denaturing high performance liquid chromatography in a EURO-MRX family with SLC6A8 deficiency

O.T. BETSALEL¹, J.M. van de KAMP², C. MARTÍNEZ-MUÑOZ¹, E.H. ROSENBERG¹, A.P.M. de BROUWER^{5,6}, P.J.W. POUWELS³, M.S. van der KNAAP⁴, G.M.S. MANCINI⁷, C. JAKOBS¹, B.C.J. HAMEL^{5,6}, G.S. SALOMONS¹
Departments of Clinical Chemistry, Metabolic Unit¹, Clinical Genetics², Physics and Medical Technology³, Child Neurology⁴, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands. Department of Human Genetics⁵, Radboud University Nijmegen Medical Center, Nijmegen, The Netherlands, Department of Clinical Genetics⁷, EURO-MRX consortium⁶, Erasmus University MC/Sophia Children's Hospital, Rotterdam

Introduction: Creatine transporter deficiency is an X-linked mental retardation disorder, caused by mutations in the creatine transporter gene, SLC6A8. This study indicates DHPLC as an important tool in the detection of low-level mosaicism, as does it illustrate the importance of considering somatic and germline mosaicism in the case of apparent de novo mutation.

Methods: By DNA sequence analysis of the creatine transporter gene we analyzed 66 DNAs of males with presumed X-linked mental retardation. Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) was used to investigate the presence of somatic mosaicism in DNA of the mother of a patient with a novel SLC6A8 mutation.

Results: In a European Mental Retardation Consortium panel

of 66 patients, we identified a male with mental retardation, caused by a c.1059_1061delCTT; p.Phe354del mutation in the SLC6A8 gene. With the use of direct DNA sequencing, the mutation was also found in the brother of the proband, but not in their mother. However, by analyzing EDTA blood of the mother with denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC), we could show that the mother displays low-level somatic mosaicism for the three base-pair deletion.

Conclusion: This study indicates DHPLC as an important tool in the detection of low-level mosaicism, as does it illustrate the importance of considering somatic and germline mosaicism in the case of apparent de novo mutation.

112. Hepcidin levels are innately low in HFE-related hemochromatosis but differ between C282Y-homozygotes with elevated and normal ferritin levels

B.A.C. van DIJK¹, J.M.M. LAARAKKERS¹, S.M. KLAVER¹, E.M.G. JACOBS^{1,2}, L.J.H. van TITS²,
M.C.H. JANSSEN², J.L. WILLEMS¹, D.W. SWINKELS¹

Department of Clinical Chemistry¹, Department of General Internal Medicine², Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen

Introduction: HFE C282Y homozygosity confers a high risk for iron overload. This has been explained by the observation of low mRNA and urine hepcidin levels in mice and man, leading to increased iron levels.

Methods: In the current study, serum hepcidin levels of newly diagnosed HFE C282Y homozygotes with (N=15) and without (N=7) elevated serum ferritin levels were compared to levels in controls carrying (N=20) and without (N=20) the mutation. In addition, hepcidin levels of 4 C282Y homozygotes were investigated during phlebotomy treatment.

Results: Serum hepcidin levels were lower in HFE C282Y homozygotes (1.92 ± 1.22 nmol/L) compared to heterozygotes

(4.37 ± 4.57 nmol/L) and non-carriers of the mutation (3.76 ± 3.10 nmol/L). Of homozygotes, those with elevated serum ferritin had higher serum hepcidin and lower hepcidin/ferritin ratios than those with normal ferritin (2.37 ± 1.21 nmol/L hepcidin vs. 0.96 ± 0.49 nmol/L, and $4.61 \pm 2.63 \times 10^{-3}$ nmol hepcidin/ μg ferritin vs. $12.4 \pm 6.20 \times 10^{-3}$ nmol/ μg). Serum hepcidin decreased during the depletion phase of phlebotomy and remained low during maintenance.

Conclusion: This study confirms the biological model that in HFE-hemochromatosis serum hepcidin is innately low, but can still be regulated by iron stores and erythropoiesis. Serum hepcidin levels might prove useful for diagnosis and prediction.

113. Opsporingsprogramma 'Familiale Hypercholesterolemie': de praktijk

J. PRINS¹, A.J.B. van OPDORP¹, I. KINTDT²

Albert Schweitzer Ziekenhuis Dordrecht & RIVAS Beatrix Ziekenhuis Gorinchem¹, Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium, Stichting Opsporing Erfelijke Hypercholesterolemie² (StOEH), Amsterdam

Inleiding: In Nederland hebben naar schatting 40.000 personen Familiale Hypercholesterolemie (FH). FH wordt gekenmerkt door een vroegtijdig voorkomen van hart- en vaatziekten (HVZ). Tijdig starten met cholesterolsynthese remmers doet dit risico aanzienlijk afnemen. Sinds 2003 voert de StOEH, samen met het RIVM en met subsidie van het ministerie van VWS, een bevolkingsonderzoek uit met als doel het vroegtijdig opsporen van alle FH-patiënten. Hierbij wordt gebruik gemaakt van DNA diagnostiek (LDL-receptor mutatie-analyse) en familiecascade screening.

Methode: Om huisartsen op potentiële FH-patiënten te attenderen is binnen het laboratorium informatie systeem (LIS-MCS) een regel aangemaakt waarmee, bij een patiënt met een cholesterol > 8,0 mmol/l en triglyceriden < 1,5 mmol/l, eenmalig een

attenderingsbrief wordt verstuurd. Hierin treft men informatie aan over een vervolgspakket ter uitsluiting van secundaire oorzaak van hypercholesterolemie (TSH, creatinine, eiwit in urine, ALAT, glucose) en een verwijzing naar het FH beslischema op www.stoeh.nl (o.a. voor LDL-receptor mutatie analyse).

Resultaat: Gedurende 4 maanden (augustus–november 2007) zijn 93 attenderingsbrieven verstuurd. Tot nu toe is bij 37/93 patiënten vervolg diagnostiek ingezet, waarbij bij 18/37 patiënten een substantiële daling van de cholesterolwaarde (> 1,5 mmol//) werd waargenomen, waarschijnlijk veroorzaakt door het voorschrijven van cholesterolsynthese remmers. Slechts voor 3/93 patiënten werd, na uitsluiting van secundaire oorzaak, materiaal ingestuurd voor LDL-receptor mutatie-analyse.

Conclusie: Het risico op vroegtijdige HVZ bij FH-patiënten is substantieel te verlagen door het op jonge leeftijd opsporen en behandelen van FH-indexpatiënten en hun familieleden. Door optimaal gebruik te maken van LIS-faciliteiten kan het FH-

bevolkingsonderzoek ondersteund worden. Uit deze pilot blijkt dat, naast het voorschrijven van cholesterolsynthese remmers, nog onvoldoende belang wordt gehecht aan de genetische identificatie van FH-patiënten en hun familie.

Overigen

114. Supplementation of docosahexaenoic (DHA) and arachidonic acid (AA) in pregnancy improves breast milk DHA and AA status

S.A. van GOOR¹, D.A.J. DIJCK-BROUWER², I.A. MARTINI², A. SCHAAFSMA³, F.A.J. MUSKIET²

Pathology and Laboratory Medicine¹ and Laboratory Center², Friesland Foods³, University Medical Center Groningen, Leeuwarden

Introduction: The long chain polyunsaturated fatty acids (LCP) AA (20:4ω6) and DHA (22:6ω3) are components of phospholipids, precursors of eicosanoids and modulators of gene expression. DHA and AA compete for incorporation, at least in some compartments. Dietary DHA increases milk DHA, but may decrease AA. It is unknown whether dietary AA increases milk AA. We investigated whether a DHA+AA supplement improves both milk DHA and AA.

Methods: Women received DHA (220 mg+270 mg linoleic acid), DHA+AA (220 mg+220 mg) or placebo (530 mg linoleic acid), from the sixteenth week of pregnancy till twelve weeks postpartum. Using gas chromatography, we determined the fatty acid compositions (gram%) of untimed fractions of breast milk collected at two (hm2) and twelve weeks (hm12) postpartum.

Results: DHA vs. Placebo: DHA increased DHA and LCPω3 and lowered the AA/DHA-ratio in both hm2 and hm12. DHA+AA vs. Placebo: DHA+AA increased DHA, LCPω3, AA and LCPω6 in hm2, and DHA and LCPω3 in hm12. DHA+AA vs. DHA: DHA+AA increased AA, 22:4ω6, LCPω6 and AA/DHA-ratio in hm2 and AA and AA/DHA-ratio in hm12. In each group, both DHA and AA decreased from two to twelve weeks, but the AA/DHA-ratio remained constant.

Conclusion: At current dosages, dietary DHA during pregnancy and lactation increases milk DHA, without affecting AA. This is the first study to show that supplemental AA elevates milk AA. The combination of DHA and AA does not cause competition between DHA and AA for incorporation.

115. Insufficient lactating Dutch women comply with recommendations for fish intake

S.A. van GOOR¹, D.A.J. DIJCK-BROUWER², I.A. MARTINI², A. SCHAAFSMA³, F.A.J. MUSKIET²

Pathology and Laboratory Medicine¹ and Laboratory Center², Friesland Foods³, University Medical Center Groningen, Leeuwarden

Introduction: The long chain polyunsaturated fatty acids (LCP) arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA) are abundant in brain. DHA is conditionally essential for fetus and newborn. Current consensus is that newborn brain DHA is positively related to cognitive/behavioral performance but that differences are difficult to detect. The Dutch recommendation is to consume 450 mg LCP/day (about 170 mg DHA/day), while ISSFAL recommends 300 mg DHA/day during pregnancy/lactation. Using data from a randomized intervention study we estimated percentages women complying with these recommendations.

Methods: The long term DHA intake-milk DHA dose-response relation was taken from the literature: 170 and 300 mg DHA/day correspond with 0.43 and 0.79 g% milk DHA on postpartum day 30, respectively. Investigated women received placebo (n=18), DHA (220 mg, n=30), or DHA+AA (220 mg+220 mg, n=19) from 16 weeks pregnancy until 12 weeks postpartum.

Fatty acids in untimed milk samples were measured at 2 (hm2) and 12 (hm12) weeks.

Results: Mean percentages women in the placebo group complying with Dutch and ISSFAL recommendations amounted to about 19.5% (hm2-38.9%; hm12-0%) and 0% (hm2-0%; hm12-0%), respectively. For the combined DHA supplemental groups these data were 62.3% (hm2-85.7%; hm12-38.8%) and 17.3% (hm2-22.4%; hm12-12.2%), respectively.

Conclusion: Percentages women complying with Dutch and ISSFAL recommendations were low. The 220 mg/day DHA supplement caused only about 40% of women to comply with Dutch recommendations two weeks postpartum. Twelve weeks postpartum no one complied to the recommendations. Representativity for the entire Dutch population is uncertain, but more attention to meeting recommendations for fish consumption during pregnancy is warranted.