

## Posterabstracts

Samenvattingen van de posterabstracts tijdens het 64e Congres van de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde op 13, 14 en 15 april 2011 te Veldhoven

### Categorie 1 Analytisch

#### Hemocytometrie, flowcytometrie, hemostase

##### 1. Reagens does matter: INR-metingen met behulp van Innovin en Hepato Quick reagens

J. A. RIEDL, H. van der GIESEN-van der HOOFT, P.B. BERENDES

*Department of Clinical Chemistry, GKCL, Albert Schweitzer Hospital, Dordrecht, The Netherlands*

**Inleiding:** Hepato Quick is een Owrens tromboplastine waaraan Factor V en fibrinogeen zijn toegevoegd. Trombosediensten die Hepato Quick (Roche) gebruiken als tromboplastine-reagens scoren beter v.w.b. longtermpatiënten (i.c. patiënten die langer dan 6 maanden orale antistolling gebruiken) dan trombosediensten die andere (vaak recombinant) tromboplastines gebruiken. Het percentage longtermpatiënten dat binnen het streefgebied zit varieert enorm tussen trombosediensten: 67,3% tot 89,3% v.w.b. het streefgebied 2,0-3,5 INR en 64,7% tot 82,5% v.w.b. het streefgebied 2,5-4,0 INR (bron: samenvatting medische jaarverslagen van de Federatie van Nederlandse Trombosediensten (FNT) 2007). De trombosedienst Dordrecht/Gorinchem scoort voor bovengenoemde streefgebieden 73,7% (streefgebied 2,0-3,5 INR) en 68,2% (streefgebied 2,5-4,0 INR) en ligt op de 13de plaats van de slechts scorende trombosediensten (totaal 58 deelnemers). De trombosedienst Dordrecht/Gorinchem gebruikt het recombinante tromboplastinereagens Innovin (Siemens).

**Methode:** Wij hebben een applicatie ontworpen voor Hepato Quick reagens op de Sysmex CA-1500 (Dordrecht). Eindcontrole van de ISI en MNPT is gebeurd in samenwerking met dr. van den Besselaar (RELAC). De Hepato Quick methode is geschikt bevonden voor het meten van de INR op de Sysmex CA-1500 en de applicatie voor het Hepato Quick reagens is op de Sysmex stolautomaten van Gorinchem gezet. Uiteindelijk zijn de INR-waarden van de patiënten in Gorinchem over een lange periode (> 6 maanden) met het Hepato Quick reagens gemeten. Gedurende deze periode is de INR van de Dordtse trombosedienstpatiënten als vanouds (met behulp van het Innovin reagens) bepaald.

**Resultaat:** Na circa 1 jaar zijn de resultaten van de twee trombosediensten met elkaar vergeleken.

**Conclusie:** Samengevat leveren wij bewijs dat INR-metingen met Hepato Quick leiden tot een hoger percentage patiënten in het INR-gebied 2,0 - 4,0 dan INR-metingen met Innovin.

### Categorie 1 Analytisch

#### Overigen

##### 2. Inter-laboratory pre-classification reproducibility assessment in digital morphology using the digital microscope DM96

J.A. RIEDL<sup>1</sup>, H. CEELIE<sup>2</sup>, J. BOONSTRA<sup>3</sup>, W. van GELDER<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, GKCL, Albert Schweitzer Hospital, Dordrecht; Department of Clinical Chemistry<sup>2</sup>, Vlietland Hospital, Schiedam; Department of Clinical Chemistry<sup>3</sup>, Erasmus Medical Centre, Rotterdam, The Netherlands*

**Introduction:** The automated digital microscopy system DM96 is a digital microscope using several advanced mathematical algorithms to classify leukocytes. We have previously shown that the DM96 is capable of correct classification of leukocytes in peripheral blood and body fluid samples (Ceelie et al. 2007, Riedl et al. 2010).

**Methods:** In this study we set out to compare 4 DM96 digital microscopes in classifying the five main peripheral blood cell classes (segmented neutrophils, eosinophils, basophils, lymphocytes and monocytes) and blast cells in 50 specimens. The DM96 machines were located at four different locations: the Albert Schweitzer Hospital (ASz); the Erasmus Medical Centre, Central location (Centrum) and Daniel location (Daniel) and finally Vlietland Hospital (Vlietland). To establish this comparison we collected 50 random peripheral blood smears from our hospital population and generated 4 blood smear specimens per patient; one for each hospital location using

standardized protocols. Samples were processed on the DM96 present at every location and pre-classification results were compared with the average results obtained by all four laboratory locations.

**Results:** Overall the pre-classification comparison results of the various cell classes between the various laboratory locations are excellent, except for the basophils. This can be explained by the relative low number of percentages present in random peripheral blood smears and thereby subtle differences in analysed percentages give rise to huge variation. To our knowledge this is the first reproducibility study description between different digital microscopy systems.

**Conclusion:** In conclusion different digital microscopy systems give rise to reproducible pre-classification results in determining segmented neutrophils, eosinophils, lymphocytes, monocytes and blast cells.

### 3. De Totale IJzerbindingscapaciteit in de SKML Combi Algemene Chemie enquête: zijn alle resultaten het rapporteren waard?

C. RAMAKERS, M. TRIBAK, Y. KLUITERS-de HINGH

*Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium & Trombosedienst, St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg*

**Inleiding:** De totale ijzerbindingscapaciteit (TYBC) kan berekend worden uit de transferrineconcentratie (transferrine x 25) of door de latente ijzerbindingscapaciteit (LYBC) concentratie bij de serumijzerconcentratie op te tellen.

**Methode:** De LYBC bepaling is een goedkope spectrofotometrische bepaling waarbij een overmaat ijzer wordt toegevoegd aan een serum- of plasmamonster waardoor het aanwezige transferrine voor 100% wordt verzadigd. Het resterende ongebonden ijzer kan met behulp van FerroZine® worden bepaald waarbij het gemeten signaal omgekeerd evenredig is aan de LYBC. Zowel de serumijzerconcentratie als de TYBC maken onderdeel uit van de Combi Algemene Chemie (CAC)-enquête van de SKML.

**Resultaat:** Bij de beoordeling van het kwartaalrapport 2010.1 vielen monsters 2010.1A en 2010.1B op door een gerapporteerde TYBC van 0 µmol/l. Bij nader onderzoek bleek bij deze

monsters een negatieve LYBC gemeten te zijn. Een retrospectieve data-analyse laat patiënten (N=7561) geen enkele negatieve LYBC zien. Dit suggereert dat de negatieve LYBC in de CAC-enquête niet-fysiologisch is en waarschijnlijk veroorzaakt wordt door een extreem hoge serumijzerconcentratie als gevolg van toevoeging van ijzer, waarbij er naast het aan transferrine gebonden ijzer ook nog vrij geïoniseerd ijzer aanwezig is. In de CAC-enquête wordt gebruik gemaakt van één enkele transferrineconcentratie. Dit maakt dat de TYBC berekend m.b.v. LYBC structureel zal afwijken van de transferrinemethode naar mate meer ijzer wordt toegevoegd aan de SKML-monsters.

**Conclusie:** Omdat vooralsnog analytisch onduidelijk is hoe om te gaan met niet-fysiologische negatieve LYBC's in sommige CAC-monsters en het feit dat één enkele transferrineconcentratie wordt gebruikt in de CAC-enquête is het de vraag of de TYBC-rapportage in deze enquête nog zin heeft.

### 4. Sweat analysis on chemistry platforms

J.J.J. HULSTEIN, J.L.C. JONGMAN, I.M.E. den DUBBELDEN, P. van 't SANT

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

**Introduction:** According to consensus documents sweat-testing remains the standard for diagnosing Cystic fibrosis. We studied a novel procedure of sweat-analysis on two chemistry platforms; Dimension Vista (Siemens Healthcare Diagnostics) and Aeroset (Abbott).

**Methods:** Sweat collected from healthy individuals and aqueous samples in the critical range for sweat-analysis were measured using Orion 290 plus, Chiron 925 chloridometer, flame photometry, sweat-chek analyser and indirect ion-selective electrodes (ISE) of Vista and Aeroset. For measurement on ISE 20 µl sample were added to an aqueous standard of 40 mmol/l NaCl to achieve a total volume of 80 µl.

**Results:** Within-run and between-run precision were measured during 5 days using a 40 mmol/l aqueous standard. Aeroset and Vista passed the tests with a CV <5% as prescribed by UK guidelines. Between-run precision showed mean values on Vista and Aeroset of resp. 38.3 and 38.5 mmol/l for sodium and 39.2

and 36.9 mmol/l for chloride. Correlation between traditional methods and ISE-modules was determined using CLSI EP9. 23 aqueous samples and 9 sweat samples were measured in duplicate. Correlations between chloridometer and chloride concentrations analysed on Vista or Aeroset were resp.  $y=0.96x+7.61$  and  $y=0.97x+1.10$  and between sweat-chek (conductivity) and sodium concentrations analysed on Vista or Aeroset was resp.  $y=0.96x+7.61$  and  $y=0.97x+1.10$ . When classified according to medical decision rules (30 mmol/l and 60 mmol/l chloride, combined with sodium concentration) the same classification was found with ISE-module and conventional methods for all samples.

**Conclusion:** Quantitative correlation studies using medical decision rules show good correlation between conventional methods and ISE-modules. The addition-protocol provides a means to measure sodium and chloride in one sample in duplicate, even though sample size is limited. Moreover, the use of ISE-modules is simple and saves costs of dedicated devices.

### 5. Reversibiliteit van temperatuur-gemedieerde verandering in plasma elektrolytenconcentratie

M.M.G.J. van BORREN, A.C. WELTEN, P. van 't SANT

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

**Inleiding:** De activiteit van membraangebonden iontransporters is sterk temperatuursafhankelijk. Na bloedafname kan deze omgevingsfactor de ionconcentraties in erythrocyten en plasma beïnvloeden. Ten einde foutieve klinische beslissingen te vermijden onderzochten we dit proces, met name ook of het reversibel is.

**Methode:** Veneus bloed afgenomen in lithium-heparine buizen is sequentieel gesampeld en geanalyseerd op een bloedgasanalyser (Rapidlab 1265, Siemens) terwijl de buizen aan verschillende temperatuurprotocollen zijn blootgesteld.

**Resultaat:** De [K<sup>+</sup>] in volbloed stijgt bij 4°C met 0,14±0,01 mmol/l/uur (n=24), blijft nagenoeg constant bij 21°C (0,02±0,04 mmol/l/uur, n=6) en daalt daarentegen met 0,04±0,02 mmol/l/uur (n=6) bij 37°C. De [Na<sup>+</sup>] in volbloed beweegt tegenovergesteld aan de [K<sup>+</sup>], en daalt bij 4°C met 0,13±0,06 mmol/l/uur (n=24), blijft nagenoeg constant bij 21°C (0,06±0,09 mmol/l/uur, n=6) en stijgt met 0,28±0,12 mmol/l/uur (n=6) bij 37°C

De [Cl<sup>-</sup>] en [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] concentraties bewegen ook tegengesteld. Bij 4°C neemt de [Cl<sup>-</sup>] toe met 0,23±0,07 mmol/l/uur (n=24) en de [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] af met 0,39±0,09 mmol/l/uur (n=24). Bij 21°C en 37°C namen de veranderingen alleen maar toe. In nieuwe serie van 6 monsters die 4 uur bij 4°C zijn bewaard traden de hierboven genoemde veranderingen op. Door deze monsters 1 uur bij 37°C te verwarmen herstelden de elektrolyten richting de oorspronkelijke niveaus. Het gemiddelde verschil met de uitgangswaarden werd voor [K<sup>+</sup>], [Na<sup>+</sup>], [Cl<sup>-</sup>] en [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] respectievelijk 0,25±0,04 mmol/l, 0,18±0,25 mmol/l, -0,67±0,36 mmol/l en 0,46±0,52 mmol/l.

**Conclusie:** Temperatuur heeft een groot effect op de elektrolytenconcentratie in volbloed na bloedafname. In buizen die gekoeld bewaard zijn, kunnen nagenoeg de oorspronkelijke waarden van [K<sup>+</sup>], [Na<sup>+</sup>], [Cl<sup>-</sup>] en [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] weer worden verkregen door de monsters 1 uur bij 37°C te incuberen.

## 6. Directe bilirubinebepaling: de oplossing voor hemolytische interferentie!?

J.M.A. EMMEN, D.L. BAKKEREN

*Klinisch laboratorium, Máxima Medisch Centrum, Veldhoven*

**Inleiding:** De directe bilirubinebepaling op de Roche/Hitachi chemie-analyzers is zeer gevoelig voor hemolytische interferentie. Bij een hemolytisch (H-) index > 20, overeenkomend met 20 µmol/l Hb, veroorzaakt het aanwezige Hb een afwijking >18% t.o.v. de oorspronkelijke concentratie en wordt de uitslag niet gerapporteerd. Dit komt zeer regelmatig voor bij monsters afkomstig van onze afdeling neonatologie. Het doel van deze studie was de evaluatie van een geautomatiseerde directe bilirubinebepaling die minder gevoelig is voor hemolytische interferentie als mogelijk alternatief voor de huidige bepaling.

**Methode:** De huidige bepaling (Roche), die gebaseerd is op de diazo-methode (Jendrassik-Grof-based), werd vergeleken met een bepaling waarbij gebruik gemaakt wordt van chemische oxidatie met vanadaat (Siemens). Voor beide bepalingen, uitgevoerd op de Roche analyzer, werd de grenswaarde van hemolytische interferentie bepaald met gepoolde patiëntenplasma's en een precisiestudie uitgevoerd. Een methodevergelijking werd

gedaan met patiëntenmateriaal afkomstig van volwassenen (n=42) en een kleine serie neonaten (n=14).

**Resultaat:** Bij de vanadaat-methode werd geen hemolytische interferentie waargenomen tot een H-index van 75 dan wel > 300, afhankelijk van directe bilirubine concentratie van het poolmonster. De variatiecoëfficiënten van de diazo- en vanadaat-methode waren respectievelijk 1,8 - 2,9 en 1,1 - 3,3 %. Methodevergelijking met patiëntenmateriaal afkomstig van volwassenen gaf een goede correlatie en  $y = 0,92x + 2,15$ . Echter, de serie monsters afkomstig van neonaten toonde een slechte correlatie.

**Conclusie:** De vanadaat-bepaling is minder gevoelig voor hemolytische interferentie en op basis van de precisiestudie en methodevergelijking een goed alternatief voor een direct bilirubinebepaling bij volwassenen. Echter, bij monsters van neonaten, waarbij regelmatig sprake is van (geringe) hemolyse, bleken beiden methoden niet te correleren. Hiervoor kon nog geen eenduidige verklaring worden gegeven, zodat dit nader onderzoek vereist.

## 7. Pseudohyponatriëmie op de (kinder) IC: frequent maar onbekend!

L.J. van PELT<sup>1</sup>, J.J.J. van LEEUWEN<sup>1</sup>, R.F.J. KEMPERMAN<sup>1</sup>, J.E. KOOTSTRA-ROS<sup>1</sup>, M.J.I.J. ALBERS<sup>2</sup>, M.W.N. NIJSTEN<sup>3</sup>

*Afdeling Laboratoriumgeneeskunde<sup>1</sup>, Afdeling Kinder intensive care<sup>2</sup>, Afdeling Volwassenen intensive care<sup>3</sup>, UMCG, Groningen*

**Inleiding:** In het UMCG wordt bij IC patiënten Natrium vaak zowel point-of-care gemeten op de ABL (Radiometer) als centraal op de Modular (Roche). Regelmatig worden wij bij patiënten op de kinder IC geconfronteerd met resultaten die op de ABL tot wel 10 mmol/l lager liggen dan op de Modular. Dergelijke discrepanties gaven tot voor kort aanleiding tot onrust en twijfel aan de betrouwbaarheid van de (point-of-care) laboratoriumuitslagen. Aanvankelijk hebben wij uitvoerig, maar tevergeefs, naar een verklaring gezocht in het (pre-)analytische traject van de bepaling op de bloedgasanalyzer. Vervolgens hebben wij gekeken naar gemeenschappelijke patiëntkarakteristieken. De overeenkomst tussen de patiënten is dat de meesten jonger zijn dan een jaar en dat ze zonder uitzondering kritisch ziek zijn. Omdat beide kenmerken gecorreleerd zijn met een laag totaal eiwit, hebben we de hypothese getoetst dat het hier gaat om pseudohyponatriëmie agv indirecte ionselectieve meting op de Modular.

**Methode:** 130 patiëntenmonsters werden geselecteerd op (afwijkende) totaal eiwit concentraties. In alle monsters is het natrium gemeten op de Modular en ABL. Vervolgens zijn alle monsters gevriesdroogd om het percentage vaste stof te bepalen.

**Resultaat:** Er blijkt een duidelijke correlatie te zijn tussen de hoeveelheid vaste stof in het plasma en de delta-natrium tussen de Modular en ABL. De relatie wordt bepaald door de eiwitconcentratie. Bij analyse van een groot cohort patiënten op de volwassenen IC blijkt de delta-natrium eveneens te zijn gecorreleerd met de eiwitconcentratie.

**Conclusie:** Pseudohyponatriëmie is een bekend fenomeen binnen de klinische chemie. Pseudohyponatriëmie gerelateerd aan een verlaagde eiwitconcentratie is een nauwelijks onderkend maar frequent voorkomend fenomeen bij IC-patiënten. Bij jonge, ernstig zieke patiënten kunnen de verschillen met de werkelijke, met een directe ionselectieve methode bepaalde, natriumconcentratie klinisch relevant zijn.

### Categorie 1 Analytisch

#### Hemocytometrie, flowcytometrie, hemostase

## 8. Sensitivity and specificity of the High Fluorescent Lymphocyte Count-gate on the Sysmex XE-5000 hematology analyser for detection of peripheral plasma cells

E. van MIRRE, G.J. VRIELINK, N. TJON-A-TSOI, H. HENDRIKS, W. de KIEVIET, E. ten BOEKEL

*Klinisch laboratorium, Sint Lucas Andreas Ziekenhuis, Amsterdam*

**Introduction:** Plasma cells are one of the end-products of a B-lymphocyte mediated immune response. These cells normally reside in the bone marrow or some peripheral lymphoid tissues. Increased numbers of plasma cells in the blood, usually indicates pathology; such as infection, auto-immunity or haematological malignancy. Therefore, the ability to measure plasma cells (PCs) on an automated cell analyser might be advantageous.

**Methods:** The performance of the Sysmex XE-5000 leukocyte differential channel (HFLC area) was evaluated for the ability

to detect plasma cells in peripheral blood and we compared it with the results of flow cytometric analysis.

**Results:** Our results show that the HFLC count from the XE-5000 correlates ( $r^2 = 0,8$ ) with the number of PCs in peripheral blood, but detects PCs with moderate to good sensitivity (88.9%) and specificity (87.8%).

**Conclusion:** The Sysmex XE-5000 is suitable for screening blood samples for the presence of elevated number of plasma cells in peripheral blood, but the actual quantification needs to be confirmed by use of flow cytometry.

## 9. Reference values of fetal erythrocytes in maternal blood during pregnancy, established using flow cytometry

H.J. ADRIAANSEN<sup>1</sup>, L. van DUN<sup>2</sup>, J.J.M.L. HOFFMANN<sup>3</sup>, J.A. KOOREN<sup>4</sup>, E.A. ROELANDSE-KOOP<sup>5</sup>, J. RUINEMANS-KOERTS<sup>6</sup>, L. SCHAKEL<sup>7</sup>, J.H.N. SCHUITEMAKER<sup>7</sup>, H. de WIT<sup>8</sup>  
*Gelre Hospitals, Apeldoorn<sup>1</sup>, Abbott Diagnostics, Hoofddorp<sup>2</sup>, Abbott Diagnostics, Wiesbaden-Delkenheim, Germany<sup>3</sup>, Medial Laboratories, Hoofddorp<sup>4</sup>, VU Medical Center, Amsterdam<sup>5</sup>, Rijnstate Hospital, Arnhem<sup>6</sup>, IQ Products, Groningen<sup>7</sup>, Stichting KCL / Medical Center, Leeuwarden<sup>8</sup>*

**Introduction:** Flow cytometry is replacing the Kleihauer-Betke (K-B) assay for quantifying foetomaternal hemorrhage (FMH). The K-B assay has inherent inaccuracies which are largely absent in flow cytometry. Although flow cytometry has superior analytical performance, surprisingly few papers reported reference ranges and in none of these pregnant women were studied. Therefore, the aim of our study was to assess the fetal RBC count in maternal blood during uncomplicated pregnancies. We used a flow cytometric method on a routine hematology analyzer, permitting FMH assays on a 24/7 basis.

**Methods:** Pregnant women were recruited through midwives and obstetricians; pregnancies with complications or high-risk pregnancies were excluded. Blood samples were collected after informed consent. All participating laboratories used the FMH QuikQuant kit (Trillium Diagnostics, Brewer, ME, USA) on a CELL-DYN Sapphire hematology analyzer (Abbott Diagnostics,

Santa Clara, CA, USA). Raw data were collected in FSC format and analyzed using standard flow cytometric software by two independent observers. Standard statistical methods were used; outliers were removed according to Tukey. The reference range was estimated according to CLSI using the 95% percentile.

**Results:** In total 238 samples were suited for statistical analysis. Gestational ages ranged from 21.6 to 41 (mean 32.0) weeks and foetal RBC count from 0.00 to 0.50 (mean 0.0466) %. There was no significant correlation between foetal RBC count and gestational age ( $r = -0.096$ ,  $P=0.141$ ). ANOVA analysis also did not show a relationship ( $P = 0.666$ ). The reference range for foetal RBC was 0.00 - 0.125% (90% confidence limits of the upper reference value 0.115 - 0.145%).

**Conclusion:** The fetal RBC count in maternal blood shows no correlation with gestational age. The reference values during pregnancy are  $< 0.13\%$ .

## 10. Validity of NRBC counts on hematology analyzers: a critical evaluation of the reference method

C. RAMAKERS, Y. KLUITERS-de HINGH

*Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium & Trombosedienst, St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg*

**Introduction:** Nucleated red blood cells (NRBC) can be counted using automated hematology analyzers. Analyzer performance is verified using a CLSI H20-A protocol which includes a manual evaluation of a stained blood smear. Correlation studies on various platforms report excellent correlation coefficients ( $r^2$ ) but suboptimal slope values, with a recurring underestimation of the automated NRBC count. Because of this many hematology laboratories in Europe are hesitant using automated hematology analyzers for counting NRBC's.

**Methods:** We hypothesize that the recurrent discrepancy can be attributed to a skewed distribution of the different blood cells within a blood smear, with NRBC's more likely to be distributed equally with red blood cells (RBC) than with the larger leucocytes (lymphocytes, granulocytes and monocytes).

**Results:** Using nucleated chicken RBC's as artificial NRBC's we found that the %NRBC (per 100 leucocytes) in a blood smear is dependent on the density area under evaluation with increasing %NRBC as RBC densities decrease. The %eNRBC (per 1000 RBC's) proved to be more stable and independent of the RBC density area.

**Conclusion:** In conclusion, we show that the CLSI reference method for assessing the accuracy of hematology analyzers with regard to reporting %NRBC has an important pitfall in that the distribution between NRBC's and leucocytes in a blood smear is skewed. This has to be taken into account before disqualifying automated NRBC counts solely on slope discrepancies in correlation studies.

## 11. New multiplate aggregation test to screen for Gsalpha dysfunction: Screening of patients with unexplained mental retardation for Gsalpha hyperfunction

I.M.L.W. KÖRVER-KEULARTS<sup>1,2</sup>, M.E. RUBIO-GOZALBO<sup>2,3</sup>, C.T.R.M. SCHRANDER-STUMPEL<sup>4</sup>, P. VERHEZEN<sup>1</sup>, D. MAESSEN<sup>1</sup>, M.G.M. WILLEMS<sup>1</sup>, J.W.M. HEEMSKERK<sup>5</sup>, P. van der MEIJDEN<sup>5</sup>, K. HAMULYAK<sup>1</sup>, Y. HENSKENS<sup>1</sup>  
*Department of Hematology<sup>1</sup>, Department of Clinical Genetics, lab of Biochemical Genetics<sup>2</sup>, Department of Pediatrics<sup>3</sup>, Department of Clinical Genetics<sup>4</sup>, Department of Biochemistry<sup>5</sup>, Maastricht University Medical Center (MUMC), Maastricht, The Netherlands*

**Introduction:** Jaeken (2003) described four children with variable psychomotor retardation (PMR), axial hypotonia and bleeding problems linked to Gsalpha hyperfunction. Signal transduction defects (STD) due to GNAS1 mutations can cause Gsalpha hyperfunction. Screening for Gsalpha-associated STD requires a platelet aggregation-inhibition test and cAMP measurement (second messenger of Gsalpha-pathway). We developed a multiplate collagen-aggregation/PGE1-inhibition assay to test for Gsalpha defects in patients with unexplained PMR and functionally tested the assay with two patients with Gsalpha hypofunction.

**Methods:** Controls - Healthy volunteers (n=17-33), 20-50 years, not taking alcohol, aspirin or NSAIDs. Patients - Two Albright hereditary osteodystrophy patients (AHO; OMIM 103580) with a heterozygote GNAS1 mutation (c.1A>G;p.Met1Val) and 50% reduced Gs protein bioactivity. Three patients with unexplained PMR. Aggregation assay - 3 ml of hirudin-anticoagulated blood was used in the multiplate aggregation-inhibition

assay. cAMP measurement - cAMP was measured in PGE1-stimulated washed platelets with a cAMP enzyme immunoassay kit CA201 (Sigma-Aldrich, Germany).

**Results:** In healthy volunteers, PGE1 gave a dose dependent inhibition of multiplate collagen aggregation of 33±14% (30 nM PGE1) and 48±17% (50 nM PGE1). Two AHO patients (Gsalpha hypofunction) showed a reduced PGE1 inhibition of 17 resp. 8% (30 nM PGE1) and 9 resp. 0% inhibition (50 nM PGE1). One AHO patient showed a lower (20 pmol/ml) maximal cAMP response in PGE1-stimulated thrombocytes than controls (60 and 70 pmol/ml). Three patients with PMR tested normal in the platelet aggregation-inhibition assay.

**Conclusion:** We developed a multiplate aggregation-inhibition assay to screen patients with PMR and/or bleeding for Gsalpha dysfunction. The first three patients with unexplained PMR tested normal.

*Literature:* Jaeken et al. Eur J Paediatr Neurol. 2003; 7(5): 211-215

## 12. Uitgebreide evaluatie van de Coasys Plus C stollingsanalyzer

W. SCHORNAGEL, M. HECKMAN, B. BAKKER, E.J. van den DOOL, A. STURK, A.K. STROOBANTS  
*Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie (LAKC), Academisch Medisch Centrum, Amsterdam*

**Inleiding:** De Coasys Plus C van Roche Diagnostics is een routine-stollingsanalyzer voor kleine tot middelgrote laboratoria. Het LAKC is door Roche Diagnostics benaderd om de Coasys Plus C uitgebreid te evalueren.

**Methode:** De bepalingen aPTT (STA APTT en STA Cephascreen), PT/INR (Hepato Quick en Neoplastin Plus, STA Neoplastin R), fibrinogeen (Fibrinogen), antitrombine (Antithrombin III) en D-dimeer (Tina-quant D-Dimer Gen.2) zijn als volgt getest: familiarisatiefase (met o.a. bepalingvolgorde en dood volumetest), intra-assay reproduceerbaarheid, carry-over, capaciteit en totale imprecisie. De bepaling PT Neoplastin R is als volgt getest: imprecisie en patiëntenvergelijking met de STA-R Evolution van Roche Diagnostics.

**Resultaat:** Het doodvolume is 90 µl. Er is geen carry-over. De Coasys Plus C leverde in totaal 240 meetresultaten (STA-APTT, PT Neoplastin plus, fibrinogeen, antitrombine) in 217 minuten. Een CITO-uitslag (monster ingezet 10 minuten na start capaciteitstest) was bekend na 26 minuten. 90 PT/INR-meetresul-

taten (Neoplastin R, met cap-piercing) werden bekend in 86 minuten. De reproduceerbaarheid van de bepalingen is als volgt (gemiddelde gemeten VC/opgegeven VC): STA APTT 2,3%/2,0%; APTT Cephascreen 2,1%/2,0%; PT Neoplastin Plus 1,7%/2,0%; PT Hepato Quick 1,2%/2,0%; INR Hepato Quick 1,1%/2,0%; fibrinogeen 4,1%/3,5%; antitrombine 3,1%/5,0%; D-dimeer 4,3%/5,0% en PT Neoplastin R 2,7%/2,0%. De totale imprecisie van de bepalingen is als volgt (gemiddelde gemeten VC/opgegeven VC): STA APTT 2,2%/4,5%; APTT Cephascreen 2,3%/4,5%; PT Neoplastin Plus 2,9%/5,3%; PT Hepato Quick 2,6%/5,3%; INR Hepato Quick 2,4%/4,5%; fibrinogeen 8,7%/13,6%; antitrombine 3,9%/8,3%; D-dimeer 4,6%/5,0% en PT Neoplastin R 3,7%/5,3%. Patiëntenvergelijking PT Neoplastin R:  $y=0,958x-0,38$  ( $r=0,997$ ).

**Conclusie:** De Coasys Plus C is een zeer snelle stollingsanalyzer die prettig is in het gebruik. In het algemeen zijn de evaluatieresultaten klinisch goed. De totale imprecisie voldoet aan de door de firma opgegeven waarden.

## 13. Evaluatie van de Unicel DxH800 als routine hematologie analyzer in een perifere ziekenhuissetting

J.J.H. HENS<sup>1,2</sup>, T. LEENEN<sup>1</sup>, K. HAANAPPEL<sup>2</sup>, H.O. AGRICOLA<sup>1</sup>, G.W.A. LANSBERGEN<sup>1,2</sup>

*Resultaat Verantwoordelijke Eenheid Laboratoria<sup>1</sup>, Zuwe Hofpoort Ziekenhuis, Woerden; Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>2</sup>, Groene Hart Ziekenhuis, Gouda*

**Inleiding:** Betrouwbare en snelle diagnostiek van hematologische parameters speelt binnen een perifere klinische 7x24 setting een essentiële rol. Wij evalueerden de klinische toepasbaarheid van de Unicel DxH800 hematologie analyzer (Beckman-Coulter) met betrekking tot celtelling, Hb-meting en leukocytdifferentiatie.

**Methode:** Voor een 50-tal EDTA-bloedmonsters zijn op de DxH800 hematologie analyzer de belangrijkste leukocyten-, trombocyten- en erythrocytenparameters vergeleken met die op de HmX hematologie analyzer. Daarnaast is voor een 40-tal geselecteerde EDTA-bloedmonsters de leukocytdifferentiatie van de DxH800 vergeleken met een "single-tube" CytoDiff antistofkleurpaneel (CD45, CD16, CD2, CD36, CD19 en CRTH2) op een FC500 flowcytometer.

**Resultaat:** De hemocytometrische bepalingen op de DxH800 correleerden zeer goed met die op de HmX: tellingen van leukocyten, trombocyten en erythrocyten toonden evenals voor Hb- en MCV-metingen uitstekende correlatiecoëfficiënten ( $r^2>0,990$ ). De juistheid van de DxH800 data bleek goed overeen te komen met die van de overall-groep van de SKML en-

quêtes hemocytometrie 2009.6 en 2010.1. Wanneer de 5-part leukocytdifferentiatie op de DxH800 werd vergeleken met de 9-part CytoDiff analyse waarbij de diverse subpopulaties werden samengevoegd voor lymfocyten, monocyten, en neutrofiële en eosinofiele granulocyten resulteerde dit in goede correlatiecoëfficiënten ( $r^2>0,900$ ). Een 10-tal geselecteerde EDTA-monsters waarin met de CytoDiff-kleuring flowcytometrisch blasten aantoonbaar waren werden alle door de DxH800 van een passende waarschuwingsslag voorzien.

**Conclusie:** De DxH800 toont zich in de klinisch praktijk als een volwaardige en betrouwbare hematologie analyzer. Koppeling van de DxH800 aan Remisol-laboratorium interfacing resulteerde binnen onze ziekenhuislaboratorium in een reductie van het aantal manuele leukocytdifferentiaties tot onder de 15% van het aantal aanvragen. De DxH800 blijkt adequaat te differentiëren tussen normale en abnormale leukocytenpopulaties, waarbij passende waarschuwingsslaggen door de DxH800 worden gegenereerd bij linksverschuiving en pathologische leukocytenpopulaties.

## 14. Hemoglobine in reticulocyten als snelle (non-)responsparameter op ijzersuppletie

J.E. de VRIES

*Centraal Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Laurentius Ziekenhuis, Roermond*

**Inleiding:** De huidige generatie hemocytometrie analyzers heeft al meer dan 10 jaar de optie om hemoglobine (Hb) in reticulocyten (HiR) te meten. HiR stijging is in principe na 1 tot 3 dagen aantoonbaar na ijzersuppletie bij een microcytaire anemie (MA) door ijzertekort. In de praktijk wordt HiR niet gebruikt om de respons op ijzersuppletie te meten.

**Methode:** Bij 18 patiënten met MA vanwege ijzerverlies door verschillende onderliggende ziektebeelden, is de HiR bepaald na ijzersuppletie.

**Resultaat:** Bij 17 van de 18 patiënten is stijging van HiR binnen 2 dagen aantoonbaar voor hetzij orale, hetzij intraveneuze ijzersuppletie. Follow-up bij 14 van deze 17 patiënten toont normalisatie van het Hb na 2 tot 3 weken. Patiënt 15 overleed kort na ijzersuppletie, patiënt 16 werd niet verder vervolgd na uterus-extirpatie, evenals gravida-patiënt 17 na bevalling. Zij

kreeg rond week 30 ijzer voorgeschreven. In week 38 werd duidelijk dat zij geen ijzer slikte (Hb 4,9; HiR 1,52 fmol), waarop een venofer-infuus werd gegeven. Twee dagen later presenteerde zij zich op de SEH (Hb 5,1; HiR 1,85 fmol) en werd besloten de bevalling in te leiden. Patiënt 18 kreeg eind april 2010 orale ijzersuppletie voorgeschreven door de huisarts, bij een moeizaam revalidatietraject met vermoeidheidsklachten na een totale heupvervangingsoperatie. Er was geen HiR stijging. Er was ook geen normalisatie van het Hb na enkele weken.

**Conclusie:** De laatste twee patiënten zijn exemplarisch voor de groep die baat heeft bij snelle controle op het effect van ijzersuppletie. Het is daarom zinvol om HiR een plaats te geven in de KNOV-standaard "Anemie in de eerstelijns verloskundige praktijk" uit 2001 en in de huidige NHG standaard voor anemie, waar uitgegaan wordt van Hb-controle na 4 - 6 weken.

## 15. Evaluatie van de body fluid modus op de Unicell DxH 800 (Beckman Coulter) voor de telling van leukocyten in liquor cerebrospinalis

A.P. van ROSSUM<sup>1</sup>, A.J. van der SLOT-VERHOEVEN<sup>1</sup>; R. HERPERS<sup>1</sup>, I. BOLLEBOOM<sup>1</sup>, M. SLAGTER<sup>1</sup>, M. GUIJT<sup>1</sup>, D. HEEG<sup>1</sup>, L. ROOZENBURG<sup>1</sup>, B. LANGE<sup>2</sup>, R. HUISMAN<sup>2</sup>, A. CASTEL<sup>1</sup>

*Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium<sup>1</sup>, Bronovo Ziekenhuis, Den Haag; Beckman Coulter<sup>2</sup>, Nederland*

**Inleiding:** De microscopische telling van leukocyten in liquor cerebrospinalis is al sinds lange tijd de gouden standaard. Deze telling kent echter enkele nadelen zoals een hoge imprecisie, hoge kosten en een lange analysetijd. Een automatische cellteller zou deze nadelen niet hebben. Aangezien de nieuwe hematologische cellteller van Beckman Coulter, de DxH800, over een body fluid modus beschikt, is deze modus als cellteller van liquor onderzocht.

**Methode:** De leukocyten en erythrocyten in liquormonsters (n=27) werden allereerst microscopisch geteld in een Fuchs-Rosenthal telkamer. Vervolgens werd het monster gemeten in de body fluid modus van de DxH800. Resultaten van beide methoden werden vergeleken met behulp van Passing-Bablok regressie analyse. Eveneens is een precisieprofiel van de geautomatiseerde celtelling vastgesteld in liquor. Als laatste werd een lineariteitsstudie van de leukocytentelling op de DxH800 verricht.

**Resultaat:** Beckman Coulter claimt een ondergrens van 20 leukocyten/ $\mu$ l in de body fluid modus. In onze studie blijkt dat deze specificatie ruimschoots wordt gehaald en dat zelfs onder de 10 leukocyten/ $\mu$ l accuraat en precies kan worden geteld. Tellingen van leukocyten onder de 20 leukocyten/ $\mu$ l toonden een acceptabele variatiecoëfficiënt (VC <20%). De vergelijking tussen beide methoden (range 0 tot 230 cellen/ $\mu$ l) liet een goede correlatie ( $r^2=0,92$ ) en juistheid (DxH=0,97\*(microscopische telling)-1,4) zien. De erythrocytentelling daarentegen liet een slechte correlatie ( $r^2=0,05$ ) en een slechte imprecisie (57%) zien tussen de microscopische telling en DxH800 telling.

**Conclusie:** De telling van leukocyten in de body fluid modus op de DxH800 toont een goede correlatie met de microscopische telling. De telling van erythrocyten in de body fluid modus is in de huidige set-up op de DxH800 niet geschikt als alternatief voor de microscopische telling.

## 16. Pre-acquisition system assessment of the Sysmex® Coagulation System CS-2100i and comparison with end-user verification; a model for the regional or national introduction of new analyzers and methods

P.J. MOLENAAR, A. LEYTE

*Hematology and Clinical Chemistry Laboratory, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam, The Netherlands*

**Introduction:** Pre-acquisition system assessments of clinical laboratory analyzers and/or methods are generally repeated independently in each individual organisation planning their introduction. In the course of replacing our 10-year old Sysmex® CA1500 for CS2100i coagulometers, we designed and tested a model in collaboration with Siemens Healthcare Diagnostics based on CLSI protocols in which one laboratory performs a so-called super-user validation, allowing others to rely on a concise verification only.

**Methods:** Validation of the Sysmex® CS-2100i was performed largely according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, Wayne, USA) Guideline H57-A (Protocol for the Evaluation, Validation, and Implementation of Coagulometers, 2008) and included EP-5, 7, 9 and 10 protocols in the evaluation of 10 assays encompassing all measurement principles available. EP-15 was used for the end-user verification. Practicability and results of validation and verification were compared.

**Results:** The analytical performance of the CS-2100i was as claimed by the manufacturer and complied with our own (often more strict) criteria for all assays. Results of the system verification had sufficient statistical power and were compatible with those of the super-user validation. Verification was very time effective (completed in 3 weeks against 3 months for the validation), and its reagent costs were estimated to be approximately 5 times lower.

**Conclusion:** We have approved the Sysmex® CS-2100i analyzer for introduction in our laboratory. For other buyers a system verification is proposed to be sufficient when referring to our data, and restricted to the 10 assays studied. It is our intention to use the super-user validation versus end-user verification model for future method introductions and when harmonising between our different locations.

## 17. Juistheid bij de hemoglobinebepaling: Consensus of referentiemethode?

K.J.M. BOONEN<sup>1</sup>, J. CURVERS<sup>1</sup>, A.A. TIMMERMAN<sup>2</sup>, E. van LIEROP<sup>3</sup>, D.H. van de KERKHOF<sup>1</sup>

*Algemeen Klinisch Laboratorium<sup>1</sup>, Catharina Ziekenhuis Eindhoven; Laboratorium Klinische Chemie<sup>2</sup>, Sint Jansgasthuis Weert; Laboratorium Diagnostiek voor U<sup>3</sup>, locatie Eindhoven*

**Inleiding:** De SKML hemocytometrie rondzending maakt voor de rapportage gebruik van een consensuswaarde als referentie. Er is echter een referentiemethode beschikbaar voor de hemoglobine bepaling, welke is gebaseerd op de spectrofotometrische eigenschappen van hemiglobinecyanide. Hiervoor bestaat ook een primaire standaard van runderbloed (ontwikkeld door de ICSH/Eurotrol) die direct herleidbaar is naar de NIBSC standaard. Bij de relatief kleine groep Cell-Dyn Sapphire (Abbott) gebruikers bestond een systematische afwijking ten opzichte van de consensuswaarde in de rondzending (bijvoorbeeld  $y=0,20+0,969x$ , rondzending 2010.6) met een opmerkelijke positieve bias in het lage gebied. Het doel van deze studie was dan ook het vergelijken van de hemoglobinebepaling op de Cell-Dyn Sapphire met de consensus en de referentiemethode.

**Methode:** 50 patiëntenmonsters met een relevante spreiding (Hb 2,5-12,1) en 3x 8 SKML monsters uit de rondzendingen 2010.4, 2010.5 en 2010.6 werden gemeten op 5 verschillende Cell-Dyn Sapphires op 3 onafhankelijke laboratoriumlocaties

en met de referentiemethode. Met behulp van Passing Bablok regressie en Bland-Altman plots werden systematische afwijkingen geëvalueerd.

**Resultaat:** Vergeleken met de referentiemethode hadden de uitslagen van de Cell-Dyn Sapphires een negatieve bias (voor locatie A gemiddeld -0,20 mmol/l (95% CI -0,278 tot -0,120)). Opmerkelijk was echter dat de consensuswaarden van de SKML monsters eveneens een negatieve bias van gemiddeld 0,36 mmol/l (95% CI -0,468 tot -0,251) vertoonden ten opzichte van de referentiemethode.

**Conclusie:** Er is een significante negatieve bias van de consensus ten opzichte van de referentiemethode. Het zou de juistheid ten goede komen om de resultaten uit de rondzending te vergelijken met de referentiemethode in plaats van met de consensus. De consensuswaarde blijkt vooral bepaald te worden door Sysmex-gebruikers, alle onderzochte Abbott gebruikers wijken systematisch af.

## 18. FLAER verbetert flowcytometrische PNH diagnostiek

R. BEKKEMA, W.H.A. DE JONG, A.B. MULDER

*Afdeling Laboratoriumgeneeskunde, Universitair Medisch Centrum, Groningen.*

**Inleiding:** Paroxismale Nachtelijke Hemoglobinurie (PNH) is een verworven hematologische afwijking die ontstaat als gevolg van een somatische mutatie in het fosfatidyl-inositolglycaan klasse A gen (PIG-A) in één of meerdere hematopoïetische stamcellen. PIG-A codeert voor het eiwit glucosylfosfatidyl-inositol (GPI) dat noodzakelijk is voor de verankering van verschillende eiwitten aan glycofosfolipiden op de buitenzijde van het celmembran van o.a. erythrocyten, granulocyten en monocytten. PNH gaat gepaard met intravasculaire hemolyse, trombofilie en/of beenmergplasie. Flowcytometrie is de standaardmethode voor het aantonen van ontbrekende PI-verankerde eiwitten. Echter, ook op granulocyttaire voorstadia, zoals bijvoorbeeld bij een linksverschuiving als gevolg van een infectie of bij dysplasie treedt, verminderde expressie van één of meerdere GPI-verankerde eiwitten op, hetgeen de diagnose bemoeilijkt. In deze studie is het nut van het gebruik van FLAER, een fluorochroom-gelabeld reagens dat direct aan het GPI-anker bindt, onderzocht.

**Methode:** Met behulp van meerkleurenflowcytometrie zijn expressies van het GPI-anker en een aantal GPI-verankerde eiwitten op het celmembran van granulocyten, monocytten en erythrocyten van patiënten met PNH, MDS, en een linksverschuiving onderzocht. Gebruikt zijn FLAER, een fluorochroom-geconjugeerd bacterieel eiwit, het aerolysin, dat specifiek GPI-ankers bindt, en antistoffen gericht tegen de GPI-verankerde antigenen CD16, CD24, CD55, CD59.

**Resultaat:** Bij aanwezigheid van een PNH-kloon werd naast een verminderde expressie van CD16, CD24, CD55 en CD59 ook steeds een verminderde reactiviteit met FLAER gevonden. Bij patiënten met MDS of een linksverschuiving werd verminderde expressie van CD16 en wisselende expressie van CD55 en/of CD66b gevonden, echter steeds met een normale FLAER reactiviteit.

**Conclusie:** Gebruik van FLAER bij flowcytometrische diagnostiek van PNH maakt morfologische controle op aanwezigheid van granulocyttaire voorstadia en dysplasie overbodig.

## 19. 14-Part leukocytendifferentiatie met CytoDiff antistofpanel op de flowcytometer is een snel en betrouwbaar alternatief voor de microscopische manuele leukocytendifferentiatie in de routine

G.W.A. LANSBERGEN<sup>1,2</sup>, K. HAANAPPEL<sup>1</sup>, T. HAAKMAN<sup>1</sup>, A. van MEIJEREN<sup>1</sup>, J.J.H. HENS<sup>1,2</sup>

*Klinisch Chemisch Laboratorium, Groene Hart Ziekenhuis<sup>1</sup> Gouda; Resultaat Verantwoordelijke Eenheid Laboratoria, Zuwe Hofpoort Ziekenhuis<sup>2</sup>, Woerden*

**Inleiding:** In een routinelaboratorium genereert een hematologie-analyzer dagelijks tot 20% microscopische manuele leukocytendifferentiaties. De microscopische leukocytendifferentiaties kent echter diverse nadelen waaronder de statistische onbetrouwbaarheid, de arbeidsintensiviteit en de soms lastige typering van met name leukoblasten. De recente commerciële beschikbaarheid van het CytoDiff Panel (Beckman-Coulter) voor de flowcytometer biedt een alternatief voor de microscopische leukocytendifferentiaties, zonder eerder genoemde nadelen. We bestuderen de routinematige toepasbaarheid van het CytoDiff monoclonale antistofPanel (CD45, CD16, CD19, CD36, CD2 en CD294-CRTH2) als flowcytometrische 14-part leukocytendifferentiatie. Met het CytoDiff Panel zijn op de flowcytometer naast de standaard 5-part leukocytendifferentiaties ook onrijpe granulocyten (IG), B- en T-lymfocyten te onderscheiden en indien aanwezig ook T- en B-blasten en myeloïde-blasten. Tevens zijn pro-inflammatoire monocytten te onderscheiden evenals cytotoxische T- en NK-cellen.

**Methode:** De leukocytendifferentiatie van 110 EDTA-patiëntenmonsters is beoordeeld met het CytoDiff Panel op een

FC500 flowcytometer (Beckman Coulter) en vergeleken met de leukocytendifferenties op de hematologie-analysers DxH800 (Beckman-Coulter), XE-2100 (Sysmex) en microscopische differentiatie. Naast de normale hematologische beelden zijn ook pathologische beelden waaronder linksverschuiving, EBV-geïnfecteerden, B-CLL, NHL, MDS en AML geïncorporeerd.

**Resultaat:** De 5-part leukocytendifferentiatie parameters laten een prima methodevergelijking zien, middels Passing Bablok, tussen de flowcytometer enerzijds en de twee hematologie-analysers en microscoop anderzijds. Neutrofielen op de flowcytometer vallen soms lager uit hetgeen wordt veroorzaakt door de extra parameter IG. De verschillende hematologische beelden worden uitstekend herkend op basis van afwijkende patronen in de scatterplots.

**Conclusie:** Met het CytoDiff antistofPanel kan op de flowcytometer een snelle en betrouwbare 14-part leukocytendifferentiatie worden gegenereerd. Door rapportage van de flowcytometrische CytoDiff in de routine bieden we de kliniek een snel en betrouwbaar alternatief voor de microscopische manuele leukocytendifferentiatie.

## 20. Casus: trombocytenuitstapeling en satellitisme in EDTA-volbloed: XT-4000i versus Advia 120

J. van DUIJL, M. van ROIJ, L. VRANKEN-ENGELLEN, J. de VRIES

*CKCHL, Laurentius Ziekenhuis, Roermond*

**Inleiding:** In de validatieperiode van de XT-4000i ter vervanging van de Advia 120 kwam de volgende patiëntencasus langs.

**Methode:** Routine hemocytometrie op de XT-4000i en de Advia 120.

**Resultaat:** De XT-4000i geeft een flagging in EDTA-volbloed van een vrouw (54 jaar). Er is sprake van een afwijkend scattergram, waarbij de neutrofielen en de eosinofielen niet van elkaar onderscheiden kunnen worden. Het scattergram is wel normaal met citraat-volbloed uit een afname-buis voor de bezinking. De Advia 120 geeft een flagging voor platelet-clumps (+) in het EDTA-volbloed. Er zijn geen bijzonderheden bij het

scattergram van citraatbloed. Het trombocytenaantal is 223 in EDTA-volbloed (XT-4000i en Advia 120) en 291 (XT-4000i) en 297 (Advia 120) in citraatbloed. Naast de bekende trombocytenuitstapelingen van het EDTA-fenomeen is onder de DM1200-microscoop ook duidelijk te zien dat de trombocytten in extreme mate hechten aan neutrofielen. Enkele voorbeelden hiervan zijn vastgelegd.

**Conclusie:** De hechting van de trombocytten aan de neutrofielen zorgt waarschijnlijk voor een populatie cellen, welke tussen de neutrofielen en de eosinofielen liggen bij de XT-4000i, waardoor de neutrofielen en eosinofielen niet meer van elkaar worden onderscheiden.

## 21. Gemodificeerde APC-R; een betere discriminatie tussen wild-type en heterozygoot/homozygoot factor V Leiden

M.A. KARIMAN, E.F.A. GEMEN, J.J.J. HULSTEIN, N.C.V. PÉQUÉRIAUX

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

**Inleiding:** Bij onderzoek naar mutaties in Factor V speelt de APC-resistentietest (APC-R) een belangrijke rol. Het discriminerend vermogen van de kit is afhankelijk van de kitsamenstelling, 'lot-to-lot' en inter-laboratorium variatie [1]. In deze studie is onderzocht of verlenging van de incubatietijd het discriminerend vermogen van de APC-R test (Pefakit, Pentapharm, Zwitserland) vergroot, waardoor bovengenoemde factoren minder invloed hebben.

**Methode:** Bij 65 patiënten is de APC-R bepaald met standaard incubatietijd van 180 seconden en met verlengde incubatietijd van 240 seconden. Meting vond plaats op de STA-R analyser (Roche/Stago, Frankrijk). APC-R ratio is berekend volgens de formule: stoltijd +APC/stoltijd -APC. Bij alle patiënten met een APC-R >2,0 (cut-off JeroenBoschZiekenhuis tussen wild-typen en gemuteerde groep) en bij een deel van de patiënten met APC-R >2,0, is PCR Factor V Leiden uitgevoerd.

**Resultaat:** De Pefakit APC-R bepaling geeft een goed diagnostisch onderscheid met de standaard incubatietijd van 180

seconden alsmede met de verlengde incubatietijd van 240 seconden. Het discriminerend gebied (delta) tussen de wild-typen en heterozygote populatie neemt toe bij verlenging van de incubatietijd van 180 naar 240 seconden van delta 0,66 naar 1,64 en bij de heterozygote- homozygote populatie van delta 0,30 naar 0,36, resulterend in een nog beter discriminerend vermogen tussen de wild-typen, heterozygote en homozygote vormen.

**Conclusie:** Door verlenging van de incubatietijd van 180 naar 240 seconden neemt het discriminerend vermogen van de Pefakit APC-R bepaling toe, waardoor het resultaat minder beïnvloed wordt door analytische variabelen en individuele factoren.

**Literatuur:** 1. Reto Schöni, Peter Quehenberger et al. Clinical evaluation of a new functional test for detection of activated protein C resistance (Pefakit) APC-R Factor V Leiden) at two centers in Europe and the USA. *Thrombosis Research* (2007) 119, 17-26.

## 22. Differences between one stage clotting and chromogenic factor VIII assay results

A.K. STROOBANTS, E.J. van den DOOL, B. BAKKER, M. HECKMAN, A. STURK

Laboratory for General Clinical Chemistry, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands

**Introduction:** Hemophilia A patients can be treated with several FVIII concentrates. These therapies are monitored by the commonly used one stage clotting assay, the two stage clotting assay or a chromogenic assay. The aim of this study was to analyze the differences between the one stage clotting and chromogenic assays in healthy volunteers, and patients untreated or treated with various FVIII concentrates.

**Methods:** We analyzed samples from healthy volunteers (27), untreated hemophiliacs (24), and treated hemophiliacs (68). These hemophiliacs received FVIII concentrates Refacto (24), Advate (19), Kogenate (19), Helixate (6), Aafact (2) or Minrin (29). The chromogenic and clotting FVIII assays (total CV 6.1 and 4.3%, resp. 2.1 and 6.3% for normal pool and 40% FVIII concentration) were determined using Siemens reagents on a CA-7000 system.

**Results:** In healthy volunteers and hemophiliacs we found a mean 22.7% and 9.0% lower result with the chromogenic assay. Pfizer inc. (formerly Wyeth) recommends to use a chromogenic assay and a Refacto laboratory standard for monitoring Refacto treatment, we found a negative difference of 12.5% (-25.2 to 25.1%). Treatment with Advate (20.2%; -11.6 to 44.2%), Kogenate (18.7%; 5.1 to 40.4%), Helixate (11.2%; -20.8 to 29.3%), and Aafact (2.8%; -5.6 to 11.3%) generally showed a positive difference with the chromogenic assay. The Minrin-treated patients showed a positive difference of 14.1% (-2.2 to 35.5%).

**Conclusion:** The differences in factor VIII results between a one-stage clotting assay and a chromogenic assay can be very large in individual patients, but also on average. Physicians and clinical chemists should be aware of these differences when interpreting factor VIII results in individual patients.

### Categorie 1 Analytisch

#### Immunoassay, (bloedgroepen-)serologie

## 23. Invloed van verschillende ACTH methoden op de ACTH concentraties gemeten bij patiënten met kleincellig longcarcinoom

J.A.P. BONNS<sup>1</sup>, A.C. DINGEMANS<sup>2</sup>, P.P.C.A. MENHEERE<sup>1</sup>

Laboratorium Klinische Chemie<sup>1</sup>, Afdeling Longziekten<sup>2</sup>, Universitair Medisch Centrum, Maastricht

**Inleiding:** Adrenocorticotroop hormoon (ACTH) wordt gemeten bij verdenking van stoornissen in de hypothalamus-hypofyse-bijnier as. Bij patiënten met kleincellig longcarcinoom (SCLC) kan er sprake zijn van ectopische ACTH productie. Eind december 2009 werd er bij een SCLC patiënt een discrepantie gezien tussen de uitslagen verkregen met twee verschillende ACTH methoden. Het doel van deze studie is om verschillende ACTH methoden te vergelijken bij SCLC patiënten.

**Methode:** In een pilotstudie zijn EDTA plasma monsters van negen SCLC patiënten gemeten met drie verschillende ACTH methoden; immunoradiometrische methode (IRMA, Brahms), chemiluminescentie-immunometrische methode (Elecsys, Roche), radioimmunoassay (RIA, DRG). Er werden tevens twaalf EDTA plasma monsters van patiënten die een insuline tolerantietest (ITT) hebben ondergaan gemeten met de IRMA en RIA methoden. Standaard wordt op ons laboratorium de specifieke IRMA methode gebruikt.

**Resultaat:** De gemiddelde ACTH Elycsys/IRMA en RIA/IRMA ratio's bedroegen respectievelijk 0,84 (range: 0,61-0,94) en 4,66 (range: 1,52-17,0) voor de negen SCLC patiënten. De RIA/IRMA ratio bedroeg 1,96 (range: 0,90-5,25) voor de ITT groep. De gemiddelde RIA/IRMA ratio in de SCLC groep is een factor 2,4 hoger ten opzichte van de ITT groep.

**Conclusie:** Ectopische ACTH productie kan leiden tot discrepanties in de ACTH concentraties gemeten met verschillende methoden. In het geval van ectopisch ACTH productie is men niet alleen geïnteresseerd in de concentratie van het intacte ACTH, maar ook in de totale ACTH concentratie inclusief fragmenten, afbraakproducten en precursors. In die gevallen is het zinvol om tevens een RIA methode in te zetten. Als klinisch chemicus dient men goed op de hoogte te zijn van de verschillende methoden en de mogelijke kruisreacties aangezien dit zeer belangrijk is voor een correcte interpretatie van de patiëntenuitslagen.



## 24. Validatie van de 25-hydroxyvitamine D-bepaling op de iSYS (IDS) en vergelijking met 3 andere 25-hydroxyvitamine D-bepalingen

H.H. van ROSSUM<sup>1</sup>, M.M. BUIJS<sup>2</sup>, J.M.W. van den OUWELAND<sup>3</sup>, G. STEEN<sup>1</sup>

*Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium<sup>1</sup>, Bronovo ziekenhuis, Den Haag; Medial Diagnostische Centra<sup>2</sup>, Hoofddorp; Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>3</sup>, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen*

**Inleiding:** De huidige 25-hydroxyvitamine D-bepaling in het Bronovo ziekenhuis maakt gebruik van HPLC-UV. Gezien de sterk toegenomen vraag naar 25-hydroxyvitamine D-bepalingen en de beperkte capaciteit en hoge werkbelasting inherent aan de HPLC-techniek werd gezocht naar een geautomatiseerde 25-hydroxyvitamine D-methode.

**Methode:** Een geautomatiseerde chemiluminescentiemethode (iSYS, firma IDS) is gevalideerd waarbij reproduceerbaarheid, drift, carry-over en lineariteit middels het CLSI EP10-protocol zijn onderzocht. Daarnaast werden de volgende 25-hydroxyvitamine D-methoden met de iSYS en/of de LC-MS/MS als referentie methode vergeleken met behulp van het CLSI EP9-protocol (n=63): LIAISON (Diasorin, Medial), iSYS (IDS, Medial) en Modular E170 (Roche; monoklonaal 25-hydroxyvitamine D3-reagens, Medial). Methoden werden onderling vergeleken met behulp van Passing-Bablok regressieanalyse. Daarnaast werd de Pearson's correlatiecoëfficiënt (r) berekend. De volgende validatiecriteria werden gebruikt: een maximaal toegestane totale variatiecoëfficiënt (VC) van 10%, niet-signi-

ficant afwijkende intercept en slope t.o.v. de referentiemethode en een minimale r van 0,90.

**Resultaat:** De iSYS 25-hydroxyvitamine D-methode vertoonde geen significante drift en carry-over en was lineair van 33 tot 109 nmol/l met totale VC's van 7,9% (33 nmol/l), 5,6% (69 nmol/l) en 6,5% (109 nmol/l). Het vergelijk van de verschillende immunoassays met de LC-MS/MS gaf de volgende resultaten [slope (95%CI), intercept (95%CI), r]: iSYS vs LC-MS/MS [0,95(0,86-1,05); 9,4 (2,0-14,1); 0,92], LIAISON vs LC-MS/MS [0,72 (0,63-0,81); 1,5 (-4,0-7,0); 0,90] en Modular vs LC-MS/MS [0,68 (0,51-0,86); -7,4 (-18,5-2,7); 0,61]. De vergelijking tussen beide iSYS-systemen (Bronovo en Medial, n=38) gaf de volgende resultaten: iSYS Medial vs Bronovo [0,97 (0,90-1,05); -1,6 (-6,1-1,1); 0,99].

**Conclusie:** De iSYS 25-hydroxyvitamine D-bepaling heeft adequate analytische eigenschappen, laat van de technieken die gebruik maken van immunoassaytechnologie de beste correlatie met de LC-MS/MS referentiemethode zien en blijkt reproduceerbaar op verschillende iSYS-systemen.

## 25. Inventarisatie van standaard macroprolactine screening bij iedere nieuwe hyperprolactinemie

H.H. van ROSSUM, A. CASTEL, G. STEEN

*Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium Bronovo Ziekenhuis, Den Haag*

**Inleiding:** Een verhoogde prolactine-uitslag kan verschillende (patho)fysiologische oorzaken hebben zoals hypofyse-steel pathologie en een prolactinoom. Lichte verhogingen kunnen echter ook een niet-pathologische oorzaak hebben zoals door stress bij afname of macroprolactine interferentie. De interferentie door aanwezigheid van macroprolactine verschilt per analysemethode en is gemiddeld verantwoordelijk voor ongeveer 10% van alle verhoogde prolactine-resultaten. Dit heeft ons ertoe gebracht te inventariseren wat de incidentie van macroprolactine-interferentie is in de patiëntenpopulatie van het Bronovo ziekenhuis gemeten met de IMMULITE 2500.

**Methode:** Er werd bij 20 opeenvolgende verhoogde prolactine-uitslagen een polyethyleenglycol 6000 (PEG6000) precipitatie-experiment uitgevoerd en de recovery van prolactine werd berekend. Indien er sprake was van een recovery van minder dan 60% werd er gesproken van interferentie door macroprolactine.

**Resultaat:** Er werd bij 2 patiënten een recovery van minder

dan 60% gevonden. Bij patiënt 1 (vrouw, 43 jaar, cyclusstoor-nis) werd een recovery van 51% gevonden waarna de prolactineconcentratie nog steeds 1,5x boven de bovengrens van het referentiewaardenbereik lag. In het LUMC (Cobas, Roche) en het Haga ziekenhuis (DxI, Beckman Coulter) werden recoveries van respectievelijk 65% en 73% gevonden bij duidelijk verhoogde prolactineconcentraties. Bij deze vrouw werd middels een MRI van de schedel een microadenoom van 3 mm gevonden. Bij patiënt 2 (man, 66 jaar) werd een prolactine recovery van 26% gevonden. Hier was prolactine onbedoeld aangevraagd. Na precipitatie-behandeling normaliseerde de prolactineconcentratie. Verder was er geen kliniek die paste bij een verhoogde prolactineconcentratie.

**Conclusie:** Door standaard screening op de aanwezigheid van macroprolactine werd er bij ongeveer 10% van iedere nieuwe hyperprolactinemie, relevante macroprolactine interferentie gevonden. Het vaststellen van deze interferentie sloot echter prolactine gerelateerde pathologie niet uit.

## 26. Vrij T4 bij neonaten: groot verschil tussen Immulite/VISTA en Vitros ECI

F. WEERKAMP, R.W. WULKAN

*Afdeling Klinische Chemie, Maasstad Ziekenhuis, Rotterdam*

**Inleiding:** Schildklierhormoon is essentieel voor een goede groei en hersenontwikkeling van neonaten. Vroege opsporing van hypothyreodie door meting van vrij T4 (fT4) is daarom van levensbelang. Ook de initiële monitoring van suppletie met Thyrox gebeurt door het vervolgen van fT4.

**Methode:** In het Maasstad ziekenhuis wordt fT4 sinds april 2010 gemeten op de Dimension VISTA en daarvoor op de Immulite 2500. De VISTA en Immulite stemmen goed overeen voor volwassen monsters. Neonatale monsters worden daarnaast naar het Erasmus MC gestuurd voor meting met de Vitros ECI. De fT4 waardes gevonden met beide bepalingmethoden werden met elkaar vergeleken.

**Resultaat:** Bij alle patiënten werden lagere fT4 waardes gevonden in het Maasstad ziekenhuis dan in het Erasmus MC. De grootte van de afwijking was zeer variabel (range verschil 0,4-

28,5 pmol/l) en leeftijdsafhankelijk. De afwijking was bij kinderen van 2 tot 5 dagen oud veel groter dan in navelstrengbloed en nam daarna af met toenemende leeftijd. De verschillen tussen VISTA/Immulite en Vitros in de SKML rondzending konden de gevonden afwijkingen niet verklaren. De oorzaak van het verschil lijkt ook niet te liggen in de TBG concentratie: uit de literatuur blijkt TBG niet verhoogd bij zeer jonge neonaten. Bovendien vinden wij een verschil in fT4 van 14 pmol/l bij een TBG deficiënt kind (8 dagen).

**Conclusie:** Hoewel een sluitende verklaring voor deze bevinding nog ontbreekt, is het voor laboratoria en kinderartsen belangrijk alert te zijn op het feit dat verschillende bepalingmethoden grote verschillen in fT4 waardes kunnen opleveren bij neonaten. Dit zou potentieel kunnen leiden tot overdosering van T4. Bij rondvraag bleek dit verschijnsel vrijwel onbekend te zijn.

## 27. Validatie van de derde generatie-PTH(1-84)-bepaling

M.M.J.F. KOENDERS, J. van KASTEREN, M. HAMERS-DRIJVERS, L. BURGMANS, R. TRIEPELS  
*Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium en Trombosedienst, St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg*

**Inleiding:** Tweede generatie-immunoassays gericht tegen 'inact' PTH kruisreageren met inactieve PTH-fragmenten (o.a. getrunceerd-PTH (PTH(7-84))). Deze kruisreactiviteit verschilt per assay en resulteert in een verminderde reproduceerbaarheid tussen laboratoria en de daaraan gekoppelde handhaving van richtlijnen. Patiëntafhankelijke accumulatie van inactieve PTH-fragmenten in dialysepatiënten leidt mogelijk tot klinische non-uniformiteit. Recentelijk is de derde generatie-PTH(1-84)-immunoassay van Diasorin op de markt gebracht. Volgens de fabrikant is de assay gericht tegen biologisch actief en intact PTH (PTH(1-84)) en is er geen kruisactiviteit met inactieve PTH-fragmenten. De genoemde test is technisch gevalideerd. Voorlopige data van een uitgebreide klinische correlatiestudie (n = 250), waarbij de focus ligt op verbetering van inzicht in de klinische outcome van uremische dialysepatiënten, worden gepresenteerd. **Methode:** De PTH(1-84)-assay is m.b.v. de Liaison (Diasorin) technisch gevalideerd volgens een CLSI geaccrediteerd EP5. De patiëntafhankelijke correlatie tussen de Liaison (Diasorin) en

Cobas Elecsys e6000 (Roche) is in kaart gebracht voor een populatie patiënten met en zonder nierfalen.

**Resultaat:** Het EP5 is goedgekeurd op grond van verificatie van de door de fabrikant opgegeven testspecificaties. Ondanks een gemiddelde correlatiecoëfficiënt groter dan 0,975 vertoont het procentuele meetverschil tussen de Liaison en de Cobas een patiëntafhankelijk karakter.

**Conclusie:** De derde generatie-PTH(1-84)-assay is technische gezien een solide test voor de bepaling van intact PTH. Door de schijnbaar afwezige kruisreactiviteit met PTH-fragmenten zal invoering van de genoemde test leiden tot een betere reproduceerbaarheid tussen laboratoria en een betere handhaving van internationale richtlijnen m.b.t. behandeling van dialysepatiënten. Met de komst van de derde generatietest is het aannemelijk dat de clinicus beter inzicht krijgt in de overschatting van PTH concentraties door testen van de tweedegeneratie en kan deze het therapeutische handelen van secundaire hyperparathyreoïdie/renale osteodystrofie optimaliseren.

## 28. Analytische evaluatie van de Abbott Architect 25OH-vitamine D

F.A.L. van der HORST, J. VERZIJL, I. BLANC  
*Diagnostisch Centrum SSDZ, Reinier de Graaf Groep, Delft*

**Inleiding:** Vitamine D deficiëntie heeft een hoge prevalentie binnen een aantal grote bevolkingsgroepen. De bepaling van 25-hydroxy vitamine-D (25OH-VD) is een belangrijke parameter voor het vaststellen van de vitamine-D status. Het is daarom gewenst te kunnen beschikken over een snelle en betrouwbare methode voor de bepaling van 25OH-VD. Hier beschrijven wij onze bevindingen van de analytische evaluatie van de Abbott Architect 25OH-VD bepaling, die recent op de markt is verschenen.

**Methode:** Voor de evaluatie op een routine Architect CI8200, zijn vijf (pre-)productie lots gebruikt. De correlatie van de Architect-methode met de Diasorin '25-hydroxy vitamine-D TOTAL'-methode op de Liaison en een LC-MS/MS referentiemethode geschiedde conform NCCLS-EP-9. De analytische kwaliteit werd conform EP-10 gedaan. De seizoens-referentiewaarden werden in 525 gezonde mannen en vrouwen bepaald. **Resultaat:** De relatie tussen de Architect 25OH-VD resultaten en LC-MS/MS referentiemethode was 1,03 (n=106) met een re-

latiecoëfficiënt (RC) van 0,90. De helling met de resultaten van de Liaison was 1,23 (n=314). In het interval 30 tot 100 nmol/l was de imprecisie beter dan 5%. Het verschil tussen de resultaten van controle- en patiëntenmonsters bij een 'between-calibration' (n=5), 'between run' (n=3) en 'between-lot' (n=3) setting was in alle gevallen minder dan 6 %. De resultaten (n=12) van de DEQAS 25OH-VD rondzending vielen binnen de 1-SD interval. De functioneel detectielimiet (CV<20%) is ca. 15 nmol/l. De seizoensgebonden referentiewaarden stemmen goed overeen met de literatuur. Gebruikmakend van NIST-SRM972 referentiemateriaal is de recovery van de D2 variant gevonden van ca. 40 % voor de Architect methode en 70% voor de Liaison.

**Conclusie:** De Architect 25OH-VD bepaling toont een goede analytische kwaliteit en een goede correlatie met de referentiemethode. Wij concluderen dat deze methode geschikt is voor klinisch gebruik.

## 29. Evaluation of a new procalcitonin assay for the Siemens Advia Centaur with the established method on the BRAHMS® Kryptor

R.J. SANDERS<sup>1</sup>, M. SCHOORL<sup>1</sup>, E. DEKKER<sup>1</sup>, D. SNIJDERS<sup>2</sup>, W.G. BOERSMA<sup>2</sup>, E. ten BOEKEL<sup>1</sup>  
*Department of Clinical Chemistry, Hematology and Immunology<sup>1</sup>, Department of Pulmonary Diseases<sup>2</sup>, Medical Center Alkmaar, Alkmaar, The Netherlands*

**Introduction:** Procalcitonin (PCT), the precursor of the calcitonin hormone, is secreted by various cell types as a response to bacterial infections. Levels of PCT increase upon infections and decrease upon recovery. PCT is a widespread biomarker of bacterial infections, particularly lower respiratory tract infections, which is used in different clinical settings, including primary care, emergency room and intensive care. It can be used to guide antibiotic therapy in patients. In this study, we compared the established BRAHMS Kryptor PCT assay with the newly developed Advia Centaur BRAHMS PCT assay.

**Methods:** The Advia Centaur assay is a one-step immunometric assay using three monoclonal antibodies and chemiluminescent detection, enabling quantitative measurement of PCT in the range from 0.02 - 100 µg/L. The study is performed in serum samples of 97 subjects admitted with common acquired pneumonia.

**Results:** Methods were compared by Passing and Bablok regression analysis. The correlation between Kryptor and Centaur of the total sample range was found to be very good: (y = 0.880x - 0.025 µg/L); (95 % CI) slope 0.880 (0.843-0.906), intercept 0.025 µg/L (0.013-0.053 µg/L), r<sup>2</sup>=0.9944. The average difference between both methods was 0.66 µg/L [95 % CI: -0.18 to 0.29 µg/L]. With the cutoff used in our medical setting, 0.25 µg/L, 94 % of all samples were concordant for both assays.

**Conclusion:** The PCT assay on the Advia Centaur shows a good correlation and concordance with the established Kryptor method. Our data support the use of the same nominal PCT cutoff value previously established for this application. Therefore, the novel Advia Centaur BRAHMS PCT assay is suitable for clinical routine diagnostics.

### 30. Snelheid belangrijker dan afname temperatuur

J. CURVERS, A.K. BOER

*Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina Ziekenhuis, Eindhoven*

**Inleiding:** Het meten van peptidehormonen zoals renine en ACTH is afhankelijk van de afname temperatuur. Afnamesbuisen voor ACTH moeten bijvoorbeeld zo snel mogelijk op ijs worden geplaatst, terwijl renine-buisen juist niet op ijs geplaatst mogen worden. Echter, de mate waarin dit temperatuur-effect de uitslag beïnvloedt, wordt niet gespecificeerd.

**Methode:** In dit onderzoek hebben we gekeken naar de invloed van temperatuur op de renine (massa) en ACTH-concentratie gemeten op de Liaison (platform DiaSorin). Bij 10 vrijwilligers werd tussen 9.00-10.00 uur 's ochtends (piekwaarde) 2 EDTA-buisen afgenomen. Deze buizen werden 0 of 6 uur bewaard bij kamertemperatuur of op smeltend ijswater. Om overige pre-analytische variabelen te beperken, zijn de plasma's vervolgens met vloeibare stikstof ingevroren en bewaard bij -20 °C.

**Resultaat:** Wanneer de condities voor renine worden vergeleken valt op dat het bewaren op ijswater resulteert in een circa 5-14% hogere renineconcentratie dan bij kamertemperatuur,

maar dat de temperatuur geen invloed heeft als de monsters direct (<30 minuten) worden verwerkt. Een onverwachte bevinding was dat de renine-concentratie op kamertemperatuur daarentegen lijkt af te nemen. Wanneer de condities voor ACTH worden vergeleken valt op dat het 6 uur bewaren bij kamertemperatuur resulteert in een circa 20% lagere ACTH concentratie dan het afnemen op ijswater en direct meten. Dit effect wordt ook gezien als de afnamesbuis 6 uur wordt bewaard op ijswater. Kennelijk neemt de ACTH-concentratie in de tijd af, onafhankelijk van de bewaartemperatuur.

**Conclusie:** Wanneer EDTA-plasma direct (binnen 30 minuten) wordt verwerkt op het laboratorium heeft de afname temperatuur geen effect op de renine en ACTH-concentratie gemeten op de Liaison (DiaSorin). Bovendien blijken de temperatuur-effecten na 6 uur beperkt te blijven tot slechts een fractie van de verwachte fout op basis van biologische variatie.

### 31. Versimpelde afnamecondities voor PTH bij de juiste platformkeuze

J. CURVERS, A.K. BOER

*Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina Ziekenhuis, Eindhoven*

**Inleiding:** Parathormoon (PTH) is gevoelig voor in vitro degradatie door calcium-afhankelijke proteasen. Het meten in EDTA-plasma en afnemen op ijswater reduceren deze afbraak. Het afnemen op ijswater is arbeidsintensief en kent restricties qua afname locatie (externe prikposten). De noodzaak van "afnemen op ijswater" wordt in alle literatuur vermeld, maar de mate van het temperatuur-effect is niet beschreven.

**Methode:** Wij hebben de invloed van afname temperatuur op vier moderne PTH-bepalingen uitgetest; 1) de intact-PTH assay op de Centaur (Siemens); 2) de intact-PTH assay op de Cobas 6000 (Roche); 3) de intact-PTH assay en 4) de full-length-PTH assay, beide op de Liaison (DiaSorin). Voor de vergelijking werd bij 10 vrijwilligers twee EDTA-buisen afgenomen, een EDTA-buis op kamertemperatuur en een op smeltend ijs. Daarnaast werd van 20 patiënten met een verhoogde PTH-waarde een EDTA-buis afgenomen en bewaard op kamertemperatuur, teruggezocht. De PTH werd voor de buis op ijs direct gemeten

en de buis op kamertemperatuur werd 6 tot 8 uur bewaard alvorens de PTH gemeten werd.

**Resultaat:** De Roche en Siemens assays worden niet beïnvloed door afname bij kamertemperatuur (Passing en Bablock analyse Roche:  $y=0.93x+0.45$ ;  $r=0.998$ ;  $n=25$  en Siemens:  $y=1.01x-0.11$ ;  $r=0.990$ ;  $n=30$ ). De bepalingen van DiaSorin blijken wisselend te worden beïnvloed door de afnamecondities. De intacte PTH assay laat in de kamertemperatuur-plasma's een negatieve bias van 14% zien t.o.v. de afname op ijs (Passing en Bablock analyse  $y=0.86x+0.85$ ;  $r=0.994$ ;  $N=29$ ), terwijl de nieuwste full-length PTH assay niet gestoord wordt (Passing en Bablock analyse  $y=1.02x+0.19$ ;  $r=0.994$ ;  $n=16$ ).

**Conclusie:** De PTH bepalingen van Roche, Siemens en Liaison (full length) worden niet beïnvloed wanneer afgenomen bloed tot 8 uur wordt bewaard bij kamertemperatuur. De afnamecondities van de PTH bepaling kunnen hierdoor in hoge mate worden versimpeld.

### 32. What you see is not what you get: cardiac troponin T and I in AMI serum is mainly degraded

A.M.A. MINGELS, W.K.W.H. WODZIG, M.P. van DIEIJEN-VISSER

*Department of Clinical Chemistry, University Medical Center, Maastricht, The Netherlands*

**Introduction:** Cardiac troponins (cTn) are the recommended biomarkers to diagnose and monitor an acute myocardial infarction (AMI). However, structural characteristics of cTnT and cTnI in serum/plasma are still unclear and are expected to be of importance for clinical interpretation and assay harmonization. Here, we investigate the native conformation of cTn in serum of an AMI patient.

**Methods:** Non-covalent complexation of cTnT-cTnI-cTnC in serum was investigated using gel filtration chromatography (GFC). Fractions were subjected to immunoprecipitation, SDS-PAGE, and Western Blot (WB) analysis using cTnT and cTnI antibodies similar to the ones used in the Roche 4th generation and Abbott AxSYM-cTnI immunoassays, respectively. cTn in serum from an AMI patient (female, 84 y) was studied 3, 14, 22, and 46 hours after admission to the emergency department.

**Results:** GFC elution profiles illustrate that cTnT and cTnI conformation in serum of the AMI patient was dependent on the time from admission. Except for the first 3 hours, cTnT (MW estimated, 40 kD) as detected with the Roche antibodies was completely degraded (100%) into smaller fragments of around 29, 17, 16, and 15 kD. In addition, cTnI (MW estimated, 28 kD) in serum as detected with the AxSYM-cTnI antibodies was in complex with TnC and degraded for >50% into 25, 18, and 15 kD fragments.

**Conclusion:** We prove that cTnT as measured with the Roche immunoassay in AMI serum is mainly present as cTnT degradation products. In addition, we confirm that cTnI is in complex with TnC both in the intact and degraded form. Future research has to point out whether cTn structures in non-AMI subjects with elevated cTn concentrations deviate from AMI subjects, like in subjects after prolonged exercise.

### 33. Stability of cardiac troponin T and I in human serum or plasma spiked with NIST standard reference material 2921

A.M.A. MINGELS<sup>1</sup>, C.M. COBBAERT<sup>2</sup>, W.F.P.M. van den HOF<sup>1</sup>, N. de JONG<sup>3</sup>, M.P. van DIEIJEN-VISSER<sup>1</sup>  
*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Maastricht University Medical Center, Department of Clinical Chemistry<sup>2</sup>, Leiden University Medical Center, Department of Clinical Chemistry and Hematology<sup>3</sup>, Amphia Hospital, Breda, The Netherlands*

**Introduction:** Ultimate standardization of troponin T (cTnT) and especially troponin I (cTnI) assays is dependent on the availability of an international recognized reference system. Recently, well characterized NIST standard reference material (SRM) 2921 became available. With this reference material European Quality Assurance Organizations (EQAS), such as the Dutch SKML, aim to monitor cTnT and cTnI standardization and harmonization.

**Methods:** Serum and heparin plasma from healthy controls were spiked with NIST SRM 2921 1:400, incubated at 4 and 37°C, and aliquots were collected at 0, 0.5, 2, 6, 24, 48, and 72 h. cTnT and cTnI stability were investigated using a Cobas 6000 (Roche) and AxSYM (Abbott) analyzer, respectively. In addition, immunoprecipitation followed by Western Blot was performed using the catcher and detector antibodies similar to the commercial immunoassays.

**Results:** Overall cTnT recovery for NIST SRM 2921 remained constant (>90%) when incubated in serum or plasma for 3 days at 4°C. Western Blot detection confirmed no time-dependent degradation of cTnT (MW estimated, 40 kD) in plasma, but in serum fragmentation products appeared of 29 and 16 kD. Incubation at 37°C resulted in decreased cTnT recovery (59%) and Western Blot detection confirmed the higher extent of cTnT degradation. Moreover, cTnI recovery remained constant when incubated at 4°C (>90%), but not at 37°C (<60%), and Western Blot detection did not reveal time-dependent degradation.

**Conclusion:** We show that cTnT in NIST SRM 2921 standard is susceptible to time-dependent degradation when spiked in serum and stored at 4°C but not in heparin plasma. For cTnI, as measured with the AxSYM assay, this seems not the case. Overall, spiked heparin plasma is thus preferable for cTnT and cTnI standardization and harmonization purposes.

Categorie 1 Analytisch

**Chromatografie: HPLC, GC, CE**

### 34. Detectie van een vloeibare streepjescode in urine als identificatie van een patiënt

M. de GRAAF, L. LIEBREGT, H. HATZMANN, A. KOIJMAN  
*Salto, Utrecht*

**Inleiding:** Falsificatie van urine is een groot probleem bij controle van drugsverslaafden. Door zowel intrinsieke als extrinsieke factoren kan de uitslag in de urine worden beïnvloed. Er zijn zelfs commerciële kits met vervalste urine via Internet beschikbaar. In de praktijk probeert men zichtcontrole de vervalsingen tegen te gaan. Dit is echter tijdrovend en verstorend voor de relatie tussen patiënt en zorgverlener. Door patiënten voor de urineproductie een markervloeistof oraal te laten innemen, kan falsificatie van urine worden voorkomen. Deze techniek is ontwikkeld in Duitsland en werkt op basis van PEG-moleculen. De techniek wordt veelal toegepast in de verslavingszorg, maar kent ook andere mogelijkheden (o.a. penitentiaire inrichtingen, sport, scholen, werkplaatscontrole, verkeer). De resultaten van de marker met de eerste 15 patiënten worden hier gepubliceerd. Naast de markervloeistof wordt ook controle op het uitspugen van de marker ('spitmarker') en op het urinemonster ('sample check') zelf uitgevoerd.

**Methode:** HPLC met refractieindex. Na onteiwitting wordt de urine direct geïnjecteerd.

**Resultaat:** Er zijn 15 patiëntenmonsters van 6 verschillende patiënten met het markersysteem getest. De ingenomen markers zijn bij alle 15 patiënten in de urine teruggevonden. Zowel de 'spitmarker' als de 'sample check' van de 15 patiëntenmonsters gaven geen afwijkingen te zien. Eén urinemonster had een te lage kreatinineconcentratie, maar de marker was wel aantoonbaar.

**Conclusie:** De urinemarker heeft geen afwijkingen laten zien. De patiënt is hiermee zelf verantwoordelijk gemaakt voor het inleveren van een juist urinemonster. Extrinsieke en intrinsieke beïnvloeding van het urinemonster wordt opgespoord door de diverse controles in het systeem.

**Literatuur:** Kaarlo Simojoki et al. Heroin Addict Relat Clin Probl 2010; 12(1): 25-32.

### 35. Gecombineerde vitamine B1 en B6 bepaling m.b.v. de HPLC

F.P.W. TEGELAERS<sup>1</sup>, J. HAGEN<sup>1</sup>, B.J. KOOMEN<sup>1</sup>, S. WIERINGA<sup>2</sup>  
*Laboratorium KCHI, Medisch Centrum Alkmaar<sup>1</sup>; Instruchemie<sup>2</sup>, Delfzijl*

**Inleiding:** De bepaling van vitamine B1 en vitamine B6 geschiedt doorgaans m.b.v. twee afzonderlijke HPLC bepalingen, die verschillen in onteiwittingsmethode, derivatiseringsstap en loopvloeistof. Een (partitiële) samenvoeging in één bepalingstechniek levert een aanzienlijke tijdswinst op. Instruchemie heeft een geïntegreerde methode ontwikkeld. De methode is verder getest in het Medisch Centrum Alkmaar.

**Methode:** EDTA bloed wordt onteiwit. Het supernatant wordt in twee porties gesplitst: in deze porties vinden (gescheiden) derivatiseringsstappen voor B1 en B6 plaats. Vervolgens worden beide porties weer bij elkaar gevoegd. Het gecombineerde monster wordt op een Polaris C18A kolom gescheiden met één enkele mobiele fase en gedetecteerd m.b.v. fluorescentie.

**Resultaat:** De B1 en B6 resultaten van de gecombineerde methode zijn middels Passing Bablok vergeleken met de afzonderlijke in gebruik zijnde methoden van het Medisch Centrum Alkmaar.

De CV's van verschillende levels zijn bepaald, evenals de gevoeligheid van de nieuwe methode voor de beide vitamines. Daarnaast wordt er aanzienlijk tijd bespaard in de voorbewerking: 50 patiëntenmonsters duren nu nog ruim tweemaal drie tot vier uur en met de nieuwe geïntegreerde methode éénmaal twee uur.

**Conclusie:** De nieuwe geïntegreerde methode draait op dezelfde HPLC apparatuur als voorheen, zonder extra investeringen. De correlatie van de vitamine B6 en B1 met de afzonderlijke methoden is goed ( $r > 0,95$ , resp.  $> 0,89$ ); de bias is echter afhankelijk van de gebruikte calibrator. De CV's zijn vergelijkbaar met de afzonderlijke methoden (<5%). De gevoeligheid van de combi B6 bepaling is vergelijkbaar met de losse B6 bepaling. De combi B1 bepaling is iets minder gevoelig dan de losse methode, zonder dat dit klinische consequenties heeft. De gerealiseerde tijdsbesparing in de voorbewerking is aanzienlijk; daarnaast kan volstaan worden met één HPLC run.

### 36. Evaluatie van de Tosoh G8 HPLC-analyzer

H. ULENKATE, M. SLABBEKOORN, R. RIEMENS, M. POISSONNIER, C. VERSLUYS  
*Klinisch Chemisch Laboratorium, ZorgSaam Ziekenhuis Zeeuws-Vlaanderen, Terneuzen*

*Inleiding:* HbA1c wordt gemeten met de Tiniquant methode op de Cobas6000 van Roche. Als mogelijk alternatief wordt de G8 HPLC van Tosoh geëvalueerd. Hiertoe werd tijdelijk een G8 analyser op het laboratorium geplaatst.

*Methode:* De HbA1c is d.m.v. een korte evaluatie uitgetest op de G8 in de var-mode. Met verschillende levels van controle- en patiëntmateriaal is de lineariteit, reproduceerbaarheid en carry-over getest. Circa 200 patiëntmonsters met een HbA1c tussen 4-12% zijn zowel op de Cobas (2e generatie reagens) als op de G8 gemeten. Waardes zijn als volgt uitgedrukt: gemiddelde $\pm$ cv%.

*Resultaat:* De lineariteit is getest met 2 monsters: 4,74% en 10,95%. De recovery ligt tussen 98,8-100,9%;  $y=0,995+0,009x$ ;  $r^2=0,9997$ . De reproduceerbaarheid (20x, 1 dag) van 2 controlemonsters:  $5,60\pm 0,61\%$  en  $10,09\pm 0,35\%$  en van 3 patiëntmonsters:  $5,04\pm 0,4\%$ ;  $7,54\pm 0,3\%$  en  $8,85\pm 0,4\%$ . De reproduceerbaarheid (ochtend en middag in duplo, 5 dagen) van 2

controlemonsters:  $5,52\pm 1,14\%$  en  $10,10\pm 0,67\%$  en van 3 patiëntmonsters:  $4,98\pm 0,31\%$ ;  $7,61\pm 0,18\%$  en  $9,70\pm 0,24\%$ . De carry-over is getest met 2 monsters van 5,25% en 10,06%. De recovery ligt tussen 98,8-100,5%. Methodevergelijking G8 versus Cobas:  $y=1,13x-6,3467$ ;  $r^2=0,977$ ;  $n=203$ . Kwaliteitscontroles G8 ( $n=13$ ):  $5,53\pm 2,13\%$  en  $10,07\pm 0,62\%$ . Kwaliteitscontroles Cobas ( $n=13$ ):  $5,8\pm 2,06\%$  en  $9,6\pm 0,98\%$ ; bij  $n=600$ :  $5,8\pm 3,44\%$  en  $9,7\pm 3,12\%$ .

*Conclusie:* De lineariteit op de G8 is prima en er is geen carry-over aantoonbaar. De waarde en de cv van de lage kwaliteitscontrole van de G8 liggen wat aan de hoge kant. De patiëntresultaten van de Cobas6000 komen goed overeen met die van de G8. De cv's op de G8 zijn kleiner dan die op de Cobas. Op beide analyzers kan in volbloed als hemolysaat gemeten worden. De G8 beschikt tevens over cap piercing en kan in de var-mode melding maken van Hb-varianten.

Categorie 1 Analytisch

**Vlamfotometrie, AAS, massaspectrometrie**

### 37. Measurement of histamine in plasma using UPLC-tandem mass spectrometry

J.A. BAKKER, W.A.H. WATERVAL, J. BIERAU

Laboratorium Erfelijke Metabole Ziekten, Maastricht Universitair Medisch Centrum, Maastricht

*Introduction:* Histamine serves a number of functions, e.g. immunomodulation, vasodilatation, smooth muscle contraction. To examine the role of histamine as a marker for mast cell activation we adapted our method for the analysis of underivatized amino acids in body fluids for the determination of histamine in plasma.

*Methods:* 100  $\mu$ l of plasma was mixed with 10  $\mu$ l 50 nM D4-Histamine (internal standard) and applied to a PES-10K centrifugal filter tube. The filtrate was mixed with an equal volume of 1mM Tridecafluoroheptanoic acid (TDFHA). Injection volume was 5  $\mu$ l. Separation of histamine was achieved on an Acquity UPLC BEH C18, 1.7  $\mu$ m, 2.1\*100 mm column using a linear gradient system of water/acetonitril, both containing 0.5 mM TDFHA; flow rate was 650  $\mu$ l/min. The column effluent from 10 to 15 minutes was directed into the MS. Run to run time was 30 minutes. Detection was performed using

a Waters Quattro Premier XE Tandem Mass Spectrometer in positive ionization-multiple reaction monitoring mode, m/z transitions were  $111.7 > 94.7$  for histamine and  $115.7 > 98.7$  for D4-histamine.

*Results:* Calibration was performed using aqueous standards in the range of 0-40 nM histamine. Sensitivity was 5-15 fmol, both in water and plasma. Mean response factor for aqueous standards and plasma were identical: 0.96 (VC 5%). Linearity and accuracy were tested and the mean recovery in plasma was 103% (VC 9%). The limit of detection was 3 fmol histamine on column (signal-to-noise ratio 3). The intra-assay variation at a mean concentration of 5.7 nM was 5.6%. Inter-run variations were comparable. Reference values were determined in plasma.

*Conclusion:* Quantification of histamine in the nanomolar range in plasma was easily achieved using the described method.

### 38. Vitamin B6 measurement in whole blood using LC-MS/MS

B.D. van ZELST, R. de JONGE

*Department of Clinical Chemistry, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands*

*Introduction:* Vitamin B6 is a cofactor in numerous biologic processes that include gluconeogenesis, neurotransmitter synthesis and amino acid metabolism. Our aim was to develop a method to measure the concentration of the biologically active form of vitamin B6 (pyridoxal-phosphate PLP) in heparin whole blood with stable isotope dilution LC-MS/MS and compare this new procedure with an established home-made HPLC method based on derivatization of pyridoxal-phosphate.

*Methods:* A stable isotope (PLP-D3) was added to the samples, followed by deproteinization with 20% TCA. After centrifugation, 20  $\mu$ l of the supernatant was injected into the LC-MS/MS. Reversed phase chromatography was performed on a UPLC system, using a Waters<sup>TM</sup> Symmetry C18 column, with a gradient of 0.1% formic acid in methanol. PLP was measured on a tandem MS with a mass transition of  $247.8 > 149.8$  in the positive ion mode with a collision energy of 14 eV.

*Results:* The chromatographic run lasted 5 minutes. The method was linear from 0-300 nmol/l. The intra-assay CV was 2.2% and the inter-assay CV was 4.2% at 122 nmol/l. The absolute matrix-effect was 115%. The relative matrix-effect was 95%. The mean recovery was 95% [91%-105%]. The comparison of the LC-MS/MS method with our current HPLC method yielded the following equation: LC-MS/MS=1.14 [95% CI: 1.07-1.21] x HPLC + 6.7 [95% CI: 0.4-11.9] ( $r^2=0.94$ ).

*Conclusion:* This LC-MS/MS based method is characterized by simple sample processing and a short run time. The comparison with the current HPLC method is excellent although a significant positive bias was detected. To conclude, the LC-MS/MS method is an appropriate method to determine PLP in whole blood both for clinical routine and research applications.

### 39. The potential of direct mass spectrometry in haemoglobinopathy analysis

J.A.P. BONNS<sup>1,2</sup>, A.M.J. ROUSSEAU<sup>1</sup>, A. van HEMEL-LIJNEN<sup>1</sup>, Y.M.C. HENSKENS<sup>2</sup>, D. de BOER<sup>1</sup>, W.K.W.H. WODZIG<sup>1</sup>  
*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup> and Laboratory Haematology<sup>2</sup>, Maastricht University Medical Centre, Maastricht, The Netherlands*

**Introduction:** In this study, different technologies to detect haemoglobinopathies were evaluated; ion-exchange High-Performance Liquid Chromatography (IE-HPLC), and direct mass spectrometry (MS). One aim was to evaluate if haemoglobinopathy screening with quantitative HbF and HbA2 measurements can be performed using our in house internal IE-HPLC method by comparing it with an external IE-HPLC method. The role of direct MS was to evaluate the discrepancies during validation and to facilitate the decision process.

**Methods:** EDTA blood samples from 25 patients with an indication for haemoglobinopathy screening were measured on different instruments; Bio-Rad Variant II dual (internal IE-HPLC), Waters Alliance 2690 HPLC of Sanquin Diagnostics (external IE-HPLC), and Applied Biosystems MALDI-TOFMS QSTAR XL (direct MS).

**Results:** The comparison of the HbF and HbA2 data of the internal and external IE-HPLC resulted in correlation coeffi-

cients of 0.98 and 0.96 for HbF and HbA2, respectively. Based on direct MS one homozygous HbS patient was excluded because the external IE-HPLC gave comigration of glycosylated HbS with HbA2. In another case, the MS data confirmed indirectly that a high HbA2 result obtained with the internal IE-HPLC was caused by comigration of HbE and HbA2.

**Conclusion:** Our internal IE-HPLC is suitable for HbF and HbA2 quantitation. Haemoglobinopathy screening with quantitative HbF and HbA2 measurements can be performed in future in our own laboratory. This study indicated that direct MS is complementary in cases of discrepancies between different HPLC methods. At this moment, a liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) method is further optimized for confirmation of haemoglobin variants using tryptic digest analysis of different haemoglobins.

### 40. Methylmalonzuurmeting in serum en urine met behulp van LC-tandemmassa spectrometrie

J.M.W. van den OUWELAND, A.M. BEIJERS, H.W. van DAAL  
*Klinisch Chemisch Laboratorium, Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen*

**Inleiding:** Methylmalonzuur (MMA) is de meest gevoelige en specifieke marker voor de vitamine B12 status op cellulair niveau. We beschrijven hier een LC-MS/MS methode voor de bepaling van MMA in serum en urine.

**Methode:** Na toevoeging van interne standaard (D3-MMA) aan serum of urinemonsters volgt een extractie met acetonitril/methanol (80/20, v/v). Na afdraaien en droogdampen van het supernatant wordt het residu opgelost in bidemi +3% mierzuur (FA). Scheiding van succinaat en MMA geschiedt op een HSS-T3 kolom (Acquity, Waters) met behulp van een methanol/bidemi/FA gradient. Detectie gebeurt op basis van selectieve reactie monitoring (Acquity TQD, Waters). Ter vergelijking zijn serummonsters (n=48) met een tweede LC-MS/MS methode (UMCN) gemeten. Ook is een beperkt aantal urinemonsters (n=5) op een HPLC methode (AML) overgemeten.

**Resultaat:** MMA elueert op 3,3 min op een totale 5 min runtijd. De bepaling is lineair tot 20 µmol/L met intra- and in-

terassay variaties <6% over een range van 0,17-1,19 µmol/l. Functionele gevoeligheid is 0,05 µmol/L met recoveries van 86 tot 115%. Beide LC-MS/MS methoden komen goed met elkaar overeen in een vergelijk van patiëntensera (Passing en Bablok regressie: slope 1,11, intercept - 0,01; r=0.99). Urinemonsters geven lagere waarden met LC-MS/MS dan met de HPLC methode (Passing & Bablok regressie: slope 0,79, intercept -3,11; r=0.99).

**Conclusie:** We hebben een snelle, accurate en robuuste LC-MS/MS methode ontwikkeld voor MMA meting in serum en urine. Deze methode is uitermate geschikt om alle sera met intermediaire B12 concentraties (100-200 pmol/l) op MMA na te bepalen om zo met meer zekerheid een functioneel B12 tekort vast te kunnen stellen.

**Literatuur:** Wiersinga WJ, et al. De diagnostiek van vitamine-B12-deficiëntie herzien. Ned Tijdschr Geneesk 2005;149:2789-94.

### 41. Dexamethasone suppression test: simultaneous determination of cortisol and dexamethasone in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry

C. HEMPEN, S. ELFERING, A.H.L. MULDER, F.A.J.T.M. van den BERGH, R.G.H.J. MAATMAN  
*Clinical Chemistry Laboratory, Hospital Group Twente, Hengelo, The Netherlands*

**Introduction:** Dexamethasone is a synthetic glucocorticoid, which is used in the dexamethasone suppression test to diagnose patients suspected for Cushing's syndrome. Measurement of plasma dexamethasone in addition to cortisol after performing a dexamethasone suppression test may allow clinicians to assess compliance with the protocol and improve the diagnosis of Cushing's syndrome.

**Methods:** A liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) method for both cortisol and dexamethasone was developed and validated. Plasma samples were cleaned-up by solid-phase extraction before analysis. Liquid chromatographic separation was carried out by gradient elution under reversed phase conditions. The analytes were determined and quantified in the presence of deuterated internal standards cortisol-d4 and dexamethasone-d4. Plasma samples were obtained from 28 patients after low-dose overnight dexamethasone suppression test (LDODST).

**Results:** The standard curve for dexamethasone was linear up

to 100 nmol/L and up to 2.2 µmol/L for cortisol, respectively. The limit of quantitation was 1.89 nmol/L for dexamethasone and < 0.02 µmol/L for cortisol. The recoveries of both analytes ranged from 80.2-114.4%. Intra- and inter-assay coefficients of variation (CVs) were <15% for both analytes. The cortisol and dexamethasone concentration was determined in a group of 28 patients after performing LDODST. The interpretation of the LDODST was compared either using only the cortisol concentration or using both the cortisol and dexamethasone concentration.

**Conclusion:** A method for the simultaneous measurement of dexamethasone and cortisol in human plasma by LC-MS/MS has been developed and successfully validated. The method is suitable for controlling the compliance to the LDODST test and for determining the cortisol plasma level after the dexamethasone suppression test. The interpretation of LDODST tests is improved by the simultaneous determination of both analytes.

## 42. Low range accuracy of testosterone immunoassays and possible improvement through sample extraction

W.M. TIEL GROENESTEGER<sup>1</sup>, H.N. BUI<sup>2</sup>, H.L. VADER<sup>3</sup>, W.P. OOSTERHUIS<sup>4</sup>, J. ten KATE<sup>5</sup>, P.P.C.A. MENHEERE<sup>6</sup>, A.C. HEIJBOER<sup>2</sup>, M.J.W. JANSSEN<sup>1</sup>

Laboratory of Clinical Chemistry and Haematology<sup>1</sup>, VieCuri Medical Centre, Venlo; Department of Clinical Chemistry<sup>2</sup>, VU University Medical Center, Amsterdam; Laboratory of Clinical Chemistry<sup>3</sup>, Máxima Medical Centre, Veldhoven; Department of Clinical Chemistry & Hematology<sup>4</sup>, Atrium Medical Center Parkstad, Heerlen; Department of Clinical Chemistry and Hematology<sup>5</sup>, Orbis Medical Center, Sittard-Geleen; Department of Clinical Chemistry<sup>6</sup>, Maastricht University Medical Centre, The Netherlands

**Introduction:** Immunoassays have been shown to overestimate testosterone concentrations in the low measuring range. We studied the accuracy of five in the year 2010 commercially available testosterone immunoassays and possible improvement through sample extraction, by comparison with liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS).

**Methods:** We measured testosterone concentrations before and after a diethyl ether sample extraction in 68 sera categorized by LC-MS/MS as  $\Delta 3.2$  nmol/l. Immunoassays studied were Abbott Architect®, Beckman Coulter Access®, Siemens ADVIA Centaur®, Siemens Coat-a-Count® and the second generation assay Roche Cobas®.

**Results:** The Cobas® assay turned out to be the only immunoassay not significantly different compared with LC-MS/MS (slope 1.20; intercept -0.14; R 0.80). The results for the other

assays were: Architect® (slope 1.79; intercept 0.75; R 0.71), Access® (slope 1.67; intercept -0.24; R 0.76), ADVIA Centaur® (slope 1.50; intercept 0.08; R 0.86) and Coat-a-Count® (slope 1.29; intercept -0.17; R 0.93). Sample extraction clearly improved the accuracy of the Architect® assay (slope 0.88; intercept 0.15; R 0.88) and the Coat-a-Count® assay (slope 1.12; intercept -0.12; R 0.91), as a result of which no significant differences compared with LC-MS/MS existed anymore.

**Conclusion:** The Cobas® assay was the only immunoassay tested, that is reliable for the investigation of testosterone concentrations  $\Delta 3.2$  nmol/l in untreated samples. Sample extraction has to be performed in advance for accurate measurement with the Architect® and Coat-a-Count® assays. Results for the Siemens Immulite® 2000 and the second generation Architect® assays are in progress.

Categorie 1 Analytisch

### Moleculaire biologie

## 43. Genetische determinanten van clozapine-geïnduceerde agranulocytose

H.M. LOOVERS, J. van der WEIDE

GGz Centraal, Ermelo Ziekenhuis St. Jansdal, Harderwijk

**Inleiding:** Het gebruik van het antipsychoticum clozapine wordt beperkt door de relatief hoge kans op agranulocytose (< 0,5 neutrofielen per nL) en de bijbehorende strenge richtlijnen voor het gebruik van clozapine. Indien groepen gedefiniëerd kunnen worden met een hoog of laag risico kan dit protocol worden aangepast.

**Methode:** Patiënten werden geselecteerd op het voorkomen van agranulocytose (n=9) of neutropenie (n=37) tijdens of na clozapine gebruik. Controles (n=74) werden geselecteerd op minimaal 1 jaar gebruik van clozapine en geen documentatie van <2 neutrofielen per nL. DNA samples werden gescreend op acht polymorfismen: ABCB1 G2677T/A, ABCB1 C3435T, CYBA A640G, Hsp70 G1276A, MPO G-463A, NQO1 C609T, NQO2 G1541A en TNF G-308A met behulp van PCR, gevolgd door allel-specifieke digestie. De genetische determinanten die in dit onderzoek onderzocht werden, zijn betrokken bij het me-

tabolisme van clozapine, de distributie van clozapine en/of zijn eerder beschreven als mogelijk genetische determinanten voor clozapine-geïnduceerde agranulocytose.

**Resultaat:** Een significant verschil in frequenties werd gevonden voor Hsp70 G1267A voor de groep met neutropenie (13% vs 24% GG, p=0,01). Verschillen in frequentie van de overige afzonderlijke polymorfismen waren niet significant, maar bij patiënten met agranulocytose leek het GG genotype vaker voor te komen (44% vs 24%, p=0,24). De genotype combinatie Hsp70 (1267) GG + ABCB1 (2677) GG kwam in de agranulocytose groep significant vaker voor (44% vs 5%, p=0,004).

**Conclusie:** Overeenkomstig met eerdere studies lijkt het polymorfisme Hsp70 G1267A geassocieerd te zijn met clozapine-geïnduceerde agranulocytose. De associatie tussen ABCB1 G2677T/A en agranulocytose wordt in deze studie voor het eerst beschreven.

## 44. Estimation of Coumarin maintenance dose based on VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms

E.M. van BEEK<sup>1</sup>, R. VIJZELAAR<sup>2</sup>, A. VERHEUL<sup>1</sup>, W. KORTLANDT<sup>1</sup>

Laboratory of Clinical Chemistry and Hematology<sup>1</sup>, Diakonessenhuis, Utrecht; MRC-Holland b.v.<sup>2</sup>, Amsterdam, The Netherlands

**Introduction:** Coumarin derivatives, including acenocoumarol, phenprocoumon and warfarin are the most prescribed anticoagulant drug for reducing thromboembolic events. The management of oral anticoagulation is challenging because of a large variability in the dose-response relationship, which is in part caused by genetic polymorphisms. Incorrect dosage, especially during the initial phase of treatment, carries a high risk of either severe bleeding or failure to prevent thromboembolism. Different studies have shown that polymorphisms in the enzyme vitamin K epoxide reductase subunit 1 (VKORC1), the molecular target of coumarins, or in the drug-metabolizing cytochrome P450 (CYP) 2C9 gene, affect coumarin dose requirement. Screening for the presence of polymorphisms in the VKORC1 and CYP2C9 gene may improve management of coumarin therapy.

**Methods:** We designed, developed and validated an assay

based on the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique, allowing simultaneous detection of four VKORC1 and three CYP2C9 polymorphisms. The amplified products were characterized using capillary electrophoresis.

**Results:** So far we screened a small group of patients, using low, intermediate or high doses of coumarin, for the presence of VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms. We found that particular combinations of genetic variation in VKORC1 and CYP2C9 associate with clinically significant coumarin dose requirement.

**Conclusion:** We demonstrated that it is possible to rapidly screen for the presence of VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms using MLPA. This genetic information may help to estimate coumarin dose more precisely and thus improve the efficiency of the dosage titration process.

## 45. Snelle en gevoelige screening van mutaties in het NPM1 gen bij AML diagnose

W.H.A. de JONG, A. SIMPELAAR, A.M. MANSCHOLT, A.B. MULDER  
*Afdeling Laboratoriumgeneeskunde, Universitair Medisch Centrum, Groningen*

*Inleiding:* Mutaties in het Nucleofosmine-1 (NPM1) zijn de meest voorkomende genmutaties bij acute myeloïde leukemie (AML) en zijn geassocieerd met een relatief goede prognose. Het eiwit, gecodeerd door het NPM1 gen, bevindt zich in de nucleolus en transporteert ribosomale eiwitten over de kernmembraan. Het NPM1 gen is gelocaliseerd op chromosoom 5 (5q35) en bestaat uit 12 exonen. De meer dan veertig beschreven mutaties resulteren allen in een netto insertie van vier basenparen in exon 12, waardoor cytoplasmatische locatie van NPM1 optreedt. Het karyotype bij patiënten met deze mutatie is meestal niet afwijkend. Het doel van onze studie is het ontwikkelen van een snelle en eenvoudig uitvoerbare fragmentanalyse methode voor de detectie van NPM1 mutaties in AML patiënten.

*Methode:* Archiefmonsters van 101 bekende AML patiënten negatief voor t(15;17), t(8;21), inv(16) of t(16;16) zijn geanalyseerd. Een met PCR geamplificeerd 192 basenparen groot

fragment uit exon 12 van het NPM1 gen is gebruikt voor fragmentanalyse. Positief bevonden monsters met een 196 basenparen groot fragment werden gesequenced mbv de ABI Prism® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Alle analyses zijn uitgevoerd met een ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

*Resultaat:* Een NPM1 genmutatie is in 26 AML patiënten (26%) met behulp van fragmentanalyse aangetoond en bevestigd door middel van sequencing. Er zijn 8 verschillende mutatie types gevonden, waarvan twee nog niet eerder beschreven. Een verdunningsreeks van de OC-AML3, een controle-celijn met een NPM1-mutatie, toonde een gevoeligheid van 5%, wat ruim voldoende is bij de diagnose van een AML.

*Conclusie:* Deze studie toont aan dat fragmentanalyse geschikt is als snelle, betrouwbare en gemakkelijk uitvoerbare screeningsmethode voor het aantonen van prognostisch gunstige NPM1 genmutaties bij diagnose van AML.

### Categorie 1 Analytisch

#### Overigen

## 46. Invloed werkplek op ammoniak meting m.b.v. Pocket Chem BA meter

J. DINKELAAR, I.A. HAAGEN, E.H. SLAATS  
*HKCL, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam*

*Inleiding:* Ammoniakwaarde in bloed kunnen snel gemeten worden doormiddel van POCT apparatuur. Volbloed wordt op een strip in contact gebracht met een boraatbuffer, er vormt zich ammoniakgas wat in contact komt met een pH-indicator. Na een bepaalde incubatietijd wordt de verkleuring gemeten. De wekelijkse QC van deze meting valt sinds begin november vaak buiten de 2 SD grens, tevens is de VC groter dan de maximum grens van 15%. Het doel van deze studie is de invloed van luchtcirculatie op de ammoniakmeting in kaart te brengen.

*Methode:* Reagent strips en Pocket Chem BA meter van Arkray (A.Menarini diagnostics), QC's (Eurotrol) met 48 (38-57) en 225 (190-259) umol/l. Voor een vergelijk van verschil in luchtcirculatie is gekozen voor incubatie van de strips: 1) aan

de lucht zoals beschreven in de bijsluiter. 2) onder een plastic bakje om zo de luchtcirculatie te beperken.

*Resultaat:* Met een gemiddelde van 33 micromol/l ligt de gemeten concentratie bij incubatie aan de lucht lager dan de afgesloten meting, 38 umol/l. Tevens is de variatiecoëfficiënt van de open meting groter met 7,4% dan gesloten met 4,5%. 33 umol/l ligt buiten de range gesteld voor het QC materiaal. Bij de metingen met de hoge QC werd dezelfde trend waargenomen.

*Conclusie:* De gemeten waarden zijn zowel in het lage als hoge gebied preciezer en juister op het moment dat de meting wordt uitgevoerd in een gesloten compartiment. Het meten van de ammoniakconcentratie in volbloed met incubatie op strips in een afgesloten ruimte verdient de voorkeur.

## 47. Drie bepalingsmethodes voor kreatinine op de Beckman Synchron DX860i voor en na dialyse

M.B. KOK, D. VERDUIN, F.P.W. TEGELAERS  
*Laboratorium KCHI, Medisch Centrum Alkmaar, Alkmaar*

*Inleiding:* In deze studie zijn drie bepalingsmethodes voor kreatinine op de Beckman Synchron DX860i met elkaar vergeleken en is het effect van hemodialyse op de metingen in kaart gebracht. Hiervoor is plasma afgenomen bij 58 patiënten met chronisch nierfalen, zowel voor als na hemodialyse.

*Methode:* Drie verschillende methodes zijn vergeleken: CREm, CR-S en CR-E. Twee van de drie methoden (CREm, CR-S) zijn gebaseerd op de Jaffe-reactie waarbij kreatinine met picrinezuur een gekleurde complex vormt (kinetische meting). De derde methode (CR-E) betreft een eindpuntbepaling van een enzymatische omzetting van kreatinine.

*Resultaat:* De waarden van de Jaffe gebaseerde methodes zijn zowel voor als na dialyse significant hoger dan die met de enzymatische bepaling. Voor dialyse zijn de waarden voor respectievelijk CREm en CR-S,  $5,3 \pm 2,6$  % ( $p < 0,005$ ) en  $3,8 \pm 2,6$  % ( $p < 0,005$ ) hoger dan de waarden bepaald met CR-E. Na dialyse zijn de waarden voor CREm en CR-S respectievelijk  $9,3 \pm 3,2$

% ( $p < 0,005$ ) en  $7,3 \pm 2,8$  % ( $p < 0,005$ ) hoger dan de waarden bepaald met CR-E. De verschillen tussen de bepalingen zijn na dialyse significant groter dan die van voor dialyse. Het absolute verschil met CR-E na dialyse (CREm:  $30 \pm 10$   $\mu\text{mol/l}$  en CR-S:  $29 \pm 10$   $\mu\text{mol/l}$ ) was in vergelijking met een groep niet gedialyseerde patiënten (CREm:  $20 \pm 10$   $\mu\text{mol/l}$  en CR-S:  $14 \pm 12$   $\mu\text{mol/l}$ ) in een vergelijkbare range (100-450  $\mu\text{mol/l}$ ) significant hoger ( $p < 0,005$ ).

*Conclusie:* Bij de Jaffe gebaseerde methodes, kunnen Jaffe actieve stoffen aanwezig in patiëntenmateriaal leiden tot een verhoging van de gemeten kreatinine waarde. Het grotere verschil na dialyse tussen de methodes CREm en CR-S in vergelijking met CR-E zou kunnen worden verklaard doordat Jaffe actieve stoffen minder effectief worden verwijderd uit de bloedbaan met behulp van hemodialyse en hierdoor ophopen in het bloed.



#### 48. Detectie en kwantificering van M-proteïnes: vergelijk van verschillende elektroforetische procedures

A.J. BAKKER, C. ELDERMAN- van der WERF, T. van ABBEMA, J.H. van der BIJ, J. HOEKSTRA, L. KUPPENS  
*St. Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden*

**Inleiding:** Detectie en kwantificering van M-proteïnes wordt soms bemoeilijkt doordat de monoklonale band in het eiwit-spectrum niet te scheiden is van één van de reguliere banden in het eiwitspectrum. In deze studie is bekeken in hoeverre met verschillende elektroforeseprocedures het aantal niet te scheiden monoklonale banden is te beïnvloeden.

**Methode:** Van 466 patiënten met een bekend of nieuw ontdekt M-proteïne werd agarosegelelektroforese met de Hydragel proteïne (S5), de Hydragel  $\beta$ 1- $\beta$ 2 (S6) en de Hydragel HR (SHR) kits op de Hydrasys 2 (Sebia) uitgevoerd. Als routinemethode werd de eiwitelektroforese met de SPIFE 2000 met de split  $\beta$  procedure van Helena (H6) uitgevoerd.

**Resultaat:** De patiëntengroep was samengesteld uit 441 patiënten met een M-proteïne (99 niet eerder bekend), 11 waarbij het M-proteïne niet meer aantoonbaar was, 10 met oligoklonale

banden en 4 met geen afwijkingen. Geen afwijkingen werden gevonden bij 25/90/82/129 (resp. H6/S5/S6/SHR); een M-proteïne werd gevonden bij 367/335/303/295, waarvan kwantificeerbaar ( $\approx 1.0$  g/l) 220/191/156/186; het M-proteïne was niet te scheiden van één van de reguliere eiwitbanden bij 62/41/81/42. De correlaties van de meetbare M-proteïnes waren: S5=0,92xH6-0,64, bias=-1,30, r=0,974; S6=0,85xH6-0,41, bias=-1,70, r=0,963; SHR=0,71xH6-0,29, bias=-3,12, r=0,953.

**Conclusie:** Detectie van M-proteïnes in de eiwitelektroforese lukt het best met de Hydragel  $\beta$ 1- $\beta$ 2, terwijl de kwantificering van M-proteïnes het best lukt met de Hydragel proteïne en de Hydragel HR. De M-proteïne concentraties gemeten van de Hydragel HR zijn echter ca. 20% lager dan met de beide andere gelen.

#### 49. De betekenis van positieve resultaten van voedselmengseltests in de dagelijkse routine

I.A. HAAGEN

*HKCL, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam*

**Inleiding:** Voor de diagnostiek van een voedselallergie maakt het HKCL OLVG gebruik van een voedselmengseltest. De betreffende voedselmengseltest fx5 (ImmunoCAP, Phadia) bestaat uit de volgende voedselallergenen: Kippenei-eiwit (f1), Koemelk (f2), Vis (kabeljauw, f3), Tarwe (f4), Pinda (f13), Soja (f14).

**Methode:** In 2009 heeft het laboratorium 4477 fx5 tests uitgevoerd waarvan 14 % positief. Daarvan werd 89,2% bevestigd met een positief follow-up panel (bestaande uit de uitgesplitste afzonderlijke testen, zoals hierboven aangegeven). De overige positieve fx5 tests (10,8%) hadden een negatief follow-up panel (fx5PN). Dit fenomeen kan als volgt verklaard worden: de som van de responswaarden van elk voedselallergeen in het mengsel, kan de absolute waarde van de mengseltest net boven de cut-off waarde (0,35 kU/l op de ijklijn) brengen. Het aantal fx5PN tests binnen het totaal aantal positieve fx5 tests is ge-

limiteerd. Phadia stelt deze grens op < 12%. Van deze fx5PN testresultaten werden de ruwe unit (RU) waarden van fx5, de 6 voedselallergenen en de cut-off waarde verzameld. We onderzochten of met onderstaand rekenmodel het betreffende fenomeen verklaard kon worden: (f1 - f2 - f3 - f4 - f13 - f14) > cut-off waarde. (alle in RU)

**Resultaat:** Op basis van deze analyse werden inderdaad 62 fx5PN tests (95%) verklaard. Bij de overige 3 fx5PN tests was de som van de 6 allergenen < cut-off waarde. Deze monsters zouden in principe herhaald moeten worden ter bevestiging van het resultaat.

**Conclusie:** Bij een zeer kleine fractie van de patiëntmonsters kan een positieve voedsel mengseltest, fx5, niet verklaard worden uit een som van zwakke reacties (0,5%). Bij een gelijkblijvende waarde na een herhaalde bepaling kunnen verschillende acties ondernomen worden in overleg met Phadia.

#### 50. Validatie SediMax sediment analyse systeem (Menarini) binnen de huisartsenpraktijk

A.M.J. KOOIJMAN-BUITING<sup>1</sup>, T. van DIJK<sup>1</sup>, H. HATZMANN<sup>1</sup>, S. van DELFT<sup>1</sup>, D. van LOON<sup>2</sup>, M. de GRAAF<sup>1</sup>  
*Saltro<sup>1</sup>, Utrecht; Klinische Chemie<sup>2</sup>, Sint Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein*

**Inleiding:** Binnen de nieuwe Landelijke transmurale afspraken chronische nierschade, opgesteld door NHG, NIV en nfn, zijn afspraken gemaakt omtrent diagnostiek door de huisarts. Ver-eist is ondermeer onderzoek naar celcilinders en/of dysmorf-e erythrocyten. Het Saltro heeft gekozen voor de SediMax omdat deze analyser het sediment geautomatiseerd uitvoert. De benoemde beelden kunnen na analyse handmatig gecorrigeerd worden. Uitslagen inclusief beeldmateriaal met eventuele correcties worden gearchiveerd. De validatie van de SediMax is een samenwerking tussen het Sint Antonius Ziekenhuis en Saltro.

**Methode:** 141 (exclusief nefrologiepatiënten) plus 11 urinemonsters (nefrologiepatiënten) zijn verzameld binnen het ziekenhuis. De urinemonsters zijn in tweeën gesplitst en het urinemonster bestemd voor de SediMax (Menarini) werd gestabiliseerd met Stabilur. De resultaten, behaald met de SediMax, werden vergeleken met de manuele microscopische beoordeling. De urinemonsters werden 3 opeenvolgende dagen

getest. Vervolgens werd op de SediMax een binnendag variatie uitgevoerd.

**Resultaat:** De binnendag variatie gaf de volgende resultaten: Erythrocyten hoog: gemiddelde 300 (sd 22, vc 7,4); Erythrocyten laag: gemiddelde 2,35 (sd 1,1; vc 46,6); Leucocyten hoog: 422 (sd 74; vc 17,6); Leucocyten laag: gemiddelde 14,8 (sd 2,4; vc 16,5). Bij de vergelijking tussen de manuele methode en de SediMax zien we dat de resultaten goed overeenkomen. Bij de uitslagen van niet-nefrologie patiënten werd 1 discrepantie gezien. Bij de beoordeling van de celcilinders/dysmorf-e erythrocyten bij nefrologiepatiënten laten 3 van de 11 verschillend oordeel zien. Bij een second opinion werden 2 van deze 3 herzien.

**Conclusie:** De SediMax voldoet aan de eisen van Saltro vanwege de vergelijkbare resultaten met het naburige ziekenhuis. De standaardisatie van het gehele proces (voorbewerking en interpretatie analisten) en de mogelijkheid van second opinion is een bijkomend voordeel.

## 51. Validation of two point-of-care testing devices for fetal lactate assessment during labour

J. KLEIN GUNNEWIEK<sup>1</sup>, A. HEINIS<sup>2</sup>, J. DINNISSSEN<sup>1</sup>, M. SPAANDERMAN<sup>1</sup>, F. LOTGERING<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Department of Obstetrics and Gynecology<sup>2</sup>, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands.*

**Introduction:** Determination of pH or base deficit (BD) in fetal scalp blood (FBS) during labour reflects fetal metabolism. However, full blood gas analysis in FBS is cumbersome and a relative large amount of blood is needed. Measurement of lactate, the major end product of anaerobic metabolism, using a Point-of-Care Testing (POCT) device is an alternative approach. Aim of this study is to evaluate the performance of two POCT lactate meters.

**Methods:** Analytical performance of StatStrip Lactate (Nova Biomedical) and Lactate Pro (Arkray) was evaluated using commercial control materials (Rapid QC; Siemens Healthcare Diagnostics). Fetal scalp (n=37) and neonatal cord artery blood (n=121) was used for comparison of the two POCT lactate meters with our lactate reference method (RapidLab 865; Siemens Healthcare Diagnostics).

**Results:** Using control material mean values and coefficients

of variation (CVs) were 0.9, 7.5, 14.1 mmol/L and 5.1%, 5.0%, 2.6%, respectively, for StatStrip Lactate and 1.7, 4.1, 6.4 mmol/L and 10.7%, 5.2%, 5.7%, respectively, for Lactate Pro. Consecutive measurement of lactate in FBS and cord blood revealed different Deming regression lines. In FBS: StatStrip Lactate = 1.13\*RapidLab - 0.40 (R = 0.951), and Lactate Pro = 0.96\*RapidLab - 0.08 (R = 0.909). In cord artery blood: StatStrip Lactate = 1.08\*RapidLab - 0.03 (R = 0.894), and Lactate Pro = 0.73\*RapidLab + 0.59 (R = 0.874). Lactate in fetal scalp blood measured by RapidLab, StatStrip Lactate and Lactate Pro showed significant correlation with BD (p < 0.01) and pH (p < 0.05) using Spearman's rho.

**Conclusion:** In our hands, StatStrip Lactate has the smallest CVs when using control material and results in fetal scalp and cord artery blood show closest correlation to our reference method.

## 52. Ontwikkeling en validatie van nieuwe methode voor verzamelen van portie urine

J. HESSELS<sup>1</sup>, A.C.M. DASSEL<sup>2</sup>, M.H.J. GROB<sup>3</sup>, M. DOGGER<sup>4</sup>

*Klinisch chemisch laboratorium<sup>1</sup>, afdeling kindergeneeskunde<sup>2</sup>, Deventer Ziekenhuis, Deventer; HesselsGrob bv<sup>3</sup>, Deventer; Huisartsenpraktijk<sup>4</sup>, Medisch Centrum, Heetten*

**Inleiding:** Het gebruik van een plaszakje bij neonaten voor het verzamelen van een portie urine levert in de praktijk regelmatig problemen op: ongemak bij het kind, slecht plakkende plaszakjes en lekkage. Het verzamelen van urine bij volwassenen heeft eveneens nadelen: vrouwonvriendelijk, lekkage van beker, veel plastic afval. We hebben gezocht naar een eenvoudige alternatieve methode voor het opvangen, conserveren en verzenden van urine.

**Methode:** Een oplossing is gevonden door urine te verzamelen in viltachtig absorptiemateriaal geklemd in een plastic houder in een urineverzamelbuis met schroef dop. Bij neonaten (n = 10) is het losse absorptievilt in de luier gelegd en na plassen in de houder geklemd en in de buis geplaatst. Volwassenen (n = 30) houden de houder met absorptievilt even in de urinestraal en plaatsen het daarna in de buis. Op het laboratorium is de buis gecentrifugeerd (5 min, 1000G) en de plastic houder verwij-

derd. De buis met ca. 1 ml urine is op de Cobas 6000 geplaatst voor het meten van: amylase, ureum, kreatinine, calcium, magnesium, natrium, kalium, uraat, fosfaat, chloride, totaal eiwit, microalbumine en een striptest (Urisys 1800, Roche). De resultaten zijn vergeleken met de conventionele methode voor urineverzameling bij neonaten (plaszakje) en volwassenen (urinebeker).

**Resultaat:** Het absorptiemateriaal is een kunststof non woven apolair vilt dat na bewerking goed urine absorbeert, maar geen adsorptie heeft van te meten componenten in urine: alleen in het lage gebied (< 1,5 mmol/l) is calcium statistisch significant hoger (gemiddeld 0,2 mmol/l) bij urine opgevangen in absorptievilt.

**Conclusie:** Het opvangen van urine in absorptievilt heeft geen nadelig effect op te meten analytes. Het is goedkoop, patiëntvriendelijk, per post te versturen, en levert minder afval op.

## 53. Macro-aspartate aminotransferase (ASAT), a rare cause of hypertransaminasemia

F.J. LOUPATTY<sup>1</sup>, R.R.L. WENER<sup>2</sup>, W.E.M. SCHOUTEN<sup>2</sup>, E.H. SLAATS<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Department of Internal Medicine<sup>2</sup>, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam, The Netherlands*

**Introduction:** A 34-year old woman with amenorrhea of 34 weeks was presented to the gynaecologist with pain in the right upper abdomen. The gynaecologist observed a normal pregnancy without any cause for the abdominal pain. However, laboratory examination demonstrated a sole elevation of ASAT activity (397 IU/L, reference values ASAT < 30 IU/L). Subsequent extensive biochemical and imaging studies revealed no abnormalities. The presence of macro-ASAT was suggested and subsequently confirmed by means of a polyethylene glycol precipitation assay.

**Methods:** 100 µL plasma was added to either 100 µL of PEG 6000 solution (250 g/L in 9 g/L saline) or 100 µL saline (9 g/L) and held at roomtemperature for 1 min prior to centrifugation at 15000g for 10 minutes [1]. ASAT-activities were measured using the standard IFCC ASAT-assay (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) on both the supernatant and the saline dilution. The PEG-precipitable activity (%PPA) for ASAT was

calculated as: %PPA = 100 x [(ASAT-activity – ASAT-activity-PEG) / (ASAT-activity)]

**Results:** Our patient demonstrated that 98% of ASAT-activity was precipitated with polyethylene glycol, whereas two controls showed 24 and 37 %PPA (reference values 18-53 %PPA [1]), confirming the presence of macro-ASAT.

**Conclusion:** Our case illustrates the need to consider a macroenzyme as a cause of persistent elevated ASAT to avoid unnecessary and costly investigations in these patients. The use of polyethylene glycol (PEG) is a simple and effective test for the detection of macroenzymes species as exemplified by our case. Since the presence of macro-ASAT is not a transient phenomenon, it is imperative to record this information prominently in the patients notes in order to help avoid diagnostic confusion in the future

*Literature:* Davidson et al. Ann Clin Biochem. 2003,40:514-20

#### 54. De invloed van pre-analytische centrifugatietijd op de samenstelling van serum en plasma; een studie op de COBAS C6000

M.M.J.F. KOENDERS<sup>1</sup>, M. van HURNE<sup>1</sup>, M. GLASMACHER-van ZIJL<sup>1</sup>, G. van der LINDE<sup>2</sup>, L.W.J.J.M. WESTERHUIS<sup>1</sup>

*Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium en Trombosedienst<sup>1</sup>, St. Elisabeth Ziekenhuis Tilburg; Proffesional Diagnostics<sup>2</sup>, Roche Diagnostics Nederland BV, Almere*

*Inleiding:* De COBAS C6000 betreft een routine chemie- en immunochemie analyzer. Binnen het KCHL is een Modular Pre-Analytics (MPA)-module voor de COBAS C6000 geplaatst; een geautomatiseerde module die centrifugeert, ontdopt, aliquoteert en archiveert. Voor een optimale doorlooptijd door de MPA adviseert de fabrikant een centrifugestap van 5 minuten bij 1885 x g. Dit is echter in tegenspraak met het voorschrift voor de vacuümbuizen die 10 minuten bij 1885 x g gecentrifugeerd dienen te worden voor een optimale scheiding. Onderstaande studie is uitgevoerd om na te gaan of de lengte van de centrifugestap van invloed is op de samenstelling van het serum en plasma.

*Methode:* Van 100 klinische patiënten zijn 2 stolbuizen of 2 heparinebuizen afgenomen. Per patiënt is één van de heparine/stolbuizen handmatig gecentrifugeerd volgens voorschrift (10 min 1885 x g). De andere buis is gecentrifugeerd zoals inge-

steld op de MPA (5 min 1885 x g). Beide buizen zijn vervolgens gealiquoteerd en gedistribueerd door de MPA-module waarnaar een aantal chemie- en immunochemieparameters zijn gemeten op de COBAS C6000. De data zijn verwerkt met behulp van EPevaluator.

*Resultaat:* Er zijn geen significante verschillen geconstateerd tussen een 5 of 10 minuten durende pre-analytische centrifugatiestap voor de chemie- en immunochemieparameters. De percentuele verschillen tussen de twee centrifugetijden overschreed de analytische variatiecoëfficiënt niet.

*Conclusie:* Uit de data kan geconcludeerd worden dat de samenstelling van serum/plasma, gemeten op basis van chemie- en immunochemieparameters, niet significant is veranderd door stol- of heparinebuizen korter te centrifugeren dan wordt geadviseerd door de leverancier van de vacuümbuizen.

#### 55. Clinical evaluation of a point of care testing device for creatinine measurements in finger prick blood for the follow-up of kidney transplant patients

L.S.M. BOESTEN<sup>1</sup>, J. van PELT<sup>1</sup>, C. BEIJER<sup>3</sup>, T.J. RABELINK<sup>2</sup>, P.J.M. VAN DER BOOG<sup>2</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Department of Nephrology<sup>2</sup>, Leiden University Medical Center; Department of Clinical Chemistry<sup>3</sup>, Diaconessenhuis, Leiden, The Netherlands*

*Introduction:* Kidney-transplant patients frequently visit the hospital in the post surgery period for regular health control visits. During this period the serum creatinine concentration is an important parameter to assess the presence of rejection. Recently, a point of care testing (POCT) device (StatSensor Creatinine) for the measurement of creatinine in finger prick blood has been introduced, which gives the opportunity to monitor kidney-transplant patients at home.

*Methods:* To determine its applicability in the home care setting the POCT-system was evaluated for its analytical performance, followed by performance testing in an outpatient clinic and in a clinical setting. Results obtained from the POCT-device were compared to the routine laboratory creatinine method.

*Results:* Coefficients of variation were 5.9%, 4.5% and 3.9% at creatinine concentrations of 84, 347 and 566  $\mu\text{mol/L}$ , respec-

tively. Interference studies showed no effects of various common endogenous compounds except for ascorbic acid and creatine. In the outpatient clinic and clinical situation discrepancies were found between methods on individual level. However, longer term follow-up studies in these patients showed relatively comparable trends in detection of changes in creatinine concentration.

*Conclusion:* Correlation between the StatSensor Creatinine POCT-device and the local routine laboratory method are currently suboptimal. The possibility to introduce a calculated offset in the StatSensor Creatinine POCT-device in combination with its ability to detect creatinine concentration changes in longer term follow-up studies, as shown in this study, is promising for further analysis of the device in post-kidney transplant patients to analyze creatinine concentrations at home in the future.

#### 56. Standard correction of potassium concentrations for hemolysis is not valid for capillary blood samples

M. OOSTENDORP, H. KEMPERMAN

*Laboratory of Clinical Chemistry and Hematology, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands*

*Introduction:* Spuriously elevated potassium concentrations due to in vitro hemolysis can lead to misinterpretation of potassium results. Several options to correct results based on hemolytic indices were described previously. Remarkably, we observed that capillary samples appear to show higher potassium elevations than expected based on hemolytic indices. Therefore, the relationship between potassium and hemolytic index was investigated for capillary samples. Elevation of lactate dehydrogenase (LDH) activity due to hemolysis was included to study possible differences between venous and capillary samples for large molecules.

*Methods:* For potassium, 332,760 venous and 2,607 capillary samples were selected. For LDH, 135,974 venous and 999 capillary samples were included. Venous and capillary samples were differentiated using patient age, as we perform mostly capillary blood sampling in children and venous sampling in adults. All results were obtained using Beckman-Coulter Dx800 chemistry analyzers.

*Results:* The increase in potassium concentration with increasing hemolytic index was considerably higher for capillary samples compared with venous samples. Linear regression revealed a potassium increase of 0.37 mmol/L per increment in hemolytic index for capillary samples, which is more than twice as high as the 0.17 mmol/L increase found for venous samples. For LDH, no differences were found between venous and capillary samples.

*Conclusion:* At the same hemolytic index, capillary samples showed a higher potassium elevation than venous samples. This effect was not seen for LDH. Most likely, capillary blood sampling renders erythrocytes more fragile, resulting in leakage of small molecules like potassium, whereas large molecules such as hemoglobin and LDH remain intracellular. Consequently, literature based correction factors for potassium are not valid for capillary samples and can lead to misdiagnosis of hypokalemia and hyperkalemia.

## 57. Diagnostiek bij auto-immuun leverziekten, klinische validatie

K. FARHAN, M. van der STEEN, M. van ZUYLEN, A. LEYTE, I.A. HAAGEN

*Hematologisch Klinisch Chemisch Laboratorium, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam*

**Inleiding:** Auto-immuun leverziekten (AIH) komen weinig voor, met een specifieke klinische presentatie. Bij drie van de vier AIH (AIH, PBC, PSC) spelen auto-antistoffen een rol. Naast de kliniek is laboratoriumonderzoek belangrijk voor het stellen van de diagnose, het vervolgen van de ziekte en de response op therapie. Antistoffen kunnen op verschillende manieren bepaald worden. Deze studie beschrijft de klinische validatie van een ELISA (F-actine), een line-blot en een dot blot voor de detectie van leverspecifieke antistoffen.

**Methode:** Patiënt(-sera) zijn geselecteerd op basis van laboratoriumaanvragen voor de diagnostiek naar AIH. Gebruikte laboratoriumtesten: 1. line blot, EUROIMMUN, Biognost, België, bevattende de allergenen AMA-M2, 3E(BPO), Sp100, PML, gp210, LKM1, LC1 en SLA/LP; 2. QUANTA Titetm Actin IgG ELISA, INOVA, Werfen Group, San Diego, USA; 3. Dot blot Hep 7plus Dot, Mediphos, Germany, bevattende de allergenen M2, gp210, sp100, LKM1, LC1 en SLA/F-actine.

**Resultaat:** F-actine antistoffen zijn bepaald met de ELISA (INOVA) en de dot blot (Mediphos). Het is bekend dat F-actine antistoffen bij veel verschillende ziektebeelden voor komen maar de titer bij AIH is hoger dan bij de andere ziektebeelden. Op basis van de diagnose is de cut off waarde naar een ratio van 60 aangepast. De concordantie met de kliniek is nu >90%. Voor de antistoffen tegen SLA, M2, PML en Sp100 werd een concordantie met de kliniek van >70% voor de Line blot gevonden. Concordantie met huidige methode was 91%.

**Conclusie:** (Auto-)antistoffen zijn heteroog. Analyseresultaten zijn dan ook afhankelijk van de gebruikte testmethode. De onderzochte auto-antistoffen tegen F-actine (SMA) en tegen M2, PML, Sp100 en SLA, kunnen betrouwbaar bepaald worden met de ELISA en Line blot. Deze methodes zijn snel, objectief en (semi-)kwantitatief ten opzichte van de (weefsel-)immunofluorescentiemicroscopie.

## 58. Houdbaarheid van fecaal hemoglobine: beïnvloed het seizoen de uitslag?

B. SMIT, S.M. SMITS, M. van der STEEN, A. LEYTE, I.A. HAAGEN

*Hematologisch Klinisch Chemisch Laboratorium, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam*

**Inleiding:** De Actim Fecal Blood Test (AFB-Test) is een 1-stap teststrip voor het aantonen van humaan hemoglobine in feces, gebaseerd op een immunochemische methode (iFOBT). De test is vergeleken met twee in gebruik zijnde bepalingen, de peroxidase assay (A.B.T.S.) en de Guajak methode. Naar aanleiding van publicaties ("Seizoen beïnvloed darmkankerscreening") is bij de validatie aandacht besteed aan de houdbaarheid.

**Methode:** Van de AFB-Test, Lucron Bioproducts, Gennep, is naast een methode vergelijk, de detectielimiet, de specificiteit voor humaan Hb en de houdbaarheid onderzocht. De detectielimiet is vastgesteld door fecesporties te mengen met EDTA bloed (concentratie 25, 50, 200 µgHb/g feces). De specificiteit is vastgesteld door feces te mengen met bloed verkregen uit kogelbiefstuk, kippen- en schapenlever. De houdbaarheid is onderzocht door porties feces te maken met verschillende concentraties Hb. Deze porties zijn bewaard bij kamertempera-

tuur, 4 °C en bij -20 °C. Gedurende 7 achtereenvolgende dagen is in triplo met behulp van de A.B.T.S. en de AFB-Test het Hb gemeten.

**Resultaat:** De detectie grens van de AFB-Test bedraagt 25 µgHb/g feces. Bloed uit kippen-, schapen- en rundvles werd niet aangetoond met de AFB-Test, daarentegen wel met de A.B.T.S.-methode waarmee de specificiteit van de AFB-Test is bevestigd. Bij een concentratie van 25 µgHb/g feces is de houdbaarheid van het Hb, indien bewaard bij kamertemperatuur maar 3 dagen. Bewaren in de koelkast of vriezer was respectievelijk mogelijk tot dag 5 of 6.

**Conclusie:** De AFB-Test is betrouwbaar en gebruiksvriendelijk. Omdat de meeste laboratoria in Nederland bij navraag niet het potje met buffer aan de patiënt meegeven is het zeer belangrijk de patiënt goed over de bewaarcondities en het inleveren van een vers feces monster te instrueren.

## 59. Tachypacing and ischemia induce the release of different forms of cardiac troponin

L.H.J. JACOBS<sup>1</sup>, A.S. STRENG<sup>1</sup>, R.W. SCHWENK<sup>2</sup>, W.K.W.H. WODZIG<sup>1</sup>, J.F.C. GLATZ<sup>2</sup>, M.P. van DIEIJEN-VIS-SER<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Cardiovascular Research Institute Maastricht (CARIM)<sup>2</sup>, Department of Molecular Genetics, Maastricht University Medical Center, The Netherlands*

**Introduction:** The cardiac troponins (cTn) are important biochemical markers for the detection of cardiac damage, but elevated levels have also been found in situations where irreversible cardiomyocyte damage is unlikely to play an important role (e.g. after endurance exercise). We hypothesized that cTn release can occur in the absence of cell-death and that this release will mainly be in the form of intact cTn. Additionally, we speculate that the release patterns of various molecular forms of cTn can differ in response to varying biological and chemical stimuli.

**Methods:** Cultured HL-1 cardiomyocytes were subjected to ischemia or mechanical stretch. Ischemia was modelled by metabolically inhibiting the cells with sodium azide (NaN<sub>3</sub>). Strenuous exercise is modelled by rapid electrical stimulation (tachypacing) at 3 Hz. After treatment, the culture medium and the cell lysates are collected and cTn and total protein concentrations are measured. Different molecular forms cTn are visualized using Western blotting.

**Results:** Both NaN<sub>3</sub> treatment and tachypacing induced a significant decrease in the cTn content of the cell lysates and an increase in the culture medium. The cTnT decrease after NaN<sub>3</sub> treatment was equaled by the loss of total protein content (suggesting cell death), whereas the cTnT content after tachypacing exceeded that of the total protein content. Western blots of the tachypaced cells only showed intact cTnT (37 kDa) and cTnI (27 kDa), whereas NaN<sub>3</sub> treatment resulted in additional 28 kDa and 17 kDa degradation products for cTnT and cTnI respectively.

**Conclusion:** Ischemic damage induces the formation and release of cleaved forms of cTn whereas cTn remains intact upon Tachypacing (at 3 Hz). These findings suggest that different molecular forms of cTn are generated after different forms of cardiac damage.

## 60. Vergelijking van centrifugatie methode en telkamer methode zonder centrifugatie voor beoordeling van semenmonsters na vasectomie

A.O. de GRAAF, V. de GRAEF, C.H.H. SCHOENMAKERS, J.L.P. van DUIJNHOFEN  
*Algemeen Klinisch Laboratorium, Elkerliek Ziekenhuis, Helmond*

*Inleiding:* De richtlijn 'Controle na vasectomie, laboratorium protocol versie 1.0' (ingangsdatum 1 augustus 2010) is op een aantal punten vernieuwd. Centrifugeren van semen wordt afgeraden. Er wordt geadviseerd de semenconcentratie te bepalen m.b.v. een telkamer met als doel een concentratie van < 100.000 spermatozoën/ml te kunnen rapporteren met 99 % zekerheid. De urologen in ons ziekenhuis hebben aangegeven dat ze geen behoefte hebben aan de door de richtlijn aanbevolen kwantitatieve methode en willen de huidige kwalitatieve methode voor controle na vasectomie, waarbij het semen gesedimenteerd wordt, handhaven.

*Methode:* 50 semenmonsters die in het Elkerliek ziekenhuis zijn aangeboden voor controle na vasectomie zijn beoordeeld volgens onze huidige kwalitatieve methode (het beoordelen van aanwezige zaadcellen in 25 µl sediment verkregen door centrifugatie van het semen) en de door de richtlijn aanbevolen kwantitatieve methode zonder centrifugatie (het tellen van de zaadcellen in minimaal 1 µl semen m.b.v. een telkamer).

*Resultaat:* Van de 50 semenmonsters waren er in 5 monsters enkele dode zaadcellen te zien met de sedimentatie methode, die niet gezien werden met de telkamer methode. In 2 monsters waren dode zaadcellen te zien met de sedimentatie methode, maar was het monster te visceus om in de telkamer te worden opgezogen. Er was geen sprake van aanwezigheid van veel debris in de semenmonsters na centrifugatie die de beoordeling zou kunnen bemoeilijken.

*Conclusie:* Uit onze methode vergelijkingen blijkt dat er met de telkamer methode (dode) zaadcellen gemist worden die wel gezien worden in de huidige sedimentatie methode. Op basis hiervan is er besloten om de huidige kwalitatieve methode voor beoordeling van semenmonsters na vasectomie m.b.v. centrifugatie te handhaven.

*Literatuur:* Laboratorium Praktijkrichtlijn 'Controle na vasectomie', versie 1.0, ingangsdatum 1 augustus 2010.

## 61. Lithium-heparine buizen zijn geschikter voor lactaatbepalingen dan NaF buizen: NaF buizen geven vals verlaagde lactaatwaarden

M. M.G.J. van BORREN, M.A.H. de BRESSER, P. van 't SANT  
*Laboratorium Klinische Chemie en Hematologie Jeroen Bosch Ziekenhuis, 's-Hertogenbosch*

*Inleiding:* Lactaatbepalingen worden vaak uit een aparte natriumfluoride buis afgenomen. Soms is een extra buis niet wenselijk, met name bij neonaten. Daarom onderzoeken wij de mogelijkheid om lactaatbepalingen uit te voeren uit een veelvuldig afgenomen lithium-heparine buis.

*Methode:* Bij vrijwilligers is veneus bloed afgenomen in 4 ml NaF (NaF buis) én in 3 ml lithium-heparine (Li-Hep buis) buizen (BD Vacutainer). Plasma lactaat is bepaald met een chemieanalyser (Vista, Siemens) en volbloed lactaat en pH met een bloedgasanalyser (Rapidlab 1265, Siemens).

*Resultaat:* In Li-Hep volbloed stijgt lactaat met 0,84 mmol/l/ uur (n=6), terwijl in NaF volbloed deze stijging beperkt blijft tot 0,04 mmol/l/uur (n=6). Zowel centrifugatie als afkoelen (ijswater) reduceert lactaataccumulatie ook in Li-Hep tot 0,04 mmol/l/uur (n=6) en 0,07 mmol/l/uur (n=6) respectievelijk. Echter direct na afname liggen de lactaatwaarden in Li-Hep-buizen 42±3,8% (n=16) hoger ten opzichte van NaF buizen.

De beperkte tijd tussen bloedafname en centrifugatie (<3 min) sluit glycolyse als oorzaak uit. We tonen aan dat Li-Hep en NaF-Na2EDTA zelf niet interfereren met de lactaatbepaling, en dat de hogere osmolaliteit in de NaF buizen (+80 mosm/l) ook geen invloed heeft. Daarentegen, de lagere pH-waarden (0,34±0,01 units; n=10) in NaF buizen kunnen wel het grote verschil in lactaat verklaren. Immers, doordat [Lac-]plasma met [H+]plasma in evenwicht is met [Lac-]cel en [H+]cel, zal een pH daling van ~0,3 (factor 2 in [H+]) theoretisch leiden tot een halvering van [Lac-]plasma, wat goed overeenkomt met de 42% lagere lactaatwaarden in NaF buizen.

*Conclusie:* Mits meteen gecentrifugeerd of gekoeld zijn Li-Hep buizen beter geschikt dan NaF buizen voor de lactaatbepaling. NaF buizen geven namelijk een pH daling waardoor de cellen lactaat gaan opnemen wat vervolgens resulteert in vals verlaagde lactaatwaarden.

### Categorie 2 Bedrijfsvoering

#### Dienstverlening, doorlooptijden, workflowanalyse

## 62. Beïnvloedt 'reflecterend testen' het beoordelen van casuïstiek door huisartsen?

W.P.H.G. VERBOEKET-van de VENNE<sup>1</sup>, W.P. OOSTERHUIS<sup>1</sup>, H. de WAARD<sup>2</sup>, P. van 't SANT<sup>2</sup>, H.A. KLEINVELD<sup>1</sup>  
*Afdeling Klinische Chemie en Hematologie<sup>1</sup>, Atrium Medisch Centrum Parkstad Heerlen; Laboratorium voor Klinische Chemie en Hematologie<sup>2</sup>, Jeroen Bosch Ziekenhuis, Den Bosch*

*Inleiding:* Een nieuw aspect van consultverlening door het klinisch chemisch laboratorium betreft het toevoegen van testen en/of commentaar aan een laboratoriumaanvraag. Bij deze werkwijze interpreteert de laboratoriumspecialist afwijkende uitslagen en beoordeelt of aanvullende testen nodig zijn. Vanaf juni 2006 hanteert het Atrium Medisch Centrum Parkstad in Heerlen deze procedure (ook wel 'reflecterend testen' genoemd) bij laboratoriumaanvragen van huisartsen. Huisartsen die verbonden zijn aan het Jeroen Bosch Ziekenhuis in Den Bosch zijn (nog) niet bekend met deze werkwijze. In dit onderzoek willen we het beoordelen van casuïstiek door huisartsen in de twee regio's met elkaar vergelijken, en nagaan of dit beïnvloed wordt door 'reflecterend testen'.

*Methode:* Een lijst met 13 casussen is opgesteld en naar de huisartsen verstuurd. Bij elke casus werd gevraagd naar de werkhypothese en de vervolgactie(s) die de huisarts zou ondernemen (bijv. aanvullende laboratoriumdiagnostiek (welke?), verwijzing naar specialist, medicatie, andere vervolgactie?). Vervolgens zijn de lijsten beoordeeld op hun overeenkomst met de vermoedelijke diagnose zoals die gesteld werd na het toevoegen van aanvullende testen.

*Resultaat:* Resultaten zijn compleet van 56 huisartsen uit de regio Heerlen en 31 huisartsen uit de regio Den Bosch. Samenvattend kon een adequate werkhypothese gesteld worden door een significant hoger percentage huisartsen in Heerlen (50,8 %) ten opzichte van de huisartsen in Den Bosch (38,2 %) (p<0,001).

Het verschil in beoordeling tussen de regio's was het meest uitgesproken bij de casus over hemochromatose (Heerlen: 69,6% vs. Den Bosch: 35,5%,  $p < 0,001$ ).

*Conclusie:* Huisartsen die bekend zijn met 'reflecterend testen' beoordelen casuïstiek vaker correct in vergelijking tot huis-

artsen waarbij deze consultverlening niet gegeven wordt. Mogelijk zorgt het toevoegen van commentaar tekst aan een aanvraag voor een leereffect bij huisartsen, met name bij minder vaak voorkomende ziektebeelden.

### 63. 'Operatie Stabiel': verbetering van het therapeutisch resultaat van een Trombosedienst

R. K. SCHINDHELM<sup>1</sup>, N. BROUWERS-van den BROEKE<sup>2</sup>, J. GOUDRIAAN-BARENDRECHT<sup>2</sup>, P.C.M. BARTELS<sup>1,2</sup>  
*Laboratorium voor Klinische Chemie, Hematologie & Immunologie<sup>1</sup>, Medisch Centrum Alkmaar, Alkmaar; Stichting Artsenlaboratorium en Trombosedienst Starlet-DC<sup>2</sup>, Alkmaar*

*Inleiding:* Het percentage patiënten met een INR binnen de therapeutische range is door de Federatie Nederlandse Trombosediensten (FNT) gedefinieerd als één van de kwaliteitsindicatoren bij longterm patiënten. De FNT hanteert de volgende criteria: tenminste 70% van de patiënten in de eerste intensiteitsgroep (INR 2,5-3,5) en tenminste 65% in de tweede intensiteitsgroep (INR 3,0-4,0) dienen een INR binnen de therapeutische range (INR: 2,0-3,5 en 2,5-4,0, respectievelijk) te hebben. In 2009 voldeed de trombosedienst van Starlet-DC aan de eerste norm (70,9%), maar haalde de tweede norm net niet (64,8%). Deze lage scores waren aanleiding om een trouble-shooting programma te ontwikkelen en de kritische succesfactoren te benoemen om beide percentages te verhogen. Doel was om een verbetering van >10% per jaar (1% per maand) te realiseren.

*Methode:* De volgende subinterventies werden toegepast: 1) instabiele patiënten overzetten van acenocoumarol naar fenprocoumon; 2) uniformeren van interpretatie en applicatie van

doseringen; 3) proactief benaderen van therapieontrouwe trombosedienstcliënten. De mate van instelling werd na 2 maanden geëvalueerd. Tevens werd het percentage opgevolgde doseeradviezen van PortaVita® door de doseeradviseurs vervolgd.

*Resultaat:* Bij de start van het interventietraject bedroeg het percentage patiënten binnen de therapeutische range voor de eerste intensiteitsgroep 73,7% en voor de tweede 66,3%. Na 2 maanden bedroegen deze percentages 75,1% en 70,0%, respectievelijk ( $P < 0,001$ ). Het percentage opgevolgde doseeradviezen nam niet significant toe ( $P = 0,46$ ). In de eerste 2 maanden zijn 32 patiënten overgezet naar fenprocoumon.

*Conclusie:* Het interventieprogramma "Operatie Stabiel" heeft geleid tot een significante toename van het percentage juist ingestelde patiënten met name in de tweede intensiteitsgroep. Een verbetering in de eerste intensiteitsgroep werd nog niet gerealiseerd. Het effect op langere termijn (>2 maanden) zal verder geëvalueerd worden.

### 64. Terugkoppeling naar aanvragers over aanvraaggedrag m.b.v. het LIS Labosys

H. ULENKATE, C. VERSLUYS

*Klinisch Chemisch Laboratorium, ZorgSaam Ziekenhuis Zeeuws-Vlaanderen, Terneuzen*

*Inleiding:* Huisartsen vragen bij het klinisch chemisch laboratorium allerlei testen aan. Gerichte terugkoppeling over het aanvraaggedrag van bepaalde testen in relatie tot een klinisch probleem vindt niet met regelmaat plaats. Een aantal keren heeft een diagnostisch toets overleg (DTO) plaats gevonden. Echter een handig hulpmiddel om de feedback rapportage naar de afzonderlijke aanvragers mogelijk te maken ontbreekt. Gewerkt is aan het automatiseren van een feedbackrapport.

*Methode:* In Labosys hebben we met de queryserver Labfocus een hulpmiddel gemaakt om aan de aanvrager een terugrapportage te kunnen sturen over zijn aanvraaggedrag in relatie tot dat van zijn collegae. De test waar het om gaat dient opgegeven te worden alsmede een aantal grenswaardes. Daarna kan de rapportage gestart worden.

*Resultaat:* Nadat de rapportage "met 1 druk op de knop" gestart is, verschijnt in 1 run achter elkaar per A4 het feedbackrapport van elke aanvrager. Het rapport kan een grafiek en/of tabel bevatten, waarmee de aanvrager zijn aanvraaggedrag kan vergelijken met dat van zijn collegae. De rapporten kunnen per post of email verstuurd worden.

*Conclusie:* De rapportage wordt ingezet als feedback naar de huisartsen. Huisartsen geven aan voor welke testen zij terugkoppeling wensen. Met het feedbackrapport kunnen de aanvragers tijdens een intercollegiaal-overleg het aanvraaggedrag onderling bespreken en optimaliseren. De rapportage kan gepaard gaan met nuttige informatie over de desbetreffende test en eventueel over een gerelateerde richtlijn of aanbeveling.

### 65. Het gebruik van en wensen voor een elektronisch consultregistratie systeem (E-CRS)

W. KORTLANDT, J.C. FISCHER, C.J.A. DOELMAN, J.J.H. HENS, Y.M.C. HENSKENS, J.J. KEYZER  
*NVVC, Commissie Bedrijfsvoering, Utrecht*

*Inleiding:* De consultfunctie is een belangrijke taak van de klinisch chemicus. Er bestaat evenwel geen gedragen definitie van een consult, en er is geen inzicht in het aantal consulten en de wijze van registratie. Een consult dient primair te worden verstrekt vanuit het belang voor de patiënt. Zeker nu elektronische patiëntendossiers op grote schaal worden ingevoerd is het belangrijk consulten van klinisch chemici beter te structureren en een vaste plaats te geven binnen dit patiëntendossier.

*Methode:* Er werd via de NVVC-website een elektronische enquête uitgezet onder de actieve leden over toepassing en wensen ten aanzien van de vast te leggen informatie

*Resultaat:* Er was een respons van 67 inzenders uit 49 ziekenhuizen (70% van de laboratoria). Het overgrote deel der laboratoria maakt gebruik van GLIMS en LaboSys. De achterliggende ZISsen zijn divers. 7 Instituten maken gebruik van een elektronisch CRS. Vier hiervan gebruiken een geïntegreerd

CRS binnen hun LIS. De andere 3 hanteren een stand-alone CRS. Het consult is inzichtelijk voor directe collegae maar niet voor de behandelend arts. Niet altijd wordt bij een consultvraag het systeem geraadpleegd op eerdere consulten. Van de overige inzenders houdt 47% een vorm van papieren registratie bij. Van alle inzenders zonder E-CRS zou 66% hier wel graag over beschikken. Alle deelnemers vonden registratie van arts en advies noodzakelijk; casusbeschrijving, vervolgcacties, eigen aantekeningen werden als zeer nuttig aangemerkt. Het aantal consulten per week ligt gemiddeld op ca 25. Er is zorg over het tijdsbeslag dat met registratie is gemoeid.

*Conclusie:* Het is nog bepaald niet gangbaar consulten gestructureerd vast te leggen in de status of het elektronisch dossier van de individuele patiënt. Wel bestaat er een breed gedragen wens een E-CRS te willen hanteren.

**Point-of-care testing**

**66. De rol van interfererende stoffen bij POC glucose meters**

N. BROUWER, F. TEGELAERS

*Laboratorium klinische chemie, hematologie en immunologie, Medisch Centrum Alkmaar*

*Inleiding:* Het is bekend dat Point of Care (POC) meters gestoord kunnen worden door diverse componenten die bij de behandeling van de patiënt noodzakelijk zijn. Vier POC glucosemeters van verschillende leveranciers zijn bestudeerd op interfererende stoffen en de correlatie met de labmethode is onderzocht.

*Methode:* Met de Accucheck I (Roche), Accucheck II (Roche), Statstrip (Nova biomedical) en de 201 DM (Hemocue) glucosemeters is in volbloedsamples bij drie concentraties glucose naar de interferentie gekeken van Hematocriet, Vitamine C, Galactose, Maltose en HAES (plasma expander), waarbij 3 concentraties van iedere component in 4-voud is gemeten. Als referentiemethode is de glucosebepaling op de Beckman DXC880i gebruikt. Daarnaast is met 20 samples een correlatie studie uitgevoerd met de vier POC meters in vergelijking tot de Beckman methode (glucose concentratie variërend tussen 1,4 en 22,5 mmol/l).

*Resultaat:* Een oplopende concentratie Hematocriet gaf een onderschatting van de glucose concentratie met de Accucheck I. Vitamine C gaf een overschatting van de glucoseconcentratie met de Accucheck II en in mindere mate ook met de Accucheck I. Galactose zorgde voor een overschatting van de glucose met de Accucheck I en minder uitgesproken ook met de Accucheck II, terwijl Maltose alleen interfereerde met de glucosemeting op de Accucheck I. De Statstrip en Hemocue vertoonden niet of nauwelijks interferentie op de glucosemeting in aanwezigheid van bovenstaande stoffen. HAES gaf een lichte onderschatting van de glucoseconcentratie bij alle meters. De methodecorrelatie was  $r^2 > 0,996$  voor alle 4 meters, met een bias binnen de ISO 15197 limiet.

*Conclusie:* Alle meters scoorden goed bij de correlatie studie met de Beckman DXC880i glucose bepaling. De mate van interferentie op de glucosemeting is mogelijk doorslaggevend voor de keuze van de POC glucosemeter.

**67. Veilige diabetes zorg in de kliniek: rol van POCT van glucose in geprotocolleerde diabeteszorg bij opgenomen patiënten met diabetes mellitus**

S. KOS<sup>1</sup>, R. WULKAN<sup>1</sup>, M. ALKEMADE<sup>2</sup>, K. DEKKER<sup>2</sup>, L.J.D.M. SCHELFHOUT<sup>2</sup>, J. van der LINDEN<sup>2</sup>

*Afdeling Klinische chemie<sup>1</sup>, Afdeling Interne Geneeskunde<sup>2</sup>, Maasstad Ziekenhuis, Rotterdam*

*Inleiding:* Gedurende klinische opname is acute ontregeling van diabetes mellitus een belangrijke complicatie bij de diabetes patiënt. Snelle interventie bij ontregeling is van belang ter preventie van additionele complicaties. Het doel van de studie was vermindering van het aantal complicaties (incidentele ontregelingen): hypo- (glucose < 4,0 mmol/l) en hyperglycemieën (glucose > 15 mmol/l) tijdens opname van patiënten door dagelijks multidisciplinair overleg in combinatie met geprotocolleerde bijregulatie van incidentele ontregeling.

*Methode:* Alle patiënten met diabetes type I of II van chirurgische afdelingen ouder dan 18 jaar, zijn geïncludeerd in deze studie. Direct bij opname werd de internist en diabetes verpleegkundige geconsulteerd, waarna een dagelijks behandelplan werd vastgesteld op basis van een 4-punts glucose dagcurve. Glucosewaarden werden decentraal met HemoCue 201 DM Glucosemeter gemeten volgens een eerder geïntroduceerd ziekenhuisbreed systeem voor point of care testing. Het aantal incidentele ontregelingen in glucose concentratie in de maanden

voor de invoering werd vergeleken met de maanden na de invoering van geprotocolleerde diabeteszorg (t-test). Bij incidentele ontregelingen werd actie ondernomen door het verplegend personeel volgens een van tevoren vastgesteld protocol.

*Resultaat:* In de periode voor de invoering werden 3310 glucose metingen uitgevoerd, waarbij 517 (15,6%) complicaties werden gevonden, 44 hypo- (1,3%) en 473 hyperglycemieën (14,3%). Na de invoering van geprotocolleerde bijregulatie zijn 2087 glucoses gemeten, waarbij 93 (4,5%) complicaties, 31 hypo- (1,4%) en 62 hyperglycemieën (3,3%). Er was een significante daling ( $p < 0,001$ ) van het aantal hyperglycemieën gevonden ten opzichte van de periode vooraf, terwijl het aantal hypoglycemieën onveranderd is gebleven.

*Conclusie:* Door het invoeren van geprotocolleerde bijregulatie is het aantal acute hyperglycemieën fors gedaald, waarbij het aantal hypoglycemieën onveranderd is gebleven. Het decentraal meten draagt bij aan veiligere diabetes zorg voor opgenomen patiënt.

**Kwaliteit, referentiewaarden**

**68. Van fout naar oplossing: “cognitive psychology meets clinical chemistry”**

R.K. SCHINDHELM<sup>1</sup>, H.J. HOSPERS<sup>2</sup>, M. SLINGSCHRÖDER<sup>1</sup>, R.J. SLINGERLAND<sup>1</sup>

*Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>1</sup>, Isala klinieken, Zwolle; University College<sup>2</sup>, Maastricht University, Maastricht*

*Inleiding:* Het minimaliseren van fouten is één van de doelen van het kwaliteitssysteem. Ondanks uitgebreide beschrijvingen van procedures in SOP's zijn menselijke fouten niet altijd te voorkomen. Een model dat op basis van drie cognitieve niveaus menselijk handelen met betrekking tot fouten probeert te verklaren is het SRK-model van Rasmussen. In dit SRK-model worden drie gedragsniveaus onderscheiden: skill-, rule- en knowledge-based gedragsniveaus. Op basis van het SRK-model kunnen passende oplossingsrichtingen voorgesteld worden. Doel van deze studie

was het inventariseren van de klachten en fouten volgens het SRK-model en het analyseren of de gekozen oplossing past binnen de oplossingsrichting die het SRK-model voorstelt.

*Methode:* In deze studie zijn de fouten en klachten uit 2009 geanalyseerd. Het aantal klachten per order werd berekend en de klachten en fouten werd ingedeeld in preanalytische, analytische en postanalytische fouten en klachten. Vervolgens zijn de klachten en fouten ingedeeld volgens het SRK-model en werd bestudeerd of de gekozen oplossingsrichting passend was.

**Resultaat:** In 2009 bedroeg het gemiddelde aantal klachten/fouten per aantal orders 0,06%. Dit zou betekenen dat bij 2318 analyses, geen of foutieve uitslagen gerapporteerd zijn. De onderverdeling van de fouten in preanalytisch, analytisch en postanalytisch was 62%, 5% en 33%, respectievelijk. Binnen de preanalytische fase waren 92% skill-based fouten, 4% rule-based fouten en 4% knowledge-based fouten. Voor de postanalytische fase bedroeg deze indeling 69%, 25% en 6%, respectievelijk.

**Conclusie:** Het aantal klachten/fouten binnen het KCL is relatief laag. Het merendeel van de fouten zijn skill-based fouten, waarbij in meerderheid geen "passende" oplossing zijn voorgesteld. Het SRK-model kan bijdragen aan het begrip waarom fouten kunnen ontstaan en tevens kan het model oplossingsrichtingen aandragen die passend zijn bij het type fout.

## 69. One in five laboratories using various hemoglobin A1c methods do not meet the criteria for optimal diabetes care management

E. LENTERS-WESTRA<sup>1,2</sup>, C. WEYKAMP<sup>3</sup>, R.K. SCHINDHELM<sup>1</sup>, C. SIEBELDER<sup>3</sup>, H. J. BILO<sup>4,5</sup>, R.J. SLINGERLAND<sup>1,2</sup>

*Departments of Clinical Chemistry<sup>1</sup> and Internal Medicine<sup>4</sup>, Isala klinieken, Zwolle; European Reference Laboratory for Glycohemoglobin<sup>2</sup>, Zwolle, European Reference Laboratory for Glycohemoglobin<sup>3</sup>, Winterswijk; Department of Internal Medicine<sup>5</sup>, University Medical Centre, Groningen, The Netherlands*

**Introduction:** We assessed the reference change value (RCV) of currently available hemoglobin A1c (HbA1c) laboratory assays, which is defined as the critical difference between two consecutive HbA1c measurements representing a significant change in health status.

**Methods:** We examined the individual laboratory coefficients of variation (CVs) in the Dutch/Belgian quality scheme based on 24 lyophilized samples and calculated the RCV per laboratory (n = 220) and per assay method. In addition, two pooled whole blood samples were sent to the participating laboratories. The individual laboratory results were compared to the assigned value ± an allowable total error (TEa) of 6%.

**Results:** At HbA1c values of 41.0 mmol/mol (5.9%-Diabetes Control and Complications Trial [DCCT]) and 61.8 mmol/mol (7.8%-DCCT), 99% and 98%, respectively, of the laboratories reported a value within a TEa limit of 6%. The analyti-

cal CV of the HbA1c method used in 78% of the laboratories is <2.4%. The mean RCV at an HbA1c value of 53 mmol/mol (7.0%-DCCT) for methods of Bio-Rad is 5.9 mmol/mol (0.59%-DCCT); for Arkray/Menarini, 4.3 mmol/mol (0.43%-DCCT); for Roche, 6.5 mmol/mol (0.65%-DCCT); for Tosoh, 3.3 mmol/mol (0.33%-DCCT); and for other methods, 6.3 mmol/mol (0.63%-DCCT).

**Conclusion:** The analytical performance of the majority of laboratory HbA1c methods is within the clinical requirements. However, based on the calculated RCV, 21.8% of the laboratories using different HbA1c methods are not able to distinguish an HbA1c result of 59 mmol/mol (7.5%-DCCT) from a previous HbA1c result of 53 mmol/mol (7.0%-DCCT). It can be presumed that differences in HbA1c results of 5 mmol/mol (0.5%-DCCT) do influence treatment decisions.

## 70. Preanalytische kwaliteit van urinediagnostiek bij de huisarts

M.T.M. RAIJMAKERS, W.P. OOSTERHUIS, H.A. KLEINVELD

*Klinisch Chemisch & Hematologisch Laboratorium, Atrium Medisch Centrum Parkstad Heerlen*

**Inleiding:** In de huisartsenpraktijk wordt veelvuldig gebruik gemaakt van POC-testen voor urineonderzoek. Het is echter niet inzichtelijk welke apparatuur en reagentia in de praktijk aanwezig zijn en hoe deze gebruikt worden. Hierdoor is de kwaliteit van de resultaten niet duidelijk. De doelstelling van ons onderzoek is het in kaart brengen van de kwaliteit van de urinediagnostiek aan de hand van een vragenlijst.

**Methode:** Aan 78 huisartspraktijken (116 huisartsen) is een enquête rondgestuurd. In deze enquête is de huisarts bevraagd over (pre)analytische variabelen zoals aanlevering van de urine, uitvoering van de dipstick en vervolgacties bij afwijkende resultaten.

**Resultaat:** Op de enquête reageerde 54% van de huisartspraktijken (43% huisartsen). Van 8 praktijken gaven meerdere huisartsen antwoord. Zowel binnen een praktijk als tussen praktijken wordt zeer verschillend met urinediagnostiek omgegaan.

Opvallende bevindingen in de enquête zijn de acceptatie van urine in een urineverzamelingsflesje van de patiënt (62% van de respondenten), het niet mengen van de urine voor het dopen van de urinestrip (72%), het aflezen op het onjuiste moment van de urinestrips (45%). Daarnaast wordt in bijna alle gevallen de urinestrips met het oog beoordeeld. Gezien de lage sensitiviteit en specificiteit van urinediagnostiek met stripsten zijn de genomen acties op afwijkende waarden opvallend. Het merendeel van de respondenten (82%) geeft aan een diagnostische vervolgactie uit te voeren (i.e. sediment, ander laboratorium-onderzoek of controlebezoek patiënt). Daarnaast geeft de helft aan een behandeling in te zetten of te verwijzen.

**Conclusie:** Uit de enquête is naar voren gekomen dat urinediagnostiek bij huisartsen op een aantal punten kwalitatief verbeterd kan worden. De betrokkenheid van het klinisch chemisch laboratorium kan hierbij een belangrijk initiatief zijn.



## 71. Nieuwe methode voor de validatie van buizenpostsystemen gebruikt voor het versturen van bloedmonsters

L.C. JELLEMA<sup>1</sup>, A. LUIJT<sup>2</sup>, H. PUTS<sup>1</sup>, D. CALCOEN<sup>2</sup>, J.D.E. van SUIJLEN<sup>1</sup>  
KCL<sup>1</sup>, Gelre ziekenhuizen, Apeldoorn; Qcapsule<sup>2</sup>, Delft

*Inleiding:* Een veel gebruikte methode binnen ziekenhuizen om de doorlooptijd van bloed analyses te verkorten is het gebruik van buizenpost systemen. Bloedmonsters kunnen hiermee direct na afname naar het laboratorium worden gestuurd voor analyse. Over de invloed van het gebruik van de buizenpost op de kwaliteit van bloedmonsters is echter weinig bekend. Hier wordt een nieuwe methode beschreven waarbij met behulp van krachten analyse het buizenpost systeem wordt gevalideerd.

*Methode:* Met een speciaal ontwikkelde sensorcapsule worden tijdens het transport de g-krachten en snelheden gemeten. Op basis van de resultaten worden risicovolle stations geselecteerd om te valideren met patiëntenmateriaal. Vanaf deze stations is patiëntenmateriaal naar het laboratorium verstuurd via ambulantly en buizenpost transport om zo het effect van de buizenpost te bepalen. Vanuit kwaliteitsoogpunt is er een maximaal toelaatbaar verschil, tussen beide transport vormen, van 5% als eis gesteld voor de validatie.

*Resultaat:* De gevonden afwijkingen vallen binnen de eis van 5% toelaatbaar verschil. Daarnaast is er vanaf één station gekeken naar het effect van de snelheid (buizenpost transport snelheid van 4 m/s en 8 m/s) op de vrijgekomen krachten en het effect op patiëntenmateriaal. Het verhogen van de snelheid veroorzaakt een verhoging in krachten en een grotere spreiding op de gemeten LD. De overige analyse resultaten zijn niet noemenswaardig veranderd.

*Conclusie:* Deze nieuwe methode maakt het mogelijk om de buizenpost op basis van een risico analyse betrouwbaar en snel te valideren zonder dat daarvoor grote hoeveelheid patiëntenmateriaal benodigd zijn. Tevens kan deze methode eenvoudig als periodiek onderdeel van het kwaliteitssysteem worden geïntroduceerd ter controle van de buizenpost zonder gebruik te maken van patiënten materiaal.

## 72. Efficiencywinst met een geoptimaliseerde toepassing van de (six-)sigmastrategie in een vervangingstraject voor routineapparatuur

J.J. APPERLOO, A.K. BOER, E.A.T. van DIJK-VAN BERKEL, K.J.M. BOONEN, J. CURVERS,  
D.H. van de KERKHOF, V. SCHARNHORST  
Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina Ziekenhuis, Eindhoven

*Inleiding:* Ook in klinische laboratoria wordt de (six-)sigma benadering toegepast. Wij hebben de gebruikelijke werkwijze geoptimaliseerd om het vervangingstraject van Advia 1650 en Centaur naar Cobas 6000 zo efficiënt mogelijk te kunnen uitvoeren, waarbij waarden voor imprecisie en bias apart berekend zijn.

*Methode:* Sigmawaarden zijn berekend voor reproduceerbaarheid en bias, omdat dit in een validatieproces twee onafhankelijke parameters zijn, die met EP5- en EP9-protocollen gekwantificeerd worden. Op basis van vier SKML-rondzendingen (Q-base), is voor de imprecisie(i)-berekening de binnenlab-VC (Cobas 6000-gebruikers) gerelateerd aan de maximaal toelaatbare analytische imprecisie ( $0,5 \times CV(\text{intra-individueel})$ ) en zijn voor de bias (b)-berekening verschillen in Cobas 6000-Advia 1650 apparaatgemiddelden gerelateerd aan de maximaal toelaatbare analytische bias ( $=0,25 \times \sqrt{CV(\text{intra})^2 + CV(\text{inter})^2}$ ). De sigmawaarden geven een inschatting vooraf welke testen (in klinisch opzicht) kritisch zijn ( $\text{sigma} < 3$ ) en welke 'safe' ( $\text{sigma} > 4$ ). Afhankelijk van de sigmawaarden ( $\text{sigma} < 3$

$\text{sigma} 3-4 / \text{sigma} > 4$ ) werden verkorte of volledige EP5- (5/10/20 dagen) en EP9-protocollen (10/20/40 monsters) uitgevoerd.

*Resultaat:* Voor de imprecisie van chemietesten vonden we:  $13x i < 3$ ,  $4x i = 3-4$  en  $28x i > 4$ , hetgeen 52% reductie in EP5-metingen bewerkstelligde tov het 20-dagen protocol. Voor de bias:  $19x b < 3$ ,  $5x b = 3-4$  en  $19x b > 4$ , hetgeen 40% reductie in EP9-metingen betekende t.o.v. 40 monstervergelijk. Er bestond geen verband tussen sigmawaarden van imprecisie en bias, hoewel deze gebruikelijkerwijze samengevoegd worden tot één sigmawaarde.

*Conclusie:* Door analytische reproduceerbaarheid en bias als onafhankelijke parameters te beschouwen en aparte sigmawaarden te berekenen, kunnen EP5 en EP9 protocollen aanzienlijk efficiënter ingezet worden. Samenvoegen van beide parameters in één enkele sigmawaarde zou tot foutieve onder- of overvalidatie hebben geleid.

*Literatuur:* J.M. Gras et al. Clin Chem Lab Med 2007;45:789-96.

## 73. Algoritme voor monitoren tussen-analist-variantie bij microscopische (semen)beoordelingen.

A.K. BOER  
Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina Ziekenhuis, Eindhoven

*Inleiding:* In de WHO-manual voor semendiagnostiek (5e editie, 2010) wordt voorgeschreven dat de tussen-analist-variantie gecontroleerd moet worden aan de hand van Sbar en Bland-Altman grafieken en dat de tussen-analist-variantie getoetst moet worden aan de hand van een F-test. Door de beperkte houdbaarheid van semen, is de door de WHO beschreven systematiek echter in grote mate afwijkend van de dagelijkse diagnostiek. Bovendien zijn de vereiste QC materialen duur of is het zelf maken ervan zeer arbeidsintensief.

*Methode:* Wij hebben een algoritme ontwikkeld om de tussen-analist-variantie in de tijd te vervolgen. Eenmaal per week wordt een semen dat toch al geanalyseerd moest worden, door meerdere analisten medebeoordeeld. De semenconcentratie en motiliteit (% bewegelijke semen) worden "blind" ingevoerd in de Excel-spreadsheet. De spreadsheet registreert wie wanneer heeft deelgenomen en houdt vervolgens de longitudinale tussen-analist-varianties bij. Trends per analist worden weer-

gegeven en er wordt gealarmeerd als de uitkomsten van één of meerdere analisten statistisch afwijken (volgens de door de WHO aanbevolen statistiek).

*Resultaat:* Door introductie van dit algoritme kwam naar boven dat één analist systematisch een systematische afwijking in de semenconcentratie had van gemiddeld 3%. Na het doorspreken van de gehele procedure, was deze afwijking verdwenen. Daarnaast nam het maximale cumulatieve verschil tussen twee analisten in semenconcentratie af van 50% gedurende de eerste 8 weken, naar 9% over een periode van 30 weken.

*Conclusie:* Ons algoritme voor het monitoren van de tussen-analist-variantie bij microscopische semenbeoordeling voldoet aan de door de WHO gestelde criteria, zonder omslachtige of dure procedures en draagt bij aan een actieve verbetering van de tussen-analist-variantie. Bovendien wordt de werkelijke werkwijze getoetst en niet een artificiële afgeleide hiervan.

## 74. Nationale referentie-intervallen: de start van een marathon

N. BROUWER<sup>1</sup>, E.F. EPPENS<sup>2</sup>, I.A. HAAGEN<sup>3</sup>, Y.C.M. KLUITERS<sup>4</sup>, R.T.P. JANSEN<sup>5</sup>, C. RUITER<sup>2</sup>, M.H.M. THELEN<sup>6</sup>  
*Laboratorium Klinische Chemie, Hematologie en Immunologie<sup>1</sup>, Medisch Centrum Alkmaar; NVKC Commissie Kwaliteit<sup>2</sup>, Utrecht; Hematologisch, Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>3</sup>, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam; Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium<sup>4</sup>, Sint Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg; SKML<sup>5</sup>, Nijmegen; Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium<sup>6</sup>, Amphia Ziekenhuis, Breda*

*Inleiding:* Referentie-intervallen worden vastgesteld op basis van zeer uiteenlopende bronnen: eigen onderzoek, literatuur, bijsluiters of regionale afspraken. Vergelijkbaarheid van uitslagen en referentie-intervallen tussen laboratoria onderling is van belang met het oog op het groeiende aantal patiënten dat meerdere ziekenhuizen bezoekt en de komst van het E-lab dossier en het EPD. Dit kan slechts worden bereikt als meetmethoden worden geharmoniseerd. Voor die analyses waarvoor een referentiemethode is beschreven kan een harmonisatie van referentie-intervallen plaatsvinden.

*Methode:* Een literatuuronderzoek is uitgevoerd naar analyses waarvoor referentie-intervallen zijn vastgesteld met de referentiemethode en commuteerbaar juistheidsverificatiemateriaal aanwezig is. Aan de laboratoria is een enquête gestuurd via de NVKC website om voor een aantal algemeen klinisch chemische bepalingen te inventariseren wat de huidige referentie-intervallen en bijbehorende bronnen zijn.

*Resultaat:* Op basis van de literatuur kunnen drie categorieën analyses worden onderscheiden in afnemende mate van herleidbaarheid van de referentie-intervallen. Categorie 1) zoals

enzymen, elektrolyten, glucose en ureum: referentiemethode, -materiaal, -intervallen en commuteerbaar juistheidsverificatiemateriaal aanwezig. Categorie 2) zoals enkele hematologische bepalingen en corticosteroiden: referentiemethode, -materiaal en -intervallen aanwezig, echter geen (houdbaar) juistheidsverificatiemateriaal. Categorie 3) zoals eiwitten: referentiemateriaal en commuteerbaar juistheidsverificatiemateriaal aanwezig, geen referentiemethode en -intervallen. De enquête toont aan dat harmonisatie van referentie-intervallen op basis van regionale afspraken slechts beperkt is gerealiseerd. Daarnaast blijkt dat referentie-intervallen uit externe bronnen worden overgenomen zonder verificatie in het eigen laboratorium.

*Conclusie:* Harmonisatie van referentie-intervallen op een zo hoog mogelijk niveau van herleidbaarheid is noodzakelijk. Dit is mogelijk met een referentiemethode waarmee referentie-intervallen zijn vastgesteld en de concentratie in commuteerbaar juistheidsverificatiemateriaal voor SKML rondzendingen is bepaald. Laboratoria kunnen op deze wijze hun methoden standaardiseren. Om de uitvoering hiervan te bereiken wordt er gewerkt aan een richtlijn.

## 75. Validatieprotocol voor geconditioneerde opslagproducten

H.H.M. SCHOTMAN, J.J.G. HILLEBRAND, H.B. BROUWER  
*Klinisch laboratorium, Ziekenhuisgroep Twente, Almelo.*

*Inleiding:* Het klinisch laboratorium is verantwoordelijk voor het beheer van geconditioneerde opslagproducten binnen het ziekenhuis. Good Manufacturing Practice (GMP) houdt in dat bewaarkasten voor dit soort producten voorzien moeten zijn van een continue temperatuursregistratie en een akoestisch alarm. Onlangs is bij de aanschaf van twee nieuwe bewaarkasten (Pool Koudetechniek) voor erythrocytenconcentraten in het laboratorium een uitgebreide validatie uitgevoerd.

*Methode:* Er werd gebruik gemaakt van een validatieprotocol specifiek voor bewaarkasten. Op verschillende plekken in de bewaarkast werd, in verschillende situaties, de temperatuur ge-

meten en gelogd m.b.v. een draadloos temperatuurregistratie systeem (IceSpy). In de normale opslagsituatie, voor erythrocytenconcentraten, diende de temperatuur van de bewaarkasten tussen de 2 en 8 °C te zijn. In extreme situaties diende er een akoestisch alarm te klinken en diende de overshoot- of herstellijd minimaal te zijn.

*Resultaat:* Beide bewaarkasten voldeden aan de criteria die gesteld waren in het validatieprotocol.

*Conclusie:* Aan de hand van het validatieprotocol voor geconditioneerde opslagproducten, werden de bewaarkasten voor erythrocytenconcentraten geaccepteerd en in gebruik genomen.

### Categorie 2 Bedrijfsvoering

#### Automatisering, dataverwerking

## 76. Koppeling van POCT in de huisartsenpraktijk aan het LIMS

H.A. KLEINVELD, W.P. OOSTERHUIS, J.H.C.M. PANTUS, R. VISSER, M.T.M. RAIJMAKERS  
*Afdeling Klinische Chemie, Atrium Medisch Centrum, Heerlen*

*Inleiding:* POCT in huisartsenpraktijken staat (nog) niet onder de directe regie van het laboratorium. Moderne automatiseringssystemen maken een dergelijke regierol van het laboratorium theoretisch mogelijk. In een door de SKMS (Stichting Kwaliteitsgelden Medische Specialisten) gesubsidieerde pilotstudie werden de praktische en technische haalbaarheid hiervan onderzocht bij de POC analyse van urine.

*Methode:* Twee huisartsenpraktijken met toegang tot het EPD van het ziekenhuis participeerden in het onderzoek. In de huisartsenpraktijken werden semi-automatische urinestrip-analysers geplaatst voorzien van een barcodereader. De analyser werd gekoppeld aan een PC van de huisartsenpraktijk. Deze PC werd voorzien van Meditrack. Op het laboratorium werd POCcelerator geïnstalleerd en gekoppeld aan het LIMS.

*Resultaat:* Via het EPD kan de huisarts een barcode-label met patiëntgegevens printen dat op het urinemonster wordt ge-

plakt. Het monster wordt na het scannen van de barcode geanalyseerd. Door Meditrack wordt het analyseresultaat met patiënt- en praktijkgegevens gestuurd naar het laboratorium. Op het laboratorium integreert POCcelerator de gegevens in een database en stuurt deze door naar het LIMS. Hier wordt een order gegenereerd en volgt binnen 15 minuten een rapportage naar het ziekenhuis EPD en het HIS van de huisarts. In beide huisartsenpraktijken is de pilotfase afgerond en wordt de POC-urinediagnostiek uitgevoerd op een gestandaardiseerde en op afstand door het laboratorium gecontroleerde werkwijze. De resultaten worden elektronisch vastgelegd.

*Conclusie:* Kwaliteitsborging van POCT-diagnostiek in de huisartsenpraktijk is technisch en praktisch mogelijk. Resultaten van analyses verricht in de eerste lijn kunnen op afstand worden gecontroleerd door het centrale ziekenhuislaboratorium hetgeen de kwaliteit van de analyse ten goede komt.

## Overigen

### 77. Diagnostische waarde van een minimaal anemieprotocol gebaseerd op 10 laboratoriumparameters

J.F.W. KEUREN, W.P.H.G. VERBOEKET-van de VENNE, W.P. OOSTERHUIS, M.P.G. LEERS  
*Afdeling Klinische Chemie & Hematologie, Atrium Medisch Centrum Parkstad, Heerlen*

*Inleiding:* Op het NVKC-congres in 2010 is besloten om een richtlijn anemiediagnostiek voor de eerste lijn te ontwikkelen. Een inventarisatie van anemieprotocollen in Nederlandse laboratoria liet een grote diversiteit zien. Om te komen tot een eenduidig protocol hebben wij uit de diverse flowschema's een minimaal anemieprotocol gedestilleerd: Hb, MCV, ferritine (laag ferritine plus laag MCV duidt op ijzeregebrek, protocol stopt), transferrine, transferrine-verzadiging, CRP, BSE, vitamine-B12, foliumzuur, kreatinine/MDRD). De diagnostische waarde van dit protocol wordt in deze studie getoetst.

*Methode:* Bij 423 patiënten werd een uitgebreid 22 parameter anemieprotocol toegepast, inclusief trombocyten, leukocyten, erythrocyten, reticulocyten, serum ijzer, sTFR, Ret-He, homocysteïne, TSH, bilirubine, haptoglobine en LDH. Dit protocol wordt in dit onderzoek beschouwd als gouden standaard en op basis hiervan werden patiënten ingedeeld bij een bepaald type anemie. Twee laboratoriumspecialisten hebben vervolgens bij deze 423

patiënten alleen de parameters van het minimale anemieprotocol beoordeeld. De conclusies die gevonden zijn met het minimale protocol zijn door een onafhankelijke persoon vergeleken met de diagnostische indeling op basis van het uitgebreide protocol.

*Resultaat:* Bij 97 van de 423 patiënten gaven het uitgebreide en het minimale anemieprotocol geen uitsluitel over de oorzaak (23%). Bij 295 van de overige 326 patiënten (90%) werd met behulp van het minimale anemieprotocol dezelfde conclusie getrokken dan met het uitgebreide protocol. Bij de overige 10% werd met het minimale protocol vaak een foutief onderscheid gemaakt tussen ijzeregebreksanemie en anemie van chronische ziekte. Hemolytische anemieën en mogelijke beenmergaandoeningen (reticulocyten aanmaak) werden gemist met het minimale protocol.

*Conclusie:* Het voorgestelde minimale anemieprotocol is in staat om het grootste deel van de oorzaken van anemie te achterhalen. Dit minimale anemieprotocol is een aanbeveling voor de nog te ontwikkelen NVKC richtlijn anemiediagnostiek.

### 78. Online publieksinformatie van de NVKC: volwassen, betrouwbaar en erkend

D.L. BAKKEREN, C. RUITER

*Werkgroep Publieksvragen, Werkgroep Uw Bloedserieus / Kies Beter, NVKC, Utrecht*

*Inleiding:* Vanaf 2003 beantwoordt de NVKC werkgroep Publieksvragen vragen van patiënten en geïnteresseerden. Sinds de evaluatie van deze service in 2005 is het aantal vragen fors gestegen, zonder nadrukkelijke publiciteit. Medio oktober 2008 werden op de overheidswebsite [www.kiesbeter.nl](http://www.kiesbeter.nl) en op de NVKC publiekswebsite [www.uwbloedserieus.nl](http://www.uwbloedserieus.nl) 200 testbeschrijvingen gepubliceerd. Deze zijn gemaakt door de gelijknamige NVKC werkgroep.

*Methode:* Sinds de start van de publieksvragenservice wordt uitgebreide statistiek van het aantal vragen bijgehouden. Vanaf maart 2008 worden de bezoekersaantallen van [www.uwbloedserieus.nl](http://www.uwbloedserieus.nl) o.a. op herkomst en zoekgedrag gevolgd.

*Resultaat:* De toename in het aantal publieksvragen ging tot het 4e kwartaal van 2008 gelijk op met de bezoekersaantallen op [www.uwbloedserieus.nl](http://www.uwbloedserieus.nl). In 2008 werd deze website gemiddeld 188 maal per dag bezocht, in 2009 gemiddeld 400 en in 2010 gemiddeld 640 maal. Nadat eind 2008 de 200 test-

beschrijvingen op beide websites werden gepubliceerd, steeg het dagelijks aantal bezoekers op de publiekssite tot ruim 300 per dag en bedroeg het aantal publieksvragen meer dan 40 per week; teveel voor de enkele 'klinisch chemicus van dienst'. In een kort tijdsbestek werden maatregelen genomen: een dubbel dienstrooster en een navigatiesluis langs alle beschikbare informatie alvorens bezoekers een vraag kunnen stellen. Dit leidde tot een stabilisering van het aantal vragen tot gemiddeld 27 per week in 2010. Sinds 2009 zijn de vragen duidelijk meer gericht en doen ze een serieus beroep op de expertise van de beroepsgroep. Eind december 2010 heeft [www.uwbloedserieus.nl](http://www.uwbloedserieus.nl) het HONcertificaat verworven: ook in de ogen van kritische buitenstaanders geeft de NVKC betrouwbare, deskundige en onafhankelijke gezondheidsinformatie.

*Conclusie:* Bij het publiek is behoefte aan informatie over laboratoriumonderzoek. Door het gericht ontsluiten van deze informatie voorziet de beroepsgroep daar in.

### 79. De rol van de specialist laboratoriumgeneeskunde bij verwantschapsonderzoek

J.W.J. van der STAPPEN, J.M.W. van den OUWELAND, M. de METZ, H. de WOLF

*Klinisch chemisch laboratorium, Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen*

*Inleiding:* Het KCL van het CWZ is 7 jaar geleden gestart met het uitvoeren van verwantschapsonderzoeken, dit naar aanleiding van de toenemende vraag van de regionale huisartsen voor ondersteuning bij verwantschapsproblemen. Een belangrijk onderdeel van de gehele procedure ligt op het terrein van de consultfunctie.

*Methode:* De verwijzing voor onderzoek vindt plaats via huisartsen, privé personen of maatschappelijke instellingen. Voorafgaand aan de analyse voert de klinisch chemicus een intake gesprek om de mogelijkheden te bepalen en de gevolgen van de uitkomst voor betrokkenen in te schatten, zowel juridisch als emotioneel. De bloedafname en identificatieprocedure vindt onder strikte condities plaats om een juiste uitkomst te garanderen.

*Resultaat:* Uit de enquête die cliënten een half jaar na het verwantschapsonderzoek krijgen toegestuurd blijkt een hoge mate van tevredenheid. In toenemende mate worden wij benaderd als

expertise centrum mede door de publiciteit rondom onze bijdrage aan het NCRV programma "DNA onbekend". Met de hulp van verschillende collega's hebben wij een landelijk dekkend netwerk van klinisch chemische laboratoria opgezet die materiaal inzamelen volgens onze richtlijnen. Hierdoor werd het mogelijk een samenwerkingsverband op te zetten met Stg. Ambulante Fiom die KID kinderen helpt om hun biologische vader te vinden. De activiteiten op het gebied van verwantschapsonderzoek genieten een brede belangstelling hetgeen blijkt uit publicaties in diverse dagbladen en een gastoptreden in een landelijk radioprogramma.

*Conclusie:* Bij verwantschapsonderzoek komt de consulentfunctie van onze beroepsgroep in sterke mate tot uiting. Het biedt zowel de gelegenheid om ons vak breed uit te dragen als om de cliënt persoonlijk te adviseren over verwantschapsonderzoek. Hiermee wordt meerwaarde gecreëerd boven anonieme instanties die via het internet hun diensten aanbieden.

**Endocrinologie en intermediaire stofwisseling**

**80. ID-XLC-MS/MS method for salivary measurements of testosterone in transsexual patients after testosterone ester injection**

H.N. BUI, S.E.E. SCHAGEN<sup>1</sup>, H.A. DELEMARRE-van de WAAL<sup>2</sup>, M.A. BLANKENSTEIN<sup>1</sup>, A.C. HEIJBOER<sup>1</sup>  
*Dept. of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Dept. of Paediatrics, VUmc, Amsterdam; Dept of Paediatrics<sup>2</sup>, LUMC, Leiden, The Netherlands*

*Introduction:* At our hospital, female-to-male transsexuals (FtM) from the age of 16 are treated with two- or four-weekly intra-muscular testosterone-ester injections according to a standard protocol. To evaluate this protocol, salivary testosterone was measured between injections. Measuring salivary testosterone is a practical solution for sequential measurements of testosterone; sample collection is non-invasive and can be done at home. Since ~2% of total serum testosterone is present in saliva, a sensitive assay is necessary. For this purpose, we developed an isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method with online-SPE (ID-XLC-MS/MS).

*Methods:* Testosterone was derivatized and analyzed on a Spark Symbiosis coupled to a Waters Quattro Premier-XE tandem-MS (ESI+). Intra- and inter-CV were <5% and <20% respectively. LLOQ was 35pmol/L. Four FtM treated with 125mg/2weeks testosterone depots and three FtM treated with

250mg/4weeks depots collected saliva prior to injection, 12h, 24h, 48h, and 72h after injection, and subsequently every two days until the next injection.

*Results:* Results show a similar testosterone profile in all patients: testosterone levels peaked supraphysiologically directly after injection, and decreased to reach reference levels (130-420 pmol/L) after one week. One patient receiving 125mg/2weeks and two patients treated with 250 mg/4weeks ended with testosterone concentrations below the reference interval.

*Conclusion:* The developed ID-XLC-MS/MS method is a sensitive and accurate assay for measuring salivary testosterone. Initial findings suggest that after injection, testosterone levels in transgender-patients quickly increase to supra-physiological levels and decrease to relatively low levels towards the end of the inter-injection period. To maintain levels within the reference range, treatment with 125mg/2weeks seems preferable.

**Hart- en vaatziekten, atherosclerose**

**81. Prognostic value of highly sensitive cardiac troponin T measurements in patients with acute dyspnea**

L.H.J. JACOBS<sup>2</sup>, S. van WIJK<sup>1</sup>, L.W. EURLINGS<sup>1</sup>, R. LEMMERS<sup>1</sup>, P. BROOS<sup>1</sup>, O. BEKERS<sup>2</sup>, H.J. CRIJNS<sup>1</sup>, Y.M. PINTO<sup>3</sup>, M.P. van DIEIJEN-VISSER<sup>2</sup>, H.P. BRUNNER-la ROCCA<sup>1</sup>  
*Department of Cardiology<sup>1</sup>, Department of Clinical Chemistry<sup>2</sup>, Maastricht University Medical Center; Heart Failure Research Center<sup>3</sup>, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands*

*Introduction:* Recent studies have shown that previously undetectable cTnT levels, which can now be measured with the hs-cTnT assay, proved to be of prognostic value in stable coronary disease and heart failure. The highly sensitive assay may also improve prognostic power of cTnT in acute dyspnea. The purpose of this study was to investigate whether highly sensitive cardiac troponin T (hs-cTnT) improves risk stratification in patients presenting to the emergency department with dyspnea.

*Methods:* We prospectively studied the prognostic value of hs-cTnT for both early and long-term mortality in 678 consecutive patients presenting to the emergency department with dyspnea.

*Results:* cTnT levels were measurable in 648 patients (95.6%) with the hs-cTnT assay, whereas only 331 patients (48.8%, P<0.001) had detectable cTnT levels with the conventional

assay. Hs-cTnT was strongly associated with both early and long-term mortality, independent of other known clinical risk factors including NT-proBNP. Importantly, in patients with undetectable cTnT, hs-cTnT still had significant prognostic accuracy. The cut-off defining cardiac troponin T elevations for hs-cTnT of 0.016 µg/L showed excellent sensitivity (96%) and negative predictive value (98%), which could not be achieved with the conventional assay cut-off of 0.03 µg/L (65% and 93%, respectively).

*Conclusion:* Our data show that cardiac troponin T levels measured by the hs-cTnT assay have important prognostic value in patients presenting to the emergency department with acute dyspnea. Moreover, for clinical decision making, the hs-cTnT assay enables a better identification of subjects with a low risk of early and long-term mortality compared to the conventional assay.

## 82. Ischemia modified albumin as a screening test for intestinal ischemia

M.F. BOKKES<sup>1,2</sup>, J.J. KOLKMAN<sup>1</sup>, R.H. GEELKERKEN<sup>1</sup>, IVERMES<sup>1</sup>, C.J.A. DOELMAN<sup>1</sup>  
*Medisch Spectrum Twente<sup>1</sup>, Enschede; University Twente<sup>2</sup>, Enschede, The Netherlands*

**Introduction:** Intestinal ischemia is an inadequate supply of oxygen and nutrients to intestinal tissue, due to a reduced blood flow. Intestinal ischemia can result in a bowel infarction which has a high mortality ranging from 30 to 75%, depending on its etiology. This high mortality is (partly) caused by the delay in diagnosis. Ischemia modified albumin (IMA) is a promising biomarker for the early diagnosis of intestinal ischemia. The binding capacity of albumin with transition metals, such as cobalt, is reduced during ischemia; this variant of albumin is known as ischemia modified albumin (IMA).

**Methods:** IMA level is indirectly measured by a cobalt binding assay test (CBA-test) on serum samples of patients with intestinal ischemia (n=20) and on serum samples of non-ischemic control patients (n=10). Serum is pretreated with CaCl<sub>2</sub> to remove chelating medications, which might affect the CBA-test by chelating cobalt. Serum is incubated with cobalt chloride to

allow binding to albumin. Dithiothreitol was added as colorizing agent, it colors the solution when bound to free cobalt. Absorbance is measured at 450nm and values are reported as absorbance units (ABSU).

**Results:** Patients with splanchnic ischemia (n=20) had significantly higher CBA values (0,439 ABSU±0,081 SEM) compared to the control group (n=10) (0,237 ABSU±0,057). The test had a sensitivity of 100% and specificity of 90% when the threshold is set on 0,3 ABSU.

**Conclusion:** IMA level is significantly increased in patients with splanchnic ischemia compared to the non-ischemic group. Level of IMA, like other oxidative stress markers, cannot be used to differentiate between different organs of origin, due to a lack of tissue specificity, but it can be used as a screening test for intestinal ischemia.

### Categorie 3 Klinisch

#### Endocrinologie en intermediaire stofwisseling

## 83. Diagnostische opbrengst van reflexmeting op serum methylmalonzuur voor het vaststellen van een functioneel vitamine B12 tekort

J.M.W. van den OUWELAND, A.M. BEIJERS, H.W. van DAAL  
*Klinisch Chemisch Laboratorium, Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen*

**Inleiding:** Methylmalonzuur (MMA) wordt als de meest gevoelige en specifieke marker beschouwd voor de cellulaire vitamine B12 (B12) status. MMA accumuleert bij een B12-tekort als gevolg van een verminderde omzetting van methylmalonyl-CoA naar succinyl-CoA door methylmalonyl-CoA-mutase, een B12-afhankelijk enzym. Door het ontbreken van eenvoudige en goedkope analysemethoden wordt MMA slechts in beperkte mate aangewend om een mogelijk functioneel B12-tekort vast te stellen. We hebben gekeken naar de prevalentie van verhoogde MMA concentraties bij diverse serum B12 concentraties en bespreken de impact van de routinematige implementatie van MMA reflexmeting bij intermediaire B12 concentraties voor ons laboratorium.

**Methode:** In 355 sera met B12 concentraties 22-1476 pmol/l (ECLIA, Roche) en normale kreatinine gehalten (<110 (M), <90 (V) µmol/L; enzymatisch, Roche) werd MMA gemeten (LC-MS/MS, Waters). MMA referentiewaarden zijn vastgesteld in een subset van sera met hoog normale B12 concentra-

ties (>400 pmol/l; n=87).

**Resultaat:** Referentiewaarden (2,5-97,5 percentiel) voor serum MMA zijn 0,05-0,34 µmol/l. MMA vertoont een negatieve correlatie met serum B12 (r=-0,22; p<0,0001). Voor B12 <100, 100-200 en > 200 pmol/l is MMA verhoogd in respectievelijk 80%, 32% en 12%. Voor B12 concentraties 100-150, 150-200, 200-250 en > 250 pmol/l is MMA verhoogd in 44%, 27%, 16% en 2%.

**Conclusie:** Onze bevindingen sluiten goed aan bij het landelijk advies om bij B12 concentraties tussen 100-200 pmol/l nader op MMA te testen (1). Op basis van alle B12 aanvragen over 2010 in ons laboratorium zal MMA reflexmeting in 17% geïndiceerd zijn waarbij in 32% van de gevallen een verhoogd MMA mag worden verwacht.

**Literatuur:** 1. Wiersinga WJ, de Rooij SEJA, Huijman JGM, Fischer JC, Hoekstra JBL. De diagnostiek van vitamine-B12-deficiëntie herzien. Ned Tijdschr Geneesk 2005; 149: 2789-94.

## 84. Late-night salivary cortisol for diagnosing Cushing's syndrome, as measured by LC-MS/MS and automated immunoassay

M.P. SCHUIJT<sup>1</sup>, M. VEGT-WAGENMAKERS<sup>2</sup>, J. MEINARDI<sup>3</sup>, A. HERMUS<sup>2</sup>, J.M.W. van den OUWELAND<sup>4</sup>  
*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Slingeland Hospital, Doetinchem; Department of Internal Medicine<sup>2</sup>, Radboud University Medical Centre, Nijmegen; Departments of Internal Medicine<sup>3</sup> and Clinical Chemistry<sup>4</sup>, Canisius Wilhelmina Hospital, Nijmegen, The Netherlands*

**Introduction:** The objective of the study was to describe the diagnostic performance of late-night salivary cortisol (LNSC) for diagnosing Cushing Syndrome (CS).

**Methods:** Three groups of subjects were studied in whom at least one LNSC sample was collected: normal subjects (n=77), patients in whom Cushing syndrome (CS) was excluded or could not be confirmed (pseudo-Cushing; n=19), and patients with proven CS (n=14). Saliva was collected at 23:00 h using a Salivette with polyester swab (Sarstedt). LNSC was measured by both liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS, TQD Waters) and automated electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA, Roche).

**Results:** For both assays, LNSC levels (median (range)) were high-

er in patients with CS (7.3 (2.0-42.6) nmol/L for LC-MS/MS and 13,0 (6.0-121.7) nmol/L for ECLIA), compared with patients with pseudo-Cushing (1,4 (0.6-4.4) nmol/L for LC-MS/MS and 3.5 (0.6-13.9) nmol/L for ECLIA), and normal subjects (0,7 (0.5-9.0) nmol/L for LC-MS/MS and 2.5 (0.5-15.5) nmol/L for ECLIA), P < 0.0001). For LC-MS/MS, the highest combined sensitivity (86%) and specificity (90%) was achieved at a cut-off point of 3.05 nmol/L. For ECLIA, the highest combined sensitivity (79%) and specificity (79%) was achieved at a cut-off point of 7.40 nmol/L.

**Conclusion:** LNSC is a non-invasive and promising test for screening patients suspected to have CS. LC-MS/MS shows the highest diagnostic performance (sensitivity/specificity) when compared to ECLIA.

## 85. Pseudohypoparathyreoidie, een geval apart

M.B. KOK<sup>1</sup>, C.R. van ROOIJEN<sup>2</sup>, E. ten BOEKEL<sup>1</sup>, F. STAM<sup>2</sup>  
*Laboratorium KCHI<sup>1</sup>, Afdeling Interne Geneeskunde<sup>2</sup>, Medisch Centrum Alkmaar*

*Inleiding:* Een 18-jarige negroïde vrouw met een blanco voor-geschiedenis presenteert zich op de spoedeisende hulp met sinds enkele dagen kramp in beide handen. Ze is geboren in Jamaica en woont sinds 8 maanden in Nederland. Bij lichamelijk onderzoek worden verkrampde vingers gezien met een positief teken van Trousseau, kenmerkend voor hypocalciëmie.

*Methode:* Casusbeschrijving

*Resultaat:* Laboratoriumonderzoek laat een ernstige hypocalciëmie (1,16 mmol/l) bij een normaal albumine (36 g/l), een licht verlaagd magnesium (0,6 mmol/l), normaalwaarde voor alkalische fosfatase (93 U/l) en hyperfosfatemie (2,0 mmol/l) zien. Uitscheiding van fosfaat en calcium in urine is laag, respectievelijk 0,8 mmol/24u en 5 mmol/24u. Verder wordt een verhoogd PTH (22,1 pmol/l), een normaal 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamine D (69 pmol/l), en een verlaagd 25-OH-vitamine D (31 nmol/l) gevonden. Een verhoogd PTH, hypocalciëmie en hyperfosfatemie past bij pseudohypoparathyreoidie (PHP), een aandoening waarbij het weefsel resistent is voor PTH. PHP

kan worden aangetoond met behulp van de Ellsworth-Howard test. Hierbij wordt synthetisch PTH toegediend en wordt gemeten of de fosfaat excretie in urine toeneemt. De test liet een minimale (5-voudig, normaal is groter dan 100-voudig) toename in fosfaatexcretie in urine zien, wat de diagnose PHP ondersteunt.

*Conclusie:* In dit abstract is een patiënte beschreven met pseudohypoparathyreoidie (PHP). PHP is een congenitale aandoening waarbij zowel de klinische als laboratoriumtechnische kenmerken overeenkomen met hypoparathyreoidie. PHP wordt veroorzaakt door een mutatie van de PTH receptor, leidend tot weefselresistentie voor PTH. Hierdoor is de calciumreabsorptie en fosfaat-excretie in de nieren verlaagd, evenals botresorptie in geval van hypocalciëmie. Daarnaast is de 1 $\alpha$ -hydroxylering van 25-OH-vitamine D verminderd. Behandeling bestaat uit levenslange calcium en 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamine D suppletie. Suppletie leidde tot een snelle afname van de klachten en normalisatie van het calcium.

## 86. A case of consistent discrepancies between urine- and blood hCG measurements

A. ALBERSEN<sup>1</sup>, E. KEMPER-PROPER<sup>1</sup>, M.M.H. THELEN<sup>2</sup>, N.A. KIANMANESH RAD<sup>3</sup>, R.F. HOEDEMAEKER<sup>4</sup>, L.S.M. BOESTEN<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, IJsselland Ziekenhuis, Capelle aan den IJssel; Department of Clinical Chemistry<sup>2</sup>, Amphia Ziekenhuis, Breda; Department of Gynecology<sup>3</sup>, IJsselland Ziekenhuis, Capelle aan den IJssel; PATHAN Foundation<sup>4</sup>, Rotterdam, The Netherlands*

*Introduction:* Our laboratory was confronted with two successive urine samples from a single patient which tested positive for human chorionic gonadotropin (hCG) in both qualitative- and quantitative assays, combined with no detectable hCG in corresponding plasma samples.

*Methods:* Serial dilution and recovery experiments were performed in order to investigate the presence of interfering substances or a high-dose hook effect. The ovarian cysts that were removed from this patient were immunohistochemically stained using polyclonal anti-human hCG antibodies. Furthermore, a urine sample was sent to the USA hCG Reference Service for hCG variant analysis.

*Results:* Dilution and recovery experiments in urine- and plasma samples were unremarkable. The biopsy stained negative for human hCG and free  $\beta$ -subunit. hCG isoform analysis in the urine sample revealed that 87.5% of the immunoreactive hCG lacked the  $\beta$ -subunit C-terminal peptide.

*Conclusion:* The transient presence of hCG in urine with no detectable hCG in blood samples are likely to be caused by familial hCG syndrome. The majority of the total hCG has a degraded form of hCG with a  $\beta$ -subunit that lacks the C-terminal peptide. This hCG variant is thought to have an extreme fast clearance rate explaining the discordance between the hCG results in urine- and plasma samples.

### Categorie 3 Klinisch

#### Bloedvorming, bloedstolling, transfusie

## 87. Malaise en donkerbruine urine: denk ook aan een uitgestelde transfusiëreactie!

M.B. KOK, R.K. SCHINDHELM, W.A.T. SLIEKER  
*Laboratorium KCHI, Medisch Centrum Alkmaar, Alkmaar*

*Inleiding:* Een 46 jarige vrouw meldt zich op de spoedeisende hulp met sinds enkele dagen pijn in de nierloge, zonder koorts. Differentiaal-diagnostisch werd gedacht aan een cystitis dan wel pyelonefritis. Oriënterend laboratoriumonderzoek onderstreept deze waarschijnlijkheidsdiagnose en liet een verhoogd CRP (138 mg/l) en leukocytentetal (10,1 x 10<sup>9</sup>/l) zien. Echter, de ingeleverde donkerbruine urine en het verlaagde hemoglobinegehalte (6,5 mmol/l), suggereerden mogelijke hemolyse. Bij het laboratorium was bekend dat de patiënte 9 dagen eerder drie erytrocytenconcentraten had ontvangen bij een gecompliceerde uterusexpiratie (1 liter bloedverlies) en werd er derhalve gedacht aan een uitgestelde transfusiëreactie. De eenheden zijn op basis van een definitieve ABO/RhD-bloedgroep en negatieve irregulaire antistofscreening volgens het Type&Screen-beleid uitgegeven.

*Methode:* Casusbeschrijving

*Resultaat:* Laboratoriumonderzoek gedurende de opname (1 week) bevestigde de hemolyse (verlaagd haptoglobine, verhoogd LDH, verhoogd bilirubine in plasma en urineonder-

zoek). Onderzoek naar een mogelijke transfusiëreactie liet een negatieve directe antiglobulinetest (DAT) zien en een positieve antistofscreening, die getypeerd werd als een anti-e. De rhesus-fenotypering van de donoreenheden was CcDee, ccEde, CcDEe en van de patiënte ccDEE.

*Conclusie:* Normaal gesproken vindt er geen hemolyse plaats tijdens de primaire immuunrespons. Het is daarom aannemelijk dat eerder immunisatie plaats heeft gevonden en dat de hemolytische transfusiëreactie het gevolg is van een secundaire immuunrespons. Bij navraag bleek de patiënte eerder een transfusie in het buitenland te hebben ontvangen bij de geboorte van één van haar kinderen. De negatieve DAT kan worden verklaard doordat de getransfundeerde erytrocyten reeds zijn afgebroken of dat deze een lage expressie van bloedgroepantigenen hebben (heterozygote expressie). In deze casus werd een uitgestelde hemolytische transfusiëreactie beschreven, welke door het laboratorium werd ontdekt. Deze casus onderschrijft de noodzaak van een goede anamnese met betrekking tot bloedtransfusie.

## 88. An unusual case of arterial thrombosis in a young woman using desmopressin

E.J.M. SCHRIJVER<sup>1</sup>, W. DEENIK<sup>2</sup>, H. CHON<sup>3</sup>, N.A. KOEDAM<sup>4</sup>, A. M. E. SPOELSTRA - de MAN<sup>1</sup>  
*Department of Intensive Care<sup>1</sup>, Department of Internal Medicine<sup>2</sup>, Department of Clinical Chemistry<sup>3</sup>, Department of Surgery<sup>4</sup>, Tergooiziekenhuizen, Hilversum, The Netherlands*

**Introduction:** Desmopressin (vasopressin analogue) is prescribed for nocturnal enuresis. It also stimulates the release of von Willebrand factor (VWF) and factor VIII from endothelial cells, making it an effective drug for coagulation disorders. Frequently reported adverse events include venous and sporadically arterial thrombosis.

**Methods:** A 27-year-old woman presented at the emergency room after weeks of severe abdominal pain and diarrhoea. Her medical history included a borderline personality disorder with multiple hospitalizations and auto-intoxication. For nocturnal enuresis she used desmopressin 0.2mg orally daily.

**Results:** At presentation we measured: sodium 132 mmol/L (137-144), creatinine 47 umol/L (50-95), lactate 4.8 mmol/L (<2.0), CRP 180 mg/L (<5), leucocytes 23.7x10<sup>9</sup>/L (4.0-11.0), 10% band forms. Because of recurrent thrombosis, on multiple occasions thrombi, the gall bladder and ischemic parts of the small bowel were removed, resulting in a small bowel of <1 meter. Also, an aortahepatic bypass was made. Additional tests

showed PT 20.6 s (12-15), APTT 62 s (28-38) during heparin use, haptoglobin 2.6 g/L (0.3-2.0), factor VIII activity 268% (50-150), vWF antigen 740% (50-150) and vWF RiCoF activity 590% with a normal multimer pattern. The LAC test, anti-β<sub>2</sub>-glycoprotein-1 and anti-cardiolipin antibodies were negative. She was no carrier of factor V Leiden, the prothrombin G20210A or the Jak-2 V617F gene mutation and CD59 expression was normal. Cardiac ultrasound did not reveal any thrombi. Histopathological examination did not support vasculitis or other underlying diseases.

**Conclusion:** Since most common prothrombotic factors and PNH were excluded and although the patient was inconsistent, she probably took a desmopressin overdose before admission. Unfortunately, a desmopressin level could not be measured. To our best knowledge, this is the first report suggesting a possible relationship between oral desmopressin use and arterial thrombosis.

## 89. Een familie met hereditaire elliptocytose met drie mutatie in het (alpha)spectrinegen

J. POSTMA, A. SPAANS, M. VEUGER, P. FRANCK  
*Afdeling Klinische Chemie, Haga Ziekenhuis, Den Haag*

**Inleiding:** Het membraan van erythrocyten wordt ondersteund door een membraanskelet van eiwitten, waaronder spectrine. Bij Hereditaire Elliptocytose (HE) met een elliptocytair vorm, verminderde vervormbaarheid en verkorte levensduur van de erythrocyt is (alpha) spectrine gemuteerd. Bij Hereditaire Pyropoikilocytose (HPP) is naast de HE-mutatie nog een tweede mutatie in het (alpha) spectrine aanwezig. Als deze Lely (Low Expression Lyon) mutatie in trans ligt t.o.v. de HE-mutatie, is de expressie van het heterozygote wildtype spectrine verminderd. Meer gemuteerd HE-spectrine wordt in het instabiele membraanskelet gebouwd, met HPP als resultaat.

**Methode:** Meting vervormbaarheid erythrocyten met ektacytometer. DNA (sequentie) analyse.

**Resultaat:** Een familie met zowel HE als HPP is onderzocht. Broer E. heeft klinische klachten, een bloedbeeld en ektacytometrische vervormbaarheid passend bij HPP. Broer W.

en dochter N. hebben geen klinische klachten maar wel een bloedbeeld en ektacytometrische vervormbaarheid passend bij HE. Bij alle aangedane familieleden is eenzelfde HE/Exon 2 en Lely-mutatie aangetroffen. Bij E. is nog een derde mutatie in Exon 6 van het (alpha) spectrine aanwezig.

**Conclusie:** De combinatie HE/Exon 2 en Lely veroorzaakt normaliter HPP. Broer W. en dochter N. hebben echter een milde HE. De verklaring hiervoor is, dat HE/Exon 2 en Lely in cis liggen in plaats van in trans. Het HE/Exon 2 komt minder tot expressie en meer heterozygoot wildtype spectrine wordt ingebouwd. Dezelfde mutaties heeft broer E., maar hij heeft wel HPP. Dit wordt veroorzaakt door de extra mutatie in Exon 6. Deze staat in trans met de in cis liggende combinatie HE/Exon 2 en Lely. Het HE/Exon 2 spectrine komt gelijk bij broer E. verminderd tot expressie. Echter er wordt nu meer instabiel HE/Exon 6 spectrine ingebouwd, met alsnog HPP als resultaat.

## 90. Casus: Aortaboog reconstructie bij een patiënt met koude agglutinenen (anti-IH): serologisch en klinisch beloop

I. HUBEEK<sup>1</sup>, H. ter HEIDE<sup>2</sup>, W.W. van SOLINGE<sup>1</sup>, K.M.K. de VOOGHT<sup>1</sup>  
*Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie<sup>1</sup>, Afdeling Kinder cardiologie<sup>2</sup>, Universitair Medisch Centrum Utrecht*

**Inleiding:** Bij een 7-jarige jongen werd preoperatief serologisch onderzoek aangevraagd. Aangezien de geplande aortaboog reconstructie onder circulatoir arrest en diepe hypothermie zou plaatsvinden, werd ook een screening op koude auto-antistoffen verricht. In het plasma van de patiënt werd een koude agglutinine gevonden. De behandelend arts wilde weten of en wanneer de ingreep kon plaatsvinden.

**Methode:** Bloedgroepbepaling en irregulaire antistofscreening werden uitgevoerd in de Liss techniek (Ortho). Koude antistofscreening en titerbepaling werden uitgevoerd in de zout techniek.

**Resultaat:** De patiënt was O positief en de irregulaire antistof screening was negatief. De koude antistofscreening liet een koude auto-antistof met specificiteit tegen het IH-antigeen zien, met reactiviteit tot 28 °C (titer 1:2). Sterke koude auto-antistoffen I(H) worden meestal gevonden na infecties en zijn over het algemeen self-limiting. Het risico van een operatie

onder circulatoir arrest en diepe hypothermie (tot 18 °C) in aanwezigheid van deze antistof was onvoldoende in te schatten en de operatie werd uitgesteld. De aanwezigheid en titer van de anti-IH antistof werd periodiek vervolgd. Na 3 maanden was de anti-IH antistof nog aantoonbaar tot 24 °C (titer 1:1). Reactiviteit tot 22 °C kon na 5 maanden nog worden aangetoond. Dit bleek ook na 7 maanden nog het geval te zijn. Hierop werd besloten de operatie uit te voeren, maar de patiënt minder diep te koelen (tot 24,9 °C). De operatie verliep ongecompliceerd.

**Conclusie:** Koude auto-antistoffen IH kunnen problemen veroorzaken bij patiënten die sterk gekoeld worden voor een cardio-pulmonaire bypass procedure. Indien uitstel van OK mogelijk is, kan gewacht worden totdat de antistof minder reactief is. Anti-IH antistoffen kunnen lang persisteren. Periodiek vervolgen van reactiviteit en titer kan van belang zijn om vast te stellen wanneer een patiënt veilig geopereerd kan worden.

## 91. Measurement of direct thrombin inhibitors: which assay to use?

J. CURVERS, D. van de KERKHOF, V. SCHARNHORST  
*Department of Clinical Laboratories, Catharina Hospital, Eindhoven, The Netherlands*

**Introduction:** As opposed to heparin, direct thrombin inhibitors (DTI) should require less monitoring, since their half life is very short. Still, when bleeding problems occur an assay to determine the level of direct thrombin inhibitor remains necessary. Although being considered superior to activated partial thromboplastin time (APTT), dedicated tests as the ecarin clotting time (ECT) are still poorly standardized.

**Methods:** In this study we tested the effect of DTI's argatroban, lepirudin and bivalirudin in different concentrations with a maximum of 5mg/mL on the APTT (kaolin, Roche Stago), prothrombin time (PT, Neoplastin Plus, Roche Stago), ECT (Stago) and Hemoclot (Hyphen Biomed) on a Roche STA-R evolution.

**Results:** Influence of the DTI's on APTT was dose dependent (linear above 1mg/mL) and the gradual increase of the APTT was not significantly different between different DTI's. The PT

was also dose dependent and showed a linear increase with increasing concentrations of DTI's. The largest increase was shown for argatroban, an intermediate increase was seen for Bivalirudin and only a mild increase was observed for lepirudin. The ECT showed similar results as the PT, however with an increased sensitivity for all DTI's. Even lepirudin showed an increase up to a 5-fold of the baseline value. The Hemoclot assay showed the highest dose dependent increase for all DTI's, without apparent differences in increase between different DTI's.

**Conclusion:** The two dedicated DTI-monitoring assays ECT and Hemoclot show a dose-dependent linear increase with increasing DTI-concentration. Only the Hemoclot assay shows the same kinetic response to the different DTI's. Therefore, full standardisation can only be achieved for the Hemoclot assay, irrespective of the DTI used.

## 92. PCR-SSP ter ondersteuning bij het uitzoeken van een afwijkende fenotypische A-antigeen expressie

J.H. MEEKERS, W.H.A. de JONG, A.B. MULDER, C.A.M. HAZENBERG  
*Afdeling Laboratoriumgeneeskunde, Universitair Medisch Centrum Groningen*

**Inleiding:** Bij een patiënt met in het plasma anti-B en anti-A werd met de AB0/D bloedgroepbepaling een sterk verzwakte expressie aangetoond van het A-antigeen. Wordt dit resultaat veroorzaakt door een normaal A-antigeen met een zwakke expressie of door een A-variant? Wat is het te volgen beleid bij bloedtransfusie? Het doel van onze studie is het beantwoorden van deze vragen.

**Methode:** Voor het vaststellen van de expressie van het A-antigeen is een absorptie/elutie methode gebruikt, waarbij wordt gekeken of de patiënterythrocyten specifiek anti-A kunnen binden. Hiervoor worden gewassen patiënterythrocyten gedurende 1 uur bij 4 °C met humaan anti-A geïncubeerd. Na een wasstap wordt een eluaat gemaakt dat vervolgens in de IAT getest is tegen A-testerythrocyten en ter controle ook tegen B- en 0-testerythrocyten. Met behulp van PCR in een DNA-SSP analyse van BAGene (AB0-TYPE variant kit) is het AB0 genotype van de patiënt vastgesteld. Deze PCR gebruikt sequentie

specifieke primers (SSP) voor de verschillende glycosyltransferasen van het AB0-bloedgroepsysteem op de lange arm van chromosoom 9 (9q34). Bij lage temperatuur wordt de specificiteit van de anti-A vastgesteld met A1 en A2 donorerythrocyten. De klinische relevantie van de anti-A wordt vastgesteld in de IAT-LISS bij 37 °C met A1 donorerythrocyten.

**Resultaat:** Met behulp van de absorptie/elutie methode is vastgesteld dat de erythrocyten van patiënt specifiek A-antigeen bevatten. PCR analyse toont voor de AB0-bloedgroep het minder frequent voorkomende O1Aw genotype. De anti-A blijkt een anti-A1 te zijn. De kruisproeven zijn negatief.

**Conclusie:** Genetisch blijkt de patiënt slechts één gemuteerd allel te hebben dat codeert voor een A-glycosyltransferase. Dit leidt fenotypisch tot een verzwakte expressie van het A-antigeen. De gevonden anti-A1 heeft geen klinische relevantie, patiënt mag op basis van deze gegevens A-bloedproducten ontvangen.

## 93. Rivaroxaban stoort factor Xa-afhankelijke stollingsbepalingen

V.J.J. BOM<sup>1</sup>, Y.I.G.V. TICHELAAR<sup>2</sup>, J.J.W. PENTERMAN<sup>1</sup>, J.H. NIJLAND<sup>1</sup>, W.H.A. de JONG<sup>1</sup>, K. MEIJER<sup>2</sup>, A.B. MULDER<sup>1</sup>  
*Afdeling Laboratoriumgeneeskunde<sup>1</sup>, Afdeling Hematologie<sup>2</sup>, Universitair Medisch Centrum Groningen*

**Inleiding:** Rivaroxaban (Bay 59-7939, Xarelto®) is een nieuw antitromboticum voor de preventie en behandeling van trombo-embolische aandoeningen. Voordelen bij het gebruik van Rivaroxaban zijn de orale toediening en geen noodzaak tot continue laboratoriummonitoring. Rivaroxaban is een oxazolidinone verbinding met een hoge biologische beschikbaarheid (80-100%), die direct, selectief en reversibel factor Xa bindt. Omdat vele stollingsbepalingen mede afhankelijk zijn van factor Xa activiteit, onderzochten we in deze studie de invloed van Rivaroxaban-gebruik.

**Methode:** We onderzochten het effect van Rivaroxaban in een aantal Xa-gemedieerde stollingsassays; i.e. de PT (Innovin, Siemens), APTT (actin FS/FSL, Siemens), Factor VIIIc (actin FS, Siemens), LAC (Russell's Viper Venom (RVV)-testen (Kordia/Life Diagnostics) met APTT (actin FS/FSL, Siemens), zowel in plasma's na in vitro toevoeging ("spiken") als in plasma's verkregen 4 uur na orale toediening van 20 mg per os aan 6 vrijwilligers.

**Resultaat:** Rivaroxaban, in vitro toegevoegd aan normaal plasma in een concentratiereeks van 5 tot 500 µg/l, verlengde respectievelijk de PT en APTT vanaf 15 en 5 µg/l. De factor VIIIc bepaling werd in de 1:10 verdunning vanaf 50 µg/l duidelijk verstoord en de interferentie nam af bij hogere verdunning. Na een eenmalige toediening per os van 20 mg Rivaroxaban werden de PT en APTT verlengd met gemiddeld 1,4 en 8,0 sec, respectievelijk. Bij in vivo Rivaroxaban-gebruik werd de FVIIIc bepaling geremd tot en met een 1:320 verdunning, waarbij, afhankelijk van de verdunning, circa 50-15% lagere FVIIIc waarden gevonden werden. Ook de LAC diagnostiek, en dan vooral de (RVV)-testen werden beïnvloed, terwijl de actin FS/FSL ratio nauwelijks beïnvloed werd.

**Conclusie:** Hoewel Rivaroxaban nauwelijks monitoring behoeft, moet men alert zijn op remming van een aantal factor Xa-afhankelijke stollingsassays.



#### 94. Diagnostic accuracy and user-friendliness of 5 point-of-care D-dimer tests for the exclusion of deep vein thrombosis

G. J. GEERSING<sup>1</sup>, D.B. TOLL<sup>1</sup>, K.J. JANSSEN<sup>1</sup>, R. OUDEGA<sup>1</sup>, M.J. BLIKMAN<sup>1</sup>, R. WIJLAND<sup>1</sup>, K.M.K. de VOOGH<sup>2</sup>, A.W. HOES<sup>1</sup>, K.G. MOONS<sup>1</sup>

*Julius Center for Health Sciences and Primary Care<sup>1</sup>, Department for Clinical Chemistry and Haematology<sup>2</sup>, University Medical Center Utrecht, The Netherlands*

**Introduction:** Point-of-care D-dimer tests have recently been introduced to enable rapid exclusion of deep venous thrombosis (DVT) without the need to refer a patient for conventional laboratory-based D-dimer testing. Before implementation in practice, however, the diagnostic accuracy of each test should be validated.

**Methods:** We analyzed data of 577 prospectively identified consecutive primary care patients suspected to have DVT, who underwent 5 point-of-care D-dimer tests-4 quantitative (Vidas, Pathfast, Cardiac, and Triage) and 1 qualitative (Clearview Simplify)-and ultrasonography as the reference method. We evaluated the tests for the accuracy of their measurements and submitted a questionnaire to 20 users to assess the user-friendliness of each test.

**Results:** All D-dimer tests showed negative predictive values higher than 98%. Sensitivity was high for all point-of-care

tests, with a range of 0.91 (Clearview Simplify) to 0.99 (Vidas). Specificity varied between 0.39 (Pathfast) and 0.64 (Clearview Simplify). The quantitative point-of-care tests showed similar and high discriminative power for DVT, according to calculated areas under the ROC curves (range 0.88-0.89). The quantitative Vidas and Pathfast devices showed limited user-friendliness for primary care, owing to a laborious calibration process and long analyzer warm-up time compared to the Cardiac and Triage. For the qualitative Clearview Simplify assay, no analyzer or calibration was needed, but interpretation of a test result was sometimes difficult because of poor color contrast.

**Conclusion:** Point-of-care D-dimer assays show good and similar diagnostic accuracy. The quantitative Cardiac and Triage and the qualitative Clearview Simplify D-dimer seem most user-friendly for excluding DVT in the doctor's office.

#### 95. Characterization of PROS1 mutation-negative hereditary protein S deficiency

R. MULDER<sup>1,2</sup>, M.K.ten KATE<sup>2</sup>, W.H.A. de JONG<sup>1</sup>, H. ten CATE<sup>3</sup>, H.C. KLUIN-NELEMANS<sup>2</sup>, A.B. MULDER<sup>1</sup>  
*Department of Laboratory Medicine<sup>1</sup>, Division of Haemostasis, Thrombosis, Department of Hematology<sup>2</sup>, University Medical Centre Groningen; Laboratory for Clinical Thrombosis and Haemostasis<sup>3</sup>, Department of Internal Medicine and Cardiovascular Research Institute Maastricht, Maastricht University Medical Centre, Maastricht, The Netherlands*

**Introduction:** Inherited protein S (PS) deficiency is a risk factor for venous thrombosis (VTE). In only 50% of all cases a causative mutation in PROS1 can be detected. The aim of this study was to characterize relatives, belonging to PS deficient, PROS1 mutation-negative families with increased VTE occurrence.

**Methods:** We used nine different PS assays, i.e. 2 total PS antigen assays (DAKO and Reaads® Protein S Antigen reagents), 4 free PS antigen assays (DAKO, Reaads® Monoclonal Free Protein S Antigen, HemosIL™ and STA® - Liatest® Free Protein S reagents), and 3 PS activity assays (PSact, Cryocheck quantitative Protein S Clotting Assay CLOT S™, and STA Protein S Clotting reagents). Additionally, thrombin generation, measured with the CAT method, C4BP protein and gene and free TFPI were analyzed in 29 PROS1 mutation-negative relatives. Controls consisted of healthy volunteers, PS deficient

subjects with a causative PROS1 mutation, and subjects with the PS Heerlen polymorphism.

**Results:** Thrombin generation assay showed similar hypercoagulable states in subjects with and without a causative PROS1 mutation. PROS1 mutation-negative relatives had low to normal total, free, and PS activity levels and increased C4BP levels, all significantly higher than subjects with a causative PROS1 mutation. No mutations were found in the coding sequence of C4BPβ. Free TFPI levels were normal and significantly different from both the decreased levels, found in subjects with a causative PROS1 mutation and the increased levels, found in subjects with a PS Heerlen polymorphism.

**Conclusion:** Relatives, belonging to PS deficient, PROS1 mutation-negative families with VTE show a hypercoagulable state, intermediate total, free and PS activity levels, increased C4BP levels, and normal free TFPI levels.

#### 96. Increased numbers of microparticles and microparticle specific thrombin generation in patients with myeloproliferative disease

M.C. van AALDEREN<sup>1</sup>, M.C. TRAPPENBURG<sup>1</sup>, M. van SCHILFGAARDE<sup>2</sup>, P.J. MOLENAAR<sup>2</sup>, H. ten CATE<sup>3</sup>, A. LEYTE<sup>2</sup>, W.E. TERPSTRA<sup>1</sup>  
*Department of Internal Medicine<sup>1</sup>, Department of Hematology and Clinical Chemistry<sup>2</sup>, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam; Department of Internal Medicine and Cardiovascular Research Institute<sup>3</sup>, Maastricht University Medical Center, Maastricht, The Netherlands*

**Introduction:** Essential Thrombocythemia (ET) and Polycythemia Vera (PV) are both myeloproliferative neoplasms associated with an ill-understood high risk of thromboembolic events. In a previous study we showed elevated levels of platelet, endothelium and leukocyte related microparticles (MPs) in ET (1). Here we compared MP phenotypic profiles and MP-dependent thrombin generation of ET and PV patients to healthy controls to further explore the putative role of MPs in myeloproliferative thrombophilia.

**Methods:** In plasma samples from 18 ET patients, 24 PV patients and 20 controls, levels and cellular origin of MPs were determined by flowcytometric analysis and MP-dependent

thrombin generation by our adaptation of the Siemens ETP assay (2).

**Results:** ET patients had significantly higher numbers of platelet derived MPs (CD41+) than PV patients and controls (median: ET 9000, PV 5970, controls 4100x106/l; p<0.001). MPs expressing the endothelial marker CD62E were highly abundant in ET and moderately increased in PV compared with controls (median ET 2975, PV 324, controls 80x106/l; p<0.001 and p=0.02). Leukocyte derived (CD45+) MP numbers were small but elevated in all patients (median: ET 77, PV 112, controls 21x106/l; p<0.001; p<0.001) and correlated with leukocyte count (P<0.001). In line with their MP numbers, ET

patients had a higher MP-dependent endogenous thrombin potential (ETP) than controls (median ET 278, PV 212, controls 147 milliAbsorbance;  $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** ET and PV patients had elevated numbers of MP with phenotypic profiles reflecting different degrees of platelet, endothelium and leucocyte ancestry. MP specific thrombin

generation which was highest for ET patients appeared equally proportional to ET, PV and control MP numbers suggesting similar procoagulant properties.

**Literature:** 1. Trappenburg MC et al. Haematologica 2009 Jul; 94 (7): 911-8. 2. Van Aalderen MC et al. JTH 2010 Oct; e-pub.

## 97. De transferrine/log(ferritine) ratio: een nieuw hulpmiddel bij het diagnosticeren van ijzergebreksanemie. Vier jaar PAGAS

R. CASTEL, M.G.H.M. TAX, J. DROOGENDIJK, M.P.G. LEERS, R. BEUKERS, M.D. LEVIN, P. SONNEVELD, P.B. BERENDES

*Afdeling GKCL, Albert Schweitzer ziekenhuis, Dordrecht*

**Inleiding:** IJzergebrek is wereldwijd de vaakst voorkomende oorzaak van anemie. Ferritine is de meest geschikte laboratoriumtest voor het vaststellen van ijzergebrek. Ferritine  $< 15 \mu\text{g/l}$  is vrijwel bewijzend voor ijzergebrek, en ferritine  $> 100 \mu\text{g/l}$  sluit ijzergebrek uit. Echter, tussen de 15 en  $100 \mu\text{g/l}$  kan ijzergebrek niet worden uitgesloten. PAGAS (Project of Anemia analysis from the General practitioner to the Albert Schweitzer hospital) is in 2007 gestart met als doel: 1) Het verbeteren van de kwaliteit van zorg voor patiënten met anemie. 2) Een platform te zijn voor wetenschappelijk onderzoek naar anemie.

**Methode:** De PAGAS-populatie bestaat uit mannen (18 jaar en ouder) en vrouwen (50 jaar en ouder) met anemie (mannen: Hb  $< 8,5 \text{ mmol/l}$ ; vrouwen: Hb  $< 7,5 \text{ mmol/l}$ ), gepresenteerd door een bij PAGAS aangesloten huisarts. Bij al deze patiënten wordt aan de aanvraag een standaard combinatie laboratoriumtesten toegevoegd.

**Resultaat:** Van de 2977 patiënten hadden 428 patiënten (14%) ferritine  $< 15 \mu\text{g/l}$  (ijzergebrek), 1564 patiënten (53%) hadden

ferritine  $> 100 \mu\text{g/l}$  (ijzergebrek uitgesloten), en 985 patiënten (33%) hadden ferritine tussen de 15 en  $100 \mu\text{g/l}$  (mogelijk ijzergebrek). Wij laten zien dat met geen enkele van de klassieke en de moderne ijzerstatus parameters die wij testten, maar wel met de transferrine/log(ferritine) ratio, twee schijnbaar normaal verdeelde populaties kunnen worden onderscheiden: patiënten met een ratio  $\Delta .70$  (geen ijzergebrek), en patiënten met een ratio  $> 1.70$  (ijzergebrek).

**Conclusie:** De transferrine/log(ferritine) ratio kan in een anemische huisarts-patiënten populatie de patiënten met en zonder ijzergebrek onderscheiden. Omdat de transferrine/log(ferritine) ratio gebaseerd is op gestandaardiseerde laboratoriumtesten, kan het in de meeste laboratoria routinematig worden bepaald. Daarom geloven wij dat de transferrine/log(ferritine) ratio in potentie een wijdverbreid, praktisch hulpmiddel bij het diagnosticeren van ijzergebreksanemie is.

**Literatuur:** Clark SF. Curr Opin Gastroenterol. 2009 Mar; 25 (2): 122-8.

## 98. Mixed field agglutinatiereactie als trigger voor een spoedsectie bij foetomaternale transfusie

H.K. de WOLF, M. de METZ

*Laboratorium Klinische Chemie, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen*

**Inleiding:** Een mixed field agglutinatiereactie bij de bloedgroepbepaling wijst op de aanwezigheid van een tweede rode bloedcelpopulatie in het bloed van een patiënt. We presenteren een casus waarbij de mixed field uitslag van een hoogzwangere patiënt aanleiding was voor een spoedsectie.

**Methode:** Bij een 33-weeken primigravida met alarmsymptomen werd een Kleihauer Betke-test aangevraagd. In verband met diensttijd liet de uitslag hiervan nog vier uur op zich wachten. Ondertussen werd bij de bloedgroepbepaling van de patiënte een mixed field agglutinatiereactie op de anti-A-cel waargenomen. Mede op basis hiervan werd besloten tot een spoedsectie. Het kindje overleed enkele uren na de geboorte ten gevolge van een respiratory distress syndroom graad IV en perinatale asphyxie (Hb  $1,5 \text{ mmol/l}$ , pH 7,06, reticulocyten  $225 \times 10^9/l$ , normoblasten  $382/100$  leukocyten). Er werden 40 promille foetale cellen in het maternale bloed gezien, passend bij een massale foetomaternale transfusie (FMT) van ongeveer 230 ml.

**Resultaat:** De mixed field reactie bij de bloedgroepbepaling van een zwangere met een FMT kan enkel optreden als er sprake is van een incompatibiliteit tussen moeder en kind en een groot transfusievolume. Er is gekeken vanaf welk promillage dit in onze laboratoriumsetting wordt geobserveerd. Hier voor is OPOS bloed in oplopende concentraties met ANEG gemengd en ingezet op verschillende bloedgroep agglutinatiekolommen (BioVue/Bioclon, Ortho en DiaClon, Diamed). Promillages vanaf 60‰ (Diamed) en 80‰ (Ortho) werden als mixed field reacties waargenomen, overeenkomend met FMTs van 350 tot 460 ml.

**Conclusie:** Enkel een massale FMT zal in de bloedgroepbepaling als mixed field agglutinatiereacties aan het licht kunnen komen. Desalniettemin kan de aanwezigheid hiervan bij zwangere vrouwen aanleiding zijn voor een spoedsectie.

## 99. De anti-Xa bepaling: hoe te calibreren?

M.A.C. BROEREN, F. van der GRAAF

*Klinisch Chemisch Laboratorium, Máxima Medisch Centrum, Veldhoven*

**Inleiding:** De anti-Xa bepaling wordt in de klinische praktijk gebruikt voor het monitoren van de dosering van gefractioneerde heparine. In een artikel van het NTKC is beschreven dat het noodzakelijk is om voor de anti-Xa-activiteitsbepaling per type gefractioneerde heparine een aparte ijklijn te maken. Voor drie verschillende anti-Xa assays hebben wij onderzocht of dit noodzakelijk is door ijklijnen van verschillende commerciële calibratoren en gefractioneerde heparinepreparaten te vergelijken met een internationaal referentiepreparaat.

**Methode:** Drie verschillende anti-Xa assays (Hyphen Biomed

Anti-Xa assay (Chromogenix), Nodia anti-Xa assay en liquid heparin anti-Xa assay (IL)) zijn geïnstalleerd op de IL Advance stollingsanalyzer. Met deze assays zijn van drie verschillende commerciële calibranten (hepcal, liquid hepcal en organon calibrator), dalteparine (fragmin®), nandroparine (fraxiparine®), enoxaparine (clexane®), danaparoid (organon®) en een internationaal referentiepreparaat (NIBSC 01/608) calibratiecurves gemeten. Van elk van deze preparaten zijn 8 monsters gemaakt in een concentratie van 0-2 U/ml door te verdunnen met normaalplasma.

**Resultaat:** In elke assay zijn verschillen waarneembaar tussen het internationaal referentiepreparaat en de calibratoren of heparinereparaten. Deze verschillen variëren van 0,05 IU/ml tot 0,3 IU/ml.

**Conclusie:** Er kunnen significante verschillen bestaan tussen calibratiecurves van verschillende heparinetypen. Om variatie als gevolg van heparinetype te verkleinen lijkt het zinvol om

bij alle anti-Xa bepalingen gebruik te maken van de calibratiecurve van het internationaal referentiepreparaat, waarvan de exacte anti-Xa activiteit bekend is.

*Literatuur:* E.J. van den Dool, Y.M.C. Henskens en A.K. Stroobants, *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2008; 33: 244-246.

## Categorie 3 Klinisch

### Infectie, afweer, allergie

#### 100. Sensibilisatie voor ambrosiapollen: kruisreactie of co-sensibilisatie?

C.BEIJER<sup>1,2</sup>, M.J. VERTEGAAL<sup>1</sup>

*Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>1</sup>, Diaconessenhuis, Leiden; Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>2</sup>, Rijnland Ziekenhuis, Leiderdorp*

**Inleiding:** Ambrosia artemisiifolia (W1) is een niet-inheemse plant welke tegenwoordig ook in Nederland wordt waargenomen. Bijvoet (Artemisia vulgaris, W6) en ambrosia behoren tot de Compositen plantenfamilie, sensibilisatie voor pollen van beide planten lijkt sterk geassocieerd. Het doel van deze studie: 1. mate van sensibilisatie voor ambrosia in Nederland vaststellen; 2. identificeren van de individuele polleneiwitten specifiek voor de diagnose van sensibilisatie voor ambrosia en bijvoet; 3. onderzoeken of de sensibilisatie voor ambrosia een gevolg is van kruisreactie of co-sensibilisatie met bijvoet.

**Methode:** Monsters werden verzameld gedurende de periode 15 juli - 1 november 2007. Monsters die positief testen op specifiek IgE tegen inhalatieallergenen (AlaTop) op de Immulite 2000 werden getest op specifiek IgE tegen ambrosia. Vervolgens werden de ambrosia-positieve monsters getest op specifiek IgE tegen bijvoet. Het onderzoek op de aanwezigheid van

specifiek IgE tegen individuele polleneiwitten van beide planten werd uitgevoerd d.m.v. immunoblot-analyse.

**Resultaat:** 29 monsters (9,4%) testen positief voor ambrosia. Van deze monsters blijken 19 (76%) positief te testen voor bijvoet. Van 14 van de 25 ambrosia-positieve monsters kon er specifiek IgE aangetoond worden tegen individuele polleneiwitten. In 11 gevallen (79%) treedt er reactie op met Amb a1, het belangrijkste allergeen voor ambrosia. De 3 Amb a1 negatieve sera vertonen reactie met Amb a8 (profiline) en 2 van deze sera ook met Art v4 (profiline in bijvoet). Van de 14 positieve-ambrosia monsters reageren er 11 (79%) positief op de diverse polleneiwitten van bijvoet waarvan 8 met Art v1, het belangrijkste allergeen van bijvoet, en 3 met alleen Art v4.

**Conclusie:** Sensibilisatie voor ambrosia in Nederland is met name een gevolg van co-sensibilisatie met bijvoet en niet een gevolg van kruisreactie met profiline.

#### 101. Pharmacogenetic analysis of ABCB1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2D6 and CYP3A5 in relation to efavirenz and nevirapine plasma levels in HIV-infected individuals

S.G. HEIL<sup>1</sup>, M.E. van der ENDE<sup>2</sup>, P.W. SCHENK<sup>1</sup>, I. van der DER HEIDEN<sup>1</sup>, J. LINDEMANS<sup>1</sup>, D. BURGER<sup>3</sup>, R.H.N. van SCHAİK<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry (AKC)<sup>1</sup>, Department of Internal Medicine<sup>2</sup>, Erasmus MC University Medical Center Rotterdam; Department of Clinical Pharmacy<sup>3</sup>, Radboud University Medical Centre Nijmegen*

**Introduction:** HIV-infected individuals show large interindividual variation in response to antiretroviral therapy. Efavirenz (EFV) and nevirapine (NVP) are non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) which are frequently prescribed in combination with other antiretroviral therapy in the so-called highly active antiretroviral therapy (HAART). Recent studies provide strong evidence for a role of cytochrome P450 (CYP) genes, in particular CYP2B6, in relation to EFV and NPV pharmacokinetics. In this study, we investigated whether common ABCB1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2D6 and CYP3A5 alleles are associated with higher plasma levels of EFV and NVP in HIV-infected individuals.

**Methods:** Plasma drug levels were quantified by HPLC in 143 HIV-infected individuals receiving HAART containing either EFV or NPV. Genotyping for common alleles was performed by RFLP and Taqman assays. Individuals were genotyped

for 11 single-nucleotide polymorphisms (SNP) in 5 genes. CYP2B6 haplotypes were reconstructed by PHASE.

**Results:** Plasma EFV levels were positively associated with CYP2B6 c.516 G>T, c.785 A>G and c.983 A>G SNPs in HIV-infected individuals. Haplotype analysis demonstrated a strong association of CYP2B6\*6/\*6 or \*6/\*18 alleles with plasma EFV as well as NVP levels when compared to CYP2B6\*1/\*1 (increase of 62% [95% CI 44.0-80.1] in plasma EFV and increase of 24% [95% CI 7.0-40.0] in NVP levels). No significant association with other genes in relation to EFV or NVP levels was found.

**Conclusion:** Our study confirms the association of CYP2B6\*6 and CYP2B6\*18 alleles in relation to EFV plasma levels and provides novel evidence for a minor role of these alleles in relation to NVP pharmacokinetics in HIV-infected individuals.

## 102. Heeft indirecte immunofluorescentie screening in de diagnostiek van kleine vaten vasculitis een meerwaarde t.o.v. screening m.b.v. antigeen specifieke (EliA) antistoffen?

J.S. KAMPHUIS, W.B.M. GERRITSEN, J.D.E. van SUIJLEN

*Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium, Gelre ziekenhuizen, Apeldoorn en Zutphen*

*Inleiding:* Antineutrofiële cytoplasmatische antistoffen (ANCA) zijn aantoonbaar bij patiënten met vasculitis van de kleine bloedvaten, waarbij anti-PR3 en anti-MPO diagnostisch relevant zijn. De huidige richtlijn kleine vaten vasculitis schrijft primair een fluorescentie screening voor die bij een positieve uitslag gevolgd wordt door verdere antigeen specifieke uitypering. In een groep potentiële vasculitis patiënten is onderzocht of de fluorescentie screening een diagnostische meerwaarde heeft boven het direct uitvoeren van de antigeen specifieke antistof uitypering.

*Methode:* Binnen dit onderzoek zijn 408 patiënten monsters geanalyseerd met de volgende methoden: Sanquin indirecte immunofluorescentie screening (kwalitatief) en antigeen specifieke antistoffen (ELISA; titer, kwantitatief). Phadia (Gelre zkh) antigeen specifieke antistoffen (EliA bepaling; referentiewaarde: <1 U/ml).

*Resultaat:* Bij 377 van de 408 monsters werden dezelfde resultaten gevonden m.b.v. Sanquin en Phadia (310 neg / 40 c-ANCA pos / 27 p-ANCA pos). Discrepancies zijn waargenomen bij 31 monsters. Een patiënt had een pos resultaat bij Sanquin (p-ANCA) en een neg Phadia resultaat, waarbij een lage titer aantoonbaar was zonder klinische 'vasculitis'-klachten bij de patiënt. Dertig monsters toonden een neg Sanquin resultaat en een pos Phadia resultaat, waarbij 27 monsters <10 U/ml en 3 monsters >10 U/ml scoorden. De laatste 3 patiënten vertoonden klinisch een M. Wegener beeld.

*Conclusie:* Gebruik van de indirecte immunofluorescentie screening heeft in onze studie geen meerwaarde in de diagnostiek van kleine vaten vasculitis.

## 103. CD64 index: a new marker to identify septic patients?

J.H. GERRITS<sup>1</sup>, B. SMIT<sup>1</sup>, A.N. NIENHUIS<sup>1</sup>, J.W. SMIT<sup>1</sup>, B. LOEF<sup>2</sup>

*Clinical Chemistry Laboratory<sup>1</sup>, LabNoord, Groningen; Intensive Care Unit<sup>2</sup>, Martini Hospital, Groningen, The Netherlands*

*Introduction:* Rapid diagnosis and management of bacterial infection are based on clinical assessment and on laboratory results. Surface neutrophil CD64 expression is upregulated in patients with bacterial infection. Laboratory assays are not specific for sepsis, for example C-reactive protein (CRP) and white blood cell (WBC) count. However, it has been suggested that the CD64 index can be used to detect sepsis in hospitalized patients. In a pilot study, we questioned whether CD64 index could identify septic patients, and wondered whether the CD64 index was an improved diagnostic compared to standard assays used at the laboratory. Healthy individuals from the outpatient clinic were used as controls.

*Methods:* Leuko64 assay was used to determine the CD64 index in residual EDTA blood samples from intensive care patients (n=20) and individuals (n=22) from the outpatient clinic. Additionally, WBC count, neutrophil count, ESR and CRP

were measured simultaneously. Healthy individuals were age and gender matched with the patient group (p>0.05).

*Results:* None of the healthy individuals had bacterial infection during the study period. All intensive care patients had sepsis with a median APACHE score of 24 (range: 16-39). The CD64 index was higher in septic patients compared to control group (p<0.0001). WBC count, neutrophil count, ESR and CRP were also higher in septic patients than the healthy control group (p<0.0001). In these patients the CD64 index correlated with CRP (r=0.73; p<0.001). No correlation was found between CD64 index and WBC count, neutrophil count and ESR.

*Conclusion:* In conclusion, high CD64 index was found in septic intensive care patients, suggesting that CD64 index identifies septic patients and might be used as a new diagnostic marker for septic patients.

## 104. Urine flowcytometrie als primaire screening voor het uitsluiten van urineweginfecties

K.J.M. BOONEN, E.L. KOLDEWIJN, V. SCHARNHORST

*Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina Ziekenhuis Eindhoven, Eindhoven*

*Inleiding:* Het kweken van pathogene organismen uit urinemonsters is een tijdrovende en kostbare aangelegenheid. Bovendien is 70-80% van de kweken negatief en is een groot deel slechts bedoeld ter uitsluiting van urineweginfecties voorafgaand aan invasieve ingrepen. Met behulp van een urine flowcytometer kunnen bacteriën in urine betrouwbaar worden geteld. Het doel van deze studie was het bepalen van een afkapgrens voor het aantal bacteriën met behulp van urine flowcytometrie ten behoeve van het uitsluiten van urineweginfecties.

*Methode:* Gedurende een periode van 3 maanden werden urines waarbij een kweek werd uitgevoerd geïncubeerd in de studie. Na de screening werd het monster gemeten op de urine flowcytometer (UF500i) om het aantal bacteriën te bepalen. Achteraf werden de resultaten van de bacteriekweek (aantal colony forming units, CFU/ml) vergeleken met de uitslag van de UF500i en werd een afkapgrens bepaald waarbij geen kwe-

ken met meer dan 10<sup>4</sup> CFU/ml (mogelijke urineweginfecties, afhankelijk van het geïdentificeerde organisme) zouden worden gemist.

*Resultaat:* Tot nu toe zijn 270 urines geanalyseerd op de UF500i en vergeleken met de uitslag van de bacteriekweek. Bij een afkapwaarde van 65 bacteriën/microliter urine voor het wel of niet kweken van de urine zou geen enkele kweek met een uitslag groter dan 10<sup>4</sup> CFU/ml zijn gemist. Bovendien zouden op deze manier 132 negatieve kweken zijn bespaard.

*Conclusie:* Urine flowcytometrie is een aantrekkelijke screeningsmethode voor het uitsluiten van urineweginfecties. Met een relatief lage afkapgrens van 65 bacteriën/microliter urine voor het uitsluiten van urineweginfecties zou het aantal kweken bijna gehalveerd kunnen worden en zouden er geen kweken met een uitslag groter dan 10<sup>4</sup> CFU/ml worden gemist.

## 105. Optimalisatie van de allergie-voedsel screening door uitbreiding met FX77 en het testen met allergeen-componenten voor de risico-inschatting op een ernstige klinische reactie

G.W.A. LANSBERGEN<sup>1,2</sup>, G.J. van der VEGTE<sup>2</sup>, H. LOOTS<sup>1</sup>, P.J.M.J. KOK<sup>2</sup>, J.J.H. HENS<sup>1,2</sup>

Resultaat Verantwoordelijke Eenheid Laboratoria<sup>1</sup>, Zuwe Hofpoort Ziekenhuis, Woerden; Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>2</sup>, Groene Hart Ziekenhuis, Gouda

*Inleiding:* Laboratoriumdiagnostiek naar voedselallergie bestaat uit een vast voedselpanel FX5 (Phadia) waarmee wordt gescreend op specifiek IgE tegen pinda, koemelk-eiwit, kippen-eiwit, tarwe, soja en vis. Voor kinderen <4 jaar wordt gebruik gemaakt van een gecombineerd inhalatie- en voedselpanel (Phadiatop-Infant) met daarin de voedselallergenen pinda, koemelk-, en kippen-eiwit. Beide screeningspanels kunnen worden uitgebreid met voedselpanel FX77 (hazelnoot, cashewnoot, sesamzaad, kiwi, tomaat) en daarmee aangepast aan de Nederlandse situatie. Wij onderzochten de bijdrage van FX77 als uitbreiding op beide screeningspanels. Door bij sensibilisatie voor pinda, kippen-eiwit en hazelnoot vervolgdagnostiek in te zetten naar de klinisch relevante allergeen-componenten/epitopen kan een risico-inschatting gemaakt worden naar de klinische ernst van de allergische reactie.

*Methode:* Bij 324 patiënten (125 kinderen <18 jaar) is FX77 bepaald naast de FX5, Phadiatop-Infant en eventueel Phadiatop-inhalatiescreening, waarbij positief geteste sera zijn uitgesplitst in de losse allergeen. Tevens zijn allergeen-componenten be-

paald van 48 patiënten met sensibilisatie voor pinda, kippen-eiwit en/of hazelnoot.

*Resultaat:* Van alle 324 FX77 screenings waren er 70 (22%) positief, waarvan 41 met een negatieve FX5 screening. Een positieve FX77 ging altijd gepaard met een positieve Phadiatop-Infant, en de gecombineerde Phadiatop-inhalatiescreening was in 70% van de gevallen positief. Uitsplitsing van positief geteste FX77-panels resulteerde in: 77% hazelnoot, 14% cashewnoot, 41% sesamzaad, 43% kiwi, 39% tomaat. Vervolgonderzoek met allergeen-componenten bij pinda-sensibilisatie resulteerde bij 26% in een hoog risico-inschatting op een ernstige klinische reactie. Voor hazelnoot sensibilisatie 20%, en kippen-eiwit 44%.

*Conclusie:* De uitbreiding van voedselallergiediagnostiek met het voedselpanel FX77 heeft een duidelijke meerwaarde gezien de extra gevonden sensibilisaties. Vervolgonderzoek naar de aanwezigheid van IgE-antistoffen gericht tegen klinisch relevante allergeen-componenten lijkt een zinvolle bijdrage bij de risico-inschatting op een ernstige klinische allergiereactie.

## 106. Hazelnoot kan kabeljauw in de screening voor voedselallergie vervangen

H.J. VERMEER, F.M. VERHEIJEN, M.A. FOURAUX

Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium (GKCL), Albert Schweitzer Ziekenhuis Dordrecht & Beatrix Ziekenhuis Gorinchem

*Inleiding:* Het verrichten van allergie screenings met behulp van bloedonderzoek neemt een belangrijke plaats in bij het onderzoek naar voedselallergie. De screening naar de sensibilisatie tegen voedselcomponenten wordt binnen het GKCL uitgevoerd met behulp van een voedselpanel en de Immulite 2500 (Siemens Health Care Diagnostics). Het panel detecteert IgE-antistoffen tegen eiwit, koemelk-, kabeljauw-, tarwe-, pinda- en soja-allergenen in serum. Deze poster beschrijft de proef om de mogelijke meerwaarde van het testen op sensibilisatie tegen hazelnoot en cashew vast te stellen in een algemene ziekenhuis- en huisartsenpopulatie.

*Methode:* Gedurende 9 maanden is bij elke aanvraag voor een voedsel screening standaard een hazelnoot- en een cashewtest toegevoegd. Hierna zijn alle data geanalyseerd en zijn de diverse allergenen gescoord voor een positieve uitslag (>0,35 kE/L). Een positief voedselpanel is uitgesplitst naar de individuele componenten.

*Resultaat:* Tijdens de proef zijn er 1716 voedsel screenings

inclusief de hazelnoot en cashew aangevraagd. De populatie bestond uit gelijke percentages huisartsen- en ziekenhuispatiënten. In 183 monsters (11% van totaal) werd een positieve voedselpanelscreening gevonden. De screening van hazelnoot was in 186 monsters (11%) positief, de screening van cashew in 83 monsters (5%). In 90 monsters met een negatieve voedselpanelscreening werd een positieve hazelnootuitslag gevonden. Voor cashew gold dit in mindere mate: deze was positief bij 20 negatieve voedselpanelmonsters. Voor de hele populatie zijn de percentages positieve testen: eiwit (6%), pinda (6%), koemelk (3%), soja (3%), tarwe (3%) en kabeljauw (1%).

*Conclusie:* Alhoewel in deze proef geen klinische allergieën zijn vastgesteld, is duidelijk dat de sensibilisatie tegen hazelnoot boven de rest van de voedselallergenen uitsteekt (11% vs 6% pinda/eiwit). Ook de sensibilisatie tegen cashew komt frequent voor. Hazelnoot zou kabeljauw (1% positief) in het voedselpanel kunnen vervangen.

### Categorie 3 Klinisch

#### Lever- en darmpathologie

## 107. Lactase genotypering verbetert diagnostiek naar lactose-intolerantie

A. KOEKEN<sup>1</sup>, B.C.M. HABERKORN<sup>2</sup>, E. de BAAR<sup>1</sup>, L. SCHRAUWEN<sup>1</sup>, C. van GULDENER<sup>2</sup>, C.M. COBBAERT<sup>3</sup>, A.A.M. ERMENS<sup>1</sup>

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium<sup>1</sup>, Afdeling Interne geneeskunde<sup>2</sup>, Amphia Ziekenhuis, Breda; Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>3</sup>, LUMC, Leiden

*Inleiding:* Lactase non-persistentie wordt veroorzaakt door veranderingen in de genetische expressie van lactase en resulteert in gastrointestinale klachten na ingestie van melkproducten. Op dit moment wordt lactase non-persistentie onderzocht door middel van een lactose ademtest. Lactase non-persistentie kan ook worden vastgesteld door een genotypering te verrichten van het LCT gen. Wij onderzochten de accurate van een recent ontworpen algoritme met lactase genotypering als eerste screening in een patiëntenpopulatie met onbegrepen buikklachten.

*Methode:* Bij 124 patiënten die naar de polikliniek interne geneeskunde waren verwezen met onbegrepen buikklachten of met primaire verdenking op lactase non-persistentie werd een lactase genotypering verricht. Patiënten met een CC genotype (verlies van lactase expressie) werden direct verwezen naar een diëtiste voor een lactose-vrij dieet. Patiënten met een CT of TT genotype (resp. partieel en volledige behoud van lactase expressie) ondergingen een lactose ademtest. Degene met een positieve ademtest werden ook verwezen naar een diëtist voor een lactose-vrij dieet.

**Resultaat:** Prevalentie van de genotypes: CC 43 (34,1%); CT 48 (38,1%); TT 33 (26,2%); TG 2 (1,6%). 11/48 patiënten met CT-genotype en 1/33 patiënten met TT-genotype hadden een positieve lactose ademtest met klachten. Bij allen namen de klachten af na een lactose-vrij dieet. 4/43 patiënten met CC-genotype bleven buikklachten houden na een lactose-vrij dieet.

**Conclusie:** Onze resultaten tonen dat dit nieuwe algoritme goed toepasbaar is op een patiëntenpopulatie met onbegrepen buikklachten. Wij stellen voor om bij patiënten met verdenking op lactase non-persistentie allereerst een lactase genotypering te verrichten. Door gebruikt te maken van dit algoritme, hoeft meer dan 50% van de patiënten geen lactose ademtest meer te ondergaan.

### Categorie 3 Klinisch

#### Nierziekten

#### 108. Troponin I as a cardiac biomarker for cardiovascular mortality in patients on haemodialysis

M. VAN BERKEL<sup>2</sup>, S. VOGELS<sup>1</sup>, D. GEERSE<sup>1</sup>, C.J.A.M. KONINGS<sup>1</sup>, V. SCHARNHORST<sup>2</sup>  
*Internal Medicine<sup>1</sup> and Clinical Laboratory<sup>2</sup>, Catharina Hospital, Eindhoven, The Netherlands*

**Introduction:** To investigate the relation between cTnI, using a second generation, sensitive troponin assay and cardiovascular mortality in asymptomatic chronic haemodialysis patients. To evaluate the cardiovascular mortality in patients with only minimally (i.e. 0.05-0.10 µg/l), but persistently elevated cTnI levels. The high prevalence of cardiovascular mortality in patients on chronic haemodialysis is well established. Cardiac biomarkers like B-type natriuretic peptide and cardiac troponin T are correlated with cardiovascular mortality, but this relationship is much less clear for cardiac troponin I (cTnI).  
**Methods:** Prospective, observational, single centre study 206 chronic haemodialysis patients (> 6 months). Mean age: 65 ± 14.1 yrs. Stratification in 4 subgroups according to mean cTnI. cTnI measurement every 3 months for 24 months. cTnI-ultra assay on an Advia Centaur analyzer (Siemens Diagnostics) Cardiovascular morbidity and mortality assessed over period of 30 months.

**Results:** In total 49 patients died (23,8%), 31 due to a cardio-vascular cause (63,3%). There is a significant correlation between the cTnI concentration and cardiovascular mortality (p=0.005). After adjustment for age, sex, length of time on dialysis and associated morbidity such as diabetes, coronary haert disease and peripheral vascular disease, cTnI remained an independent risk factor for cardiovascular mortality. Asymptomatic patients with only mildly, but persistently elevated cTnI concentrations have a significantly higher risk for (cardiovascular) mortality.  
**Conclusion:** cTnI levels identify haemodialysis patients who have poor survival and higher risk of cardiovascular events and mortality. Patients with only minimally elevated cTnI levels (i.e. 0.05 - 0.10 µg/l; 99th percentile 0,05µg/l) have significantly higher risk for cardiovascular events and (cardiovascular) mortality. cTnI can be used as prognostic biomarker for (cardiovascular) mortality in chronic hemodialysis patients.

#### 109. Het IMPDH I genotype is geassocieerd met acute afstoting in niertransplantatie-patiënten onder MMF therapie

R.H.N. VAN SCHAIK, O. GENSBURGER, N. PICARD, Y. LE MEURE, A. ROUSSEAU, J.B. WOILLARD, T. van GELDER, P. MARQUET  
*INSERM, UMR-S<sup>850</sup>, Univ Limoges, Laboratory of Medical Pharmacology, CHU Limoges, Department of Pharmacology-Toxicology, Univ Limoges, Laboratory of Biophysics, Limoges, France, CHU Brest, Hopital de la Cavale Blanche, Service de Nephrologie, Brest, France, Department of Clinical Chemistry, and Departments of Hospital Pharmacy and Internal Medicine, Erasmus University Medical Centre, Rotterdam, The Netherlands*

**Inleiding:** Het bij orgaantransplantatie veelgebruikte immunosuppressivum mycopenolzuur (MMF) heeft als target het type II inosine monofosfaat dehydrogenase (IMPDH II), terwijl mogelijk ook het IMPDH I door MPA wordt beïnvloed. Het doel van deze studie was te onderzoeken of genetische polymorfismen in het IMPDH I en IMPDH II gen correleren met klinische uitkomsten bij niertransplantatiepatiënten  
**Methode:** De klinische gegevens van 456 patiënten uit twee studies werden verzameld. Bij 80 patiënten werd het IMPDH II-gen volledig gesequenced terwijl van 456 patiënten het DNA werd onderzocht op IMPDH II polymorfismen rs4974081A>G, rs11706052 T>C, 787C> T en de IMPDH I SNPs rs2278293 G>A en rs2278294 G>A. Deze SNPs waren eerder geassocieerd met effectiviteit van MMF therapie. Uitkomstmaten voor deze studie waren biopsie-bewezen acute afstoting (BPAR), leukopenie en het optreden van cytomegalovirus infecties  
**Resultaat:** Veel IMPDH II variant allelen in GenBank werden

niet gedetecteerd in onze populatie. Er werden echter ook geen nieuwe IMPDH II polymorfismen geïdentificeerd. In de totale groep van 456 patiënten bleek alleen dragerschap van de IMPDH I rs2278294 G>A SNP (41% wild typen, 46% heterozygoten, 13% homozygoot variant) significant geassocieerd met een lager risico op BPAR (OR 0,54 [95% CI 0,34-0,85], p=0,008), en met een hoger risico op leukopenie (OR 1,66 [95% CI 1,11-2,48], p=0,014). Naast IMPDH I rs2278294 bleek de blootstelling aan MPA (AUC1-12) (OR 2,2 [95% CI 1,2-4,1], p=0,011) en subtherapeutische calcineurine bloedspiegels (OR 2,3 [95% CI 1,3-4,1], p=0,006) significante factoren voor het voorspellen van BPAR.

**Conclusie:** IMPDH II genotypering kan niet bijdragen aan het voorspellen van BPAR onder MPA behandeling bij niertransplantatie. De IMPDH I SNP rs2278294 G>A is echter wel geassocieerd met BPAR, en dus mogelijk klinisch relevant.

#### 110. Questioning the plausibility of LDH as a specific marker of renal tissue injury

B. PULINX<sup>1</sup>, M.G.J. SNOEIJES<sup>2</sup>, W.A. BUURMAN<sup>2</sup>, L.W.E. van HEURN<sup>2</sup>, M.P. van DIEIJEN-VISSER<sup>1</sup>, W.K.W.H. WODZIG<sup>1</sup>  
*Departments of Clinical Chemistry, General Surgery<sup>2</sup>, Maastricht University Medical Center, Maastricht, The Netherlands*

**Introduction:** Non-heart beating (NHB) donors are a valuable source for kidney transplantation. The organs, however, sustain substantial warm ischemic damage that may jeopardize transplant outcome. Organ viability can be assessed by perfu-

sion characteristics of kidneys preserved by machine pulsatile perfusion and measurement of tissue injury markers in the preservation solution, such as lactate dehydrogenase (LDH) and glutathione S-transferase (GST)

**Methods:** After one hour perfusion, a sample of preservation solution was taken and centrifuged at 900g at 4°C for 10min. Total GST activity was measured as described previously (1). LDH concentrations were measured on the LX-20 (Beckman Coulter) in perfusate from six uncontrolled and six controlled NHB kidneys. Tandem mass spectrometry was used to identify perfusate proteins present on a 2D-gel.

**Results:** LDH concentration ( $339 \pm 20$  U/L/100g vs  $193 \pm 45$  U/L/100g;  $p=0.021$ ) and total GST activity ( $48 \pm 9$  U/L/100g vs  $19 \pm 4$  U/L/100g;  $p=0.015$ ) are significantly higher in preservation solution from uncontrolled compared to controlled NHB kidneys. Furthermore, identification of perfusate proteins on a 2D-gel revealed that almost 70% were blood-borne (e.g. albumin, transferrin and haptoglobin).

**Conclusion:** Uncontrolled NHB donors experience a longer period of warm ischemia, leading to prolonged coagulation in these kidneys compared to controlled NHB donors. After the initial cold flush, a substantial amount of blood still remains trapped in the renal microvasculature as reflected by the presence of blood-borne proteins in the perfusate. In contrast to GST, LDH seems not specific for renal tissue injury, since damaged erythrocytes will also release LDH. However, LDH remains useful as an indicator of organ viability reflecting tissue injury as well as coagulation in the microvasculature.

**Literature:** (1) Van Kreel et al. *Transpl Int* 2002; 15: 546

## Categorie 3 Klinisch

### Gynaecologie/obstetrie

#### 111. Serum tryptophan and kynurenine concentrations as parameters for indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with endometrial, ovarian and vulvar cancer

R.A. de JONG<sup>1</sup>, H.W. NIJMAN<sup>1</sup>, H.M. BOEZEN<sup>2</sup>, M. VOLMER<sup>3</sup>, K.A. ten HOOR<sup>1</sup>, A.G.J. van der ZEE<sup>1</sup>, H. HOLLEMA<sup>4</sup>, W.H.A. de JONG<sup>3</sup>, I.P. KEMA<sup>3</sup>

*Department of Gynecologic Oncology<sup>1</sup>, Department of Epidemiology<sup>2</sup>, Department of Laboratory Medicine<sup>3</sup>, Department of Pathology<sup>4</sup>, University Medical Center Groningen, University of Groningen, The Netherlands*

**Introduction:** Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) suppresses the function of T-lymphocytes and is involved in immune escape of cancers. IDO catalyses the initial rate-limiting step in the degradation of the essential amino-acid tryptophan. In this study, we investigated cancer-induced IDO activity in sera of endometrial, ovarian and vulvar cancer patients.

**Methods:** Concentrations of tryptophan and kynurenine were determined in pretreatment serum samples of patients with endometrial (n=41), ovarian (n=28) and vulvar cancer (n=40) and compared to 19 age-matched controls. In serum of a subgroup of endometrial (n=22), ovarian (n=21) and vulvar (n=21) cancer patients, tryptophan, kynurenine and the kyn/trp ratio were determined at different time points: preoperative, at clinical remission and at time of diagnosis of recurrent disease. Analyses were performed by an automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatographic-tandem mass spectrometric

(XLC-MS/MS) method. IDO activity was estimated by calculating the kynurenine-to-tryptophan ratio (kyn/trp).

**Results:** Kynurenine concentrations ( $\mu\text{mol/L}$ ) and the kyn/trp ratio ( $\mu\text{mol/mmol}$ ) were higher in preoperative serum of endometrial, ovarian and vulvar cancer patients compared to controls (all:  $p<0.001$ ). Preoperative serum of ovarian cancer patients contained higher kynurenine concentrations (median: 2.53; IQR: 1.72-4.29) and a higher kyn/trp ratio (median: 39.3; IQR: 26.5-61.7) compared to serum collected at clinical remission (median: 2.02; IQR: 1.68-2.72,  $p=0.035$ ) and (median: 29.9; IQR: 23.4-38.9,  $p=0.005$ ), respectively.

**Conclusion:** Patients with endometrial, ovarian and vulvar cancer have increased tryptophan degradation compared to controls resulting in higher serum kynurenine concentrations and a higher kyn/trp ratio. Our results suggest that IDO-induced immune escape may play an important role in these gynecological cancers.

#### 112. Fetal scalp blood sampling, how to recognize an unreliable test result? A descriptive study of 633 samples

K.A. MOORMANN<sup>1</sup>, K.M.K. de VOOHT<sup>2</sup>, J.H. BECKER<sup>1</sup>, W.W. van SOLINGE<sup>2</sup>, M.E.M.H. WESTERHUIS<sup>1</sup>, A.C. BOLTE<sup>3</sup>, G.H.A. VISSER<sup>3</sup>, A. KWEE<sup>1</sup>

*Department of Obstetrics and Gynaecology<sup>1</sup>, Department of Clinical Chemistry and Haematology<sup>2</sup>, University Medical Center Utrecht; Department of Obstetrics and Gynaecology<sup>3</sup>, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands*

**Introduction:** Fetal scalp blood sampling (FBS) in labour aims to detect fetal acidosis. Since it is often used as the reference test in clinical decision making, it is of utmost importance that results are reliable. However, no studies have been presented on the validation of FBS yet. The aim of our study is to determine the number of unreliable FBS test results by evaluating pCO<sub>2</sub> in relation to pH.

**Methods:** Data were used from two previous studies and one cohort. Singleton fetuses in vertex position of labouring women at a gestational age of 36 weeks and more in which a FBS was taken were included. Blood gas analysis was performed using the iSTAT1 analyser. Blood gas results were validated using arterial umbilical cord blood pH corrected pCO<sub>2</sub> percentiles, as recently published by others. In addition, discrepancies between FBS and arterial umbilical blood gas results were investigated.

**Results:** 633 FBS results of 477 term fetuses were obtained. Median values for FBS pH and pCO<sub>2</sub> were 7.32 and 5.85 kPa respectively. One out of seven FBS pCO<sub>2</sub> results was outside the normal limits when using arterial cord blood reference ranges. After validation of the umbilical cord blood test results, putative discrepancies between arterial umbilical cord blood and FBS blood gas results were found in 6% of the patients.

**Conclusion:** According to arterial umbilical cord pH corrected pCO<sub>2</sub> limits, 14% of the FBS test results could be invalid. Putative discrepancies between FBS and arterial umbilical cord blood gas analysis were detected in 6% of the patients. Like in umbilical cord blood samples, pCO<sub>2</sub> could be a promising parameter to recognize erroneous FBS results.

### 113. Maternal and infant docosahexaenoic acid (DHA) equilibrium during pregnancy and lactation

R.S. KUIPERS, M.F. LUXWOLDA, W.S. SANGO, G. KWESIGABO, A. SCHAAFSMA, D.A. J. DIJCK-BROUWER, F.A.J. MUSKIET

*Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen (UMCG), The Netherlands*

**Introduction:** Low-fish consumption is related to suboptimal neurodevelopment, coronary artery disease and (postpartum) depression. The courses of maternal long chain polyunsaturated fatty acids (LCP) in pregnancy and lactation in Western countries, and the higher LCP in infant serum lipids at birth compared with maternal lipids (biomagnification), suggest maternal depletion.

**Methods:** Erythrocyte (RBC) and milk FA were determined in Tanzanian mother-infant pairs with low, intermediate and high fish-consumption. RBC were collected at delivery and after 3 months exclusive breastfeeding. Milk was collected at 3 months postpartum. We also used historical data from The Netherlands.

**Results:** At 3 months PP, there were no correlations for: maternal RBC-AA vs. breastmilk AA, breastmilk AA vs. infant RBC-AA or maternal RBC-AA vs. infant RBC-AA and positive correlations for: maternal RBC-DHA vs. breastmilk

DHA, breastmilk DHA vs. infant RBC-DHA and maternal RBC-DHA vs. infant RBC DHA. Maternal RBC-DHA at 3 months was lower than the corresponding infant RBC-DHA up to a maternal RBC-DHA of 7.88 g%. A maternal RBC-DHA at delivery of 8.07 g% corresponded with an equal maternal RBC-DHA at 3 months. This maternal RBC-DHA equilibrium corresponded with an infant RBC-DHA of 7.21 g% at delivery, an infant RBC-DHA of 7.88 g% at 3 months and milk DHA of 1.03 g% at 3 months.

**Conclusion:** Maternal and infant AA statuses seem independently regulated in these populations. At steady state intakes, the mother seems to lose DHA during lactation, when her RBC-DHA is below about 8 g% ('infant DHA biomagnification via breastmilk'). This maternal equilibrium corresponds with an infant RBC-DHA of about 7 g% at delivery and 8 g% at 3 months and a mature milk DHA of about 1 g%.

### 114. Intrauterine bio-attenuation and infant postnatal docosahexaenoic acid equilibrium in a population with lifetime high fish intake

M.F. LUXWOLDA, R.S. KUIPERS, W.S. SANGO, G. KWESIGABO, D.A.J. DIJCK-BROUWER, F.A.J. MUSKIET

*Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen (UMCG), The Netherlands*

**Introduction:** The long-chain polyunsaturated fatty acids (LCP) docosahexaenoic (DHA) and arachidonic (AA) acids are important for growth and development. We studied maternal and infant DHA and AA status throughout pregnancy until 3 months postpartum in 3 Tanzanian tribes with different lifetime fish intakes: Maasai (low), Pare (intermediate) and Sengerema (high).

**Methods:** Red blood cell (RBC) DHA and AA (g%) were determined in mothers throughout pregnancy (n=209), mother-infant pairs at delivery (n=63) and in mother-infant pairs after 3 months exclusive breastfeeding (n=104).

**Results:** Maternal RBC-AA was lowest in Sengerema and highest in Maasai. At delivery, infant RBC-AA was remarkably uniform, higher than maternal RBC-AA and independent of maternal AA and DHA status. DHA of mothers and infants were dependent on maternal fish intake. DHA transplacental

'biomagnification' occurred at maternal RBC-DHA up to about 5.6 g%. Higher maternal RBC-DHA was associated with 'bio-attenuation'. During lactation, maternal RBC-AA increased and infant RBC-AA decreased. Maternal RBC-DHA decreased; infant RBC-DHA decreased in Maasai and Pare, but increased in Sengerema infants. Postpartum infant DHA equilibrium was reached at an RBC-DHA of 5.9 g%, which corresponded with a maternal RBC-DHA of 6.1 g% at delivery and in early pregnancy.

**Conclusion:** In these tribes, infant AA status at delivery is independent of maternal AA and DHA status. Intrauterine DHA 'biomagnification' is a sign of low DHA status. DHA 'bio-attenuation' may aim at preventing intrauterine competition of DHA with AA. Infant postnatal DHA equilibrium is reached at an infant and maternal RBC-DHA of about 6 g%.

### 115. The relation between DHA+EPA and AA is synergistic at low DHA status and antagonistic at high DHA status

M.F. LUXWOLDA, R.S. KUIPERS, W.S. SANGO, G. KWESIGABO, D.A.J. DIJCK-BROUWER, F.A.J. MUSKIET

*Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen (UMCG), The Netherlands*

**Introduction:** Docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA) and arachidonic acid (AA) are important across the entire life cycle. Current data on the relation between DHA+EPA and AA are inconsistent. They are derived mostly from Western populations with low-moderate fish intakes. Little is known on populations with very low or very high fish intakes.

**Methods:** We determined erythrocyte (RBC) DHA+EPA and AA in male and non-pregnant female adults, pregnant women, women at delivery and 3-5 months postpartum, and infants from delivery until 3.5 years (n=1,982). We also determined DHA+EPA and AA in arterial (n=785) and venous (n=785) umbilical vessel walls. Populations were from The Netherlands, Curaçao, Tanzania, Israel and Pakistan. In Tanzania we included populations with very high fish intakes. We also included populations with very low fish intakes from Pakistan and Tanzania.

**Results:** In each of the investigated compartments the relation between DHA and AA proved bell-shaped. This became supported by positive linear relationships in populations with low DHA status, and negative linear relationships in populations with high DHA status.

**Conclusion:** The present data suggest that at high DHA+EPA and AA intakes, there is antagonism between DHA+EPA and AA, resulting in AA suppression. The synergism between DHA+EPA and AA at low DHA+EPA intakes suggests that AA will be adjusted to lower values. Our results underscore the regulation of the AA status by the concurrent DHA status. The AA status is for instance suppressed at an RBC-DHA status of 8 g%, which might be the optimum for cardiovascular disease prevention. Current data are in line with the notion that our genus evolved in a water-land ecosystem with ample availability of both DHA+EPA and AA.



## 116. A case of a young woman with haemolytic anaemia

W.M. TIEL GROENESTEGER<sup>1</sup>, J.J. van BEEK<sup>2</sup>, A.D. KOSTER<sup>3</sup>, M.J.W. JANSSEN<sup>1</sup>

Laboratory of Clinical Chemistry and Haematology<sup>1</sup>, Department of Gynaecology and Obstetrics<sup>2</sup>, Department of Internal Medicine<sup>3</sup>, VieCuri Medical Centre, Venlo, The Netherlands

**Introduction:** A 34-year old woman was referred to the hospital by her general practitioner because of haemolytic anaemia and, since two weeks, complaints of fatigue, mild abdominal pain and irregular vaginal blood loss. Three weeks earlier she suffered from pharyngitis wherefore antibiotic therapy.

**Methods:** Common laboratory and imaging tests were used. Methaemalbumin was measured spectrophotometrically.

**Results:** On admission blood analysis showed increased CRP, ESR, LD levels and an increased reticulocyte count. In addition haemoglobin concentration was decreased and haptoglobin was undetectable. The direct Coombs test was negative and erythrocyte morphology was normal. Remarkably, her serum was darkly brown coloured (cola), and turned out to be caused

by the presence of methaemalbumin. The next days haemoglobin and LD levels normalised and therefore first diagnosis was transient haemolytic anaemia following infection. In addition, the patient was referred to the gynaecologist because of a positive home pregnancy test. Blood hCG was 89 U/L. Surprisingly, ultrasonography showed an extrauterine gravidity (EUG) in the right fallopian tube and a fluid collection intraperitoneally. Salpingectomy revealed an EUG imbedded in old blood. Laboratory findings normalised two weeks after.

**Conclusion:** The possibility of an atypical haemorrhagic EUG should be considered when a fertile woman presents with Coombs negative haemolytic anaemia. Detection of methaemalbumin can be a supporting laboratory finding.

Categorie 3 Klinisch

Neurologie, psychiatrie, KNO en oogheelkunde

## 117. Pilotstudie naar de detectie van myeline lipide-specifieke antistoffen in liquor van Multiple Sclerosis (MS) patiënten

M.H.J. VOGT<sup>1</sup>, R.J. DRENT<sup>1</sup>, J. ten KATE<sup>1</sup>, R. HUPPERTS<sup>2</sup>

Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium<sup>1</sup>, Afdeling Neurologie<sup>2</sup>, Orbis Medisch Centrum, Sittard

**Inleiding:** In de diagnostiek van Multiple Sclerosis spelen de detectie van oligoclonale banden en de IgG index een beperkte rol. Dit komt met name door de lage specificiteit en sensitiviteit van beide bepalingen. Recent onderzoek suggereert dat antilichamen in liquor van MS patiënten specifiek zijn voor in myeline aanwezige lipides. In deze studie is een methode opgezet om de myeline lipide-specifieke antilichamen in liquor aan te tonen met als doel een bepaling te ontwikkelen met een hogere specificiteit voor MS.

**Methode:** Eerst werden polystyrene beads (3,0 µm) gecoat met verschillende myeline lipides, namelijk fosfatidylcholine (PC), sphingomyelin (SM), Fosfatidylserine (PS) en fosfatidylethanolamine (PE). Na blocking met bovine serum albumine (BSA), werden de beads geïncubeerd met liquor van twee MS patiënten (pat.A met IgG index: 1,3 en OGB: 13 en pat.B met IgG index: 2,6 en OGB: 22) en twee controle liquo-

ren (IgG index: 0,46 en 0,49 zonder OGB). Daarna werden gebonden antilichamen aangetoond m.b.v. flowcytometrie na toevoeging van anti-IgG-FITC en anti-IgM-PE.

**Resultaat:** In liquor van controles en MS patiënten werden geen specifieke IgG of IgM antilichamen aangetoond tegen het PC en PE lipide (<2% pos. beads). Slechts zwakke reactiviteit tegen het PS lipide (2-4% pos. beads) was zichtbaar bij twee controle liquoren en liquor van MS patiënt A. Sterke reactiviteit tegen lipide SM (8.5% IgG en 5,5% IgM positieve beads) werd aangetoond in liquor van MS patiënt B, terwijl geen reactiviteit aantoonbaar was bij controles en MS patiënt A (<2% pos. beads)

**Conclusie:** Deze pilotstudie suggereert dat myeline lipide-specifieke antistoffen in liquor mogelijk aangetoond kunnen worden m.b.v. flowcytometrie en myeline lipide-gecoate beads.

## 118. Vitamine B6 intoxicatie: een pleidooi voor (h)erkenning

M. van ZWAM<sup>1,2</sup>, M.G. SMITS<sup>3</sup>, S.C. ENDENBURG<sup>1</sup>

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium<sup>1</sup>, Ziekenhuis Gelderse Vallei, Ede; Laboratorium Klinische Chemie<sup>2</sup>, UMC St Radboud, Nijmegen; Afdeling Neurologie<sup>3</sup>, Ziekenhuis Gelderse Vallei, Ede

**Inleiding:** Pyridoxal-5-fosfaat is de biologisch actieve vorm van vitamine B6 en fungeert als cofactor van enzymen, die betrokken zijn bij de aminozuurstofwisseling. Vitamine B6 zit in voedingsmiddelen; een tekort komt in Nederland nauwelijks voor. De aanbevolen dagelijkse hoeveelheid (ADH) voor vitamine B6 is 1,5 mg, met een veilige bovengrens van 25 mg. Overmatig gebruik van supplementen of bier leidt tot overschrijden van de ADH. Vitamine B6 wordt gemeten om deficiënties of intoxicaties vast te stellen. Op het ZGV nam in de laatste twintig jaar het aantal verhoogde vitamine B6 resultaten toe. Wij onderzochten klinische verschijnselen van patiënten met hoge vitamine B6 concentraties.

**Methode:** Vitamine B6 concentraties werden bepaald met een HPLC-fluorescentie methode (Chromsystems). Referentiewaarden: 35-110 nmol/l.

**Resultaat:** In de periode 1991-2010 werd een toename gezien van het aantal vitamine B6 resultaten >110 nmol/l. In diezelfde periode vertienvoudigde het aantal aanvragen. In 2010 was

50% van de 2230 resultaten >110 nmol/l terwijl dit in 2001 nog maar 12% was. De maximale vitamine B6 concentratie gemeten op het ZGV was 11000 nmol/l. Hoge vitamine B6 concentraties werden gevonden bij patiënten die vitamine B6 bevattende supplementen gebruikten of overmatig bier consumpties. Deze patiënten vertoonden neurologische afwijkingen zoals polyneuropathie of het 'burning feet syndrome'.

**Conclusie:** Patiënten met verhoogde vitamine B6 concentraties vertoonden neurologische afwijkingen zoals polyneuropathie of het 'burning feet syndrome'. Deze patiënten gebruikten dagelijks vitamine B6 bevattende supplementen of meerdere consumpties bier. Uit het elektronisch patiëntendossier bleek niet altijd dat er een relatie werd gelegd tussen een hoge vitamine B6 concentratie en neurologische afwijkingen. Wij pleiten voor meer bekendheid over vitamine B6 intoxicaties in relatie tot neurologische afwijkingen en voor een strikter beleid bij 'over-the-counter'-gebruik van vitamine B6 bevattende supplementen.

### 119. Measurement of thyroglobulin antibodies in patients with differentiated thyroid carcinoma: mind the serum thyroglobulin level

M.S. KLEIN HESSELINK<sup>1</sup>, T.P. LINKS<sup>1</sup>, J. KOERTS<sup>2</sup>, A.N.A. van der HORST-SHRIVERS<sup>1</sup>, A.H. BROUWERS<sup>3</sup>, J.T.M. PLUKKER<sup>4</sup>, W.J. SLUITER<sup>1</sup>, A.C. MULLER KOBOLD<sup>2</sup>

*Departments of Endocrinology<sup>1</sup>, Laboratory Medicine<sup>2</sup>, Nuclear Medicine and Molecular Imaging<sup>3</sup> and Surgical Oncology<sup>4</sup>, University Medical Center Groningen, The Netherlands*

**Introduction:** The measurement of thyroglobulin (Tg) may be hampered by interference from Tg antibodies (TgAbs). In this study we evaluated the complementary value of a luminescence immunoassay (TgAb-ILMA, Abbott Laboratories Inc.) and a radioimmunoassay (TgAb-RIA, Brahms) for detection of TgAbs.

**Methods:** Between March 2006 and September 2010, TgAb concentrations were routinely measured in 3075 serum samples from 483 patients with differentiated thyroid carcinoma using the TgAb-RIA and TgAb-ILMA. Tg concentrations were also measured, using a sensitive immunoradiometric assay (Tg-IRMA, Brahms). Additional recovery tests were performed in selected samples to assess the presence of TgAbs.

**Results:** Using TgAb-ILMA and TgAb-RIA, respectively 8.5% and 10.1% of the samples were found positive. When subdividing samples with detectable (>0.11 ng/ml) and undetectable Tg, these percentages were 2.6% versus 5.8% and 5.9%

versus 4.3% respectively (TgAb-ILMA versus TgAb-RIA). A strong correlation was found between the TgAb concentration measured with TgAb-RIA and Tg concentration if the latter exceeded 1000 ng/ml ( $\rho = 0.959$ ,  $n = 133$ ,  $p < 0.001$ ). Recovery tests of 40 retrieved samples with high TgAb-RIA and low TgAb-ILMA results showed no interference of TgAbs. In sera with a Tg concentration below 1000 ng/ml, the TgAb-RIA and TgAb-ILMA results were well correlated ( $\rho = 0.386$ ,  $n=2941$ ,  $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** The results of the TgAb-RIA and TgAb-ILMA are not complementary in sera with Tg concentrations below 1000 ng/ml. However, in sera with Tg concentrations above 1000 ng/ml TgAb measurement using this TgAb-RIA appears to be unreliable. This finding is probably due to competition of endogenous Tg with the Tg-tracer. The TgAb-ILMA is a reliable method for TgAb determination and may be used in preference to this widely used TgAb-RIA.

### 120. Chromogranin A, Neuron-specific enolase, Progastrin Releasing Peptide and MonoTotal in patients with neuroendocrine tumors

C.M. KORSE<sup>1</sup>, B.G. TAAL<sup>4</sup>, J.M.G. BONFRER<sup>1</sup>, A. VINCENT<sup>2</sup>, M.L. van VELTHUYSEN<sup>3</sup>, J.C.G.M. BUNING-KAGER<sup>1</sup>, T.C. LINDERS<sup>1</sup>, P. BAAS<sup>4</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Biometrics<sup>2</sup>, Pathology<sup>3</sup>, Medical Oncology<sup>4</sup>, The Netherlands Cancer Institute - Antoni van Leeuwenhoek Hospital, Amsterdam, The Netherlands*

**Introduction:** Chromogranin A (CgA) is the most frequently used tumor marker, especially in well-differentiated neuroendocrine tumors (WDNET) and neuron-specific enolase (NSE) for the poorly differentiated neuroendocrine tumors (PDNET). Recently, progastrin-releasing peptide (proGRP), a marker for small cell lung cancer, and MonoTotal (MT), a cytokeratin marker, became available. We investigated the association of these markers with tumor characteristics, and overall survival according to histological classification.

**Methods:** CgA, NSE, proGRP and MT were measured in 280 patients with WDNET (242 patients with grade 1 (G1NET) and 38 patients with grade 2 (G2NET) tumors); 293 patients with PDNET (42 patients with large cell (G3LCC) and 251 patients with small cell carcinoma (G3SCC)) and in 282 healthy persons.

**Results:** Elevated levels of CgA, NSE, proGRP and MT were found in 69%, 24%, 27% and 38% in patients with WDNET,

and in 41%, 62%, 68% and 52% in patients with PDNET, respectively. ProGRP levels were higher in patients with lung tumors while CgA levels were lower in patients with non-lung tumors within the patients with G3SCC. In the multivariate models for patients with WDNET, CgA, proGRP and MT were associated with survival ( $P=0.004$ ,  $P=0.010$  and  $P=0.005$ , respectively), while for the patients with PDNET, only MT was associated with survival ( $P < 0.001$ ).

**Conclusion:** CgA remains the best predicting marker for diagnosing neuroendocrine tumors (not including small cell cancers). For predicting small cell cancers, proGRP is the most sensitive marker with even a higher sensitivity for lung tumors than for non-lung tumors. CgA, proGRP and MT are independent prognostic variables for survival in patients with WDNET, while MT was the only significant variable for survival patients with PDNET.

### 121. Improved prostate cancer detection by methylation-specific quantification of prostate cancer associated genes GSTP1, RARB2 and RASSF1a in urine

S.G. HEIL<sup>1</sup>, E. de JONGE<sup>1</sup>, M. WILDHAGEN<sup>2</sup>, C.H. BANGMA<sup>2</sup>, J. LINDEMANS<sup>1</sup>, R.H.N. VAN SCHAIK<sup>1</sup>

*Departments of Clinical Chemistry<sup>1</sup> and Urology<sup>2</sup>, Erasmus MC Rotterdam, The Netherlands. \* Noyons Stipendium Project*

**Introduction:** Prostate cancer is the most common malignancy of the urogenital tract. Prostate-specific antigen (PSA) is widely used for screening of prostate cancer. However, the PSA test is not ideal as specificity is limited. Recent studies show that hypermethylation of a panel of genes (e.g. GSTP1, RARB2 and RASSF1) in urine can be a prognostic marker for prostate cancer. In this study, we aimed to develop assays to detect methylation of these genes in urine and to apply these assays on urine of patients suspected to have prostate cancer.

**Methods:** Fresh urine was collected retrospectively from 39 men of whom 12 were diagnosed with prostate cancer by pros-

tate biopsy. DNA was isolated from 1 ml of urine (easyMAG kit, bioMerieux) and treated with bisulfite (EZ DNA-methylation gold kit, Zymo Research). Methylation status of GSTP1, RARB2 and RASSF1 was detected by MethyLight (ABI7500 analyzer) using ACTB as methylation independent reference gene.

**Results:** DNA was isolated from urine yielding concentrations of 6-10 ng/ $\mu$ L. After bisulfite modification and real-time quantitative PCR all samples were positive for ACTB indicating successful bisulfite treatment. LOQ was 2.5 pg for RARB2, RASSF1a and ACTB and 6.2 pg for GSTP1 in presence of

10,000 copies unmethylated DNA. Preliminary results showed that a combination of two positive tests resulted in a sensitivity of 33.3% and a specificity of 95.2% for detection of biopsy proven prostate cancer. PPV and NPV were 88% and 73%, respectively.

*Conclusion:* Detection of methylation status of a panel of genes is possible in DNA isolated from urine. Results from our study confirm that methylation-status of GSTP1, RARB2 and RASS-F1a might have additive value in prostate cancer screening.

## 122. Genetische polymorfismen in Mannose-Binding Lectin (MBL) zijn geassocieerd met irinotecan-geïnduceerde febrile neutropenie

R.H.N. van SCHAIK<sup>1</sup>, J.M. van der BOL<sup>2</sup>, F.A. de JONG<sup>2</sup>, A. SPARREBOOM<sup>2</sup>, M.A. van FESSEM<sup>1</sup>, F.E. van de GEIJN<sup>3</sup>, P.L. van DAELE<sup>3</sup>, J. VERWEIJ<sup>2</sup>, S. SLEIJFER<sup>2</sup>, R.H. MATHIJSSSEN<sup>2</sup>  
*Afd. Klinische Chemie<sup>1</sup>, Afd. Medische Oncologie<sup>2</sup>, Afd. Interne Geneeskunde<sup>3</sup>, Erasmus MC, Rotterdam*

*Inleiding:* Mannose-bindend lectine (MBL) speelt een belangrijke rol in de aangeboren immuunrespons. Genetische polymorfismen in het MBL2-gen zijn direct gerelateerd aan differentieële expressie van MBL. Wij onderzochten de effecten van MBL2-genotypen in relatie met toxiciteit op irinotecan chemotherapie bij patiënten met solide tumoren.

*Methode:* Patiënten die behandeld werden met irinotecan werden ge genotypeerd voor MBL2: twee promotor polymorfismen (-550 H/L en -221 X/Y) en 3 exon polymorfismen (52 A/D, 54 A/B, en 57 A/C, samen aangeduid als A/O). De twee promotor polymorfismen coderen voor drie haplotypen, resulterend in hoge (HL), intermediaire (LY) en lage (LX) MBL spiegels. Neutropenie en febrile neutropenie werden gescoord tijdens de behandeling.

*Resultaat:* Van de 133 patiënten hadden er 37 (28%) een ern-

stige neutropenie en 13 (10%) een febrile neutropenie. Er werden geen associaties gevonden tussen de exon polymorfismen (A/O) en febrile neutropenie. Echter, patiënten met het -550 H/H promotor genotype hadden significant frequenter febrile neutropenie vergeleken met patiënten met de -550 H/L en L/L genotypes (20% vs 13% vs 5%,  $p=0,039$ ). Bij haplotype-analyse bleek dat patiënten met het HYA haplotype significant vaker febrile neutropenie hadden dan patiënten zonder dit hoog-MBL producerende haplotype (16% vs 4%,  $p=0,019$ ). In de groep patiënten met wild-type exon polymorfismen (A/A) bleken patiënten met het hoge MBL promotor-fenotype de hoogste incidentie van febrile neutropenie te hebben ( $p=0,030$ ).

*Conclusie:* Patiënten met een hoog-MBL2 promotor genotype en haplotype hebben een factor 4 significant hoger risico voor het ontwikkelen van febrile neutropenie onder irinotecan therapie.

### Categorie 3 Klinisch

#### Acute zorg, IC, toxicologie

## 123. Betrouwbaarheid van de iSTAT1 point-of-care analyser voor de analyse van bloedgas, elektrolyten en glucose in beenmerg: een pilot study

E.S. VELDHOEN<sup>1</sup>, N.M.C.B. TURNER<sup>2</sup>, A.B.C. VERSLUYS<sup>3</sup>, K.M.K. de VOOGHT<sup>4</sup>  
*Afdeling Intensive Care voor Kinderen<sup>1</sup>, Divisie Perioperatieve zorg en Spoedeisende zorg<sup>2</sup>, Afdeling Kinderhematologie en Oncologie<sup>3</sup>, Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie<sup>4</sup>, Universitair Medisch Centrum, Utrecht*

*Inleiding:* Een botnaald is een snelle, eenvoudige methode voor het verkrijgen van een vasculaire toegangsweg bij een kritiek zieke patiënt. Het verkregen beenmergmonster kan gebruikt worden voor biochemische laboratorium bepalingen en zo het beleid beïnvloeden. Risico is echter obstructie van de reguliere apparatuur. Dit zou voorkomen kunnen worden door gebruik van Point-of-Care (POC) analyzers met disposable cartridges. Deze studie onderzoekt de bruikbaarheid en de betrouwbaarheid van de iSTAT1 POC analyzer voor de bepaling van bloedgas, elektrolyten en glucose in een beenmergmonster.

*Methode:* Kinderen die een electieve, diagnostische beenmergen-venapunctie onder algehele anesthesie ondergingen werden geïncubeerd. Deze monsters werden gelijktijdig afgenomen en

beiden geanalyseerd met de iSTAT1 analyzer. De studie werd goedgekeurd door de medisch ethische toetsingscommissie van ons ziekenhuis.

*Resultaat:* Zestien kinderen werden geïncubeerd in deze pilot study. De analyse was mogelijk bij alle patiënten. Regressie analyse toonde een significante relatie tussen bicarbonaat ( $p=0,014$ ), base excess ( $p=0,000$ ), natrium ( $p=0,002$ ), geïoniseerd calcium ( $p=0,027$ ) en glucose ( $p=0,001$ ) in veneus bloed en beenmerg. De geobserveerde verschillen waren klinisch acceptabel.

*Conclusie:* De iSTAT1 POC analyzer lijkt betrouwbaar te zijn voor de bepaling van bloedgas, elektrolyten en glucose in een beenmergmonster.

### Categorie 3 Klinisch

#### Erfelijke stofwisselingsziekten

## 124. Milde multipale acylCoA dehydrogenase deficiëntie (MADD): de sleutel tot een riboflavine transporter defect als oorzaak van het Brown-Vialetto-Van Laere syndroom, een nieuwe behandelbare erfelijke stofwisselingsziekte

N.G.G.M. ABELING<sup>1</sup>, M. DURAN<sup>1</sup>, A.M. BOSCH<sup>2</sup>, L. IJLST<sup>1</sup>, A.E.M. STROOMER<sup>1</sup>, R.J.A. WANDERS<sup>1</sup>, F.A. WIJBURG<sup>2</sup>, H.R. WATERHAM<sup>1</sup>  
*Laboratorium Genetische Metabole Ziekten, Afd. Klinische Chemie<sup>1</sup>, Emma Kinderziekenhuis<sup>2</sup>, AMC, Amsterdam*

*Inleiding:* Multipale acylCoA dehydrogenase deficiëntie (MADD) is een erfelijke stoornis van de mitochondriale vetzuuroxidatie, tengevolge van een defect in de electronenoverdracht van de diverse oxidatiereacties. De primaire oorzaak van MADD ligt in de afwezigheid van het electron transfer flavoprotein (ETF) of het electron transfer flavoprotein oxidoreductase (ETFDH).

Riboflavine is nodig voor de biosynthese van flavine adenine dinucleotide (FAD), acceptor voor de bij de oxidatiereacties vrijkomende electronen.

*Methode:* Wij beschrijven 2 patiëntjes die zich op de zuigelingenleeftijd presenteerden met progressieve spierzwakte en paralyse van het diafragma. Bij metabole basisdiagnostiek werden

lichte afwijkingen gevonden in het acylcarnitinepatroon van plasma en het organische zurenprofiel van urine, passend bij een milde vorm van MADD.

**Resultaat:** Primaire MADD werd uitgesloten. Riboflavinesuppletie leidde echter snel tot het normaliseren van de metaboliëtenpatronen en duidelijke verbetering van de kliniek. Riboflavine en FAD in plasma waren sterk verlaagd, maar na suppletie normaal. Er moest dus sprake zijn van een verminderde opname van riboflavine uit de darm. Sequentie-analyse van het intestinale riboflavine transporter gen C20orf540 toonde bij beide patientjes homozygotie aan voor een pathogene mutatie. Bij toeval werden tegelijkertijd door Green et al. mutaties ont-

dekt in hetzelfde gen als oorzaak van het Brown-Vialetto-Van Laere syndroom. De kliniek van onze patientjes met het riboflavine transporter defect is compatibel met het klinische beeld dat beschreven wordt door dit syndroom.

**Conclusie:** De snelle verbetering van zowel de kliniek als de biochemie bij de door ons beschreven patientjes impliceert dat tenminste een deel van de symptomen passend bij het Brown-Vialetto-Van Laere syndroom wordt veroorzaakt door de riboflavine deficiëntie, en dat riboflavinesuppletie, tenminste in jonge patientjes met dit syndroom een effectieve therapie kan zijn.

*Literatuur:* Green et al. Am J Hum Genet 2010, 12; 86 (3): 485-489.

## Categorie 3 Klinisch

### Overigen

#### 125. Diffuse alveolar hemorrhage associated with VKORC1 and CYP2C polymorphisms

P. WIJNEN<sup>1,2</sup>, M. DRENT<sup>2,3</sup>, F. COX<sup>4</sup>, O. BEKERS<sup>1,2</sup>

*Clinical Chemistry Dept<sup>1</sup>, Child care team<sup>2</sup>, Respiratory Medicine Dept<sup>3</sup>, Maastricht University Medical Centre, Maastricht; Respiratory Medicine Dept<sup>4</sup>, Bernhoven ziekenhuis, Oss, The Netherlands*

**Introduction:** Diffuse alveolar hemorrhage (DAH) can be a life-threatening complication. Recently, we found that DAH is associated with vitamin K epoxide reductase (VKORC1) and cytochrome P450 CYP2C9 and CYP2C19 variant alleles in patients using oral anticoagulation therapy (1). We hypothesized that the DAH occurring in eight patients after inhalation of paint thinner, turpentine, textile protector and/or cleaning product fumes, that can work as so-called superwarfarin, also might be associated with these polymorphisms.

**Methods:** CYP2C9\*2/\*3 (C430T/A1075C), CYP2C19\*2/\*3 (G681A/G636A), and VKORC1 (G-1639A/C1173T) single nucleotide polymorphisms were genotyped, using real-time PCR.

**Results:** In all eight patients (mean age 32.6±13.2; 7 males), at least one relevant variant allele was found. Five out of eight

patients (62%) displayed a combination of variant alleles, compared with 43% (74/173) in healthy volunteers. In three patients CYP2C9 heterozygote allelic variants (one \*1/\*2 and two \*1/\*3) were observed and one patient had a CYP2C19\*1/\*2, together with VKORC1 variant alleles. In one patient CYP2C9\*1/\*2 and CYP2C19\*1/\*2 variant alleles and no VKORC1 variant alleles were found. Three patients displayed either CYP2C9\*1/\*2, CYP2C19\*1/\*3 or VKORC1 AA/TT variant alleles.

**Conclusion:** DAH due to toxic fume inhalation might be associated with VKORC1, CYP2C9, and CYP2C19 polymorphisms. In cases of unexplained DAH, genotyping for these polymorphisms is recommended.

*Literature:* (1) Wijnen, P. et al. Mol Diagn Ther 2010; 14: 23-30.

#### 126. Familiaire pseudo-hyperkaliëmie

M.V. LUKENS<sup>1</sup>, A. de MARE<sup>1</sup>, M. KERBERT-DRETELER<sup>2</sup>, F.A.J.T.M. van den BERGH<sup>1</sup>

*Afdeling Laboratorium<sup>1</sup>, Afdeling Maag-Darm-Lever ziekten<sup>2</sup>, Medisch Spectrum Twente, Enschede*

**Inleiding:** Hyperkaliëmie wordt meestal veroorzaakt door verminderde nierfunctie, hyperglycemie of medicatie. Er kan ook sprake zijn van pseudo-hyperkaliëmie, door hemolyse, stuwung of leukocytose. Zeldzamer is het "leaky cell syndroom" met toegenomen passieve kalium lekkage uit erythrocyten, niet gecompenseerd door de Na/K-ATPase pomp (1). Hierdoor worden binnen 2 uur na afname afwijkende kalium en natrium waarden gevonden. Een 57-jarige man komt voor controle bij de MDL-arts, na laboratorium-analyse is er sprake van hyperkaliëmie (9,9 mmol/l) zonder aanwijzingen van hemolyse, leukocytose of klinische symptomen. Nieuwe bloedafname en directe analyse geven een normaal kalium (3,6 mmol/l).

**Methode:** Voor diagnostiek van pseudo-hyperkaliëmie werd bloed afgenomen in heparine en EDTA buizen van patiënt en controle. Materiaal werd geïncubeerd bij 4°C, KT en 37°C voor 2, 4 en 6 uur, waarna plasma van de cellen werd gescheiden. In het plasma werd natrium, kalium en chloride en parame-

ters van hemolyse (vrij Hb, LD) bepaald. Tegelijkertijd werden EDTA buizen gebruikt voor hematologische analyse.

**Resultaat:** Twee na uur incubatie bij kamertemperatuur stijgt kalium met 4 mmol/l en loopt op tot 12 mmol/l na 6 uur incubatie t.o.v. analyse direct na afname. Er zijn geen aanwijzingen voor hemolyse of leukocytose. Patiëntmateriaal geïncubeerd bij 37°C of controle laat geen significante veranderingen in natrium of kalium zien gedurende de 6 uur incubatie.

**Conclusie:** Pseudo-hyperkaliëmie op basis van het "leaky cell syndroom" is een zeldzame aandoening die autosomaal dominant overerft zonder exacte identificatie van het gen. Deze eenvoudige screeningstest kan de aandoening aantonen (2). Voor de patiënt is het van belang dat het monster snel naar het laboratorium getransporteerd en geanalyseerd wordt.

*Literatuur:* 1. Stewart GW. Curr Opin Hematol. 2004, 11: 244-250.  
2. Leadbeater S, et al. Lancet 198, 2: 103-104.

## 127. Endothelial erythrophagocytosis of lactadherin-opsionized red blood cells

M.H.A.M. FENS<sup>1</sup>, K.L. van ROOIJEN<sup>1</sup>, G. ANDRINGA<sup>1</sup>, R. van WIJK<sup>1</sup>, H.M. DIJSTELBLOEM<sup>1</sup>, J.T. RASMUSSEN<sup>2</sup>, K.M. de VOOGHT<sup>1</sup>, R.M. SCHIFFELERS<sup>3</sup>, C.A.J.M. GAILLARD<sup>4</sup>, W.W. van SOLINGE<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry and Haematology, Laboratory for Red Blood Cell Research<sup>1</sup>, The Netherlands Protein Chemistry Laboratory<sup>2</sup>, University Medical Center Utrecht, The Netherlands; Department of Molecular Biology<sup>3</sup>, Aarhus University, Aarhus, Denmark; Department of Pharmaceutics, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences (UIPS)<sup>4</sup>, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands; Department of Internal Medicine, Meander Medical Center, Amersfoort, The Netherlands*

**Introduction:** Phosphatidylserine (PS) exposure of red blood cells (RBCs) initiates their phagocytic removal from the circulation, generally in liver and spleen. Previously, we have shown that endothelial cells are capable of phagocytosis of RGD-modified RBCs through the PS-lactadherin- $\alpha$ -integrin pathway. To study this process in a more (patho)physiological context we subjected RBCs to oxidative damage and studied phagocytosis by endothelial cells.

**Methods:** RBCs were incubated with tert-butyl hydroperoxide (tBHP). PS exposure was measured by FACS using annexin V. Deformability of RBCs was analyzed using a Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORRCA). Endothelial cell erythrophagocytosis was studied by adding tBHP-treated RBCs to cultured HUVECs, either in presence or absence of lactadherin. Subsequently, intracellular hemoglobin (Hb) content of HUVECs was determined by measuring the pseudoperoxidase activity of Hb.

**Results:** tBHP-treated RBCs showed a dose-dependent increase of PS-exposure rendering  $38 \pm 17\%$  of RBCs PS-pos-

itive at 3 mM tBHP. Untreated RBCs showed marginal PS-exposure. Next to PS-exposure, membrane rigidity is critical for cell erythrophagocytosis. We therefore measured RBC deformability. At increasing shear stress, deformability of 3 mM tBHP-treated RBCs was virtually reduced to zero compared to untreated RBCs. tBHP treatment also showed a dose-, time-, and lactadherin-dependent increase in erythrophagocytosis: after 4 h incubation 3 mM tBHP-treated RBCs showed marked erythrophagocytosis by HUVECs (13  $\mu$ g Hb/well, roughly 5-30 RBCs/endothelial cell as determined by light microscopy), only in presence of lactadherin. Control RBCs were not phagocytosed (0  $\mu$ g Hb/well).

**Conclusion:** RBCs subjected to oxidative stress expose PS and demonstrate loss of membrane integrity and/or deformability. Our results further show that lactadherin-mediated RBC-endothelial cell interactions lead to erythrophagocytosis. These findings may have implications for pathological events in hematological disorders.

## 128. Success rate of salivary Dim Light Melatonin Onset measurements

H. KEIJZER<sup>1</sup>, T. PEETERS<sup>1</sup>, C.W.N. LOOMAN<sup>3</sup>, S.C. ENDENBURG<sup>1</sup>, M.G. SMITS<sup>2</sup>, D. J.M.T. KLEIN GUNNEWIEK<sup>1</sup>  
*Department of Clinical Chemistry and Hematology<sup>1</sup> Department of Sleep-Wake Disorders and Chronobiology<sup>2</sup>, Gelderse Vallei Hospital, Ede; Institute of Public Health<sup>3</sup>, Erasmus MC Rotterdam, The Netherlands*

**Introduction:** Dim Light Melatonin Onset (DLMO) is the most reliable marker to assess circadian rhythmicity and to time administration of exogenous melatonin in the treatment of circadian rhythm disorders. At the Dutch national referral centre for circadian rhythm sleep disorders salivary DLMO is measured yearly in about 1,500 patients. Patients collect saliva conveniently in their home environment and send it to the laboratory for analysis of melatonin concentration. The success rate of these salivary DLMO measurements in insomnia patients has not yet been studied and therefore we retrospectively analyzed the patients sample size of the year 2008. Furthermore, we studied the correlation between diary and PSG (polysomnography) sleep onset with DLMO to see if DLMO can be predicted by sleep onset time in patients with information available from sleep diary or PSG.

**Methods:** Patients, who were referred to the sleep centre of

the Gelderse Vallei Hospital, were asked to complete an online questionnaire. A Sleep Check containing saliva collection devices (Salivette®) was sent to the patient in order to collect saliva at 5 consecutive hours for partial melatonin profiling. Melatonin concentration was measured using a radioimmunoassay (Buhlmann) and DLMO was defined as the time at which the melatonin concentration in saliva reaches 4 pg/mL.

**Results:** Out of 1,848 five point partial melatonin curves, DLMO was determined in 76.2% (n=1,408). Pearson correlations (r) between DLMO and sleep onset measured with PSG or a diary were 0.514 (p<0.001, n= 54) and 0.653 (p=0.002, n= 20), respectively.

**Conclusion:** DLMO can be determined reliably by measuring melatonin in saliva that is conveniently collected at home. DLMO cannot be predicted reliably by sleep onset measured by PSG or diary.

## 129. Is there a role for active vitamin B12 in the NHG-anemia protocol of the general practitioners?

A.M.J. KOOIJMAN-BUITING<sup>1</sup>, A. STELLINGWERF<sup>1</sup>, M. de RUIJTER-ELKERBOUT<sup>1</sup>, H.J. ADRIAANSEN<sup>2</sup>, S. van DELFT<sup>1</sup>

*Saltro<sup>1</sup>, Utrecht, KCHL<sup>2</sup>, Gelre Ziekenhuizen, Apeldoorn en Zutphen*

**Introduction:** In the NHG-anemiaprotocol Vitamin B12 is measured in case of macrocytic anemia. Active vitamin B12 (Holotranscobalamin II) is the earliest serum marker to measure subnormal vitamin B12 absorption. In our study we tried to find out if Active B12 can be a major player in the anemia-protocol of a general practitioner laboratory.

**Methods:** 716 samples (MCV>82fl) were collected from the anemiaprotocol (500 samples had a MCV>90fl). From the collected samples 262 turned out to have a real anemia. Hematology (Sysmex XE 2100) and Immunochemical (Dx1, Beckmann Coulter) results were collected. In a later phase Vitamin B12 and Active B12 were measured at an AxSYM (Abbott).

**Results:** From the 716 samples we found in 653 samples (=91,2%)

both normal total and Active B12; 23 samples (=3,2%) were deficient for both total and Active B12; 14 samples (=1,9%) were normal for total B12, but deficient for Active B12 and 26 samples (=3,7%) were deficient for total B12, but had a normal amount of Active B12. Macrocytic anemia (MCV >98fl) was found in 26 samples. 4 of these 26 samples were Vitamin B12 deficient based on total B12, but only 1 of these 4 samples was deficient for Active B12.

**Conclusion:** There is a poor correlation between total and active vitamin B12. Total vitamin B12 is not a good marker to find real deficiencies. At this moment Active B12 is used as a reflex assay, but it would be better to replace the total vitamin B12 in the Active B12 assay. A prerequisite is the availability of the Active B12 assay on routine analysers.

### 130. Longitudinal studies of the association between peripheral CD27++ plasma cells and Systemic lupus erythematosus disease activity

E. ten BOEKEL<sup>1</sup>, M. PRINS<sup>2</sup>, G.J. VRIELINK<sup>1</sup>, W. de KIEVIET<sup>1</sup> C. SIEGERT<sup>2</sup>

*Departments of Clinical laboratory<sup>1</sup> and Internal medicine<sup>2</sup>, Saint Lucas Andreas Hospital Amsterdam, The Netherlands*

**Introduction:** High numbers of CD27++ CD20+; plasma cells (PCs) in peripheral blood have been reported in systemic lupus erythematosus (SLE) patients. In the current study we have monitored the CD27++ PC compartment of patients with SLE to answer the question whether the number of CD27++ PCs may be a valuable biomarker for SLE disease management.

**Methods:** Seventeen SLE patients were followed up longitudinally for a period of 2 to 7 years (172 total clinic visits). CD27++ PC number in peripheral blood and disease activity were monitored. Disease activity assessment was performed using the SLE disease activity index (SLEDAI). A lupus flare was defined as a > 3 point increase in SLEDAI compared with the previous visit.

**Results:** Thirty-one peaks, defined as PC-value > 3.6 x10E6/L (+1sd of mean of controls) and > 100% increased since the pre-

vious visit, and 31 baseline values (lowest PC-value between two PC-peaks) of CD27++ PCs were identified. A PC-peak preceded increased SLEDAI established at the next visit or correlated with a concurrent rise in SLEDAI in about half of the cases (n=16/31). In the other half of the cases a PC-peak was not associated with eminent changes in SLEDAI. Eight out of 10 major flares (SLEDAI >8) and 8 out of 11 minor flares (SLEDAI 4-7) were coincided with a PC-peak.

**Conclusion:** CD27++ PCs may potentially be a biomarker for monitoring SLE patients during a flare. However, a rise in CD27++ PCs appears not to be consistently associated with increased SLEDAI.

**Literature:** Ten Boekel E, Prins M, Vrieling GJ, de Kieviet W, Siegert CE. Ann Rheum Dis. 2010 Nov 12.

### 131. Vitamine D bij probleemgeoriënteerde aanvraagcode 'Vage klachten'

I.C.A. MUNNIX, W.P. OOSTERHUIS, H.A. KLEINVELD

*Klinische Chemie en Hematologie, Atrium Medisch Centrum, Heerlen*

**Inleiding:** Vitamine D gebrek kan leiden tot myopathie en osteomalacie. Meer recent is de ontdekking dat het ook een rol lijkt te spelen bij tal van chronische aandoeningen, waaronder maligniteiten, auto-immuunziekten, infectieziekten en cardiovasculaire ziekten. Een spiegel van minimaal 50 nmol/l mag als streefwaarde worden beschouwd. In een pilot-studie uitgevoerd bij 40 patiënten waarbij door huisartsen het probleemgeoriënteerde aanvraagpakket 'Vage klachten' was aangevraagd bleken 18 patiënten (45%) een concentratie onder de 50 nmol/l te hebben.

**Methode:** Na overleg met de aanvragende huisartsen in onze regio werd afgesproken om vitamine D toe te voegen aan de probleemgeoriënteerde aanvraagcode 'Vage klachten'. Na een jaar werd dit beleid geëvalueerd.

**Resultaat:** In 2010 werd door huisartsen bij 4148 patiënten het probleemgeoriënteerde aanvraagpakket 'Vage klachten' aan-

gevraagd. De gemiddelde vitamine D concentratie was 62 ± 30 nmol/l (range 10-311 nmol/l). Bij 34% van deze patiënten lag de concentratie vitamine D onder de streefwaarde van 50 nmol/l. Een ernstig vitamine D gebrek (< 20 nmol/l) werd gevonden bij 5% van de patiënten. Een vitamine D tekort bleek veruit de meest vastgestelde afwijkende uitslag bij de aanvraagindicatie 'Vage klachten'. In vergelijking met de andere testen van de probleemgeoriënteerde aanvraagcode 'Vage klachten' bleek de bezinking, met 13% afwijkende uitslagen, na vitamine D de test met de meest voorkomende afwijkende uitslagen.

**Conclusie:** Een opvallend hoog percentage mensen met vage klachten heeft een tekort aan vitamine D. Het toevoegen van vitamine D aan het probleemgeoriënteerde aanvraagpakket 'Vage klachten' lijkt derhalve zinvol. Nader onderzoek zal moeten uitwijzen of er een causaal verband is tussen een vitamine D tekort en vage klachten.