

Posterabstracts

Samenvattingen van de posterpresentaties tijdens het 68e Congres van de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde op 15 t/m 17 april 2015 te Veldhoven

Categorie 1 Analytisch

Fotometrie, elektrochemie, sensortechnologie

1. Pseudonatriëmie: voorkomen is beter dan genezen

M.L.P. LANGELAAN, L. KAMP, M.T.M. RAIJMAKERS

Laboratorium voor Klinische Chemie en Hematologie, Atrium-Orbis Medisch Centrum, Heerlen

Inleiding: Het optreden van pseudohypo- en pseudohypernatriëmieën bij het bepalen van de natriumconcentratie middels de indirecte ionselectieve electrode (ISE) is een bekend fenomeen [1]. Bij patiënten met een afwijkende waterfractie, kan dit leiden tot een foutieve diagnose. Onze studie richtte zich op de effecten van de waterfractie op de natriumconcentratie.

Methode: De natriumconcentratie werd gemeten bij random (n=99, plasma) en IC patiënten (n=99, volbloed/plasma) middels een directe (RapidPoint 500, Siemens) en indirecte (C8000, Roche) methode. De waterfractie (W) van bloedplasma werd benaderd volgens $W = (991 - 1,03L - 0,73P) / 1000$, met P=totaal eiwit en L (totaal lipiden) = $2,27TC + TG + 0,623$, waarbij TC=totaal cholesterol, TG=triglyceriden (C8000, Roche) [2]. We onderzochten de invloed van materiaaltype, de waterfractie en de mogelijkheid deze te gebruiken voor correctie van pseudonatriëmieën.

Resultaat: Bij IC patiënten werden discrepanties in diagnoses waargenomen bij de verschillende methoden: 32% van

de hypernatriëmieën met indirecte ISE bleken normaal met directe ISE. Over de gehele patiëntenpopulatie was het verschil direct - indirect in plasma -4 mmol/l. Daarbij werd een lineair verband waargenomen tussen de waterfractie en het concentratieverschil met beide bepalingen. Door te corrigeren voor de waterfractie werd het verschil tussen de directe en indirecte methode kleiner.

Conclusie: Het verschil tussen natriumconcentraties gemeten met indirecte en directe ISE is afhankelijk van de waterfractie van de samples. Materiaaltype en methode blijken van invloed bij het stellen van de juiste diagnose. Correctie met behulp van de benaderde waterfractie is een veelbelovende tool om pseudonatriëmieën te voorkomen indien geen directe bepaling voorhanden is.

Literatuur: [1] Dimeski et al. J Crit Care 2012, 27(3):326. [2] Waugh et al. Metabolism 1969, 18(8):706.

2. De NOVA View: Geautomatiseerde indirecte immunofluorescentie microscoop voor ANA en ANCA

R.L.J.M. HERPERS¹, W. van ZUIJLEN-van ROOIJEN², I-A. HAAGEN²

Algemeen Klinisch Chemisch Laboratorium, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden¹, Hematologisch Klinisch Chemisch Laboratorium, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam²

Inleiding: De meest gebruikte techniek voor het screenen op anti-nucleaire antistoffen (ANA) en antistoffen tegen cytoplasmatische bestanddelen van neutrofielen (ANCA) is de indirecte immunofluorescentie (IIF-)microscopie (ACR 2009 "aanbeveling voor IF-ANA"). Het beoordelen vraagt gespecialiseerde analisten, is tijdrovend en is vaak subjectief. Automatisering van immunofluorescentie microscopie kan tijdsbesparend zijn en harmonisatie bevorderen.

Methode: De NOVA View, INOVA diagnostics, is een geautomatiseerde fluorescentie microscoop. De NOVA View leest, analyseert en archiveert digitale foto's van IF-glaasjes. Cellen worden gekleurd met DAPI en een fluorescentielabel. patroonherkenning werkt op basis van 3D hologram. Patiëntenmonsters, afkomstig van routine aanvragen en na selectie op aanwezigheid van antistoffen in ANA en/of ANCA-IF, zijn zowel met de NOVA View als met de IF-microscoop beoordeeld op positief/negatief en patroon herkenning.

Resultaat: ANA: Bekende (n=36) en onbekende patiëntenmonsters (n=162) zijn beoordeeld. Er is 100% concordantie voor

de negatieve monsters. De NOVA View detecteert meer positieve monsters. Aanpassing van de cut-off van de licht-intensiteit kan dit verbeteren maar wordt afgeraden door de firma. patroonherkenning toont een concordantie van 75%. Discrepanties worden veroorzaakt door cytoplasmatisch aankleuring, dubbel-patronen of zwakke IF.ANCA: Er is 94% concordantie voor de herkenning van positiviteit versus negativiteit (17/18). patroonherkenning door de NOVA View is juist in 91% (20/22) van de monsters. Dit resulteert in de volgende werkwijze: na de eerste uitslag gegenereerd door de NOVA View, volgt een beoordeling door de analist wat leidt tot de definitieve uitslag.

Conclusie: Geautomatiseerde IF-microscopie door de NOVA View is een betrouwbare vervanging voor de manuele IF-microscopie. Discriminatie tussen positieve en negatieve monsters is accuraat. patroonherkenning is voldoende (ANA) tot goed (ANCA). Beoordeling kan door een enkele analist van achter een willekeurig computerscherm en hoeft niet in een donkere kamer.

3. A continuous glucometer system evaluated in a tonometer

R. J. SLINGERLAND, M. FOKKERT, E. SLUITER, R. DOLLAHMOURSID, R. MUNNIKHUIS, C. WITTEVEEN, W. MULLER, B. DIKKESCHEI
Clinical Chemistry Laboratory, Isala, Zwolle, the Netherlands

Introduction: For continuous glucometers not the precision is at stake but the bias under varying physiological conditions. For the first time to our knowledge, a temperature-controlled tonometry-based dynamic test setting was used to evaluate the performance of a continuous glucometer.

Methods: A temperature-controlled tonometer was filled with freshly obtained venous blood from a healthy volunteer. Oxygen and carbon dioxide content of the venous blood were changed at stable nitrogen gas condition to even arterial blood values. Hematocrit was changed during the experiment by gently centrifuging the venous blood. Supernatant plasma was removed and stored at room temperature. The concentrated blood sample was added to the tonometer and subsequently at various moments in time an extra quantity of the plasma supernatant was added to this blood sample in the tonometer. The blood was sampled simultaneously for the continuous intravenous glucose oxidase sensor-based glucometer (Glucoclear, Edwards Scientific, USA) as well as for ID-GCMS

aligned perchloric acid deproteinized hexokinase analysis (Roche, Almere, the Netherlands) and, as a positive control on oxygen dependency, a handheld glucometer (OneTouch Ultra, Lifescan, Belgium).

Results: The continuous blood glucometer was essentially hematocrit, oxygen tension/carbon dioxide and temperature independent. The Mean Absolute Relative Difference (MARD) was 1.62% in the hematocrit experiment. The control glucometer appeared as expected to be highly oxygen dependent.

Conclusion: A temperature-controlled tonometer was used to evaluate a glucose-oxidase sensor based continuous blood glucometer GlucoClear (for intravenous use). This continuous glucometer performed extremely well in comparison with the ID-GCMS aligned hexokinase method under varying physiological conditions like temperature (20 °C vs. 37 °C, 20-51% hematocrit and 5-15 kPa oxygen).

4. Development and validation of an isotope dilution mass spectrometric assay for urinary 6-sulfatoxymelatonin and establishment of reference ranges

M. van FAASSEN¹, B.H. WOLFFENBUTTEL², I.P. KEMA¹

Department of Laboratory Medicine¹, Department of Endocrinology², University of Groningen, The Netherlands

Introduction: Melatonin is an endogenous marker of the circadian rhythm in humans and is best known for its role as signaling molecule for the length of day and night. Recent data show an increase of disturbed circadian rhythm by late night computer screen exposure with potential serious health implications. The major urinary metabolite of melatonin in urine is 6-sulfatoxymelatonin (6-SM) and can be used for measuring the total output of melatonin over 24 hour (24h). We developed a high-throughput isotope dilution mass spectrometry assay for 6-SM in urine and established reference ranges in 24h urine.

Methods: 24h urine was collected and to 100 µL urine deuterated internal standard was added. After mixing and centrifuging, five µL urine equivalent was injected and online sample extraction was performed. Chromatographic separation was completed within six minutes and mass spectrometric

detection was performed in positive mode. 120 healthy men and 120 healthy women were identified from the Lifelines cohort, with 20 individuals per age decade (20-80 years) and 24h urine was collected.

Results: Precision was <6% at three different levels. LLOQ was 0.3nM, which is adequate for quantifying 6-SM in 24hr urine. There was an overall significant age-dependent decline in 6-SM output in 24h urine, age decade 20-29 (median 42 nmol/24h, range 2.9-162), age decade 30-39 (median 40 nmol/24h, range 4.2-87), age decade 40-49 (median 32 nmol/24h, range 4.5-72), age decade 50-59 (median 27 nmol/24h, range 7.5-69), age decade 60-69 (median 20 nmol/24h, range 1.7-60), age decade 70-79 (median 15 nmol/24h, range 0.85-55), p< 0.001.

Conclusion: We describe the first isotope dilution mass spectrometric method for the analysis of 6-SM in urine. 6-SM urinary output showed an age-dependent decline.

Categorie 1 Analytisch

Hemocytometrie, flowcytometrie, hemostase

5. Evaluatie van een nieuwe assay voor het meten van D-dimeer op de STA-R Evolution

C. SELTONRIJCH, S. de LATHOUDER

Klinisch Chemisch Laboratorium, Star-MDC, Rotterdam

Inleiding: Voor het geautomatiseerd meten van D-dimeer op de STA-R Evolution is een nieuwe assay ontwikkeld; de STA-Liatest D-Di PLUS (Diagnostica Stago). Deze assay is ontwikkeld om storende effecten bij de meting van D-dimeer door reumafactor of HAMA's uit te sluiten. Doel van deze studie is verifiëren of de nieuwe assay de oude assay kan vervangen.
Methodie: Bij 257 patiënten uit de eerste lijn is de D-dimeer in citraat plasma gemeten met STA-Liatest D-Di en D-Di PLUS. Uitkomsten (200-5000 ug/l) zijn met elkaar vergeleken (Deming regressie). Reumafactor is bepaald bij 8 sterk afwijkende uitkomsten. De totale precisie is geëvalueerd (EP15 protocol met citraat plasma en controle materiaal). Bij 25 patiënten is een compressie echo verricht waarvan de uitkomst is vergeleken met het D-dimeer resultaat.

Resultaat: De resultaten van de methoden vergelijking zijn: $y=0,959x + 11$ (R=0,949). De aanwezigheid van reumafactor (RF) is in de onderzochte populatie laag, daarom is RF slechts gemeten in 8 monsters met resultaten buiten het CI. RF was negatief in 7 van de 8 monsters. De aanwezigheid van RF verklaart daarom niet de gevonden verschillen. De verschillen hebben geen invloed op de klinische beslissing. De gevonden CV is 6% en 3% op 770 ug/l en 2280 ug/l respectievelijk en 19% op 270 ug/l (LOD). Klinische validatie (n=25) toont dat bij een afkapping van 500 ug/l alle 8 patiënten met aangetoonde diep veneuze trombose in het been correct geclassificeerd worden. Vals positieve uitslagen zijn gevonden in 6 (D-Di) en 5 (D-Di PLUS) patiënten. Vals negatieve uitslagen zijn niet gevonden.
Conclusie: De nieuwe D-dimeer assay (STA Liatest D-Di PLUS) voor de STA-R Evolution kan de oude assay vervangen.

6. Specificity of coagulation tests for monitoring direct oral anticoagulants (DOACs)

D. van de KERKHOF^{1,2}, E.M.H. SCHMITZ^{2,3}, M. MOOLENAAR¹, M.W.M. SCHELLINGS⁴ A-K. BOER^{1,2}, K. BOONEN¹
Clinical Laboratory¹, Expert Center Clinical Chemistry Eindhoven², Catharina Hospital Eindhoven, Department of Biomedical Engineering, Laboratory of Chemical Biology and Institute of Complex Molecular Systems, Eindhoven University of Technology³, Clinical Laboratory, Máxima Medical Center Veldhoven⁴, The Netherlands

Introduction: Oral anticoagulants as vitamin K antagonists, dabigatran and rivaroxaban are frequently used in clinical practice. Clinical laboratories often analyze samples for different purposes, without knowledge of the therapeutic anticoagulants present in the sample. In an emergency situation, reliable information on medication history can be difficult to obtain. Therefore, establishing the type and concentration of anticoagulation used can be of relevance for determining therapeutic policy. In this study, we determined the specificity of coagulation tests used for quantification of new direct oral anticoagulants.

Methods: Left-over citrated blood samples were obtained from patients using coumarins, dabigatran, rivaroxaban, fractionated heparin (LMWH) or unfractionated heparin. These samples were analysed with a panel of coagulation tests: PT/INR, APTT, thrombin time, dabigatran calibrated dTT and rivaroxaban and heparin calibrated anti-Xa.

Results: In dabigatran samples, low levels rivaroxaban and LMWH were measured as artefact using the anti-Xa assay. Vice versa, in rivaroxaban samples, low artefact levels of dabigatran were determined with the dTT assay. In patients using LMWH or during bridging LMWH to vitamin K antagonists, low to therapeutic artefact levels of dabigatran and rivaroxaban were determined. In samples obtained during intravenous heparin therapy low or therapeutic artefact dabigatran levels were determined, but artefact rivaroxaban concentrations remained mostly undetectable. The correlation of the rivaroxaban calibrated anti-Xa and the dabigatran calibrated dTT was low in dabigatran as well as rivaroxaban samples.

Conclusion: Coagulation tests for therapy monitoring are aspecific. If the patients medication history is unclear, it is advisable to analyze a panel of coagulation tests to exclude errors in data interpretation. Routine laboratory tests as PT, APTT and thrombin time could assist in this.

7. Stabiliteit van stolparameters in ontdooid Omniplasma bij 4 °C

N. GEERTS¹, W. SCHRODER¹, D. van de KERKHOF^{1,2}
Klinisch laboratorium, Catharina Ziekenhuis¹, Expertise Centrum Klinische Chemie², Eindhoven

Inleiding: Omniplasma® is een gepoold, Solvent/Detergent (SD)-behandeld en prion gereduceerd plasma dat aan het productassortiment van Sanquin is toegevoegd. Op advies van de Medische Adviesraad (MAR) zal door Sanquin het huidige standaard plasma product (FFP) vervangen worden door Omniplasma, waarna de levering van FFP's gefaseerd zal beëindigen. Belangrijke overwegingen voor de overgang zijn de reductie van het risico van transmissie van bloed overdraagbare agentia, zoals virussen en prionen, en de verdere vermindering van allergische reacties en het aantal TRALI-gevallen. In deze studie hebben wij gekeken naar stabiliteit van Omniplasma vergeleken met FFP bij bewaren in de koelkast.

Methode: Drie Omniplasma producten met verschillend lotnummer en drie FFP's werden ontdooid bij 37 °C. De stolparameters werden direct na ontdooiden, en na 3, 5, 8 dagen opgeslagen bij 4 °C gemeten. Gemeten parameters (STA-R): PT, APTT, fibrinogeen, FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI,

proteïne C, proteïne S, antitrombine, VWF antigeen en VWF activiteit.

Resultaat: De gemiddelde waarden van stolparameters vielen direct na ontdooiden voor beide producten binnen de referentiewaarden. Ook was de stabiliteit van stolparameters in Omniplasma als functie van bewaarduur niet afwijkend van die in FFP.

Conclusie: De stolparameters van Omniplasma zijn goed vergelijkbaar met die van de huidige FFP's. De laatste jaren hebben we een kleine voorraad FFP gehad van ontdooid product, om de uitgiftetijd van plasma te reduceren bij bloedingen. De maximale bewaarduur van ontdooid FFP's was 5 dagen. Op basis van productstabiliteit zijn er geen redenen om deze praktijk te wijzigen voor Omniplasma. Echter, omdat Omniplasma niet gezien wordt als een kort houdbaar bloedproduct maar als een geneesmiddel, zou het langer dan 24 uur ontdooid bewaren van plasma vallen onder off-label gebruik.

8. Discrepancy in d-dimer measurement between second generation Tinaquant and four other routine assays

M. NOORDEGRAAF, P. MEIJER, C.M. HACKENG
Department of Clinical Chemistry, St. Antonius Hospital, Nieuwegein, and ECAT Foundation, Voorschoten, the Netherlands

Introduction: D-dimer testing is a rapid and inexpensive method supporting the exclusion of Venous Thromboembolism. However, currently available d-dimer tests differ in epitope recognition, antibodies, assay format, calibration standards and instruments. To investigate whether these differences lead to different test results, a small survey was conducted. The aim was to compare the analytical performance of the five most used d-dimer assays in the Netherlands.

Methods: We distributed 7 pooled plasma samples or lyophilised (ECAT) plasma samples to 10 laboratories using 5 different d-dimer assays: VIDAS d-dimer assay (Biomérieux), Tinaquant assay (Roche diagnostics), STAlia-test (Diagnostics Stago), IL d-dimer-HS 500 test (Instrumentation Laboratory) or Innovance d-dimer assay (Siemens healthcare). For each sample, the median value from all results was calculated. We also calculated the median values for all samples for the 5 different assays. We plotted the median value measured by the

different assays against the total median value and calculated the 95% percentile. To identify any outliers, we performed an outlier calculation on the median values.

Results: Median values ranged from 0.37 to 1.16 mg/l. At the lowest concentration the value measured by the different D-Dimer assays ranged from 0.17 to 0.55 mg/l and at the highest concentration from 0.81 to 1.38 mg/l. A strong concordance between Vidas, Innovance and IL d-dimer assays was observed. STAlia test measures lower compared to the assays mentioned above, but still within the 95% percentile. Surprisingly the Tinaquant assay measures significantly lower compared to the other assays and based on our outlier calculation, can be considered as outlier.

Conclusion: Based on our results we recommend that for each new d-dimer test a clinical validation of the cut-off level is necessary.

9. Multicenter evaluatie van de Sysmex XN-serie

M. SCHOORL, M. SCHOORL, M. CHEVALLIER, T. van der PLOEG, J. van PELT
Lab KCHI, Medisch Centrum Alkmaar

Inleiding: De validatie van hemocytometrie apparatuur wijkt door het ontbreken van geschikte controles en de noodzaak van vers materiaal belangrijk af van die van klinische chemie apparatuur. In de praktijk moet volstaan worden met een vergelijk met de voorheen gebruikte apparatuur en de vaststelling van reproduceerbaarheden. Indien in clusters van laboratoria dezelfde apparatuur in gebruik genomen wordt is uniformiteit noodzakelijk. Wij evalueerden simultaan 7 Sysmex XN modules verspreid over drie laboratoria in vergelijk met de Sysmex XE-2100 waarvan de performance uitgebreid bekend is uit jarenlange interne en externe kwaliteitscontroles.

Methode: K2-EDTA-bloed van 160 patiënten werd binnen 4 uur na afname gemeten. De resultaten van de XN modules werden met lineaire regressie vergeleken met die van de XE. 90% van de getallenparen moest voldoen aan de ideale lijn ($y=x$) met een spreiding afhankelijk van de reproduceerbaarheid van de parameter. De reproduceerbaarheden werden

bepaald in verschillende patiënten monsters op 3 niveaus. *Resultaat:* De reproduceerbaarheden van de verschillende hematologische parameters waren allen ruimschoots kleiner dan de fabrieksopgave. De data sets van XE en XN resultaten werden geplot op de ideale lijn $y=x$ met een 95% BI range daaromheen, afhankelijk van de reproduceerbaarheid van de parameter. Per parameter werd de gemiddelde asafsnede, richtingscoëfficiënt en correlatiecoëfficiënt vastgesteld. Vervolgens werd per parameter vastgesteld of de 7 XN modules overeenkwamen met de XE module en of er onderlinge verschillen waren. De RBC en Ht van 2 respectievelijk 4 XN modules moest geherkalibreerd worden.

Conclusie: Op eenvoudige en snelle manier werden 7 nieuwe Sysmex XN modules gevalideerd. De uitkomsten lieten voor alle parameters en modules uniforme resultaten zien die identiek waren aan de voorheen gebruikte Sysmex XE-2100 waarvan de performance genoegzaam bekend was.

10. Improved flagging performance of the Sysmex XN2000 haematology analyzer

M. SCHOORL, M. SCHOORL, M. CHEVALLIER, J. ELOUT, J. van PELT
Lab KCHI, MCA, Alkmaar

Introduction: Hematology analyzers generate suspect flags in the presence of abnormal cells. With the introduction of the Sysmex XN haematology analyser the WBC differentiation channel (WDF) and abnormal cell detection channel (WPC) have been added with improved algorithms for flagging blasts and abnormal or atypical lymphocytes.

Methods: This study evaluated 2011 K2EDTA anticoagulated samples from the daily routine (clinical patients: $n=863$, outpatients: $n=1148$). For comparison, blood smears were examined with a CellaVisionDM96, according to the CLSI protocol H20-A2-2007. The Sysmex XN Haematology analyser was equipped with software version 00.12. Q-flag settings were according to the specifications of the manufacturer.

Results: Based on the CellaVision results the total number of samples on the XN-2000 demonstrated 6 FP and 4 TP in the blast flag, 6 FP and 9 TP in the lymph flag, and 15 FP and 0 TP in the atypical lymph flag. Furthermore 9 FN were observed

in the blast flag, 158 FN in the abnormal lymph flag and 4 FN in the atypical lymph flag. From the samples with an initial positive WBC suspect flag ($n=58$) the flag Blasts/Abnormal lymph? was demonstrated in 40 cases, the combined flag Blasts/Abnormal lymph?/Atypical Lymph? in 15 cases and the flag Atypical Lymph? in 4 cases. From the 55 samples with the initial WBC IP suspect flags Blasts/Abnormal lymph? or Blasts/Abnormal lymph?/Atypical Lymph? a reflex test was performed within the WPC channel which resulted in a negative flagging in 14 cases.

Conclusion: With the more specific flagging from the WPC channel slide reviews were reduced with 25%. Atypical and abnormal lymphocytes are microscopically difficult to distinguish, which may have resulted in a high number of false-negatives. For proper evaluation additional immunocytological studies should be performed in pathological samples.

11. Het effect van buizenpost op stollingsparameters: "To walk or not to walk"

D.S. BOSS¹, C.M. HACKENG¹, E. VLOT², D. van LOON¹

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, St Antonius ziekenhuis, Afdeling Anesthesiologie², St Antonius ziekenhuis, Nieuwegein en Utrecht

Inleiding: De SKML adviseert om buizen voor stollingsonderzoek in verticale positie te vervoeren, een eis waar een buizenpoststelsel niet aan kan voldoen. In dit onderzoek is gekeken naar het effect van het versturen van samples met de buizenpost op de uitkomst van diverse stollingstesten.

Methode: Bij vrijwilligers ($n=20$) zijn 2 EDTA buizen en 2 Natriumcitraatbuizen (3,2 %) afgenomen, bij 10 intensive-care patiënten bij wie reeds screenend stollingsonderzoek was aangevraagd ($n=10$) is 1 extra Natriumcitraatbuis afgenomen. Van ieder buis type is na afname 1 buis lopend (verticaal gepositioneerd) richting het laboratorium vervoerd en 1 buis met de buizenpost getransporteerd (afstand circa 250 m). Naast de stollingstesten aPTT, PT, fibrinogeen en factor VIII is een vergelijk gedaan op de trombocytentelling. Voor iedere bepaling is de reference change value (RCV) berekend. De uitkomsten van de bepalingen na lopend transport zijn vergeleken met de uitkomsten na transport met de buizenpost

middels een gepaarde t-toets. Daarnaast is gekeken naar de klinische relevantie van de gevonden verschillen na transport met buizenpost en lopend transport (op basis van de RCV).

Resultaat: Zowel in de populatie vrijwilligers als in de populatie intensive-care patiënten werden geen significante verschillen gevonden. Gemiddelden van de gehele populatie (lopend versus buizenpost): Trombocyten $186*109/l$ vs $185*109/l$; aPTT 35,9 sec vs 35,8 sec; PT 14,0 sec vs 14,1 sec; fibrinogeen 3,37 g/l vs 3,39 g/l; factor VIII act 215% vs 218%. De verschillen die bij individuele vrijwilligers/patiënten gevonden werden waren op 1 uitzondering na niet klinisch relevant. Deze uitzondering betrof trombocytentellingen bij een intensive-care patiënt van $55*109/l$ na lopend transport en $77*109/l$ na transport met de buizenpost.

Conclusie: Wij beschouwen de gevonden resultaten valide om buizen voor screenend stollingsonderzoek met de buizenpost te versturen.

12. Keuze combinatie deficiënte plasma's en APTT reagens voor bepaling intrinsieke stollingsfactoren op de STA-R

F.A. HELMICH

Klinisch laboratorium, Máxima Medisch Centrum, Eindhoven en Veldhoven

Inleiding: De intrinsieke stollingsfactoren worden op ons lab tweewekelijks bepaald middels een 1/10-verdunde APTT, gebruik makende van STA-APTT (reagens) en oude generatie Immun Depleted (ID, factor deficiënt plasma). Elke meet-serie begint met een nieuwe kalibratielijijn waarop patiënten monsters/controles worden gekwantificeerd. Wij zijn ontvreden over reproduceerbaarheid van ijklijnen en controlemonsters. Naast precisie zitten we niet altijd juist in de externe rondzending. Mede in het kader van ons Hemofilie Behandel Centrum ZON analyseren wij veel monsters waarbij accurateid bij lage concentraties essentieel is. Dit resulteerde in een algehele herziening van de analyse van F-VIII/IX/XI/XII met nieuwe soorten factor deficiënte plasma's en APTT reagentia. **Methode:** De plasma's van een nieuwe generatie ID, Affinity Biological en Precision Biologic zijn allen getest met Kaoline en Cephascreen. Er is gekeken naar de respons en vorm van ijklijnen (Fase 1), stabiliteit van ijklijn (Fase 2) en een patiënten

vergelijk (Fase 3) van de optimale combinatie APTT reagens en factor deficiënt plasma.

Resultaat: Alle ijklijnen laten een logisch en lineair verloop zien tussen 0 en 100%, echter buigen enkele af bij lage concentraties. De beste combinatie is Kaoline met de nieuwe generatie ID. Voor juiste waarden in het lage gebied zijn voor F-VIII en IX ijklijnen tussen 0 en 20% opgesteld gebaseerd op een 1/2-verdunde APTT. De ijklijnen zijn reproduceerbaar zodat slechts gekalibreerd moet worden op geleide van lotnummerwisseling.

Conclusie: De intrinsieke stollingsfactoren worden reproduceerbaar bepaald met de nieuwe generatie ID in combinatie met Kaoline. Standaard worden de monsters in parallelisme gemeten; eerste meting in 1/20-verdunning en een confirmerende analyse in de 1/10-verdunning (<100%) of 1/40-verdunning (>100%). Voor F-VIII wordt een confirmerende analyse in 1/2-verdunning gemeten indien concentratie <20%.

Categorie 1 Analytisch

Immunoassay, (bloedgroepen-)serologie

13. Evaluation of the Fujirebio 25OH vitamin D assay

J.P.M. WIELDERS, J.M.W. van den OUWELAND

Klinisch laboratorium, Meander Medisch Centrum, Amersfoort; Klinisch laboratorium, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen

Introduction: Reliable 25(OH)vitamin D (25OHD) assays are essential for measuring the vitamin D status. Fujirebio Europe introduced in 2013 its Lumipulse® G 25-OHVitamin D assay, which claims equimolar measurement of both 25OHD3 and 25OHD2. We tested its precision and linearity, imprecision profile and correlation with a calibrated LC-MS/MS as well as two other 25OHD immunoassays.

Methods: A CLSI-EP10 protocol and BioRad Immunoassay Special 1 and 3 controls were used for basic precision and linearity testing. Method correlation was performed with 60 left-over human serum samples using a CLSI-EP9 protocol. The LUMIPULSE® G 600-II analyzer and the Lumipulse G 25-OHVitamin D kit were used as prescribed by Fujirebio Europe. The LC-MS/MS calibration was verified using the "Thienpont" reference serum panel for 25OHD (LabQuality). AbbottArchitect and BeckmanAccess assays were used as prescribed by the manufacturers.

Results: Correlation of our LC-MS/MS method with LabQuality by Deming regression was excellent LC-MS/MS=1.01xLabQuality-1.4 (R=0.998). The Lumipulse G assay correlated very well with LC-MS/MS by Deming regression: Lumipulse=0.97xLC-MS/MS-5.2 nmol/L; R=0,986 with a mean negative bias of 7.5 nmol/l. The LOQ at 10 % CV is 15 nmol/L and the assay was linear over the range 15 - 150 nmol/L. Lumipulse 'total' CV was 4.1 % at 37 nmol/l and 1.3% at 191 nmol/l. Correlations for competitors against LC-MS/MS were BeckmanAccess=0.95xLC-MS/MS+1.9 (R=0.901) and AbbottArchitect =1.24xLC-MS/MS - 10.8 (R=0.920).

Conclusion: We found the new Fujirebio Lumipulse G 25-OHVitamin D kit suitable for measuring total 25OHD in serum. Correction for a small negative bias could be considered. Reproducibility and correlation with LC-MS/MS were high.

14. Validation of the Roche second generation Elecsys Thyroglobulin II assay and determination of the reporting limit using Thyroglobulin negative patient samples

D.M. ROTTEVEEL-de GROOT¹, H.A. ROSSI¹, R.T. NETEA-MAIER², M.J.R. JANSSEN³, J.D. OOSTING¹, F.C.G.J. SWEEP¹, A.E. van HERWAARDEN¹

Afdeling laboratoriumgeneeskunde, afdeling algemene interne geneeskunde², afdeling nucleaire geneeskunde³, Radboudumc¹, Nijmegen

Introduction: Thyroglobulin (Tg) assays are used to monitor for residual thyroid tissue in patients with differentiated thyroid cancer after thyroidectomy and radioiodine ablative therapy. In recent years highly sensitive Tg assays have been developed to be able for detection of basal Tg without TSH-stimulation. **Methods:** In this study we have evaluated and compared the analytical performance of the Roche® second generation Elecsys Tg II assay on a Modular E170 random access analyser with the Access2 Tg assay (Beckman-Coulter). In addition, the upper reference limit of the Elecsys Tg II assay was determined using truly Tg negative patient samples.

Results: Non-linearity, drift and carry-over according to CLSI EP10 and EP6 in a measuring range of 0.04 to 500 ng/mL were non-significant. Total precision according to CLSI EP5 was 10% at a Tg level of 0.08 ng/mL. Despite calibration with CRM457 in both Roche and Beckman Tg methods, a comparison with anti-Tg negative patient sera performed according to a modified CLSI E9 protocol shows a significant slope of 1.5 with no significant intercept. Using human sera truly negative of Tg we determined an upper reference limit of the 99.9% confidence interval of 0.06 ng/mL as a reporting limit of the assay.

Conclusion: In conclusion, in our hands the Elecsys Tg II assay shows a good analytical performance. Patient samples measured with this assay have an approximately 1.5 times higher value in comparison with the Access2 Tg assay. Finally,

we determined an upper reference limit of the confidence interval of 0.06 ng/mL as a clinical decision point for residual or recurrence of DTC.

15. EliA-TPO: een nieuwe assay voor de detectie van antistoffen tegen TPO

M.H.M.T. de KONING¹, W.A.T. SLIEKER², I-A.HAAGEN¹

Hematologisch Klinische Chemisch Laboratorium, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis¹, Amsterdam, Laboratorium voor Klinische Chemie, Hematologie en Immunologie, Medisch Centrum Alkmaar², Alkmaar

Inleiding: Antistoffen tegen thyroïd peroxidase (TPO) worden aangetroffen bij >90% van de patiënten met Hashimoto's thyreoïditis en primaire myxoedeem en bij 40-75% van de patiënten met andere auto-immuun ziekten van de schildklier zoals de ziekte van Graves en postpartum thyroïdie. Nu worden op de Phadia250 van TFS antistoffen tegen TPO bepaald met de ImmunoCAP techniek. Deze studie beschrijft de validatie van de nieuwe EliA-TPO op de Phadia250 t.o.v. de huidige methode en de kliniek. Volgens de leverancier zou de EliA methode een betere sensitiviteit bij gelijkblijvende specificiteit vertonen.

Methode: Patiënten monsters, n=71, zijn geselecteerd op basis van de aanwezigheid van antistoffen met de ImmunoCAP-TPO methode. De verdeling van de sera op basis van de gemeten antistoffen was als volgt: veertien <26 kU/L, vierentwintig 26-60 kU/L, twintig 60-100 kU/L en dertien >100 kU/L. Monsters zijn vervolgens gemeten met de EliA methode.

Resultaat: Voor antistoffen tegen TPO met de ImmunoCAP methode wordt als referentie interval <60 kU/L gebruikt. Het referentie interval voor de EliA methode is <25 kU/L, met een dubieus gebied tussen de 25-35 kU/L. Omdat er een lineair verband lijkt te zijn tussen de ImmunoCAP en de EliA methode, worden meer positieve patiënten monsters gevonden met de EliA. Voor zo ver was na te gaan zijn deze monsters van patiënten met een kliniek van subklinische/primaire hypothyroïdie. Met monsters uit SKML rondzendingen is de concordantie 100% (n=8). Eén monster is niet conclusief: de ImmunoCAP methode scoort negatief terwijl de EliA methode, net als de luminescentie methode groep, positief scoort.

Conclusie: De EliA methode op de Phadia250, TFS, toont voor de detectie van antistoffen tegen TPO een hogere sensitiviteit, met geringe afname van de specificiteit, ten opzichte van de huidige ImmunoCAP techniek.

16. Validatie EliA-TPO van Thermo Fisher Scientificx

M. de LEEUW-TERWIJN¹, G.J. VRIELINK¹, I.A. HAAGEN², M.M.L. DECKERS¹

Klinisch Laboratorium, Sint Lucas Andreas Ziekenhuis¹, Amsterdam, Hematologisch Klinisch Chemisch Laboratorium, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis², Amsterdam, Nederland

Inleiding: Antistoffen tegen thyreoperoxidase (anti-TPO) worden bepaald bij patiënten met verdenking op auto-immuun schildklierlijden of subacute thyreoïditis. De helft van de laboratoria in Nederland gebruikt de ImmunoCAP methode van Thermo Fisher Scientific (TFS). Eind 2014 bracht TFS de EliA-TPO op de markt, waarbij een hogere sensitiviteit met behoud van specificiteit werd geclaimd. Deze laatstgenoemde assay werd gevalideerd en vergeleken met de anti-TPO test van Siemens uitgevoerd op de Centaur.

Methode: Patiëntmonsters met bekende schildklierwaarden en anti-TPO uitslagen (n=44) zijn geselecteerd en gemeten met de EliA methode. Hiervan waren er 14 onder het meetbereik van de Centaur, 2 onder de cut-off van 65 kU/L en 29 boven de cut-off. Discrepante uitslagen zijn vergeleken met de ImmunoCAP methode.

Resultaat: De reproduceerbaarheid van de assay was goed (intra-assay variatie <6%, inter-assay variatie 2.1%). Uitgaande van de cut-off voor de EliA™ methode van 25 kU/L en een dubieus gebied van 25- 35 kU/L waren 16 samples in beide assays negatief en 25 samples in beide assays positief en 3 monsters waren discordant. De discrepante samples, allen negatief in de ELiA, zijn gemeten met de ImmunoCAP en kwamen allen overeen met de EliA. Eén van de drie discrepanties was mogelijk foutief negatief in de EliA test, 1 foutief positief in de Centaur en 1 waarde lag rond de cut-off van de Centaur. Om het referentiegebied te toetsen is anti-TPO in 20 donoren met normale schildklierwaarden gemeten. Bij 1 donor werd een positieve anti-TPO gemeten in zowel de Centaur als de EliA conform de te verwachten frequentie in een gezonde populatie. *Conclusie:* De TPO EliA test heeft een acceptabele VC en goede concordantie met de methode van de Centaur.

17. Interferentie van monoclonale antilichaam therapie op bloedtransfusie serologie: een complexe zaak

M. OOSTENDORP¹, J.J. LAMMERTS van BUEREN², P. DOSHI³, I. KHAN³, T. AHMADI³, P.W.H.I. PARREN², W.W. van SOLINGE¹, K.M.K. de VOOGHT¹

Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht¹, Utrecht, Genmab², Utrecht, Janssen Pharmaceutical Companies LLC³, Spring House, NJ, USA

Inleiding: Monoclonale antilichamen (mAbs) vormen een snel groeiende klasse van geneesmiddelen voor de behandeling van een verscheidenheid aan ziektes. Deze middelen kunnen echter storen op laboratoriumonderzoek. Wij beschrijven een onverwachte interferentie van een nieuwe therapeutische mAb, welke is gericht tegen CD38 en wordt toegepast bij patiënten met multipel myeloom, in de indirecte antiglobuline test (IAT). Deze interferentie heeft een grote impact op het bloedtransfusiebeleid, omdat er geen negatieve screening en kruisproeven kunnen worden verkregen tijdens therapie.

Methode: De IAT werd uitgevoerd in de LISS-techniek met 3 en 11-cels panels (Ortho). De interferentie van de anti-CD38 mAb werd bestudeerd door vers bevroren plasma te spiken met verschillende concentraties antilichaam en dit plasma te gebruiken voor het serologisch onderzoek. Daarnaast werd onderzocht of de interferentie kon worden voorkomen door het toevoegen van twee verschillende blokkerende stoffen aan het plasma: een specifiek anti-idiotypie antilichaam en recombinant CD38 eiwit. *Resultaat:* Toevoeging van de anti-CD38 mAbs aan het plasma resulteerde in een foutief positieve IAT, waarbij de

agglutinatiesterkte afhankelijk was van de antilichaamconcentratie. Door toevoeging van het anti-idiotypische antilichaam of het CD38 eiwit kon de interferentie worden voorkomen. Tevens konden hiermee bekende irregulaire antistoffen correct worden geïdentificeerd tijdens therapie met anti-CD38 antilichamen.

Conclusie: Behandeling van patiënten met monoclonale antilichamen tegen CD38 resulteert in foutief positieve uitslagen in de IAT. Door toevoeging van blokkerende stoffen aan

het plasma kon de interferentie worden voorkomen. Deze studie toont aan dat de mogelijke interferentie van monoclonale antilichamen met laboratoriumonderzoek (waaronder bloedtransfusieserologie) onderzocht moet worden tijdens de ontwikkeling van deze therapieën. Hierdoor kan een mogelijke interferentie adequaat worden geïdentificeerd en kunnen passende oplossingen worden ontwikkeld die zorgdragen voor een veilige bloedtransfusieketen.

18. How do first, second, and third generation ANCA assays relate in daily clinical practice?

J.A.P. BONNS¹, P. van PAASSEN², J. DAMOISEAUX¹

Central Diagnostic Laboratory¹, Department of Internal Medicine², Maastricht University Medical Center, Maastricht, The Netherlands

Introduction: Antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) tests are used to diagnose and monitor disease activity in ANCA-associated vasculitis (AAV). There are different antigen-specific ANCA tests: first, second and third generation immuno-assays. We retrospectively examined whether the increased sensitivity of third generation assays equals the high sensitivity of second generation assays for PR3-ANCA. Furthermore, we evaluated if third generation ANCA assays share the high specificity of second generation assays for both MPO- and PR3-ANCA.

Methods: Patient data were extracted from our hospital information system. Patients were included with a first ANCA request one year before or one year after shifting from first to third generation assay. ANCA screening was performed by indirect immunofluorescence technique on ethanol-fixed granulocytes (INOVA Diagnostics). Immuno-assays used were: first generation test (direct-FEIA; Thermo Fisher

Scientific), second generation test (Wieslab capture ELISA; Euro-Diagnostica), and third generation test (anchor-FEIA; Thermo Fisher Scientific).

Results: Second generation PR3-ANCA testing did not reveal any positive result in C-ANCA positive samples with a negative PR3-ANCA by first (n=64) or third generation assays (n=31). First and third generation positive results were confirmed in second generation assays with a concordance of 38% and 80%, respectively. Results of first, second, and third generation tests were differentially in line with presence or absence of AAV: 6/16 (37%), 25/36 (69%), and 9/20 (45%), respectively.

Conclusion: In our study population the previously described high sensitivity of the second generation PR3-ANCA assays could not be confirmed. Although the specificity of the third generation assays is slightly increased, confirmation with second generation tests remains indicated.

19. Evaluatie van twee POCT troponine I bepalingen

L.W. NEKEMAN¹, H. van INGEN¹, C. RAMAKERS², F.J. LOUPATTY³, A. de WAARD¹

Klinisch Chemisch Laboratorium, Star-MDC¹, Afdeling Klinische Chemie, Erasmus Medisch Centrum², Rotterdam, Afdeling Klinische Chemie Reinier de Graaf Gasthuis³, Delft

Inleiding: Analytische en klinische validatie van 2 POCT Troponine I testen; AQT-90 Flex (Radiometer) en de Pathfast (Mitsubishi Chemical Medicine Corporation).

Methode: Een methodevergelijk is uitgevoerd met heparineplasma afkomstig van 59 patiënten (afd. Thoraxcentrum, ErasmusMC). Hierbij zijn de resultaten vergeleken met onze huidige hs-cTnI test (Beckman Coulter). De within-run en totale precisie in plasma is geverifieerd op 3 nivo's met een gemodificeerd CLSI EP 15 protocol. Vergelijkbaarheid tussen volbloed en corresponderend plasma is gecontroleerd. Voor de klinische validatie zijn de patiënten geclassificeerd op basis van verslaglegging in het elektronisch patiëntendossier en/of de hs-cTnI uitslag van het Erasmus MC.

Resultaat: Het methodevergelijk gaf de volgende Passing-Bablok regressies. DxI (x) vs AQT-90 (y): $y=0,22x+1,1$, $r^2=0,92$, $n=88$. DxI (x) vs Pathfast (y): $y=0,38x-2,35$, $r^2=0,89$, $n=88$. In plasma werden m.b.v. EP15 de volgende CV's gevonden bij de 99e percentiel: (nivo / within run precision / total

precision): AQT-90: 24 ng/l / 7,5% / 8,1%; Pathfast: 24 ng/l / 4,6% / 4,6%. Uit de klinische validatie volgt dat 9 van in totaal 24 gevallen van Acuut Coronair Syndroom worden gemist met de AQT-90, 6 met de Pathfast.

Conclusie: Beide POCT apparaten voldoen ruimschoots aan het criterium <10% CV bij de 99e percentiel. Het methodevergelijk laat zien dat beide POC testen veel lagere uitslagen produceren dan de DxI. De correlaties (r^2) van de apparaten zijn laag, maar verklaarbaar omdat Troponine I testen niet zijn geharmoniseerd. Het onderzoek toont aan dat klinisch relevante uitkomsten worden gemist. De Troponine I test op de Pathfast en de AQT-90 kunnen beide niet worden ingezet ter vervanging van de hs-cTnI bepaling (Beckman Coulter).

Literatuur: De Jong et al. Nauwkeurigheid en precisie van drie POCT D-dimeren meters. Ned. Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2014, 39:158-159.

20. Analytical performance of commercially available ELISA kits for quantification of infliximab and antibodies-to-infliximab

E.M.H. SCHMITZ^{1,2,3,4}, M.A.C. BROEREN^{1,2}, D. van de KERKHOF^{1,3}, J.L.J. van DONGEN^{1,4}, P. KUIJPER^{1,2}, V. SCHARNHORST^{1,3,4}, L. BRUNSVELD^{1,4}

Expert Center Clinical Chemistry Eindhoven¹, Máxima Medical Center², Clinical laboratory, Veldhoven, Clinical laboratory Catharina Hospital³, Eindhoven, Laboratory of Chemical Biology Eindhoven University of Technology⁴, Eindhoven, the Netherlands

Introduction: Infliximab (IFX; Remicade®) is effectively used as second line treatment for inflammatory diseases. However, a substantial number of patients is resistant to IFX (1). This could be due to various reasons, demanding different treatment optimization strategies. The trough level of IFX and presence/absence of antibodies-to-infliximab (ATI) predict the cause of non-response. Therapeutic drug monitoring (TDM) as part of routine care could thus improve therapy efficiency and reduce costs (2). In this study, we determined whether commercially available ELISA kits for quantification of IFX and ATI have acceptable analytical performance for TDM purpose.

Methods: The commercially available kits of Theradiag, Progenika and apDia for quantification of IFX and ATI were implemented on a DSX 4-Plate ELISA Processing System. Imprecision was determined by triplicate measurements of patient samples on five days. To determine accuracy, patient samples and spiked samples were measured and sent to

Sanquin Research. Comparison was done by calculating linear regression and constructing Bland-Altman plots.

Results: Imprecision was considered acceptable for the ELISA kits (IFX: $\leq 21\%$, ATI: $\leq 31\%$). Due to the sigmoid calibration line of Theradiag's and Progenika's kits, imprecision is higher near the limits of quantification. This is not the case for the apDia kit, which has a linear calibration line. Also, differences in accuracy were found between the assays. For the ATI assays, sensitivity and quantification range were not comparable.

Conclusion: Despite the fact that the tested ELISA kits show differences in both imprecision and accuracy, we believe that each kit could be suitable for TDM. However, application of a therapeutic range for IFX will be problematic without assay standardization.

Literature: 1) Dignass et al. J Crohns Colitis 2012;10:991-1030. 2) Steenholdt et al. Gut 2014;6:919-27.

Categorie 1 Analytisch

Chromatografie: HPLC, GC, CE

21. Ion chromatography for the precise analysis of chloride and sodium in sweat

J. DOORN¹, T.T.R. STORTEBOOM¹, A.M. MULDER¹, W.H.A. de JONG¹, B.L. ROTTIER², I.P. KEMA¹

Department of Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen¹, Groningen, Department of Pediatric Pulmonology and Allergy, Beatrix Children's Hospital/University Medical Centre Groningen², GRIAC Research Institute, Groningen, the Netherlands

Introduction: Patients with cystic fibrosis (CF) excrete abnormally high amounts of chloride in sweat. The 'sweattest' therefore remains an essential part of the diagnostic algorithm in CF. In our laboratory, chloride in sweat used to be determined using coulometry, however, this method no longer met quality requirements. In addition, elevated chloride concentrations may be caused by conditions other than CF and additional measurements of sodium concentrations may aid the interpretation. Therefore, we developed an ion chromatography (IC/HPLC) method for the analysis of both chloride and sodium concentrations in sweat.

Methods: Total sweat was dissolved by incubating the filter paper in ultra pure water. Chloride and sodium concentrations were determined by IC/HPLC. The IC system consisted of a Metrohm 861 Advanced compact IC equipped with a conductivity detector. For details on chromatographic separation see [1]. The assay was calibrated by sodium and chloride standards.

Precision, linearity and limit of quantitation were established. Passing and Bablok method comparison was performed with the traditional Chlorocounter and with RCPA external quality assurance (EQA) material.

Results: Total analysis time including controls and blanks was around 3hrs for chloride and another 3hrs for sodium. Inter-assay variation was 2.6% for chloride and 4.9% for sodium (at 25 mmol/L), LOQ was established at 0.95 mmol/L for chloride and 0.35 mmol/L for sodium and the method was linear up to 400 mmol/L. No interfering peaks were observed. Passing and Bablok analysis demonstrated excellent correlation with both the chlorocounter (chloride) and RCPA EQA samples (chloride and sodium).

Conclusion: The developed IC/HPLC method demonstrates high precision, trueness, a wide linear range and an excellent LOQ.

Literature: 1. Doorn et al. Ann Clin Biochem. 2014 Aug 15. [Epub ahead of print]

Categorie 1 Analytisch

Vlamfotometrie, AAS, massaspectrometrie

22. Liquid chromatography tandem mass spectrometry based method for serum serotonin

H.H. van ROSSUM, O. van TELLINGEN, D. LINDERS, M. BUNING-KAGER, D. van den BROEK, C.M. KORSE
Algemeen klinisch laboratorium, Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis, Amsterdam

Introduction: Serotonin is an important neurotransmitter and paracrine agent that is used diagnostically for diagnosis and follow-up of carcinoid tumors. We have developed and validated a liquid chromatography tandem mass spectrometry based method for measurement of serum serotonin.

Methods: Serum and EDTA anti-coagulated whole blood was collected for serotonin and thrombocyte measurement respectively. Serotonin-d4 was used as internal standard (IS) and a liquid-liquid extraction was used for sample preparation. Serotonin was analyzed using reverse phase chromatography

and positive mode electron spray ionization. Mass spectrometry was run in multiple reaction monitoring modus on a API3000 system and the 177->160 and 177->115 m/z transitions were used as quantifier and qualifier respectively. Analytical method validation included assay accuracy; 5 levels determined in 10 runs 4 times per run; linearity; interference studies for hemolytic, icteric, lipemic samples and related compounds; and sample stability. 50 patient samples were used for method comparison with whole blood serotonin assay (HPLC-ECD). For comparison of these methods, serotonin concentrations were expressed per thrombocyte.

23. LC-MS/MS measurement of plasma free metanephrines and 3-methoxytyramine

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

Introduction: Pheochromocytoma and Paragangliomas (PPGLs) are tumours of adrenal chromaffin cells or similar tissue in extra-adrenal paraganglia. PPGLs are characterized by secretion of catecholamines and associated signs and symptoms of catecholamine excess. Initial biochemical testing for PPGLs should include measurements of urinary fractionated metanephrines or plasma free metanephrines, the latter showing highest diagnostic sensitivity. We have developed a novel, sensitive and specific method for measurement of free normetanephrine (NMN), metanephrine (MN) and 3-methoxytyramine (3-MT) in plasma by LC-MS/MS.

Methods: Free MN and NMN are extracted from 500 ml of plasma using solid phase extraction. The concentrated eluate is analyzed by LC-MS/MS using an Acquity UPLC HSS T3 column and a Xevo TQS MS (Waters) and quantified using stable isotope labeled internal standards, d(3)-MN, d(3)-

Results: The analytical accuracy determined at 91, 223, 953, 1524 and 7195 nmol/L were all <5%. The serotonin assay was found to be linear and no interference was observed for tryptophan, melatonin, 5-OH-tryptophan and N-ac-serotonin. Method comparison data obtained by Passing Bablok regression and Spearman correlation were LC-MS=1.02x(HPLC-ECD) - 0.91 and r=0.98.

Conclusion: An LC-MS/MS based assay for serum serotonin was developed that showed adequate analytical performance. Method comparison revealed that the whole blood serotonin assay can reliably be replaced by the serum serotonin assay.

NMN and d(3)-3-MT. Imprecision, linearity and method comparison to LC with electrochemical detection (LC-EC) were established.

Results: Free plasma NMN, MN and 3-MT were base-line separated eluting at 1.2, 1.6 and 2.3 min, respectively. The assay was linear from 0.1-25 nmol/L for NMN and MN and from 0.06-10 nmol/L for 3-MT. Intra-assay and inter-day coefficients of variation were <5,3% and <15% at medium/high and low concentrations, respectively. Excellent correlation with LC-EC was found (Passing-Bablok regressions: slope=0.99, intercept=0.01, r=0.98 for MN (n=26) and slope=0.99, intercept=0.07, r=0.99 for NMN (n=26)).

Conclusion: We have developed a sensitive and specific LC-MS/MS method for the measurement of O-methylated metabolites of catecholamines (NMN and MN) and dopamine (3-MT) in human plasma.

24. Quantitation of desmosine and isodesmosine in urine and plasma by LC-MS/MS as biomarkers for elastin degradation

J.M.W. van den OUWELAND¹, M. SPANBROEK², R. JANSSEN², A. BEIJERS¹, H. van DAAL¹
Department of Clinical Chemistry¹ and Pulmonary Disease², Canisius Wilhelmina Hospital, Nijmegen, The Netherlands

Introduction: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by the degradation of elastin, the major insoluble protein of lung tissues. Its degradation gives rise to desmosine (DES) and isodesmosine (IDS) in body fluids. DES and IDS are promising biomarkers for estimating activity of elastin degradation, although their clinical validity and utility remain uncertain due to the lack of reliable and sensitive assays. The objective of this study was to develop and validate a stable isotope dilution LC-MS/MS method for measurement of DES and IDS in urine and plasma.

Methods: The method is based on spiking with a deuterium-labeled desmosine standard (D4-DES) to urine or plasma sample, acid hydrolysis (o/n at 110 °C), SPE using cellulose, C18 chromatography using 5mM NH₄COOH in H₂O/MeOH

+ 0,1% HFBA and positive ESI MS/MS analysis (Xevo TQS, Waters) by SRM monitoring of transition ions 526-481 for DES, 526-397 for IDS and 530-486 for D4-DES. Lower limit of quantitation (LLOQ), imprecision profile, linearity and recovery were established.

Results: DES and IDS were base-line separated, eluting at Rt 6.6 and 6.3 min. LLOQ was 0.1 ng/mL. Intra- and inter-assay imprecision were <10%. The assay was linear up to 10 ng/mL. DES and IDS recoveries were within 80-120%.

Conclusion: We have developed a sensitive and specific assay for the measurement of DES and IDS in human urine and plasma. This method can be used to assess the potential of DES and IDS as biomarkers for estimating disease activity in COPD and the effect of therapeutic interventions.

25. Development of a quantitative mass spectrometry assay for determining the fragmentation of cardiac troponin T in serum of patients with acute myocardial infarction

A.S. STRENG¹, D. de BOER¹, F.G. BOUWMAN², E.C.M. MARIMAN², M.P. van DIEIJEN-VISSER¹, W.K.W.H. WODZIG¹
Central Diagnostic Laboratory, Maastricht University Medical Centre, Maastricht¹, Department of Human Biology, Maastricht University, Maastricht², the Netherlands

Introduction: Cardiac troponin T (cTnT) is an important biomarker for the diagnosis of acute myocardial infarctions (AMI). However, cTnT is thought to be highly fragmented in the serum of patients suffering from AMI. Mass spectrometric assays can be used to identify and quantify these fragments.

Methods: cTnT and cTnT-fragments were isolated from serum using immunoprecipitation employing the M11.7 catcher antibody (Roche Diagnostics) and fractionated with SDS-PAGE. Coomassie stained bands at 37, 27, 18 and 16 kDa were excised and digested with trypsin.

Digests were analysed on a QExactive instrument (Thermo Scientific) set on targeted Selected Ion Monitoring (t-SIM) mode with data dependent tandem-MS (dd-MS2) for identification. Results were analysed with Skyline. *Results:* This t-SIM/dd-MS2 method was first validated using a set of seventeen synthesised cTnT peptides of interest. A dilution series of cTnT in serum was then created to validate the linearity and sensitivity. Area under the curve (AUC) of the selected precursor chromatograms was calculated and normalised. We demonstrated a linear relationship between the initial cTnT concentration and the selected peptides. Next, we incubated intact cTnT in human serum at 37°C for up to

48 h to induce fragmentation. cTnT peptides were identified in all excised bands, confirming the existence of cTnT fragments. In all fragment bands, the AUC intensities of various peptides collapsed; indicating the removal of these specific peptides from the respective cTnT-fragments. Lastly, this method was applied to serum samples from patients suffering from AMI, confirming these findings.

Conclusion: A quantitative targeted mass spectrometric method was developed to pinpoint the molecular changes of cTnT in human serum. Using this method we identified cTnT-fragments, and their cleavage sites, in the serum of AMI patients.

26. Comparison of seven LC-MS/MS methods for the simultaneous measurement of testosterone, androstenedione and DHEA in serum

R.M. BÜTTLER¹, F. MARTENS¹, F. FANELLI², B.G. KEEVIL³, H.T. PHAM⁴, M.M. KUSHNIR⁵, A.E. TAYLOR⁶, T. SOEBORG⁷, M.A. BLANKENSTEIN¹, A.C. HEIJBOER¹

Endocrine Laboratory, department of Clinical Chemistry, VU University Medical Center¹, Amsterdam. Endocrinology Unit and Center for Applied Biomedical Research, Department of Medical and Surgical Sciences, S.Orsola Malpighi Hospital² - University of Bologna. Department of Clinical Biochemistry, University Hospital of South Manchester³, Manchester, United Kingdom. BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck⁴, Austria. Department of Pathology, University of Utah, Salt Lake City⁵, USA and ARUP Institute for Clinical and Experimental Pathology, Salt Lake City, USA. Centre for Endocrinology, Diabetes and Metabolism, School of Clinical and Experimental Medicine, University of Birmingham⁶, United Kingdom. Department of Growth and Reproduction, Faculty of Health and Medical Sciences, Rigshospitalet, Copenhagen University Hospital⁷, University of Copenhagen, Denmark

Introduction: Recently, Liquid-chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was stated to be the method of choice to measure sex steroids (1). Information on the mutual agreement of LC-MS/MS-methods, however, is scarce. Therefore, we compared seven published LC-MS/MS-methods for the simultaneous measurement of testosterone, androstenedione and DHEA.

Methods: Fifty-five random serum samples obtained from volunteers were analyzed in duplicate by seven published LC-MS/MS methods (2-7). We calculated a Passing-Bablok regression line and a Pearson's correlation coefficient to assess the agreement of the investigated methods with one of the methods, arbitrarily chosen as "reference method". We calculated the intra-assay coefficient of variation using the duplicate results.

Results: Concentrations of testosterone, androstenedione and DHEA were 0.2-29 nmol/L, 0.4-5.2 nmol/L and 1.8-18 nmol/L, respectively. The slopes of the regression lines ranged from 0.92-1.10 and 0.94-1.17 for all testosterone

values and testosterone for concentrations below 2 nmol/L, respectively. For androstenedione and DHEA the slopes were 0.77-1.24 and 0.97-1.23, respectively. The correlation coefficients ranged 0.987-0.998, 0.926-0.988, 0.803-0.998 and 0.955-0.983 for all testosterone values, testosterone below 2 nmol/L, androstenedione and DHEA, respectively. The intra-assay CVs were 1.6-6.2%, 3.4-17%, 3.1-12% and 4.3-16% for all testosterone values, testosterone concentrations below 2 nmol/L, androstenedione and DHEA, respectively.

Conclusion: In general the investigated LC-MS/MS methods showed a good agreement. However, there appear to be differences in standardization between some of the assays and a high variation in some of the assays.

Literature: 1) Handelsman DJ et al. J Clin Endocrinol Metab 2013. 2) Büttler RM et al. Clin Chim Acta 2014. 3) Fanelli F et al. Steroids 2011. 4) Koal T et al. J Steroid Biochem Mol Biol 2011. 5) Kushnir MM et al. Clin Chem 2010. 6) O'Reilly MW et al. J Clin Endocrinol Metab 2014. 7) Soeborg T et al. Clin Chim Acta 2013.

Categorie 1 Analytisch

Moleculaire biologie

27. Multiple ligase probe amplification (MLPA) for the detection risk alleles HLA DQ2.2, DQ2.5 and DQ8 in celiac disease

A.J. van GAMMEREN¹, R. VIJZELAAR², E. de BAAR¹, L. SCHRAUWEN¹, E. van der ZWAN³, R. YILMAZ², I. van HOOGSTRATEN⁵, A. VERHEUL⁴, W. KORTLANDT⁴

Laboratory of Clinical Chemistry and Hematology, Amphia Hospital¹, Breda, MRC-Holland BV², Amsterdam, Laboratory of Clinical Chemistry and Hematology, Sint Franciscus Gasthuis³, Rotterdam, Laboratory of Clinical Chemistry and Hematology, Diaconessenhuis⁴, Utrecht, Department of Pathology VU Medical Center⁵, Amsterdam The Netherlands

Introduction: Celiac disease is strongly associated with HLA haplotypes HLA-DQ2.5 (HLA-DQA1*05 / HLA-DQB1*02) and HLA-DQ8 (HLA-DQA1*03 / HLA-DQB1*0302). Recently also HLA-DQ2.2 (HLA-DQA1*02 / HLA-DQB1*02) has been identified as being related inextricably to celiac disease. Genetic HLA- DQ2.5, DQ2.2, and DQ8 testing has a very strong negative predictive value for celiac disease. Testing for these alleles is very useful to discriminate individuals who are genetically susceptible to celiac disease.

Methods: A multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) assay (MRC-Holland) has been innovated to confirm or exclude all relevant DQ2.5, DQ2.2 and DQ8 haplotypes in one single PCR reaction.[1] The MLPA test has been validated by two independent centres using 39 samples consisting of the HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 and HLA-DQ8 variants and various combinations of these haplotypes, as well as negative samples. Reference genotyping using conventional methods was performed by either the VU medical center (Amsterdam, the Netherlands) or Sanquin (Amsterdam, the Netherlands).

Results: MLPA analysis of HLA-DQ2.2 HLA-DQ2.5 and HLA-DQ8 was 100% in agreement with the results of conventional DNA analysis methods, used by the reference centres.

Conclusion: The MLPA method is a multiplex PCR assay with internal references for each MLPA analysis. This evaluation shows that the innovated MLPA method provides a quick, complete and reliable result to determine all three HLA haplotypes relevant for celiac disease.

Literature: 1) van Beek EM, Roelandse-Koop EA, Vijzelaar R, Yilmaz R, van Hoogstraten IM, Schreurs MW, et al. A multiplex assay to rapidly exclude HLA-DQ2.5 and HLA-DQ8 expression in patients at risk for celiac disease. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1191-8.

28. Integrated JAK2 V617F, JAK2 exon 12, CALR and MPL mutational screening in myeloproliferative neoplasms by next generation sequencing

A.O. de GRAAF, M. MASSOP, B.A. van der REIJDEN, J.H. JANSEN
Dept. of Laboratory Medicine, Laboratory Hematology Nijmegen

Introduction: Myeloproliferative neoplasms are genetically characterized by mutations in three genes. In polycythemia vera JAK2 V617F can be detected in over 95% of patients and JAK2 V617F negative PV patients usually harbor a mutation in JAK2 exon 12. JAK2 V617F is also present in about 55% of patients with ET or PMF. Mutations in exon 9 of CALR and codon 515 of MPL are found in approximately 25% and 5% of ET and PMF patients, respectively. The analysis of these genes can be challenging due to different assays that are used to screen the genes and the heterogeneity of mutations in CALR and JAK2 exon12.

Methods: We developed PCR-based targeted next generation sequencing assays on the IonTorrent PGM platform (Life Technologies) for mutational analysis of JAK2 V617F, JAK2 exon 12, CALR exon 9 and MPL codon 515. Patient samples were analysed in parallel using IonTorrent sequencing and

conventional methods. Sequencing data were analysed using SeqPilot (JSI) for Sanger sequencing data or SeqNext (JSI) for IonTorrent sequencing data.

Results: We found 100% concordant results for all patient samples in all the genes tested on IonTorrent versus conventional methods. Both single nucleotide substitutions, large deletions and complex indels were accurately detected and at levels below 10%. The sensitivity of this assay is superior to Sanger sequencing, which is relevant for MPN because the allele frequency of mutations can be below 20% at diagnosis.

Conclusion: We have developed a comprehensive IonTorrent semiconductor sequencing assay to accurately detect mutations in JAK2 V617F, JAK2 exon12, MPL and CALR with a high sensitivity. This assay can be used for routine analysis in the diagnostic work up of myeloproliferative diseases.

29. Typing van HLA-DQ2/8 met GenVinset HLA Celiac test

M. NOORDEGRAAF, A. van den BRULE, R. HOEDEMAKERS

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

Inleiding: De rol van HLA-DQ-bepalingen bij patiënten verdacht voor coeliakie is met name van belang ter uitsluiting van coeliakie. Ongeveer 98% van de coeliakie patiënten is DQ2-en/of DQ8-positief. De ESPGHAN-richtlijn (2012) voor coeliakie bij kinderen beschrijft een belangrijke rol voor de typing van HLA-DQ2/DQ8. Bij kinderen met symptomen met een sterk verhoogd tTG-IgA (> 10x URL) en positieve EMA is een biopsie niet noodzakelijk voor de diagnose indien de HLA-DQ2/8 typing positief is. Bij kinderen zonder klachten, maar met een verhoogd risico op coeliakie, kan de HLA DQ2/8 typing gebruikt worden om coeliakie uit te sluiten. Recent is een nieuwe kit op de markt gebracht voor de typing van HLA-DQ2/8 (Blackhill Diagnostics). Deze kit, GenVinset HLA Celiac, is door ons getest en vergeleken met bekende uitslagen (uitgevoerd door VU medisch centrum).

Methode: De GenVinset HLA Celiac test voor de typing van HLA-DQ2/8 is een RT-PCR en typeert HLA-DQ2.2, HLA-DQ2.5 en HLA-DQ8 (allen geassocieerd met coeliakie). De test is in eerste instantie gebruikt voor de typing van 12 patiënten.

Resultaat: Van de 12 patiënten waren 3 patiënten positief voor HLA-DQ2.2, 6 patiënten positief voor HLA-DQ2.5 en 3 patiënten positief voor HLA-DQ8. Alle uitslagen kwamen overeen met de bij ons bekende uitslagen van het VU medisch centrum. We zullen in totaal 40 patiënten in deze correlatiestudie includeren.

Conclusie: De GenVinset HLA Celiac test lijkt een betrouwbare RT-PCR voor de typing van HLA-DQ2.2, HLA-DQ2.5 en HLA-DQ8. Momenteel wordt de kit verder getest in een grotere groep patiënten.

30. Ontwikkeling van 2 multiplex real-time PCR assays voor de detectie van de Coeliakie gerelateerde Humaan Leukocyte Antigenen DQ2.5, DQ2.2 en DQ8

M. OOSTRA, J.J.J. HULSTEIN

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Gelre ziekenhuizen, Apeldoorn

Inleiding: Coeliakie is een auto-immuun ziekte waarbij na blootstelling aan gluteneiwit, dat voorkomt in veel graansoorten, beschadiging van de dunne darm optreedt, resulterend in chronische diarree. Ongeveer 90% van de Coeliakie patiënten bezit de Humaan Leukocyte Antigen (HLA)-DQ2.5 variant, de overige 10% de HLA-DQ8 of HLA-DQ2.2 variant. Deze varianten komen ook bij ongeveer 40% van de gezonde populatie voor. Screening op deze varianten is wel van groot belang in de diagnostiek naar Coeliakie aangezien de afwezig-

heid hiervan een goede negatieve voorspellende waarde heeft.

Methode: Wij hebben 2 multiplex real-time PCR's ontwikkeld waarmee de allelen van de HLA-DQ2.5, -DQ2.2 of DQ8 varianten gedetecteerd kunnen worden. De ene multiplex detecteert de allelen DQA1*05, DQA1*02 en DQB1*02 voor het aantonen van de HLA-DQ2.5 en -DQ2.2 varianten en de tweede multiplex detecteert de allelen DQA1*03 en DQB1*0302 voor het aantonen van de HLA-DQ8 variant. Daarnaast detecteren beide multiplexen ter controle ook een huishoudgen.

Resultaat: Er zijn retrospectief ongeveer 45 monsters getest in de real-time PCR waarvan eerder bij Sanquin door middel van Luminex SSO in combinatie met PCR-SSP de HLA-DQ allelen waren vastgesteld. Hierbij werden geen discrepanties gevonden in de conclusie van aan- of afwezigheid van de HLA-DQ2.5, -DQ2.2 en -DQ8 varianten. Vervolgens zijn er nog 30 monsters prospectief getest en vergeleken met de uitslagen van Sanquin en ook hierbij werden geen discrepanties gevonden.

Conclusie: De ontwikkelde multiplex real-time PCR heeft een goede negatief voorspellende waarde voor de aanwezigheid van de met Coeliakie geassocieerde HLA-DQ2.5, -DQ2.2 en -DQ8 varianten. Bovendien is de assay eenvoudig uit te voeren en te analyseren en relatief goedkoop. Deze assay kan dus goed als primaire screening ingezet worden voor de diagnostiek naar Coeliakie.

Categorie 1 Analytisch

Overigen

31. Evaluation of the Sysmex UF1000i urine flow cytometers ability to rule out urine tract infection and to correctly identify bacterial morphology

N. GEERTS¹, K.J.M. BOONEN², R.P.W.F. WIJN³, E.L. KOLDEWIJN³, N.L.A. ARENTS⁴, A.R. JANSZ⁴, A.K. BOER¹, V. SCHARNHORST¹

Clinical Laboratory, Catharina Hospital¹ Eindhoven, Clinical Laboratory, Amphia Hospital², Breda, Department of Urology, Catharina Hospital³ Eindhoven, Laboratory for Pathology and Medical Microbiology(PAMM), Department of Medical Microbiology⁴, Veldhoven, The Netherlands

Introduction: The diagnosis of urine tract infection (UTI) by urine culture is a time-consuming and costly procedure. Usage of a screening method, to identify negative samples, would therefore affect time-to-diagnosis and laboratory cost positively. In this study, we have assessed the ability of urine flowcytometry in combination with a cut-off value, to identify negative cultures. In addition, we evaluated the latest Sysmex software update designed to indicate bacterial morphology. **Methods:** Sysmex urine flowcytometers are able to identify particles in urine by scattering and fluorescence. To evaluate the analytical performance of the UF100i as a method for ruling out UTIs, of over 7000 urine samples were retrospectively analysed and compared to urine culture results. The bacterial morphology software was evaluated by comparing the UF morphology indication to the actual morphology of the bacterial pathogen found in 510 urine samples.

Results: With a cut-off value of > 200 bacteria/ μ L (to rule out negative urines), we obtained a NPV of at least 96%, avoiding the culture of 48% of samples. The UF1000i classifies bacteria into two categories: 'rods' and 'cocci/mixed'. If the UF morphology indication is compared to the actual morphology of the bacterial pathogen, the 'rods' category scores reasonably well with 91% chance of finding rod-shaped bacteria. The 'cocci/mixed' category underperforms, with only 29% of spherical-shaped bacteria (cocci). In this category, the dominating species are also rod-shaped (68%).

Conclusion: While the feasibility of Sysmex urine flowcytometers to reduce the number of cultures by prescreening urines is proven in this large study, the bacterial morphology software is not yet of clinical use in this study population.

32. Lactate Point-of-Care Testing: cross-comparison of two devices with routine laboratory results

R. van HORSSSEN¹, T. SCHUURMAN², M. de GROOT¹, B. JAKOBS¹

Department of Clinical Chemistry, Laboratory for Clinical Chemistry and Haematology¹ and Department of Obstetrics and Gynaecology², Elisabeth-TweeSteden Hospital, Tilburg, The Netherlands

Introduction: Lactate is a major parameter in making medical decisions. During labour, it is an indicator for immediate intervention and measurement in small volumes, could significantly improve efficiency. In parallel, at the Emergency Department (ED) direct blood gas analysis can reduce the turn-around-time. Therefore, we cross-compared two point-of-care analysers for measuring lactate in these two different clinical settings.

Methods: We used umbilical cord blood (n=66) and samples from the ED and Critical Care Unit (n=85) to compare analytical performance of two point-of-care devices with routine laboratory results (ABL-735, Radiometer). We evaluated the StatStrip Lactate (Nova Biomedical) and the iSTAT-1 Analyser with CG4+ cassettes (pH, pCO₂, pO₂, BE, HCO₃⁻, sO₂, Lactate, Abbott). Blood gas parameters were compared to the ABL-735. Lactate levels were cross-compared between the three analysers.

Results: For lactate in umbilical cord blood, the StatStrip correlated well with the ABL (r=0.9737). The error-index was the highest at lower lactate levels while all samples above 6.6 mmol/L (indicating metabolic acidosis) were within the imprecision range of 13.6%. Cross-comparison of the StatStrip with the iSTAT showed a comparable correlation (r=0.9774). Comparing lactate levels from ED samples measured on the iSTAT and ABL showed a correlation of r=0.9953. The correlation of the other parameters was pH: r=0.9942, pCO₂: r=0.9744 and pO₂: r=0.9839. Precision analysis was excellent for lactate and pH, while for pO₂ and pCO₂ the CV was high. **Conclusion:** Both devices perform analytically adequate to measure blood lactate. Measuring foetal scalp lactate can be implemented using the StatStrip to indicate metabolic acidosis in a very small blood sample (1 μ l). To reduce the turn-around-time for complete blood gas analysis for the ED, further evaluation will be set up.

33. Pre-analytische oorzaken voor pseudohyperkaliëmie in de buitendienst

M.J. VOS, M.J. FOKKERT, L.D. DIKKESCHEI
Klinisch Chemisch Laboratorium, Isala, Zwolle

Inleiding: De grootste variatie in de bepaling van de kaliumconcentratie is toe te schrijven aan pre-analytische factoren. Hierbij worden vaak stuwings- en hemolyse als de meest belangrijke factoren aangewezen. Echter, wanneer er sprake is van een afname in de buitendienst worden ook de factoren transporttijd en temperatuur van belang. In deze studie hebben we deze twee factoren onderzocht met betrekking tot onze buitendienst afnames waarbij gebruik wordt gemaakt van koelboxen en waar transporttijden kunnen oplopen tot 4 uur gerekend van afname tot binnenkomst in het laboratorium.

Methode: Kaliumuitslagen afkomstig van afnames uit de buitendienst van de afgelopen twee jaar werden geanalyseerd op verhoogde waarden samen met de gemiddelde dagtemperatuur. Uit deze dataset werden patiënten geselecteerd met medisch onverklaarbare hoge kaliumuitslagen. Na toestemming van de huisarts en patiënt werd in een erythrocyten afkoelingsexperiment de effecten van transporttijd en temperatuur onderzocht.

Resultaat: Medisch onverklaarbare verhoogde kaliumuitslagen bij patiënten waarbij een bloedafname in de buitendienst plaatsvond konden in bijna alle gevallen worden toegeschreven aan de combinatie van transporttijd en lage temperatuur tijdens transport. Binnen de groep geteste patiënten waren tevens een aantal met een extreem snelle kaliumlekkage uit erythrocyten waargenomen. Tevens bleek deze eigenschap een erfelijke component te bevatten.

Conclusie: Pre-analytische verhoging van de kaliumconcentratie blijkt bij patiënten uit de buitendienst hoofdzakelijk te worden veroorzaakt door transporttijd en afkoeling van de afnamebuisen alvorens deze worden verwerkt op het laboratorium. In een aantal gevallen kan dit leiden tot onnodige opnames op de SEH gepaard gaande met ongerief voor de patiënt en kosten voor de gezondheidszorg. Een vooralsnog onbekende genetische oorzaak kan leiden tot versnelde kaliumlekkage uit erythrocyten bij lage temperatuur wat correcte analyse van de kaliumconcentratie in de buitendienst extra bemoeilijkt.

34. Nieuwe afkapwaarde absolute Lymfocyten voor microscopische differentiatie

M. NOORDEGRAAF, J. LEUVENINK, M-L. van GERVEN
Laboratorium voor klinische chemie en hematologie, Jeroen Bosch Ziekenhuis 's-Hertogenbosch

Inleiding: Op basis van internationale en nationale gepubliceerde regels is er opnieuw gekeken naar de differentiatieregel voor lymfocyten. Binnen het Jeroen Bosch ziekenhuis wordt een microscopische differentiatie gedaan bij een absolute lymfocytose $> 4,5 \times 10^9/l$. (Inter)nationaal wordt een absolute lymfocytose $> 5,0 \times 10^9/l$ geadviseerd. Over de periode van een jaar werd gekeken naar het aantal diffen waarbij de diff regel absoluut lymfocyten aantal $> 4,5 \times 10^9/l$ werd overschreden. Op een totale productie van 255.424 monsters, werden 8576 (3,7%) microscopische differentiaties uitgevoerd. Bij deze monsters is gekeken of de bestaande diff regel aangescherpt kon worden om het aantal microscopische differentiaties te reduceren.

Methode: Van het totaal aantal microscopische differentiaties werd 25,9% uitgevoerd op basis van de regel absolute lymfocytose $> 4,5 \times 10^9/l$. Op jaarbasis werden (6,%) differentiaties uitgevoerd met een absolute lymfocytose tussen 4,5 en $5,0 \times 10^9/l$. Bij deze differentiaties is teruggezocht of er pathologische

bevindingen waren. Daarnaast is gekeken naar een absolute lymfocytose tussen 5,1 en $5,5 \times 10^9/l$ in combinatie met het percentage lymfocyten $> 50\%$.

Resultaat: Bij microscopische differentiaties met een absolute lymfocytose tussen 4,5 en $5,0 \times 10^9/l$ en 182 differentiaties met een absolute lymfocytose tussen 5,1 en $5,5 \times 10^9/l$ en tevens een percentage lymfocyten $< 50\%$ werden geen pathologische bevindingen gerapporteerd. Dit scheelt op jaarbasis 700 microscopische differentiaties, wat neerkomt op een vermindering van 8,2%.

Conclusie: De afkapwaarde voor een absolute lymfocytose kan veilig worden verhoogd naar $5,0 \times 10^9/l$, wanneer er geen andere flaggings zijn. Verder kan een absolute lymfocytose tussen 5,0 en 5,5 in combinatie met het percentage lymfocyten $> 50\%$ lymfocyten ook veilig geïntroduceerd worden ter reductie van het aantal handdifferen. Dit levert een reductie op van 8,2% van het totaal aantal microscopische differentiaties.

35. Three of 7 Hemoglobin A1c Point-of-Care instruments do not meet generally accepted analytical performance criteria

E. LENTERS-WESTRA, R.J. SLINGERLAND
Department of Clinical Chemistry, Isala, Zwolle, European Reference Laboratory for Glycohemoglobin, Zwolle, the Netherlands.

Introduction: In 2009, we investigated the conformance of 8 hemoglobin A1c (Hb A1c) point-of-care (POC) instruments. Since then, instruments have improved and new devices are available on the market. In this second study, we evaluated the performance of DCA Vantage, Afinion, InnovaStar, Quo-Lab, Quo-Test, Cobas B101, and B-analyst Hb A1c POC instruments. *Methods:* Clinical and Laboratory Standards Institute protocols EP-5 and EP-9 were applied to investigate imprecision, accuracy, and bias. We assessed bias using the mean of 3 certified secondary reference measurement procedures (SRMPs). Assay conformance with the National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) certification criteria was also evaluated. Interference of common Hb variants was investigated for methods that could work with hemolysed material. *Results:* The total CVs for all instruments, except for the DCA

Vantage at a high Hb A1c value, were $> 3.1\%$ in SI units and $> 2.1\%$ in Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) units. Afinion, DCA Vantage, B-analyst, and Cobas B101 instruments passed the NGSP criteria with 2 different reagent lot numbers. Quo-Test, Quo-Lab, and InnovaStar instruments had a negative bias compared to the mean of the 3 SRMPs and failed NGSP criteria. Most of the common Hb variants did not interfere with the investigated instruments, except Hb AE for the Cobas B101.

Conclusion: Afinion, DCA Vantage, Cobas B101, and B-analyst instruments met the generally accepted performance criteria for Hb A1c. Quo-Test, Quo-Lab, and InnovaStar met the criteria for precision but not for bias. Proficiency testing should be mandated for users of Hb A1c POC assays to ensure quality.

36. De 'halo': feit of folklore

K. DORRESTEIJN¹, I. KUIPERS², G.A.E. PONJEE², K.J. JELLEMA¹
Afdeling neurologie¹ en Labwest, MCHaaglanden², Den Haag

Inleiding: In medische tekstboeken en literatuur over traumatologie wordt er anekdotisch geschreven over het gebruik van het 'halofenomeen' ter diagnostiek van liquorlekkage. De test is gestoeld op de theorie dat bloed waarin liquor vermengd is, op een filtreerpapier diffundeert waarbij de liquor verder migreert. Hierdoor ontstaat een lichte ring om de bloedvlek. Onderzoek naar het optreden van dit fenomeen is nauwelijks verricht. Wij hebben onderzocht of liquor vermengd met bloed op verschillende, in de praktijk voorhanden zijnde ondergronden, resulteert in een halo.

Methode: Liquor werd gemengd met bloed. Daarnaast is bloed gemengd met een fysiologische zoutoplossing, speeksel en kraanwater. Ook werd er liquor gebruikt van SAB-patiënten. Dit werd vervolgens op een kussensloop, wondgazen en papieren handdoeken gedruppeld en beoordeeld op het ontstaan van een halo over de tijd.

Resultaat: Een halo ontstond op een kussensloop bij liquor/

bloed in de verhouding 75-25% en 95-5% en bij NaCl/bloed in de verhouding 75-25%. Op gaas werd een halo waargenomen bij bloederige liquor van een SAB-patiënt en liquor/bloed in de verhouding 50-50%. Op een papieren handdoek resulteerde het mengsel liquor/bloed 95-5% en bloederige liquor van een SAB-patiënt in een halo. Bij 10 verschillende liquores van SAB-patiënten bleek in 5 gevallen een halo op te treden. Dit was afhankelijk van de hoeveelheid bloedbijmenging en de ondergrond waarop de liquor werd gedruppeld.

Conclusie: Het halofenomeen treedt in wisselende mate op. Hieruit kan geconcludeerd worden dat het halofenomeen zowel onvoldoende sensitief als specifiek is. Derhalve heeft de halo een zeer beperkte plaats heeft binnen de opsporing van een open verbinding tussen buitenwereld en cerebrum.

Literatuur: 1. Sunder R, Tyler K. Basal skull fracture and the halo sign. CMAJ. 2013;185:416.

37. De invloed van kreatinine meetmethoden op de MELD-score in icterische patiënten

R.J.A.C. ROELOFSEN-de BEER, A.B. GREUTER-VROLING, B. BOLMAN, B.D. van ZELST, C.R.B. RAMAKERS
Afdeling Klinische Chemie, Erasmus MC, Rotterdam

Inleiding: De MELD-score wordt gebruikt om de kans op overlijden te schatten van eindstadium leverpatiënten en hun plaats op de wachtlijst voor een donorlever te bepalen. De MELD-score wordt berekend m.b.v. de serum kreatinine- en bilirubineconcentratie en PT-INR. Aangezien sterk verhoogde bilirubinewaarden interfereren bij de bepaling van kreatinine vormt dit een probleem in sterk icterische patiënten.

Methode: In deze studie is de mate van interferentie door bilirubine onderzocht door in 198 sera van 39 patiënten met een icterische index >300 de concentraties van kreatinine te bepalen met vijf verschillende meetmethoden (Jaffé, enzymatisch, beiden zowel onverdund als verdund en de bloedgasanalyser). Concentraties zijn vergeleken met de kreatinineconcentratie bepaald m.b.v. LC-MS/MS, een referentiemethode die niet gestoord wordt door bilirubine. Vervolgens is de invloed van de verschillende analysemethoden op de MELD-score bekeken (bilirubine gemeten, PT-INR gelijkgesteld aan 1).

Resultaat: Vergeleken met de LC-MS/MS-methode resulteerde de enzymatische kreatininebepaling in een 16% lagere concentratie ($P < 0,0001$) en 7% lager ($P < 0,0001$) wanneer de verdunde modus werd gebruikt. De onverdunde Jaffé-methode verschilde niet significant van de referentiemethode, terwijl de verdunde modus 12% lagere concentraties gaf ($P < 0,0001$). De correlatie van de Jaffé-methode met die van de LC-MS/MS was minder goed dan voor de enzymatische methode ($r = 0,91$ vs $r = 0,95$). De concentraties van de bloedgasanalyser (ABL) kwamen het beste overeen met die gemeten met LC-MS/MS en gaven de minste spreiding ($r = 0,99$). T.o.v. de op LC-MS/MS gebaseerde MELD-score waren er relevante verschillen (>3 punten op maximaal 40) in 8% van de patiënten bij gebruik van de enzymatische methode. Dit was respectievelijk 4%, 13%, 8% en 1% voor de verdunde enzymatische, Jaffé, verdunde Jaffé en ABL-methode.

Conclusie: Het is wenselijk om een LC-MS/MS of ABL-methode te gebruiken om de MELD-score te berekenen.

Categorie 2 Bedrijfsvoering

Dienstverlening, doorlooptijden, workflowanalyse

38. Informing patients about laboratory results within the framework of patient empowerment

W.P.H.G. VERBOEKET-van de VENNE, A.M. HENDRIKS-DYBICZ, W.P. OOSTERHUIS
Department of Clinical Chemistry, Atrium Medical Centre, Heerlen, The Netherlands

Introduction: Patient empowerment fits the trend that patients prefer to be better informed. This applies equally to the results of laboratory testing. Patients want to know which tests are done, and - more importantly - what the results of the tests mean with respect to their health condition. The direct provision of test results to patients by the laboratory is not common practice in the Netherlands.

Methods: Four general practitioners (GPs) participated in the study. They each randomly recruited 10 patients in whom blood tests were requested. The sample was analysed and an interpretive comment in layman's terms was added, as well as links to additional information on the internet. After approval of the GP, the printed laboratory report was sent to the patient by post. Subsequently, patients were interviewed using topic lists to determine how they perceived this procedure.

Results: Results were complete for 38 patients (21 males, 17 females), aged 18-86 years. The topic list contained 8 opinion questions on clarity and comprehensibility of the laboratory report, and overall experience with the procedure. Answers were scaled into three categories and processed quantitatively. In total, 89% of the patients were positive about this way of providing explanatory information on laboratory results. They indicated that they were better informed and would like to receive this information with blood sampling in the future.

Conclusion: By giving patients access to their results - including explanation and background information - control over their treatment will be enhanced. It is anticipated that patients that are well informed about their own health will participate more in treatment decisions and are often better motivated to adhere to treatment.

39. Analyse van de waarde van het urinesediment: richtlijnen van zes wetenschappelijke verenigingen vergeleken

I. REVET^{1,2}, E. KEMPER¹, J. W. JANSSEN², M. H. BEUNIS²

Algemeen klinisch laboratorium, IJsselland ziekenhuis¹, Capelle aan de IJssel. Klinisch chemisch en hematologisch laboratorium, Sint Franciscus Gasthuis², Rotterdam.

Inleiding: Beoordelen van urinesedimenten behoort tot het 24 uren analysepakket van algemene ziekenhuizen en wordt bij een afwijkende urinescreening toegevoegd. Urinescreening wordt veelvuldig aangevraagd door huisartsen, verpleeghuisartsen, kinderartsen, urologen, gynaecologen en nefrologen bij de vraagstelling urineweginfectie of nierschade. Hier onderzoeken we of urinesedimentanalyse van toegevoegde diagnostische waarde is bij verdenking van urineweginfectie of nierschade. Daarnaast is ook het pre-analysetraject onderzocht. **Methode:** Voor dit onderzoek zijn de richtlijnen van het Nederlandse huisartsen genootschap (NHG), de Nederlandse vereniging van verpleeghuisartsen (NVVA), de Nederlandse vereniging voor urologie (NVU), de Nederlandse vereniging voor kinderartsen (NVK), de vereniging voor obstetrie en gynaecologie (NVOG) en de Nederlandse federatie voor nefrologie (NFN) voor de diagnoses urineweginfectie, chronische nierschade en hematurie vergeleken.

Resultaat: In het Sint Franciscus Gasthuis en IJsselland

ziekenhuis werden respectievelijk 30 en 19 urinesedimenten per dag verricht. Uit alle richtlijnen blijkt dat het beoordelen van urinesedimenten van onvoldoende toegevoegde diagnostische waarde is, behalve voor de diagnose hematurie. Op basis hiervan is in nauw overleg met de verschillende specialismen de procedure voor het beoordelen van urinesedimenten aangepast, waarbij alleen nog een beoordeling plaatsvindt bij de vraagstelling hematurie. Deze nieuwe werkwijze heeft het aantal teruggebracht naar 2 urinesedimenten per dag. Voor het correct beoordelen van dysmorphe erythrocyten is het essentieel dat de urine niet ouder dan 1 uur is. Door de aanpassing in de pre-analytische condities is de beoordeling van dysmorphe erythrocyten en cilinders in het urinesediment verbeterd.

Conclusie: Ons onderzoek laat zien dat een reductie van het aantal urinesedimenten mogelijk is en in goed overleg met de kliniek ingevoerd kan worden. Met een optimalisatie van het pre-analyse traject hebben we tevens een kwaliteitsverbetering bewerkstelligd.

Categorie 2 Bedrijfsvoering

Point-of-care testing

40. HemoCue point-of-care glucose meter voor neonaten

H.M. HAMER, M.P. KELLENS, O. BEKERS, S.J.R. MEEUX

Centraal Diagnostisch Laboratorium, Maastricht Universitair medisch Centrum+, Maastricht

Inleiding: Het nauwkeurig monitoren van de glucose concentraties in neonaten is van groot belang omdat directe medische interventie blijvende schade bij de neonaat kan voorkomen. Hierdoor worden glucose point-of-care analyses steeds vaker toegepast. Echter, point-of-care glucose metingen in neonaten dienen in deze specifieke doelgroep gevalideerd te worden gezien de lage glucose concentraties, parenterale voeding en hoge hematocriet waarden die de bepaling kunnen beïnvloeden. Omdat er in de literatuur discussie is of de HemoCue point-of-care glucose analyzer voor deze toepassing geschikt is (1, 2), hebben we een praktische validatie studie uitgevoerd in deze populatie.

Methode: Capillair bloed is afgenomen bij 50 neonaten in een microvette CB 300 met fluoride en heparine als anticoagulans. Glucose is gemeten met de standaard glucose analyzer (Sensostar GL30) die geschikt is voor glucose metingen in neonaten in het lage gebied (vanaf 0.6 mmol/l). De verkregen

glucose concentraties zijn vergeleken met de point-of-care analyzer van HemoCue (HemoCue Glucose 201 DM). Data-verwerking is verricht met behulp van EP evaluator 9 in de complex module.

Resultaat: De gemiddelde glucose concentraties gemeten met de Sensostar en de HemoCue point-of-care analyzer zijn respectievelijk $4,19 \pm 2,45$ en $4,38 \pm 2,46$ mmol/l. De glucose concentraties van neonaten variëren tussen de 1,4 mmol/l en 14,3 mmol/l. Deming regressieanalyse toonde een correlatie coëfficiënt van 0,9959 met een slope van 1,005 (0,979-1,032), een intercept van 0,17 (0,04-0,30) en een bias van 0,19.

Conclusie: De HemoCue point-of-care glucose meter is geschikt voor de glucose bepaling bij neonaten.

Literatuur: 1) Bellini et al. Clin Lab Med. 2007;45:1549. 2) Reddy et al. J Clin Diagn Res. 2014;8:10.

41. Evaluatie van twee POCT Hemocytometers

N. BROUWER, J. van PELT

Lab KCHI, Medisch Centrum Alkmaar

Inleiding: Recent zijn twee apparaten op de markt verschenen voor het meten van het witte bloedbeeld uit capillair vingerprikbloed die geschikt zijn voor een point-of-care setting. Het betreft het WBC DIFF systeem van Hemocue en de Microsemi CRP van Horiba. Het eerstgenoemde systeem meet de totale hoeveelheid WBC en een 5 part differentiatie met een geavanceerde beeld technologie. De Horiba Microsemi meet het complete bloedbeeld met een 3 part diff met conventionele celt technieken en kan dit combineren met een kwantitatieve CRP bepaling. Beide gebruiken 10 ul bloed voor de WBC respectievelijke CBC analyse.

Methode: Het Hemocue WBC DIFF systeem en de Horiba Microsemi werden gelijktijdig geëvalueerd in vergelijking met de Sysmex XE-2100 als laboratorium methode. Voor het vergelijken werden veneuze bloedafnames gebruikt van 125 eerste lijns patiënten met aanvraag bloedbeeld en CRP. De reproduceerbaarheid werd bepaald door kwaliteitscontrole materiaal en verschillende patiënten monsters in tienvoud te meten. Van een aantal samples werd de stabiliteit in de tijd vastgesteld.

Resultaat: De reproduceerbaarheden van de WBC, neutrofielen of granulocyten en lymfocyten in patiënten samples waren gemiddeld 1,7%, 3,3% en 5,1 voor de Horiba en 3,3%,

5,0% en 5,3% voor de Hemocue. De reproduceerbaarheden van de monocytën, eo's en baso's waren aanzienlijk groter (>20%) doordat de absolute aantallen in de gemeten samples klein waren. De parameters bleven tot 24 uur stabiel maar gingen daarna afwijken. De correlaties van WBC, granulo's of

neutro's en lymfo's met de Sysmex XE-2100 waren goed met correlatie coëfficiënten groter dan 0,98.

Conclusie: Beide geteste Hematologie analyzers komen goed overeen met de laboratorium methode en lijken daarmee bruikbaar voor een capillaire POCT meting.

42. Gebruik van CRP-POCT op de huisartsenpost

L. BOONMAN-de WINTER, J. BOSSERS, D. MEIJER TIMMERMAN THIJSSSEN, K. MOHRMANN
SHL-groep, Etten-Leur

Inleiding: In de NHG-standaard "acut hoesten" wordt het gebruik van een CRP-sneltest geadviseerd om onderscheid te maken tussen een pneumonie en een milde onderste luchtweginfectie bij matig zieke volwassen patiënten. In Nederland is het gebruik van een CRP-point of care test (POCT) al onderzocht in huisartsenpraktijken, op de huisartsenposten is dit nog niet beschreven.

Methode: Vanaf oktober 2011 is de Afinion AS 100 analyzer geplaatst bij een groot aantal huisartsenpraktijken en vanaf augustus 2012 bij een aantal huisartsenposten. Het personeel is door SHL-Groep getraind. Samen met de uitslag is informatie verzameld over de klinische vraagstelling, de beïnvloeding van het beleid door de CRP-uitslag en het voorschrijven van antibiotica. De klinische vraagstelling is voor de verwerking in vier categorieën onderverdeeld; luchtweginfecties, diverticulitis, appendicitis/buikklachten en overige indicaties. De gegevens van de huisartsenposten en de huisartsenpraktijken zijn met elkaar vergeleken.

Resultaat: In de periode van oktober 2011 tot december 2013 zijn van 9517 CRP-POCT bepalingen gegevens verzameld (8969 unieke patiënten). Van deze bepalingen werden er 661 (6,9%) uitgevoerd op de huisartsenpost. Op de huisartsenpost wordt de CRP-meting relatief minder voor luchtweginfecties gebruikt dan in de huisartsenpraktijk (38,0% vs 63,2%; p-waarde < 0.001). Het omgekeerde geldt voor de indicaties appendicitis/buikklachten (32,2% vs 9,6%; p-waarde < 0.001). De patiënten bij wie een CRP-POCT bepaling wordt uitgevoerd, zijn op de huisartsenposten gemiddeld jonger (36,1 jaar) dan in de huisartsenpraktijk (46,3 jaar). In dienstsituaties worden na een CRP-meting bij luchtweginfecties meer antibiotica (39,8%) voorgeschreven dan tijdens kantooruren (24,2%) (p<0,001).

Conclusie: Er worden verschillen gevonden tussen het gebruik van de CRP-POCT in de huisartsenpraktijk en op de huisartsenpost in klinische vraagstelling, leeftijd van de patiënten en het voorschrijven van antibiotica bij luchtweginfecties na een CRP-meting.

Categorie 2 Bedrijfsvoering

Kwaliteit, referentiewaarden

43. Application of moving average as continuous analytical quality control instrument for 24 routine chemistry assays

H.H. van ROSSUM^{1,2}, H. KEMPERMAN¹

Department of Clinical chemistry and hematology, University Medical Center Utrecht¹, Utrecht, Department of clinical chemistry, The Netherlands Cancer institute - Antoni van Leeuwenhoek Hospital², Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Moving Average (MA) is a valuable tool for medical laboratories as continuous analytical quality control (aQC) instrument. Many laboratory software systems allow usage of MA protocols and implementation is therefore possible for most medical laboratories. General implementation in clinical chemistry laboratories, however, has failed due to difficulties associated with generating optimal MA protocol settings. In addition, no guidelines on management of MA-alarms are available. We investigated the relevance of MA-alarms and MA-alarm management issues after implementation of MA for 24 routine chemistry parameters.

Methods: After selection of optimal settings, MA was monitored 24/7 for 24 chemistry assays for 100 consecutive days on two Beckman Coulter AU5811 routine chemistry analyzers. Every MA-alarm generated during working hours (8:00-17:00) was followed by measurement of internal assay controls (iQC), assay comparison with patient samples between analyzers and patient reviewing for investigation the origin of generated MA-alarms.

Results: A total of 76 MA-alarms were generated. 71% of all MA-alarms was generated between 8:00-17:00. 41 were further investigated and caused by; ISE failure (1), improper iQC settings (1), bias between both analyzers (10), non-patient materials analyzed (2), extreme results of single patient (2), pre-analytical error (1), no cause identified (20), no conclusion possible (4).

Conclusion: For management of MA-alarms, several applications in the MA software would simplify routine use of MA procedures such as exclusion of non-patient materials/extreme patients, allowing resetting MA-values and separate graphical presentation of MA-values. We show that general implementation of MA-procedures as continuous aQC instrument for routine clinical chemistry assays is possible. In our set-up, when every MA-alarm required follow-up, a manageable number of MA-alarms was generated that resulted in some valuable MA-alarms.

44. Standardization status of 16 routine chemistry parameters in Argentinean and Dutch medical laboratories

C.M. COBBAERT¹, M. THELEN², C. WEYKAMP³, F. ROMIJN¹, D. MAZZIOTTA⁴

Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Leiden University Medical Center¹, Leiden, CFB, SKML², Radboud University, Nijmegen, MCA, Queen Beatrix Hospital³, Winterswijk, the Netherlands; La Plata, Fundación Bioquímica Argentina⁴, Argentina

Introduction: Equivalence of test results among laboratories is a major mission for medical laboratories. In Western-European laboratories homogenous, CE-IVD approved tests are mostly used for general chemistry, whereas in other continents heterogenous test applications may be the norm. As clinical chemistry practices differ across the globe, non-exchangeable test results may result. We evaluated the standardization status of 16 general chemistry analytes in Argentina and the Netherlands.

Methods: Six commutable poolsera, covering the (patho) physiological range for all chemistry analytes, were assayed by 75 Argentinian labs and 220 Dutch laboratories. Mean interlaboratory coefficients of variation (CVs,%) were calculated per analyte and per country for all 6 levels. Evenso, mean recoveries were calculated as % of the assigned target values per analyte per country for all 6 levels.

Results: Interlaboratory CVs for serum enzymes in the Argentinian sample range between 10-22%, as compared

to 3-6% in the Netherlands. For serum uric acid, creatinine, glucose and total protein, interlaboratory CVs vary between 4.3-13.1% in Argentinian labs, as compared to <3.5% in the Netherlands. For serum electrolytes, interlaboratory CVs range between 1.8-22.3% as compared to <3% in the Netherlands. Mean recoveries in Argentinian laboratories are 95-119% for serum creatinine, glucose, CK, calcium and sodium. In the Netherlands, absolute mean recoveries are overall 98.9% with SD=2.0%.

Conclusion: International exchange of commutable, value-assigned EQA-materials for general chemistry tests is helpful for inventarizing the standardization status in Latin-American countries. Interlaboratory variability of general chemistry test results was demonstrated to be 4-to 10-fold higher in Argentinian medical labs as compared to Dutch labs. We conclude that the only way forward for global test standardization is full-blown participation in type 1 EQA-programs.

45. Method-dependent selectivity of direct HDL- and LDL-cholesterol tests in hypertriglyceridemic specimens: time to adapt the Combi Lipids EQA program!

C.M. COBBAERT¹, F. ROMIJN¹, C. WEYKAMP², A. van der LAARSE^{1,3}

Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Leiden University Medical Center¹, Leiden, MCA, Queen Beatrix Hospital², Winterswijk, Department of Cardiology, Leiden University Medical Center³, Leiden, the Netherlands.

Introduction: Despite succesful international standardization programs for LDLc and HDLc, non-selectivity issues have been reported by the EAS-EFLM Collaborative Project study group. Therefore, we further elaborated on the effect of preanalytical variables and matrix on analytical accuracy of direct HDL-cholesterol (dHDLc) and direct LDL-cholesterol (dLDLc) methods routinely used in the Netherlands.

Methods: Effect of freezing, freeze/thaw cycles, and storage period was studied in one center using Roche reagents (data not shown). The effect of elevated triglyceride (TG; 1.19-10.5 mmol/L) concentration on dHDLc and dLDLc test results was examined in the Combi Lipid EQA (SKML; 200 labs) using accuracy-based, CLSI C37-A prepared serum pools. dLDLc and dHDLc tests from Abbott, Beckman, Siemens, Olympus and Roche were considered. Analytical performance was judged according to NCEP criteria.

Results: When using fresh frozen hypertriglyceridemic serum pools, negative biases and significant underrecoveries were

found for dHDLc assays from Abbott, Beckman, Siemens, Olympus and Roche by respectively -6%, -5%, -32%, -6%, and -18%, which is beyond TEa in the dHDLc assays from Siemens and Roche. Significant positive biases were found for the dLDLc methods from Abbott and Beckman by +19% and +18%, both exceeding TEa. When using fresh hypertriglyceridemic serum pools, Abbott, Siemens and Roche dHDLc assays were negatively biased (-9%,-23% respectively -21%); Abbott's and Beckman's dLDLc assays were positively biased (+6% respectively +5%), and Siemens dLDLc was negatively biased (-7%).

Conclusion: Direct HDLc and LDLc tests are affected by hypertriglyceridemia in a method-dependent way. Freezing and frozen storage of hypertriglyceridemic specimens further aggravate biases of dHDLc and LDLc tests. Therefore, future Lipid EQA surveys should systematically include specimens from individuals with dyslipidemias to better mimic "real world" assay performance.

Categorie 2 Bedrijfsvoering

Automatisering, dataverwerking

46. Kwantificering van proteinurie via de smartphone: van gezondheidszorg naar zorg voor goede gezondheid!

R.L. SMEETS¹, M. VELIKOVA², E.P.L.M. de GROUW¹, P.J.F. LUCAS², J.D. OOSTING¹

Afdeling Laboratoriumgeneeskunde, Laboratorium klinische chemie, Radboudumc¹, Nijmegen; Institute for Computing and Information Sciences, Radboud Universiteit Nijmegen², Nijmegen

Inleiding: De patiëntenzorg is aan verandering onderhevig. De patiënt staat centraal in het zorgproces maar wat betekent dat voor de klinische chemie? Analyses bewegen van bench (lab) naar bedside (POCT) en nemen in toenemende mate hun intrede bij de patiënt thuis. Huidige mobiele multimedia kan hierbij nieuwe mogelijkheden bieden. In deze studie hebben gekeken naar het gebruik van het mobiele platform bij het kwantificeren van eiwit in urine.

Method: Een op android-gebaseerde mobiele-applicatie is ontwikkeld voor het bepalen van eiwit in urine middels de dipstick (microalburstix, Siemens). Deze applicatie moet gebruiksvriendelijk zijn en de gebruiker begeleiden in het correct uitvoeren van de analyse. Gebruikmakend van de camera wordt middels beeldacquisitie en beeldanalyse een sample classificatie algoritme gevoed wat is gekalibreerd ten opzichte van de albumine nefelometrische bepaling (Siemens) en de enzymatische

kreatinine bepaling (Abbott) zoals op het laboratorium gehanteerd.

Resultaat: De ontwikkelde mobiele applicatie ondersteunt de gebruiker bij het uitvoeren van de dipstick analyse en standaardiseert de ontwikkeltijd door de beeld acquisitie te automatiseren. Daarnaast is de ontwikkelde applicatie weinig gevoelig gemaakt voor omgevingslicht. De analytische performance en klinische accuraatheid in het onderscheiden van albuminurie (>3,4 mg/mmol kreat) ten opzichte van normaal was goed met een sensitiviteit van 92% en een specificiteit van 84% (PPV=90% en NPV=88%).

Conclusie: Deze mobiele applicatie kan gebruikt worden voor het thuis vervolgen van proteïnurie bij patiënten met chronisch nierlijden of bij patiënten met verdenking pre-eclampsie. Verdere klinische validatie dient te worden uitgevoerd om gebruiksgemak te optimaliseren en data communicatie naar data bases zoals, LIS, EPD of cloud mogelijk te maken.

Literatuur: Smeets et al. Smartphone based analysis of biochemical tests for health monitoring support at home. *Healthcare Tech Lett* 2014.

47. Systeem voor vroegtijdige signalering van de achteruitgang van de nierfunctie

D.L. BAKKEREN, P.H.M. Kuijpers

Klinisch laboratorium, Máxima Medisch Centrum, Eindhoven en Veldhoven

Inleiding: Ons laboratorium heeft een doorbelbeleid voor het plasma kreatinine. Dit is geen garantie dat een geleidelijke achteruitgang van de nierfunctie tijdig wordt opgemerkt wanneer alle uitslagen onder de doorbelgrens blijven. Naar aanleiding van een ongunstig verlopen casus is het laboratorium gevraagd om een trendsignalering te realiseren.

Methode: Laboratoriuminformatiesystemen kunnen uitsluitend een deltacheck uitvoeren op het actuele en het voorgaande resultaat. Trendanalyse is niet mogelijk. Ons criterium voor vroegtijdige signalering was een actueel kreatinine >150 (M) resp. >120 (V) micromol/l en een verdubbeling van het kreatinine in 6 maanden. Met behulp van het expertsysteem RippleDown werden alle plasma kreatinine-uitslagen beoordeeld. De resulterende klinische alerts werden in het EPD gerapporteerd, niet-klinische alerts werden tevens doorgebeld. Na 9 maanden heeft een evaluatie plaatsgevonden. Over de maanden mei en juni 2014 is geregistreerd welke acties volgden op de alerts.

Resultaat: In de periode van december 2013 t/m september 2014 werden ruim 104.000 kreatinine-uitslagen beoordeeld. Er werden 272 alerts gegenereerd (0,26% van alle kreatinine-uitslagen). De alerts waren als volgt over de aanvraagcategorïen verdeeld: huisartsen 4%, verpleeghuis-/instellingsartsen 2%, klinische aanvragers 62%, poliklinische aanvragers 32%. In een periode van 2 maanden zijn 39 statussen beoordeeld op de ondernomen acties. Bij klinische patiënten waren dehydratie en multi-orgaan falen het meest voorkomend. Bij niet-klinische aanvragers leidde het alert vaak tot aanpassing van de medicatie of tot een consult bij een internist of uroloog.

Conclusie: De geregistreerde interventies door aanvragers waren eenvoudig van aard, zoals het wijzigen van medicatie. De signalering lijkt het meest zinvol bij niet-klinische patiënten, zeker wanneer meerdere behandelaren betrokken zijn, waaronder huisartsen. Een formule als eGFR(CKD-EPI) is meer geschikt dan het plasma kreatinine om mannen en vrouwen bij dezelfde nierfunctie te signaleren.

Categorie 2 Bedrijfsvoering

Overigen

48. Assessing the cost-effectiveness of point-of-care testing for patients with symptoms suggestive of ACS in primary care: a threshold analysis

M.J. MOESKER¹, L.M.G. STEUTEN³, M.M.A. KIP¹, R. KUSTERS^{1,3}

Department of Health Technology and Services Research, University of Twente¹, Enschede, Hutchinson Institute for Cancer Outcomes Research, Fred Hutchinson Cancer Research Center², Seattle, USA, Department of Clinical Chemistry and Haematology, Jeroen Bosch Hospital³, s-Hertogenbosch, The Netherlands

Introduction: To assess the cost-effectiveness of POCT Troponin in ACS in primary care, we performed a threshold analysis to estimate the minimum diagnostic performance of regular clinical assessment with POCT compared to clinical assessment without POCT.

Methods: A decision-analytic model, reflecting a hypothetical cohort of the Dutch population aged >35 years consulting their GP with chest complaints, was developed. The analysis included all medical costs and productivity losses, over a lifelong time horizon. Health benefit was expressed as QALY. Input data, quality of life estimates and costs are based on published data and hospital administration data. Outcome parameters include: a) the incremental cost-effectiveness ratio (ICER) of POCT vs. no POCT, and b) the minimum required diagnostic performance of GP assessment including POCT to become cost-effective compared to GP assessment only.

Results: The sensitivity and specificity for diagnosing ACS (without-POCT) in primary care are 88% and 72% respectively. The minimum required performance of the GP assessment combined with POCT should result in an increase in sensitivity and specificity to 95% and 75% to achieve a median cost for society below the threshold of €30.000/QALY (the most commonly applied threshold in the Netherlands). Per 20.000 patients, the number of false-positive and false-negative referrals will reduce with an estimated median of 1.139 (IQR:1113-1163) and 33 (IQR:30-36), respectively

Conclusion: If POCT Troponin can increase overall sensitivity of this GP assessment from 88% to 95%, and increase the specificity from 72% to 75%, this can be considered a cost-effective strategy in excluding ACS. This is expected to contribute to a reduction of both false-positive referrals and missed ACS diagnoses, and thereby improve the quality of care.

Hart- en vaatziekten, atherosclerose

49. The effect of exercise training on the course of cardiac troponin T and I levels: results from three independent training studies

N. van der LINDEN¹, L.J.J. KLINKENBERG¹, M. LEENDERS^{2,3}, M. TIELAND^{3,4}, L.B. VERDIJK^{2,3}, M. NIENS⁵, J.D.E. van SUIJLEN⁵, L.C.P.G.M. de GROOT^{3,4}, O. BEKERS¹, L.J.C. van LOON^{2,3}, M.P. van DIEIJEN-VISSER¹, S.J.R. MEEEX¹

Department of Clinical Chemistry, Cardiovascular Research Institute Maastricht (CARIM), Maastricht University Medical Center (MUMC)¹, Maastricht, Department of Human Movement Sciences, School for Nutrition, Toxicology and Metabolism (NUTRIM), Maastricht University Medical Center (MUMC)², Maastricht, Top Institute Food and Nutrition, Wageningen University³, Wageningen, Division of Human Nutrition, Wageningen University⁴, Wageningen, Department of Clinical Chemistry, Gelre Ziekenhuizen⁵, Apeldoorn, The Netherlands

Introduction: With the introduction of high sensitive assays, cardiac troponins have become potential biomarkers for risk stratification and prognostic medicine. Observational studies have shown that physical activity is inversely related to basal cardiac troponin levels. However, causality has never been demonstrated. This study investigated the hypothesis that basal cardiac troponin concentrations are receptive to lifestyle interventions such as exercise training.

Methods: We assessed the effect of two exercise training programs (12-week resistance-type exercise training (study 1) and 24-week resistance-type exercise training (study 2)) on high sensitive cardiac troponin T and I in older adults (>65 years). In addition, we performed a post-hoc analysis for high sensitive troponin I in a previous 24-week exercise intervention

study in (pre)frail older adults (>65 years) (study 3). Basal venous blood samples were drawn before, during, and after the intervention period. Mixed linear model analyses were used to assess the effect on the course of cardiac troponin levels.

Results: In total, 13 men (study 1), 26 men and women (study 2) and 52 (pre)frail men and women (study 3) were included in the final data analyses. We found no significant changes in cardiac troponin levels over time in study 1 and 2 (study 1: Troponin T p=0.16, and troponin I p=0.44; study 2: Troponin T p=0.23, and troponin I p=0.37). Neither did we find an effect of training on troponin I in study 3 (intention-to-treat analysis p=0.21, per-protocol analysis p=0.24).

Conclusion: Prolonged resistance-type exercise training does not modulate basal troponin T and I levels.

50. The prognostic value of basal cardiac troponin levels on mortality in the general population: a systematic review and meta-analysis

N. van der LINDEN¹, L.J.J. KLINKENBERG¹, O. BEKERS¹, M.P. ZEEGERS², M.P. van DIEIJEN-VISSER¹, S.J.R. MEEEX¹

Department of Clinical Chemistry, Cardiovascular Research Institute Maastricht (CARIM), Maastricht University Medical Center (MUMC)¹, Maastricht, Department of Complex Genetics, Cluster of Genetics and Cell Biology, Nutrition and Toxicology Research Institute Maastricht (NUTRIM), Maastricht University Medical Center (MUMC)², Maastricht, The Netherlands

Introduction: The aim is to conduct a systematic review and meta-analysis on the prognostic value of basal cardiac troponin T and I levels on the risk of cardiovascular death and all-cause mortality in the general population.

Methods: We included reports of prospective cohort studies that reported the predictive value of basal levels of cardiac troponin I and/or T in the general population for all-cause mortality and/or cardiac death. Data sources were PubMed, EMBASE, the Cochrane Library, and other trail registries (up to August 2014) and reference lists of retrieved articles. For studies with stratified data, hazard ratio per standard deviation increase in cardiac troponin levels (HR/sd) was estimated based upon the assumption of normally distributed log-transformed cardiac troponin concentrations. We used random effects models to calculate pooled hazard ratios and 95% confidence intervals (95%CI). Pooling of troponin T and I data, as well as pooling

of retrieved and estimated hazard ratios was preceded by a heterogeneity check using meta-regression analyses.

Results: Ten prospective cohort studies were eligible: ten studies reported on all-cause mortality, and five on cardiovascular death. During follow-up, ranging from 3.9 to 14 years, there were 4553 all-cause and 1675 cardiovascular deaths among 41507 and 20390 participants, respectively. We found a positive association between levels of cardiac troponin T and I and the risk on all-cause mortality and cardiovascular death. Pooled HR/sd were 1.29 (95%-confidence interval 1.14 to 1.46) for all-cause mortality and 1.39 (95%-confidence interval 1.26 to 1.54) for cardiovascular mortality.

Conclusion: This meta-analysis provides decisive evidence that basal elevated troponin levels in the general population are associated with poor prognosis.

51. Determination of the 99th percentile value for high-sensitivity cardiac Troponin T and I

D.M. KIMENAI¹, R.M. HENRY², C.J. van der KALLEN², P.C. DAGNELIE³, M.T. SCHRAM², C.D. STEHOUWER², J.D. van SUIJLEN⁴, M. NIENS⁴, O. BEKERS¹, M.P. van DIEIJEN-VISSER¹, S.J. MEEEX¹

Department of Clinical Chemistry¹ Maastricht University Medical Center+ (MUMC+)¹, Cardiovascular Research Institute Maastricht (CARIM)², Department of Internal Medicine, Department of Clinical Chemistry and Haematology, Department of epidemiology, Maastricht, MUMC³+, Department of Clinical Chemistry and Haematology, Gelre Hospital⁴, Apeldoorn, The Netherlands

Introduction: The decision level of 99th percentile of high-sensitivity cardiac troponin (hs-cTn) of healthy reference population is used for diagnosing myocardial infarction. A side

by side comparison of the 99th percentile of hs-cTnT and hs-cTnI in a large well-defined healthy reference population has never been performed. This study sought to determine age

and gender specific 99th percentile upper reference limits for hs-cTnT (Roche) and hs-cTnI (Abbott) in a healthy reference population.

Methods: The healthy reference population was derived from The Maastricht Study and a sample of 3,451 individuals were assessed for eligibility. The healthy subcohort was defined by excluding individuals with diabetes mellitus, a clinical history for known cardiovascular disease by questionnaire, NTproBNP>125ng/L and eGFR<60ml/min/1.73m². Nonparametric analysis were performed to determine 99th percentile values of hs-cTn. Dixon's outlier detection method applied.

Results: From TMS cohort, a total of 2,021 individuals were enrolled into the "healthy" reference population. Six hsTnI values were considered outliers, leaving 2,015 individuals

for analyses. Overall 99th percentile upper reference limit of hs-cTnT and hs-cTnI was 16 ng/l (95%CI: 15-18) and 17 ng/l (95%CI: 13-21), respectively. The 99th percentile of hs-cTnT for men was 18 ng/l (95%CI: 16-22) and for women 13 ng/l (95%CI: 12-15). The 99th percentile of hs-cTnI was 22 ng/l (95%CI: 16-25) and 13 ng/l (95%CI: 10-17) for men and women respectively. The 99th percentile values of hs-cTn increased with age, and most prominent in the stratum >65years. The 99th percentile values of hs-cTnI were slightly higher than hs-cTnT.

Conclusion: 99th percentile values for hs-cTn assays are gender- and age-dependent. Clinical validation studies are needed to investigate the gender- and age-specific cut-off values outperform fixed cut-off values for diagnosing myocardial infarction.

52. A diurnal rhythm of cardiac troponin T, but not cardiac troponin I, is a common phenomenon in subjects with chronic troponin elevations

L.J.J. KLINKENBERG¹, N. van der LINDEN¹, J.-W. van DIJK², I.W. KOUW², L.-J.C. JELLEMA³, M. NIENS³, B.A. NAAIJKENS³, J.D.E. van SUIJLEN³, J. ten KATE⁴, L.J.C. van LOON², O. BEKERS¹, M.P. van DIEIJEN-VISSER¹, S.J.R. MEEËX¹

Department of Clinical Chemistry, Cardiovascular Research Institute Maastricht1 (CARIM), Maastricht University Medical Center (MUMC), Maastricht. Department of Human Movement Sciences, School for Nutrition, Toxicology and Metabolism (NUTRIM), Maastricht University Medical Center² (MUMC), Maastricht. Department of Clinical Chemistry and Laboratory Hematology, Gelre ziekenhuizen³, Apeldoorn/Zutphen. Department of Clinical Chemistry and Hematology, Orbis Medical Center⁴, Sittard-Gelee, The Netherlands

Introduction: Diagnosis of acute myocardial infarction (AMI) relies strongly on serial cardiac troponin (cTn) testing. The underlying assumption when interpreting cTn changes is that cTn in "healthy" subjects fluctuates randomly around a homeostatic setpoint. This dogma was recently challenged by our finding of a diurnal troponin T (cTnT) rhythm in seven subjects with type 2 diabetes. The present study was conducted to validate rhythmic cTnT oscillation as a general phenomenon, and verify the presence of a diurnal cTnT rhythm in a clinical setting.

Methods: Twenty-four individuals without a recent cardiovascular event were hourly sampled over 25h. Cardiac emergency data from three Dutch hospitals (Maastricht, Sittard-Geleen, Apeldoorn/Zutphen) were evaluated to investigate whether the diurnal oscillation is mirrored in clinical practice. Serial cTnT or cTnI data of >2x 99th percentile concentration with changes>50% were excluded, to exclude troponin changes due to an acute cardiac event.

Results: Diurnal variation of cTnT was characterized by peak concentrations during morning hours (mean 16ng/L at 8:30AM), gradually decreasing values during daytime (mean 12ng/L at 7:30PM) and rising concentrations during nighttime (mean 16ng/L at 8:30AM the next day). Distinct from cTnT, cTnI fluctuated randomly (mean 7ng/L at 8:30AM, 6ng/L at 7:30PM). Subjects who presented at the cardiac emergency department during the day demonstrated significantly more cTnT falls between successive measurements, whereas cTnT rises and falls were equally distributed during nighttime. No day/night differences were observed in patients from hospitals that relied on cTnI assays.

Conclusion: Diurnal oscillation of cTnT, but not cTnI, is a general phenomenon in subjects with chronic troponin elevations. Integrating clinical judgement together with cTn results will remain the optimal approach for ruling in or ruling out AMI.

53. High-sensitivity cardiac troponin T differs from troponin I in their association with renal dysfunction and mortality in aged nursing home residents

E. CARDINAEELS¹, M. van der VELDEN-DAAMEN², J. SCHOLS², O. BEKERS¹, M.P. van DIEIJEN-VISSER¹, H.P. BRUNNER-la ROCCA³, A. MINGELS¹

Department of Clinical Chemistry, Cardiovascular Research Institute Maastricht¹ (CARIM), Maastricht University Medical Centre (MUMC+), Department of General Practice and Primary Care, CAPHRI, Maastricht University², Maastricht. Department of Cardiology, CARIM, MUMC+³, Maastricht, the Netherlands

Introduction: Elderly subjects often present with elevated cardiac troponin (cTn) concentrations, consequently challenging clinicians with the understanding of hs-cTn concentrations. In the present study we explored the interpretation and prognostic importance of hs-cTnT versus hs-cTnI concentrations in a well-characterized cohort of fragile elderly nursing home residents.

Methods: 495 residents from nursing homes (>65 years) of five healthcare organizations were examined. The residents underwent clinical and echocardiographic assessment, for the diagnosis of heart failure. cTn was measured using highly sensitive (hs-)cTnT (Roche), hs-cTnI (Abbott) and conventional cTnI (Beckman) assays. The glomerular filtration rate was estimated using serum creatinine and cystatin C concentrations.

Results: Median (IQR) concentrations were 20.6 (17.8-30.6) ng/L, 6.8 (4.1-12.5) ng/L and 4.0 (2.0-8.0) ng/L for hs-cTnT, hs-cTnI and cTnI respectively. In total, 79% had elevated hs-cTnT concentrations, while only 9% and 5% of hs-cTnI and cTnI concentrations were elevated. Most important determinants for higher hs-cTnT and hs-cTnI concentrations were of cardiac and renal origin. Whereas both heart failure (OR:3.4) and eGFR (OR:3.6) were equal contributors to higher hs-cTnT concentrations (all p<0.001), renal dysfunction exerted less influence on hs-cTnI (OR:1.9;p=0.007) and cTnI (OR:2.1;p=0.003) in comparison to heart failure (OR:4.3 and 4.7, respectively, p<0.001). Still, hs-cTnT concentrations were a better predictor for all-cause mortality compared with both cTnI assays.

Conclusion: All hs-cTn were highly associated with the presence of heart failure, although hs-cTnT was more influenced by the presence of renal dysfunction. Notwithstanding, hs-cTnT was

better in the prediction of all-cause mortality than both (hs-) cTnI measurements.

Categorie 3 Klinisch

Endocrinologie en intermediaire stofwisseling

54. Failing laboratory diagnostics: a possibly understated problem in Diabetes diagnosis

S.A.A. van den BERG, M.H.M. THELEN, L. SALDEN, S.W. van THIEL, K.J.M. BOONEN
Department of Clinical Chemistry and Hematology, Amphia hospital, Breda, The Netherlands

Introduction: Although clinical chemistry laboratories are key players in determining plasma glucose concentration (PG), little to no changes have been made to the state-of-art in the past decades. PG may drop up to 1 mmol/L/h due to in vitro glycolysis. Immediate centrifugation and cooling of phlebotomy material is impractical, so most laboratories rely on glycolysis inhibitors (sodium-fluoride, NaF). However, it is not widely known that NaF does not prevent glycolysis in the first 2 to 4 hours.

Methods: Here, we describe a study, which includes a survey on the state-of-art in Dutch clinical chemistry laboratories and an in depth study in to what extent a deviation from the recommended procedure affects glucose concentration.

Results: Survey response was received from 25 laboratories. In 90% of laboratories, TAT exceeded 1 hour. Most laboratories relied on NaF to prevent glycolysis. Additional steps were

taken only in a few laboratories (<5%). The common TAT - phlebotomy material combination (60-120 minutes, NaF only) results in a significant drop in PG, and individual drop may exceed 1 mmol/L. Importantly, NaF has no effect during the first 2 hours. Interestingly, even though recommended, cooling of blood is only partially effective and large variation between subjects exists, ranging from complete stabilization of PG to a drop of 0.3 mmol/L in 15 minutes. The glycolysis inhibitor citrate was the only method to consistently and completely prevent in vitro glycolysis.

Conclusion: Only a very small percentage of laboratories takes precautions to prevent glycolysis other than the ineffective addition of NaF. Therefore, the state-of-art in glucose measurement results in a false low outcome due to in vitro glycolysis and may result in incorrect diagnosis.

55. CT-proAVP levels in central diabetes insipidus and syndrome of inappropriate ADH secretion

M.M. van der KLAUW¹, A.C. MULLER KOBOLD², J.H. ROFFEL-HOOIJER², E.W. HOVING³, J.M.A. KUIJLEN³, G. van den BERG¹, B.H.R. WOLFFENBUTTEL¹
Department of Endocrinology, University Medical Center Groningen¹, Groningen; Department of Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen², Groningen; Department of Neurosurgery, University Medical Center Groningen³, Groningen, The Netherlands

Introduction: Recently, an automated assay for CT-proAVP has become available. We examined whether this assay could be helpful in diagnosing central diabetes insipidus (DI) and syndrome of inappropriate ADH secretion (SIADH) after pituitary surgery.

Methods: From November 27, 2013 until September 10, 2014, patients undergoing pituitary surgery for non-functioning pituitary adenoma, Cushing's disease, treatment resistant prolactinoma, meningioma, acromegaly, pituitary cyst, craniopharyngeoma and hemangioma in the cavernous sinus were seen in the UMCG. Serum left-overs from routine measurements was stored at -20C. Analyses for CT-proAVP were performed on the Kryptor Compact Plus (Brahms/Fischer Diagnostics, Germany). Retrospectively data were collected on the development of DI and/or SIADH pre- or postoperatively, and on the use of desmopressin. Also, the sodium levels at sampling days were collected. The CT-proAVP levels of

patients with and without DI and SIADH were then compared using an independent samples Mann-Whitney U test.

Results: 46 patients were included, 7 developed a (transient or permanent) DI and 6 a transient SIADH. The median CTproAVP levels in patients with a DI was: 1.728 pmol/l (range 1.283-2.883), in patients with a SIADH: 3.34 pmol/l (range 2.515-4.721), and in patients without DI or SIADH: 2.952 (range <0.900-19.320). Using the independent samples Mann-Whitney U test, we found that the difference in CT-proAVP levels in patients measured at time points with/without DI was significantly different (p-value 0.000). Comparing patients with/without a SIADH we found no difference (p-value 0.252).

Conclusion: The CT-proAVP levels could help in distinguishing patients with/without central diabetes insipidus, but not in distinguishing between patients with/without SIADH after pituitary surgery. A multicenter study is planned, in order to determine the predictive power of a single CT-proAVP measurement.

56. Prevalentie van vitamine D deficiëntie, haar determinanten en associaties met gezondheidsfactoren bij zuigelingen en peuters in Nederland: de kiDs studie (pilot fase)

J.P.M. WIELDERS, M.P. HOEVENAAR-BLOM, P.H.G. HOGEMAN
Afdelingen Klinische Chemie en Kindergeneeskunde, Meander Medisch Centrum, Amersfoort

Inleiding: Een grootschalig onderzoek naar de vitamine D status van jonge kinderen in Nederland is nodig. Eerder vonden we een ernstige vitamine D deficiëntie (25(OH)D3 < 20 nmol/l) bij 72% van allochtone en bij 24% van autochtone pasgeborenen. In de kiDs studie wordt de vitamine D status bepaald van 800 Nederlandse kinderen (6 maanden tot 4 jaar) uit de algemene populatie in Midden-Nederland. Tevens wordt

een breed pakket van mogelijke oorzaken en klinische effecten van een vitamine D tekort onderzocht.

Methode: Eind zomer 2014 zijn 52 kinderen op de consultatiebureaus van de GGD regio Utrecht geïncludeerd als pilot. Via een vingerprik en bloodspot analyse met LC-MS/MS werd de 25(OH)D3 status bepaald. Een 25(OH)D3 plasma concentratie <30 nmol/l noemen we ernstig deficiënt, 30-50 nmol/l

deficiënt, 50-75 nmol/l marginaal suffiënt en >75 nmol/l optimaal suffiënt. Ouders vulden vooraf een digitale vragenlijst in. Aanvullend werd uitgebreid lichamelijk onderzoek uitgevoerd, onder andere naar skeletafwijkingen, spiertonus, schedelvorm en gebitontwikkeling.

Resultaat: Bij 52 kinderen is de vitamine D status bepaald (response rate: 36%). Deelnemers hadden in vergelijking met niet-deelnemers vaker een niet-West-Europese vader (17% vs. 13%), en de ouders van deelnemers hadden vaker een

opleidingsniveau van HBO of hoger (moeder: 60% vs. 39% en vader: 50% vs. 26%). Gemiddelde leeftijd van deelnemers was $2,1 \pm 1,2$ jaar, 62% was jongen. 17% van de vaders en 10% van de moeders was van niet-Europese komaf. Wij vonden één kind deficiënt, 10 kinderen marginaal suffiënt en de overige 41 kinderen optimaal suffiënt.

Conclusie: In deze pilot was vitamine D deficiëntie bij hele jonge kinderen zeldzaam aan het einde van de zomer in Nederland.

57. High levels of 3-epi-25-hydroxyvitamin D3 from vitamin D supplementation in preterm infants

N. OOMS¹, H. van DAAL², A.M. BEIJERS², P. GERRITS¹, B. SEMMEKROT¹, J.M.W. van den OUWELAND²

Department of Pediatrics¹ and Department of Clinical Chemistry², Canisius Wilhelmina Hospital, Nijmegen, The Netherlands

Introduction: The interpretation of serum 25(OH)D concentrations in infants is complicated by the presence of an epimeric form of 25(OH)D (3-epi-25(OH)D), a vitamin D metabolite that can be erroneously included as 25(OH)D by HPLC or LC-MS methods not separating both compounds. Little is known on its formation and physiological function. Our objective was to study the dynamics of 25(OH)D3 and 3-epi-25(OH)D3 formation during infancy.

Methods: Plasma 25(OH)D3 and 3-epi-25(OH)D3 were measured by LC-MS/MS in pre-term and full term infants from birth up to 2 years of age using left-over plasma samples (n=316). All infants received a daily dose of 400 IU of vitamin D from the first week of life.

Results: At birth, mean (range) 25(OH)D3 levels were 39 (7-112) nmol/L with 77% having <50 nmol/L. Mean (range) 3-epi-25(OH)D3 levels were 3 (1-7) nmol/L with low relative

contribution to 25(OH)D3 (<10%). From the first week, after the start of vitamin D supplementation, until three months of age, both 25(OH)D3 and 3-epi-25(OH)D3 increased. In pre-term infants, 25(OH)D3 and 3-epi-25(OH)D3 levels reached as high as 200 nmol/L. Relative 3-epi-25(OH)D3 contribution was most pronounced in pre-term infants (up to 55%, versus 37% in full-term infants). After three months of age, relative 3-epi-25(OH)D3 contribution normalized to <10% in all infants.

Conclusion: At birth, the majority of infants were 25(OH)D deficient (< 50 nmol/L) with low contribution of 3-epi-25(OH)D3. Highest levels of 3-epi-25(OH)D3 were found in pre-term infants, most likely induced by vitamin D supplementation. These data support the hypothesis that hepatic immaturity may play a role in 3-epi-25(OH)D3 production. Our finding raises concerns on the safety of current vitamin D dosing using 400 IU, especially in pre-term infants.

58. Intra-operative ACTH measurements: a way to more successful surgery for cushing's disease?

J.A.P. BONNS¹, E.M.J. CORNIPS², W. van ZWAM³, N. SCHAPER⁴, P.P.C.A. MENHEERE¹

Central Diagnostic Laboratory, Maastricht University Medical Center¹, Maastricht; Department of NeuroSurgery, Maastricht University Medical Center², Maastricht; Department of Radiology, Maastricht University Medical Center³, Maastricht; Department of Internal Medicine, Maastricht University Medical Center⁴, Maastricht, The Netherlands

Introduction: In Cushing's disease, elevated plasma cortisol levels are the result of excessive ACTH production by a pituitary adenoma. The first choice treatment is selective adrenalectomy by transsphenoidal surgery. However, in 10-35% of cases Cushing's disease is not cured due to incomplete removal or early recurrence. Intra-operative ACTH measurements theoretically gives information about the completeness of resection and might support intra-operative decision making.

Methods: Patients with Cushing's disease undergoing transsphenoidal surgery at the Maastricht University Medical Center were evaluated. At regular intervals during the surgical procedure samples were taken from the femoral and both internal jugular veins. Once the neurosurgeon thought the resection was complete, the procedure was interrupted and 4 consecutive samples were taken from all catheters with a 5 minutes interval. The final decision to terminate the procedure was based on visual satisfactory removal of the adenoma combined with a biochemical satisfactory ACTH decline.

Results: For 14 patients (16 procedures), intra-operative ACTH measurements were performed. Three procedures resulted in an acceptable ACTH decline and these three patients were cured (mean follow-up 5.5 years). For 10 patients (11 procedures), a second look was performed based on unsatisfactory intra-operative ACTH decline. Five of these 10 patients were cured (mean follow-up 6.6 years) and possibly benefited from second look and biochemical evaluation. The other 5 patients were not cured. For two patients with unsatisfactory intra-operative ACTH decline surgery was stopped because of technical issues. Both patients had a recurrence within 2 years.

Conclusion: Intra-operative ACTH measurements seem to be a promising tool to detect residual ACTH secreting adenoma. Hence, a second look is justified to obtain a complete resection of the adenoma.

59. Biological variation of Hemoglobin A1c: consequences for diagnosing Diabetes Mellitus

E. LENTERS-WESTRA^{2,3}, T. RØRAAS⁴, R.K. SCHINDHELM^{5,6}, R.J. SLINGERLAND^{2,3}, S. SANDBERG^{4,7,8}

Department of Clinical Chemistry Isala², Zwolle, European Reference Laboratory for Glycohemoglobin, Isala³, Zwolle, Norwegian Quality Improvement of Primary Care Laboratories (NOKLUS) Haralds plass Hospital Bergen⁴, Norway, Department of Clinical Chemistry Hematology & Immunology Medical Centre Alkmaar⁵, Alkmaar, Department of Clinical Chemistry and Hematology Gemini Hospital⁶, Den Helder, Department of Global Health and Primary Health Care Faculty of Medicine and Dentistry University of Bergen⁷, Norway, Laboratory of Clinical Biochemistry Haukeland University Hospital Bergen⁸, Norway

Introduction: Several studies have been published assessing the within-person biological variation of HbA1c (CVwp). However, none of these studies applied different HbA1c methods measuring different measurand, which might lead to different estimates of the biological variations.

Methods: Twenty-one apparently healthy subjects were recruited from the hospital employees. Five EDTA anticoagulated whole blood samples were collected every two weeks for two months and the aliquots were immediately stored at -80 °C until analysis. The samples were analyzed in a single run in duplicate with 4 different IFCC and NGSP certified secondary reference measurement procedures.

Results: The mean CVwp of healthy persons with four different HbA1c methods was in SI units 1.3% (range 0.8% to 1.7%) and in NGSP units 0.8% (range 0.5% to 1.0%), depending on the

HbA1c method used. The mean between person biological CV (CVbp) was in SI units 7.4% (range 6.7% to 8.0%) and in NGSP units 4.3% (range 3.9% to 4.7%). The CVwp for healthy subjects measured with the Ultra2 was significantly different from the Tosoh G8 but not if measured with Roche Tina-quant Gen.2 and the Premier Hb9210. The index of individuality varied between 0.11 and 0.22.

Conclusion: The within person biological variation of HbA1c in healthy individuals is very low compared with the between person biological variation of HbA1c, affirming the absolute individuality of Hb A1c. The data also suggest that population-based reference limits and fixed cutoff values should be more closely examined for the diagnosis of diabetes. CVs in DCCT units are lower than CVs in SI units and therefore cannot be directly compared.

60. Testosterone, androstenedione, cortisol and cortisone levels in unstimulated, stimulated and parotid saliva

R.M. BÜTTLER¹, E. BAGCI¹, H.S. BRAND², M.A. BLANKENSTEIN¹, A.C. HEIJBOER¹

Endocrine laboratory, Department of Clinical Chemistry, VU University Medical Center¹, Amsterdam, Department of Periodontology and Oral Biochemistry, Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA)², Amsterdam, The Netherlands

Introduction: In recent years measurement of steroid hormones like testosterone, androstenedione, cortisol and cortisone has become increasingly important in both patient care and research. This is mainly due to the simple and non-invasive sample collection.

Methods: We investigated in twenty healthy volunteers whether there is a difference between steroid hormone concentrations in unstimulated and parotid gland saliva as well as stimulated saliva collected while chewing without aid, using cotton and synthetic Salivettes®, citric acid or chewing gum. Testosterone, androstenedione, cortisol and cortisone were measured in all saliva samples using Liquid-Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).

Results: Testosterone, androstenedione and cortisol concentrations were not affected by stimulation by chewing itself, whereas cortisone levels decreased (mean decrease was 11%). Levels of all four hormones were lower in parotid gland saliva compared to unstimulated saliva (mean decrease was

27%, 14%, 24% and 27%, respectively). Salivary levels of testosterone, androstenedione and cortisone decreased when using synthetic Salivettes® (mean decrease was 56%, 38% and 25%, respectively) and increased when using cotton Salivettes® (mean increase was 238%, 50% and 34%, respectively) compared to chewing without aid, whereas cortisol levels in saliva were unaffected by both types of Salivettes®. Citric acid stimulation and chewing gum decreased salivary cortisone levels (mean decrease was 35% and 25%, respectively).

Conclusion: The way saliva is collected should be taken into account when analysing and interpreting salivary hormone concentrations. Stimulation on its own does not change the concentrations of testosterone, androstenedione and cortisol, but decreased the levels of cortisone. This is probably due to the rate-limited conversion of cortisol to cortisone in salivary glands. Stimulation with Salivettes®, should be avoided for analysis of testosterone, androstenedione and cortisone.

Categorie 3 Klinisch

Bloedvorming, bloedstolling, transfusie

61. Reversal of dabigatran and rivaroxaban with different haemostatic agents: an in vitro study

D. van de KERKHOF^{1,2}, E.M.H. SCHMITZ^{2,3}, D. van den HEUVEL¹, M. SCHELLINGS⁴, F. van der GRAAF^{2,4}, K. BOONEN¹

Clinical Laboratory¹, Expert Center Clinical Chemistry², Catharina Hospital Eindhoven, Department of Biomedical Engineering, Laboratory of Chemical Biology and Institute of Complex Molecular Systems³, Eindhoven University of Technology, Clinical Laboratory, Máxima Medical Center Veldhoven⁴, The Netherlands

Introduction: The effect of haemostatic agent as prothrombin complex concentrate (PCC, or activated PCC), activated recombinant FVIIa (rFVIIa) or fresh frozen plasma (FFP) on the bleeding risk of patients using novel direct oral anticoagulants (DOACs) remains largely unknown. Also, there is little evidence on which are adequate tests to follow-up on the use of haemostatic agents. We therefore studied the

haemostatic effect of different agents in an in vitro experiment applying sample pools obtained from patients using dabigatran or rivaroxaban. The haemostatic effects were determined using different coagulation assays.

Methods: Plasma pools obtained from patients using dabigatran or rivaroxaban were mixed with different concentrations of activated recombinant FVIIa (rFVIIa) or prothrombin complex

concentrate (PCC, or activated PCC). Also, a mixing study with relevant volumes of fresh frozen plasma (FFP) was performed. Each dabigatran sample was analyzed with the APTT, PT, diluted thrombin time (dTT) and Ecarin Chromogenic Assay (ECA). Each rivaroxaban sample was analyzed with the APTT, PT and the anti-Xa assay.

Results: After mixing dabigatran and rivaroxaban pools with haemostatic agents the PT normalized with rVIIa, PCC and aPCC. The APTT only normalized when rivaroxaban was

reversed with rVIIa of aPCC. FFP showed less effect for dabigatran and rivaroxaban reversal. Dedicated DOAC assays as dTT, ECA and anti-Xa were shown not to be adequate for therapy monitoring during reversal of DOACs.

Conclusion: This study shows that aPCC, and to a lesser extent rVIIa and PCC, is effective in normalizing the in vitro effects of dabigatran and rivaroxaban. FFP was shown to be ineffective.

62. Microcytaire anemie: thalassemie of ijzergebreek? Een meta-analyse van diagnostische formules

J.J.M.L. HOFFMANN¹, E. URRECHAGA², U. AGUIRRE LARRACOECHA³

Medical and Scientific Affairs, Abbott Diagnostics¹, Wiesbaden-Delkenheim, Duitsland; Hematologie Laboratorium² en Research Unit REDISSEC³, Hospital de Galdakao-Usansolo, Galdakao, Spanje

Inleiding: Er bestaan meer dan 40 diagnostische formules (DF) om bij patiënten met microcytaire anemie thalassemie trait (TT) te onderscheiden van ijzergebreek. Geen van deze formules is absoluut specifiek of sensitief en ook de onderlinge rangorde van de verschillende formules varieert sterk. Derhalve hebben wij voor het eerst een meta-analyse uitgevoerd van de meest gebruikte DF.

Methode: Uitgebreid literatuuronderzoek leverde 147 publicaties op waarin minstens één DF was geëvalueerd. Hiervan voldeden er 99 aan onze eis dat de DF in minimaal 5 studies onderzocht moest zijn; dit leverde 12 DF op. Voor iedere DF berekenden wij de Diagnostic Odds Ratio (DOR) als maat voor de diagnostische zeggingskracht.

Resultaat: De M/H ratio (microcytaire / hypochrome erythrocyten) liet veruit de hoogste DOR zien (DOR=115; 95% betrouwbaarheidsinterval [BI] 49-270), significant hoger

dan de DOR van de andere 11 DF. Als één na beste formule vonden wij de Sirdah index (DOR=47; BI: 25-88), gevolgd door de Ehsani index (DOR=42; BI: 26-67). Vier DF toonden een middelmatige DOR tussen 25 en 30: de England & Fraser, Green & King, Jayabose (RDWI) en Mentzer indices. De Ricerca, Srivastava and Shine & Lal indices scoorden een relatief lage DOR (ongeveer 14), en de Bessman index (RDW) eindigde onderaan de lijst (DOR=6; BI: 4-10). Alle indices presteerden beter in volwassenen dan in kinderen. Studies uit Europa toonden hogere DOR waarden dan publicaties uit Mediterraane en Zuidoost-Aziatische landen.

Conclusie: De M/H ratio was verreweg de beste formule om TT van ijzergebreek te onderscheiden. Desondanks zijn sensitiviteit en specificiteit niet hoog genoeg voor een definitieve diagnose. De M/H ratio is wel uitermate geschikt om patiënten te identificeren, bij wie aanvullend onderzoek naar TT geïndiceerd is.

63. Heparine-geïnduceerde obstakels op de weg naar een nieuw APTT-reagens

K.L.M. COENE, D. van de KERKHOF

Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina Ziekenhuis Eindhoven, Eindhoven

Inleiding: In het Catharina Ziekenhuis Eindhoven (CZE) wordt de geactiveerde partiële tromboplastinetijd (APTT) bepaald met het STA APTT reagens. Een overstap naar het APTT Cephascree reagens werd wenselijk geacht gezien de betere gebruiksvriendelijkheid, hogere factorgevoeligheid en lagere gevoeligheid voor lupus anticoagulans. Het Cephascree reagens kent echter andere referentiewaarden en een andere gevoeligheid voor ongefractioneerd heparine (UFH). De UFH-gevoeligheid is van belang omdat de APTT gebruikt wordt voor monitoring van behandeling met intraveneus UFH. In het CZE is in een zogenaamd 'Heparine-protocol' vastgelegd hoe de UFH perfusor-pomp ingesteld moet worden op basis van de STA APTT. De validatie van het Cephascree APTT reagens omvat daarom onder andere het vertalen van het 'Heparine-protocol' naar de nieuwe situatie.

Methode: Om de UFH-gevoeligheid van het STA APTT en Cephascree reagens te analyseren, zijn monsters gemeten van patiënten behandeld met UFH volgens het 'Heparine-protocol',

waarin het therapeutische gebied gedefinieerd is als een STA APTT tussen 70 en 120 seconden. Ook is voor deze monsters een antiXa-spiegel bepaald.

Resultaat: Andere referentiewaarden vormen geen belemmering om over te gaan op het Cephascree reagens voor de meeste toepassingen. Het vertalen van het 'Heparine-protocol' naar het Cephascree reagens blijkt echter problematisch gezien de lagere gevoeligheid voor UFH en het ontbreken van een lineair verband met de STA APTT in UFH-bevattende monsters. Uit antiXa-metingen blijkt dat de gemeten antiXa-spiegel vaak onder het therapeutische gebied (0.3-0.7 U/ml) ligt, hoewel op basis van de STA APTT de therapeutische dosering (70-120 seconden) wel bereikt zou worden.

Conclusie: Er is weinig overeenstemming tussen de STA APTT, Cephascree en de aXa-spiegel betreft het wel of niet bereiken een therapeutische UFH-spiegel. Adequate wetenschappelijke onderbouwing van UHF-instelling op basis van APTT of antiXa ontbreekt.

64. Succesvolle introductie van beslissondersteuning is meer dan een goed algoritme - Het heparinepomp protocol op de intensive care als voorbeeld

A.K. BOER¹, H.G. KREEFTENBERG², A.J.G.H. BINDELS², A.N. ROOS², S. HOUTERMAN³, H.H.M. KORSTEN², E.A.T. van DIJK - van BERKEL¹

Algemeen Klinisch Laboratorium / Kenniscentrum Klinische Chemie Eindhoven¹, Intensive Care², Afdeling Opleiding en onderzoek³, Catharina Ziekenhuis Eindhoven.

Inleiding: In een complexe en hoogtechnische omgeving als de intensive care worden voortdurend beslissingen genomen over de patiënt en zijn medicatie. Het hebben van bijvoorbeeld een heparinepompprotocol op zich, is daardoor geen garantie

dat patiënten perfect binnen de therapeutische window blijven. Beslissingsondersteuning wordt in dergelijke gevallen vaak geroemd, maar "gewoon" automatiseren leidt vaak niet tot betere prestaties van wege onder andere de meldingsmoeheid.

Method: Op onze intensive care (35 bedden en 157 verpleegkundigen) werden 30 patiënten (langere tijd) behandeld met ongefractioneerd heparine. Het heparinepompprotocol is een “papieren” naslagwerk waarin staat hoe de dosering moet worden aangepast aan de hand van de APTT en een aantal patiënteigenschappen. Dit protocol werd zodanig in de beslissingsondersteuningssoftware GASTON geprogrammeerd, dat het zelfstandig de laboratoriumuitslagen en de patiënten karakteristieken uit het ZIS haalt en gevraagd hierop de juiste pompstand berekent. In totaal werd bij 19 patiënten de dosering gebaseerd op het “papieren” protocol en werd bij 11 patiënten de dosering door GASTON voorgesteld.

Resultaat: Het percentage van de APTT's binnen het therapeutische window was significant beter in de GASTON-

groep dan in de “papieren” groep (86% versus 30%, $p < 0,001$). Bovendien moet de APTT op gezette momenten worden herhaald. In de GASTON-groep werd aanzienlijk vaker binnen de beoogde tijdswindow een nieuwe APTT aangevraagd dan in de papieren groep (86% versus 64%, $p = 0,009$).

Conclusie: Het hebben van een doseringsprotocol alleen, is niet voldoende om in een complexe omgeving als een intensive care de dosering van ongefractioneerd heparine goed in te stellen. In een aanvullende enquête geven verpleegkundigen aan dat zij GASTON makkelijker vinden omdat het zelf de APTT opzoekt en hierop de juiste pompstand berekent. Ze beschouwen dit als tijdswinst en werklastermindering, waardoor de compliance toeneemt.

65. Increased coagulation and fibrinolytic potential of solvent-detergent plasma: a 72 hour observation study between Omniplasma and Quarantine plasma

J.J.B.C. van BEERS¹, L.T. van EGMOND¹, R.J.H. WETZELS¹, E.A. M. BECKERS², R.van OERLE^{1,3}, H.M.H. SPRONK³, R.J.M.H.E. STRAAT¹, Y.M.C. HENSKENS¹

Central Diagnostic Laboratory, Cluster for Hemostasis and Transfusion, Maastricht University Medical Center² (MUMC+), Maastricht, Department of Internal Medicine, Subdivision Hematology, Maastricht University Medical Center² (MUMC+), Maastricht, Laboratory for Clinical Thrombosis and Haemostasis, Department of Internal Medicine, Cardiovascular Research Institute Maastricht, Maastricht University Medical Center³ (MUMC+), Maastricht, The Netherlands

Introduction: The aim of this study was to examine the potential differences in fibrinolysis and coagulation between single donor quarantine plasma (Q-plasma) and the recently developed SD-treated Omniplasma. In addition, thawing time as well as the stability of coagulation proteins in the plasma bags were compared. Plasma stability was studied by measuring at different time points after storage at 2-6 °C.

Methods: 10 Omniplasma bags and 10 Q-plasma bags were used to study different coagulation, anticoagulation and fibrinolytic parameters in both plasmas. Analysis was performed from baseline up to 72 hours of storage at 2-6 °C after thawing to study stability.

Results: At baseline, significant reduced levels of factor V, free protein S, $\alpha 2$ -antiplasmin and tPA induced lysis time were observed in Omniplasma as compared to single donor Q-plasma. Moreover, thrombin generation and IX-AT complex are significantly increased in Omniplasma. The majority of the

parameters studied remained stable in Omniplasma 48 hours after thawing. Finally, it was observed that Q-plasma and Omniplasma differ in the thawing time.

Conclusion: Our results suggest increased coagulation potential and increased fibrinolytic potential of Omniplasma. Increased coagulation potential is suggested to be the result of contact activation, possible due to the production process. Increased fibrinolytic potential is based upon decreased lysis time (50% lower as in Q-plasma) in Omniplasma. Reduced lysis time suggest faster degradation of fibrin. Our data suggest that reduced $\alpha 2$ -antiplasmin may play a role in the reduction of lysis time. Furthermore, the stability of Omniplasma is comparable to Q-plasma and a storage time of 48 hours after thawing for Omniplasma can be suggested. Finally, thawing of Omniplasma, which contains a smaller volume than Q-plasma, takes similar time or even longer than Q-plasma.

66. Peak and trough values of Pradaxa® in cardiologic and orthopedic patients

K.J.M. BOONEN¹, E.M.H. SCHMITZ^{2,3}, F.F.J. ROZESTRATEN⁴, M. SCHELLINGS⁵, D. van der HEUVEL⁴, P. van der VOORT⁴, R. ten BROEKE⁴, A.T. BESSELAAR⁴, D. van de KERKHOF^{2,4}

Clinical Laboratory, Amphia Hospital Breda, Breda. Expert Center Clinical Chemistry Eindhoven², Eindhoven. Department of Biomedical Engineering, Laboratory of Chemical Biology and Institute of Complex Molecular Systems, Eindhoven University of Technology³, Eindhoven. Clinical Laboratory, The Netherlands, Catharina Hospital Eindhoven⁴, Eindhoven, Clinical Laboratory, Máxima Medical Center Veldhoven⁵, Veldhoven, The Netherlands

Introduction: Dabigatran (Pradaxa®) is one of the most used direct oral anticoagulants in common practice. Clinical trials have shown large variation in peak and trough concentrations, ranging from 35 to 450 ng/mL for peak concentrations and 10 to 225 ng/mL for trough concentrations, in spite of standard dosage regimes. Since knowledge of peak and trough levels is helpful in the establishment of bleeding risk in emergency situations, we investigated these levels in an orthopedic and a cardiologic population using Pradaxa®.

Methods: Forty orthopaedic and forty cardiologic subjects were included. The cardiologic subjects had been stable outpatient users of the drug for the prevention of thromboembolism in atrial fibrillation, whereas the orthopaedic subjects were using the drug for the second consecutive day after total knee or hip replacement surgery.

Blood was collected just before and 2 and 4 hours after taking a dose. Samples were analyzed for dabigatran by UPLC-MS/MS and several coagulation assays (2 different dTT assays, ECA, PT and APTT).

Results: An impressive range of peak and trough values was found for both groups. For the cardiologic patients, median peak and trough values (with 95% CI) were 154 (50-381) and 59 (19-142) ng/mL respectively. For the orthopedic patients, median peak and trough values (with 95% CI) were 69 (11-279) and 12 (1-50) ng/mL respectively. All coagulation assays show a significant bias when compared to the UPLC-MS/MS method, dependent on time point and patient group.

Conclusion: Peak and trough values vary significantly within patient groups. Coagulation assays correlate relatively well with UPLC-MS/MS, but show bias.

67. Anti-Jkb antistoffen klinisch relevant voor afstoting van een niertransplantaat

M.P. ZIJLSTRA¹, M. DELLO¹, J. VANDERLOCHT², E.A.M. BECKERS³, Y.M.C. HENSKENS¹

Centraal diagnostisch laboratorium¹, Transplantatie immunologie², Interne geneeskunde³, Maastricht Universitair Medisch Centrum

Inleiding: Antistoffen tegen het Jkb (Kidd) antigeen spelen mogelijk een rol in de afstoting van niertransplantaten (1). Jkb antistoffen zijn efficiënte activatoren van het complement-systeem en kunnen, bij lage titers, worden gemist in antistofscreeningen. Een reactieversterker zoals PEG kan dit voorkomen. Hier beschrijven wij een casus waarbij een +/- reactie in het screeningspaneel blijkt te worden veroorzaakt door een anti-Jkb antistof die alleen aantoonbaar is in de PEG-techniek, maar klinisch relevant lijkt te zijn voor de afstotingsreactie van een niertransplantaat.

Methode: Patiënt (v) 48 jaar, non-heartbeating-donor (m) onbekende leeftijd. 3-cells screening (ID-Diacell, BioRad) is gevolgd door het elf-cells ID-Diapanel (Biorad) LISS en PEG. Jkb phenotypering patiënt (negatief) (Biorad), genotypering nierdonor (positief) op DNA uit de milt (Sanquin). Serum van de patiënt is maandelijks geanalyseerd op de aanwezigheid van HLA-antistoffen (Luminex, Life Technologies) en anti-Jkb antistoffen (Retrospectief, PEG Sanquin, ID-Diapanel).

Resultaat: Antistofscreeningen uit het verleden waren negatief. 1 jaar na de niertransplantatie werd een +/- reactie gevonden m.b.v. de standaard LISS techniek, die na PEG-behandeling veroorzaakt bleek te worden door anti-Jkb antistoffen. Retrospectieve analyse in PEG liet een positieve reactie zien 1 maand en 1 jaar (tijdens de afstotingsreactie die gepaard ging met een kreatinine stijging en expressie van HLA-antistoffen) na transplantatie. Het Jkb-antigeen is de ureum transporter in de nier. Binding van de anti-Jkb antistoffen aan deze transporter kunnen door complementactivatie leiden tot nierschade en uiteindelijk afstoting van het transplantaat. De afstotingsreactie van het transplantaat bij deze patiënt kan mogelijk verklaard worden door bovenstaand fenomeen.

Conclusie: Er is mogelijk een onderbelichte rol voor anti-Jkb antistoffen in de afstotingsreactie van niertransplantaten.

Literatuur: 1) Holt et al, Nephrol Dial Transplant 2004;19:2403-2406.

68. TTP gevolgd door een HIT: two thrombocytopenia hits in a row

P.J. GEUTJES, I.C.A. MUNNIX, J.M.W. van den OUWELAND

Klinisch Chemisch Laboratorium, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen

Inleiding: Trombotische trombocytopenische purpura (TTP) en heparine-geïnduceerde trombocytopenie (HIT) zijn zeldzame maar ernstige aandoeningen die gepaard gaan met een diepe trombocytopenie in combinatie met trombose. In beide gevallen kan de oorzaak immuun-gemedieerd zijn waarbij autoantistoffen de trombocyten in de microcirculatie activeren. Van beide aandoeningen is uitgebreide casuïstiek beschreven maar een casus met zowel TTP als HIT is zover ons bekend niet eerder gerapporteerd.

Methode: Een 37-jarige vrouw meldde zich op de spoedeisende hulp van het CWZ met spontane bloedneuzen en hematomen (>10) op romp en ledematen. Na uitgebreid laboratoriumonderzoek bleek ze naast een diepe trombocytopenie ($6 \times 10^9/L$) een hemolytische anemie (Hb 6,0 mmol/L, LDH 507 U/l, haptoglobine <0,10 g/l, Coombs negatief, fragmentocyten) te hebben. Haar nierfunctie was normaal en er waren geen tekenen van neurologische problematiek of infecties. Na het inzetten van ADAMTS-13 diagnostiek werd direct gestart met prednison (1 mg/kg), plasmaferese (50 ml/kg/dag) en heparine.

Resultaat: Er werd een verlaagde ADAMTS-13 activiteit (5%) aangetoond ten gevolge van specifieke autoantistoffen en binnen 6 dagen na start van de behandeling werd een licht herstel van het trombocytenaantal waargenomen ($40 \times 10^9/L$). Op dag 8 werd echter een trombocytendaling ($18 \times 10^9/L$) zonder trombose geconstateerd. Na een 3+ positieve 4T HIT score (volgens Warkentin et al.1) werd HIT diagnostiek ingezet en heparine vervangen door danaparoid. Zowel de heparine/PF4 ELISA als de confirmatietest (HIPAA) waren positief. Twee dagen later herstelde het trombocytenaantal waarna plasmaferese kon worden gestopt.

Conclusie: Het betreft hier een unieke trombocytopenie casus die zowel door TTP als HIT werd veroorzaakt. Laboratoriumdiagnostiek was bepalend in opheldering en behandeling van beide aandoeningen.

Literatuur: 1. Warkentin TE. Br J Haematol 2003;121:535-55.

69. INR vs. thrombin generation assays for guiding VKA reversal: a retrospective comparison

R. HERPERS¹, R.T. van BEEM², W.M. MICHEL³, V.J.F. STRIJBIS³, P.F.W. STRENGERS², A. CASTEL¹, H.J.M. BRINKMAN, A.P. van ROSSUM¹

Laboratory for Clinical Chemistry and Haematology, Bronovo Hospital¹, The Hague, Medical Department, Sanquin Plasma Products², Amsterdam, Department of PlasmaProteins, Sanquin Research, Amsterdam³, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Prothrombin complex concentrate (PCC) is used to reverse vitamin K antagonist (VKA)-induced anticoagulation. Prothrombin time-derived international normalized ratio (INR) measurements are widely used in determining the required PCC dose, but this approach requires reappraisal. The aim of the present study was to determine the added value of the thrombin generation assay (TGA) compared with the INR in guidance of VKA reversal by PCC.

Methods: In an open, observational study, INR and TGA measurements were carried out on plasma samples from phenprocoumon-treated patients receiving VKA reversal. Following both analytical methods, PCC dosing correlates

were calculated and compared retrospectively. Alternatively, in vitro PCC spiking experiments were performed.

Results: As expected, an exponential relationship between PCC dose and INR was found. For the TGA parameters peak thrombin and endogenous thrombin potential (ETP), however, this relationship was found to be linear throughout the full therapeutic range. Additional computational analysis showed a positive correlation ($r^2 = 0.7$) between the initial INR and PCC dose required for a target INR of 2.1, which was completely lost at a lower target INR. In contrast, a positive correlation ($r^2 = 0.8$) between initial ETP as well as peak height and PCC dose required to obtain parameter normalization was found.

These correlates appeared useful for calculating PCC dose. *Conclusion:* Our results support the current debate questioning the rationale for the use of the INR in the management of

anticoagulation by VKA. Compared with INR, TGA-based calculations may enable a more accurate PCC dosing regimen for patients requiring VKA reversal.

Categorie 3 Klinisch

Infectie, afweer, allergie

70. CRP in de huisartsenpraktijk heeft meerwaarde

H. ULENKATE¹, R. van POEIJER¹, V. VOORBROOD²

Klinisch Chemisch Laboratorium, ZorgSaam Ziekenhuis Zeeuws-Vlaanderen¹, Huisartsenpraktijk², Hulst

Inleiding: Het doel was na te gaan of en hoe de CRP-sneltest het voorschrijfgedrag van antibiotica in de huisartsenpraktijk beïnvloedt. De NHG-standaard acut hoesten beschrijft het gebruik van een CRP-sneltest. Het voorschrijven van antibiotica wordt niet aangeraden bij een lage CRP-uitslag bij matig zieke patiënten met gecompliceerde luchtweginfecties zonder risico op gecompliceerd beloop.

Methode: Doktersassistenten werden geschoold in de uitvoering van de CRP-sneltest van Biomerieux bij patiënten met luchtweginfecties. Bij elke test werd een formulier ingevuld met o.a. de klachten van de patiënt en wat het voorschrijfgedrag was zonder CRP-uitslag. Tevens werd na meting van de CRP het voorschrijfgedrag ingevuld met kennis van de CRP-uitslag. Nagegaan werd of het voorschrijfgedrag met kennis van de CRP-uitslag herzien werd.

Resultaat: Bij 39% van de geteste patiënten (n=142) heeft het verkrijgen van de CRP-uitslag ervoor gezorgd dat het voorschrijfgedrag van antibiotica als volgt is aangepast. Bij 9% van de patiënten zou op basis van de anamnese en lichamelijk

onderzoek wel antibiotica gegeven worden, maar is op basis van de lage CRP-uitslag uiteindelijk geen antibiotica voorgeschreven. Bij 30% van de patiënten zou op basis van de anamnese en lichamelijk onderzoek geen antibiotica gegeven worden, maar is op basis van de anamnese en lichamelijk onderzoek met hoge CRP-uitslag uiteindelijk wel antibiotica voorgeschreven. Bij 41% van de patiënten bevestigde de lage CRP-uitslag de anamnese/lichamelijk onderzoek en werd geen antibiotica voorgeschreven. Bij 14% van de patiënten bevestigde de hoge CRP-uitslag de anamnese/lichamelijk onderzoek en werd antibiotica voorgeschreven. Bij 6% van de patiënten was het formulier niet volledig ingevuld of paste het beleid niet bij de CRP-uitslag.

Conclusie: De CRP-uitslag beïnvloedt of bevestigt het antibioticabeleid en heeft daarmee een meerwaarde in de huisartspraktijk voor de patiënt.

Literatuur: NHG-standaard M78 acut hoesten (2013).

Categorie 3 Klinisch

Lever- en darmpathologie

71. Evaluation of automated fecal calprotectin

M.P. SCHUIJT, J. KRABBEN, M. de GRAAF, J. HARTSKEERL, S.G.A. KOEHORST

Laboratory for Clinical Chemistry and Hematology, Slingeland Hospital, Doetinchem, The Netherlands

Introduction: Calprotectin is a promising marker to distinguish inflammatory bowel disease (IBD) from irritable bowel syndrome (IBS).

Methods: To investigate the performance of the automated fecal calprotectin analysis on the Alegria (Orgentec/Siemens) and on the ImmunoCAP250 (Thermo Fisher), 25 fecal samples of patients with either IBS, ulcerative colitis or Crohn's disease were collected. The accuracy was determined by using the alternative method comparison protocol. The imprecision was determined by the CLSI EP10 protocol. All samples were kept frozen until extraction. The fecal sample preparation kit of Roche Diagnostics was used for both methods. The only difference was the extraction buffers used. The extracted samples were kept frozen in aliquots until use.

Results: Twenty-two samples showed equal results. Two samples of patients with irritable bowel syndrome were just above the cut-off with the Alegria (67 and 52 mg/kg), while

the ImmunoCAP250 measured below (24 and 35 mg/kg). For one patient with ulcerative colitis in remission, the Alegria gave a high result (620 mg/kg), whereas the ImmunoCAP250 measured just above the cut-off (69 mg/kg). The Alegria showed a total CV of 23.5%, 16.5% and 12.6% at low, intermediate and high levels of fecal calprotectin, whereas the ImmunoCAP250 showed a total CV of 11.9%, 13.2% and 7.1%, respectively. To complete the EP10 protocol with the Alegria, three extra runs were needed because of rejected control measurements (2x) and an outlier (1x). With the ImmunoCAP250 the extracted aliquots appeared to decrease over time.

Conclusion: Both analysers perform well. The fecal calprotectin analysis on the ImmunoCAP250 appears to resemble the clinical situation better. The Alegria is more suitable for daily testing, whereas the ImmunoCAP250 is more designed for batchwise analysis.

Nierziekten

72. Long term variation of BNP and NT-proBNP in haemodialysis patients

M. VAN BERKEL, M.J.E. DEKKER¹, V. SCHARNHORST, C. J.A.M KONINGS²

Clinical laboratory and ¹ Department of internal medicine², Catharina Hospital, Eindhoven, The Netherlands

Introduction: Cardiovascular damage is one of the major complications in patients with end stage renal disease (ESRD). Not only 70% of ESRD patients suffer from left ventricular hypertrophy (LVH) at the start of dialysis, hypertrophy progresses during the period of dialysis. Early detection of deteriorating LVH is therefore warranted. Brain natriuretic peptide (BNP) and N-terminal prohormone (NT-pro) BNP are sensitive biomarkers to detect congestive heart failure. Definition of a static cut-off value for these biomarkers in haemodialysis patients is often inconclusive, since clearance during dialysis, residual renal clearance and volume status creates large intra-individual variation. Therefore, the intra-individual variation of NT-proBNP as well as BNP in a large population of asymptomatic haemodialysis patients was investigated.

Methods: This study was a prospective, observational, single centre study with 185 chronic hemodialysis patients. Every

3-monthly routine laboratory control was taken prior to dialysis and included either BNP (Siemens Medical Solutions Diagnostics) or NT-proBNP (Roche Diagnostics) for a total period of 15 months.

Results: The intra-individual variation (% CVi) for BNP in 185 asymptomatic patients with > 2 values (a total of 802 values) was 44%. For NT-pro BNP, the % CVi was similar, e.g. 42% for a 3 month interval (derived from 531 values). The normal RCVs were 122% and 115% for BNP and NT-proBNP respectively for asymptomatic haemodialysis patients.

Conclusion: We have established reference intervals for variation of BNP and NT-proBNP within a population of hemodialysis patients. A relative change in (NT-pro)BNP exceeding this variation may be used to detect abnormal (e.g. > 95th percentile of change) variation in a haemodialysis patient and might improve clinical decision for detection of deteriorating LVH.

Gynaecologie/obstetrie

73. Low vitamin B12 is highly prevalent in milk of women living in Europe, Caribbean, Africa and Asia

E. STOUTJESDIJK¹, A. SCHAAFSMA², D.A.J. DIJCK-BROUWER¹, F.A.J. MUSKIET¹

University Medical Center Groningen, Laboratory Medicine¹, Friesland Campina, Leeuwarden² University of Groningen

Introduction: WHO recommends exclusive breastfeeding for the first 6 postnatal months. Subclinical vitamin B12 (VB12) deficiency in Western adults is widespread and low VB12 status is a characteristic finding in breastfed children. Adequate VB12 status is important for neurodevelopment. Adequate VB12 intake (AI) for 0-6 months infants by IOM is 0.4 microg/day, which translates to 378 pmol VB12/L breast-milk at a mean intake of 780 mL/day. A recent RCT showed that <8 months old infants with feeding difficulties, subtle neurological symptoms or delayed psychomotor development and 6.5-18.0 micromol homocysteine/L had improved motor functions and regurgitations at 1 month following a single 400 µg i.m. VB12 injection. We investigated milk VB12 in various populations of lactating women.

Methods: Breast-milk was collected from 4-12 weeks lactating women in The Netherlands (n=20), Curaçao (n=10), Tanzania-Maasai (n=18), Vietnam-HaLongBay (n=20), Vietnam-PhuTho (n=22), Vietnam-TienGiang (n=20), Vietnam-HoChiMinhCity

(n=18), Vietnam-Hanoi (n=21) and Malaysia-Ipoh (n=20). VB12 was analyzed by Immulite.

Results: Medians in pmol/L (range; percentage below AI) were: The Netherlands 167 (n.d.-678; 80%), Curaçao 231 (n.d.->738; 70%), Tanzania-Maasai 120.5 (n.d.-391; 94%), Vietnam-HaLongBay 503 (123- >738; 35%), Vietnam-PhuTho 238 (120-674; 82%), Vietnam-TienGiang 213.5 (n.d.-603; 65%), Vietnam-HoChiMinhCity 242.5 (115-661; 58%), Vietnam-Hanoi 242 (114-500; 86%) and Malaysia-Ipoh 297 (n.d.-714; 65%). Present results proved comparable with literature: 65% of milk VB12 of Guatemalan lactating women fell below 50 pmol/L and supplemented Californian women exhibited a 565 pmol/L median.

Conclusion: The prevalence of breastmilk VB12 <378 pmol/L is high. Mothers in Vietnam-HaLongBay constitute an exception. They belong to a fish-eating community. Fish and shellfish are rich sources of VB12. VB12 availability from fish is better than meat. VB12 status of women of childbearing age needs urgent attention.

74. Studying human milk electrolyte interactions independent of lactose for manufacturing optimal infant formula composition

E. STOUTJESDIJK¹, E.F. VOGELAAR², H. EBBELINK², A. SCHAAFSMA³, D.A.J. DIJCK-BROUWER¹, F.A.J. MUSKIET¹
Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen¹, Groningen. World Health Laboratory, Bunnik², Friesland Campina, Leeuwarden³

Introduction: Understanding electrolyte interactions is important for manufacturing optimal infant formula composition. Interactions are, however, poorly understood. Milk osmolality equals plasma osmolality. Lactose is the major osmotic determinant, with the remainder mostly on account of free electrolytes, notably Na, K, Ca (33% of total), Mg (66%) and anionic counterparts. Osmotic dominance of lactose and its

biological variation hamper the study of interactions between electrolytes expressed as concentrations (mmol/L). We studied milk Na, K, Ca and Mg expressed as molar percentages of their sum (mol%).

Methods: Breast-milk samples from lactating mothers in the Netherlands (n=20), Tanzania-Ukerewe (n=17), Tanzania-Maasai (n=20), Vietnam-HaLongBay (n=20), Vietnam-

PhuTho (n=22), Malaysia-Ipoh (n=20) and Curaçao (n=11) were analyzed for Na, K, Ca and Mg using ICP-MS.

Results: Medians (ranges) for all 127 samples in mmol/L were: K 14.0 (9.4-18.7), Na 6.8 (2.3-31.9), Ca 7.0 (3.5-9.5), Mg 1.3 (0.7-2.1). In mol% they were: K 48.5 (21.5-63.2), Na 22.5 (10.0-62.1), Ca 23.6 (7.1-30.2), Mg 4.3 (1.8-7.1). The CVs biological (in %) for data expressed in mmol/L vs. mol% were: K (18.2 vs. 12.3), Na (55.9 vs. 43.4), Ca (27.2 vs. 20.3), Mg (33.1 vs. 32.5). Expressed in mmol/L, we found correlations ($p < 0.01$) for:

K vs. Ca ($r = 0.341$), K vs. Mg ($r = 0.309$), Mg vs. Ca ($r = 0.345$). When expressed in mol% these relations were: Na vs. K ($r = -0.817$), Na vs. Ca ($r = -0.603$), Na vs. Mg ($r = -0.509$), K vs. Mg ($r = 0.314$), Mg vs. Ca ($r = 0.315$).

Conclusion: Expression of milk electrolytes in mol%, as compared to mmol/L, reduces biological variation and reveals negative associations for Na vs. K/Ca/Mg and positives for Mg vs. Ca/K. These physiology-based interrelationships take us closer to optimizing the infant formula electrolyte composition.

Categorie 3 Klinisch

Neurologie, psychiatrie, KNO en oogheelkunde

75. Susceptibility to vitamin B6-induced neuropathy may derive from low homocysteine remethylation capacity, notably low vitamin B12 status. A pilot study

R.F. MAHOMEDRADJA¹, E.M.H. MATHUS-VLIEGEN², M.A. BLANKENSTEIN³, F.A.J. MUSKIET¹
Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen (UMCG), Groningen¹, Department of Gastroenterology and Hepatology, Academic Medical Centre (AMC), Amsterdam², Department of Clinical Chemistry, VU University Medical Center (VUMC), Amsterdam³, The Netherlands

Introduction: Vitamin B6 (VB6)-toxicity through self-supplementation increases. Underlying mechanism is unclear. Both VB6-deficiency and VB6-toxicity cause neuropathy. Surprisingly, some develop VB6-toxicity-neuropathy at relatively low VB6 intakes, while others have no symptoms at high intakes. We hypothesize that high VB6 may excessively stimulate cystathione-beta-synthase (CBS), both as prosthetic group and chaperone, causing disbalance between homocysteine remethylation and homocysteine transsulfuration in favor of the latter, resulting in diminished transmethylation and 5-methyltetrahydrofolate cycling. VB6-induced excessive stimulation of CBS, cystathionine-gamma-lyase (CGL) and aspartate-aminotransferase (AAT)/cysteine-aminotransferase (CAT) may also augment H2S production (desulfuration). High H2S is neurotoxic. Subjects susceptible to VB6-toxicity-neuropathy might have diminished homocysteine remethylation capacity, including VB12, folate, protein intake (methionine), betaine/choline and MTHFR-TT. High VB6 may especially precipitate subclinical VB12-deficiency to clinical VB12-deficiency. (Sub)clinical VB12-deficiency is widespread, notably in elderly. Interestingly,

clinical presentations of VB12-deficiency and VB6-toxicity are similar. Both show sensory and motor neuropathies, while sural-nerve biopsies indicate demyelination and axonal degeneration in both conditions.

Methods: We studied a 78-years-old woman with sensory neuropathy. She took 50 mg VB6 for more than 1 year, B-100 complex (25 mg VB6, 0.1 mg folic acid, 0.1 mg VB12, 0.1 g choline-bitartrate) daily for years and also took cimetidine. Without discontinuing this regime we supplemented her with 1 mg VB12/day for 1.5 months.

Results: Plasma VB6 dropped from 220 to 37 nmol/L, VB12 increased from 168 to 351 pmol/L, methylmalonic acid dropped from 280 to 180 pmol/L and homocysteine remained unchanged (9.8 vs. 9.6 micromol/L). Reportedly, the neuropathy ameliorated.

Conclusion: This pilot suggests that vitamins involved in the folate cycle-remethylation-transmethylation-transsulfuration-desulfuration pathways interact. Patients with suspected VB6-toxicity-neuropathy may need examination of diminished remethylation capacity, notably caused by low VB12 status.

Categorie 3 Klinisch

Oncologie

76. Multicenterevaluatie van een nieuwe progastrin-releasing peptide (ProGRP) immunoassay in Europa en China

C.M. KORSE¹, J.C. BUNING-KAGER¹, J.A. BRUIN¹, B. WEHNL², D. van den BROEK¹
Algemeen Klinisch Laboratorium, Antoni van Leeuwenhoek¹, Amsterdam, Roche Diagnostics GmbH², Penzberg, Duitsland

Inleiding: In toenemende mate wordt pro-gastrin releasing peptide (proGRP) beschreven als veelbelovende tumormarker bij de differentiaal diagnostiek tussen kleincellige longtumoren (SCLC) en niet-kleincellige longtumoren (NSCLC). Recentelijk heeft Roche een proGRP-assay ontwikkeld.

Methoden: In samenwerking met vier andere internationale centra heeft er een technische en klinische evaluatie plaatsgevonden van de Elecsys® assay (Roche), waaronder een methodevergelijking met de ARCHITECT-assay (Abbott) en de ELISA van Fujirebio, vaststellen referentiewaarden en vergelijking met neuronspecifiek enolase (NSE) in de differentiaal diagnostiek SCLC vs. NSCLC. Hiervoor zijn ROC-AUC's, sensitiviteit en specificiteit berekend. ProGRP en NSE zijn beide Elecsys®, electrochemiluminescentie-immunoassays.

Resultaat: De intervariatie coëfficiënt van de proGRP varieert tussen 2,2% en 6,0%. Stabiliteit in serum en plasmamonsters

onder verschillende bewaarcondities is goed. Correlatie-coëfficiënt tussen Roche ARCHITECT is 0,96 (slope 1,02, intercept -2,72 ng/l) en tussen serum- en plasmamonsters 0,97 (slope 0,93, intercept 2,35 ng/l). Referentiewaarde is vastgesteld bij 1038 gezonde personen als <68 ng/l). Bij 852 patiënten met NSCLC en 184 met SCLC is bij een vastgestelde 95% de sensitiviteit van NSE 41% en van proGRP 72%. ROC-AUC's zijn respectievelijk 0,76 en 0,87. Er was geen relatie gevonden met roken, etniciteit, leeftijd of geslacht. ProGRP kan vals verhoogd zijn bij eGFR >30 ml/min/1,73m².

Conclusie: ProGRP is een waardevolle tumormarker bij de differentiaaldiagnostiek SCLC vs. NSCLC. ProGRP is bij SCLC sensitiever dan NSE. Stabiliteit van de Elecsys® ProGRP-assay is beter dan bestaande methodes. Correlatie met bestaande methodes is goed. ProGRP kan verhoogd zijn bij nierfalen.

Literatuur: Korse et al. Clin Chim Acta 2014;438C:388.

77. Technische validatie van Human Epididymal protein 4 (HE4)

C.M. KORSE¹, A. STIEKEMA², H. RAMDHANI¹, H.H. van ROSSUM¹, D. van den BROEK¹

Algemeen Klinisch Laboratorium, Antoni van Leeuwenhoek¹, Amsterdam. Centrum voor Gynaecologische Oncologie Amsterdam (CGOA)²

Inleiding: Eierstokkanker is de meest dodelijke kanker van de gynaecologische maligniteiten. CA125 is tegenwoordig de meest gebruikte tumormarker bij deze ziekte, maar heeft zijn beperkingen wat betreft sensitiviteit en specificiteit. Verschillende studies laten zien dat de recent ontwikkelde tumormarker Human Epididymal protein 4 (HE4) een hogere specificiteit heeft dan CA125 en samen met CA125 gebruikt kan worden als triage voor de voorspelling van het ovariumcarcinoom (bij vrouwen met een massa in het kleine bekken). Recentelijk is daarom de Cobas-HE4-bepaling gevalideerd.

Methode: De HE4-bepaling, een "ECLIA", werd verricht op de Cobas®6000 analyzer (Roche). De analytische validatie bestond uit het vaststellen en/of confirmeren van de imprecisie (volgens EP5-02); lineariteit; methodevergelijking met de Architect i1000 (Abbott); analytische interferentie door hemolyse, icterie en lipemie; houdbaarheid monstermateriaal. De door Roche opgegeven referentiewaarden, met aandacht voor leeftijdsafhankelijkheid, zijn bestudeerd met behulp van CLSI C28-A3.

Resultaat: De detectielimiet van HE4 is 15 pmol/l. Intra- en interassay variaties zijn kleiner dan 5%. Spearman correlatiecoëfficiënt tussen Cobas en ARCHITECT is $r=0.975$. Passing Bablok regressie: Roche = $6,39 + 0,97 \times$ Abbott. HE4 is tot 8 uur stabiel bij kamertemperatuur, 2 weken bij +4°C en minstens 2,5 jaar bij -30 °C. De HE4 referentiewaarden zijn leeftijdsafhankelijk en vastgesteld op: vrouwen jonger dan 40 jaar: <60 pmol/l; van 40-60 jaar: <75 pmol/l en ouder dan 60 jaar: <90 pmol/l.

Conclusie: De Cobas-HE4 heeft adequaat analytische eigenschappen voor gebruik in de patiëntenzorg. Er is een uitstekende correlatie met de ARCHITECT-assay. De referentiewaarden zijn in tegenstelling tot CA125 niet afhankelijk van de menopauzale status, maar wel van de leeftijd.

Literatuur: 1) Stiekema et al. *Gynecol Oncol* 2014;132:573. 2) Moore et al. *Gynecol Oncol* 2009;112:40.

78. Human Epididymal protein 4 (HE4), een waardevolle tumormarker bij de diagnostiek van het ovariumcarcinoom

C.M. KORSE¹, A. STIEKEMA², C.A.R. LOK², H.H. van ROSSUM¹, D. van den BROEK¹

Algemeen Klinisch Laboratorium, Antoni van Leeuwenhoek¹, Amsterdam. Centrum voor Gynaecologische Oncologie Amsterdam (CGOA)², Amsterdam

Inleiding: De recent ontwikkelde tumormarker HE4 voor het epitheliaal ovariumcarcinoom (EOC) is wat betreft specificiteit superieur aan CA125 en biedt veelbelovende mogelijkheden voor de diagnostiek van het EOC. Wij onderzochten de waarde van HE4 in relatie met andere tumormarkers bij het onderscheid 1) tussen benigne en maligne ovariumtumoren en 2) tussen EOC en ovariële metastasen afkomstig van gastro-intestinale (GI) tumoren.

Methode: 1. De Risk of Malignancy Index (RMI), een score op basis van CA125, menopauzale status en echografie, wordt gebruikt om te differentiëren tussen benigne en maligne ovariële afwijkingen. Bij vrouwen die met een RMI >200 zijn doorverwezen naar het CGOA werd HE4 en CA125 (Cobas, Roche) gemeten. 2. Retrospectief werd in de sera van 147 vrouwen met EOC en 40 vrouwen met ovariële metastasen afkomstig van GI tumoren HE4, CA125 en CEA (Cobas, Roche) gemeten.

Resultaat: 1. Interimanalyse van 38 vrouwen met een RMI>200 liet zien dat 22 (58%), 3 (8%) en 13 (34%) vrouwen respectievelijk een EOC, een borderline tumor of een benigne cyste hadden. Hiervan hadden er 19 (86%), 1 (33%) en 1 (8%) een verhoogde HE4. 2. HE4 en CEA waren onafhankelijke factoren in de differentiatie tussen EOC en ovariële metastasen (beide $p<0,001$) in tegenstelling tot CA125 ($p=0,33$). De $HE4^{2.5}/CEA$ -ratio had het grootste onderscheidend vermogen (ROC-AUC=0,94) in vergelijking tot HE4 (0,88), CEA (0,78) en CA125 (0,80). Specificiteit $HE4^{2.5}/CEA$ -ratio was 83% bij een 90% sensitiviteit.

Conclusie: HE4 is een belangrijke, nieuwe tumormarker in de diagnostiek van het EOC. Met vrij grote betrouwbaarheid kan voorafgaand aan de operatie worden vastgesteld of patiënte een benigne of maligne ovariumafwijking heeft, dan wel een primair ovariumcarcinoom of ovariële metastase van GI origine.

Literatuur: Stiekema et al. *Gynecol Oncol*. 2015.

79. Niacin (vitamin B3) suppletion in patients with serotonin producing neuroendocrine tumors

M. van FAASSEN¹, G. BOUMA², G. KATS-UGURLU³, E.G.E. de VRIES², A.M.E. WALENKAMP², I.P. KEMA¹

Department of Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen¹, Groningen, Department of Medical Oncology, University Medical Center Groningen¹, Groningen, Department of Pathology, University Medical Center Groningen³, Groningen, The Netherlands

Introduction: Serotonin is derived from the essential amino acid tryptophan. Tryptophan is also a precursor of niacin (vitamin B3) which is critical for normal cellular metabolism. In case of excessive serotonin production by neuroendocrine tumors (NETs), tryptophan and/or niacin can be deficient in these patients leading to symptoms including pellagra. Suppletion of tryptophan might facilitate serotonin production and is therefore undesirable in patients with serotonin producing NETs. In malnourished people, pellagra is effectively treated with niacin suppletion. However, in serotonin producing NET

patients data on niacin status are scarce and suppletion of niacin receives hardly attention. We therefore aimed to assess niacin status before and after niacin suppletion in serotonin producing NET patients.

Methods: We identified serotonin producing NET patients who had received oral niacin suppletion for tryptophan deficiency and/or pellagra associated symptoms. Pre-suppletion plasma tryptophan levels and niacin status based on the urinary niacin metabolite N1-methylnicotinamide (N1-MN) before (n=42) and after start suppletion (in 34 paired samples) were assessed.

Results: The mean pre-suppletion plasma tryptophan level was 31.8 ± 9.7 $\mu\text{mol/L}$ (reference value 40.0-70.0 $\mu\text{mol/L}$). Pre-suppletion urinary N1-MN levels were lower in patients (median 17.9 $\mu\text{mol/24-hour}$ (24-h), range 2.6-70) compared to healthy controls (median 43.7 $\mu\text{mol/24-h}$, range 9.5 - 169, $P < 0.0001$) and below normal in 45% of the patients. Niacin suppletion increased urinary N1-MN levels to high normal levels (median 55.5 $\mu\text{mol/24-h}$, range 7.4 - 489) in 86% of the niacin deficient patients.

Conclusion: In serotonin producing NET patients niacin deficiency is prevalent. Therefore, urinary N1-MN deserves to be included in their standard biochemical evaluation. Niacin suppletion normalizes niacin status in most niacin deficient serotonin producing NET patients. A prospective study is warranted.

80. Detectie van tumor-specifieke mutaties in plasma

D. LINDERS, C.M. KORSE, D. van den BROEK

Algemeen Klinisch Laboratorium, Antoni van Leeuwenhoek, Amsterdam

Inleiding: Specifieke mutaties zijn essentieel voor de ontwikkeling en groei van een tumor. De identificatie van deze mutaties vormt de basis voor een gerichte behandeling. In bloed bevinden zich DNA-fragmenten afkomstig van de tumor. Deze fragmenten kunnen mogelijk als een "vloeibaar biot" worden gebruikt. Droplet digital PCR kwantificeert op basis van maximaal 20.000 PCR reacties aanwezige DNA fragmenten met een mutatie, in een achtergrond van wildtype DNA. Wij presenteren hier pre-analytische karakteristieken van circulerend tumor DNA (ctDNA) en onze eerste resultaten van seriële metingen van ctDNA in 4 patiënten.

Methode: Plasma en volbloed waren afkomstig uit K2-EDTA buizen. Stabiliteit van totaal ctDNA is geëvalueerd bij KT en 4 °C ($t=0, 1, 3, 6, 24u$). Isolatie is uitgevoerd met Roche MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit, MN NucleoSpin Plasma XS, Qiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit en Invitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit. 22 plasma-

monsters afkomstig van restmateriaal van 4 patiënten met niet-kleincellig longcarcinoom zijn onderzocht op een EGFR (E746_A750del)-mutatie met behulp van de QX200 Droplet Digital PCR en QuantaSoft software van Bio-Rad Laboratoria. Resultaten zijn vergeleken met tumormarkers en klinische gegevens.

Resultaat: Totaal ctDNA was stabiel in volbloed bij KT en 4 °C tot 6 uur na afname. Plasmasamples waren minimaal stabiel tot 24u (KT en 4 °C). De Roche Magnapure en de Qiagen isolatiekits lieten de beste resultaten zien. De kwantitatieve resultaten voor de EGFR_E746_A750del correleerden goed met tumormarkers en kliniek.

Conclusie: Met Digital PCR is het mogelijk om tumor-specifieke DNA mutaties in plasma aan te tonen die correleren met kliniek en tumormarkers. Verdere validatie van ctDNA als vloeibaar biot voor klinische toepassing is nodig.

Categorie 3 Klinisch

Overigen

81. Toepassing van methylmalonzuur in de vitamine B12 diagnostiek beïnvloedt in beperkte mate het vitamine B12 voorschrijfgedrag bij huisartsen

P. FRANKEN¹, P.J. GEUTJES³, J.M.W. van den OUWELAND³, M. ZEEMAN¹, J. de KOK²

Afdeling Geriatrie¹ en Klinisch Chemisch Laboratorium², Deventer Ziekenhuis, Deventer; Klinisch Chemisch Laboratorium, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis³, Nijmegen

Inleiding: De diagnostische specificiteit van een serum vitamine B12 (B12) uitslag is laag. Een aanvullend methylmalonzuur (MMA) kan uitsluitsel geven of er daadwerkelijk B12-deficiëntie is op weefselniveau. De vraagstelling van dit onderzoek is in hoeverre een aanvullende MMA uitslag de suppletie van B12 door huisartsen beïnvloedt.

Methode: Het suppletiegedrag van 9 huisartsenpraktijken, 4 in regio Nijmegen en 5 in regio Deventer, werd onderling vergeleken. De huisartsen in Nijmegen kregen bij B12 uitslagen tussen 100 en 200 pmol/l tevens een MMA uitslag ($n=118$). De huisartsen in Deventer hadden geen beschikking over een MMA uitslag ($n=135$).

Resultaat: Bij patiënten met een B12 uitslag tussen 100-150 pmol/l (Nijmegen) heeft 35% een verhoogd MMA. Hiervan kreeg 68% suppletie, gelijk aan de B12-suppletie in Deventer (70%). Indien MMA uitslag zou worden gehanteerd als

standaard om te suppleren is in Nijmegen 38% onterecht gesuppleerd (normale MMA). Het verschil met Deventer, 46% onterechte suppletie (na extrapolatie MMA uitslagen), is klein. Bij patiënten met B12 uitslag tussen 150-200 pmol/l heeft 30% een verhoogd MMA (Nijmegen). Hiervan kreeg 26% suppletie, versus 2% in Deventer. De beschikbaarheid van MMA geeft bij een B12 uitslag tussen 150-200 pmol/l in Nijmegen een duidelijke verbetering van het voorschrijfgedrag ten opzichte van Deventer (14% versus 29% onterecht geen suppletie). In de B12-groep < 100 pmol/l krijgen patiënten in de regio's Nijmegen (86%) en Deventer (89%) in gelijke mate B12-suppletie.

Conclusie: Uit dit onderzoek blijkt dat invloed van de MMA uitslag op de beslissing wel of niet B12 te suppleren afhangt van de hoogte van de B12 uitslag.

82. Prevalence of vitamin C deficiency in surgical patients and its implications for wound healing

A. BIKKER^{1,3}, M. LOUBERT², R. van LOO¹, J. WIELDERS¹

Dept. of Clinical Chemistry, Meander Medical Centre¹, Amersfoort Dept. of Surgery, Meander Medical Centre², Amersfoort Dept. of Clinical Chemistry and Haematology³, UMCU, Utrecht

Introduction: Vitamin C or ascorbate is the antiscorbutic factor in citrus fruits and some other produce preventing scurvy. It is essential for collagen synthesis, in the conversion of procollagen into collagen. As a reductor it also serves as a cofactor in other hydroxylation reactions, as enzyme complement, co-substrate and anti-oxidant. Scurvy is regarded as something from the past, however patients with low or subclinical levels of ascorbate are frequently seen in our hospital. Subclinical deficiency will not display the hallmark symptoms of scurvy, but an altered collagen synthesis may be the result and have major implications for adequate wound healing, such as in the surgical field.

Methods: Ascorbate was measured by HPLC using UV detection (Recipe) in a teaching hospital surgical patient group (n=180) within a week pre- or post-surgery. In detail, we describe three cases showing poor wound healing, despite regular wound dressing.

Results: Over a period of 21 months we found ascorbate levels below the reference limit (25 umol/L) in 65 out of 180 patients (36%). Three patients described in detail initially showed poor wound healing. Their ascorbate levels were 8, 4, and 19 umol/L respectively. After starting supplementation (1000 mg/day) a dramatic and fast recovery of extensive and complicated wounds was observed by the patients and clinician. Supplementation was ceased after the wounds were completely healed.

Conclusion: Ascorbate deficiency is not uncommon in the hospital population, especially in those at risk (elderly, individuals suffering from vascular disease, pregnant women, smokers and substance abusers). Treating deficient patients with ascorbate leads to swift improvement of the wound healing process post-surgery, thereby reducing the costs of extensive wound treatment and an extended stay in hospital.

83. Labtracker: a smartphone app for the interpretation of serial laboratory results

J.M. HILDERINK¹, R.P. KOOPMANS², R.J.M.W. RENNENBERG², O. BEKERS¹, M.P. van DIEIJEN-VISSER¹, S.J.R. MEEUX¹

Central Diagnostic Laboratory, Maastricht University Medical Centre¹, Maastricht, Department of Internal Medicine, Maastricht University Medical Centre², Maastricht, the Netherlands

Introduction: Medical doctors rely on their intuition to interpret changes in serial laboratory results, guided by clinical experience. For less experienced medical students and residents, the lack of an easy reference for the interpretation of serial laboratory results can be challenging. Hence, random fluctuations may be interpreted as true changes, or vice versa. We developed Labtracker, a smartphone-app that calculates the probability of a true change between two serial laboratory results.

Methods: For a change between serial measurements to become significant, the difference between the two measurements must exceed the total inherent variation. This is termed the "reference change value" (RCV), and calculated as follows: $RCV = 2^{1/2} \cdot Z\text{-score} \cdot (CV^2_{\text{analytical}} + CV^2_{\text{biological}})^{1/2}$. In clinical practice, the classical RCV-formula is less convenient since not all decisions are taken at fixed probability levels (e.g. $p < 0.05$ or $p < 0.01$). A more informative result can be obtained when the probability of change between two serial

measurements is calculated. This can be achieved by a simple rearrangement of the RCV formula which makes the Z-score (and hence the probability) the unknown: $Z = \text{percentage change} / [2^{1/2} \cdot (CV^2_{\text{analytical}} + CV^2_{\text{biological}})^{1/2}]$. Labtracker calculates the probability of a change based on this rearranged formula.

Results: We systematically reviewed published biological variation studies of 86 laboratory tests and demonstrate a time-dependent increase of the biological variation for 21 parameters. The associations between biological variation data and the time-window to which they apply, was modeled statistically and integrated in labtracker. This enabled the calculation of "probabilities of a change" between serial measurements for 86 parameters, while accounting for the time-span between serial measurements.

Conclusion: We expect Labtracker to support clinical intuition in the interpretation of serial laboratory results.