

Ingezonden

Samenvattingen van de posterpresentaties tijdens het 59e Congres van de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde op 12 en 13 april 2006 te Lunteren

Categorie 1: Analytisch

Fotometrie, elektrochemie, sensortechnologie

1. An improved laboratory protocol to assess subarachnoid hemorrhage (SAH)

J.J. APPERLOO¹, F. van der GRAAF¹, P.L.I. DELLEMIJN², H.L. VADER¹

Laboratory of Clinical Chemistry¹, Department of Neurology², Maxima Medical Centre, Veldhoven, The Netherlands

Introduction: The laboratory analysis of CSF plays a key role in considering SAH in patients with clinical suspicion, but negative CT-scan. Although the determination of the CSF bilirubin concentration generally provides high sensitivity, it was recently shown that specificity and positive predictive value are unacceptably low, limiting its use as diagnostic tool.

Methods: We present a procedure in which a 'bili-excess' concentration is determined, being the surplus of measured CSF bilirubin after subtraction of an estimated upper limit for the individual patient. The latter is calculated from serum-bilirubin, serum-albumin and CSF-albumin, taking into account the propagation of analytical errors in the individual analyses. We investigated the applicability of direct absorption versus derivative spectroscopy, thereby addressing the influence of various calibration methods. We evaluated our procedure in 93 CSF-samples drawn from patients with (n=33) and without (n=60) suspicion of SAH.

Results: In our study-population (n = 93), we show that specificity increases from 0.83 (95% CI 0.74-0.91) to 1.00 (95% CI 0.96-1.00), using the bili-excess concept with an upper limit for bili-excess of 0.11 umol/l instead of using an 'uncorrected' CSF bilirubin concentration upper limit of 0.20 umol/l. Sensitivity in both cases is 1,00 (95% CI 0.66-1.00). We demonstrate the merit of allowing for analytical imprecisions in the bili-excess concept.

Conclusion: We provide a quantitative procedure to explore the likelihood of SAH independent of the absolute CSF bilirubin concentration by considering the 'bili-excess' concentration per individual, using derivative spectroscopy to determine CSF-bilirubin. In a reference population, the bili-excess 99th percentile value was assessed at 0.11 umol/l. This procedure accounts for an increase in specificity to 1,00 (95% CI 0.96-1.00) in our study population.

2. Point-of-Care(POC)-glucosemeting bij hyperglykemie

J.W. SMIT, A.F. KLEINHERENBRINK, G. SCHMAAL, R.F.M. OUDE ELFERINK

LabNoord, Martini Ziekenhuis, Groningen

Inleiding: POC-testen betreffen vooral bepalingen van bloedgassen, glucose en stollingsparameters. POC-glucosebepalingen worden het meest uitgevoerd. Echter de POC-bloedglucosemeters hebben ook hun tekortkomingen: er is een limiet in de bepalingenrange. In deze presentatie wordt aangeven dat bij patiënten met een hyperglykemie, acidose, en daarbij kans op een hyperosmolariteit, POCT-glucosemetingen aanzienlijk lager kunnen uitvallen dan de hemolysaatglucosemetingen.

Methode: Bij patiënten met een sterke acidose werden glucosemetingen met zowel een POC-apparaatje (PCX, Abbott) als een hemolysaatmethode gemeten. Bij enkele patiënten werden serieel en op hetzelfde tijdstip glucosemetingen verricht met de hemolysaat- en de POC- methode, alsmede met een bloedgasmeter.

Resultaat: Bij de patiënten waren er grote discrepanties op de tijdstippen met een zeer hoge glucosewaarde. Hierbij werd tevens een zeer lage pH-waarde in het bloed werd gemeten:

$\leq 7,0$. De seriële metingen geven aan dat deze discrepanties optreden bij glucosewaarden > 20 mmol/l. Metingen met de bloedgasapparatuur laten zien dat boven 20-30 mmol/l verschillen kunnen optreden met de hemolysaatmethode. Onder deze condities blijkt de osmolariteit verhoogd te zijn. Ook door anderen zijn deze discrepanties aangetoond, waarbij als verklaring voor de lage gemeten glucoses in de POC-apparaatjes de verhoogde viscositeit van de bloedmonsters wordt aangeduid, waardoor onvoldoende bloed in de capillairen in het apparaatje binnenkomt.

Conclusie: Bij patiënten met een sterke acidose, verhoogde bloedglucosespiegels en daarmee gepaard gaande hoge osmolariteiten dient de glucose niet met een POC-methode te worden bepaald. Hoewel in deze acute situaties een snelle meting met een bloedgasapparaat als alternatieve methode voor de hand ligt, laten onze meetresultaten zien dat ook hierbij lagere waarden worden gevonden dan bij de hemolysaatmethode. Deze laatste methode dient daarom te worden gebruikt.

3. Analytical performance of a spectrophotometric method for the measurement of pyruvate concentration in cerebrospinal fluid

E.C. LASES^{1,2}, D. van LOON¹, M. de BIE¹, M.M. VERBEEK³, J.H.H. THIJSEN², F.J.L.M. HAAS¹
Department of Clinical Chemistry¹, St. Antonius Hospital, Nieuwegein, Department of Biomedical Analysis², Utrecht University, Department of Neurology³, University Medical Centre Nijmegen, The Netherlands

Introduction: Rapid, precise routine measurement of pyruvate concentrations in cerebrospinal fluid is particularly important in the diagnosis and follow-up of mitochondrial encephalomyopathies. The aim of our study was to develop and validate an automated spectrophotometric method for the measurement of pyruvate concentrations in cerebrospinal fluid.

Methods: The spectrophotometric method was developed according to the optimized standard method performed by the reference laboratory and validated according to the NCCLS EP5-A and EP9-A guidelines.

Results: The within-run reproducibility was 3.7-7.2% and total reproducibility ranged from 3.8 to 6.5%. Furthermore, our results (mean = 124 µM) and the results obtained by the reference laboratory (mean = 116 µM) were highly correlated ($y = 0.84 (\pm 0.02) x + 26 (\pm 3)$, $s_{yx} = 7 \mu\text{M}$, $r = 0.99$).

Conclusion: Our results show that the developed method is precise and correlates well with the method performed by the reference laboratory. Our method can thus be applied for routine diagnostic procedures and (patho)physiological research.

Hemocytometrie, flowcytometrie, hemostase

4. Clinical evaluation of the Abbott Cell Dyn Sapphire hematology analyser

A. HUISMAN, R. STOKWIELDER, J. HEUNKS, W.W. van SOLINGE
Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medical Centre Utrecht, The Netherlands

Introduction: The Cell Dyn Sapphire is a new advanced hematology analyser made by Abbott Diagnostics. We performed a clinical evaluation of the analyzer for the Federal Drug Administration in the USA. The objective of this study was to validate operational performance characteristics in a typical end-user setting and to generate data to demonstrate safety and clinical efficacy from a medical perspective.

Methods: The analytical evaluation was carried out by our laboratory using residual fresh (<8 hours) EDTA anticoagulated samples that had been submitted for routine full blood counts. Inter instrument agreement (comparability) was determined versus the Abbott Cell Dyn 4000 for the absolute WBC count and differential, routine red cell and reticulocyte parameters, platelet measurements, immunological platelet count (CD61) and immunological lymphocyte differential (CD3/4/8). More-

over, data concerning background, carryover, analytical measurement range and imprecision were obtained.

Results: During 1 month 980 samples were processed. The comparability between the Cell Dyn Sapphire and the reference instrument, the Cell Dyn 4000 was excellent. For all parameters involved the agreement between both instruments (using Passing - Bablock regression) reached 1.0. Background was negligible, and carryover was at maximum 0.63% for hemoglobin measured in the closed mode. The maximum inter assay (day-tot day) %CV using standard control material was 2.29% for the optical platelet count.

Conclusion: The Cell Dyn Sapphire has an excellent correlation with the reference instrument, the Cell Dyn 4000. Moreover the instrument has good operational and performance characteristics and reliability.

5. Reliability study of the Abbott Cell Dyn Sapphire hematology analyser

A. HUISMAN, R. STOKWIELDER, J. HEUNKS, W.W. van SOLINGE
Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medical Centre Utrecht, The Netherlands

Introduction: The Abbott Cell Dyn Sapphire is a new multi parameter, automated hematology analyser designed for in vitro diagnostic use in clinical laboratories. The objective of this study was to stress test the Cell Dyn Sapphire, to determine operational reliability over a six-week period and to determine the inter- and intra-mode reproducibility.

Methods: The analytical evaluation was carried out by our laboratory using residual fresh (<8 hours) EDTA anticoagulated samples that had been submitted for routine full blood counts. During a period of six weeks, each working day a minimum of 400 samples were processed in automated sampler mode with the Cell Dyn Sapphire. Of these samples 10% were run in duplicate for paired difference analysis. Moreover several brands of tubes and micro-containers and different barcode formats were processed by the analyser in order to test tube

and barcode specifications. Also different test selections and processing modes were evaluated.

Results: During six weeks we performed 13747 CBC cycles on the Cell Dyn Sapphire. During this period there were no mechanical or software malfunctions, we have observed 42 (0.31%) hardware related failures that required a second analysis of the sample involved. There were no differences observed between different processing modes or test selections. The paired difference analysis show excellent correlation for all parameters involved. All tube types and barcode formats were processed without any problem.

Conclusion: During this study the Cell Dyn Sapphire has proven to be a reliable instrument with good operational performance and reliability characteristics.

6. Diagnostic use of dual parameter carbonic anhydrase/HbF- flow cytometry in distinguishing adult HbF-containing cells and fetal erythrocytes

M.P.G. LEERS¹, H.M.P. PELIKAN², H.A. KLEINVELD¹, T.H.B. SALEMANS², V. SCHARNHORST¹
Dept. of Clinical Chemistry & Hematology¹, Dept. of Obstetrics and Gynaecology², Atrium Medical Centre Heerlen, The Netherlands

Introduction: Detection and quantification of fetal erythrocytes in maternal blood is important in obstetric practice and has important treatment implications. The manual Kleihauer-Betke test, which is rather imprecise and subjective, is widely used for this purpose.

Methods: Fetal erythrocytes were determined using a dual-parameter carbonic anhydrase/HbF- flow cytometric assay. This assay was compared with routine Kleihauer-Betke test and with Hb-electrophoresis.

Results: This report describes a case of a false-positive Klei-

hauer-Betke test in a pregnant women with a blunt abdominal trauma. The false-positive Kleihauer-Betke test was caused by maternal erythrocytes containing fetal haemoglobin. Maternal origin was proven by a dual parameter (carbonic anhydrase/HbF-) flow cytometric assay that distinguishes adult carbonic anhydrase-containing erythrocytes from fetal red blood cells.

Conclusion: This case report shows a flow cytometric assay that specifically detects fetal erythrocytes and should be integrated in the diagnostic work-up of a patient with suspected fetomaternal hemorrhage and a positive Kleihauer-Betke test.

7. Preanalytical variables and off-site blood collection: Influences on the results of the prothrombin time/International Normalized Ratio test and implications for monitoring of oral anticoagulant therapy

J.H.H. van GEEST-DAALDEROP¹, A.B. MULDER¹, L.J.M. BOONMAN-de WINTER², M.M.C.L. HOEKSTRA³, A.M.H.P. van den BESSELAAR³
Thrombosis Service¹, Department of Laboratory of Clinical Chemistry and Haematology, Jeroen Bosch Hospital, 's Hertogenbosch, Thrombosis Service and Contract Research of Stichting Huisartsen Laboratorium², Etten-Leur, Haemostasis and Thrombosis Research Centre³, Department of Haematology, Leiden University Medical Centre, The Netherlands

Introduction: The quality of oral anticoagulant therapy management with coumarin derivatives requires reliable results for the prothrombin time/International Normalized Ratio (PT/INR). We assessed the effect on PT/INR of preanalytical variables, including ones related to off-site blood collection and transportation to a laboratory.

Methods: Four laboratories with different combinations of blood collection systems, thromboplastin reagents and coagulation meters simulated preanalytical variables: mechanical agitation and time between blood collection and PT/INR determinations, both at room temperature, 4-6°C, and at 37°C; mechanical agitation at room temperature, at 4-6°C, and at 37°C; time between centrifugation and PT/INR determination; times and temperatures of centrifugation. Besides the statistically significant changes, we considered the clinical relevance of the results. For variables that affected results, the effect was classified as moderate when <25% of samples showed a

change of 10% or more, and as large if >25% of samples showed such a change.

Results: During the first 6 h after blood collection, INR changed by 10% or more in <25% of samples (moderate effect) when blood samples were stored at room temperature, 4-6°C, or 37°C, with or without mechanical agitation and independent of the time of centrifugation. With one combination of materials and preanalytical conditions, a 24-h delay at room temperature or 4-6°C had a large effect. In all laboratories, a 24-delay at 37°C or with mechanical agitation had a large effect. We observed no clinically or statistically relevant INR differences among studied centrifugation conditions.

Conclusion: We recommend a maximum of 6 h between blood collection and PT/INR determination. The impact of a 24-h delay should be investigated for each combination of materials and conditions. This recommendation does not agree with the NCCLS guideline.

8. Evaluation of the Sysmex XE-2100 immature granulocytes Q-flag and percentage as screening parameters for the presence of immature granulocytes

K.M.T. de BRUYN, H.A. HULS, M.P.C. JACOBS, F.L.A. WILLEKENS
Department of Clinical Chemistry, Rijnstate Hospital, Arnhem, The Netherlands

Introduction: The Sysmex XE-2100 haematology analyser judges a sample 'positive' in case quantitative and/or qualitative abnormalities are found present according to preset criteria. For instance, data retrieved from the immature granulocytes (IG) cluster in the IMMature Information and DIFFerentiation channels, are translated into both an IG percentage and arbitrary Q-flag number on scale 0-300, expressing increasing suspect for the presence of IG. Positive IG Q-flag values 100 and higher trigger microscopic analysis of leukocytes. We investigated whether the IG flagging principle is an effective screening parameter in the selection of samples containing an increased IG fraction.

Methods: Retrospectively, 477 positive samples that in addition passed microscopic research were selected. True positive IG Q-flagging was defined as the presence of 2% IG (promyelocytes, myelocytes and metamyelocytes) or more in a 100-cell microscopic differentiation. Next, also the XE-2100 IG percentage was included in the analysis.

Results: With 197 positive IG Q-flags, this screening parameter yielded 95% sensitivity, 67% specificity, 136 false positives and 1 false negative. In search for improvement of the IG screening characteristics, contribution of the IG% measured by the XE-2100 was explored. The combination positive IG Q-flag and measured IG%>1 as more stringent condition for positive IG screening, would reduce positive samples to 91 while generating only 3 false negatives. Screening characteristics would achieve 87% sensitivity, 88% specificity, and only 39 false positives.

Conclusion: Although in this study IG Q-flag screening reaches high sensitivity, 69% false positives are generated. Defining a positive screening as concomitant positive IG Q-flag and measured IG%>1 would strongly reduce the amount of false positive samples and unnecessary microscopic differentiations, while sufficient sensitivity is retained.

9. Comparison and flagging performance of the Abbott Cell Dyn 4000 and the Sysmex XE-2100, Automated Hematology Analyzer

Y.C.M. de HINGH, M.P.B. van GERVEN, M. van ZOELLEN, I.B.B. WALSH, R.M. HOEDEMAKERS
Dept. of Clinical Chemistry and Haematology, Jeroen Bosch Hospital, 's-Hertogenbosch, The Netherlands

Introduction: During a one-month period, we evaluated and compared the analytical and flagging performance of the Abbott Cell Dyn 4000 and the Sysmex XE-2100.

Methods: The CBC, the WBC differential count, NRBC, immature granulocytes, and platelets were determined in 290 samples with the Abbott Cell Dyn 4000 and the Sysmex XE-2100 analyser. Samples with recorded morphological abnormal differentials were statistically processed to determine flag sensitivity, specificity, efficiency, positive predictive PPV, and negative predictive value in which the microscopic evaluation was considered to be the golden standard.

Results: The overall correlation between the Abbott Cell Dyn 4000 and the Sysmex XE-2100 analysers is excellent and both analysers report reliable automated WBC differentials compared to microscopic evaluation. In general, the performance of the flaggings (manufactures settings) for both analysers is comparable but moderate; most morphology flags have PPV

below 50%. The XE-2100 flag 'PLTclumps?' creates many false positives resulting in a low specificity and PPV, whereas the IG-flag of the Cell Dyn 4000 has many false negatives. Both the Cell Dyn 4000 and the XE-2100 are poor in flagging for presence of blast cells (PPV of 44% and 23%). Fine-tuning of the flags is possible and will increase the PPV. In the samples with pathological leukocyte morphology based on microscopic evaluation, the flagging rate of both analysers is about 70%. Another 13% of these samples were identified by numerical criteria and 17% was missed but only contained atypical lymphocytes.

Conclusion: Flaggings can be useful but have to be used in combination with numerical criteria. This was already demonstrated for the blast flag of the Cell Dyn 4000 (1) and confirmed in our study.

Literature: Hoedemakers et al. Clin Lab Haematol 1999; 21: 347.

10. De toepasbaarheid van de 'Protein C Pathway' screeningstest op de ACL-9000 en de KC-4

R.W.L.M. NIESSEN, I. BRASPENNING, C. CLEMENT
Klinisch Chemisch Laboratorium, Rijnland Ziekenhuis, Leiderdorp

Inleiding: Bij een aanvraag voor trombofilieonderzoek wordt er in het Rijnland Ziekenhuis onderzoek verstuurd voor een proteïne C (act), proteïne S (ag), antitrombine (act), FII-mutatie (G20210A), APC-resistentie / FV-Leiden. Daar slechts een klein gedeelte van deze onderzoeken een afwijkend resultaat oplevert is onderzocht of het zelf uitvoeren van de 'Protein C Pathway' (PCP)-screeningstest (Gradithrom, Kordia) afwijkingen in het PC/PS-systeem of een APC-resistentie goed kan opsporen.

Methode: Onderzocht zijn in totaal 31 patiëntenmonsters met een bewezen FV-Leidenmutatie (28 heterozygoot en 3 homozygoot), 22 patiëntenmonsters met een verlaagd proteïne C/S (2 prot. C-def. 1 verdenking PS-def. en 19 onder OAC) en 43 patiëntenmonsters waarbij trombofilie screening is aangevraagd en geen afwijkingen gevonden zijn. De PCP-screeningstest wordt uitgevoerd als een gemodificeerde APTT, waarbij het Russell Viper Venom direct factor X activeert, en er met en

zonder toevoeging van Protac (proteïne-C-activator) een stoltijd gemeten wordt. De PCP-screeningstest wordt uitgedrukt als een ratio en is zowel uitgevoerd op de ACL-9000 (Instrumentation Laboratory) als de KC-4 delta (Kordia life sciences).

Resultaat: Bij een cut-off-ratio van 2,2 worden zowel op de ACL-9000 als op de KC-4 alle afwijkende patiëntenmonsters (FV-Leiden en verlaagde proteïne C/S) geïdentificeerd, uitgezonderd één patiëntenmonster met een proteïne S van 61% (ref. > 67%). Op de ACL-9000 worden geen patiëntenmonsters zonder afwijkingen als afwijkend geduid met de PCP-screeningstest, i.t.t. de KC-4 waar 4 van deze monsters als afwijkend geduid worden met de PCP-screeningstest.

Conclusie: De hier beschreven PCP-screeningstest leent zich goed als screenende test in het trombofilieonderzoek voor het uitsluiten van afwijkingen in het PC/PS-systeem of een APC-resistentie.

Immunoassay, (bloedgroepen-)serologie

11. Troponin I on the Immulite 2500

R.W. WULKAN¹, M.A. NIEUWENHUIZEN¹, J. TAK²
Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Medisch Centrum Rijnmond-Zuid, Rotterdam, Klinisch Chemisch Laboratorium², Ikazia Ziekenhuis, Rotterdam

Introduction: The Troponin I assay using an Immulite 2500 instrument (DPC) was the subject of a limited evaluation.

Methods: Two plasma pools were created from lithium heparin patient samples. These were aliquotted and kept frozen at -20 °C until analysis. TnI was measured on 9 consecutive days and the between-day CVs were calculated. TnI was measured in 100 consecutive samples from outpatients attending non-cardiac clinics. The 99th percentile was calculated from these data. Furthermore, TnI was measured in patient samples with a Dimension RxL Max (Dade Behring) and with an Immulite 2500 (DPC). Troponin T measurements were made with a Cardiac Reader (Roche). Samples with TnT in the range 0.05-0.1 µg/L were used to measure TnI and clinical information was retrieved.

Results: Between-day CVs were 4.3% and 8.3% at 0.23 µg/L

and 0.38 µg/L, respectively. The 99th percentile found in outpatients attending non-cardiac clinics was 0.24 µg/L. Bablok and Passing regression resulted in the line: Immulite = 1.83 x Dimension - 0.11.

Conclusion: The between-day coefficient of variation is below 10% at the 99th percentile cutoff level. The cutoff value we found (0.24 µg/L) is slightly higher than the 0.20 µg/L recommended by DPC. Comparison of TnI between DPC and Dade Behring revealed that external standardization is necessary. Thirteen out of seventeen samples with TnT in the indeterminate range had increased TnI values. Of the four patients with normal TnI values, three had non-cardiac syndromes, whereas one had atrial fibrillation with spontaneous conversion. This patient was discharged.

12. Praktisch bruikbare FT4-uitslagen snel beschikbaar bij neonaten?

J.W. JANSSEN¹, J.A. BAKKER¹, Y.B. de RIJKE², J. van OORD¹

Afdeling Klinische Chemie¹, St Franciscus Gasthuis, Rotterdam, Diagnostisch Laboratorium Endocrinologie², Erasmus MC, Rotterdam

Inleiding: De referentiemethode voor FT4 is de evenwichts-dialyse. Deze methode is bewerkelijk en kan moeilijk routinematig uitgevoerd worden. Routinebepalingen uitgevoerd met immunoanalyzers kunnen echter voor neonaten afwijkende uitslagen geven. De Immulite 2000 (DPC) levert de resultaten snel, maar hiermee worden t.o.v. de referentiemethode lagere FT4-waarden gevonden. In deze pilotstudie is onderzocht of er in de dagelijkse praktijk met de Immulite 2000 gebruik gemaakt kan worden van een omrekeningsfactor voor FT4 voor neonaten.

Methode: Evenwichtsdialysemethode FT4, Erasmus MC. Immulite 2000 FT4, competitieve chemoluminescentie immuno-

assay. Sera van neonaten (n=26) en sera van volwassenen (n= 24). Methodenvergelijking m.b.v. de orthogonale regressie-analyse.

Resultaat: De berekende regressielijnen tussen de evenwichts-dialyse (Y) en de Immulite 2000 (X) zijn, voor volwassenen: $Y = 1,43 (0,11) X - 6,5 (2,7)$; voor neonaten: $Y = 2,00 (0,24) X - 4,5 (4,2)$

Conclusie: Sera van volwassenen en sera van neonaten leveren een (significant) verschillende omrekeningsfactor op bij de benadering van de juiste FT4-waarden. Voor het gebruik in de praktijk zal een groter aantal sera van neonaten geïnccludeerd worden.

13. Evaluatie van de 'LABScreen Mixed'-assay m.b.v. de Luminex 100

M.A. FOURAUX¹, D.P.D. BESTERS², P.T.C.W. van TOREN², G. de BRUIJN², K. SINTNICOLAAS²

GKCL¹, Albert Schweitzer Ziekenhuis en RIVAS Zorggroep, Dordrecht, Laboratorium voor Histocompatibiliteit en Immunogenetica², Sanquin Bloedbank Regio Zuidwest, Rotterdam

Inleiding: Het Laboratorium voor Histocompatibiliteit en Immunogenetica (LHI) screent patiëntensera op de aanwezigheid van HLA-antistoffen. Hiervoor wordt een flowcytometrische methode, de FlowPRA, gebruikt. Hierbij is het mogelijk om HLA-antistoffen tegen klasse-I- en -II-antigenen te detecteren. Deze test is bewerkelijk en duur, zodat alternatieven voor deze test gezocht worden. De 'LABScreen Mixed'-assay maakt gebruik van gezuiverde humane HLA-antigenen gecoat op micropartikels om HLA-antilichamen gericht tegen klasse-I- en -II-antigenen te detecteren. Met patiëntensera en kwaliteitscontrolemonsters is de sensitiviteit en specificiteit van de LABScreen Mixed assay geëvalueerd.

Methode: De LABScreen Mixed-assay bepaalt aan de hand van een positieve cut-offwaarde de aan- of afwezigheid van HLA-antilichamen tegen klasse-I- en -II-antigenen. Met negatieve sera afkomstig van mannen (nooit getransfundeerd, nooit geopereerd, nooit bloedtransfusie gehad) is deze cut-offwaarde bepaald. Vervolgens zijn 75 monsters afkomstig uit zowel de

dagelijkse routinescreening en kwaliteitscontrole rondzendingen gebruikt om de LABScreen Mixed-assay met de FlowPRA-assay te vergelijken.

Resultaat: Aan de hand van de negatieve sera is een positieve cut-offwaarde van 2,6 bepaald. Dit is hoger dan de door de firma standaard ingestelde waarde van 1,5. Wanneer de waarde van 1,5 wordt gebruikt om de 75 sera te testen op aanwezigheid van HLA-antistoffen wordt een sensitiviteit van 98% en een specificiteit van 76% gevonden ten opzichte van de FlowPRA-assay. Met een positieve cut-offwaarde van 2,6 blijft de sensitiviteit 98%, maar neemt de specificiteit toe tot 98%.

Conclusie: De LABScreen Mixed-assay is ten opzichte van de FlowPRA-assay makkelijker in gebruik, goedkoper en de interpretatie van de resultaten is gestandaardiseerd. Daarbij is de sensitiviteit en specificiteit van beide assay's vergelijkbaar. Concluderend kan de LABScreen Mixed-assay de FlowPRA-assay vervangen.

14. Enhanced performance of an ELISA for GAD autoantibodies compared to existing radioimmunoassays

B.E.P.B. BALLIEUX¹, Z. MENGI¹, M. BATSTRA², B. ROEP³

Dept. Clinical Chemistry¹, Dept. Immunohaematology², Leiden University Medical Centre, Diagnostic Centre³, SSDZ, Delft, The Netherlands

Introduction: Diabetes Mellitus type 1 (DM1)-associated autoantibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD) are highly specific for the diagnosis DM1 and the antibodies to the tyrosine fosfatase IA2 are highly predictive for development of DM1 in 1st degree relatives of patients with DM1. Recently new non-radioactive solid phase immunoassays for GAD- and IA2-antibodies were developed. We compared the performance with conventional RadioImmunoprecipitation Assays (RIA).

Methods: 55 patients within five days of diagnosis of DM1 and 55 healthy siblings, (not developing DM1 within at least 5 years after inclusion), were included in the study. Both GAD-antibodies and IA2-antibodies were assayed using the new ELISA's of Medipan, Dahlewitz/Berlin, Germany. The reagents for these ELISA's are manufactured by RSR Limited, Cardiff, UK. RIA's were performed using in-house assays at SSDZ. ROC curves were constructed for the ELISA's and the RIA's

for determination of cut-off values and clinical performance.

Results: The clinical performance of the ELISA for GAD-antibodies was superior compared to the RIA (sens 93% vs. 77%, spec. 95% vs. 92%, AUC 0,94 vs. 0,87). The cut-off value for the ELISA was 2,9 IU/ml. The ELISA for IA2-antibodies was comparable to the RIA (sens 70% vs. 70%, spec 90% vs. 86%, AUC 0,82 vs. 0,83) The cut-off value for the ELISA is 4 IU/ml.

Conclusion: The diagnostic performance of the ELISA for GAD-antibodies was superior to existing RIAs in this population of children, and improves risk profiling in 1st degree relatives of patients with DM1. If this ELISA performs equally well in adults (as can be expected), it is a usefull and reliable tool to distinguish early DM type 2 and Late-onset Auto-immune Diabetes in Adults (LADA) in recently diagnosed young adults.

15. Erythrocytenpanelvergelijking voor antistofidentificatie

H. MEIJERING-BAKKER, J.W. SMIT
LabNoord, Martini Ziekenhuis, Groningen

Inleiding: Bij zowel de screening van antistoffen tegen erythrocytenantigenen als de antistofidentificatie is in de meeste laboratoria een methodiekwijziging opgetreden: de buisjesmethode is vervangen door een kolomagglutinatie techniek. Recentelijk zijn commercieel verkrijgbare antistofidentificatiepanelen voor meerdere kolomagglutinatie technieken beschikbaar gekomen. In deze studie zijn verschillende panelen vergeleken.

Methode: 53 patiëntenplasma's met erythrocytenantistoffen werden onderzocht met: één 0,8% 11-celpanel ID-DiaPanel, één 0,8% 11 celpanel Ortho Resolve Panel B en één 11-celpanel uit het Sanquin Columnpanel 16. 5 cellen uit het Sanquin Columnpanel werden met een ID-DiaPanel Plus 6 vergeleken voor het uitsluiten van extra antistoffen. Parameters: reactiesterkte, uitsluiten van antistoffen per panel, antigenencombinaties, volume reagentia, houdbaarheid, presentatie en leesbaarheid van het antigram, kostprijs.

Resultaat: Voor antistoffen tegen D, C, Cw, E, K, F^a, M en P¹

werden geen duidelijke verschillen in reactiesterkte aangevoeld. Kleine verschillen waren er m.b.t. het aantal uit te sluiten antistoffen. De twee kleinere identificatiepanelen leveren een bijdrage bij het uitsluiten van extra antistoffen. Vergelijking van antigenen en antigenencombinaties: het Diamed 11-celpanel bevat zelden homozygoot Kell, altijd Cw, altijd Kpa, nooit een RZR1-cel, nooit een Wra, en frequent (storend) Bga. Het Ortho Resolvepanel B had altijd een keer KK, niet altijd Cw en Kpa, altijd een RZR1-cel, geen Wra, geen Bga. De 11 cellen uit het Sanquinpanel bevatten nooit KK, altijd Cw, een enkele keer Kpa, altijd een RZR1-cel, geen Wra, geen Bga.

Conclusie: Er werden geen verschillen gevonden voor reactiesterkten en het aantal keren dat antistoffen kunnen worden uitgesloten. Beide kleinere panelen leveren een bijdrage voor het uitsluiten van extra antistoffen. Bij de keuze van identificatiepanelen spelen de aanwezigheid van antigenen en combinaties hiervan, houdbaarheid, volume en kostprijs een rol.

16. Comparison of six automated assays for total and free prostate specific antigen (PSA) and their reactivity towards the WHO (96/760) reference preparation

S.A.R. KORT¹, F. MARTENS¹, H. VANPOUCKE², J.L.P. van DUIJNHOFEN³, M.A. BLANKENSTEIN¹
VU University Medical Center¹, Endocrine Laboratory Department of Clinical Chemistry, Amsterdam, The Netherlands, H. Hartziekenhuis², Laboratory of Clinical Chemistry, Roeselare-Menen vzw, Belgium, Elkerliek Hospital³, Dept. Clinical Chemistry, Helmond, The Netherlands

Introduction: To improve assay comparison an international reference preparation that approaches the molecular heterogeneity of PSA in the circulation (90% complexed to ACT and 10% free PSA) has been devised. Many manufacturers of automated PSA assays have referenced their assays to this WHO standard. The purpose of the present study was to assess the responsiveness of the WHO standard in various assays for free and total PSA and to compare their performance on clinical specimens with different PSA concentrations.

Methods: 70 serum samples and the WHO PSA 96/760 standard were measured. Total and free PSA were measured on the Access (Beckman), Architect and AxSym (Abbott), E170 (Roche) and Immulite (DPC). Total and complexed PSA was

measured on the Centaur (Bayer).

Results: All assays measured T-PSA and 3 out of 5 measured F-PSA close to the expected WHO standard value. Slope varied from 1.0 - 1.2 for T-PSA and 1.1 - 1.8 for F-PSA. Agreements of values from the tested assays for T-PSA and F-PSA in patient samples were excellent. Differences in slopes between all assays were less than 10% for T-PSA and less than 20% for F-PSA and r^2 varied from 0.94 to 0.99.

Conclusion: The tested assays correlated well with each other in patient aliquots and all measured total PSA reasonably close to the assigned WHO standard value. There were larger differences in free PSA values measured in the WHO standard.

17. Analytical evaluation of the evolving Beckman CKMB-mass assay versus OCD Vitros and Beckman CKMB-activity assays

J. van de VEN, F.P.W. TEGELAERS
Dept. Clinical Chemistry, Haematology and Immunology, Medical Centre Alkmaar, The Netherlands

Introduction: CKMB elevation is a marker for myocardial ischemic injury, and was traditionally measured as CKMB enzyme activity. Immunochemical CKMB-mass assays are available now, which theoretically should be more specific due to lack of interference of CKBB. In this study we compared analytical performance of two CKMB mass assays to two CKMB activity assays.

Methods: Two separate comparisons were made, both using patient material for which a cTnI test was ordered. cTnI was used as mock gold standard for myocardial damage by excluding patients with marginally elevated cTnI (0.05-0.45 µg/l). In 2002, 1700 samples were assayed for CKMB-activity (OCD Vitros), CKMB-mass and cTnI (both on Beckman Acces-2). In 2005, 150 samples were assayed for CKMB-

activity (Beckman LX20pro), CKMB-mass and cTnI (Both on Beckman LXi-725). Sensitivity and specificity was calculated and plotted in ROC-curves.

Results: In the 2002 comparison, CKMB-activity and CKMB-mass were found to have similar ROC-curves. In 2005, using new assays, CKMB-mass performed better compared to CKMB-activity in terms of both higher sensitivity en specificity. In addition, the new CKMB mass assay performed better than the earlier mass assay.

Conclusion: At the time, the 2002 results made us decide to continue the CKMB-activity assay, which had been our usual assay for CKMB. Based on the results from the 2005 re-evaluation with the new assays however, we now consider to introduce the CKMB-mass assay in our laboratory.

18. Evaluation of troponin I STAT on Immulite 2500

N.J. van TROOYEN-van VROUWERFF, T. BRON, R. SCHULTZ, F.A.L. van der HORST
Dept. of Clinical Chemistry, St. Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands

Introduction: Troponin I is shown to be of great value in the diagnosis Acute Coronary Syndrome. Recently guidelines have been developed for the analytical performance of Troponin assays (1). An important criterium is that the imprecision of the assay should be < 10% at the 99th percentile reference range. In this study we evaluated the performance of the Immulite 2500 Troponin I STAT assay that recently was released.

Methods: The Troponin I values were determined with the Immulite 2500 STAT Troponin I assay, in heparinized plasma of 581 (286 male and 295 female) apparently healthy subjects (symptomless and no cardiac history, based on questionnaire). This study was approved by the local ethics committee. The coefficient of variation (CV) of the assay at the 99th percentile (non-parametric) level of Troponin ins this population was

determined using EP-evaluator software (DPC, Breda). The imprecision of the assay at several low range TnI-values was determined using the EP5-A protocol in human pooled heparinized plasma.

Results: The 99th percentile of female was 0.27 µg/L (n=295) and of male 0.29 µg/L (n = 286). The 99th percentile at an age below 60 year (n=324) was 0.23 µg/L and 0.29 µg/L above the age (n=256). Both differences were not statistically significant. The 10 % imprecision level of the Immulite 2500 STAT Troponin I assay was at 0.30 µg/L.

Conclusion: This study demonstrates that the Immulite 2500 STAT Troponin I assay nearly meets the requirements of the IFCC.

Literature: Panteghini et al. Clin Chem 2004; 50: 327.

Chromatografie: HPLC, GC, CE

19. Detection of transferrin sialoforms in cerebrospinal fluid (CSF) by capillary electrophoresis (CE)

D.C.W. POLAND, N. MENGI, F.W.C. ROELANDSE, J. van PELT
Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden

Introduction: Asialotransferrin (0-Tf) is an accepted marker of CSF leakage from the subarachnoid space into the nasal or aural cavity as the result of a head trauma. Nowadays, the 0-Tf detection method of choice is isoelectric focusing on polyacrylamide gel with direct immunofixation of transferrin and silverstaining. A great disadvantage is the time-consuming technique (> 5 h.) while the clinician needs a quick result in order to treat the possibility of central nervous system infection. The aim of this study was to evaluate the use of CE in the detection of 0-Tf in CSF. CE has already been used for the detection of transferrin sialoforms in blood of patients suspected of chronic alcohol abuse. An increase in 0- and 2-sialotransferrin is suspicious for alcohol abuse. The concentration of

transferrin in blood varies from 2.0 – 4.0 g/L which is a 100-fold higher than the transferrin concentration in CSF.

Methods: To overcome the difference in concentration we applied a rapid (15-30 min) centrifugation concentration step that was followed by CE analysis (8 min) for the detection of transferrin sialoforms.

Results: Migration times of the different transferrin sialoforms of CSF were determined by CE analysis of transferrin after partial sialidase treatment and were comparable to those in serum.

Conclusion: With this method it is possible to detect the 0-Tf in excretions from the nose or the ear within 45 min.

20. Heading for standardisation of CDT analysis: experiences with six different CDT methods in Amersfoort

J.P.M. WIELDERS, R. te STROET
Department of Clinical Chemistry, Meander Medical Centre, Amersfoort, The Netherlands

Introduction: Carbohydrate deficient transferrin (CDT) is a useful marker for recent alcohol misuse. Several methods are available but both precision and accuracy data differ widely. Since the results of CDT analyses are used in court, there is an extra need for standardization.

Methods: Using a NCCLS EP9 protocol and 50 patient samples, we compared the AXIS turbidimetric method, two capillary electrophoresis methods, the DadeBehring N-Latex method and two HPLC methods. Correlation graphs are calculated using one of the HPLC methods as a reference.

Results: HPLC and CE methods, where %CDT results are

directly derived from peak ratios, are mutually closely related: slopes 1 ± 0.05 , intercepts are 0 ± 0.2 . On the other hand, methods using the ratio of immunochemical protein measurements (AXIS and DadeBehring) presented slopes close to 0.6 and intercepts > 1.5.

Conclusion: Methods belonging to the peak ratio group are clearly different from the immunochemical protein measurement group. We postulate that a difference in affinity or exposure of epitopes for the 'CDT' isoforms compared to the major transferrin isoforms in the immunochemical methods causes the different results between the two groups of methods.

21. Determination of thymidine phosphorylase activity by a non-radiochemical assay using reversed-phase high performance liquid chromatography

A.B.P. van KUILENBURG, L. ZOETEKOUW
Lab. Genetic Metabolic Disease, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) is an autosomal recessive disease which is caused by a thymidine phosphorylase (TP) deficiency. TP catalyses the first step in the degradation of the pyrimidine deoxynucleosides thymidine and deoxyuridine. In patients

with MNGIE, no or a severely reduced TP activity was detected in leukocytes. A serious drawback of the frequently used spectrophotometric assay is the fact that the non-specific absorbance of interfering substances of crude tissue extracts hampers the accurate determination of the TP activity.

Methods: The TP activity was determined by separation of thymidine from thymine with reversed-phase HPLC, followed by detection of thymine at 265 nm. (1)

Results: A non-radiochemical assay procedure for TP was developed in which thymine was detected at 265 nm after separation with reversed-phase HPLC. A complete separation of thymidine and thymine was achieved in 6 min and the minimum amount of thymine that could be detected was 0.8 pmol. The assay was linear with reaction times, up to at least 4 h, and protein concentrations up to at least 65 µg/ml. The

intra-assay CV and the inter-assay CV for the complete assay, HPLC detection and protein determination, were 5.1 % (n = 10) and 11 % (n = 10), respectively.

Conclusion: A highly sensitive non-radiochemical assay procedure for TP was developed in which thymine was detected at 265 nm after separation with reversed-phase HPLC. Population analysis showed no differences in TP activity between man and women or with increasing age.

Literature: Van Kuilenburg et al. J Chrom B 2005; 820: 271

Vlamfotometrie, AAS, massaspektrometrie

22. 'Back to basics' with the Energy Absorbing Matrix in SELDI-TOF-MS

D. de BOER, K.W.H. WODZIG, M.P. van DIEIJEN-VISSER

Department of Clinical Chemistry, University Hospital Maastricht, The Netherlands

Introduction: The optimism created by the first results of the search for biomarkers with Surface enhanced Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry (SELDI-TOF-MS) is tempered by its lack of reproducibility. Consequently, a 'back to basics' approach is required to understand the nature and causes of analytical discrepancies in SELDI-TOF-MS. This study describes the effect of the presence of alkali cations in sinapinic acid (SPA). SPA is used as the Energy Absorbing Matrix (EAM) in the majority of SELDI-TOF-MS studies.

Methods: SPA of Chiphergen (SPA-c) and Fluka (SPA-f) were compared by SELDI-TOF-MS (NP20 array, PBS IIc analyzer) using equine apomyoglobin and bovine serum albumin as model proteins. Of each protein the mass accuracy and signal-to-noise (S/N) ratio were determined (n=4). SPA-c was analyzed both in the presence and absence of NaCl and KCl combined or not with (NH₄)H₂PO₄. SPA-f was analyzed only

in presence and absence of (NH₄)H₂PO₄.

Results: The addition of NaCl and KCl to SPA-c significantly decreased the mass accuracy of the SELDI-TOF-MS analysis of both proteins, of which the decrease could be compensated by the co-addition of (NH₄)H₂PO₄ as an alkali cation adduct ion suppressor. The addition of simply (NH₄)H₂PO₄ to SPA-c or SPA-f resulted in an increase of the mass accuracy. The effect on the S/N ratio was less consistent, but the overall effect of (NH₄)H₂PO₄ was an increase of the S/N ratio.

Conclusion: The mass accuracy and S/N ratio of the SELDI-TOF-MS analysis were deteriorated by controlled addition of alkali cation salts to SPA and improved by addition of an alkali cation adduct ion suppressor. Thus, non-controlled presence of alkali cation ions in the EAM could affect the reproducibility of SELDI-TOF-MS analysis.

23. Analysis of pyrimidine-synthesis 'de novo' intermediates in urine and dried urine filter-paper strips with HPLC-electrospray tandem mass spectrometry

A.B.P. van KUILENBURG¹, H. van LENTHE¹, M. LÖFFLER², A.H. van GENNIP³

Lab. Genetic Metabolic Diseases¹, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands, Institute for Physiological Chemistry², Philipps-University, Marburg, Germany, Departments of Clinical Genetics and Clinical Chemistry³, Academic Hospital Maastricht, The Netherlands

Introduction: The concentrations of the pyrimidine 'de novo' metabolites and their degradation products in urine are useful indicators for the diagnosis of patients suspected of an inborn error of the pyrimidine 'de novo' pathway or a urea-cycle defect. Up to now, no procedure was available allowing the analysis of all these metabolites in a single analytical run. In this paper, we describe a fast and specific method to measure these metabolites with HPLC tandem-mass spectrometry.

Methods: Urine or urine-soaked filter-paper strips were used to measure N-carbamyl-aspartate, dihydroorotate, orotate, orotidine, uridine and uracil. Reversed-phase HPLC was combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and detection was performed by multiple-reaction monitoring. Stable-isotope-labeled reference compounds were used as internal standards (1).

Results: All pyrimidine 'de novo' metabolites and their degra-

dation products were measured within a single analytical run of 14 min with the lower limit of detection ranging from 0.4 µM to 3 µM. The intra-assay variation and inter-assay variation of urine with added compounds was 1.2-5% for liquid urines and 2-9% for filter-paper-extracts of the urines. Recoveries of the added metabolites were 97-106% for urine samples and 97-115% for filter-paper-extracts of the urines. Analysis of urine samples from patients with a urea-cycle defect showed an aberrant metabolic profile compared to controls.

Conclusion: HPLC with electrospray ionization tandem mass spectrometry allows rapid testing for disorders affecting the pyrimidine 'de novo' pathway. The use of filter-paper strips will facilitate collection, transport and storage of the urine samples.

Literature: Van Kuilenburg et al. Clin Chem 2004; 50: 2117.

24. Determination of 5-fluorouracil in plasma with HPLC-tandem mass spectrometry

A.B.P. van KUILENBURG¹, H. van LENTHE¹, J.G. MARING², A.H. van GENNIP³

Lab. Genetic Metabolic Diseases¹, Academic Medical Centre, Amsterdam, Department of Pharmacy², Diaconessen Hospital Meppel, Departments of Clinical Genetics and Clinical Chemistry³, Academic Hospital Maastricht, The Netherlands

Introduction: 5-fluorouracil (5FU) remains one of the most frequently prescribed chemotherapeutic drugs for the treatment of cancers of the gastrointestinal tract, breast, head and neck. A relationship between the 5FU dose intensity and the

therapeutic response, as well as toxicity, has been noted. Patients with a dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency are unable to degrade 5FU and these patients are at risk of developing severe toxicity after the administration of 5FU (1).

In this study, we described a fast and specific method to measure 5FU with HPLC tandem-mass spectrometry.

Methods: Plasma samples from controls and patients were used to measure 5FU. Reversed-phase HPLC was combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and detection was performed by multiple-reaction monitoring.

Results: Stable-isotope-labeled 5FU was used as an internal standard. 5FU was measured within a single analytical run of 16 min with a lower limit of detection of 0.05 μ M. The intra-assay variation and inter-assay variation of plasma with added

5FU was <6%. Recoveries of the added 5FU in plasma were > 97%. Analysis of the 5FU levels in plasma samples from patients with the HPLC tandem mass spectrometry method and a HPLC-UV method yielded comparable results ($r^2 = 0.98$).

Conclusion: HPLC with electrospray ionization tandem mass spectrometry allows the rapid analysis of 5FU levels in plasma and could, therefore, be used for therapeutic drug monitoring.

Literature: Van Kuilenburg. Eur J Cancer 2004; 40: 939

25. Development and validation of a proteomics-based analysis of differentially expressed proteins in human urine associated with early stage renal injury

K.J.A. VANHOUTTE¹, C. LAARAKKERS², P. PICKKERS³, J.F.M. WETZELS⁴, L.P. van den HEUVEL^{5,6}, F.G.M. RUSSEL¹, R. MASEREEUW¹, J.L. WILLEMS²

Dept. of Pharmacology-Toxicology¹, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Department of Clinical Chemistry², Department of Intensive Care Medicine³, Department of Nephrology⁴, Department of Paediatric Nephrology⁵, Nijmegen Proteomics Facility⁶, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

Introduction: Urine proteomics is one of the key emerging technologies to discover new biomarkers for renal disease and offers an attractive alternative to other more expensive, invasive and time consuming clinical diagnostics. Here we assess the technical reproducibility of Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF-MS) with a focus on biological confounders (e.g. age, gender, daily variation). We aim to validate the technique for biomarker discovery in patients with mild ischemic kidney injury.

Methods: We analyzed first-morning mid-stream urine samples from 50 healthy volunteers and from 20 intensive care unit patients, where we collected urine 12-24 hours after coronary artery bypass graft (CABG) surgery. Samples were briefly centrifuged (10 min, 2000g) and stored at -80°C with protease inhibitors. After thawing, samples were concentrated about 10 times and desalted with centrifugal ultrafiltration

(45-60 min, 13.000g, 3 kD Microcon filters, Millipore). We analyzed urine samples with constant creatinine levels on 8-well weak cation-exchange chips (CM10) and immobilized metal affinity chips (IMAC3) in a PBSIIc Seldi mass spectrometer (Ciphergen).

Results: The average intra- and interchip variation lies in the normal experimental range (CV~10 to 30%). Cluster analysis with Ciphergen Express and Ciphergen Biomarker Wizard Software revealed 1) low intra-individual day-to-day variation in individual healthy volunteers; 2) no predominant cluster patterns based on age or gender; 3) high concordance between the master pool sample and the individual normal samples; 4) multiple protein peaks as potential classifiers for the CABG condition.

Conclusion: The Seldi-TOF technique is potentially useful for the discovery of early urinary biomarkers after ischemic injury.

Moleculaire biologie

26. The -326 guanine to adenine-promoter polymorphism in the chitinase 3-like 1 gene is associated with serum levels of YKL-40, a novel sarcoidosis marker

A. KRUIT¹, J.C. GRUTTERS¹, W.B.M. GERRITSEN², C.M. van MOORSEL^{1,2}, J.M.M. van den BOSCH¹, H.J.T. RUVEN²

Department of Pulmonology¹, Heart Lung Centre Utrecht, Department of of Clinical Chemistry², St. Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands

Introduction: The human cartilage glycoprotein-39, or YKL-40, has recently shown its potential as a marker for sarcoidosis and the presence of pulmonary fibrosis (1). The aim of this study was to investigate whether single nucleotide polymorphisms in the chitinase 3-like 1 (CHI3L1) gene might influence serum YKL-40 levels in sarcoidosis patients and healthy controls.

Methods: Serum YKL-40 and 6 single nucleotide polymorphisms were determined in white Caucasian controls (n=333) and sarcoidosis patients with 4 years of follow-up (n=63).

Results: Sarcoidosis patients had significantly higher (mean, 95%CI) serum YKL-40 levels (181.3 ng/ml, 50.7-648.1) compared to controls (36.6 ng/ml, calculated reference range: 11.9 - 110.0 ng/ml), $p < 0.0001$. Serum YKL-40 was elevated in 79% of the patients and revealed an inverse correlation with carbon monoxide diffusing lung capacity (Dlco) at presenta-

tion ($r^2 = -0.27$, $p = 0.03$), but not after 2-4 years ($r^2 = -0.16$, $p = 0.27$). Serum YKL-40 levels in controls were dependent on the CHI3L1 -329 G/A polymorphism (genotype, mean, 95%CI): GG (n = 213) 48.3, 41.7-56.0; GA (n = 101) 31.2, 26.6-36.3; AA (n = 17) 17.8, 13.6-23.4, $p < 0.0001$ and age ($r^2 = 0.23$, $p < 0.0001$). In the sarcoidosis patients, the genotype-dependent effect was not observed.

Conclusion: This study supports the use of YKL-40 as a marker for sarcoidosis. Serum YKL-40 was unable to predict the course of pulmonary disease phenotypes. The CHI3L1 -329 G/A polymorphism may be of interest for investigations involving YKL-40, as our study delivered in vivo evidence that it contributes to inter-individual variations in YKL-40 levels.

Literature: Johansen et al. Respir Med 2005; 99: 396.

27. Erythroid-specific transcriptional regulation of the human protoporphyrinogen oxidase gene is mediated by two GATA-1 sites in exon 1

K.M.K. de VOOGHT, R. van WIJK, W.W. van SOLINGE

Department of Laboratory Medicine, University Medical Centre Utrecht, The Netherlands

Introduction: Protoporphyrinogen oxidase (PPOX) catalyzes the six-electron oxidation of protoporphyrinogen IX to protoporphyrin IX. Like other heme biosynthetic proteins, PPOX is involved in synthesizing heme for red cells (erythroid-specific expression) and heme as a cofactor for the respiratory cytochromes (housekeeping expression). Whereas tissue specific regulation of other heme biosynthetic enzymes is extensively studied, there is little knowledge concerning transcriptional regulation of PPOX.

Methods: Functional studies were performed using transient transfection of PPOX promoter constructs in human K562 erythroleukemia cells. DNA-protein interaction at the GATA-1 sites in exon 1 of PPOX was studied using Electrophoretic Mobility Shift Assay's (EMSA) with nuclear extracts from K562 cells.

Results: In vitro transfections studies revealed that PPOX reporter constructs containing exon 1 showed a 300% increase in promoter activity compared to constructs lacking this exon.

Transfection experiments of wild-type and mutant reporter plasmids in K562 cells demonstrated that erythroid-specific transcriptional regulation of PPOX was mediated by two GATA-1 sites in exon 1. The highest level of transcription depended on the integrity of both sites. Electrophoretic mobility shift assay and supershift experiments using K562 nuclear extracts demonstrated that both GATA sites were able to bind GATA-1 in vitro. Exon 1 did not have any effect on PPOX promoter activity in human hepatoma HepG2 cells. In HeLa human cervical carcinoma cells, however, the presence of exon 1 decreased promoter activity.

Conclusion: Exon 1 of the human PPOX gene contains two GATA-1 binding motifs, which both are required for erythroid-specific expression of PPOX and, in addition, bind GATA-1 in vitro. These results contribute to a better understanding of the molecular mechanisms involved in differential regulation of the human PPOX promoter in erythroid and non-erythroid cells.

28. Allelgerelateerde serumconcentraties van paroxetine

J. van der WEIDE, J.W.J. HINRICHS, W. SMALLEGOOR, E.H. van BAALEN-BENEDEK, C. WELKER

Afdeling Klinisch Chemie, St Jansdal Ziekenhuis, Harderwijk

Inleiding: Behandeling met psychofarmaca wordt gekenmerkt door grote individuele verschillen in drugrespons en -dosering. Een belangrijke oorzaak hiervoor is de variatie in genotypen van cytochroomP450(CYP)2D6- en -2C19-enzymen, verantwoordelijk voor het metabolisme van de meeste psychofarmaca. Recentelijk onderzoek heeft een lineair verband aangevend tussen het aantal (verminderd) functionele CYP2D6/2C19-allelen en de serumconcentraties van amitriptyline en imipramine. Verminderd functionele genotypen, zoals het recentelijk ontdekte CYP2D6*41, nemen hierbij een belangrijke plaats in. De hiervan afgeleide 'functional gene dose' (FGD), brengt een genotypespecifiek doseringsadvies dichterbij. Doel van het onderzoek is om voor het veel voorgeschreven antidepressivum paroxetine een soortgelijk systeem te ontwikkelen, dat tevens rekening houdt met co-medicatie en de inhiberende werking op het eigen metabolisme.

Methode: Van 150 paroxetinegebruikers is zowel de bloedserumspiegel als de genotypering voor CYP2D6 (*3, *4, *5, *6 en genduplicatie) routinematig bepaald. Deze gegevens zijn

vervolgens aangevuld met nieuw ontwikkelde genotyperingen voor verminderd functionele CYP2D6-genotypen (*9, *10, *41). De serumconcentratie/dosering-ratio is uitgezet tegen het aantal (verminderd) functionele allelen, uitgedrukt als 'semi-quantitative gene dose' (SGD), na correctie voor co-medicatie (G-standaarden).

Resultaat: In de onderzochte populatie zijn de allelfrequenties van CYP2D6*9, *10 en *41 respectievelijk 3%, 3% en 8%. Ze vertegenwoordigen een aanzienlijk deel van patiënten met een zogenaamd intermediair metabolisme. Voor paroxetine lijkt ook een lineair verband te bestaan tussen de serumconcentratie/dosering-ratio en de SGD. De correctie voor co-medicatie met inhiberende eigenschappen speelt hierbij een belangrijke rol.

Conclusie: De gevonden relatie tussen de serumconcentratie/dosering-ratio en het aantal (verminderd) functionele CYP2D6-allelen vormt tezamen met kennis van de inhiberende co-medicatie een goed uitgangspunt voor het vaststellen van een doseringsadvies voor paroxetine.

29. Influence of different allelic variants of cytochrome P450 3A and multidrug resistance-1 gene on the tacrolimus pharmacokinetic profile of chinese renal transplant recipients

R.A.M. op den BUIJSCH¹, J.E. de VRIES^{1,2}, C.Y. CHEUNG³, K.M. WONG³, P.A.H.M. WIJNEN¹, M.P. van DIEIJEN-VISSER¹, O. BEKERS¹

Department of Clinical Chemistry¹, Department of Biochemical and Clinical Genetics², University Hospital Maastricht, The Netherlands, Renal Unit³, Department of Medicine, Queen Elizabeth Hospital, Hong Kong

Introduction: The calcineurine inhibitor tacrolimus, used widely after organ transplantation, has a narrow therapeutic index and highly variable pharmacokinetic characteristics which requires close monitoring of the drug concentration to achieve an optimal efficiency while minimizing the risk of sub-therapeutic or toxic blood concentrations. To elucidate the variability in the tacrolimus pharmacokinetics, we examined the influence of several polymorphisms in the cytochrome P450 (CYP) 3A iso-enzymes and the multidrug resistance-1 (MDR1) gene on the tacrolimus pharmacokinetic profiles in 103 Chinese renal transplant recipients.

Methods: A two time point sampling strategy which highly correlated with the complete 12-hour area-under-the-tacrolimus-

concentration curve (AUC₀₋₁₂) is used to calculate the AUC₀₋₁₂ of the Chinese renal transplant recipients. Both the dose-normalized area-under-the-tacrolimus-concentration curve (dnAUC₀₋₁₂) and the daily tacrolimus dose (mg/kg) were related to CYP3A, CYP3A1 and MDR1 genotypes determined by real-time PCR Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) assays.

Results: A significant allele-dependent effect is observed for the CYP3A5*3 polymorphism resulting in a significantly lower dnAUC₀₋₁₂ (median (range) in ng·hr/mL per mg/kg) for homozygotes of the CYP3A5*1 genotype compared to homozygotes for the CYP3A5*3 genotype: 920 (300-1981) versus 2156 (827-11125), (Mann-Whitney; P<0.001). Regarding the MDR1

G2677T/A and C3435T polymorphisms, a trend is observed towards a lower dnAUC₀₋₁₂ for carriers of the MDR1 2677TT or MDR1 3435TT genotype.

Conclusie: Renal transplant recipients carrying a CYP3A5*1 allele, MDR1 2677TT or MDR1 3435TT genotype require a

higher daily tacrolimus dose compared to those carrying a CYP3A5*3 allele, MDR1 2677GG or MDR1 3435CC genotype to maintain the tacrolimus blood level within the therapeutic window.

30. Detection of the 1173C>T polymorphism of the human Vitamin K epoxide reductase complex (VKORC1) gene with the LightCycler®

J.F.M. ROIJERS, C.W.G.G. WILGERS-ELESEN, R.H. TRIEPELS, E.M.V. WIJK
Department of Clinical Chemistry, St. Elisabeth Hospital, Tilburg, The Netherlands

Introduction: Recently it has been demonstrated that polymorphism's in the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 gene (VKORC1) are responsible for about 37% of the inter-individual differences in the anticoagulant response. VKORC1 1173C>T accounts for a low dose requirement. Genotyping for VKORC1 can predict a high risk for overdose before initiation of anticoagulation. The aim of the study was to develop a LightCycler assay for the detection of VKORC1 1173C>T polymorphism. To evaluate the reliability of genotyping with the LightCycler the samples were also analyzed by digestion with HinfI.

Methods: The LightCycler was used for the detection of the single nucleotide polymorphism 1173C>T of the human VKORC1 gene. During the melting curve analysis the hybridization probes dissociate from the target DNA at specific melting temperatures. The presents of a C-allele introduced a destabilizing mismatch, resulting in a decreased

melting temperature. For detection of VKORC1 1173C>T with a restriction enzyme, the presents of a T-allele introduced an extra recognition site for HinfI.

Results: A LightCycler assay was developed to analyze the VKORC1 1173C>T. In heterozygous genotypes the difference in melting temperature was $4,4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,75 \text{ }^\circ\text{C}$ (46 samples). Genotyping 25 human DNA samples with both the LightCycler and by digestion with HinfI resulted in 9 CC, 11 CT and 5 TT alleles. With both methods in all samples a clear genotype was obtained and no discrepancies were found.

Conclusion: With the described LC assay it is possible to detect the VKORC1 1173C>T polymorphism. Comparison between LightCycler genotyping and digestion with a restriction enzyme showed complete concordant results. Real-time PCR followed by melting curve analysis is a rapid, simple, accurate method for genotyping the VKORC1 1173C>T polymorphism.

31. Farmacogenetische analyse van CYP2D6 met behulp van de AmpliChip450

R.H.N. van SCHAİK, M. van FESSEM, P.W. SCHENK, J. LINDEMANS
Afd. Klinische Chemie, Erasmus MC Rotterdam

Inleiding: DNA-analyse van geneesmiddel-metaboliserende enzymen (farmacogenetica) staat momenteel sterk in de belangstelling. Ongeveer 30% van alle geneesmiddelen wordt gemetaboliseerd door CYP2D6. 5-10% van de Kaukasiërs heeft echter nauwelijks enzymactiviteit door het bezit van twee nul-allelen. Daarentegen veroorzaakt CYP2D6-genduplicatie in 2-3% van de bevolking voor een 'ultrarapid' metabolisme. Er zijn inmiddels 70 CYP2D6-variantallelen beschreven. De AmpliChip450 detecteert de meest voorkomende 26 CYP2D6-varianten, alsmede genduplicaties. Hiermee is het voor het eerst mogelijk een goede inschatting te krijgen over het voorkomen van deze allelen in Kaukasiërs. Detectie van 'decreased activity'-allelen zorgt ervoor dat een 'gene-dosage' kan worden berekend, met mogelijk een betere voorspelling van fenotype.

Methode: Van 30 Kaukasische bloeddonoren werd 250ng genomisch DNA geanalyseerd op CYP2D6-allelen *1,*2,*3,*4,*5,*6,*7,*8,*9,*10,*11,*14A,*14B,*17,*19,*20,*25,*26,*29,*30,*31,*35,*36,*40,*41 en genduplicatie met

behulp van de AmpliChip450 (Roche Diagnostics/Affymetrix Genescanner).

Resultaat: Het percentage allelen met normale activiteit was 67%, terwijl de 'decreased activity'-allelen een gezamenlijke allelfrequentie hadden van 17%. Het *41-allel leverde hierbij de grootste bijdrage (10%). De nul-allelen hadden een gezamenlijke allelfrequentie van 17%, met het *4-allel (12%) als meest frequente nul-allel. Bij 2 personen (7%) werd een genduplicatie aangetroffen, waarbij het in 1 geval een verdubbeling van een 'decreased activity'-allel betrof. Hierdoor wordt een normaal metabolisme verwacht, en geen 'ultrarapid'. Indeling naar gendosering gaf: 3% >3, 43% 2, 23% 1.5, 20% 1.0, 7% 0.5 en 3% 0.

Conclusie: CYP2D6-analyse met behulp van de AmpliChip is een snelle manier om veel CYP2D6-variantallelen te analyseren, en maakt indeling op CYP2D6-'gene-dosage' mogelijk. Van de nul-allelen was *4 het meest frequent, terwijl het *41-allel de belangrijkste bijdrage leverde aan de 'decreased activity'-allelen.

32. Afwijkende piekenpatronen bij genotypering van HLA-B27-negatieve patiënten m.b.v. de LightCycler

A.G.M. van der ZANDEN², J.S. KAMPHUIS¹, S.H.M. DAMHUIS¹, I.J.M. GOTINK¹, N. AYTEN¹, J. de BEER², J.D.E. van SUIJLEN¹

Klinisch Chemisch Hematologisch laboratorium¹, Medische Microbiologie & Infectiepreventie², Gelre ziekenhuizen, Apeldoorn

Inleiding: Binnen het klinisch-chemisch en hematologisch laboratorium vindt genotypering plaats van HLA-B27 uit bloed m.b.v. de LightCycler 2.0 (Roche). Als interne controle wordt gebruik gemaakt van het β -globinetarget, dat altijd in humaan DNA aanwezig is. Analyse van negatieve HLA-B27-patiëntenmonsters liet een afwijkend piekenpatroon zien, ondanks een probleemloze voorgeschiedenis.

Methode: DNA-isolatie uit EDTA-bloed is uitgevoerd m.b.v. de MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche).

De real-time-PCR is uitgevoerd m.b.v. de LightCycler. Door het gebruik van SYBR Green I wordt geamplificeerd DNA zichtbaar. Door het uitsmelten van de gevormde producten, β -globine en HLA-B27, wordt de specificiteit bevestigd. De oorzaak van het probleem is onderzocht door het variëren van diverse aspecten van de test; aantal cycli, isolatiemethoden, concentratie / kwaliteit van de primers en de hoeveelheid DNA-input. Tevens is sequentieanalyse toegepast om zeker te zijn van de specificiteit van de bepaling.

Resultaat: 'Sequencen' van de amplificaten bevestigde de aanwezigheid van specifiek product. Het variëren van de diverse aspecten van de test leverde alleen resultaat op voor de hoeveelheid DNA-input. Door de DNA-input van monsters met een afwijkend piekenpatroon met een factor 10 te verlagen werden de meeste patronen duidelijk verbeterd.

Conclusie: De concentratie van de DNA-input is van groot belang voor de kwaliteit van de HLA-B27-bepaling m.b.v. de LightCycler. Voor het routinematig optimaal uitvoeren van deze bepaling is het wenselijk monsters met afwijkende piekenpatronen te herhalen met een 10 maal verdunde DNA-input.

33. Detectie van het HLA-B27-allel met het Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System

E.M.L. SMETS, J. OOMES, M. CHEVALLIER, M. SCHOORL

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

Inleiding: Aanwezigheid van het HLA-B27-allel is o.a. geassocieerd met spondylarthropathieën en uveïtis. Omdat immunocytologische bepalingen vaak last hebben van kruisreactiviteit met andere HLA-B-epitopen, hebben we een moleculair biologische methode geoptimaliseerd.

Methode: Uit volbloed werd DNA geïsoleerd. Als interne controle op isolatie- en PCR-efficiëntie werd RNase P gebruikt; primers en probe werden bij Applied Biosystems besteld. Primers en probes voor HLA-B27 werden handmatig ontworpen. Na 10 min. op 95°C werden 45 cycli van 15 s op 95°C en 60s op verschillende annealingstemperaturen voltooid.

Resultaat: Hoewel primers en probe specifiek ontworpen waren voor alle HLA-B27-allelen was er wel enige reactie met niet-HLA-B27-allelen; nagenoeg niet te vermijden gezien de soms zeer kleine verschillen in nucleotidensequentie tussen de allelen. Verhoging van annealingstemperatuur van 60 tot 64°C verhoogde de specificiteit en gevoeligheid voor HLA-B27. De

'threshold cycle' (Ct), cyclus waarbij de fluorescentie een vastgestelde waarde overschrijdt, nam af van 33,5±8,0 tot 31,7±9,3 bij 60 resp. 64°C. De gevoeligheid voor RNase P werd echter minder; Ct's namen toe van 23,8±0,6 tot 28,0±2,3 bij 60 resp. 64 °C. Bij 64 °C werd RNase P bovendien niet meer altijd gedetecteerd. Bij een annealingstemperatuur van 63 °C geeft het genormaliseerde fluorescentiesignaal (Rn) bij een optimale afkapwaarde een gevoeligheid van 86% (n=14) en specificiteit van 86% (n=26). Een optimale afkapwaarde voor Ct verhoogde de gevoeligheid tot 100%, maar de specificiteit was slechts 77%. Door de Ct van HLA-B27 af te trekken van die van RNase P -beide onafhankelijk variabel ($r=0.004$) - werden specificiteit en gevoeligheid beide op 100% gebracht.

Conclusie: Optimaliseren van annealingstemperatuur en afrekken van de Ct's van HLA-B27 van RNase P leverde een gemakkelijk uitvoerbare detectiemethode op met 100% gevoeligheid en specificiteit.

Overigen

34. Starrsed Auto-Compact

J.W.P.H. SOONS, H. van DIJK-van de VEN, T. DIETZENBACHER-van DOOREN

Dept. Clinical Chemistry, St. Anna Hospital, Geldrop, The Netherlands

Introduction: The Starrsed Auto-Compact (SA) is a fully automated erythrocyte sedimentation rate (ESR) analyser. We compared the Starrsed Auto-Compact with its predecessor, the Starrsed 3 (S3) and the reference method, the classic Westergren method (W).

Methods: The erythrocyte sedimentation rate is measured in EDTA-blood. The two analysers have a different dilution device for mixing the EDTA-blood with the 109 mM citrate solution, but use the same volume ratio. In the classic Westergren method 1.2 ml EDTA-blood is diluted in 0.3 ml 109 mM citrate solution. All three methods use standardized sedimentation tubes in which the blood is allowed to sedimentate for one hour before measuring the ESR.

Results: The ESR is measured in EDTA-blood obtained from 250 patients by both the automated systems. In 50 of these patients the ESR is also measured by the reference method. Comparison of the obtained data by Passing Bablock analysis results in the following equations: $SA = 1,17 * S3 + 0,67$, $SA = W$, $S3 = 0,84 * W - 1,36$. The line obtained by plotting the data of the SA against those of S3 shows a kink in the line at an ESR value of 20 mm/hr. Analysis of these data, divided in two groups, results in the following equations: $ESR < 20$; $SA = 1,50 * S3 - 0,50$, $ESR > 20$; $SA = 0,97 * S3 + 5,72$.

Conclusion: The Starrsed Auto-Compact correlates well with the Starrsed 3 for ESR values above 20 mm/hr. The Starrsed Auto-Compact correlates well with the reference method.

35. Evaluatie van de StatSpin Express 2 voor citobepalingen

R.F.M. OUDE ELFERINK, E. BALDUK, B. NIENHUIS

LabNoord, Martini Ziekenhuis, Groningen

Inleiding: Uit een eerder onderzoek was gebleken dat door toepassing van de StatSpin Express 20 minuten tijdswinst te behalen is bij het uitvoeren van de citobepalingen. De opzet van dit onderzoek is om de toepassing te valideren voor alle citomonsters.

Methode: Op de StatSpin zijn 3 verschillende standen (30 seconden, 120 seconden en 180 seconden). De snelheid van de centrifuge is vast: 4440 g. De validatie werd toegepast op de citobepalingen Troponine I, D-dimeer, stolling en chemie. Hierbij werd eerst een pilot met tien patiënten uitgevoerd om de optimale centrifuge tijd per bepalingsgroep vast te stellen. Na vaststelling van deze tijd, werd het aantal patiënten uitgebreid tot n=50. Bij de stollingsbuizen werden in het plasma

ook het aantal trombocyten geteld om te controleren of er plaatjesarm plasma ontstaat.

Resultaat: Uit het pilotonderzoek bleek dat 120 seconden centrifugeren optimaal is. De standaardcentrifugemethoden bleken goed te correleren met de StatSpin. Alleen de LDH-waarde bleek significant lager uit te vallen dan bij de standaardmethode. Het plasma was plaatjesarm.

Conclusie: Uit dit onderzoek blijkt duidelijk dat de StatSpin Express 2 breed inzetbaar is voor de citobepalingen. In het belang van de patiënt kan hierdoor mede ook door de aangepaste monsterlogistiek de service van het laboratorium naar de kliniek sterk worden verbeterd.

36. Invloed temperatuur en transporttijd op de plasmakaliumwaarde

H.A. ASSINK, G. BARLA
LabNoord, Groningen

Inleiding: Tijdens een zomerperiode kregen wij enkele vragen van huisartsen over onverwachte lage kaliumuitslagen. Omdat het in die periode erg warm was, is een verband gelegd met de omgevingstemperatuur.

Methode: Bij diverse vrijwilligers is bloed afgenomen en onder diverse condities bewaard, alvorens te centrifugeren en kalium te meten. Variabelen hierbij waren de tijdsfactor, de omgevingstemperatuur en het buistype. De kaliumanalyses zijn uitgevoerd met de Vitros 950 chemie-automaat. De patiëntenmaandgemiddelden van ca. 13 klinisch-chemische testen is gedurende de periode van bijna 2 jaar uitgezet tegen de gemiddelde maandtemperatuur, zoals opgegeven door het KNMI.

Resultaat: Er is een duidelijke relatie gevonden tussen de bewaartemperatuur en de plasmakaliumwaarden. Hoe hoger de bewaartemperatuur van de monsters voor afdraaien, hoe lager

de plasmakaliumwaarden waren. Dit effect was tijdsafhankelijk. Ook bleek dit proces reversibel. Verschillende plasma-buistypen hadden geen invloed op dit proces. Verder bleken de gemiddelde plasmakaliumwaarden van de huisartspatiënten gecorreleerd te zijn aan de gemiddelde omgevingstemperatuur. *Conclusie:* In het preanalytisch traject bestaat er een duidelijk verband tussen de plasmakaliumwaarden, de omgevingstemperatuur en de transporttijd. Dit is ook verklaarbaar omdat het Na/K-ATPase in de ery's na bloedafname actief blijft. Deze activiteit, en dus ook de kaliumwaarden in bloed, kunnen wij beïnvloeden door de temperatuur te verhogen of te verlagen. Dit proces is reversibel. De omgevingstemperatuur heeft zelfs meetbare invloed op de gemeten plasmakaliumwaarden. Het is belangrijk om de monsters onder geconditioneerde omstandigheden te transporteren en de transporttijden te bewaken.

37. The analytical evaluation of spermalite (SQA-V) for the determination of semen parameters

N.J. van TROOYEN-van VROUWERFF¹, H. HATZMANN², F.A.L. van der HORST¹
Dept. of Clinical Chemistry¹, St. Antonius Hospital, Nieuwegein, SALTRO², Utrecht, The Netherlands

Introduction: Semen analysis by using the WHO criteria (1) is very time consuming and prone to significant inter-observer imprecision. Automation of the semen analysis could improve standardisation and productivity. The Spermalite (SQA-V) is a new analytical device for a quantitative evaluation of semen parameters. In this study results obtained with the Spermalite(SQA-V) are compared with those of a conventional semen analysis based on WHO-recommendations (1).

Methods: The Spermalite (software version 2.45; DPC, The Netherlands) was used. Manual semen analysis was carried out according to the WHO-criteria. Motility was determined at room temperature by a highly trained technician, whereas sperm counts were carried out on a routine base by a pool of specialized technicians (n = 12). Correlations were based on at least 49 patient samples referred to our dept of Gynaecology.

Results: Examples of correlations between the semen parameters obtained with a Spermalite (Sp) and microscopically (Mi) were: Motile sperm cells (VCM, Milj): $VCM(Sp) = 0,88 \times VCM(Mi) + 5.1$ (R = 0.849), Total sperm concentration (TSC, Milj/ml): $TSC(Sp) = 1.0 \times TSC(Mi) + 9.4$ (R = 0.782),

Motility class A (MotA,%): $MotA(Sp) = 0.90 \times MotA(Mi) + 3.1$ (R = 0.63), Motility class A + B (Mot AB): $MotAB(Sp) = 0.87 \times MotAB(Mi) - 3.3$ (R = 0.55). The correlation between two Spermalites (Sp1 and Sp2) was: $VCM(Sp1) = 1.0 \times VCM(Sp2) + 5.1$ (R=0.99903) Typically, the coefficient of variation of Spermalite parameters was < 10%.

Conclusion: The Spermalite show a good correlation of the concentration, motility, motile sperm concentration and VCM with that of the microscopic analysis. The observed good inter-device reproducibility offers the possibility to solve the problem of standardisation of results between different laboratories with low efforts. Based on the results we use the Spermalite in such a routine setting, that no manually analysis is performed if normal semenparameters are found with the Spermalite (VCM > 40).

Literature: WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, 1999, Cambridge, United Kingdom.

38. Automatisering van het urinesediment met behulp van de IQ200

D. van den BROEK, A. DEKKER, R. HOMAN, M. SCHIPPER, I.M.L.W.KEULARTS, J. PRINS,
R.J. KRAAIJENHAGEN, J.P.M. WIELDERS
Klinisch Chemisch Laboratorium, Meander Medisch Centrum, Amersfoort

Inleiding: Het urinesediment is een arbeidsintensieve analyse met een hoge mate van variabiliteit in uitvoering en interpretatie. De IQ200 van Instrumentation Laboratory biedt de mogelijkheid tot een volledige automatisering en standaardisering van de analyse van het urinesediment. Aan de hand van 500 digitale foto's per urinemonster worden vormelementen gekarakteriseerd en ingedeeld in 12 verschillende klassen. Wij hebben de IQ200 geëvalueerd met als doel de betrouwbaarheid van de urinediagnostiek te vergroten en de bewerkelijkheid te beperken.

Methode: Evaluatie van de IQ200 waarbij de resultaten van de geautomatiseerde analyse zijn vergeleken met de striptest (Roche Diagnostics) en het handsediment voor 200 random urinemonsters. Vervolgens zijn gedurende twee maanden alle

urines met een positieve stripuitslag met behulp van het handsediment en geautomatiseerd door de IQ200 geanalyseerd.

Resultaat: De IQ200 heeft weinig problemen met de detectie van de meeste vormelementen zoals erythrocyten, leukocyten en epitheelcellen. De IQ200 identificeert in vergelijking met het handsediment gemakkelijk cilinders. Het is zelfs mogelijk om dysmorphe erythrocyten te herkennen. De IQ200 heeft echter soms moeite met de correcte classificatie van gisten en identificatie van bacteriën (m.n. coccen). Daarnaast vereist het gebruik van digitale foto's een goede instructie en duidelijke regels ten aanzien van 'reviewen' d.w.z. de beoordeling van de door IQ200 uitgevoerde classificatie.

Conclusie: De IQ200 kan een grote stap voorwaarts zijn naar een gestandaardiseerd en efficiënt urinesediment.

Dienstverlening, doorlooptijden, workflowanalyse

39. Private laboratoriumdiagnostiek, DAT is een kans voor Klinisch-chemische Laboratoria!

J.L.P. van DUIJNHOF, C.H.H. SCHOENMAKERS

Algemeen Klinisch Laboratorium, Elkerliek ziekenhuis, Helmond en St. ServiceLabs, Helmond

Inleiding: De overheid introduceert marktwerking in de zorg. Zelf keuzes maken wordt gestimuleerd, en kosten dienen (deels) zelf gedragen te worden, o.a. middels eigen risico. Daarnaast ontstaan Zelfstandige BehandelCentra (ZBC's), welke concurreren met de ziekenhuizen voor relatief eenvoudige ingrepen. De ZBC's hebben doorgaans geen eigen laboratoriumfaciliteiten beschikbaar.

Methode: Na een voorbereidingsperiode van 2 jaar is eind 2004 St. ServiceLabs opgericht, die zich richt op diagnostiek voor particulieren (Direct Access Testing, DAT) met tevens ouderschap-DNA-onderzoek, diagnostiek keuringen levensverzekeringen, diagnostiek aangeboden aan Elkerliek door ZBC's, diagnostiek sportkeuringen en check-ups (o.a. lokale sportscholen, procontinental wielerploeg, en SMA Elkerliek ziekenhuis i.o), contract onderzoek diagnostische industrie, en glucosemeterkwaliteitscontrole voor particulieren. Acquisitie vindt ondermeer plaats via een website. Tarieven conform CTG, inclusief honorariumtarief.

Resultaat: In de eerste helft van 2005 zijn 326 orders verwerkt, waarvan 59 door particulieren (6 anoniem). Van de

overige aanvragen door artsen kwamen 192 van een sportarts. Uit de directe regio (postcode 57xx) kwamen 242 aanvragen, waarvan Helmond 177 en Deurne 23. De verhouding man/vrouw was 1,1, de gemiddelde leeftijd 47,8 jaar. Doorgaans werd het basisonderzoek aangevraagd, soms aangevuld met extra testen. Cholesterol en gGT waren relatief vaak verhoogd, resp. 15% en 18% van aanvragen. LDL en triglyceriden waren vaak verlaagd, resp. 46% en 14%. 4 maal werd HIV aangevraagd (allen negatief) en 1x drugscreen. De prognoseomzet 2005 bedraagt € 57.000, bruto inkomsten St. ServiceLabs € 21.000.

Conclusie: Het aanbieden van becommentarieerde laboratoriumdiagnostiek voor particulieren is een interessante vakinhoudelijke uitdaging voor de klinisch chemici, en stimuleert de bekendheid van het vak bij het publiek. Commerciële activiteiten kunnen een substantiële extrabudgettaire inkomsten bron zijn voor de ziekenhuizen, en zo mogelijk en desgewenst ook voor de klinisch chemici.

Literatuur: www.servicelabs.nl

40. Procesautomatisering door de introductie van twee Olympus OLA 2500 HS perianalytische systemen

M. de GRAAF, D. FONTIJN, R.J.M. van OERS, W.M. VERWEIJ

Stichting Saltro Huisartsenlaboratorium en Trombosedienst Utrecht

Inleiding: Saltro realiseert dagelijks tot 2500 patiëntencontacten. In 2005 zijn voor de preanalyse en archivering twee Olympus OLA 2500HS-systemen (OLA's) geïntroduceerd. Hier worden onze ervaringen tot nu toe gepresenteerd.

Methode: Voorafgaand aan de introductie zijn d.m.v. workflowanalyses inschattingen gemaakt van de effecten, welke de OLA's op de workflow van het laboratorium zouden hebben. Ruim een half jaar na volledige introductie zijn deze verwachtingen getoetst aan de praktijk.

Resultaat: Bij de workflowanalyses is gerekend met de door de leverancier opgegeven verwerkingssnelheid van 1200 buizen per uur. Gebleken is dat deze verwerkingssnelheid wordt beïnvloed door een aantal factoren. Deze factoren zijn de plaats van het uitvoerrek, de grootte en vulling van de primaire buis, het maken van aliquots en de grootte van de te verwerken batches buizen. De OLA's blijken weinig storingsgevoelig. Er is één interventie geweest in 9 maanden tijd. Veel bui-

zenhandelingen worden door de OLA's geautomatiseerd uitgevoerd. Hierdoor zijn minder medewerkers in dit proces betrokken. Alleen de juiste afnamebuizen met voldoende materiaal en juiste identificatie worden door de OLA eerder dan voorheen naar het analyseproces gestuurd. Buizen die hier niet aan voldoen worden in een error-rek gezet. Foutenbronnen worden hierdoor, voordat het analyseproces plaatsvindt, opgespoord. Door de ingebruikname van de OLA's is het begrip 'operator' op de afdeling klinische chemie geïntroduceerd. De operator is op de werkdag verantwoordelijk voor de bediening van de OLA's.

Conclusie: De OLA's voldoen grotendeels aan de vooraf opgestelde criteria. De doorvoersnelheid wordt in hoge mate bepaald door de inrichting en belading van het systeem. Het logistieke proces is door de perianalytische automatisering effectiever en efficiënter geworden. De werkomstandigheden zijn ontdaan van de voormalige hectiek.

Kwaliteit, referentiewaarden

41. Toepassing van een nieuw softwareprogramma ten behoeve van interne kwaliteitsbewaking en scholing bij differentiële beoordeling van bloeduitstrijken

H. CEELIE, R.B. DINKELAAR, W. van GELDER

Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium (GKCL) Albert Schweitzer Ziekenhuis (ASZ) en RIVAS zorggroep Locatie Dordwijk (DW) Dordrecht

Inleiding: Morfologische beoordeling van bloeduitstrijken is specialistisch werk waar bijzondere kennis voor vereist is. Binnen het GKCL is de microscopische beoordeling van bloeduitstrijken semi-geautomatiseerd en gedigitaliseerd, door de introductie van de Cellavision-DM96. Dit systeem beoordeelt het witte/rode bloedbeeld en pre-classificeert de leukocyten. De analist corrigeert waar nodig en accordeert elke afzonderlijke uitstrijk. In het verlengde hiervan werd een nieuw softwareprogramma geïntroduceerd, de zogenaamde Cellavi-

sion Diff-IQ software. Dit ten behoeve van interne kwaliteitsbewaking en scholing bij differentiële beoordeling van digitale bloeduitstrijken. Onderzocht werd op welke wijze Diff-IQ het beste geïmplementeerd kan worden, het gebruiksgemak werd getoetst en de ervaringen van de deelnemers geïnterviewd.

Methode: Diff-IQ is een softwareprogramma bedoeld voor educatie en interne kwaliteitscontrole bij de beoordeling van bloeduitstrijken in het laboratorium. De verschillende deelnemers beoordelen een testcase aangeboden en samengesteld

door de zogenaamde expert. Afzonderlijke diffen van een test-case komen uit een bij de software geleverde database of uit de database van de DM96. Resultaten van elke individuele deelnemer worden automatisch verwerkt.

Resultaat: Diff-IQ is een uitermate gebruiksvriendelijk programma, zeker voor gebruikers met ervaring op de DM96. Testcases kunnen door de expert eenvoudig en snel worden samengesteld. Verschillende testcases kunnen periodiek aangeboden worden aan de verschillende deelnemers. Resultaten en

statistische gegevens van de beoordeling van het witte en rode bloedbeeld worden op inzichtelijke wijze gepresenteerd t.o.v. de expert of het overall gemiddelde. De expert kan de resultaten van de verschillende deelnemers bekijken tot op het niveau van een individuele celklasse.

Conclusie: Implementatie van Diff-IQ kan een bijdrage leveren aan de scholing van analisten en is uitermate geschikt voor interne kwaliteitscontrole op individuele laboratoria. Het systeem kan eenvoudig worden geïmplementeerd.

42. "INR, not so ISI!"

J.H.C. DIRIS, R. van OERLE, Y.M.C. HENSKENS
Hematologisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Maastricht

Inleiding: Vanwege het afwijken van de INR-uitslagen van het Hematologisch Laboratorium van het academisch ziekenhuis Maastricht (azM) ten opzichte van die van de Stichting Trombosedienst Maastricht (STDM), en een structureel lagere INR-rapportage (t.o.v. andere reagentia) door het azM bij de landelijke SKML-enquêtes, werd een onderzoek gestart naar de oorzaak.

Methode: Met behulp van een zestal kalibratiemonsters met bekende INR (v.d. Besselaar) werd een ijklijn bepaald waarmee de ISI voor de azM-bepalingsmethode kon worden berekend. Ter controle van de beide bepalingmethoden (STDM: citraatvolbloed, KC4, Trombotest van Axis-Shield; azM: citraatplasma, CA-7000, Innovin van Dade Behring) werd van 56 (geanonimiseerde) patiëntenmonsters de INR bepaald volgens de specificaties van de desbetreffende firma.

Resultaat: Aan de hand van bekende PTnormaal, en INR, samen met de gemeten PT (sec) van de 6 kalibratiemonsters

werd een ijklijn gemaakt. De ISI (azM-methode), overeenkomstig met de helling van deze ijklijn, kon daarmee vastgesteld worden op 1,15, wat significant verschillend was van de door de fabrikant opgegeven waarde van 1,04. De correlatiecoëfficiënt tussen de uitgezette INR-waarden van de 56 patiëntenmonsters zoals gemeten in het azM ten opzichte van de waarden gemeten bij de STDM bedroeg 0,78 (0,71-0,84) (95% betrouwbaarheidsinterval). Na correctie van de ISI (van 1,04 naar 1,15) veranderde dit in 0,95 (0,88-1,03).

Conclusie: Ondanks het feit dat op beide locaties volgens de door de firma's opgegeven specificaties werd gewerkt, bestonden er onacceptabele verschillen tussen de gerapporteerde INR-waarden. Het vermoeden dat de verschillen veroorzaakt werden door het gebruik van een te lage ISI (1,04) door het azM werd bevestigd waarna deze gecorrigeerd werd (1,15). Controle achteraf toonde aan dat de huidige gerapporteerde waarden wel goed correleren.

43. MONIKA: elektronisch MONitoren van Ideeën, Klachten en Afwijkingen

M. PAANAKKER, A. PENNINGG
Laboratorium Klinische Chemie en Hematologie, Jeroen Bosch Ziekenhuis, 's-Hertogenbosch

Inleiding: Een goede registratie van ideeën, klachten en afwijkingen (IKA) is voor een laboratorium organisatie van groot belang. Het is essentieel inzicht te krijgen in IKA's van zowel binnen als buiten de organisatie om mede daarmee de dienstverlening te kunnen verbeteren. Om het melden van IKA's laagdrempelig te houden en te stimuleren behoort dit zo eenvoudig mogelijk te zijn. Tevens moet registratie zo uniform mogelijk zijn met een grote dataintegriteit.

Methode: Hierbij moet aan een aantal voorwaarden worden voldaan: Een IKA dient:

Zo eenvoudig mogelijk te registreren te zijn.
Volledig gemeld te worden t.b.v. een evaluatie.
Een korte doorlooptijd te hebben.
Eenvoudig en snel teruggekoppeld te worden.

Resultaat: De door ons laboratorium ontwikkelde software-module MONIKA ondersteunt dit proces. Op elke werkplek voorzien van een pc is MONIKA door alle medewerkers op te roepen. Binnen MONIKA worden de IKA's in een centrale database opgeslagen en kunnen volledig elektronisch, via e-mail, behandeld, beantwoord en verstuurd worden. MONIKA controleert en stuurt de volledigheid van een ingediende IKA, garandeert een correcte terugkoppeling, signaleert te lange doorlooptijden en geeft de mogelijkheid om historie vast te leggen en met behulp van statistiek trends vast te stellen.

Conclusie: Managementinformatie is hiermede eenvoudig voorhanden. Ten behoeve van meldingen op het gebied van hemovigilantie heeft MONIKA een separate module voor oa. het registreren en afhandelen van transfusiëreactie.

44. Kwaliteitscontrole van Hb- en glucosemeters in de eerste lijn

M.J.W. JANSSEN, J.M.W.A. van GEND, J.M.W. KLEUSKENS-WALRAVEN
Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, VieCuri Medisch Centrum voor Noord-Limburg, Venlo / Venray

Inleiding: Onlangs werd er in onze regio een bijeenkomst georganiseerd, waarbij assistenten werkzaam bij huisarts(en) of huisartsenposten in de gelegenheid zijn gesteld om hun Hb- en glucosemeters te controleren. Deze bijeenkomst, op initiatief van de ziekenhuiscommissie Kwaliteitsverbetering Laboratoriumonderzoek door de Huisarts, is bijzonder te noemen omdat de meters gecontroleerd werden met vers volbloed. Voorafgaand aan deze bijeenkomst is, met succes, gepoogd de diverse praktijken zoveel mogelijk met dezelfde type meters te laten werken (Hemocue Hb-meter en Precision XTRA / Xceed glucosemeter).

Methode: Voor controle van de Hb-meters werden monsters met drie verschillende Hb-waarden bereid van vers EDTA-volbloed. De referentiewaarden zijn vastgesteld met de routine-laboratoriummethode. Voor controle van de glucosemeters werden monsters met drie verschillende glucosewaarden bereid van vers Li-heparine volbloed en een glucosestockoplossing. De referentiewaarden, als functie van de tijd, zijn vastgesteld met Precision PCx meters.

Resultaat: De meters werden goedgekeurd als ze voldeden aan de door TNO gestelde eisen. Alle 16 Hb-meters zijn goedgekeurd. Van de 89 glucosemeters zijn er 68 goedgekeurd. De

meters die afgekeurd zijn beperken zich tot enkele praktijken. De leverancier van de meters heeft aangeboden om deze meters te vervangen.

Conclusie: Deze bijeenkomst werd als zeer waardevol ervaren in de regio, en bevordert daarmee de binding tussen huisartsen

en laboratorium. Verder zijn we van mening dat het gepresenteerde model verreweg de voorkeur geniet boven een kwaliteitscontroleprogramma dat gebruik maakt van commerciële monsters.

45. Zinkprotoporfyrinemeting met hematofluorimeter

M. SLOBBE-VAN DRUNEN¹, A. SPALDO¹, J. VAN DE VEN², J. TEN KATE¹

Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium¹, Maastrand Ziekenhuis, Sittard, Laboratorium voor Klinische Chemie, Hematologie en Immunologie², Medisch Centrum Alkmaar

Inleiding: Voor het aantonen van een ijzerebreksanemie worden meerdere testen uitgevoerd zoals Hb, ferritine, transferrine en transferrinesaturatie en zinkprotoporfyrine (ZPP). Tijdens een acutefaserespons zijn transferrine en ferritine geen betrouwbare parameters voor ijzerebreksanemie (acutefase-eiwitten) en zou ZPP een meer geschikte parameter zijn. De theoretische achtergrond is dat alleen bij een tekort aan ijzer relatief meer zink wordt ingebouwd in het hemoglobine. ZPP kan volgens 3 methoden gemeten worden; HPLC, spectrofotometrisch en hematofluorimetrisch.

Methode: In Nederland wordt de ZPP bepaald met behulp van hematofluorimetrische methode en zijn er twee firma's die deze hematofluorimeters leveren: AVIV en Helena. In de rondzending zijn 4 monsters gestuurd naar 8 laboratoria (7 AVIV en 1 Helena). De ProtoFluor-Z van Helena zat in een evaluatiefase waarbij de referentiewaarden nog bepaald moesten wor-

den. Hiervoor zijn 155 monsters genomen met een normaal Hb, Ht, MCV, ferritine en CRP.

Resultaat: Uit de rondzending blijkt dat de waarden van de Helena-gebruiker een stuk lager liggen dan die van de AVIV-gebruikers. Verder valt op dat de verschillende AVIV-gebruikers andere referentiewaarden hanteren. Bovengrens van normaal ZPP varieert van 50-140 µmol/mol heem en grens voor ijzerebreksanemie varieert van 50-150 µmol/mol heem. Het referentie-interval voor de ProtoFluor-Z van Helena bedraagt 28-70 µmol/mol heem met een gemiddelde van 49 ± 21.

Conclusie: Verdere evaluatie is nodig om de verschillen die gehanteerd worden voor bovengrens-normaal-ZPP en de grens voor ijzerebreksanemie te verklaren. Tevens is niet duidelijk waardoor het verschil in resultaat van de AVIV- en de Helena-gebruikers kan worden verklaard. Het referentie-interval welke gevonden is met de ProtoFluor-P is, 28-70 µmol/mol heem.

46. NVKC-richtlijn voor het goedkeuren van laboratoriumuitslagen

W.P. OOSTERHUIS¹, M. van der HORST², K. van DONGEN³, H.J.L.M. ULENKATE⁴, M. VOLMER⁵, R.W. WULKAN⁶.

Werkgroep Klinische Chemometrie van de Wetenschapscommissie NVKC. Atrium Medisch Centrum¹, Heerlen, Scheper Ziekenhuis², Emmen, St. Elisabeth Ziekenhuis³, Tilburg, Ziekenhuis Zeeuws-Vlaanderen⁴, Terneuzen, Universitair Medisch Centrum⁵, Groningen, Medisch Centrum Rijnmond Zuid⁶, Rotterdam

Inleiding: Deze richtlijn is opgesteld om een eenduidig goedkeurings(autorisatie)proces te bevorderen. Dit betreft het uniformeren van het signaleren van afwijkingen (fouten/uitzonderlijke analyseresultaten), en het standaardiseren van daaropvolgende acties.

Methode: De verschillende facetten van het goedkeuringsproces zijn uitgewerkt in het licht van ISO-norm 15189 en andere voorschriften. Om consensus te bereiken hebben de NVKC-leden via de website kunnen reageren.

Resultaat: Er zijn 7 deelrichtlijnen opgesteld: 1) Analyseresultaten worden pas geautoriseerd nadat er een analytisch-technische goedkeuring heeft plaatsgevonden. 2) Er bestaat een mechanisme voor het signaleren van afwijkende resultaten. 3) Het autoriseren kan – in volle omvang – alleen door een klinisch chemicus/laboratoriumarts uitgevoerd worden. 4) Tijdens het autoriseren zijn klinische gegevens beschikbaar voor de autorisator. 5) Buiten kantooruren kan volstaan worden met het ongeautoriseerd rapporteren van analyseresultaten, waarbij de uitslagen als zodanig gemarkeerd moeten zijn. 6) Het labo-

rationarium streeft naar een transparant beleid met betrekking tot eventuele vervolgacties die naar aanleiding van het goedkeuringsproces worden genomen. 7) Rectificatie van uitslagen gebeurt met inachtneming van mogelijke implicaties voor de patiënt.

Conclusie: Uit de resultaten van de Nederlandse enquête bleek dat er tussen laboratoria grote verschillen bestaan. Het goedkeuren c.q. autoriseren wordt mede bepaald door de mogelijkheden van het LIS. Vervolgacties -voortvloeiend uit het autorisatieproces- zijn niet eenduidig geregeld. Alleen de klinisch chemici/laboratoriumartsen hebben de bekwaamheid om de uitslagen in samenhang met klinische gegevens te beoordelen. Een geprotocolleerde voorscreening is mogelijk, zodat de laboratoriumspecialist alleen een beperkte selectie ter beoordeling voorgelegd krijgt. Verder onderzoek is nodig om aan te tonen -evidence-based- dat de baten van het autorisatieproces opwegen tegen de kosten.

Literatuur: Oosterhuis WP et al. NTKC 2003;28:78.

47. Bepalen van meerwaarde QC OnCall in het huidige KCHL-kwaliteitscontrolesysteem

J.S. KAMPHUIS, I.C. van MIDDENDORP, H.J. PUTS, J.D.E. van SUIJLEN

Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium, Gelre ziekenhuizen, Apeldoorn/Zutphen

Inleiding: Het kwaliteitscontrolesysteem binnen een ziekenhuislaboratorium is een belangrijk onderdeel voor het realiseren van o.a. valide patiëntenlaboratoriumuitslagen. Binnen de Gelre ziekenhuizen maken we momenteel gebruik van kwaliteitscontrole op drie verschillende locaties. Om dit goed te kunnen organiseren en controleren, moeten medewerkers voldoende overzicht hebben op en toegang hebben tot dit systeem. Momenteel worden de kwaliteitscontroles automatisch

verwerkt in het laboratoriuminformatiesysteem (Labosys), hetgeen optimaler en overzichtelijker kan. Het softwareprogramma QC OnCall biedt tal van opties om ons kwaliteitscontrolesysteem mogelijk te vereenvoudigen en gebruikersvriendelijker te maken. Ons primaire doel is om ons huidige kwaliteitscontrolesysteem te optimaliseren, zo nodig aangevuld met QC OnCall.

Methode: Het huidige kwaliteitscontrolesysteem wordt nauw-

keurig in kaart gebracht, waarna bekeken gaat worden waar in het huidige systeem aanpassingen kunnen plaatsvinden en waar QC OnCall (Bio-Rad) verbetering kan bieden. Onderdelen die hierbij een belangrijke rol spelen zijn: niveau van overzichten van kwaliteitshistorie van bepalingen, gebruik van Westgard-regels, statistiekmogelijkheden, alarmering ultrapathologie, validatie, etc.

Resultaat: Tussentijdse analyse van het kwaliteitscontrolesysteem en beoordeling van de functionaliteiten van QC OnCall wijzen er op dat het gebruik van QC OnCall een verrijking is voor het management. Overzichten van kwaliteitscontroles van verschillende locaties zijn sneller oproepbaar, overzichtelijker en beter interpreteerbaar, waarbij gebruik van verschil-

lende statistiekopties binnen het softwareprogramma de kwaliteit ten goede komt. Mogelijkheden bij het instellen van alarmering van ultrapathologie en validatie van resultaten met eenvoudig gebruik van Westgard-regels zijn groter en geven de gewenste flexibiliteit en dito overzicht. Resultaten aangaande gebruik van QC OnCall op verschillende locaties volgen.

Conclusie: Voorlopige resultaten laten zien dat QC OnCall een welkome aanvulling is voor ons kwaliteitscontrolesysteem qua overzicht, oproepbaarheid, gebruik van Westgard-regels en instellen en volgen van de validatiestappen.

Literatuur: www.qconcall.com

48. De toegevoegde waarde van externe audits door diagnosticaleveranciers

P.C.M. BARTELS, F.P.W. TEGELAERS, W.A.T. SLIEKER, M. SCHOORL

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

Inleiding: In het kader van naleving van de CCKL Praktijkrichtlijn worden planmatig interne en externe audits georganiseerd. Met het auditprogramma wordt beoogd om naleving van richtlijnen en protocollen nauwlettend te registreren, te evalueren en waar mogelijk verbetertrajecten te signaleren. Tevens wordt bij audits de werkzaamheid getoetst van het kwaliteitssysteem voor het onderhavige activiteitenpakket of onderdeel van de organisatie. Professionele expertise en een originele aanpak zijn essentiële randvoorwaarden om een optimaal rendement te realiseren. Doeltreffend kwaliteitsmanagement impliceert dat in een dergelijke situatie een verfrissende aanpak wordt gekozen. Externe oriëntatie bij het auditsysteem biedt additionele waarde. Aanvullend op de gebruikelijke externe collegiale toetsing door een team van collega-laboratoria kan de expertise van diagnosticaleveranciers in optima forma worden benut. Een auditteam van de industrie beschikt over specifieke vakkennis en competentie ten aanzien van product en proces en biedt daarmee een extra dimensie aan verbeterprocessen.

Methode: Vier leveranciers, Pharmacia Diagnostics, Goffin Meyvis, Beckman Coulter, Dade Behring, werden uitgenodigd om een audit op locatie uit te voeren. Na het verstrekken van de gespecificeerde schriftelijke opdracht werd door de betreffende firma een plan van aanpak opgesteld alsmede een programma t.b.v. de uitvoering van auditactiviteiten.

Resultaat: De audits hebben in alle gevallen geresulteerd in een concrete registratie van verbeterpunten, die met een geringe inspanning konden worden verbeterd. In een aantal gevallen werd een concreet voorstel gedaan voor eliminatie van zwakke schakels door middel van een verbetertraject.

Conclusie: Geconcludeerd wordt dat een audit een adequate structuur en nieuwe impulsen verschaft voor transfer van innovatieve kennis en expertise van leverancier naar cliënt en vice versa. Het systeem van externe audits door diagnosticaleveranciers biedt een significante toegevoegde waarde aan het optimaliseren van de keten tussen cliënt en leverancier.

Automatisering, dataverwerking

49. Digitaal registreren van transfusiereacties en incidenten in de transfusieketen

P. WETZER, M. PAANAKKER, E. van LITSENBURG, R. HOEDEMAKERS

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

Inleiding: Binnen het Jeroen Bosch Ziekenhuis wordt een verslag van elke transfusie gemeld middels een op de bloedzak aangehecht voorgedrukt transfusieverslagformulier, wat na elke transfusie wordt geretourneerd aan het laboratorium. Deze gegevens werden voorheen op papier beoordeeld en van relevante transfusiereacties werd een apart formulier ingevuld waarbij de procedure transfusiereacties werd opgestart. Tevens werden, indien van toepassing, de relevante gegevens aan TRIP en de bloedbank Sanquin gemeld. Onlangs is door een stafmedewerker Kwaliteit van het Laboratorium voor Klinische Chemie en Hematologie van het Jeroen Bosch Ziekenhuis voor de reguliere afhandeling van ideeën, klachten en afwijkingen binnen het laboratorium de softwaremodule MONIKA ontwikkeld, een digitale MONitoring van Ideeën, Klachten of Afwijkingen. Hier wordt binnen het laboratorium al geruime tijd met tevredenheid mee gewerkt.

Methode: Binnen het MONIKA-systeem is nu een pagina ont-

worpen voor de hemovigilantie: het digitaal registreren van transfusiereacties en andere incidenten binnen de transfusieketen.

Resultaat: Binnen deze module kunnen alle ongewenste incidenten binnen de gehele transfusieketen elektronisch geregistreerd worden. Het systeem stuurt de melder via een aantal voorgeprogrammeerde pagina's door het bestand, zodat alle relevante items uniform kunnen worden geregistreerd. Het systeem biedt de mogelijkheid de ondernomen acties of de nog te ondernemen acties vast te leggen. Tevens kan de melding direct via e-mail naar alle betrokkenen gestuurd worden.

Conclusie: Door middel van het elektronisch verwerken van de incidenten in de transfusieketen biedt MONIKA de hemovigilantieconsulent de mogelijkheid snel en gemakkelijk over de benodigde gegevens te beschikken en te extraheren voor eventuele gewenste statistiek.

Overigen

50. Lessen uit de Duitse klinische chemie

C.J.A. DOELMAN, J. HENS, J. FISCHER, G. HAAN, J.J. KEYSER
Commissie Bedrijfsvoering NVKC

Inleiding: De Nederlandse gezondheidszorg is sterk in beweging. Marktwerking wordt geïntroduceerd en ook de Europese grenzen gaan wat dit betreft open. Door concurrentie kan de kwaliteit verbeteren en kunnen de kosten worden verlaagd. Buitenlandse laboratoria waaronder Duitse zullen zich op de Nederlandse markt begeven en de concurrentie aangaan.

Methode: In een eerste aanzet tot een concurrentieanalyse hebben wij de belangrijkste verschillen tussen Nederlandse en Duitse laboratoria onderzocht en beschreven. De resultaten zijn belangrijke uitgangspunten voor de verdere ontwikkeling van onze eigen concurrentiepositie.

Resultaat: i) De financieringsstructuur. Duitse laboratoria zijn private ondernemingen. Er wordt per hoofd van de bevolking veel meer laboratoriumonderzoek gedaan dan in Nederland. Dit komt doordat de arts het onderzoek zelfstandig kan declareren. Als hij de kosten weet te reduceren kan er een aardig zakcentje verdiend worden. Hierdoor worden door de private laboratoria veel testen aangeboden tegen zeer lage prijzen. Toch zijn de kosten van laboratoriumdiagnostiek in Duitsland

hogere dan in Nederland (EDMA, 2003). ii) Schaalgrootte. Duitse laboratoria zijn groter. Deze schaalvergroting werkt kosteneffectiever, zeker wanneer dit bepalingen betreft, die minder worden aangevraagd. iii) Serviceniveau. De rapportagesnelheid van de Duitse laboratoria is veel hoger. Zelfs exotische bepalingen worden dagelijks uitgevoerd. iv) Kennismanagement. De kennisuitwisseling tussen de gebruikers van diagnostiek en de laboratoriumspecialisten is in Duitsland gering.

Conclusie: Uit de marktoriëntatie van laboratoria in Duitsland blijkt dat er evidente verschillen bestaan. Nederlandse laboratoria onderscheiden zich met name positief op het gebied van klinische consultatie ten opzichte van de Duitse concurrenten. Het verder verbeteren van deze succesfactor 'consultatie' kan de concurrentiepositie van Nederlandse laboratoria in de nabije toekomst voordeel opleveren.

Literatuur: EDMA (European Diagnostics Manufacturers Association). 2003. European IVD market estimates. Brussel, Belgium.

Categorie 3 Klinisch

Hart- en vaatziekten, atherosclerose

51. Homocysteine and the use of vitamins. Are we as healthy as we think we are?

J.M. PEKELHARING, J. VERZIJL
Reinier de Graaf Hospital Group, Delft, The Netherlands

Introduction: We wished to investigate the effect of vitamin use on the reference values for Homocysteine-associated parameters in a large cohort of healthy, working adults.

Methods: Nearly 300 hospital employees were asked to participate. Their year of birth, sex, and use of vitamin preparations were noted. Homocysteine (HCYS), Folic Acid (FA) and Vitamin B12 were measured using a Bayer Centaur analyser. HOLO-TC was measured with an experimental immunoassay (Axis-Shield) on an AXSYM analyser (Abbott). Results were processed using MS Excel and SPSS software.

Results: Elevated HCYS values were associated with lower FA values, lower B12 values and lower HOLO-TC values, as predicted. The 2.5-97.5% interval of Homocysteine in the vitamin-taking group (n=76) was 6.4-15.5 $\mu\text{mol/l}$. Only one person in this group had a value higher than 15.5 (22.2

$\mu\text{mol/l}$), this person was found to have an extremely low FA value of 2.7 nmol/l . Applying 15.5 as a cut-off value, 22% (45/223) of the so-called healthy persons not using vitamins were found to have unhealthy HCYS values. We calculated the 2.5% lower reference value for FA, B12 and HOLO-TC in the group vitamin non-users having HCYS values under 15.5 $\mu\text{mol/l}$: FA > 5.8 Vitamin B12 > 0.12 HOLO TC > 38.3

Conclusion: Nearly a quarter of the 'healthy' persons have elevated Homocysteine values that have shown by others to be associated with coronary artery disease, birth defects, thrombosis, cognitive decline and cancer. It could mean that we have digressed far from the diet and life style that we were designed for during the evolution. Our data seem to support the suggestion by others that every adult should take a daily vitamin pill.

52. Plasma heart-type fatty acid-binding protein is superior to troponin and myoglobin for rapid risk stratification in acute pulmonary embolism

M.M.A.L. PELSERS¹, A. KACZYNSKA², A. BOCHOWICZ², M. KOSTRUBIEC², J.F.C. GLATZ¹, P. PRUSZCZYK²
Department of Molecular Genetics¹, Maastricht University, The Netherlands, Department of Internal Medicine, Hypertension and Angiology², Medical University of Warsaw, Poland

Introduction: Irreversible right ventricular failure with ongoing myocardial damage may precipitate fatal outcome in acute pulmonary embolism (APE). Although elevated plasma troponin levels were found to predict fatal outcome, data on optimal risk stratification in APE are still limited. Cytoplasmic heart-type fatty acid binding protein (H-FABP) is a sensitive and specific biomarker of myocardial damage. We assessed which biomarker of myocardial damage or RV stretching is the most useful for short-term risk stratification in APE.

Methods: We analyzed 77 patients (51 F, 26 M) aged 65.3 \pm 16.0 yrs with confirmed APE. On admission, systemic blood pressure, 12-lead electrocardiography, transthoracic echocardi-

graphy and plasma concentrations of myoglobin (Mb), cardiac troponin T (cTnT), NT-proBNP and H-FABP were evaluated.

Results: 19,5% patients died and 31,2% experienced complicated clinical course (CCC). Plasma concentrations of all biomarkers were higher in non-survivors and in patients with CCC than in survivors and patients without CCC. Hazard ratio analysis demonstrated that plasma H-FABP, Mb, cTnT and NT-proBNP concentrations predicted fatal outcome. When only APE-related deaths were considered, plasma H-FABP concentrations indicated fatal outcome. Multivariate hazard ratio analysis revealed H-FABP as the only mortality predictor (HR 1,02 CI 95% 1,01- 1,05).

Conclusion: H-FABP measured on admission is useful for short-term risk stratification in APE. It appears to be superior to cTnT, NT-proBNP and Mb in the prediction of APE-related mortality.

Literature:

1. Kucher N et al. *Circulation* 2003;108:2191-2194.
2. Pelsers MM et al. *Clin Chim Acta* 2005;352:15-35.

53. The -588 C>T SNP in the human GCLM gene interacts with elevated homocysteine levels and increases the risk of venous thrombosis

S.G. HEIL¹, M. den HEIJER², B.J.M. van der RIJT-PISA¹, L.A.J. KLUIJTMANS¹, A.S. de VRIESE³, H.J. BLOM¹
Laboratory of Pediatrics and Neurology¹, Department of Internal Medicine², Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands, Renal Unit³, University Hospital Ghent, Ghent, Belgium

Introduction: Hyperhomocysteinemia (HHcy) is associated with increased risk of cardiovascular diseases. Recently, we identified a novel pathway in homocysteine toxicity as we demonstrated that the modifying subunit of glutamate-cysteine ligase (GCLM), the rate-limiting enzyme in glutathione synthesis, was up-regulated in aorta of rats fed a high methionine / low B vitamin diet. In humans a single-nucleotide polymorphism (SNP) in the promoter region of the GCLM gene (-588 C>T) has been reported, which reduces GCLM mRNA expression under conditions of ambient oxidative stress. We hypothesized that a hampered up-regulation of GCLM due to this -588 C>T SNP increases the risk of vascular diseases, in particular in the presence of oxidative conditions such as HHcy.

Methods: The -588 C>T SNP of the GCLM gene was genotyped by PCR followed by restriction-enzyme analysis in 170

cases with a history of recurrent venous thrombosis and 433 controls from the general population.

Results: The frequency of the -588 TT genotype was higher among recurrent venous thrombosis cases than controls, which led to a slightly increased risk of venous thrombosis (OR 1.33 [0.59-2.90]). Interestingly, interaction analysis demonstrated that this risk increased to more than 2-fold when also homocysteine levels were elevated (OR 2.55 [1.04-6.11]).

Conclusion: These findings show that the -588 C>T SNP of GCLM interacts with HHcy, which results in an increased risk of recurrent venous thrombosis. The results of this human study confirm the previously identified role of GCLM in homocysteine toxicity, and point to the involvement of oxidative stress.

54. Analytical and clinical performance of three B-type natriuretic peptide tests in the Emergency Room

C. GORISSEN¹, R. BAUMGARTEN², H. KRAGTEN³, M. LEERS²
Departments of Emergency Medicine¹, Clinical Chemistry² & Cardiology³, Atrium Medical Centre, Heerlen, The Netherlands

Introduction: Heart failure (CHF) is an increasingly common disease characterized by poor prognosis and quality of life. The earlier the disease is detected the better it can be treated and so improves disease-free life-expectancy. In recent years natriuretic peptides (ANP and BNP) have been introduced as an effective tool to detect ventricular dysfunction. The aim of our study is to evaluate the analytical and diagnostic performance of two different BNP tests and one NT-pro-BNP test in the diagnosis of CHF in the emergency department.

Methods: 90 patients (age 49-90) who visited the emergency department with acute dyspnoea as primary complaint were included. BNP was measured by a two-sided sandwich immunoassay test (Bayer Centaur) and a fluorescence immunoassay (Triage BNP test (Biosite)). NT-proBNP was measured by a commercially available immunoassay on E170 modular analytics system (Roche). Retrospectively both a cardiologist

and a lung specialist reviewed all patient charts. Receiver-operating characteristic curve analysis using Analyze-It software was performed for all three tests using the final diagnosis as reference standard.

Results: The determined intra- and interassay variation coefficient (cv) of the different tests was <10% for the BNP on the Bayer Centaur, <5% for the Roche Elecsys NT-proBNP and 16% for the Triage BNP test. ROC-analyses were performed for both the triage test and the centaur test. Both test showed to be highly sensitive and specific for the diagnosis of acute CHF.

Conclusion: These studies demonstrate the importance of NT-pro-BNP for the diagnosis and exclusion of CHF in dyspnoeic patients. Both sensitivity and specificity are high. Another important conclusion is the fact that an age stratification improves the diagnostic accuracy of NT-pro-BNP testing.

55. Cardiac troponin T degradation after acute myocardial infarction

E.C.H.J. MICHIJLSEN¹, J.H.C. DIRIS¹, W.TH. HERMENS², W.K.W.H. WODZIG¹, M. P. van DIEIJEN-VISSER¹
Department of Clinical Chemistry¹, University Hospital Maastricht, Cardiovascular Research Institute², Maastricht, The Netherlands

Introduction: Cardiac troponin T (cTnT) release after acute myocardial infarction (AMI) shows a characteristic biphasic change in the serum time concentration curve. Especially in patients with early reperfusion, a rapid initial rise of cTnT is followed by a delayed second peak. In the present study we investigated cTnT degradation at different time points after AMI.

Methods: Serum samples from 20 patients diagnosed with AMI were collected directly after admission at our hospital (0) and at 10, 13 and 46 hours and at 4 and 8 days thereafter. A highly sensitive immunoprecipitation procedure was then used, followed by Western blotting with a monoclonal anti-cTnT antibody, to detect intact cTnT and its fragments.

Results: Intact cTnT (37kDa) could only be detected within the first 10 hours after AMI. In some patients, a 25kDa fragment could be detected. At the peak cTnT concentration (reached around 13 hours), the number of fragments was 5±2 and the average molecular weight was 21.5±2.0kDa. After 8 days the number of fragments decreased to 3±2 (p=0.07) and the average molecular weight decreased to 15.9±3.5kDa (p<0.05). In vitro studies with purified human cTnT spiked into negative serum showed rapid cTnT degradation into comparable fragments ranging in size from 25 to 10kDa.

Conclusion: Only during the initial rapid release of cTnT in the first 13 hours, mainly the intact 37kDa protein was

detected. During the slow release phase, only smaller molecular weight fragments could be detected, and no intact cTnT. From both our in vivo and in vitro studies it can be concluded that intact cTnT is rapidly degraded into smaller fragments.

The current cTnT assay detects both intact cTnT and its fragments.

Literature: Michielsen et al. Clin Chem 2005;51:222-4.

56. Reference ranges and determinants of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine

R. de JONGE¹, R. de NOOIJER¹, H. van LENTHE², B. van ZELST¹, M. DURAN², W. KULIK², J. LINDEMANS¹
Department of Clinical Chemistry¹, Erasmus MC, Rotterdam, Departments of Clinical Chemistry and Pediatrics², Laboratory of Genetic Metabolic Diseases, Emma Childrens Hospital, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: The pathophysiology behind the association between hyperhomocysteinemia and (cardiovascular) disease might be better explained by increased S-adenosylhomocysteine (SAH) and a decreased S-adenosylmethionine (SAM)/SAH ratio, reflecting cellular hypomethylation. We determined reference ranges for SAM, SAH, and SAM/SAH and investigated determinants of these levels before and after methionine loading.

Methods: We took non-fasting blood of 100 (50 male, 50 female) healthy Caucasian blood bank donors. Furthermore, fasting and post-methionine (0.1 g/kg) blood samples of patients with a history of pre-eclampsia (n=44) were analysed for SAM and SAH (LC-MS/MS), homocysteine and vitamin B6 (HPLC), and folate and vitamin B12 (Roche E170 analyzer). Polymorphisms in folate-related genes were detected by PCR-RFLP.

Results: In healthy Caucasians (mean age 48±12 years), SAM (95% central range: male: 80-214 nmol/L; female: 66-128 nmol/L) and SAH (male: 15-31 nmol/L; female: 10-23 nmol/L)

were significantly lower in females whereas the SAM/SAH ratio was higher (male: 3.3-8.2; female: 3.8-8.8). Furthermore, SAH was higher (P=0.02) and SAM/SAH was lower (P=0.01) in female patients compared to healthy women. B-vitamin levels were unrelated to plasma SAM, SAH and SAM/SAH levels. MTHFR 677 TT was associated with increased fasting and post-load SAM (P=0.08 and P=0.01, respectively) and fasting SAH (P=0.008) and decreased fasting SAM/SAH (P=0.07). The TS 2R3R variant was associated with an increased post-load SAM/SAH ratio (P=0.009).

Conclusion: Gender differences exist for SAM, SAH and SAM/SAH and patients with a history of pre-eclampsia show increased SAH levels and decreased SAM/SAH ratios, possibly reflecting cellular hypomethylation. Polymorphisms in folate-related genes were related to SAM and SAH whereas B-vitamins were not. This may have implications for the efficacy of vitamin intervention trials aimed at reducing homocysteine and cardiovascular risk.

57. Is er een correlatie tussen significante coronaire sclerose en MBL-deficiëntie?

N.M. GOUDRIAAN¹, T.L. NJO¹, R. van MECHELEN², M. CASTRO-CABEZAS³, J.W. JANSSEN¹
Afd. Klinische Chemie¹, Cardiologie², Interne Geneeskunde³, St. Franciscus Gasthuis, Rotterdam

Inleiding: In de epidemiologische literatuur wordt gesuggereerd dat er een relatie bestaat tussen mannosebindend lectine (MBL) en arteriosclerose. Wij hebben onderzocht of de aanwezigheid van coronaire sclerose gecorreleerd is met de afwezigheid van MBL in het bloed.

Methode: 80 opeenvolgende patiënten, die een diagnostische hartkatheterisatie ondergingen, werden geïncludeerd. MBL-plasmawaarden en MBL-genotype werden bepaald in bloed van alle 80 deelnemers. De MBL-plasmawaarde werd vastgesteld met behulp van de human MBL elisa-kit (Sanquin, Amsterdam). Met PCR werden MBL-genotypen bepaald. Het wildtype is A/A en de gemuteerde B, C, en C genotype werden als A/0 en 0/0 genotypen aangemerkt.

Resultaat: De verdeling binnen de patiëntengroep (n=40) was als volgt: A/A 63%, A/0 32% en 0/0 5%. Dit komt ongeveer overeen met door anderen gerapporteerde verdelingen. De

MBL-plasmawaarde was gemiddeld 1843 ng/ml (SD=1560). De verdeling binnen de controlegroep (n=40) was: A/A 65%, A/0 30% en 0/0 5%. De MBL-plasmawaarde was gemiddeld 1650 ng/ml (SD=1653) (NS t.o.v. patiënten). Lage MBL-plasmawaarden werden gevonden bij patiënten met mutaties in het MBL-2-gen, en hoge MBL-plasmawaarden bij patiënten met wildtype A/A (ANOVA; p<0,001). Correlatiestatistiek liet een significante correlatie zien tussen MBL-concentraties en HDL-cholesterol.

Conclusie: Een significante correlatie werd gevonden tussen lage MBL-plasmawaarden en mutaties in het MBL-2-gen zoals door anderen eerder beschreven. Er moet echter geconcludeerd worden dat significante coronaire sclerose, aangetoond met diagnostische hartkatheterisatie, niet gecorreleerd is met MBL-deficiëntie in deze groep Nederlandse deelnemers. Het verband met HDL-cholesterol was onverwacht en nog niet verklaard.

58. Galectin-3 concentration strongly predicts 60 days mortality in CHF: a step towards a multimarker strategy in heart failure. Results from the ProBNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department (PRIDE) Study

J.A. BAKKER¹, R.R.J. van KIMMENADE², J.R. JANUZZI³, U.C. SHARMA², M.P. van DIEIJEN-VISSER¹, P.P.C.A. MENHEERE¹, Y.M. PINTO²

Dept. of Clinical Chemistry¹, Dept. of Cardiology², University Hospital Maastricht, The Netherlands, Cardiology Division³, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA

Introduction: Besides myocytes, other cell types in the myocardium also play a role in the progression of heart failure (HF). We have shown previously that activated cardiac macrophages produce galectin-3 (gal-3) in failure-prone, hypertrophied hearts, and locally administered gal-3 impairs cardiac function. We hypothesized that increased gal-3 levels indicate adverse cardiac inflammatory activity, increased myocardial remodelling, and thus may provide additional information in HF, along with already established markers of HF prognosis such as NT-proBNP.

Methods: Gal-3 concentrations were measured in serum of CHF subjects (n=600) enrolled in the PRIDE study, a prospective study of NT-proBNP testing in dyspnoeic emergency department patients. Gal-3 was measured using an ELISA method (Bendermed Systems, Vienna)

Results: Receiver operating characteristic (ROC) analysis for 60 day mortality showed an area under the curve (AUC) of 0.73 (p<0.0001), with an optimal cut-point of 9.42 ng/ml for Gal-3 while NT-proBNP had an AUC of 0.67 (p=0.008), with an optimal cut-point of 5562 pg/ml. Logistic regression showed

that concentrations of Gal-3 were the best independent predictor of 60 days mortality (OR 15.3, $p < 0.01$); the combination of Gal-3 and NT-proBNP testing identified a subgroup of patients at highest risk for death by 60 days (Log-rank $p = 0.003$).

Conclusion: Gal-3 is strongly prognostic in patients with acute CHF. Combining Gal-3 with NT-proBNP allowed the identifi-

cation of a subgroup of patients with both cardiac inflammatory activity and elevated wall stress, who may be at highest risk for mortality by 60 days. This multi-marker strategy identifies highest-risk patients deserving more intensive follow-up. This study was funded by the Nederlandse Hartstichting

59. Fatty Acid Binding Protein, a marker voor passagiere abdominale ischemie?

L. HOL¹, P. MENSINK², N. BORGHUIS-KOERTSHUIS¹, R.H. GEELKERKEN¹, A.B. HUISMAN¹, C.J.A. DOELMAN¹, J.G. KUSTERS², E.J. KUIPERS², J.J. KOLKMAN¹

Medisch Spectrum Twente¹, Enschede en Erasmus Medisch Centrum², Rotterdam

Inleiding: De diagnose ischemie bij patiënten met een verdenking op een gastrointestinale ischemie wordt gesteld met behulp van tonometrie van maag pCO₂. Tot op heden is in humane studies geen relatie tussen tonometrie en eindorgaanschade aangetoond. Uit dierproeven bleek dat fatty acid binding protein (intestinale subtype) een goede merker is voor vroege epitheliale schade in het maagdarmkanaal. In deze studie werd de relatie tussen intestinaal fatty acid binding protein en tonometrie onderzocht bij patiënten met chronische gastrointestinale ischemie.

Methodes: Patiënten verwezen met verdenking gastrointestinale ischemie en 6 gezonde vrijwilligers werden ingesloten. Allen ondergingen een 24 uren tonometrie meting en een abdominale echo en/of angiografie van de abdominale artieren. Voor en na een proefmaaltijd werd bloed afgenomen. I-FABP werd geana-

lyseerd met behulp van een ELISA-assay (HyCult biotechnology, Uden, NL)

Resultaat: Eenenvertig patiënten (12 M, 29 V), gemiddelde leeftijd 54 (22-85) jaar werden ingesloten. In 22 patiënten werd geen ischemie aangetoond. De baseline I-FABP is significant hoger in patiënten met gastrointestinale ischemie (119±25 pg/ml) dan in patiënten zonder gastrointestinale ischemie (53±21 pg/ml), evenals de I-FABP na een proefmaaltijd.

Conclusie: Epitheliale schade, zijnde verhoging van I-FABP spiegels, werd aangetoond bij tijdelijke en geringe ischemie na een proefmaaltijd. De verhoging van I-FABP van patiënten met abdominale ischemie voor een uitlokkende proefmaaltijd, maakt I-FABP een potentiële diagnostische merker voor abdominale ischemie.

60. Cobalamin status, homocysteïne remethylatie en risico van recurrende venose trombose

H. GELLEKINK¹, L.A.J. KLUIJTMANS¹, H.J. BLOM¹, M. den HEIJER^{2,3}

Laboratory of Paediatrics and Neurology¹, Department of Endocrinology², and Department of Epidemiology and Biostatistics³, Radboud University Nijmegen Medical Centre, The Netherlands

Introduction: Studies have shown that a disturbed homocysteïne and vitamin B12 (cobalamin) metabolism are associated with higher risk of venous thrombosis. Genetic variation in genes involved in vitamin B12 metabolism or maintenance of cobalamin (redox) status may modulate cellular processes and increase the risk of venous thrombosis. Methionine synthase reductase (MTRR) is involved in (re)activation of the methionine synthase-cobalamin complex, necessary for homocysteïne remethylatie.

Methods: We screened for the MTRR 66A>G variant using a heteroduplex-based technique and polyacrylamide gelelectrophoresis and assessed the effect on plasma total homocysteïne and related metabolites like vitamin B12, methylmalonic acid

(MMA) and folate in a case-control study on recurrent venous thrombosis (RVT).

Results: The MTRR 66A>G variant had no effect on tHcy, plasma vitamin B12, MMA and folate. The variant under study did not increase the risk of RVT. Low plasma vitamin B12 (<20th percentile) did not affect RVT risk. Interestingly, high plasma MMA (>80th percentile) increased the risk of RVT (OR 1.48 [0.97 to 2.25]) and an interactive effect for reduced intracellular B12 levels (MMA >80th percentile) and the MTRR66GG genotype was observed (OR 5.4 [95% CI 1.3 to 21.6]).

Conclusion: Our results suggest an interaction between high MMA and the MTRR 66GG genotype thereby increasing the risk of RVT.

61. Cardio- en neuroprotectie door ASA in combinatie met ibuprofen of diclofenac

M.P. SCHUIJT¹, H.W.H.A. FLEUREN², V. STEINE¹, E.J. VOLLAARD², M. de METZ¹

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Klinische Farmacie², Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen

Inleiding: Irreversible cyclo-oxygenase (COX)-1-remming door acetylsalicylzuur (ASA) is in de cardiologie en neurologie de gouden standaard voor profylaxe van trombotische aandoeningen. Hierbij wordt 30 mg ASA als laagst effectieve dosis beschouwd. Competitie van COX-1-remming door gelijktijdige inname van ASA met de specifieke, reversibele COX-1-inhibitor ibuprofen of diclofenac, zou het cardio- en neuroprotectief effect van ASA kunnen verlagen.

Methodes: Twaalf gezonde vrijwilligers (9 mannen, 3 vrouwen) ontvingen gedurende 1 week in een open, gerandomiseerde, cross-overstudie 1x daags 80 mg ASA wel of niet gecombineerd met 3x daags 800 mg ibuprofen of 2x daags 50 mg diclofenac. Voorafgaande aan alleen ASA 80 mg, werd 1 week ASA 30 mg gegeven. COX-1-inhibitie werd gemeten als percentage remming van serum-TXB₂-vorming in stolsbloed. TXB₂ werd bepaald met behulp van enzymimmunoassay. De gepaarde data

werden geanalyseerd met Wilcoxon 'signed rank' test.

Resultaat: De mediane basale TXB₂-concentratie vóór de interventies was 1003 nmol/l (bereik 559-2694 nmol/l), welke door ASA 30 mg gereduceerd werd met 90,1% (83,1-96,0%) en door ASA 80 mg met 97,7% (95,5-99,2%). Ibuprofen, respectievelijk diclofenac, reduceerde de basale TXB₂-concentratie met 89,8% (70,3-98,3%) en 44,4% (0-76,0%). In combinatie met ASA 80 mg, remde ibuprofen met 85,8% (76,8-95,1%) de basale TXB₂-concentratie significant minder dan ASA 30 mg. In combinatie met ASA 80 mg remde diclofenac de basale TXB₂-concentratie met 98,1% (97,2-98,9%).

Conclusie: Gelijktijdig inname van ASA 80 mg met diclofenac heeft geen invloed op het cardio- en neuroprotectief effect. Gelijktijdig inname van ASA 80 mg met ibuprofen geeft een verlaging van de COX-1-remming onder het niveau dat noodzakelijk is voor effectieve cardio- en neuroprotectie.

Endocrinologie en intermediaire stofwisseling

62. The majority of the pregnant women from non-European ethnic origin in the Netherlands and their new-born babies is (severely) vitamin D deficient

J.P.M. WIELDERS¹, P.D. van DORMAEL², F.A. WIJNBERG¹, M.J. DUK²

Department of Clinical Chemistry¹, Department of Obstetrics & Gynaecology², Meander Medical Centre, Amersfoort, the Netherlands

Introduction: In vitamin D deficiency specific symptoms like fatigue, muscle pain and weakness are often seen. Similar symptoms are common for pregnant women. Consequently, a vitamin D deficiency in pregnancy is easily overlooked and remains untreated. We determined the prevalence of vitamin D deficiency among pregnant women and their babies from non-European origin in comparison to a Dutch/ European group.

Methods: Calcidiol and calcium were determined in the 10th or 30th week of pregnancy in subsequent patients of Dutch/ European and non-European origin visiting the Obstetrics Department in a regional hospital (Amersfoort, the Netherlands) over a year. In addition cord blood samples were analysed from both baby groups. Severe vitamin D deficiency in adults and new-born babies is defined as calcidiol < 20 nmol/l and < 13 nmol/l, respectively.

Results: In 55% of 131 women of non-European origin

(mainly Turkish and Moroccan) a severe deficiency was found, while only 5% of 545 Dutch / west-European were severely deficient. For new-borns in cord blood a severe vitamin D deficiency was found for 54% of 81 neonates of non-European origin, while only 6% of 442 Dutch / west-European new-born baby's were severely deficient. Calcium levels were not significantly different between the groups studied.

Conclusion: Vitamin D deficiency is very common among pregnant women from non-European ethnic minorities. Since vitamin D deficiency mimics usual weakness and fatigue in pregnancy it remains unnoticed, preventing the beneficial supplementation for mother and child. Since the foetus is fully dependent on its mother for vitamin D, it will suffer from vitamin D deficiency as well. We advocate the need for screening pregnant women of risk groups for hypovitaminosis D.

63. Cetrorelix suppression test in the evaluation of postmenopausal androgen excess

K.M.T. de BRUYN¹, M.C.H. de MAN², H. de BOER²

Departments of Clinical Chemistry¹ and Internal Medicine², Rijnstate Hospital, Arnhem, The Netherlands

Introduction: Postmenopausal androgen excess with overt clinical manifestations is rare and, if present, usually due to androgen-secreting tumours of the adrenal or ovary. We describe a 76-year old patient referred for evaluation of hirsutism. The rapid onset of virilisation set the scene for a challenging diagnostic procedure to find the source of steroid overproduction.

Methods: The diagnostic workup included investigation of steroid hormones in blood, evaluation of pituitary function, ACTH stimulation test, dexamethasone suppression test, abdominal imaging examinations and finally cetrorelix suppression test.

Results: Initial measurements demonstrated grossly elevated total testosterone of 10.3 nmol/L accompanied by a normal SHBG, androstenedione of 30.0 nmol/L and 17-hydroxyprogesteron of 19.6 nmol/L. Oestradiol was 185 pmol/L, LH 19.5 U/L, FSH 28.0 U/L and cortisol 0.75 mmol/L. Non-classical congenital adrenal hypertrophy was excluded by an ACTH provocative test. A successful 5-day dexamethasone

suppression test did not decrease the androgen and 17-hydroxyprogesteron levels. Evidence was neither provided for ovary enlargement by abdominal ultrasound and CT scan, nor for active ovarian steroid hormone synthesis by I131-cholesterol scintigraphy. Finally, a 4-day suppression test was performed using the synthetic GnRH antagonist cetrorelix. Following suppression of LH and FSH, levels of testosterone, androstenedione and 17-hydroxyprogesterone declined rapidly.

Conclusion: Cetrorelix was a useful diagnostic tool in search for the source of excess androgen production in this postmenopausal woman. Plasma levels of testosterone, androstenedione, estradiol, 17-hydroxyprogesteron, FSH and LH all dropped within 1 day of administration, pointing to a gonadotrophin dependent ovarian origin of the increased steroid hormone synthesis. The patient underwent laparoscopic bilateral oophorectomy, after which LH, FSH, testosterone, androstenedione and 17-hydroxyprogesteron normalised. Pathological examination confirmed the presence of a tumour in the left ovary.

Bloedvorming, bloedstolling, transfusie

64. A combination of blood saving techniques results in a strong reduction of donor red cell transfusion

J.W.TH. LAHAYE¹, G.M.H. WOOLTHUIS², D. HARDEMAN³, G.J. de WILDE¹, C. WIJBENGA³, M. GOOS³, J. BAKKER²

Department of Anaesthesiology and Intensive Care¹, Department of Internal Medicine², Laboratory of Clinical Chemistry³, Antonius Hospital, Sneek, The Netherlands

Introduction: Blood transfusions are commonly used to neutralise major blood losses and to counter anaemia. Since 1999, several blood saving techniques have been introduced in our hospital to reduce the number of blood transfusion, resulting in a strong decrease in the number of blood transfusions.

Methods: In 2000 the following blood saving measures and techniques were introduced: 4,5,6-transfusion protocol, surgical damage control strategy, active patient temperature control, and cell salvage. In 2001, by organising a symposium, the awareness on the subject of blood management was increased. In 2003, preoperative epoetin alfa treatment was started for patients for total hip/knee surgery and since 2004 also in the major oncological surgery.

Results: The total use of RBC decreased 42 % from 3884 to

2270 units in the period 1999-2004, notwithstanding a 37 % increase in the number of operations from 6473 to 8891. The RBC use per specialist decreased, as well as the RBC use per patient, which decreased by 64 %. A strong decrease in the RBC use for hip/knee replacement surgery was obtained, resulting in a drop of 81 % from 2.0 to 0.37 units per patient. For hip/knee prosthetic surgery, introduction of these techniques has turned out to be save, at least not leading to an increase in postoperative prosthetic infections.

Conclusion: Introduction of blood saving measures and techniques has over several years turned out to be very successful in reducing the overall amount of blood transfusions, despite an increase in the number of operations during the same period.

65. Drug-induced thrombocytopenia: a population-based case-control study

M.J. ten BERG^{1,2}, A. HUISMAN², P.C. SOUVEREIN¹, A.F.A.M. SCHOBEN^{1,4}, A.C.G. EGBERTS^{1,3}, W.W. van SOLINGE^{1,2}, P.M.L.A. van den BEMT^{1,3}

Department of Pharmacoepidemiology and Pharmacotherapy¹, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Utrecht University, Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine², University Medical Center Utrecht, Hospital Pharmacy Midden-Brabant³, TweeSteden Hospital and St. Elisabeth Hospital, Tilburg, Hospital Pharmacy⁴, University Medical Centre Utrecht, The Netherlands

Introduction: Drug-induced immune thrombocytopenia, excluding heparin-induced thrombocytopenia, is a rare adverse drug reaction for which the evidence about frequency and risk factors mainly originates from case reports and case studies. This study aimed to assess the strength of the association between exposure to drugs for which it has been reported and thrombocytopenia.

Methods: A case-control study was conducted within the Dutch PHARMO Record Linkage System, comprising pharmacy records linked to hospital admission data. Cases were defined as patients hospitalised for thrombocytopenia in the period 1990-2002. For each case, up to 4 controls were matched on age, gender, residential area and date of hospitalisation. Exposure on the index date to anticonvulsants, beta-lactam antibiotics, cinchona alkaloids, DMARDs, diuretics, NSAIDs, sulfonamide antibiotics and tuberculostatics was assessed and categorized into mutually exclusive groups of current, recent, past, and non-

use. The strength of the association was estimated with multivariate conditional logistic regression analysis.

Results: The study population comprised 705 cases and 2,658 controls. Current use of beta-lactam antibiotics was associated with an increased risk for thrombocytopenia (Odds ratio 7.4, 95%-confidence interval 1.8-29.6). Increased risk estimates, however not significant, were found for current exposure to DMARDs and trimethoprim-sulfamethoxazole. No increased risk was found for anticonvulsants, cinchona alkaloids, diuretics, NSAIDs and tuberculostatics.

Conclusion: More evidence for an increased risk for thrombocytopenia in current use of beta-lactam antibiotics in the general population was provided. The expected increase in risk could not be confirmed for the other drugs investigated, possibly due to limited statistical power. Availability of routine laboratory data could improve the assessment of the risk for drug-induced immune thrombocytopenia in the general population.

66. The diagnosis and the estimated incidence of heparin-induced thrombocytopenia in the critically ill according to ISTH SSC criteria

J.P.J. WESTER¹, A. LEYTE², L. PORCELIJN³, K. LO², R.J. BOSMAN¹, H.M. OUDEMANS-van STRAATEN¹, J.I. van der SPOEL¹, D.F. ZANDSTRA¹

Department of Intensive Care¹, Department of Haematology and Clinical Chemistry², Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam, Sanquin³, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: The diagnosis HIT in critically ill patients is difficult due to multiple causes for thrombocytopenia. As a consequence its incidence is not known. We evaluated the diagnosis according to recently developed diagnostic scoring systems by the ISTH using the combination of clinical criteria and laboratory testing.

Methods: Prospective observational study in a 18-bed tertiary referral general ICU from January-February 2004. We defined thrombocytopenia as <100 G/l measured at least twice and persisting for >24 hours. All patients admitted >36 hours were tested for anti-heparin/platelet factor 4 antibodies (ELISA) at day 3, 6, 10 and 15. Pre-test probability scores according to Warkentin (SSC Birmingham 2003) were calculated at day 3, 6, 10 and 15. Finally, the diagnostic classification score according to Chong (SSC Paris 2001) was calculated.

Results: We investigated 43 patients (26 men, 17 women; age

67.0 ± 13.8 ys, APACHE II scores 25.9 ± 7.9 points). Thrombocytopenia developed in 17/43 patients (39.5%). The pre-test probability was calculated as low in 32, intermediate in 9 and high in 2 patients. Positive HIT-antibodies were found in 7/43 patients (16.3%); 5 in the pre-test probability category low, 2 in the category intermediate, resulting in a possible diagnosis of HIT in 2/43 patients (4.7%). The final diagnostic classification rendered HIT unlikely in 33/43 patients (76.7%) (2 with positive tests), possible in 7/43 patients (16.3%) (5 with positive tests), probable in 3/43 patients (7.0%) and definitive in 0/43 patients (0%).

Conclusion: In critically ill patients, the incidence of probable or definitive HIT according to the ISTH SSC criteria is between 0-7%. The discrepancy between clinical criteria and ELISA results is large. We advocate a special focus on these patients.

67. Platelet activation and serotonin release during treatment with haemodialysis

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

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

Introduction: Platelet activation is initiated when platelets contact nonphysiological surfaces like dialyser membranes. Platelet activation is dependent from characteristics of membranes, such as permeability and chemical composition. Platelet interaction with dialysis membrane may result in release of platelet activation factors. Platelet factor-4 (PF4) from α -granulae and serotonin from dense-granulae are markers which are indicative for platelet activation. Release can be monitored in order to assess biocompatibility in case of extracorporeal blood treatment.

Methods: Changes in PF4 and serotonin concentrations during haemodialysis (HD) are monitored. Ten subjects are dialysed with a high-flux polysulphone® membrane F-60 using Fragmin® or tri-sodiumcitrate as anticoagulant. Blood samples are

collected on t=0, t=5 and t=150 min.

Results: Application of Fragmin® resulted in an immediate increase of PF4 from 9±4 kIU/L (mean±SD) at t=0 to 101±19 kIU/L at t=5 min. At t=150 min. PF4 concentrations returned to 30±27 kIU/L. Platelet rich plasma (PRP) serotonin amounted to 1528±1056 nMol/109 platelets at t=0 and 1556±1125 nMol/109 platelets at t=150 min. Although serotonin in PRP is slightly decreased to 1216±818 nMol/109 platelets at t=5 min. additional release of serotonin in platelet poor plasma (PPP) could not be detected. During citrate dialyse a steady increase of PF4 concentrations from t=0 till t=150 min. was observed, whereas serotonin in PRP and PPP remain at the initial level. In HD subjects serotonin levels in PRP are obviously decreased if compared with healthy subjects (3465±1130 nMol/109

platelets). Serotonin levels in PPP are increased (142 ± 45 respectively 57 ± 11 nMol/L). Decreased levels of serotonin in platelets might demonstrate diminished synthesis of serotonin due to renal failure.

Conclusion: It is concluded that release of platelet activation factors occur more easily from γ -granulae than from dense granulae.

68. Prevention of amputation by autologous stem cell transplantation in patients with end stage chronic limb ischaemia

R.H. GEELKERKEN, J. SLOMP, T. KAHRAMAN, W. KRUIJER, M. de GROOT, D.W. GRIJPMAN, H. WEEKAMP, W. STEENBERGEN, J. FEIJEN, I. VERMES.

Medisch Spectrum Twente, Enschede and the Biomedical Technological Institute of the University of Twente, Enschede, The Netherlands

Introduction: Critical chronic limb ischemia is manifested by pain at rest and nonhealing feet ulcers. Compared with amputation, revascularization is more cost-effective and is associated with better prognosis. Therefore limb preservation should be the goal in patients with critical limb ischemia. We encountered the possibility of vasculogenesis induced by hematopoietic stem cells (1) in patients with progressive ischemic leg ulcers without vascular reconstructive options. The aim of the study was to establish the feasibility and the safety of the treatment.

Methods: Under anesthesia, 800 ml of bone marrow was aspirated from the os ileum. The mononuclear fraction was sorted and the volume was reduced until 60 ml. Cells were injected into the ipsilateral gastrocnemius or soleus muscles on 40 different places. The major clinical endpoints were mortality, complications, amputations and woundhealing. Furthermore, selective angiography to determine vasculogenesis was performed after 1, 6 and 12 months.

Results: Nine patients (7 men, age between 46 and 84 years) were included until now. Six of them were diabetics. The follow-up is between 20 and 1 months. There were no therapy related complications. There were two major amputations necessary. One patient underwent a forefoot amputation for pre-existent necrosis of the toes. Complete woundhealing was observed in 3 patients after 5, 6 and 6 months. Evident vasculogenesis was shown in 1 patient in the 6 and 12 month angiography.

Conclusion: In conclusion, autologous transplantation of hematopoietic stem cells is a feasible and safe treatment in patients with progressive ischemic ulcers of the leg without vascular reconstructive options. Although this is an open study the initial clinical results are promising.

Literature: 1. Tateishi-Yuyama et al. Lancet 2002;360:427-435.

69. Automated result interpretation in anemia testing using artificial neural networks

J. van de VEN, M.G. SCHOORL, P.C.M. BARTELS

Dept. Clinical Chemistry, Haematology and Immunology, Medical Centre Alkmaar, The Netherlands

Introduction: Artificial neural networks (ANNs) can be applied in complicated classification tasks, and have been used in medical decision making. In our laboratory, anemia test results that are ordered by general practitioners are routinely complemented with a human assigned classification code according to the most probable causes of anemia. In this study, we explored the potential of ANNs to learn this particular task.

Methods: We used a standard feed-forward back-propagation ANN model with two hidden layers, available as Excel implementation¹. Input parameters included: age, sex, ESR, zinc protoporphyrin, Hb, RBC, MCV, MCH, RDW-SD, neutrophilic granulocytes, IRF and reticulocytes (Sysmex XE-2100). Output parameters included: iron deficiency, thalassemia, infection, blood loss, pregnancy and deficient erythropoiesis. Separate ANNs were employed in parallel for each class. ANNs were educated with a training dataset (n=649) using a validation set (n=115) to check for possible overtraining. Candidate ANNs with the lowest training- and validation error

rate were selected, and feeded with an evaluation dataset (n=174). For each class, ANNs with the most favorable sensitivity and specificity were evaluated for the acceptability of their output.

Results: Selected ANNs generally had moderate sensitivity (ranging from 50-85%) and good specificity (80-99%). For 21% of anemia classifications, the ANN's output deviated from the human-made classification. With regard to the deviations, 16% (3% of total) were considered critical errors as subjectively judged by an experienced clinical chemist.

Conclusion: The moderate sensitivity and high specificity implicate that ANNs resulting from this particular approach are conservative in detecting an anemia cause, which may be desirable. Resulting errors are mostly acceptable. We conclude that the use of ANNs in anemia classification in a laboratory setting is feasible.

Literature: Saha, A. <http://us.geocities.com/adotsaha/NNinExcel.html>

70. Verworven thalassemie bij myelodysplasie

A.K. BOER¹, M.C.J.C. LEGDEUR², J. SLOMP¹

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Afdeling Hematologie², Medisch Spectrum Twente, Enschede

Inleiding: Afwijkingen in de hemoglobinesynthese zijn over het algemeen erfelijk, maar kunnen ook secundair voorkomen bij hematologische ziekten. Een verworven alfa-thalassemie wordt daarbij meestal waargenomen bij MDS. De reeds opgehelderde mechanismen gaan ofwel uit van een verworven deletie van het alfa-globinegencluster, ofwel van inactiverende somatische mutaties van de 'trans-acting chromatin-associated factor' ATRX. Beide mechanismen resulteren in een ernstig verlaagde expressie van alfa-globine. Ondanks het feit dat onderzoek naar deze deleties complex is, willen we aan de hand

van een casus laten zien dat juist eenvoudige bepalingen je op het spoor kunnen zetten van een verworven alfa-thalassemie.

Method: Vier jaar geleden werd een destijds 69-jarige bakker verwezen naar de internist in verband met ernstige diarree. Bij 'toeval' werd een trombocytopenie geconstateerd. Aanvankelijk werd gedacht aan een milde auto-immuungemedieerde trombocytopenie, maar dit kon niet worden bevestigd. In het beenmerg werden echter wel aanwezig gevonden voor myelodysplasie. Aangezien de patiënt geen bijbehorende klachten had, werd deze vervolgd. Twee jaar later werd de patiënt opgenomen met een

ernstige anemie en werd de diagnose MDS gesteld. Opmerkelijk was dat het MCV in die twee jaar geleidelijk was gedaald van 93 naar 81 fl (in de afwezigheid van ijzeregebrek).

Resultaat: Aangezien MDS vaak gepaard gaat met een meer macrocytair bloedbeeld en er specifieke afwijkingen in het rode bloedbeeld werden gezien, werd de mogelijkheid van een verworven alfa-thalassemie overwogen. Met een verlengde reticulocytenkleuring werden HbH-insluitels in de erythrocyten

(golfballen) gevonden, waarmee de alfa-thalassemie werd bevestigd.

Conclusie: Een verworven alfa-thalassemie is niet alleen een interessante laboratoriumbevinding (golfballen), maar heeft ook belangrijke klinische implicaties. Specifieke afwijkingen in het rode bloedbeeld en een laag/dalend MCV bij een MDS-patiënt, zijn derhalve belangrijke aanwijzingen voor een verworven alfa-thalassemie.

71. Het voorkomen van onnodige bloedtransfusies door het volgen van de Groningse 4-5-6 Flexinorm

I. WALSH¹, E. van LITSENBURG¹, L. CORNELISSEN¹, W. van de VEN², S. JANSSEN³, B. PIJLMAN⁴, K. BOSSCHA⁵

Laboratorium voor Klinische Chemie en Hematologie¹, Cluster Kwaliteit en Organisatie², Jeroen Bosch Ziekenhuis, 's Hertogenbosch, Kwaliteitsinstituut voor de Gezondheidszorg CBO³, Afdeling Verloskunde/Gynaecologie⁴, Afdeling Chirurgie⁵, Jeroen Bosch Ziekenhuis, s-Hertogenbosch

Inleiding: In het JBZ, locatie Grootziekenhuis, werd door middel van een samenwerkingsproject tussen het laboratorium en de klinische afdelingen algemene chirurgie en verloskunde/gynaecologie, het aantal onnodige postoperatieve en post-partum bloedtransfusies met ongeveer 80% verminderd.

Methode: Het invoeren van de 4-5-6 Flexinorm voor bloedtransfusie werd tot een kwaliteitsproject benoemd dat deel uitmaakte van het Doorbraakproject Medicatieveiligheid II van het CBO. 1. Nulmeting in de periode 1-2 t/m 30-6 2003. 2. Interventies: Uitleg aan betrokkenen, het verspreiden van zakkaartjes en posters met de 4-5-6 Flexinorm en ASA-criteria en van een aangepast bloedbestelformulier, terugkoppeling vanuit het bloedtransfusielaboratorium van een wekelijks transfusie-overzicht op patientennaam. 3. Resultaatmeting in de periode 1-7 t/m 31-10 2003. Voor de metingen werd aan de hand van de hemoglobineconcentratie bij ontslag en enkele klinische gegevens een inschatting gemaakt van de noodzaak van iedere transfusiegebeurtenis (1 of meerdere eenheden), getoetst aan de 4-5-6 Flexinorm.

Resultaat: Gemiddeld, werd er tijdens de periode van de resultaatmeting vergeleken met de nulmeting, een daling van 73% (chirurgie) en 85% (verloskunde/gynaecologie) in het aantal onnodige transfusies gemeten. Er was een totale vermindering van het bloedverbruik van 207 eenheden (42%) vergeleken met dezelfde periode in 2002. In juli 2004 werd de meting herhaald, waaruit bleek dat er een blijvende verandering in het transfusiebeleid was. Een daling van ongeveer 40% in het bloedverbruik was ook waarneembaar in het hele jaar na het invoeren van de interventies vergeleken met het hele jaar daarvoor.

Conclusie: In een korte periode werd het transfusiebeleid op een klinische afdeling blijvend veranderd door een projectmatige aanpak, gekenmerkt door goede voorlichting, intensieve contacten, continue terugkoppeling van bloedverbruik naar de voorschrijvende artsen en continue aandacht van de artsen voor hun transfusiegedrag.

Infectie, afweer, allergie

72. Ontstekings- en spierschadeparameters bij (minimaal-)invasieve totale heupvervangning

J. ten KATE¹, P. PILOT², B. KERENS², N.P. KORT², A.D. VERBURG², W.F. DRAIJER², W.A. BUURMAN³, R.G.T. GEESINK⁴, H. KUIPERS⁵

Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium¹, Orthopedie², Maaslandziekenhuis, Sittard, Algemene Heelkunde³, Orthopedie⁴, Bewegingswetenschappen⁵, AZM/UM, Maastricht

Inleiding: Minimaal-invasieve chirurgie (MIS) bij totale heupvervangning zou minder traumatisch zijn. Wij onderzochten of bij de anterieure MIS minder inflammatie en spierschade optrad dan bij een conventionele posterolaterale (PL) benadering.

Methode: Een inflammatieparameter (IL-6), een spierschadeparameter (H-FABP) en Hb-waardes werden preoperatief gemeten en op 5 tijdstippen postoperatief bij 10 patiënten die middels MIS werden geopereerd en vergeleken met 10 PL-benaderde patiënten.

Resultaat: De IL-6-concentratie steeg gemiddeld van 3 pg/ml preoperatief voor beiden naar 65 (PL) vs. 60 (MIS) pg/ml 4 uur postoperatief en bereikte een top van 121 vs. 100 pg/ml na 24 uur respectievelijk waarna beiden daalden. De H-FABP-

concentratie steeg gemiddeld van 2 µg/l preoperatief voor beiden naar 10 (PL) vs. 13 (MIS) µg/l 4 uur postoperatief. Een plateau fase ontstond tot 24 uur postoperatief waarna beide daalden. De Hb-waarde bedroeg 14,5 g/dl preoperatief en daalde tot 10,7 en 10,0 g/dl 72 uur postoperatief.

Conclusie: We zagen geen significant verschil in inflammatie en spierschade tussen beide benaderingswijzen. Ook wordt een grotere Hb-daling postoperatief gezien bij MIS. Een mogelijke verklaring hiervoor is de langere operatieduur. Alhoewel er een 'learning curve' aanwezig kan zijn, denken wij dat dit niet het afwezig zijn van een verschil kan verklaren. Wij geloven dat de term minimaal-invasieve chirurgie op zijn minst twijfelachtig genoemd mag worden. Meer onderzoek moet de waarde van MIS bepalen.

73. Het gebruik van verschillende infectieparameters bij het uitsluiten van neonatale sepsis

T. BRUIN¹, J. van der WEIDE¹, M. van LEEUWEN¹, W. PEELLEN², K.J. OOSTERHUIS², M. FICK², J. HAGENDOORN²

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Afdeling Kindergeneeskunde², St. Jansdal Ziekenhuis, Harderwijk

Inleiding: De keuze van parameters om neonatale sepsis (NS) aan te tonen of uit te sluiten is punt van discussie. Veelal wordt gebruik gemaakt van de CRP-concentratie in combinatie met

staafkernige granulocyten. De telling van staafkernige granulocyten buiten kantooruren is echter minder gewenst, en mede gezien de relatieve onnauwkeurigheid van de telling is gezocht

naar alternatieven. De alternatieven die wij hebben onderzocht zijn de meting van IL-6 en de meting van onrijpe granulocyten op de Sysmex XE-2100 hematologieanalyser.

Method: Bij 103 pasgeborenen met risico op het ontwikkelen van NS is, naast de telling van staafkernige granulocyten en de meting van CRP, IL-6 gemeten en is het percentage onrijpe granulocyten (IG) op de Sysmex XE-2100 bepaald. Vervolgens zijn sensitiviteit en specificiteit van de verschillende testen berekend.

Resultaat: De sensitiviteit en specificiteit van de afzonderlijke testen zijn vrij laag (staafkernige granulocyten > 3%: sens/spec = 50/88%, CRP > 5 mg/l: sens/spec = 63/70%, IL-6 > 40 pg/ml: sens/spec = 74/87%, IG > 1%: sens/spec = 35/31%). De speci-

ficeit kan aanzienlijk verhoogd worden door de combinatie van 2 testen (staafkernige granulocyten > 3% én CRP > 5 mg/l: spec = 98%, CRP > 5 mg/l én IL-6 > 40 pg/ml: spec = 99%).

Conclusie: De bepaling van afzonderlijke laboratoriumtesten voor het aantonen of uitsluiten van NS is onvoldoende. De combinatie van 2 verschillende laboratoriumtesten (CRP + staafk. granulocyten of CRP + IL-6) verhoogt de specificiteit sterk en kan dus goed gebruikt worden voor het uitsluiten van neonatale sepsis. In een setting waar buiten kantooruren neonatale sepsis mede m.b.v. laboratoriumdiagnostiek moet kunnen worden uitgesloten, is de bepaling van de combinatie van IL-6 met CRP te prefereren boven de combinatie met staafkernige granulocyten.

74. Imbalance of lymphocyte apoptosis in children with Down syndrome.

Y.C.M. de HINGH¹, E.F.A. GEMEN¹, P.W. van der VOSSSEN^{2,3}, N.W.M. RUNDERKAMP¹, E. de VRIES², A.B. MULDER¹

Departments of Clinical Chemistry¹ and Pediatrics², Jeroen Bosch Hospital, 's-Hertogenbosch, Department of Pediatrics³, Rijnstate Hospital, Arnhem, The Netherlands

Introduction: Children with Down syndrome (DS) show an increased frequency of infections, hematological malignancies and autoimmune diseases. In the literature, thymic dysregulation, T-lymphocytopenia and impaired T-lymphocyte function have been associated with DS. Recently, we have found a striking B-lymphocytopenia in these children (de Hingh et al. 2005). Because subpopulations of peripheral blood lymphocytes are reported to have different sensitivities to apoptosis in immune disorders, we postulated that increased apoptosis might play a role in the B-lymphocytopenia we observed in DS children.

Methods: Apoptosis was induced by incubating isolated blood lymphocytes in the presence of serum for 16 hr at 37°C. Of 34 DS children, apoptosis was estimated in peripheral blood lymphocyte subpopulations, by using a multi-color flowcytometry method, which measures annexin-V binding to phosphatidyl serine and propidium iodide-binding to DNA.

Results: The relative number of B-lymphocytes was signifi-

cantly decreased after culture. In accordance with these data, a significantly ($p < 0.01$) higher percentage of CD19+ B lymphocytes was apoptotic (mean +/- SD: 69 +/- 24%) as compared with CD3+ T lymphocytes (27 +/- 23%) and CD3-/CD (16+56)+ Natural Killer cells (29 +/- 23%). It further appeared that the CD4+ T-helper lymphocytes were significantly ($p < 0.05$) less sensitive to apoptosis (17 +/- 16%) as compared with the CD8+ T-suppressor/cytotoxic lymphocytes (36 +/- 23%) and the CD3+/CD(16+56)+ MHC-unrestricted cytotoxic T-lymphocytes (60 +/- 26%).

Conclusion: We observed an imbalance in the susceptibility of T and B-lymphocytes for apoptosis in DS children: B-lymphocytes were found to have an increased sensitivity to apoptosis that might be causally related to the observed B-lymphocytopenia. Additionally, the lower sensitivity to apoptosis of the T-helper lymphocytes may play a role in the impaired T-cell function found in DS.

Lever- en darmpathologie

75. The pharmacokinetic effect of discontinuation of mesalamine on 6-mercaptopurine metabolite levels in IBD patients

L.P.L. GILISSEN¹, J. BIERAU², L.J.J. DERIJKS³, L.P. BOS⁴, P.M. HOOYMANS⁵, A.H. van GENNIP², R.W. STOCKBRÜGGER¹, L.G.J.B. ENGELS⁴

Depts. of Internal Medicine and Gastroenterology¹ and Clinical Genetics², Academic Hospital Maastricht, Maastricht. Dept. of Clinical Pharmacy³, Maxima Medical Centre, Veldhoven. Depts. of Gastroenterology⁴ and Clinical Pharmacy⁵, Maasland Hospital, Sittard, the Netherlands.

Introduction: Mesalamine (5ASA) and 6-mercaptopurine (6MP) are widely used in inflammatory bowel disease (IBD). In vitro studies suggest inhibition of thiopurine methyltransferase (TPMT) by 5ASA influencing the balance between hepatotoxic 6MMP and immunosuppressive 6TGN metabolites.

Methods: A prospective in vivo interaction study was performed using the combination of 6MP and 5ASA. All patients (n=17) were in remission at inclusion. 6MMPR and 6TGN concentrations and TPMT activity were measured at baseline (t = 0), 4 weeks after discontinuation (t = 4) and 4 weeks after reintroduction of 5ASA (t = 8). 6MP was continued during the study interval.

Results: Mean 6MP and 5ASA doses were 0.78 and 43 mg/kg. Mean 6TGN levels were 262 (t=0), 209 (t=4) and 270 (t=8) pmol/8 x 108 RBC and were significantly lower at t = 4 than t

= 0 and 8 ($p < 0.01$). Mean 6MMPR levels were 1422 (t=0), 2149 (t=4) and 1503 (t=8) pmol/8 x 108 RBC at t = 0, 4 and 8. Mean 6MMPR/6TGN ratio was 6.3 at baseline, increasing significantly ($p = 0.04$) to 11.2 (t = 4) and decreasing ($p = 0.07$) to 6.2 (t = 8). Mean TPMT activity was 0.58 pmol/106 RBC at baseline and remained unchanged during the study interval. No correlations were found between 6MMPR and 6TGN levels and with 6MP/5ASA dose. However, 5ASA/6MP dose ratio correlated with 6TGN levels.

Conclusion: Significant higher levels of 6TGN were found during combination therapy of 5ASA and 6MP. 5ASA seems to inhibit TPMT activity, leading to increased 6TGN levels: probably 5ASA in vivo potentiates 6MP efficacy by improving the 6MMPR/6TGN ratio and may be an alternative indication for 5ASA in treatment of IBD.

76. Diagnostic value of measuring disaccharidase activities in duodenal biopsies of children

Y.B. de RIJKE¹, G.P. KOELEWIJN¹, J. BOUQUET²

Depts. of Clinical Chemistry¹, Gastroenterology², Erasmus MC-Sophia Children's Hospital, Rotterdam, The Netherlands

Introduction: Endoscopically obtained duodenal biopsy specimens with normal histology from 181 children suspected of malabsorption were used to establish reference ranges for lactase, maltase, isomaltase and sucrase and were compared with biopsies of 143 children with (sub)total villous atrophy. The disaccharidase measurement is time-consuming and thus costly. We aimed to establish the additional diagnostic value.

Methods: The histological and disaccharidase results of consecutively collected duodenal biopsies in 4 years were reviewed retrospectively and results were divided into 3 histologically separate groups: I normal (n=181), II subtotal (n=63) and III total villous atrophy (n=80). Disaccharidase assays were performed by Dahlqvist's method and expressed as U/g protein. Patients with an isolated disaccharidase deficiency were excluded from the data analysis.

Results: The reference range (95% confidence interval) in group I were 31 to 135 (median 73) for isomaltase; 11 to 62 (median 29) for lactase; 64 to 351 (median 171) for maltase and 24 to 146 (median 69) for sucrase. All disaccharidase activities in biopsies with (sub)total villous atrophy were statistically significantly lower compared to biopsies with normal histology ($p < 0.05$). ROC curves were performed with area under the curve for isomaltase, lactase, maltase and sucrase of 0.966, 0.987, 0.952 and 0.943, respectively.

Conclusion: Measuring disaccharidase activities in biopsies that show (sub)villous atrophy does not add clinically significant information. There is only an indication for the routine measurement of the disaccharidase activity in patients with normal histology and where selective enzyme deficiency is suspected. A considerable reduction of diagnostic costs can be achieved.

Nierziekten

77. Creatinineklaring: 24 uurs verzameling vergeleken met Cockcroft-Gault en MDRD

K. MOHRMANN, I.M.L.W. KEULARTS, J.W. JANSSEN, M.H. BEUNIS

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Sint Franciscus Gasthuis, Rotterdam

Inleiding: Aan de creatinine op basis van een 24-uursurineverzameling kleeft een aantal nadelen. Daarom bestaat in ons ziekenhuis de vraag naar een berekende klaring volgens Cockcroft-Gault. Verschillende richtlijnen adviseren echter de 4-v-MDRD-formule. In een retrospectieve studie zijn 24-uurscreatinineklaringen vergeleken met berekende klaringen volgens de Cockcroft-Gault- en de 4-v-MDRD-formule.

Method: De uitslagen van 24-uurs creatinineklaringen zijn verzameld voor een periode van 6 maanden. Van een groep patiënten is lengte en gewicht hierbij gezocht (n=300). Met behulp van de Cockcroft-Gault- en de 4v-MDRD-formule is de klaring berekend op basis van de plasmacreatinineconcentratie. Voor een juiste vergelijking wordt de Cockcroft-Gault-formule vergeleken met niet-genormaliseerde 24-uurscreatinineklaringen (beide in ml/min), de 4-v-MDRD-formule met 24-uurs-genormaliseerde creatinineklaringen (beide in ml/min/1,73 m²). In het lage gebied (klaringen <90 ml/min (1,73 m²)) is met behulp van orthogonale

regressie de regressielijn voor beide groepen berekend.

Resultaat: Vergelijking van genormaliseerde 24-uurscreatinineklaringen (X1) met de 4-v-MDRD-formule (Y1) geeft de lijn $Y1 = 0,916 (s.d.=0,034) * X1 - 0,364 (s.d.=1,886)$, met een correlatiecoëfficiënt van 0,89. Vergelijking van de 24-uurscreatinineklaringen (X2) met de Cockcroft-Gault-formule (Y2) geeft de lijn $Y2 = 0,909 (s.d.=0,038) * X2 + 0,647 (s.d.=2,037)$ met een correlatiecoëfficiënt van 0,89.

Conclusie: In het lage, klinisch belangrijke gebied hebben zowel de Cockcroft-Gault- als de 4-v-MDRD-formule een goede correlatie met onze 24-uursurineverzameling en kunnen gebruikt worden om deels de 24-uurscreatinine klaringen te vervangen. De 4-v-MDRD-formule wordt geadviseerd in verschillende richtlijnen en is logistiek makkelijker te realiseren. Onze voorkeur gaat dan ook uit naar de invoering van de 4-v-MDRD-formule. In overleg met de kliniek zal nu een definitief besluit worden genomen.

Gynaecologie/obstetrie

78. High maternal pre-pregnancy weight is associated with lower newborn essential fatty acid (EFA) and long chain polyunsaturated fatty acid (LCP) status

R.S. KUIPERS¹, J.T.V. te LINTELO¹, H. LANDMAN², D.A.J. DIJCK-BROUWER¹, F.A.J. MUSKIET¹

Pathology and Laboratory Medicine¹, University Medical Center Groningen, The Netherlands, Gynecologist², Curaçao, Netherlands Antilles²

Introduction: We reported that infants with less favorable neurological condition have lower fetal status of docosahexaenoic acid (DHA), arachidonic acid (AA) and EFA. They more frequently had birth weights above the 95th percentile and were born to mothers with higher body mass indices (BMIs). High BMI is associated with higher offspring birth weight and impaired glucose tolerance. Increased transplacental glucose flux in mothers with obesity and/or diabetes is likely to increase fetal de novo fatty acid (FA) synthesis, notably 16:0, 16:1 ω 7 and 18:1 ω 9. These de novo synthesized FA may dilute fetal EFA and LCP, causing a 'relative', rather than 'absolute' fetal EFA/LCP deficiency. We recently showed that (gestational) diabetes is associated with lower fetal EFA and LCP status. We investigated whether also newborns of non-diabetic mothers with high BMIs have lower EFA/LCP status compared with counterparts with lower BMIs.

Methods: We collected umbilical cords and recorded anthropometric and obstetric data from 7 women with prepregnancy BMIs <27 kg/m² and 10 women with BMIs >27 kg/m² in Curaçao. FA compositions of umbilical arteries (UA) and veins (UV) were determined by gas chromatography.

Results: UA from mothers with BMIs >27 kg/m² had lower AA and EFA-index $[(\omega 3 + \omega 6) / (\omega 7 + \omega 9)]$, and higher Mead acid (20:3 ω 9). When corrected for gestational age, birth weight was negatively associated with UV-DHAsi (22:6 ω 3/22:5 ω 6), UA-DHAsi and UA-EFA-index, and positively with UA-18:17, UA-20:3 ω 9 and UA-DHAdi (22:5 ω 6/22:4 ω 6).

Conclusion: Lower UA-AA and EFA status of children born to mothers with BMIs >27 kg/m², and negative correlation between birth weight, fetal DHA and EFA status, are likely to point at augmented fetal de novo FA synthesis from glucose, causing relative EFA/LCP deficiencies by dilution. High BMIs may unfavorably affect (neuro)development by deteriorating intrauterine LCP status.

79. Influence of the morphology of semen at the chance of conceiving in IUI

R.F.M. OUDE ELFERINK², S. WINK¹, M.H. GERARDS¹

Gynaecology/obstetry¹, LabNoord², Martini Hospital, Groningen, The Netherlands

Introduction: To evaluate the influence of morphology of semen at the chance to conceiving in intrauterine insemination (IUI) of couples over the year 2004 till the summer stop of 2005.

Methods: The medical records from 185 patients were studied. The semen analyses were reviewed. VCM was compared with morphology (strict criteria) and VCMM. The first semen analysis and if they conceived was used. Descriptive statistics of two groups were made: the male factor group and the eci group. We used receiver-operating-characteristic curves to estimate cut-off values. Significance was assessed with the Man-Whitney-U-test.

Results: Of the male group the median for morphology for those who conceived or not were 3.6 and 2.0. The VCM values were 7.4 and 4.7 and for the VCMM 0.192 and 0.095.

Cut-off values for the male factor group for morphology, VCM and VCMM were 5%, 33 and 0.9 million. The area under the curve for morphology, VCM and VCMM were resp. 0.626, 0.634 and 0.669. In the eci group the median for morphology was in both groups 4.0. VCM for who conceived or not were 52.5 and 36.6. The cut-off value for morphology, VCM and VCMM were 7%, 62 and 0.6 million. Area under the curve for morphology, VCM and VCMM were 0.527, 0.548 and 0.537.

Conclusion: VCMM has a slightly better positive predictive value than VCM and morphology. This small difference is not significant. These observations make clear that in comparison to other sources none of the semen parameters can be used to estimate chance significantly to conceive than to classify male fertility in IUI couples.

80. The MDR-1 C3435T Polymorphism affects the risk of having a child with a cleft lip and/or palate in mothers using periconceptional medication

R.H.N. van SCHAIK¹, B.J. BLIEK², I.P. van der HEIDEN¹, F. SAYED-TABATABAEI³, E.A.P. STEEGERS², R.P.M. STEEGERS-THEUNISSEN^{2,3,4,5}

Depts of Clinical Chemistry¹, Obstetrics and Gynecology², Epidemiology and Biostatistics³, Pediatrics⁴, Clinical Genetics⁵, Erasmus MC Rotterdam, The Netherlands

Introduction: Periconceptional medication use has been associated with having a child with a cleft lip and/or palate (CLP). Variation in P-glycoprotein expression affects the efflux of drugs, and thereby the intra-uterine exposure of the embryo to medication. The MDR-1 C3435T polymorphism is associated with decreased P-glycoprotein expression and function. We hypothesized that the maternal MDR-1 3435TT genotype in combination with medication affects the risk of having a child with CLP.

Methods: We selected 104 mothers of a CLP child and 97 mothers of an unaffected child from the Dutch case-control family study on CLP conducted between 1998 and 2003. Periconceptional use of medication and folic acid supplements was obtained via questionnaires and verified by personal interviews 15 months after delivery. Mothers were genotyped for MDR-1 C3435T using PCR-RFLP. Genotypes and periconceptional exposures were compared by multiple logistic

regression analyses. The risk estimates are presented in Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals [95%CI].

Results: We found an increased CLP risk for mothers who used medication (OR=2.3 [1.2-4.4]), or did not take folic acid (OR=1.8 [1.2-3.2]). Individuals having the MDR-1 3435TT genotype that used medication demonstrated a >3-fold CLP risk (OR=3.6 [1.0-12.9]). The highest risk was demonstrated in MDR-1 3435TT individuals that used medication and did not use folic acid (OR=7.5 [1.0-54.1]). The MDR-1 3435TT genotype itself was not associated with CLP risk (OR=1.3 [0.6-2.9]).

Conclusion: These data provide first evidence for periconceptional interactions between the maternal MDR-1 gene, medication, folic acid supplement use, and the risk of having a child with CLP. Therefore, the MDR-1 3435TT genotype should be considered as an additional risk factor for women using medication in the periconceptional period.

81. The methionine synthase reductase 66A>G polymorphism is a maternal risk factor for spina bifida

I.J.M. van der LINDEN¹, M. den HEIJER^{2,3}, L.A. AFMAN¹, H. GELLEKINK^{1,2}, S.H.H.M. VERMEULEN², L.A.J. KLUIJTMANS¹, H.J. BLOM¹

Laboratory of Pediatrics and Neurology¹, Department of Endocrinology² Department of Epidemiology and Biostatistics³, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

Introduction: The methionine synthase reductase (MTRR) enzyme restores methionine synthase (MTR) enzyme activity and therefore plays an essential role in homocysteine remethylation. The 66A>G polymorphism in the MTRR gene has been associated with increased neural tube defect (NTD) risk.

Methods: A Transmission Disequilibrium Test (TDT) was performed for 82 complete mother-father-child triads to test for preferential transmission of the MTRR risk allele. In a case-control study, we studied the association between the MTRR 66A>G polymorphism and spina bifida risk and the possible interaction between this variant and the MTR 2756A>G polymorphism, the MTHFR 677C>T variant, plasma vitamin B12 and plasma methylmalonic acid (MMA) levels in 121 mothers and 292 control women. A meta-analysis of relevant literature on the relation between the MTRR 66A>G variant and maternal NTD risk was conducted.

Results: The TDT demonstrated that there was no preferential transmission of the MTRR risk allele from parents to their spina bifida affected child. In the case-control study, the MTRR 66GG genotype increased maternal spina bifida risk 2.1-fold (OR: 2.1; 95%CI: 1.3-3.3). This risk became more pronounced in combination with the MTHFR 677TT genotype (OR: 4.0; 95%CI: 1.3-12.5). Moreover, we demonstrate a possible interaction between the MTRR 66GG genotype and high plasma MMA levels (OR: 5.5; 95%CI: 2.2-13.5). The meta-analysis demonstrated that the maternal MTRR 66GG genotype was associated with an overall 48% (95%CI: 1.00-2.19) increase in NTD risk.

Conclusion: These data show that the MTRR 66GG genotype is a maternal risk factor for spina bifida especially when intracellular vitamin B12 status is low.

82. Screening naar RNA-biomarkers in plasma voor detectie van pre-eclampsie tijdens het eerste zwangerschaps-trimester

E.M.L. SMETS¹, A. VISSER¹, A.T.J.I. GO², J.M.G. van VUGT², M.A. BLANKENSTEIN¹, C.B.M. OUDEJANS¹
Afdeling Klinische Chemie¹, Afdeling Gynaecologie en Obstetrie², VU Medisch Centrum, Amsterdam

Inleiding: Pre-eclampsie komt voor bij 5 tot 10% van alle zwangerschappen en is de meest voorkomende oorzaak van morbiditeit en mortaliteit. Hoewel symptomen zich meestal pas in het derde trimester manifesteren, ligt de oorzaak in een placentaire dysfunctie in het eerste trimester. Invasie van trofoblastcellen in het myometrium en modificatie van maternale spiraalvaten vindt onvoldoende plaats waardoor er onvoldoende bloedtoevoer naar de foetus is. Omdat eiwitmarkers in plasma onvoldoende discriminatief zijn tijdens het eerste trimester, hebben we RNA in plasma onderzocht op mogelijke markers voor vroege detectie van pre-eclampsie

Methode: De SymAtlas van het Genomics Institute of Novartis Research Foundation bevat expressieprofielen van meer dan 40.000 genen in 79 weefsels. Genen met meer dan vijfmaal de mediane expressie in placenta of gecorreleerd aan placenta (Pearson cut-off 0,98) werden geselecteerd. Verder werd er gezocht op 'key words' uit relevante literatuur.

Resultaat: 183 kandidaatmarkers werden weerhouden met exclusieve of nagenoeg exclusieve expressie in placenta. 43 hiervan behoorden tot de PSG- of CSH-multigenfamilie of expressie was <7000 arbitraire units en werden daarmee uitgesloten. 14 genen waren niet detecteerbaar in vroege placenta. Van de overblijvende 126 kandidaten was er bij 84 expressie aantoonbaar in plasma van niet-zwangeren en zij waren daarmee niet placentaspecifiek. Expressie van 30 genen was niet aantoonbaar in plasma van zwangeren tijdens het eerste trimester. Daarmee bleven 12 kandidaatmarkers over die zich kwalificeren voor verder onderzoek.

Conclusie: Het opzetten van assays voor RNA in plasma kost relatief weinig tijd en kan naast extracellulaire ook intracellulaire antigenen en niet-coderend RNA detecteren. Met deze snelle en brede screening vonden we 12 mogelijke markers voor detectie van pre-eclampsie in het eerste trimester.

Literatuur: Smets et al. Clin Chim Acta 2005, in press

83. Very high medium chain fatty acid (MCFA) and low linoleic acid contents in milk of women living in the islands of Chole and Ukerewe (Tanzania)

R.S. KUIPERS¹, J. van der MEULEN², E.R. BOERSMA³, F.A.J. MUSKIET¹
Pathology and Laboratory Medicine¹, University Medical Centre Groningen, Coordinator of Logistics², Haren, The Netherlands; retired Professor of Pediatrics³, Kaapstad, South Africa

Introduction: A carbohydrate-rich diet increases human milk-MCFA (notably 12:0 and 14:0) contents. Consumption of coconut oil, rich in MCFA (notably 12:0), also increases milk-MCFA. MCFA compete with linoleic acid (18:2 ω 6) for incorporation into milk triglycerides. We investigated the milk fatty acid (FA) composition of women consuming carbohydrate- or coconut-rich diets in combination with low intakes of 18:2 ω 6-rich vegetable oils. We were interested to compare their milk-MCFA and 18:2 ω 6 contents with current recommendations for infant formulae (i.e. 12:0 Δ , 14:0 Δ ; 18:26 ω 8-35 g%). Current recommendations are based on the milk-FA composition of Western mothers.

Methods: Mature milk was collected from women living in the Tanzanian islands of Chole (n=20) and Ukerewe (n=30). Their diets are characterized by high-carbohydrate, coconut, fruits, saltwater (shell)fish (Chole), and high-carbohydrate, fruits, freshwater fish (Ukerewe). Milk-FA compositions (g%) were determined by gas chromatography.

Results: Selected median milk-FA contents (Chole; Ukerewe) were: 12:0 (19.13; 11.50; p<0.0001), 14:0 (20.81; 19.63; ns), 18:2 ω 6 (4.65; 5.75; ns), 20:4 ω 6 (0.53; 0.63, p=0.006) and 22:6 ω 3 (0.79; 1.86; p<0.0001). Consistent with coconut consumption, the 12:0/14:0 ratios (0.95; 0.60; p<0.0001) proved higher in Chole. Comparison with our world-wide database of milk-FA compositions revealed that MCFA contents in Chole and Ukerewe are the highest ever encountered by us. These women also had lowest 18:2 ω 6, average 20:46 ω 3 (Chole, Ukerewe), average 22:6 ω 3 (Chole) and high 22:6 ω 3 (Ukerewe). **Conclusion:** The high milk-12:0 and 14:0, and low 18:2 ω 6 in Chole and Ukerewe do not comply with current recommendations. Their average-higher 20:4 ω 6 and 22:6 ω 3 are likely to prevent long chain polyunsaturated FA-deficiency, and we observed no skin problems associated with 18:2 ω 6-deficiency. Exclusive use of the Western milk-FA composition for recommendations is questionable.

84. Lower long chain polyunsaturated fatty acids (LCP) and higher de novo synthesized fatty acids in umbilical vessels of babies born to preeclamptic mothers with high intakes of arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA) from freshwater fish

R.S. KUIPERS¹, V.J.B. HUISKES¹, F.V. VELZING-AARTS¹, J. van der MEULEN², D.A.J. DIJCK-BROUWER¹, F.A.J. MUSKIET¹
Pathology and Laboratory Medicine¹, University Medical Centre Groningen, Coordinator of Logistics², Haren, The Netherlands

Introduction: AA and DHA are the principal LCP ω 6 and LCP ω 3, respectively. We previously reported lower LCP ω 6 (UA-AA, UA-22:4 ω 6), UA-DHA and LCP ω 3 (22:5 ω 3), and higher UA-20:3 ω 9 [essential fatty acid (EFA) marker] in umbilical arteries (UA) and veins (UV) of preeclamptic women living in Curaçao. We tested the consistency of our finding by measurement of the fatty acid (FA) compositions of UA and UV from preeclamptic women living in Mwanza (Tanzania). The Mwanza community has high intakes of freshwater fish from Lake Victoria. These fish are rich dietary sources of both AA and DHA.

Methods: UA and UV were collected from 31 normotensive pregnancies (mean 39.0; range 33.7-41.3 gestational weeks) and 28 pregnancies complicated by preeclampsia (37.9; 33.9-41.4). FA were determined by gas chromatography. Mann-Whitney-U test or ANCOVA (gestational age as covariate, if appropriate) investigated group differences at p<0.05.

Results: Preeclamptic Tanzanian women had higher 16:1 ω 7, 18:0, 20:5 ω 3 (UA) SAFA (UV) and 20:0 (UA and UV) and lower 22:6 ω 3, 22:4 ω 6, LCP ω 6, LCP ω 3+ ω 6 (UV) and PUFA (UA and UV), as compared with Tanzanian controls. Higher 22:6 ω 3 (UA), and lower 20:3 ω 9, 22:3 ω 9 (UA) and 22:5 ω 3

(UA and UV) in Tanzanian preeclampsics, compared with Curaçao preeclampsics, confirmed the expected higher 22:6 ω 3 and EFA status of Tanzanian newborns.

Conclusion: Our data confirm previous results from Curaçao, although LCP case-control differences in Tanzania proved less pronounced. Lower LCP (22:6 ω 3, LCP ω 3+ ω 6, 22:4 ω 6) and higher de novo synthesized FA (18:0, 20:0, SAFA, 16:1 ω 7) in

Tanzanian preeclamptic umbilical vessels suggest augmented transplacental glucose transport in preeclampsia. This, together with higher 22:6 ω 3 status in Tanzanian preeclamptic pregnancies compared with Curaçao, suggest that LCP status is at best indirectly involved in the etiology of preeclampsia, possibly through compromised glucose tolerance.

Neurologie, psychiatrie, KNO en oogheelkunde

85. Lower erythrocyte arachidonic and docosahexaenoic acids in a subgroup of children with pervasive developmental disorders in Curaçao

R.F.J. KEMPERMAN^{1,2}, F.D. MUSKIET³, A.I. BOUTIER⁴, R. BISCHOFF², F.A.J. MUSKIET¹

Department of Pathology and Laboratory Medicine¹, University Medical Center Groningen, The Netherlands, University Center for Pharmacy², Department of Analytical Biochemistry, Groningen, The Netherlands, Department of Pediatrics³, St. Elisabeth Hospital, Curaçao, Netherlands Antilles, Sentro Inge Boutier⁴, Practice for Child Therapy, Curaçao, Netherlands Antilles

Introduction: Long chain polyunsaturated fatty acids (LCP) are structural components of brain phospholipids and modulators of gene expression. Patients with pervasive developmental disorders (PDD) have low plasma DHA and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPn-3), low erythrocyte (RBC) AA, increased phospholipase-A2 activity and signs of augmented lipid peroxidation. We investigated the essential fatty acid (EFA) and LCP status in children with PDD in Curaçao, using a case-control study design.

Methods: We investigated 23 children with PDD [M/F 18/5; median (range) age 10.7 years (2.9-18.6)] and 23 controls [M/F 14/9; 11.8 years (2.8-17.6)]. Their RBC FA compositions were determined by capillary gas chromatography. Reference limits were set at the 2.5th (P2.5) and 97.5th (P97.5) percentile of controls.

Results: Children with PDD had lower RBC AA (p=0.007; 43%<P2.5), DHA (p=0.016; 25%<P2.5), LCPn-6 (p<0.001; 52%<P2.5) and LCPn-3 (p=0.001; 59%<P2.5) and higher RBC

saturated FAs and monounsaturated FAs (notably oleic acid). There were no differences in RBC linoleic acid. Remarkably, mead acid (MA, a marker for EFA deficiency) was higher in controls (p<0.001), while the usual inverse relation between MA and AA was absent in PDD.

Conclusion: The low RBC LCP and MA contents in PDD children, at apparently normal EFA status, point at increased LCP loss, insufficient LCP synthesis from parent EFAs, insufficient dietary LCP intake, or combinations. Increased loss is plausible because of the reported increased phospholipase-A2 activity and/or lipid peroxidation. Increased lipid peroxidation may occur both in vivo and in vitro, the latter suggesting a preanalytical artifact introduced during our standard RBC washing procedure. Reportedly, RBC of PDD children are more sensitive to oxidation, indicating that additional studies are needed for adequate interpretation of present, potentially important, results.

86. Energy metabolites for determining neurological deficits after repair of thoracic and thoracoabdominal aortic aneurysms

E.C. LASES^{1,2}, E.H.J.F. BOEZEMAN³, L.P.H.J. AARTS⁴, H.T.M. ter BEEK⁵, H.P.A. van DONGEN⁵, M.A.A.M. SCHEPENS⁶, H.P. SIEGERS⁷, I. van der TWEEL⁸, F.J.L.M. HAAS¹

Department of Clinical Chemistry¹, Department of Clinical Neurophysiology³, Department of Anaesthesiology and Intensive care⁵, Department of Cardiothoracic Surgery⁶ and Department of Neurology⁷, St. Antonius Hospital, Nieuwegein, The Netherlands, Department of Biomedical Analysis² and Center for Biostatistics⁸, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, Department of Anaesthesiology⁴, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands

Introduction: Neurological deficit after thoracic or thoracoabdominal aortic aneurysm surgery remains a devastating complication. The aim of our study was to investigate the clinical value of energy metabolites (glucose, lactate) for determining neurological complications after this type of surgery.

Methods: From 69 patients, cerebrospinal fluid and blood samples for biochemical analysis were drawn after the induction of anaesthesia, during the cross-clamp period, 5 minutes, 2, 4, 6, 8 and 19 hours respectively after reperfusion. In addition, continuous perioperative recording of motor-evoked potentials after transcranial electrical stimulation (tcMEP) and somatosensory-evoked potentials was carried out. Neurological examinations were performed.

Results: In patients with a defined decrease in lower extremity tcMEP during the cross-clamp period, we found that combinations of the cerebrospinal fluid concentrations of lactate and glucose cerebrospinal fluid/plasma ratios at aortic cross-

clamping, 4, 6 and 8 hours after reperfusion had both a positive and negative predictive value of 100% in predicting neurological outcome after thoracic or thoracoabdominal aortic aneurysm surgery. At 6 hours after reperfusion, glucose cerebrospinal fluid/plasma ratios on their own also demonstrated a positive and negative predictive value of 100%. In addition, at 5 minutes after reperfusion, combinations of the cerebrospinal fluid and plasma concentrations of lactate had both a positive and negative predictive value of 100% in predicting neurological outcome.

Conclusion: TcMEP monitoring during thoracic or thoracoabdominal aortic aneurysm surgery seems to be an effective but not completely sufficient guide in our protective multimodality strategy. Different combinations of energy metabolites during surgery and the direct postoperative period could be associated with neurological deficits.

87. Homocysteine metabolism and brain changes in Alzheimer's disease

C. MULDER¹, W.M. van der FLIER^{2,4}, R. VEERHUIS^{1,4}, F. BOUWMAN^{2,4}, C. JAKOBS¹, F. BARKHOF³, PH. SCHELTENS^{2,4}

Departments of Clinical Chemistry¹, Neurology², Radiology³, Alzheimer Centre⁴, VU University Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Abnormalities observed in Alzheimer's disease (AD) with magnetic resonance imaging (MRI) include the characteristic medial temporal lobe atrophy (MTA) and white matter hyperintensities (WMH), presumably related to vascular pathology. Homocysteine (Hcy) is considered a risk factor for vascular disease and brain atrophy. We investigated if Hcy metabolism influences MTA and WMH occurrence in AD.

Methods: From our memory clinic 76 consecutive AD patients were included. All patients were scanned by standard MRI protocol, including coronal 3D T1-weighted and transverse Fluid Attenuated Inversion Recovery (FLAIR) sequence. MTA was visually rated using the 5 point Scheltens scale. WMH was visually assessed using the 4 point Fazekas scale. Hcy plasma levels were measured by fluorescence polarization immunoassay and vitamin B6 by HPLC. Vitamin B12 and folate were assayed by competitive immunoassays with

luminescence (Architect, Abbott). MTA and WMH were dichotomised (absence or presence) and logistic regression was applied. We performed analyses with WMH and MTA as dependent variables and Hcy, B6, B12 and folate as predictors. Age and sex were entered as covariates. Differences of WMH- and MTA-grades were assessed by Jonckheere-Terpstra.

Results: WMH and MTA were positively related to age ($p=0.001$), and B6 was a predictor for WMH ($p=0.027$), contrary to Hcy, B12, and folate. B6 levels were associated with WMH-grades ($p=0.016$), not with MTA-grades ($p=0.097$).

Conclusion: In AD patients WMH and MTA are increasing with age. Hcy, B12, and folate are no predictors for WMH or MTA. B6 concentrations are inversely related to WMH-grades, but not associated with MTA-grades. These results suggest that the transsulfuration pathway of Hcy is not involved in the pathogenesis of WMH and MTA.

Oncologie

88. A case-study of a patient with light-chain Multiple Myeloma

R. de JONGE, M. BROUNS, A.W. van TOORENENBERGEN, J.G. BOONSTRA

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

Introduction: Nephelometric measurement of serum free-light-chains may be a valuable test next to protein electrophoresis and immunofixation electrophoresis (IFE) in patients with multiple myeloma.

Methods: Routine chemistry was performed on a Hitachi 917 analyzer. Total κ en λ free-light-chain concentrations were measured on a Beckman-Coulter Image nephelometer. Protein electrophoresis and IFE were performed on a Sebia Hydrasys-Hyrus system.

Results: A 41-year old female Turkish patient with a history of diabetes mellitus type II and obesitas (Quetelet-index 45 kg/m²) presented with aspecific complaints of pain in the upper-abdominal region, fatigue, dysuria and low hemoglobin and platelet count. Physical examination revealed no abnormalities. The laboratory noted that it was impossible to separate the serum (the gel remained at the bottom of the tube) from the red cells. Protein analysis in heparin plasma showed:

total protein 74 g/L, albumin 45 g/L, IgG 4.8 g/L, IgM <0.3 g/L, IgA 0.25 g/L and transferrin 3.2 g/L. Since a cryoglobulin was ruled out (<0.01 g total protein/L), approx. 20 g/L protein was 'unexplained for'. Immunoassay quantification of serum free-light-chains showed a free κ of 23.7 g/L and a free λ of 0.02 g/L (free κ/λ ratio 983). Serum protein electrophoresis and immunofixation showed only 3.1 g/L free κ , which presented as a clear, distinct band. Bone marrow contained 88% plasma cells and β_2 -microglobulin was 8.2 mg/L. After further analysis, the patient was diagnosed as having multiple myeloma stage IIIA.

Conclusion: This case shows a clear discrepancy between serum light-chain concentration as measured by nephelometry and electrophoresis/densitometry. This may be caused by extreme polymerization of monoclonal κ free-light-chains, although no signs of these phenomena were visible in the electrophoresis results.

89. UBC als marker voor urotheelcelcarcinoom van de urineblaas

M.J.W. JANSSEN¹, J.C.J.M. SWAANENBURG¹, M.H. VELMANS¹, A.H.P. MEIER²

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹, Afdeling Urologie², VieCuri Medisch Centrum voor Noord-Limburg, Venlo

Inleiding: De follow-up van patiënten met urotheelcelcarcinoom (UCC) van de urineblaas bestaat uit cystoscopie (gouden standaard) en, in de meeste gevallen, cytologie in urine en/of blaasspoelvoelstof. Gezien het aantal cystoscopieën voor follow-up zijn urinemarkers voor recidief interessant. Uit een recent systematisch review blijkt dat urinemarkers, vergeleken met cytologie (sensitiviteit 35%, specificiteit 94%), meerwaarde hebben in met name sensitiviteit (1). Op dit moment is er echter onvoldoende bewijs om het huidige follow-up-schema te wijzigen en een cystoscopie te vervangen door een van de beschikbare urinemarkers. Wij startten een pilot-studie naar de waarde van de urinemarker UBC (cytokeratine 8 en 18). Het betreft de tweedegeneratie-UBC-test.

Methode: Verse ochtendurine werd direct gecentrifugeerd en, verdund, opgenomen in een speciale bewaarvoelstof. Monsters werden bewaard bij -20 °C. Analyse vond plaats met de UBCTM II ELISA-test van IDL Biotech AB. De patiënten-

monsters zijn in één van de volgende categorieën geplaatst. (1) UCC, zowel primair als recidief. (2) Geen UCC. Patiënten in deze groep zijn onder behandeling wegens hematurie, waarbij (nog) geen diagnose gesteld is. (3) Bemoelijkte mictie waaronder, bij mannen, voornamelijk benigne prostaathyperplasie (BPH).

Resultaat: In deze fase van de studie zijn in de eerste categorie 7 van de 10 monsters positief. In de tweede categorie zijn 23 van de 32 monsters negatief (specificiteit 72%). In de derde groep zijn 8 van de 14 monsters negatief.

Conclusie: Het aantal patiënten is, in deze fase van de studie, nog te laag om een uitspraak te doen over sensitiviteit. De specificiteit is vergelijkbaar met die uit eerdere studies met de eerste generatie UBC-test (1). BPH lijkt fout-positieve resultaten te veroorzaken.

Literatuur: 1) Van Rhijn et al. Ned Tijdschr Urol 2005;7:189-194.

90. Pilotstudie naar de bruikbaarheid van een artificieel neurale netwerk in de besluitvorming tot het verrichten van prostaatbipten

I.E.W. van ONNA¹, H.P. BEERLAGE¹, R. KUSTERS²

Afd. Urologie¹, Laboratorium Klinische Chemie en Hematologie² Jeroen Bosch Ziekenhuis, 's Hertogenbosch

Inleiding: PSA-bepalingen worden verricht bij de screening naar prostaatacarcinoom en bij de follow-up. Verhoogd PSA kan ook wijzen op BPH of prostatitis. De PSA-waarde waarbij wordt overgegaan tot het verrichten van prostaatbipten wordt steeds lager. Het gevolg hiervan is dat er steeds meer en steeds jongere patiënten prostaabipten zullen ondergaan. Recent is een aantal artificieel neurale netwerken (ANN) ontwikkeld die in staat zijn met een hoge specificiteit de uitslag van prostaatbipten te voorspellen. In deze plotstudie hebben wij van 60 series prostaatbipten de gegevens van betreffende patiënten verwerkt in een ANN en de resultaten vergeleken.

Methode: Achtenveertig patiënten ondergingen 60 series prostaatbipten evenals een rectaal toucher, transrectale echo van de prostaat met volumemeting en een serum-PSA- en -vrij-PSA-bepaling. Deze gegevens werden verwerkt in het ANN (Prostataclass van Urologie van het Universiteitsziekenhuis

Charite te Berlijn). De voorspelling van de uitslag van de bipten werd vergeleken met de uitslagen van de Pathologie.

Resultaat: Van de 48 patiënten ondergingen 31 patiënten voor de eerste keer puncties, 20 voor de tweede keer, 6 voor de derde keer en 3 voor de vierde of vijfde keer. Gemiddeld was het PSA 10,8 ug/l (2,4-72 ug/l). De gemiddelde leeftijd was 63 jaar. Zes keer was de PA-uitslag positief voor prostaatacarcinoom, waarbij het ANN dezelfde uitslag voorspelde. Van de 54 negatieve bipten had het ANN 33 keer dezelfde voorspelling en adviseerde in die gevallen geen bipten te nemen. Met toepassing van het ANN had 55% van de bipten mogelijk voorkomen kunnen worden.

Conclusie: Deze pilotstudie laat zien dat toepassing van een ANN in besluitvorming tot het verrichten van prostaatbipten een goede voorspelling geeft van de bipt uitslag. Hierdoor kunnen onnodige bipten voorkomen worden.

Acute zorg, IC, toxicologie

91. Differences in mortality on the basis of CRP, LD and troponin-I levels in an unselected population at the Emergency Department

K. VROONHOF, W.W. van SOLINGE, A. HUISMAN

Department of Clinical Chemistry & Laboratory Medicine, University Medical Centre Utrecht, the Netherlands

Introduction: Patients are seen in the emergency department (ED) every day for various reasons. Part of the work-up of patients in the ED may consist of laboratory testing. The objective of this descriptive study was to relate CRP, LD and troponin-I of the initial blood sample of a patient visiting the emergency department, to mortality.

Methods: All patients aged 18 years and older, who visited our ED over a one year period, and for whom on clinical grounds the attending physician decided to request blood gas analysis, were included in this study (1). CRP, LD and troponin-I were related to mortality within 7 days after presentation. Samples were analyzed in the central laboratory.

Results: A total of 1698 patients entered the study (M/F: 1013/685, mean age 55±19.3 yr), of these patients 153 (9.0%) died within 7 days after admittance to the hospital. In 1293 patients CRP was measured, in 1071 patients LD and in 323

patients troponin-I. When dividing the group of patients into quintiles for CRP, the fifth quintile (>99 mg/L) shows higher mortality than the other quintiles (p<0.0001). The division into quintiles for LD, shows that mortality increases with a higher LD, even above the reference range (p<0.0001). In 323 patients troponin-I was measured, 60% had troponin-I values of zero. The two upper quintiles show higher mortality, when divided according to the reference range, the mortality above the reference range is higher in comparison to the reference range (p<0.0001).

Conclusion: This descriptive study shows significant differences in mortality for initial CRP, LD and troponin-I levels in patients visiting the emergency department, irrespective of underlying pathology.

Literature: Vroonhof et al. Clin Chem Lab Med 2005; 43: 536.

92. Differences in mortality on the basis of hemoglobin concentration, leukocyte count and platelet count in an unselected population at the Emergency Department

K. VROONHOF, W.W. van SOLINGE, A. HUISMAN

Department of Clinical Chemistry & Laboratory Medicine, University Medical Centre Utrecht, the Netherlands

Introduction: Patients are seen in the emergency department (ED) every day for various reasons. Part of the work-up of patients in the ED may consist of laboratory testing. The value of hematology laboratory results in triaging patients at the ED is not well established. The objective of this descriptive study was to relate hemoglobin concentration, leukocyte-count and platelet-count of the initial blood sample of a patient visiting the emergency department, to mortality.

Methods: All patients aged 18 years and older, who visited our ED over a one year period, and for whom on clinical grounds the attending physician decided to request blood gas analysis, were included in this study (1). The results of hemoglobin concentration, leukocyte-count and platelet-count were related to mortality within 7 days after admittance to the hospital.

Results: A total of 1698 patients entered the study, of these patients 153 (9.0%) died within 7 days after admittance to the hospital. When comparing survivors and non-survivors age

(54 vs 63 years (mean), p<0.0001), hemoglobin concentration (8.2 vs 8.0 mmol/L (mean), p<0.05) and leukocyte-count (10.8 vs 13.9 10⁹/L (median), p<0.0001) showed significant differences. When dividing the group of patients into quintiles, the highest leukocyte-count quintile (>16.1 10⁹/L) and the lowest platelet-count quintile (<191 10⁹/L) both showed high mortality in comparison to the quintile with the lowest mortality (p-values<0.0001). The lowest hemoglobin concentration quintile (<7.2 mmol/L) showed also high mortality in comparison to the quintile with the lowest mortality (p<0.05).

Conclusion: This descriptive study shows significant differences in mortality for initial hemoglobin concentration, leukocyte-count and platelet-count in patients visiting the emergency department, irrespective of underlying pathology.

Literature: Vroonhof et al. Clin Chem Lab Med 2005;43:536.

Erfelijke stofwisselingsziekten

93. ω -Oxidation of very long-chain fatty acids in human liver microsomes: implications for X-linked adrenoleukodystrophy

R. SANDERS¹, R. OFMAN², F. VALIANPOUR², S. KEMP¹, R.J.A. WANDERS¹

Lab. Genetic Metabolic Diseases¹, Departments of Clinical Chemistry and Pediatrics², Academic Medical Centre, University of Amsterdam, The Netherlands

Introduction: X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD), the most common peroxisomal disorder, is a progressive neurodegenerative disease that affects the cerebral white matter, spinal cord, peripheral nerves, adrenal cortex and testis. X-ALD is biochemically characterized by elevated levels of very long-chain fatty acids (VLCFA, >22 carbons) in all tissues and plasma. Accumulation of VLCFA is associated with reduced peroxisomal β -oxidation of these fatty acids. X-ALD is caused by mutations in the ABCD1 gene that encodes ALDP, an ATP-binding cassette transporter with an unknown function located in the peroxisomal membrane. Since the pathogenesis of X-ALD is probably due to the increased levels of VLCFAs, correction of VLCFA levels is one of the primary objectives as a therapeutic approach. Several approaches have been studied or are under investigation, including bone marrow transplantation, inhibition of VLCFA biosynthesis by mono-unsaturated fatty acids (Lorenzo's Oil), and induction of the expression of

ALDP related protein (ALDR). An alternative route for the oxidation of fatty acids is via ω -oxidation in the endoplasmic reticulum, followed by β -oxidation of the dicarboxylic acids produced.

Methods: VLCFA analysis was performed as described elsewhere (Valianpour et al. (2003)) (1).

Results: Our results show that VLCFAs are substrates for the human ω -oxidation system. We have identified two cytochrome P450 enzymes that catalyze the ω -oxidation of VLCFA.

Conclusion: Generally, the expression of cytochrome P450 enzymes can be induced by a variety of drugs. Therefore, stimulation of the VLCFA ω -oxidation pathway could provide an alternative mode of treatment to reduce the levels of VLCFAs in patients with X-ALD.

Literature: Sanders et al. J Lipid Res 2005; 46: 1001-8.

94. Exocytotic release of creatine from rat brain slices

L.S. ALMEIDA¹, F. HOGENBOOM², C. JAKOBS¹, A.N.M. SCHOFFELMEER², G.S. SALOMONS¹

Metabolic Unit,¹ Dept of Clinical Chemistry, Department of Medical Pharmacology², VU University Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Since in patients with Cerebral Creatine Deficiency Syndromes impairment of brain functioning is the major hallmark, and creatine has been demonstrated to affect GABAergic neurotransmission in the brain, we tested the hypothesis that creatine may in fact represent a novel central neuromodulator.

Methods: To that end, we studied the uptake of 3H-creatine and its subsequent electrically evoked release from rat brain slices as well as the electrically evoked release of endogenously synthesized creatine.

Results: Under quasi-physiological conditions, 3H-creatine was accumulated in rat brain cortex slices in a sodium-dependent manner. As might then be expected, incubation of brain slices in the absence of sodium completely blocked its subsequent

release when superfused brain slices were stimulated electrically. Most importantly, the electrically evoked release of 3H-creatine as well as that of endogenous (unlabelled) creatine was abolished when calcium was omitted from the superfusion medium or when neuronal depolarization was induced electrically in the presence of the sodium-channel blocker tetrodotoxin. Moreover, the potassium channel inhibitor 4-aminopyridine strongly enhanced the electrically evoked release of 3H-creatine and endogenous creatine.

Conclusion: These in vitro data indicate that creatine is not only synthesized and accumulated by central neurons, but also released in an action-potential dependent (exocytotic/vesicular) manner, providing strong evidence for its role as a neuromodulator in the brain.

95. Wildtype SLC6A8 restores the creatine uptake profile in SLC6A8/creatine transporter deficient fibroblasts

E.H. ROSENBERG¹, C. MARTINEZ MUÑOZ¹, T.J. DEGRAUW², C. JAKOBS¹, G.S. SALOMONS¹

Metabolic Unit¹, Department of Clinical Chemistry, VU University Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands, Cincinnati Children's Hospital Medical Center², Cincinnati, OH, USA

Introduction: SLC6A8 deficiency, a cerebral creatine deficiency syndrome (CCDS) is caused by mutations in the creatine transporter gene (SLC6A8) (MIM 300036). The clinical presentation of affected males are X-linked mental retardation (XLMR), expressive speech and language delay, epilepsy, developmental delay and autistic behavior. Affected males have a reduction of the creatine signal in the proton magnetic resonance spectroscopy (H-MRS) of brain, increased creatine/creatinine excretion in urine and have impaired creatine uptake in cultured fibroblasts. In order to provide final proof that SLC6A8 deficiency is caused by a primary defect of the creatine transporter, we transfected the wildtype SLC6A8 sequence into SLC6A8 deficient primary fibroblasts, and tested the creatine uptake capacity.

Methods: Wildtype SLC6A8 cDNA was cloned into a pEGFP-N1 expression vector. This construct was then stably transfected into SLC6A8 deficient primary fibroblasts. Sub-

sequently, transfected cells were incubated for 24 hours with 25 μ M creatine, 500 μ M creatine or 500 μ M creatine and 500 μ M guanidinopropionate (creatine transporter inhibitor). Creatine content was measured by SID GC-MS.

Results: Transfection of deficient primary fibroblasts with wildtype SLC6A8 results in the restoration of normal creatine uptake profile, in contrast to mock transfectants. Currently, mutations are being introduced in the wildtype sequence and transfected in deficient primary fibroblasts in order to study structure/function relationship and to investigate the nature of variants of unknown consequence.

Conclusion: We provide definitive proof that mutations in the SLC6A8 gene are primarily responsible for SLC6A8 deficiency, a CCDS. The deficient fibroblasts transfected with SLC6A8 mutants, are a model for functional analysis of variants of unknown consequence (i.e. missense mutations).

96. Human embryo, fetus and placenta have complete carnitine biosynthesis activity

N.A. OEY¹, N. van VLIES², K. BOER³, T. ATTIE-BITACH⁴, M. VEKEMANS⁴, R.J.A. WANDERS^{1,2}, F.A. WIJBURG¹, F.M. VAZ²

Depts. of Pediatrics¹, Clinical Chemistry², Obstetrics and Gynaecology³, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands, Département de Génétique et Unité Inserm U⁴, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

Introduction: The remarkably high incidence of severe pregnancy complications Acute Fatty Liver of Pregnancy (AFLP) and the Hemolysis, Elevated Liver enzymes, and Low Platelets (HELLP) syndrome in women who carry a fetus with a defect in long-chain FAO as well as the reported higher frequency of prematurity, intra-uterine growth retardation (IUGR), and several case reports of intrauterine death in association with mitochondrial long-chain FAO defects suggests that FAO plays an important role in the human fetal-placental unit. Indeed, we and others demonstrated a remarkably high activity of FAO enzymes in human placenta. In addition, we recently provided evidence that the human embryo and fetus are capable of long-chain fatty acid metabolism during development. The presence of FAO activity in the fetal-placental unit implicates that carnitine may be essential in the fetal-placental unit. The objective of this study was to investigate carnitine biosynthesis in the human fetal-placental unit.

Methods: In placental tissue activity of three carnitine biosynthesis enzymes was measured. In tissue and plasma acyl-carnitine levels and carnitine biosynthesis intermediates were measured. Furthermore, we measured the enzymatic activity of three carnitine biosynthesis enzymes in different human embryonic and fetal tissues (5-20 weeks of development).

Results: We now report that the human placenta as well as the human embryo and fetus are capable of completing the whole carnitine biosynthesis pathway.

Conclusion: The transport of carnitine from maternal blood to the fetus is an important function of the placenta. However, the ability of the placenta and fetus to synthesize their own carnitine indicates that under circumstances when maternal carnitine supply is limited, carnitine biosynthesis by the fetal-placental unit may supply sufficient carnitine for placental and fetal metabolism.

97. X-Linked creatine transporter (SLC6A8) mutations in about 1% of males with mental retardation of unknown etiology

E.H. ROSENBERG¹, A.J. CLARK², L.S. ALMEIDA¹, R.E. STEVENSON², C. JAKOBS¹, T. WOOD², C.E. SCHWARTZ², G.S. SALOMONS¹

Metabolic Unit¹, Department of Clinical Chemistry, VU University Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands, J.C. Self Research Institute², Greenwood Genetic Centre, Greenwood, South Carolina, USA

Introduction: Mutations in the creatine transporter gene SLC6A8 have been found in families with X-linked mental retardation as well as in males with sporadic mental retardation (MR). Pathogenic mutations in this gene have been associated with cerebral creatine deficiency shown by the marked reduction of creatine in H-magnetic resonance spectroscopy, increased urinary creatine/creatinine and impaired creatine uptake in cultured fibroblasts.

Methods: In order to estimate the frequency of mutations in SLC6A8 in the MR population, a screening of 478 males with MR of unknown cause was undertaken. These MR males were randomly included and should represent the male MR population in the state of South Carolina, USA. All 13 exons of SLC6A8 were sequenced using genomic DNA.

Results: Several potentially pathogenic DNA mutations were identified that were not encountered in 656 male control chro-

mosomes: 2 deletions, 1 splice site and 4 missense mutations. The deletions and the splice site alteration are considered pathogenic based on the nature of the mutation, whereas the pathogenicity of the missense mutations is more questionable: one missense mutation is highly likely pathogenic due to the difference in chemical properties of the substituted amino acid, and the fact that the amino acid is located in a highly conserved stretch of amino acids. The other missense mutations are not conserved and are not located in such stretches.

Conclusion: Our findings of 4 highly likely pathogenic mutations and 2 potentially pathogenic mutations in 478 samples indicate that about 1 % (4/478 = 0.8%; CI 0.02%-1.7%) of males with MR might have a SLC6A8 mutation. Thus, DNA sequence analysis and/or a creatine/creatinine urine screen might be warranted in any male with mental retardation of unknown cause.

98. Activity of pyrimidine degradation enzymes in normal tissues

A.B.P. van KUILENBURG¹, H. van LENTHE¹, A.H. van GENNIP²

Lab. Genetic Metabolic Diseases¹, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands, Departments of Clinical Genetics and Clinical Chemistry², Academic Hospital, Maastricht, The Netherlands

Introduction: In man, the pyrimidine bases uracil and thymine are degraded via a three-step pathway. It is generally believed that the liver is the major organ for pyrimidine catabolism to occur. However, conflicting reports exist as to the expression of the enzymes from the pyrimidine degradation pathway in extrahepatic tissues.

Methods: The activity of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), dihydropyrimidinase (DHP) and β -ureidopropionase (β -UP) was measured using radiolabeled substrates, in 16 different tissues obtained at autopsy from a single patient.

Results: The activity of DPD could be detected in all tissues examined, with the highest activity being present in spleen and liver. Surprisingly, the highest activity of DHP was present in

kidney followed by that of liver. Furthermore, a low DHP activity could also be detected in 7 other tissues. The highest activity of β -UP was detected in liver and kidney. However, low β -UP activities were also present in 8 other tissues. Apart from testis, all tissues expressing DHP also expressed β -UP. In testis, only a low activity of β -UP could be detected.

Conclusion: Our results demonstrated that the entire pyrimidine catabolic pathway was predominantly confined to the liver and kidney. However, significant residual activities of DPD, DHP and β -UP were also present in a variety of other tissues, especially in lung. In brain, only the activity of DPD could be detected indicating that human brain cells are not able to synthesise β -alanine via the catabolism of uracil.

99. Phytanic acid omega-oxidation in human liver microsomes and its implications for Refsum disease

J.C. KOMEN¹, M. DURAN², R.J.A. WANDERS²

Departments of Clinical Chemistry and Pediatrics¹, Emma Childrens Hospital, Laboratory for Genetic Metabolic Diseases², Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Phytanic acid is a branched-chain fatty acid that humans obtain through their diet. In healthy individuals phytanic acid is metabolized by alpha-oxidation in peroxisomes, but in patients suffering from Refsum disease this pathway is deficient. As a result these patients accumulate phytanic acid which is thought to be the main cause of the pathology of the disease. The symptoms include retinitis pigmentosa, peripheral neuropathy, and cerebellar ataxia. The aim of this study was the identification of an alternative degradation route for phytanic acid, namely omega-oxidation, in which phytanic acid is degraded by regular beta-oxidation from the omega-end via a dicarboxylic acid intermediate.

Methods: An enzyme assay was developed. Detection of reaction products of the omega-hydroxylation of phytanic acid in human liver microsomes was done with gas chromatography mass spectrometry (GCMS) analysis.

Results: The phytanic acid omega-hydroxylation step in human liver microsomes was characterized. Furthermore, with the use of microsomes expressing individual recombinant cytochrome P450 enzymes we have shown that the omega-hydroxylation of phytanic acid is catalyzed by multiple members of the CYP450 family 4.

Conclusion: From the obtained results we conclude that omega-oxidation of phytanic acid occurs in human liver microsomes and that the first step requires a CYP450 enzyme of family 4. We hypothesize that increasing omega-hydroxylation of phytanic acid by inducing the identified CYP450s may increase the flux through the omega-oxidation pathway and therefore may be considered as a new approach in the treatment of Refsum Disease.

Literature: Komen et al. Mol Genet Metab. 2005; 85: 190-5.

100. Deficiency of purine nucleoside phosphorylase: treatment by cord blood transplantation results in relief of neurologic symptoms

N.G. ABELING, T.W. KUIJPERS², M. DURAN¹ C.D. SCHEURER³, R.G. BREDIUS⁴, R.M. ROIFMAN⁵, B.T. THE POLL², P.G. BARTH²

Laboratory Genetic Metabolic Diseases¹, Emma Children's Hospital², Academic Medical Centre, Amsterdam, Dept. of Pediatrics³, Kennemer Gasthuis, Haarlem, Dept. of Pediatrics⁴, Leiden University Medical Centre, The Netherlands, Dept of Immunology⁵, Hospital for Sick Children, Toronto, Canada

Introduction: The female patient presented at the age of 2 years with psychomotor retardation with mild paresis of the legs and ataxic gait, and lymphopenia. An episode of autoimmune hemolytic anemia and severe varicella preceded her admission to our hospital.

Methods: HPLC and tandem-mass spectrometry for metabolites. Established methods for enzyme and DNA analyses.

Results: Metabolic investigation of a urine sample revealed strongly increased (deoxy)inosine (d)Ino and (deoxy)guanosine (d)Guo, and decreased uric acid, the characteristic pattern of purine nucleoside phosphorylase (PNP) deficiency. Erythrocyte PNP activity was < 1 % of controls. Two heterozygous mutations were detected, one in exon 2 (172 C>T) and a novel

one in exon 6 (700 C>T). In CSF (d)Ino and (d)Guo were strongly increased. MRI of the brain and spinal cord was normal. After transplantation with cord blood from her younger, unaffected, HLA-identical sib born 7 months later, dGuo and dIno normalized over time in the CSF, blood and urine, whereas Guo and Ino did not fully normalize. There was a striking catch-up development, and at the age of 5 no motor disturbances could be assessed. Her immune function also strongly improved over time.

Conclusion: It is concluded that cord blood transplantation of a suitable donor is extremely efficient in PNP deficiency and does not have the complications of bone marrow transplantation.

101. Ernstige hypertriglyceridemie in een neonaat -een uitzonderlijke casus

Y.B. de RIJKE¹, K.CRANSBERG², D. MUL³, J.B.C. de KLERK⁴

Afdelingen Klinische Chemie¹, Kindergeneeskunde- Kindernefrologie², Intensive Care Pediatrie³, Erfelijke Metabole Ziekten⁴, Erasmus MC-Sophia Kinderziekenhuis, Rotterdam

Inleiding: We presenteren een casus van een neonaat, 1 maand oud, die naar ons ziekenhuis werd verwezen door een groot algemeen ziekenhuis. Het kind had een slechte circulatie, matige hepatosplenomegalie en rectaal bloedverlies. Huidlesies waren niet zichtbaar. Ons laboratorium werd geconfronteerd met plasma dat een roomachtig uiterlijk had. Dit was toe te schrijven aan massale hyperchylomicronemie. Massale hyperchylomicronemie en hypertriglyceridemie passen bij een lipoproteïne lipase (LPL)- en/of apo-CII-deficiëntie. Dit zijn zeldzaam voorkomende autosomaal recessieve aandoeningen met een incidentie van 1:1.000.000 pasgeborenen voor LPL-deficiëntie. De cholesterol- en triglyceridenconcentratie in plasma waren resp. 40 en 338 mmol/l. De nierfunctie, leverfunctie, alsmede de CRP-, amylase-, en albumineconcentratie in plasma waren normaal. De concentraties leucocyten en trombocyten waren resp. $44 \times 10^9/l$ en $699 \times 10^9/l$.

Methoden: Bloed, afgenomen 20 min na een 50 U/kg bolus he-

parinetoediening, werd geanalyseerd op LPL-activiteit en LPL-mutaties. Een therapeutische plasmaferese werd uitgevoerd om het risico op morbiditeit en mortaliteit te verkleinen.

Resultaat: Een sterk verlaagde LPL-activiteit werd gemeten (8 mU/ml; controles: 169 ± 62), welke niet te stimuleren was met melk-LPL, hetgeen zou kunnen passen bij apo-CII-deficiëntie. De hepatische lipaseactiviteit was laag-normaal (153 mU/ml; controles: 345 ± 100). Na de plasmaferese waren concentraties van cholesterol en triglyceriden resp 7,3 en 27,6 mmol/l. Mogelijk is er ten tijde van de hyperviscositeit een klein infarct ontstaan.

Conclusie: De patiënt werd ingesteld op diëetvoeding Basis F + MCT-vetten en de triglyceridenconcentratie bleef redelijk laag. Eén maand na plasmaferese waren de cholesterol- en triglycerideconcentratie resp. 3,9 en 13,4 mmol/l. In deze casus hebben we mogelijk te maken met een LPL-deficiëntie in combinatie met apo-CII-deficiëntie. Dit wordt nader geanalyseerd.

100. SAM/SAH ratios in methionine loading tests may discriminate remethylation defects from transsulfuration defects

J.E. de VRIES^{1,2}, J. BIERAU¹, H. WATERVAL¹, J. SCHEIJEN¹, L. SPAAPEN¹, A.H. van GENNIP¹

Departments of Biochemical Genetics¹, Clinical Chemistry², Maastricht University Hospital, Maastricht, The Netherlands

Introduction: The methionine loading test is currently employed to detect mild impairments of homocysteine metabolism in patients with cardiovascular diseases. Enhanced levels of homocysteine are caused by disturbances in either the remethylation or transsulfuration pathways of homocysteine. It was investigated whether the ratio of the homocysteine precursor metabolites SAM and SAH could discern between remethylation or transsulfuration defects. SAM/SAH ratios were determined in methionine loading tests with a normal outcome (n=9), in patients with a transsulfuration defect (n=3) and in a patient with a remethylation defect (n=1).

Methods: After deproteinizing EDTA-plasma with 0.001% trifluoroacetic acid in acetonitril, the levels of SAM and SAH

were determined with LC-ESI-MS-MS (1). The Student's t-test was applied to detect significant differences (P < 0.05).

Results: In methionine loading tests with a normal outcome, the ratio of SAM/SAH increased significantly (P = 0.01) from 4.0 (before) to 6.9 (after). The ratio of SAM/SAH in patients with a transsulfuration defect decreased from 1.07 to 0.46. In the patient with a remethylation defect the SAM/SAH ratio increased from 1.5 to 2.8.

Conclusion: These preliminary results suggest that transsulfuration defects can be distinguished from remethylation defects by measurement of the SAM/SAH ratio in methionine loading tests.

Literature: Struys et al. Clin Chem 2000;46:1650-6.

Overigen

103. UPOD: Enhancing clinical pharmacoepidemiological research from a laboratory perspective

M.J. ten BERG^{1,2}, A. HUISMAN², P.M.L.A. van den BEMT^{1,3}, A.F.A.M. SCHOBEN^{1,4}, A.C.G. EGBERTS^{1,3}, W.W. van SOLINGE^{1,2}

Department of Pharmacoepidemiology and Pharmacotherapy¹, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Utrecht University, The Netherlands; Department of Laboratory Medicine², University Medical Centre Utrecht, The Netherlands; Hospital Pharmacy Midden-Brabant³, TweeSteden Hospital and St. Elisabeth Hospital, Tilburg, The Netherlands; Department of Hospital Pharmacy⁴, University Medical Centre Utrecht, The Netherlands

Introduction: The majority of adverse drug reactions can be detected with biochemical tests. Laboratory data collected during patient care are of added value for epidemiological research regarding drug safety. Linkage of laboratory data with other clinical data within a research database would provide valuable data for pharmacoepidemiological research. Therefore an infrastructure of automated and relational databases comprising data on the patients' demographics, symptoms, diseases, diagnostic procedures and therapeutic interventions that can be used for clinical pharmacoepidemiological research from a laboratory perspective was established.

Methods: In a collaboration of the UMC Utrecht and the Department of Pharmacoepidemiology and Pharmacotherapy at Utrecht University, the Utrecht Patient Oriented Database (UPOD) was established. Patient histories concerning laboratory results, medication orders, demographic, hospital discharge diagnoses and therapeutic procedures were disclosed from the hospital information system into databases. Data were checked for completeness

and integrity. Methods for updating (automated downloads), linking (patient identifier) and questioning the databases (data dictionary), were developed. Privacy aspects regarding data handling and identification of patients were considered.

Results: UPOD contains complete, well-defined and integer data for all patients that were hospitalised at the UMC Utrecht since January 2004 onwards. All databases can be used as sampling frame to select patients with an exposure or outcome of interest. The patient identifier consequently enables gathering data from other databases. Studies within UPOD are conducted in accordance with all privacy regulations.

Conclusion: Automated clinical data collected in the hospital information system can be made available for epidemiological research. UPOD enhances the opportunities for clinical epidemiologic research by linking laboratory data to other clinical data for a large population. Current research within UPOD focuses on identification of early-warning signals for drug-induced blood dyscrasias.

104. Mouse fetal brain long chain polyunsaturated fatty acid (LCP) content is strongly related to LCP contents in maternal erythrocyte (RBC) and brain

S.A. van GOOR, M.R. FOKKEMA, D.A.J. DIJCK-BROUWER, T.H. van der IEST, F.A.J. MUSKIET

Pathology and Laboratory Medicine, University Medical Centre Groningen, The Netherlands

Introduction: The LCPs arachidonic (AA) and docosahexaenoic (DHA) acids are major structural components of brain phospholipids and modulators of gene expression. Fetal LCP status depends mainly on transplacental LCP transport and to a lesser extent on synthesis from parent essential fatty acids (EFA). Low fetal LCP status may interfere with (neuro)development and LCP loss from maternal brain may be related to the memory loss of women experienced in pregnancy. We investigated whether maternal RBC LCP contents predict fetal brain LCP status, and whether both fetal and maternal brain LCP contents are affected by low fetomaternal LCP status.

Methods: Forty-two mice were divided into 9 diet-groups, varying from EFA-deficient to regular diets supplemented with selected LCP. Diets were fed from day-3 prior to conception. Mice were terminated on day-15 of pregnancy (term=18 days). Fatty acid (FA) compositions of maternal RBC, and maternal

and fetal brains were determined by gas chromatography. Correlation coefficients were calculated using Spearman correlation tests (SPSS).

Results: Associations (correlation coefficient; p-value) between maternal RBC and fetal brain FAs were: AA (+0.704; p<0.001), DHA (+0.942; p<0.001) and Mead acid (+0.725; p<0.001; EFA deficiency marker). Those between maternal and fetal brain FAs were: AA (+0.198; not significant), DHA (+0.451; p=0.003) and Mead acid (+0.650; p<0.001). All associations proved linear. EFA-deficient diets caused lower AA and DHA and higher MA in both maternal and fetal brains.

Conclusion: Our data show that maternal RBC LCP and Mead acid contents reliably reflect fetal brain LCP content and EFA-status. They also indicate that both maternal and fetal brains are sensitive to LCP depletion and EFA-status deterioration at conditions of low fetomaternal LCP status.