

Posterabstracts

Samenvattingen van de posterpresentaties tijdens het 62^e Congres van de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde op 16 en 17 april 2009 te Veldhoven

Categorie 1: Analytisch

Fotometrie, elektrochemie, sensortechnologie

1. Evaluatie van de i-STAT in een huisartsenlaboratorium

A.M.J. KOOIJMAN-BUITING, L. de WITH, M. de RUITER-ELKERBOUT, M. de GRAAF
Artsenlaboratorium en Trombosedienst, SALTRO, Utrecht

Inleiding: Indien de omgevingstemperatuur van de serum-buizen beneden de 14 °C treedt er een stijging van de kaliumwaarden op. Dit is een probleem waar laboratoria met externe poli's mee te maken hebben. Om deze vals verhoogde waarden uit te bannen zijn al vele experimenten gedaan tot nu toe zonder het gewenste resultaat. Onderzocht wordt of via Point of Care (i-STAT, Abbott) verhoogde kaliumwaarden gecontroleerd kunnen worden, voordat een definitieve uitslag naar de aanvrager gaat.

Methode: De kaliumwaarden van minimaal 21 patiënten werden op de i-STAT (Abbott) en de Advia 2400 (Siemens) vergeleken. De i-STAT meet de kalium in volbloed en de Advia in heparine plasma of serum. Op beide apparaten werden monsters uit serum- en heparinebuizen aangeboden. Het gebruik van de i-STAT binnen de laboratoriumsetting werd geëvalueerd op bedieningsgemak.

Resultaat: De correlatie tussen de kaliumwaarden op de i-STAT (heparinevolbloed) en de ADVIA 2400 (serum, referentie) is $y=0,8667x - 0,1422$. De correlatie tussen de i-STAT en de ADVIA (serum- en heparinebuis) is $y=0,905x + 0,1513$ respectievelijk $y=0,9091x + 0,2545$. Het cartridgegebruik is hoog ten opzichte van de gegenereerde resultaten. Het meeste kritisch punt was het vullen van de cartridge.

Conclusie: De kaliummetingen van de i-STAT correleren goed met de Advia (gecorrigeerd voor heparinebloed). Het onderzoek is uitgevoerd binnen het laboratorium door een analist die ook naar het gebruiksgemak heeft gekeken. Het cartridgegebruik is hoog. Dit kan verder oplopen indien het apparaat gebruikt wordt door medewerkers die onvoldoende frequent het apparaat bedienen. Het is praktisch niet haalbaar en economisch niet rendabel om de i-STAT groter uit te zetten binnen ons laboratorium.

2. Evaluation of the analytical performance of the Dimension Vista 1500 platform: first results

T. RAMMELOO¹, T. JACOBS¹, V. van TOL-van BENTHEM², T. VERSIJDE²
Department of Clinical Chemistry¹, Franciscus Ziekenhuis, Roosendaal; Siemens Healthcare Diagnostics², Breda

Introduction: The performance of the Dimension Vista 1500 analyzer was investigated using a broad spectrum of different assays such as Troponin I, NT-pro-BNP, TSH and FT4, vitamin B12, folate, ferritin, hCG, AFP, haptoglobin and transferrin, routine chemistry and various drugs.

Methods: The Vista uses at least four different methodologies to measure more than 80 serum components: fotometry, multi-sensor technology, nephelometry, LOCI (Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay) and other kinds of immunoassays. Comparison was made with our currently used methods as Dimension RxL (fotometry and electrolytes), Immage (nephelometry), Centaur (immunoassays) and RIA (B12, folate).

Results: Intra-assay coefficients of variation at three different levels varied between 1-6% for the LOCI-assays (ferritin, folate etc.), whereas all other assays showed CV's lower than 4%. Interassay CV's for LOCI assays (FT4; TSH, folate etc.) varied between 3-7% but those for nephelometric and drug assays

were even better. Good correlations were found with current assays. Intercepts were not significant different from zero. The slope of regression lines (Vista=Y) for NT-pro-BNP and transferrin assays was above 1,10 pointing at systematic differences, which may indicate calibration differences.

Conclusion: Our preliminary conclusion is that in terms of intra- and, more importantly, interassay variation of the Vista 1500 system performs adequately. Precision of cTroponin I, folate, vitamin B12 and other LOCI-assays was excellent, also with nephelometric and drug assays. Accuracy of most methods was good, NT-pro-BNP and transferrin assays should be improved. Analysis of pediatric samples is very convenient with this instrument: i.e. the TSH assay only takes 20 microliter serum or plasma. We conclude that these first results indicate that the Vista 1500 seems to be a reliable and efficient platform for integration of chemistry and immunochemistry including drugs and proteins.

3. Erythropoetin (EPO) induced decrease in hepcidin determines bone marrow response in patients with combined heart and renal failure

K. van der PUTTEN¹, D. van den BROEK¹, R.J. KRAAIJENHAGEN¹, D.W. SWINKELS², C. GAILLARD¹
*Department of Internal Medicine¹, Department of Clinical Chemistry¹, Meander Medisch Centrum, Amersfoort;
Department of Clinical Chemistry², RUMC, Nijmegen*

Introduction: Many patients with combined heart failure, chronic kidney disease and anemia are resistant to EPO. In ESRD, hepcidin levels are higher than in healthy controls. Our hypothesis is that EPO decreases hepcidin levels in patients with cardiorenal failure. We also tested whether the decrease in hepcidin levels upon EPO treatment is related to bone marrow response.

Methods: In an open-label randomized trial in patients with cardiorenal failure (MDRD 20-70 ml/min) and anemia (EPO-CARES; see ClinicalTrials.gov), patients were randomized on a 2:1 basis to receive 50 IU/kg/week EPO (n=13) or not (n=7). Hb, hepcidin, O/P ratio, ferritin, reticulocytes (Ret), soluble transferrin receptor (sTfR) and Reticulocyte Hb content (RetHe) were measured at baseline and after 3 weeks. Plasma levels of hepcidin were measured by SELDI-TOF MS.

Results: Both groups were comparable for age, renal function, left ventricular ejection fraction and all other measured

parameters. At baseline, there was no significant association between hepcidin and renal function, Hb, O/P ratio, Ret, sTfR, and RetHe. However, hepcidin significantly correlated with ferritin ($r=0.73$, $p<0.0001$). EPO treatment increased Ret ($p<0.001$) and sTfR ($p=0.001$), but decreased hepcidin ($p=0.001$). Baseline levels of hepcidin correlated with the change in Ret ($r=0.56$, $p=0.049$). The decrease in hepcidin correlated with the increase in Ret ($r=-0.76$, $p=0.003$) and the increase in sTfR ($r=-0.71$, $p=0.007$). There was no correlation between O/P ratio and change in Ret or sTfR.

Conclusion: In patients with cardiorenal failure, EPO decreased hepcidin levels. A stronger decrease in hepcidin was associated with an increased early bone marrow response to EPO. This supports that EPO acts through a decrease in hepcidin. This suggests that EPO-induced decrease in hepcidin predicts response to EPO.

4. Validatie van de 'raaklijnmethode' voor het bepalen van bloedpigmenten in liquor cerebrospinalis

F. WEERKAMP, K.M.T. de BRUYN, R.W. WULKAN
Afdeling Klinische Chemie, Maasstad Ziekenhuis, Rotterdam

Inleiding: Bij verdenking op een subarachnoidale bloeding (SAB) met een negatieve CT-scan, worden bilirubine en oxyhemoglobine in liquor spectrofotometrisch bepaald. Voor de analyse hiervan bestaan verschillende methodes. In het Maasstad Ziekenhuis werd tot voor kort gebruik gemaakt van een iteratief model ontwikkeld in het LUMC. Omdat de indruk was ontstaan dat deze methode soms vals-positieve resultaten geeft, werd een andere methode getest. Hierbij wordt een raaklijn getrokken aan het absorptiespectrum, waarboven de netto bilirubine en oxyhemoglobine absorptie wordt afgelezen. Deze methode wordt aanbevolen in de richtlijnen van de UK NEQAS (ref).

Methode: Een vergelijking van de LUMC methode en de raaklijnmethode werd gedaan met een kleine serie liquoren. De juistheid van beide methodes werd bepaald met een reeks verdunningen van neonataal plasma in water. Van de raaklijnmethode werd de precisie rond het beslispunt bepaald door vijf

absorptiespectra van hetzelfde monster elk door vijf verschillende analisten te laten beoordelen.

Resultaat: In een serie van 7 liquoren die door de LUMC-methode positief waren bevonden, waren 6 monsters negatief met de raaklijnmethode. In geen van deze patiënten werd klinisch een SAB gediagnosticeerd. Eén patiënt die mogelijk wel een SAB had, werd door de raaklijn methode benoemd als 'SAB niet uit te sluiten'. Het verschil tussen de gemaakte concentratie bilirubine en de concentratie gemeten met de raaklijnmethode varieerde tussen -7 en 17%. De variatiecoëfficiënt bij 0,15 $\mu\text{mol/l}$ bilirubine was 9,6%, waarbij de interbeoordelaar variatie kleiner was dan de variatie tussen de metingen.

Conclusie: De Engelse raaklijnmethode is betrouwbaar en voldoende precies. De procedure is eenvoudig en kan in de routine worden toegepast.

Literatuur: Cruickshank et al, Ann Clin Biochem 2008; 45: 238-244

5. Spermatozoa count on chip

L.I. SEGERINK¹, R.J. RATERINK¹, A.J. SPRENKELS¹, A. van den BERG¹, I. VERMES^{1,2}
BIOS, the Lab-on-a-Chip group¹, MESA+ Institute for Nanotechnology, University of Twente, Enschede; Department of Clinical Chemistry², Medisch Spectrum Twente, Enschede

Introduction: Semen analysis is usually one of the first tests performed for detecting the cause of infertility of a couple. One of the most important parameters is the spermatozoa concentration. Due to the intra-individual variation in the semen quality, the result of a single test is not reliable (ref). To make it more objective, cheaper and patient friendly, a lab-on-a-chip is developed. The possibility to detect spermatozoa on chip is investigated.

Methods: Electrical conductivity measurements are used to detect spermatozoa. Since the volume fraction of spermatozoa in the semen is small (0.1% for $20 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$), the cells are counted in a small channel. In case of a different conductivity between the spermatozoon and the surrounding medium, an impedance change can be detected when a cell passes the electrode pair, as a result of a change in the electrical conductivity. A glass-glass chip has been produced containing micro-

channels with a depth and width of 20 and 42 μm respectively. Two planar platinum electrodes are situated in the channel with an interelectrode distance of 30 μm . The chip was loaded by capillary filling with washed semen. With the measurement system it was possible to simultaneously detect the spermatozoa and to acquire video images.

Results: When a spermatozoon passed the electrode pair, a change in the relative impedance was measured. The average change in relative impedance caused by one spermatozoon was $0.08\% \pm 0.02\%$.

Conclusion: It is possible to detect and count spermatozoa using electrical conductivity measurements. Further investigation is focused on determining the concentration from the measurements.

Literatuur: Keel, Fertil Steril 2006; 85: 128

6. Vitamine-B12-bepaling: probleem opgelost!

A.P. van ROSSUM^{1,2}, F.M. VERHEIJEN³, J.M.T. KLEIN GUNNEWIEK⁴, A. CASTEL², M.A. FOURAUX³
CKCL¹, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden; KCHL², Ziekenhuis Bronovo, Den Haag; GKCL³, Albert Schweitzer ziekenhuis & Beatrix ziekenhuis, Dordrecht; Afdeling Klinische Chemie⁴, UMC St Radboud, Nijmegen

Inleiding: Vitamine B12 (VB12) wordt door de laboratoria van de auteurs gemeten met een competitieve immunoassay van Siemens op de Immulite 2000/2500. Eerder publiceerden we over problemen bij deze bepaling, met name over de juistheid in het concentratiegebied onder de 150 pmol/l (ref). De VB12-bepaling is door de fabrikant aangepast. Dit abstract beschrijft de evaluatie van deze nieuwe bepaling.

Methode: De nieuwe VB12-bepaling is geëvalueerd met behulp van correlatiestudies tussen de oude en nieuwe bepaling. Daarnaast is de nieuwe methode gecorreleerd met een VB12-bepaling van een andere firma. Na vrijgave van de nieuwe test zijn de patiëntmaandgemiddelden retrospectief bepaald.

Resultaat: De interne kwaliteitscontrole van de nieuwe VB12-bepaling liet een vergelijkbare correlatiecoëfficiënt zien ten opzichte van de oude bepaling; 4,9% VC (gemiddeld 296 pmol/L). De oude VB12-bepaling met de Immulite 2500 meet 30-35 pmol/l lager dan de Immulite 2000 assay (ref en nieuwe data). De nieuwe aangepaste VB12-bepaling daarentegen laat

geen significant verschil zien ten opzichte van de Immulite 2000 test (Immulite 2000 = 0,97 Immulite 2500 (nieuw) + 0,96 pmol/l; n = 173). Ook de correlatie met een VB12-test van een andere firma was goed. Het patiëntmaandgemiddelde met de nieuwe VB12-bepaling is 345 pmol/l (~ 1500 patiënten/maand), met 1-2% VB12's kleiner dan 112 pmol/l. Dit is een normalisatie ten opzichte van de oude VB12-test, waarbij een patiëntmaandgemiddelde van 310 pmol/l met 5-6% VB12's kleiner dan 112 pmol/l gevonden werd.

Conclusie: Door samenwerking tussen onze laboratoria en Siemens is het gelukt om een aangepaste Immulite 2500 VB12-bepaling te genereren, waarbij de eerdere problemen zijn opgelost. De patiëntmaandgemiddelden blijken voor deze test een waardevolle tool te zijn om de kwaliteit van de assay te monitoren.

Literatuur: Fouraux et al, NTKCL 2008; 33: 170-172

7. Measurement of plasma creatinine in children: comparison of an enzymatic and compensated Jaffé method

J. CURVERS, H. AARTS, A.K. BOER, D. van de KERKHOF, V. SCHARNHORST
Department of clinical laboratories, Catharina Hospital, Eindhoven

Introduction: Different methods for the determination of plasma creatinine yield different results, especially at low concentrations (<60 µmol/L). The IFCC and also the SKML advise the use of IDMS-traceable methods. Moreover, as creatinine increases with age in children, age-dependent reference values are warranted (ref).

Methods: In this study we established reference intervals for different juvenile age groups using the compensated Jaffé method of Siemens (ADVIA1650). We also performed a correlation study between the compensated Jaffé method and an enzymatic assay (Siemens) for samples obtained from children. We established reference values, using creatinine results of 656 children <18 years from a hospital population and of 722 children <18 years from a laboratory for general practitioners, during the period of may-august 2007. As creatinine concentration was distributed normally (gaussian) in all age categories, we used mean ±2SD to determine reference values. For the

correlation study heparinized plasma samples were obtained from children aged <16 years (N=65).

Results: Creatinine levels of children from the two different laboratories did not differ substantially. Reference intervals were comparable for both sexes up to the age of 14 years. Above the age of 14 years reference intervals were relevantly different. The correlation coefficient for the Jaffé and enzymatic assay was reasonable (R = 0.82) with a regression equation (Passing-Bablok) "enzymatic" = 0.882 x "Jaffé" - 0.129.

Conclusion: We conclude that the established age dependent reference values are in agreement with Ceriotti et al (ref) and more specific than mentioned in current literature. The use of an enzymatic method results in significantly lower results (±12%) than the compensated Jaffé method at low levels of plasma creatinine.

Literatuur: Ceriotti et al, Clin Chem 2008; 54(3): 559-66

8. Evaluatie van de Instrumentation Laboratory bloedgasanalyser GEM Premier 4000

R.J. SANDERS, T. van IJZENDOORN, F.P.W. TEGELAERS
Laboratorium voor Klinische Chemie, Hematologie en Immunologie, Medisch Centrum Alkmaar, Alkmaar

Inleiding: De bloedgasanalyser GEM Premier 4000 (GEM4000) van Instrumentation Laboratory is voorzien van cartridges met een "Intelligent Quality Management". Deze technologie controleert 55 keer per etmaal de functie van het gehele meetproces. Dit betekent dat er geen dagelijks onderhoud op de instrumenten zou hoeven plaats te vinden. Dit maakt het apparaat een ideale kandidaat voor POC-analyses. Dit apparaat werd door ons geëvalueerd en gevalideerd voor natrium, kalium, chloor, pH, pCO₂, pO₂, co-oxymetrie, glucose, lactaat en geïoniseerd calcium.

Methode: De GEM4000 is met een EP5-protocol gevalideerd voor de imprecisie. Er werd gebruik gemaakt van controles op twee verschillende niveaus: GEM CVP1 en GEM CVP2. De referentieanalyser was de Radiometer ABL 625. De methodevergelijking werd met Passing en Bablok uitgevoerd met patiëntenmateriaal uit de kliniek (n=94).

Resultaat: Controles in beide concentratieranges van alle bepalingen voldeden volgens het EP5-protocol aan de gestelde validatiecriteria. De total error voor zowel de lage- als hoge controles bedroeg voor de elektrolyten <1%, lactaat en glucose <6%, bloedgasen 3% en co-oxymetrie <3%. De resultaten liggen in dezelfde range als de referentie apparatuur. In de correlatiestudie was het 95% betrouwbaarheidsinterval van de slope in de methodenvergelijking voor alle bepalingen tussen de 0,9 en 1,1, met uitzondering van chloride (slope: 1,0 - 1,3; intercept: -29,7 - 0,0) en pH (slope: 1,2 - 1,3; intercept: -2,2 - -1,5).

Conclusie: Uit de resultaten van zowel de precisiestudie als de methodevergelijking blijkt dat de GEM Premier 4000 een geschikte bloedgasanalyser is voor het laboratorium. Daarnaast is de eenvoud van de bediening en het geringe onderhoud een extra argument voor het gebruik van deze analyzer als POCT-apparaat op andere afdelingen in het Medisch Centrum Alkmaar.

9. Evaluatie van de Rapidlab 1265 bloedgasanalyser

N.E. AJUBI, G.S. SEWRAJSINGH

Klinisch Chemisch Laboratorium, St. Elisabeth Hospitaal, Willemstad, Nederlandse Antillen

Inleiding: De analyse van bloedgassen is van belang voor het opsporen van stoornissen in het zuur-base-evenwicht die veroorzaakt kunnen worden door metabole dan wel respiratoire mechanismen. Recentelijk is in dit ziekenhuis nieuwe bloedgasapparatuur aangeschaft en is deze gevalideerd conform aanbevelingen zoals beschreven in de literatuur.

Methode: Voor de validatie zijn twee studies gedaan. Precisie (within-run en between-run)-studies en een correlatiestudie met de bestaande analyser (Bayer BG 845). Bij de precisie-studies, waarbij 3 niveau's QC-materiaal is gebruikt, zijn de volgende parameters onderzocht: pH, PCO₂, pO₂, hemoglobine (Hb), glucose, lactaat, en calcium. Voor de correlatiestudie (waarbij patiëntmateriaal is gebruikt) zijn de volgende parameters meegenomen: pH, pO₂, pCO₂, en Hb. Voor de statistiek is gebruik gemaakt van het programma CBStat waarbij Passing-Bablok is toegepast.

Resultaat: De binnenrun-CV% (alle 3 niveau's) is voor alle onderzochte parameters < 2.5%. Voor de betweenrun zijn de volgende representatieve data gevonden (gem, SD, CV%): pH (7.351, 0.04, 0.048), pO₂ (102 mm Hg, 1.3, 1.3), pCO₂ (39.9 mm Hg, 0.8, 2.0), glucose (101 mg/dl, 2, 2), Hb (14 g/dl, 0.2, 1.1), lactaat (12.27 mmol/l, 0.46, 3.78), en calcium (1.63 mmol/l, 0.03, 1.21). De correlatiestudie laat voor alle gemeten parameters een slope zien tussen de 0.95 en 1.05 en een intercept dat verwaarloosbaar is met daarbij een correlatiecoëfficiënt R > 0.95.

Conclusie: De Rapidlab 1265 vertoont goede precisiedata voor de onderzochte parameters en kan gezien de correlatiedata ingevoerd worden voor productie. Het binnenkort beschikbaar worden van bilirubine op deze analyser maakt het zeker tot een volwaardig bloedgasapparaat dat simpel in gebruik is met ready-to-use cartridgereagentia.

Hemocytometrie, flowcytometrie, hemostase

10. Trombinegeneratie als hemostase-indicator: validatie in een CVVH-setting

A. LEYTE¹, M. van SCHILFGAARDE¹, P.J. MOLENAAR¹, N.R. WIERTZ¹, J.P.J. WESTER², H.M. OUDEMANS-van STRAATEN²

HKCL¹ en Intensive Care Unit², Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam

Inleiding: De Endogene Trombine Potentiaal (ETP, Siemens Diagnostica) behelst een in-vitrosysteem voor trombinegeneratie en zou aanvullende informatie kunnen geven ten opzichte van routinestollingstesten. In dit onderzoek is gebruikt gemaakt van monsters uit een nadroparine-klaringsstudie, met als onderzoeksvraag of nadroparine accumuleert tijdens continue venieuze hemofiltratie (CVVH), om een indruk van de betekenis van de ETP voor de kliniek te verkrijgen.

Methode: Studieopzet: Twaalf intensive-carepatiënten met acute nierinsufficiëntie werden tijdens CVVH behandeld met het laagmoleculairheparine (LMWH) en nadroparine (2850 IE iv voor start, 380 IE/u). Op verschillende tijdstippen werd arterieel bloed en bloed uit het extracorporele circuit direct na het filter afgenomen. Hierin zijn de anti-Xa-activiteit als maat voor LMWH-spiegels en de ETP gemeten. De verkregen parameters zijn onderling vergeleken.

Resultaat: De belangrijkste bevindingen vanuit de nadroparinestudie waren dat in arterieel bloed de anti-Xa-waarde maximaal was na de bolus nadroparine en daarna geleidelijk daalde. Het beloop van de ETP was tegenovergesteld en significant gecorreleerd aan anti-Xa (R = -0.343, p = 0.001). In post-filterbloed was de anti-Xa stabiel, terwijl de AUC-ETP toenam in de tijd.

Conclusie: LMWH-nadroparine, intraveneus toegediend als bolus gevolgd door een continue infuus, accumuleert niet in het lichaam tijdens CVVH. In arterieel bloed lijkt de ETP een gevoelige maat voor de antistollende activiteit van LMWH. De toename van de AUC-ETP in postfilterbloed in de tijd kan wijzen op progressieve hypercoagulabiliteit in het filter ondanks een stabiele anticoagulante activiteit zoals gemeten met anti-Xa. Dit is onderwerp van nader onderzoek.

11. Recommended assay method for factor VIII clotting activity. Can it prove acquired factor VIII deficiency?

J. RUINEMANS-KOERTS¹, I. PETERSE-STIENISSEN², B. VERBRUGGEN²

Laboratory of Clinical Chemistry and Haematology¹, Rijnstate Hospital, Arnhem; Laboratory of Haematology², University Medical Centre St Radboud, Nijmegen

Introduction: A decade ago, the ECAT Foundation published a recommended assay method for analyses of factor VIII clotting activity (ref). This method is based on a generally well accepted one stage VIII clotting assay and performed according to a Parallel Line Bioassay. Non-parallelism indicates the presence of inhibitory or otherwise disturbing factors, and factor VIII activity results should be regarded as incorrect. However, which inhibitory factors cause deviation of parallelism? It can be well argued that the presence of lupus anticoagulans will cause non-parallelism as dilution of plasma will lower its concentration. In case of factor VIII antibodies this is less clear. Non-parallelism will only appear when dilution of patient plasma results in disintegration of the factor VIII/antifactor VIII antibody complex.

Methods: A factor VIII activity assay was performed according to the ECAT guideline (ref) from the following patient plasma's, containing: 1) lupus anticoagulans, 2) type 1 factor VIII antibodies, 3) type 2 factor VIII antibodies.

Results: The lupus anticoagulans positive patient sample clearly shows deviation from parallelism. In contrast, both the type 1 and 2 factor VIII antibody positive patient samples don't show any significant deviation from parallelism as compared to the reference plasma.

Conclusion: The recommended procedure for performing the one-stage factor VIII clotting activity assay by the ECAT Foundation (ref) can detect the presence of lupus anticoagulans/lupus like antibodies but not type 1 and 2 factor VIII inhibitors. Presence of factor VIII inhibitors should be analysed according to a Bethesda assay, by making patient plasma dilutions with a normal pool plasma.

Literature: Mannucci PM, Tripoli A. Factor VIII Clotting Activity. Laboratory Techniques in Thrombosis. A Manual, 2nd revised edition of ECAT Assay Procedures 1999; 107-113

12. Evaluatie van de Cellavision DM8

H. CEELIE¹, H. MOOKHOEK¹, W. van GELDER²

Laboratoria (KCL, MML en Trombosedienst)¹, Vlietland ziekenhuis, Schiedam; Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium², Albert Schweitzer ziekenhuis, Dordrecht

Inleiding: Digitale morfologie is bezig een vaste plek te overerven op het klinisch chemisch-hematologisch laboratorium. Naast de alom bekende DM96 heeft de firma Cellavision sinds enige tijd een nieuw apparaat, genaamd DM8, ontwikkeld. Met deze analyser mikt de firma op kleinere/middelgrote laboratoria. In dit onderzoek werden de analytische prestaties van de DM8 getest.

Methode: De DM8 is een geautomatiseerd digitaal cel morfologie en informatie systeem voor het lokaliseren, classificeren, tonen, bewaren en digitaal verzenden van gedigitaliseerde beelden van leukocyten en erythrocyten in bloeduitstrijkjes. Er kunnen tot 8 bloeduitstrijkjes geladen worden. Leukocyten worden geïdentificeerd (pre-classificatie) en de erythrocyten morfologie wordt beoordeeld. Eventuele herclassificatie vindt plaats door de analist (post-classificatie). De juistheid werd getest door 200 bloeduitstrijkjes te beoordelen en de resultaten te vergelijken met resultaten van de manuele beoordeling en de DM96. De precisie werd beoordeeld door 4 uitstrijkjes tienmaal te analyseren. De doorvoersnelheid werd getest door van

8 normale bloeduitstrijkjes 100, 200, 300, 400 cellen te tellen en de analysetijd te bepalen.

Resultaat: De celcategorieën neutrofielen, basofielen, lymfocyten, monocyt en eosinofielen werden door de DM8 in 92% van de gevallen correct geïdentificeerd (pre-classificatie). Regressiecoëfficiënten voor de vergelijking van de post-classificatie resultaten met manuele differentiatie waren respectievelijk 1.06(r²:0.61), 0.98(r²:0.93), 0.97(r²:0.69), 0.99(r²:0.94), 1.03(r²:0.75), 1.04(r²:0.81), 0.99(r²:0.99) voor de categorieën staven, segmenten, basofielen, lymfocyten, monocyt, eosinofielen en blasten. Vergelijkbare resultaten werden gevonden voor de vergelijking met de DM96. Dupliceerbaarheid voor alle relevante celcategorieën was goed. De doorvoersnelheid was 19.1(100 cellen), 12.3(200), 9.1(300) en 7.5(400) uitstrijkjes/uur. **Conclusie:** De DM8 doorstaat de vergelijking met manuele differentiatie en de DM96 uitstekend. Potentiële nadelen zijn dat de DM8 in vergelijking met de DM96 langzamer is en niet uitgebreid kan worden met modules voor analyse van beenmergen/lichaamsvochten.

13. Verbetering van de diagnostische accuratesse van linksverschuivingen op de hemocytometer (BC LH750)

A.P. van ROSSUM¹, R. HUISMAN², M.G. SLAGTER-ZWIER¹, A. CASTEL¹

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹, Ziekenhuis Bronovo, Den Haag; Beckman Coulter Nederland BV², Woerden

Inleiding: In de diagnostiek van infectieziekten speelt de linksverschuiving van granulocyten een belangrijke rol. De hemocytometer LH750 van Beckman Coulter (BC) genereert op basis van zowel de celltelling als morfologische karakteristieken, gemeten via de VCS technologie, indicatoren als 'NEBLAST' en 'IMM2'. Dit zijn indicatoren die volgens de fabrikant zouden duiden op een toegenomen aantal onrijpe granulocyten (staven), ofwel linksverschuiving. Op basis van deze indicatoren wordt automatisch een bloeduitstrijkje gegenereerd, dat vervolgens microscopisch door een analist wordt beoordeeld. Deze differentiatie van leukocyten vereist echter veel tijd en expertise van de beoordelaar. Om die reden is het belangrijk dat de gegenereerde indicatoren sensitief en specifiek zijn voor de detectie van staven. In dit onderzoek zijn bestaande indicatoren vergeleken met experimentele granulocyttaire parameters. De experimentele parameters zijn gebaseerd op Research Population Data (RPD) van BC en zijn statistische parameters als standaarddeviatie (SD) en het gemiddelde (MEAN) van het volume van de granulocyt (NEV).

Methode: Bestaande indicatoren (NEBLAST, IMM2, NE#>15/nl en/of NE%>85%) en een combinatie van 4 experimentele indicatoren (I. IMM1 en NEVSD>24,5; II. IMM1 en NEVMEAN>152; III. NE#>2,5 en NEVSD>26; IV. NE#>2,5 en NEVMEAN>160) werden vergeleken met de microscopische telling van het aantal staven. Een aantal van meer dan 0,5 staven/nl gold als linksverschuiving.

Resultaat: De bestaande indicatoren hadden een sensitiviteit en specificiteit van respectievelijk 66 en 54% (n=292), terwijl de experimentele indicatoren een sensitiviteit en specificiteit van respectievelijk 74 en 65% (n=292) behaalden.

Conclusie: Experimentele indicatoren op de LH750 voor linksverschuivingen laten een circa 10% hogere sensitiviteit en specificiteit zien dan de bestaande indicatoren. Om die reden zijn de bestaande indicatoren vervangen door experimentele indicatoren als voorselectie voor de manuele differentiatie.

14. Trombocytenagglutinatie niet gedetecteerd door Cell-Dyn 4000 hematologie analyseautomaat

W.M. TIEL GROENESTEGER¹, H.M.G.A. van der HEIJDEN¹, L. PORCELIJN², M.J.W. JANSSEN¹

Laboratorium voor Klinische Chemie en Hematologie¹, VieCuri Medisch Centrum, Venlo/Venray; Immunohematologie Diagnostiek², Sanquin Diagnostiek, Amsterdam

Inleiding: Bij een patiënt opgenomen wegens osteomyelitis aan de voet werd bij verschillende bloedafnames een trombocytopenie (20-65 x 10⁹/L) gerapporteerd. Deze werd echter na verloop van tijd op klinische gronden in twijfel getrokken. De ruwe data bij de betreffende trombocytentellingen lieten geen 'flags' zien. Desondanks werd besloten om onderzoek naar pseudotrombocytopenie uit te voeren wat, indien niet opgemerkt, ernstige gevolgen kan hebben.

Methode: Bij de patiënt werd vers EDTA-, citraat- en stobloed afgenomen. Stobloed werd direct na afname uitgestreken voor microscopisch onderzoek. De bepaling van het aantal trombocyten werd uitgevoerd met behulp van de Cell-Dyn 4000 hematologie analyse-automaat (Abbott). Serum werd voor onderzoek naar trombocytentistoffen verzonden naar Sanquin Diagnostiek.

Resultaat: De trombocytentelling in EDTA-bloed resulteerde in de waarde 62 x 10⁹/L, waarbij wederom geen 'flags' werden gegenereerd. Microscopisch waren in een EDTA-bloeduitstrijk veel grote trombocytentistoffen aantoonbaar, terwijl in het vers uitgestreken stobloed geen agglutinatie aanwezig was. Het aantal trombocyten in (1) EDTA-bloed na 30 minuten incubatie bij 37 °C, (2) EDTA-bloed na toevoeging van kanamycine en (3) citraatbloed was 201 (met 'flag' PltClmp), 390 en 339 x 10⁹/L, respectievelijk. Het antistofonderzoek in serum toonde uitsluitend IgM antistoffen aan die alleen aan donortrombocyten bonden in aanwezigheid van EDTA en bij kamperatuur. De aanwezige IgM antistoffen bonden niet aan donortrombocyten in EDTA vrij milieu en/of bij 37 °C.

Conclusie: In deze casus werd trombocytenagglutinatie niet gedetecteerd door de Cell-Dyn 4000 hematologie analyse-automaat waardoor een onjuist verlaagd aantal trombocyten werd gerapporteerd. De oorzaak is hoogstwaarschijnlijk ge-

legen in het feit dat detectie van trombocytenagglutinatie in de analyse-automaat plaatsvindt in het leukocytenkanaal bij circa 40 °C, terwijl de trombocytentelling uitgevoerd wordt bij kamertemperatuur.

15. Expressie van tissue factor op monocytten is verhoogd bij patiënten met een myocardinfarct

J.F.W. KEUREN, M.P.G. LEERS

Afdeling Klinische Chemie en Hematologie, Atrium Medisch Centrum Parkstad, Heerlen

Inleiding: Het myocardinfarct (MI) wordt geassocieerd met een toegenomen procoagulante activiteit. Deze procoagulante activiteit is mogelijk het gevolg van tissue factor (TF) in de bloedbaan (blood-borne TF). TF in de vaatwand is noodzakelijk voor hemostase en circulerend TF speelt mogelijk een rol bij pathologische groei van een trombus. Expressie van TF op monocytten wordt onder andere geïnduceerd door binding aan geactiveerde trombocyten. Het doel van deze studie was het bepalen van 1) TF-expressie op monocytten en 2) monocyt-trombocyt complexen, bij patiënten die zich presenteren met een MI op de SEH.

Methode: Met behulp van multiparameter flowcytometrie is gekeken naar expressie van TF (anti-TF-FITC) op monocytten (anti-CD14-APC) en naar monocyt-trombocyt (anti-CD41-PerCP-Cy5.5) complexen bij gezonde controles (n=23) en bij patiënten met MI (troponine T>0.1 bij binnenkomst op SEH; n=12).

Resultaat: De TF-expressie op monocytten bij MI patiënten (91.3%±6.7) is significant (p=0.003, Mann Whitneytest) verhoogd ten opzichte van gezonde controles (64.7±24.6). Bij een cut-off waarde van 76% is de sensitiviteit van de monocyt-TF bepaling bij MI 100% met een specificiteit van 65% (AUC=0.81). Ook het percentage monocyt-trombocyt complexen is significant verhoogd bij MI (84.0%±13.5 versus 57.9%±27.3; p=0.007). Bij een cut-off waarde van 51% is de sensitiviteit van de monocyt-trombocyt bepaling bij MI 100% met een specificiteit van 61% (AUC=0.78).

Conclusie: TF expressie en circulerende complexen van monocytten en trombocyten zijn significant verhoogd bij MI patiënten. De procoagulante activiteit die men vaak ziet bij myocardinfarcten kan mogelijk geïnduceerd worden door de verhoogde expressie van TF op circulerende monocytten.

16. "To fish or not to fish": twee methoden voor het opwerken van beenmergaspiraats voor flowcytometrische beenmergdiagnostiek

J.K. van der MOLEN-SINKE, A.P. ABBES, R.K. SCHINDHELM, P.A. KUIPER-KRAMER

Afdeling Celtechnieken, Klinisch Chemisch Laboratorium, Isala klinieken, Zwolle

Inleiding: Voor een betrouwbare immunofenotypering van beenmergaspiraats ten behoeve van hemato-oncologische laboratoriumdiagnostiek is het van belang dat zo min mogelijk bijmenging optreedt van perifere bloed. In de meeste laboratoria wordt het gehele beenmergaspiraats gehomogeniseerd (methode A) en de bloedbijmenging berekend. Door de beenmergbrokkjes uit het beenmergaspiraats te verzamelen (brokjes vissen) en te homogeniseren (methode B), kan het effect van bloedbijmenging tot een minimum beperkt worden. In dit onderzoek zijn de zuiverheid (bloedbijmenging) van beide methoden met elkaar vergeleken.

Methode: Van de 58 beenmergaspiraten zijn 20 verwerkt volgens methode A (homogenisatie) en 38 verwerkt volgens methode B (brokjes vissen). Voor het bepalen van de zuiverheid werd gebruik gemaakt van de Holdrinet-factor waarbij de zuiverheid wordt berekend op basis van de verhouding van de erythrocyten en de kernhoudende cellen in bloed en beenmerg (ref).

Resultaat: De gemiddelde zuiverheid van het opgewerkte beenmergaspiraats was significant hoger bij methode B (88% [30-99%]) dan bij methode A (78% [48-99%]) (P<0.02). Opvallend is echter de hoge bijdrage van losse beenmergcellen aan het aspiraats. Metingen in dit beenmerg/bloed lieten een zuiverheid zien met Δ6% verschil dan methode B.

Conclusie: De gemiddelde zuiverheid van gehomogeniseerde beenmergbrokkjes (methode B) is 10% hoger dan het gehomogeniseerde aspiraats (methode A). Het aandeel van losse beenmergcellen aan het beenmergaspiraats is dermate hoog, dat getwijfeld kan worden aan de representativiteit van de beenmergbrokkjes. Selectief celverlies bij het vissen van de beenmergbrokkjes (methode B) kan niet worden uitgesloten en daarom heeft de methode waarbij het gehele beenmergaspiraats gehomogeniseerd (methode A) voorkeur, mede omdat deze methode ook hygiënischer en minder arbeidsintensief is.

Literatuur: Holdrinet et al, Exp Hematol 1980; 8: 103-107

17. Flowcytometric measurement of transport of lipoproteins on leukocytes and erythrocytes

T.L. NJO¹, E. PETERS¹, S. MARTINEZ³, A. ALIPOUR³, M.H. BEUNIS¹, M. CASTRO CABEZAS², J.W. JANSSEN¹

Department of Clinical Chemistry¹, Department of Internal Medicine², Sint Franciscus Guesthouse, Rotterdam;

Department of Medicine³, Service of Endocrinology and Nutrition, Hospital Clinico Universitario de Valencia, Spain

Introduction: Atherosclerosis is an inflammatory disease in which leukocyte activation plays a pivotal role (1). Evidence has been accumulating that leukocytes and erythrocytes are involved in the transport of lipoproteins (2). Since apolipoprotein B (apoB) is linked in a one to one relation with an important atherogenic fraction of the lipoproteins, we argued that measurement of apoB on the surface of leukocytes and erythrocytes could be a valuable tool in mechanistic and clinical studies of cellular transport of lipoproteins and leukocyte activation.

Methods: EDTA-anticoagulated blood was used for cellular apoB measurement. As primary antibodies we used polyclonal

goat anti apoB antibodies (Millipore USA). As secondary antibodies we used FITC conjugated rabbit anti-goat antibodies (Nordic, the Netherlands). For the leukocyte measurement we lysed the erythrocytes with an ammonium chloride solution. For differentiation of leukocyte populations we used an ECD conjugated CD 45 antibody (Beckman Coulter, USA). As control for aspecific staining we used polyclonal goat antibody in different titers. Every sample was washed at least three times before measurement to avoid interference of serum lipoproteins. Measurement were done on a Beckman Coulter Epics XL-MCL flowcytometer.

Results: In several healthy volunteers we found a significant and specific staining of the anti apoB antibodies on both leukocytes and erythrocytes. Fluorescence in arbitrary units for lymphocytes, monocytes and granulocytes was 1,6, 8,4 and 41,8 versus 0,7, 2,8 and 19,8 for the autofluorescence respectively.
Conclusion: Flowcytometric measurement of apoB on leuko-

cytes and erythrocytes is technically possible and will be used as a tool in mechanistic and clinical studies of cellular transport of lipoproteins and leukocyte activation.

Literature: 1. Danesh et al, BMJ 2000; 321: 199-204 ; 2. Alipour et al, Circulation 2007; 114: II: 341

18. Snelle immunologische screening van nieuwe lymfocytosepatiënten met behulp van een routinehematologie-analyser

H.J. ADRIAANSEN¹, G.A. van den BERG², M.H. HERRUER³, J.H.N. SCHUITEMAKER⁴, J.W. SMIT⁵, T. van WEEL⁶, J.J.M.L. HOFFMANN⁷
Gelre Ziekenhuizen¹, Apeldoorn; Klinisch Chemisch Laboratorium², Leeuwarden; Medial³, Hoofddorp; IQ Products⁴, Groningen; Martini Ziekenhuis⁵, Groningen; Tergooi Ziekenhuizen⁶, Blaricum; Abbott Diagnostics⁷, Wiesbaden, Duitsland

Inleiding: Het doel van de studie was, de haalbaarheid te onderzoeken van een snelle, oriënterende immuuntypering om bij een nieuw gevonden lymfocytose direct vast te stellen of die "pluis of niet pluis" is. Het immuunprofiel werd in vijf laboratoria gemeten op Cell-Dyn Sapphire hematologie analysers. Tevens werd de incidentie van verschillende oorzaken van lymfocytose onderzocht.

Methode: Panel van 7 monoclonale antistoffen, gelabeld met FITC en PE, gemeten in Cell-Dyn Sapphire analysers. Het CD3/4/8 programma werd gebruikt om een immuunprofiel te maken van nieuwe gevallen van lymfocytose ($>5.0 \times 10^9/L$) bij patiënten boven 12 jaar. Hiervoor werd hetzelfde bloedmonster gebruikt waarin de lymfocytose werd gevonden.

Resultaat: Bij 112 evalueerbare patiënten werden 77 gevallen gevonden van reactieve lymfocytose: toename van T-lymfocyten, al of niet met verhoogde B- en/of NK-lymfocyten. Bij 35 patiënten waren alleen B-lymfocyten verhoogd, waarvan 25 gevallen met hetzelfde aantal CD3-, 5+ lymfocyten. Dit CLL-achtige fenotype kan goed passen bij een maligniteit. De 10 gevallen van CD5-B-lymfocyten kunnen reactief zijn, maar wellicht ook maligne. HLA-Dr droeg niet bij aan het classificeren van de patiënten.

Conclusie: Het immuunprofiel bleek goed uitvoerbaar in een routine setting; het panel antistoffen kan verder vereenvoudigd worden met volledig behoud van informatie. Minstens 22% van de gevallen werd als "niet pluis" beoordeeld; in deze gevallen is follow-up aangewezen.

19. Digital Morphology: a proven concept in the modern laboratory

J.A. RIEDL, R.B. DINKELAAR, W. van GELDER
GKCL, Albert Schweitzer Hospital, Dordrecht

Introduction: A few years ago, a new digital microscope system (DM96, Cellavision, Sweden) was introduced. We extensively tested this system in classifying all major peripheral white blood cell categories. Based on our findings and those of previous evaluations of the DM96, we decided to put the DM96 into practice in our centre location. Currently, our digital microscope system is fully integrated in the routine haematology workflow for more than 2 years. A routine 200 cell differential takes circa 2 minutes, including post-classification and reporting to the LIS. Our daily workload of peripheral blood smears is processed by a single laboratory technician. The manual review rate decreased from 19% (before introduction of digital morphology) to currently less than 0.5% of all samples. Recently, a new software module was developed enabling the DM96 to also analyse cytospin slides of spinal fluid and other body fluid samples (e.g. abdominal and

pleural fluid). The system automatically recognizes neutrophils, lymphocytes, macrophages, eosinophils, smudge cells and artefacts and classifies all other cells in the category "other".

Methods: Body fluid samples were analysed on the DM96 and manually by a laboratory technician.

Results: A study in 116 samples demonstrates an overall pre-classification accuracy of 90% in spinal fluid and 86.4% in other body fluids. Post-classification correlation coefficients with manual review results for spinal fluid sample analyses are between 0.97 and 0.99 and between 0.89 and 0.99 for other body fluids. The within run variation is less than 6% for all cell categories (< 4% excluding macrophages).

Conclusion: The DM96 has proven to be reliable and efficient, contributing to overall quality improvement in morphological analysis of peripheral blood and other body fluid samples.

20. Validatie van de nieuwe hematologieanalyser Siemens ADVIA 2120i

Y. KLUITERS-de HINGH, M. JANSEN, G. SPITS, B. van HINTUM, I. van GELDER, E. van WIJK
Laboratorium voor Klinische Chemie Hematologie, St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg

Inleiding: Siemens heeft sinds juni 2008 een nieuwe hematologie-analyser, de ADVIA 2120i. De ADVIA 2120i is de opvolger van de ADVIA 120 en kan naast de uitgebreide 5-part-dif en NRBC-telling ook leucocyten in overige lichaamsvochten meten, te weten liquor, pleuravocht, ascitesvocht en synoviaal vocht. In het Elisabeth en TweeSteden Ziekenhuis is de ADVIA 2120i de opvolger van de ADVIA 120.

Methode: De methode vergelijking voor het bloedbeeld en de leucocytdifferentiatie tussen de ADVIA 2120i en de ADVIA 120 werd volgens het CSLI EP9-protocol uitgevoerd. Van alle monsters werd tevens een uitstrijkje gemaakt voor de microscopische differentiatie. Dit maakte het mogelijk om de flaggings van de ADVIA 2120i te beoordelen. Naast bloedbeeld en differentiatie werd een methode vergelijking uitgevoerd tussen de NRBC telling van de ADVIA 2120i en de handtelling van de microscopische diff.

Resultaat: De nieuwe ADVIA 2120i laat zich goed vergelijken met de ADVIA 120 voor de parameters van het bloedbeeld en leucocytdifferentiatie. De correlatie-coëfficiënten zijn allen groter dan 0,90. Voor de flagging lijkt een aanpassing voor de blastenflag noodzakelijk. Echter de methode vergelijking van de NRBC telling van de ADVIA 2120i met de handmethode viel buiten de door ons gestelde eisen aan het begin van het validatie-traject.

Conclusie: De nieuwe Siemens ADVIA 2120i voldoet voor het bloedbeeld en differentiatie en gaat de ADVIA 120 hematologie-analysers vervangen. De nieuwe ADVIA 2120i zal over de locaties heen gekoppeld worden aan HemaLink, een softwarepakket waar de validatie van de patiëntmonsters en de afhandeling van de microscopische differentiatie. Gezien de slechte resultaten voor de NRBC-telling wordt er geen gebruik gemaakt van de automatische correctie van de leucocyten in geval van NRBC detectie door de ADVIA 2120i.

Immunoassay, (bloedgroepen-)serologie

21. Macrotrponine

E.C.H.J. MICHIELSEN¹, P.G.T. BISSCHOPS², M.J.W. JANSSEN¹

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹, Afdeling Cardiologie², VieCuri Medisch Centrum voor Noord-Limburg, Venlo en Venray

Inleiding: Een 35-jarige vrouw werd door de huisarts gezien wegens dyspnoe en recent ontstane pijn op de borst. De tropine I (cTnI) concentratie was verhoogd met een waarde van 6,4 µg/L (Architect: referentiewaarde <0,03 µg/L) bij een normaal ECG waarop patiënte naar de SEH werd verwezen. Coronairangiografie werd verricht welke normale coronairvaten toonde. De CT-scan ter uitsluiting van een longembolie liet geen afwijkingen zien. Viraal en autoimmuun serologisch onderzoek was negatief. Tijdens opname veranderde de cTnI concentratie niet significant. Het laboratorium werd uitleg gevraagd inzake deze onverklaarbaar, constant verhoogde cTnI concentratie.

Methode: Analytische interferentie werd onderzocht door verdunningsexperimenten uit te voeren met cTnI-negatief patiëntplasma en muizenserum. Polyethyleenglycol (PEG) precipitatie en gelfiltratiechromatografie (GFC) werden toegepast om een eventueel macrotrponine aan te tonen. De referentiewaarde van TnI na PEG precipitatie werd vastgesteld met behulp van 50 willekeurige patiënten met een cTnI concentratie tussen

0,10 en 45 µg/L. Tevens werd materiaal opgestuurd voor de bepaling van cTnT (Elecsys 2010) en cTnI met andere methoden (Access en MiniVidas).

Resultaat: Er waren geen aanwijzingen voor analytische interferentie. De recovery van cTnI na PEG precipitatie was 0 tot 4% voor patiënte. Bij de referentiepopulatie bedroeg de mediane recovery 52% met een minimale recovery van 31%. Met GFC werd duidelijk dat de cTnI activiteit bij patiënte in haar geheel aanwezig is in een hoogmoleculaire fractie welke ontbreekt bij het NIST standaardmateriaal en een willekeurige patiënt met een cTnI verhoging. Zowel de cTnT als beide andere cTnI bepalingen gaven een onmeetbaar laag resultaat.

Conclusie: In deze casus is sprake van een macrotrponine welke de oorzaak is van de hoge cTnI concentratie bij patiënte. Macrotrponine is nog niet als zodanig beschreven in de literatuur.

Literatuur: Clin Chem 2006; 52: 212-219

22. Analytical performance evaluation of the newly developed Elecsys sFlt-1 and Elecsys PIGF-assays on the Roche Molecular Analytics E170 analyzer

H. RUSSCHER, J. van GORP, C. van LEEUWEN, J. LINDEMANS

Department of Clinical Chemistry, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam

Introduction: Concentrations of soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt1) and placental growth factor (PlGF) are altered not only in acute preeclampsia but even several weeks before onset. This raises the possibility of measuring the ratio of these circulating angiogenic proteins in the blood as a diagnostic and predicting tool for preeclampsia. The purpose of this study was the technical performance evaluation of the newly developed sFlt-1 and PlGF assays on the Roche E170 analyzer.

Methods: The intra- and inter-assay precision were calculated with control material, spiked and early-, mid- and late pregnancy pools. Functional sensitivity was determined with male samples, while linearity testing was done by diluting high concentration samples with low concentrated pools. The PlGF and sFlt-1 assays were compared to the Quantikine micro-titerplate assays of R&D Systems by using routine pregnancy, non-pregnancy and manifest preeclampsia serum samples, which were also used to confirm lot-to-lot reproducibility.

Results: Intra-assay precision showed CV's lower than 6.1 and 3.3% and inter-assay precision lower than 7.1 and 3.0% for sFlt-1 and PlGF, respectively. Linearity testing showed linear relationships and functional sensitivity at the lowest level resulted in acceptable CVs (sFlt-1: 13.4% at 5.8 pg/ml; PlGF: 3.1% at 9.4 pg/ml). The method comparison showed 9.0% (sFlt) and 12.6% (PlGF) higher values for the Elecsys assays with satisfying correlation coefficients (sFlt:0.98 / PlGF:0.98) and intercepts (sFlt:-5.50 / PlGF:-1.81). The lot-to-lot comparisons showed excellent correlations.

Conclusion: The technical performance evaluation of Elecsys sFlt-1 and PlGF assays yielded good imprecision results, satisfying linearity and good correlation with the Quantikine assays. These new assays offer the convenience of a fully automated, ready to use reagent concept and are valuable as a diagnostic tool for preeclampsia.

23. Measuring salivary cortisol with the Architect i2000 random access analyser

A.C. HEIJBOER, F. MARTENS, M.A. BLANKENSTEIN

Department of Clinical Chemistry, VU University Medical Center, Amsterdam

Introduction: Screening patients for Cushing's syndrome, can be done with a late-night salivary cortisol.

Methods: We modified an existing automated assay for serum cortisol (chemiluminescence immunoassay (CLIA)) and compared its performance to that of a radioimmunoassay (RIA) tailored to measure salivary cortisol. Eighty-three samples from forty-nine patients were used for this comparison. We determined intra- and inter-assay variation and cross-reactivity with cortisone. Since no assays have been described yet for the Architect i2000, which use saliva as a matrix, we tested carry-over.

Results: The slope of the regression lines, determined with Passing & Bablock, was different between low (<12 nmol/L) and high saliva cortisol values (1.00 versus 0.85 respectively),

with an intercept of 0.1 and 0.2 nmol/L respectively. Correlation between the salivary cortisol RIA and the modified serum cortisol assay was high, below 12 nmol/L ($r^2 = 0.920$) as well as above 12 nmol/L ($r^2 = 0.991$). The modified serum cortisol assay is an assay which is comparable to or better than the salivary cortisol RIA in accuracy and reproducibility. The modified serum cortisol assay has no significant cross reactivity with cortisone (<4%). Moreover, no carry-over could be seen.

Conclusion: We conclude that this assay can be used in clinical research. The assay might become of interest to the clinical laboratory as well, because it allows running salivary samples frequently on a random access analyser and thus satisfying the increased popularity of salivary cortisol measurements.

24. Vergelijking van een nieuwe procalcitoninetest op de Roche Modular met de methode op de Brahms Kryptor

H.K. de WOLF¹, J. KLEIN GUNNEWIEK², Y. BERK¹, J. van den OUWELAND¹, M. de METZ¹
Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis¹, Nijmegen; Universitair Medisch Centrum Radboud², Nijmegen

Inleiding: Verscheidene studies hebben de toegevoegde waarde aangetoond van antibioticatherapie op basis van procalcitonine (PCT) spiegels o.a. bij patiënten met luchtweginfecties (1,2). Recentelijk is een PCT-test beschikbaar gekomen die geschikt is voor gebruik op een geconsolideerd routinechemie platform, het Roche Modular E170 systeem. Wij evalueerden de analytische kenmerken van deze nieuwe test en vergeleken de test met de test op de Brahms Kryptor, de momenteel veelvuldig gebruikte niet geïntegreerde PCT-test (3).

Methode: De analytische karakteristieken van de PCT-test werden bepaald met behulp van een CLSI EP10 protocol (concentraties controlesera van 0,24 tot 2,85 µg/L). In een vergelijkende studie werden de uitkomsten van 229 serum samples van patiënten met onderste luchtweginfecties vergeleken, door deze uit te voeren op de beide analyseautomaten.

Resultaat: De variatiecoëfficiënt van de Roche test varieerde van 1,3 tot 6,3 %, afhankelijk van de PCT-concentratie. De

functionele sensitiviteit werd vastgesteld op 0,06 µg/L. De PCT-concentraties van de vergelijkingsstudie lagen tussen de 0,02 (detectielimiet) en de 57 µg/L. De Roche test vertoonde een goede correlatie met de Brahms test ($y = 0,95 x - 0,09$). De overeenstemming tussen de twee testen in het onderscheiden van positieve en negatieve monsters op de belangrijkste medische beslispunten, te weten 0,25 en 0,50 µg PCT/L, was 99 en 98 %.

Conclusie: De nieuwe Roche test op de Modular vertoont een goede correlatie met de huidige Brahms test op de Kryptor. De test biedt een gemakkelijke en accurate PCT-bepaling op een volledig geïntegreerde klinische chemische immunochemieanalyseautomat.

Literatuur: 1. Stolz et al, Chest 2007; 131: 9; 2. Assicot et al, Lancet 1993; 341: 515; 3. Steinbach et al, Clin Chem Lab Med 2004; 42: 440

25. CA125-determination in dialysate for diagnosis of peritoneal sclerosis

D. van de KERKHOF, M. HEESTERBEEK, J. CURVERS, A.K. BOER
Clinical Laboratory, Catharina Hospital, Eindhoven

Introduction: CA125 in dialysate can be used as a marker for peritoneal sclerosis. The appearance rate of CA125 in dialysate is an estimate of the mesothelial cell mass in the peritoneum. Peritoneal sclerosis is a rare but hazardous complication of peritoneal dialysis. In these cases, a fast decrease of the appearance rate of CA125 during follow-up would precede clinical signs of sclerosis. Although clinical validation has been described extensively in literature, no adequate analytical validation has been published. The used automated CA125-kits, are calibrated for values >35 kU/L in plasma, using high-concentration standards. However, the clinically relevant range for dialysate is as low as 1-2 kU/L. It can therefore be expected that inter-calibration variation can contribute significantly to the total imprecision of the assay at low levels.

Methods: In this study we determined the analytical characteristics of measurement of CA125 in dialysate. We ran this

validation on the ADVIA Centaur (Siemens) and the Liaison (Diasorin). We determined within-run, between-run, between-calibration and total variation using a 20-day precision protocol. A modified calibration procedure was evaluated using an additional calibration sample at a low concentration (5 kU/L), calculated with cubic spline non-linear regression.

Results: Upon daily calibration of the Centaur, the total imprecision was 12% at 5.9 U/mL using the standard method and 7% using the modified procedure. For the Liaison the imprecision was reduced from 23% to 15% at 2.3 kU/L. Overall the inter-calibration imprecision was a major contributing factor to the total imprecision.

Conclusion: This study shows that analytical imprecision in the low-concentration range of CA125 in dialysate is a relevant issue of concern, and that a modified calibration procedure can potentially improve the longitudinal patient follow-up procedure.

26. Evaluatie van de hepatitis-C-test op de Cobas e

H. van der VUURST, W.A. NIJHOF

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Streektziekenhuis Koningin Beatrix, Winterswijk

Inleiding: De recent uitgebrachte anti-HCV test voor de cobas e analysers (Roche Diagnostics) is een 'electrochemiluminescence immunoassay' (ECLIA) volgens het sandwich principe geschikt voor het aantonen van antilichamen tegen hepatitis C virus (HCV) in humaan serum of plasma.

Methode: De nieuwe methode voor de cobas e werd vergeleken met de huidige HCV test voor de AxSYM (Abbott) die gebruik maakt van een 'microparticle enzyme immunoassay' techniek (MEIA). Het vergelijk vormt onderdeel van de validatie van de nieuwe test op de cobas e. Omdat bij deze validatie nauwelijks gebruik gemaakt kan worden van monsters met een bekende titer is in eerste opzet gekozen voor een vergelijk met de monsters uit de SKML enquête Viral Markers, aangevuld met serologie aan patiëntenmonsters.

Resultaat: Er werd gebruik gemaakt van ingevroren monsters van de SKML enquêtes Viral Markers 2008.1, 2008.2

en 2008.3 waarvan een definitieve uitslag bekend was. In alle drie de enquêtes werd door de Roche test ook in de hoogste verdunning (respectievelijk 1:4096, 1: 16384 en 1:8192) geen positief monster gemist, daar waar volgens de SKML geen van de ingezonden AxSYM bepalingen nog positief was. Alle negatieve monsters waren ook bij de Roche HCV test negatief. Een initieel vergelijk met patiëntenmonsters, met name afkomstig van de 12e weeks-screening zwangeren, laat een tweetal monsters zien die positief waren op de AxSYM maar niet bevestigd konden worden bij uitgebreid onderzoek door Sanquin. Daarentegen waren beide monsters negatief met de anti-HCV test van Roche.

Conclusie: De nieuwe anti-HCV test voor de cobas e lijkt een hoge sensitiviteit te koppelen aan een hoge specificiteit. De test lijkt hiermee een aanwinst voor het diagnostisch pakket. Meer data zijn nodig voor een volledige evaluatie.

27. Vals-normale vitamine-B12-waarden bij een vrouw met pernicieuze anemie

L.A. BOVEN, A.Y. DEMIR, M. van WIJNEN

Afdeling Klinische Chemie, Meander Medisch Centrum, Amersfoort

Inleiding: Een 59-jarige vrouw meldde zich op de spoedeisende hulp met klachten van algehele malaise. Bij laboratoriumonderzoek was het Hb 5.6 mmol/l, MCV 128 fl en LDH 3630 U/l. Samen met de kliniek gaven deze waarden aanleiding tot verdere anemiediagnostiek met een sterk vermoeden van pernicieuze anemie.

Methode: Er werden verschillende (immuno)chemie analyzers (Beckman Coulter Dx-880i, Roche Modular E170) gebruikt en een hematologie analyzer (Sysmex XE2100).

Resultaat: Er werd herhaaldelijk een normaal vitB12 gezien van 362 en 493 pmol/l, waarna een beenmergpunctie werd uitgevoerd. Dit liet een beeld zien dat paste bij megaloblastaire anemie. Methylmalonzuur en homocysteïne waren sterk verhoogd en er werden antistoffen tegen intrinsic factor (IF) gevonden. HoloTC bleek < 1 pmol/l. VitB12 werd overgemeten

op een Roche Modular E170 en was nu 58 pmol/l.

Conclusie: Deze patiënt had een klassieke pernicieuze anemie die door een vals normale vitB12 niet direct gediagnostiseerd werd. Dit resulteerde in onnodig extra onderzoek, een invasieve ingreep, vertraging van de behandeling, en onzekerheid voor de patiënt en de arts. Er was waarschijnlijk een stoorfactor aanwezig die interfereerde met de vitB12 bepaling op de Beckman Dxi. Het is bekend dat in zeldzame gevallen een hoge titer van een specifiek subtype antilichaam tegen IF kan interfereren in vitB12 assays. Omdat deze patiënt antistoffen tegen IF had, zou dit de oorzaak van de vals normale vitB12 uitslag kunnen zijn. Het is raadzaam om bij een sterk vermoeden van pernicieuze anemie en normale vit B12 waarden, de vitB12 bepaling met een ander type immunoassay te herhalen.

28. Radioimmunoassay for human serum hepcidin

C.G.J. SWEEP¹, J. GEURTS-MOESPOT¹, N. GREBENCHTCHIKOV¹, J.J.C. KROOT², H. TJALSMA², D.W. SWINKELS²

Department of Chemical Endocrinology¹, Department of Clinical Chemistry², Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen

Introduction: The hepatic peptide hormone hepcidin plays a central role in body iron metabolism. Despite its promise as a biomarker for diagnosis and monitoring of disorders of iron metabolism, the availability of this parameter to the clinical research community has been limited because of its complexity. Hepcidin has a small and compact structure, is highly conserved and antigenic epitopes are scarce. In general, the assays developed are time consuming, need expensive laboratory equipment and are performed at a low throughput rate. The aim of the present study was to develop a Radio ImmunoAssay (RIA) to measure hepcidin quantitatively in human serum, plasma and urine.

Methods: Antibodies, raised in rabbits against hepcidin-25, were affinity purified and used for the construction of a RIA. After validation, the results obtained with the RIA were compared with those obtained with surface enhanced laser desorption time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS).

Results: The analytical and functional sensitivities of the hepcidin RIA are 0.02 µg/L and 0.025 µg/L, respectively. The within-run imprecision (CV) was 4.4% and the between-run CV was 6.2%. The assay exhibits good parallelism and a mean recovery of 95% (range 81-107%). The RIA hepcidin levels excellently correlate with those obtained by SELDI-TOF MS method ($r=0.94$, $P<0.0001$).

Conclusion: The RIA measures hepcidin in human serum/plasma with high sensitivity and specificity. The assay yields accurate and reproducible results, over a wide range of physiological and pathological levels, is easy to perform, requires standard state-of-the-art laboratory equipment and can be performed in a high throughput format. This opens new opportunities to study hepcidin regulation in humans and can be used for diagnostic purposes and monitoring treatment of patients with defects in iron metabolism.

29. Methodevergelijking van vier geautomatiseerde methodes voor intact parathyroïdhormoon (iPTH) bij dialysepatiënten

E.M.L. SMETS

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

Inleiding: In de richtlijnen van de National Kidney Foundation speelt iPTH een belangrijke rol in de diagnostiek en behandeling van Chronic Kidney disease-Mineral and Bone Disorder (CK-MBD), een systemische ontregeling van de mineraal- en bothuishouding als gevolg van chronische nierinsufficiëntie. Deze richtlijnen zijn echter gebaseerd op de PTH-assay van Nichols Diagnostics Institute die in Nederland niet meer gebruikt wordt. In de circulatie zijn diverse fragmenten PTH aanwezig; de verhouding tussen de verschillende fragmenten verandert bovendien bij nierinsufficiëntie. Omdat alle iPTH-assays de verschillende fragmenten elk in meerdere of mindere mate meet, hebben we vier methoden vergeleken bij dialysepatiënten.

Methode: Bij 164 sera afgenomen vóór hemodialyse is iPTH gemeten met de volgende analyzers en bijbehorende reagentia: Access-2 (Beckman Coulter), Architect I1000 (Abbott Diagnostics), Centaur (Siemens Diagnostics) en Cobas e601 (Roche Diagnostics).

Resultaat: Hoewel de correlatie tussen de methoden goed was, vonden we een systematische bias. Methodevergelijkingen met Cobas in de abcis (x) lieten volgende regressievergelijkingen en correlaties zien: Access-2 = $1,04x - 0,2$ pmol/l; $r^2=0,995$. Architect = $1,25x + 1,5$ pmol/l; $r^2=0,993$. Centaur = $1,25x - 0,4$ pmol/l; $r^2=0,987$. Bij de beslissgrenzen van 16,5 en 33 pmol/l zouden bepalingen uitgevoerd met Access-2 en Cobas in 6% tot andere medische beslissingen leiden. Bij een vergelijking tussen Centaur en Cobas is dat 14% en bij vergelijking tussen Architect en Cobas is dat zelfs 26%. In vergelijking met Centaur zou men met Access-2 resp. Architect in 13% resp. 15% andere beslissingen. Bepalingen uitgevoerd met Architect en Access-2 zouden in 22% van de dialysepatiënten tot andere beslissingen leiden.

Conclusie: Hoewel de correlatie tussen de verschillende methoden goed is, is er een systematische bias. Referentiewaarden en medische beslissgrenzen moeten daarom met voorzichtigheid geïnterpreteerd worden.

30. De bepaling van fibroblast growth factor 23 (FGF-23)

A.C. HEIJBOER¹, M. LEVITUS¹, M.G. VERVLOET², H.M. DIJSTELBLOEM¹, M.A. BLANKENSTEIN¹
Afdeling Klinische Chemie¹ en Afdeling Nefrologie², VU Medisch Centrum, Amsterdam

Inleiding: Fibroblast growth factor 23 (FGF-23) is een recent ontdekt hormoon, dat een sleutelrol speelt in de fosfaathuishouding. FGF-23 stimuleert fosfaatuitscheiding door de nieren en remt de omzetting naar 1,25(OH)₂vitamine D. Verhoogde FGF-23 spiegels zorgen daarom voor een hoge fosfaatuitscheiding (zoals bij het ziektebeeld hypofosfatemische rachitis). Dialysepatiënten hebben vaak verhoogde fosfaatspiegels. Daarbij passend hebben zij ook een verhoogde FGF-23 concentratie in bloed. Deze FGF-23 concentratie lijkt sterk gerelateerd aan de levensduur van de dialysepatiënt. Om te weten of we FGF-23 kunnen bepalen, hebben wij een validatie uitgevoerd van de assays die beschikbaar zijn.

Methode: Er zijn momenteel drie assays voor FGF-23 op de markt: intact FGF-23 (Kainos), intact FGF-23 (Immutopics), en C-terminale FGF-23 (Immutopics). Deze drie (ELISA) assays hebben wij gevalideerd. Daarbij zijn de intra- en inter-assay variatie, lineariteit en matrixafhankelijkheid bepaald. Bovendien hebben we gezonde proefpersonen en verschillende patiëntengroepen met elkaar vergeleken.

Resultaat: Intra-assay variatie was redelijk tot goed voor de drie assays (<5% C-terminale; <6% Intact Immutopics; <10% Intact Kainos). Inter-assay variatie (~60%) en lineariteit was slecht bij de intacte (Immutopics) assay, maar redelijk tot goed bij de andere twee assays (<10%). De assays van Immutopics gaven de beste resultaten in EDTA-plasma. De assay van Kainos liet in EDTA-plasma en serum een vergelijkbare reproduceerbaarheid zien, waarbij absolute waarden in EDTA-plasma hoger lagen. Ondanks dat de bijsluiter aangaf dat de assay van Kainos met een was-apparaat gewassen kon worden, verkregen wij alleen acceptabele resultaten met handwassen. Patiëntengroepen (pre-dialyse, dialyse, hypo-fosfatemische rachitis) konden we onderscheiden van gezonde proefpersonen.

Conclusie: Aan de hand van deze validatie kunnen we concluderen dat er twee behoorlijke assays voor FGF-23 op de markt zijn: een intacte FGF-23 assay (Kainos) en C-terminale assay (Immutopics).

Chromatografie: HPLC, GC, CE

31. Diagnosis of inaccurate HbA1c measurement on the HLC-723 G7 analyzer

J.M.W. van den OUWELAND, H. van DAAL
Department of Clinical Chemistry, Canisius Wilhelmina Hospital, Nijmegen

Introduction: In early 2007 we were alerted by a new group of general practitioners about the fact that they obtained HbA1c results up to 1.2% higher in a number of their patients. Our laboratory measures HbA1c by ion-exchange chromatography on a TOSOH HLC-723 G7 analyzer.

Methods: We sought the cause of the discrepancies in HbA1c results initially by checking our internal and external quality control procedures (EQA) for any anomalies. We also compared our results with the general practitioner's former laboratory, a secondary reference laboratory (SRL) for HbA1c and other TOSOH-using laboratories.

Results: Our HbA1c results were consistently higher when compared to HbA1c values from the former laboratory as well as from the SRL. On the contrary, we had excellent scores in our EQA program and obtained accurate results from analysis of NGSP-assigned calibrator and reference samples on our in-

strument. Fortunately, it became clear that there was an unanticipated 0.4% difference in HbA1c between samples that were diluted in Hemolysis & Wash solution within the instrument (routine patient analysis) and samples that were diluted manually in water (analysis of calibrator and control materials as well as small volume patient samples). The phenomenon could be reproduced on more TOSOH instruments and disappeared after revision of the instrument.

Conclusion: It was due to the clinician's attentiveness only that we were alerted about errors in our HbA1c measurement, as our internal and external quality procedures failed to indicate any anomaly. This case illustrates the importance of treating calibrator and control materials the same way as routine patient samples in order to prevent unnoticed drift in patient HbA1c results which eventually causes unnecessary medical intervention.

32. Excellent correlation of Recipe's CDT method with the proposed IFCC reference HPLC method

J.P.M. WIELDERS, R. te STROET, N. DIRSCH
Department Clinical Chemistry, Meander Medisch Centrum, Amersfoort; Recipe Chemicals & Instruments GmbH, Munich

Introduction: Carbohydrate deficient transferrin (CDT) is the best biomarker for testing chronic alcohol abuse. Several methods are available but both precision and accuracy data differ widely. In the recently published Dutch guideline on CDT methods (1) Recipe's HPLC method is amongst others approved for use in driver licence affairs. We compared the Recipe HPLC method with the reference HPLC method proposed by the IFCC working group on CDT (2).

Methods: Anonymous serum samples (n=62) were selected in Amersfoort by N-Latex CDT analyses to be equally distributed over the quartiles of the range met in drunk-driver testing. Serum samples were split and stored frozen until further analyses. HPLC according to Helander (3) was performed in Amersfoort. Blinded frozen samples were transported to Munich and analysed in Recipe's laboratory according to the manufacturers instructions for Clin-Rep CDT-online. CDT quantification by the HPLC methods was calculated as area ratio of disialotrans-

ferrin to total transferrin (%DST) using baseline integration. Correlation was performed with Passing-Bablok calculations.

Results: The two HPLC methods showed very similar chromatograms although Recipe's overall run time is about 10 minutes and Helander's HPLC runtime about 40 minutes. The relative concentrations of CDT (expressed as %DST) were highly correlated (Passing-Bablok: $y = 0.98x + 0.19$; $r^2 = 0.99$; $P < 0.0001$). A Bland-Altman plot showed a very good level of agreement: bias 0.154 (95% CL 0,095 - 0,213).

Conclusion: Recipe's CDT method is highly correlated with the proposed IFCC method, supporting its suitability for use in Dutch driver licence affairs.

Literature: 1. NVKC Guideline (in Dutch) Geschiktheid van CDT analysemethoden etc 2008; 2. Jeppsson et al, Toward standardization of CDT. CCLM 2007; 45: 558; 3. Helander, Husa, Jeppsson. Clin Chem 2003; 49: 1881

Vlamfotometrie, AAS, massaspectrometrie

33. A rapid method for measurement of plasma citrulline with UPLC tandem mass-spectrometry for risk recognition of small intestinal enterocyte pathology

P.N.M. DEMACKER¹, A.M. BEIJERS¹, H. van DAAL¹, J.P. DONELLY², N.M.A. BLIJLEVEN², J.M.W. van den OUWELAND¹

Department of Clinical Chemistry¹, Canisius Wilhelmina Hospital, Nijmegen; Department of Hematology², University Medical Center St Radboud, Nijmegen

Introduction: Citrulline is a nonessential free amino acid, detectable in various biological fluids such as plasma, urine and cerebrospinal fluid. In clinical biochemistry plasma citrulline concentration is increasingly regarded as a reliable biomarker of enterocyte function. Current analysis usually involves lengthy HPLC separations as a part of classical amino acid analyses, or mass spectrometry usually in combination with derivatization.

Methods: We employed UPLC-HILIC-tandem mass-spectrometry of acetonitril-derived supernatants from plasma of control subjects and of patients who had received myeloablative chemotherapy. Detection was achieved by the selected reaction monitoring of transitions: m/z 176 and 180 for the normal and deuterated compound, respectively.

Results: The method was precise and accurate with inter-day

CVA 9% (n=30); recoveries ranging from 98.0-100.3 % and high linearity from 0.3 to at least 2000 $\mu\text{mol/L}$. The results for 202 plasma samples agreed well with those by a classical HPLC-fluorescence method. By a simple deproteinization/extraction step and the UPLC separation the result can be available within 30 minutes of receipt with a capacity of 12 assays per hour. Citrulline in blood and plasma or serum was stable for at least two days at room temperature which would permit postal transport to the laboratory. Normal values amounted to 13-48.1 $\mu\text{mol/L}$.

Conclusion: The UPLC-MS/MS method for measuring plasma citrulline concentrations is fast and robust and is therefore an ideal tool for monitoring the intestinal enterocyte capacity of patients and newborns with various pathological conditions.

34. Measurement of urinary free metanephrines using automated on-line solid-phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

W.H.A. de JONG¹, T.P. LINKS², E.G.E. de VRIES³, I.P. KEMA¹

Department of Laboratory Medicine¹, Department of Endocrinology², Department of Medical Oncology³, University of Groningen Medical Center, Groningen

Introduction: Usually, in urine total (free + conjugated) fractionated metanephrine (MN) and normetanephrine (NMN) are measured for the diagnosis of pheochromocytoma. However, this total fraction is influenced by several exogenous factors, such as diet, and needs a laborious and uncontrolled hydrolysis step in sample preparation, when compared to urinary free MNs. Therefore the aim of the current study was to develop an automated on-line solid phase extraction method coupled to liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection (XLC-MS/MS) for the measurement of urinary free MNs as replacement for urinary total MNs.

Methods: Five μl urine equivalent was pre-purified by automated on-line solid-phase extraction, using WCX (weak cation exchange) cartridges. Chromatographic separation of the analytes and deuterated analogues occurred by hydrophilic interaction chromatography (HILIC). Mass spectrometric detection

was performed in the multiple reaction monitoring mode using a quadrupole tandem mass spectrometer with positive electrospray ionisation. Total cycle time including sample clean-up was 8 min.

Results: Metanephrine (MN), normetanephrine (NMN) and 3-methoxytyramine (3-MT) and their deuterated internal standard were retained on and eluted from the SPE cartridges with the following absolute yields: 70% (MN), 50% (NMN) and 90% (3-MT). Intra- and inter-assay (n=20) analytical variation in urine samples in three concentration levels were less than 16%. Linearity in the 0-4000 nmol/L calibration range was excellent ($R > 0.99$).

Conclusion: This study describes the measurement of urinary free metanephrines by automated XLC-MS/MS. The method has lower imprecision and time per analysis (high-throughput) in comparison with the measurement of total MNs.

35. Steroid profiling in blood plasma using tandem mass spectrometry

C.M. HEMPEN¹, M. BOSCH², I. VERMES², G. van der SLUIJS VEER¹

Medisch Spectrum Twente¹, Enschede; University of Twente², Enschede

Inleiding: Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) is a powerful technique for profiling, especially in the field of steroids, where immunoassays lack specificity (1). Because of the diversity of biological functions, there are many clinical situations in which determination of these hormones is important.

Method: Plasma samples are mixed with deuterated standards, deproteinized by acetonitrile, evaporated, redissolved in a water/methanol mixture, followed by solid phase extraction. The eluate is concentrated and injected into the HPLC system. Separation on a reversed phase C18 column by gradient elution using a mobile phase consisting of water/ methanol takes 19 minutes. Mass spectrometry (MS) is performed after atmospheric pressure photoionization (APPI). The run is divided into five periods, during which 10 steroids are detected in the positive or negative ion mode, on an Applied Biosystems Qtrap

3200. The mass spectra are recorded in the multiple reaction monitoring (MRM) mode measuring two transitions for each steroid, one for quantitation and one for additional identification.

Resultaat: Satisfying linearity, detection limit, recovery and CV's were found for the steroids. However the sensitivity of the Qtrap 3200 is only sufficient to measure increased concentrations of aldosterone and estradiol

Conclusie: We successfully implemented a method for profiling 10 steroids in human blood plasma. The consolidation of many specific tests into one LC/MS/MS method improves efficiency in a clinical laboratory

Literatuur: Guo, et al. Steroid profiles using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure photoionization source, Arch Pathol Lab Med 2004; 128: 469-475

36. Measurement of 25-hydroxy vitamin D in blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry and comparison with a radioimmunoassay method

L. MORTIER, P. DECLERCQ, A. MEWIS
Clinical Laboratory, Virga Jesse Hospital, Hasselt

Introduction: Measurement of 25-hydroxy vitamin D is important in the assessment of calcium homeostasis. Because vitamin D has 2 forms, vitamin D2 and vitamin D3, accurate assessment of vitamin D status should include measurement of both hydroxylated forms equimolarly. Commercial immunoassays, such as the Diasorin radioimmunoassay are widely used in clinical laboratories. These assays are unable to distinguish the 2 metabolites and suffer from interference from other hydroxy metabolites. Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is a powerful analytical tool that provides excellent specificity and accuracy and rules out the use of radioactive tracers.

Methods: Deuterated 25-OH vitamin D3 was used as internal standard and sample preparation consisted of hexane extraction. After gradient elution with methanol and water on a C18 column, detection was performed using electrospray tandem mass spectrometry in the multiple reaction monitoring mode.

Quantification was based on in-house prepared serum-based calibration standards.

Results: Linearity was excellent for both metabolites and trueness was verified through participation in the DEQAS external quality control program. Precision was evaluated by analyzing serum samples and internal control material. Within-run coefficients of variation (CV's) varied between 2.4% (D3) and 8.5% (D2) while the between-run CV's were in the range 2.7% (D3) to 10.3% (D2). The limit of quantification (LOQ) was 2.5 µg/L for 25-OH vitamin D2 and 2.0 µg/L for 25-OH vitamin D3. To compare the LC-MS/MS method with the Diasorin RIA test, 112 samples were analysed with both techniques. Passing-Bablok regression analysis produced the following equation: $[LC-MS/MS] = 1.30 [RIA] - 0.52 \mu\text{g/L}$.

Conclusion: The LC-MS/MS assay is an excellent alternative for the radio immunoassay and has been successfully implemented for routine analysis in our laboratory.

37. High-speed simultaneous determination of 10 drugs by UPLC-MS/MS

P.N.M. DEMACKER, A.M BEIJERS, H. van DAAL, J.M.W. van den OUWELAND
Department of Clinical Chemistry, Canisius Wilhelmina Hospital, Nijmegen

Introduction: With the aim to report results of drug monitoring more rapidly we evaluated UPLC-MS/MS for future measurement of 10 tricyclic antidepressants (TCA's) and clozapine (metabolite).

Methods: Measurement of TCA's and related compounds by HPLC-fluorimetry is time-consuming because of lengthy SPE prepurification and chromatography. We evaluated manual extraction in combination with UPLC-MS/MS for measurement of clomipramine, norclomipramine; amitriptyline, nortriptyline; desipramine, imipramine, trimipramine, doxepine and clozapine/norclozapine. Attention was paid to all possible variables in: extraction/purification; chromatography; mass spectrometry and quantitation.

Results: Optimizing the gradient of solvents A and B resulted in complete separation of all analytes in UPLC-runs of 7 minutes versus 26 minutes in HPLC. Manual extraction with AcN/H2O 9:1 v/v required only 15 minutes in comparison to SPE prepurification and derivatization which required 3h. Observed inter-day CV's and biases for the various analytes ranged between 3.5 and 7%. Results of UPLC-MS/MS and HPLC-fluorimetry agreed well. Detection limits for most analytes were as low as 1 µg/L.

Conclusion: Using UPLC-MS/MS for drug monitoring, results of at least comparable quality can be available in 30 minutes compared to about 10h by conventional methodology.

38. Plasma tryptophan, kynurenine and 3-hydroxykynurenine measurement using automated on-line solid-phase extraction HPLC-tandem mass spectrometry

W.H.A. de JONG¹, R. SMIT¹, S.J.L. BAKKER², E.G.E. de VRIES³, I.P. KEMA¹
Department of Laboratory Medicine¹, Department of Nephrology², Department of Medical Oncology³, University Medical Center, University of Groningen, Groningen

Introduction: Tryptophan metabolism plays a key role in several (patho)physiological conditions. Indolamine-2,3-dioxygenase (IDO), the enzyme responsible for tryptophan conversion to kynurenines is related to the generation of immune tolerance to foreign antigens. In order to study this role of tryptophan and its predominant metabolites (kynurenines), these analytes should be measured with high accuracy and reliability. Aim was to develop a high-throughput on-line solid phase extraction-liquid chromatographic-tandem mass spectrometric (XLC-MS/MS) method that enables the measurement of tryptophan and its metabolites kynurenine and 3-hydroxykynurenine in plasma.

Methods: Fifty µL plasma equivalent was pre-purified by automated on-line solid-phase extraction, using strong cation exchange (PRS, propylsulphonic) cartridges. Chromatographic separation of the analytes and deuterated analogues occurred by C18 reversed phase chromatography. Mass spectrometric detection was performed in the multiple reaction monitoring mode using a quadrupole tandem mass spectrometer with posi-

tive electrospray ionisation. Total run-time including sample clean-up was 8 min.

Results: Intra- and inter-assay analytical variations were less than 9%. Linearity in the 0-1200 (tryptophan) and 0-45 µmol/L (kynurenine and 3-hydroxykynurenine) calibration range was excellent (R>0.99). Detection limits were 30 nmol/L for tryptophan, 1 nmol/L for kynurenine and 5 nmol/L for 3-hydroxykynurenine. Reference intervals for 120 healthy adults were 45.5-83.1 µmol/L (tryptophan), 1.14-3.02 µmol/L (kynurenine), <0.13 µmol/L (3-hydroxykynurenine) and 19.0-49.8 for tryptophan-to-kynurenine ratio. There is significant biological variation during the day, as measured in 26 healthy subjects.

Conclusion: This study describes how plasma tryptophan, kynurenine and 3-hydroxykynurenine can be measured accurately and precisely by automated high-throughput XLC-MS/MS. Time of blood sampling should be considered carefully. The method can also be used for liquor.

39. Analytical validation of a serum testosterone LC-MS/MS assay

H.N. BUI, E.A. STRUIJS, F. MARTENS, W. de RONDE¹, C. JAKOBS, M.A. BLANKENSTEIN, H.M. DIJSTELBLOEM
Department of Clinical Chemistry and Endocrinology Department¹, VU medical centre, Amsterdam

Introduction: Current commercial assays for testosterone determined by radioimmunoassay (RIA) or enzyme immunoassays (EIA) do not suffice in serum samples of females and children. Mainly in females, low concentrations are generally overestimated. Moreover, these assays can be sensitive to interference by other steroid hormones. This may lead to misdiagnosis and improper treatment. Previously, we presented a sensitive, specific LC-MS/MS based method to determine testosterone concentrations in serum. We have recently compared this method to an ID-gas chromatography (GC)-MS reference measurement procedure listed in the database of the Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine performed in an experienced reference laboratory.

Methods: For the LC-MS/MS assay, testosterone from 200 µL serum of both males and females was derivatized. Samples were prepared and analyzed in duplicates on an API 4000

HPLC tandem-MS with electrospray in positive mode using an injection volume equivalent to 40 µL of serum. The method was tested for specificity, reproducibility and the functional lower limit of quantification was 0.1 nmol/L. For comparison, 38 blinded serum samples, ranging from 0.2 to 24 nmol/L (reported by the ID-GC-MS) were assayed by the LC-MS/MS method as well as the ID-GC-MS method.

Results: Weighted Deming regression gave a slope of 1.00; intercept of 0.081 and a correlation coefficient of 0.9997.

Conclusion: We conclude that the LC-MS/MS assay measures serum testosterone with fairly good accuracy. Sensitivity and specificity of this method therefore comply with the current standard for measurement of testosterone in serum samples of females and children, as well as males suffering from hypogonadism.

Moleculaire biologie

40. A multiplex assay to rapidly exclude HLA-DQ2 and HLA-DQ8 expression in patients at risk for Coeliac Disease

E.A. ROELANDSE-KOOP¹, S.A. SCHOONDERMARK-STOLK^{1,2}, R.N. VIJZELAAR³, M.W.J. SCHREURS⁴, A. VERHEUL¹, A.J. van HOUTE^{1,2,5}, W. KORTLANDT¹
Laboratory of Clinical Chemistry and Hematology¹, Diakonessenhuis, Utrecht; Department of Medical Microbiology and Immunology², Diakonessenhuis, Utrecht; MRC-Holland³, Amsterdam; Department of Pathology⁴, VU University Medical Centre, Amsterdam; St. Antonius Hospital⁵, Nieuwegein

Introduction: Coeliac disease (CD) is an intestinal inflammatory disease induced by the intake of gluten, that can develop in genetically susceptible individuals. The mechanism of this autoimmune disorder is not completely clear, but involves a HLA-DQ2 and/or HLA-DQ8 restricted CD4+ T-cell immune reaction in the lamina propria of the small intestine. Absence of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 has a strong negative predictive value for CD. Screening for the presence of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 in patients at risk for CD has been included in the Dutch CBO guidelines for CD 2008.

Methods: We designed, developed and validated a multiplex assay based on multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), allowing simultaneous detection of DQA1*05-DQB1*02, encoding HLA-DQ2, and DQA1*03-DQB1*0302,

encoding HLA-DQ8. The amplified products were characterized using capillary electrophoresis. The assay was compared with a PCR/SSCP based method on a semi-automatic gel electrophoresis system.

Results: So far, we tested 50 patients with both methods. The multiplex assay showed a 100% correlation with the PCR/SSCP based method.

Conclusion: We found that it is possible to rapidly and accurately screen for the absence of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 using MLPA, excluding patients at risk for CD for further serological or histological follow-up. Additionally, MLPA proved to be an accurate tool to screen for specific HLA-types in the context of disease-association in a diagnostic laboratory setting.

41. A novel mutation in the COQ2 gene causes primary coenzyme Q10 deficiency

B. JAKOBS¹, R. SMEETS², R. RODENBURG², F. CREMER³, J. SMEITINK², L. van den HEUVEL²
Laboratory of Clinical Chemistry and Haematology¹, St. Elisabeth Hospital, Tilburg; Department of Paediatrics², Nijmegen Centre for Mitochondrial Disorders, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen; Centre for Human Genetics³, Mannheim

Introduction: Coenzyme Q10 (CoQ10) plays a crucial role in oxidative phosphorylation, as it distributes electrons among the various dehydrogenases and the cytochrome segments of the respiratory chain. Recently, the first molecular causes of primary CoQ10 deficiency were identified in several enzymes of the CoQ10 biosynthesis pathway (COQ2, CABC1, PDSS1 and PDSS2). In this study, a twin brother and sister of consanguineous Turkish parents suffering Leigh syndrome and primary CoQ10 deficiency were screened for mutations in the COQ2 gene.

Methods: DNA from the patients, parents and controls was extracted from blood. All 7 exons and splice sites of the COQ2 gene were PCR amplified followed by sequence analysis. Sequences were compared to the published wildtype sequence.

Results: In both patients, a homozygous c.905C>T mutation in exon 5 of the COQ2 gene was identified. The transition changes the evolutionary highly conserved Alanine at position 302 to a Valine (p.Ala302Val), in the third out of six transmembrane helices of the enzyme. The mutation was heterozygous in both parents and absent in 100 healthy Turkish individuals.

Conclusion: Our patients harbour a homozygous c.905C>T mutation in the para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) gene, encoding one of the enzymes of the CoQ10 biosynthetic pathway. The affected amino acid is of functional importance, therefore the mutation most likely causes the CoQ10 deficiency in these patients.

42. Simultaneous real-time detection of CYP2D6*3, *4, *6 and *41 without pre-amplification PCR

A. de VOS, J. DANNEBERG, J.E. KOOTSTRA-ROS, R.G.H.J. MAATMAN
Department of Clinical Chemistry, Hospital Group Twente, Almelo

Introduction: Co-amplification of CYP2D6 pseudogenes during real-time PCR reactions can lead to false interpretation of CYP2D6 genotypes. Therefore, real-time PCR protocols for detection of the clinically relevant mutations CYP2D6*3, *4, *6 and *41 always included a separate CYP2D6 specific pre-amplification-step.

Methods: We developed a PCR method in which the CYP2D6-specific amplification-step and detection were combined. Using a primer set specifically designed for CYP2D6, which did not co-amplify the pseudogenes CYP2D7 and CYP2D8, an amplicon encompassing the CYP2D6*3, *4, *6 and *41 mutations was generated. Sets of dual labelled mutation-specific hydrolysis probes for the detection of these mutations were

selected from earlier publications or designed by web-based software programmes.

Results: The clinically relevant CYP2D6 mutations *3, *4, *6 and *41 were easily and reliably detected without the need to perform a separate preamplification step. Pseudogenes did not interfere with the PCR analysis.

Conclusion: A method for reliable genotyping of CYP2D6*3, *4, *6 and *41 mutations during the same PCR programme was achieved using a newly developed CYP2D6-specific primer set combined with mutation-specific hydrolysis probes. Using this procedure, all mutations could be detected during the same run, while the influence of pseudogenes was excluded and the risk of contamination with preamplimers was reduced.

43. Real-Time detection of DQ2 and DQ8

J.W.J. van der STAPPEN, Y.A.W.G. van AARSSSEN, C.H.W. KLAASSEN
Department of Clinical Chemistry and Hematology, Canisius Wilhelmina Hospital, Nijmegen

Introduction: Introduction Celiac disease, or gluten intolerance, is strongly associated with the presence of the HLA DQ2 (DQA*05/DQB*02) and DQ8 (DQA*03/DQB*03) epitopes, although several other genetic factors have been implicated that might influence the onset or severity of the disease. Absence of DQ2 or DQ8 would be a strong indicator against predisposition for celiac disease. We developed a real-time PCR assay to determine the presence of DQ2 and DQ8.

Methods: Methods A Hybridization Probe based assay was formulated to simultaneously discriminate between HLA DQA*05 and DQA*02 as well as the remaining non-celiac associated alleles. A Simple Probe based assay was used to simultaneously discriminate between HLA DQB*02 and DQB*03 as well as

the remaining non-celiac associated alleles. Reaction conditions were optimized to run both assays in parallel. The combined assays allow quantitative determination of the presence of DQ2 and DQ8.

Results: Results Melting curve analysis allowed rapid and reliable identification of either DQA*05, DQA*03, DQB*02 and DQB*03 alleles. Genotyping results for this assay were validated by DNA sequence analysis.

Conclusion: Conclusions Real-Time parallel detection of HLA DQA*05, DQA*02, DQB*02 and DQB*03 enables rapid determination of the DQ2 and DQ8 epitopes and can be used to rule out a predisposition for celiac disease as well as for other conditions in which these alleles or epitopes are involved.

44. Consequences of used primer sets in testing HLA-B*27; results of a national SKML Quality Survey

H.H.M. EIDHOF¹, B.G. HEPKEMA², S.P.M. LEMS², J. DANNEBERG¹, R. MAATMAN¹
Clinical Chemistry Laboratory¹, Ziekenhuis Groep Twente, Hengelo; Immunology Laboratory², UMCG, Groningen

Introduction: An HLA-B*27 external quality survey by PCR driven techniques is sent twice a year in The Netherlands. Participants use Sequence Specific Primers as described previously by Olerup et al (exon 2) or Dominquez et al (exon 3). The last two years discrepant results were observed in two out of four surveys.

Methods: Participants used their in-house standard method to analyse blood or purified DNA samples for HLA-B*27. Results of the distributing laboratory were verified by the HLA-B27 reference laboratory.

Results: The program 2007.1, 20 out of 26 laboratories (77%), incorrectly reported a positive result for HLA-B*27. Sequencing by the reference laboratory (UMCG), indicated that quality control sample was HLA-B*1802, 4002. In the 2008.2 survey, the quality control sample was HLA-B*1802, 1501. 14 out of 34 laboratories (41%), reported incorrect positive results for HLA-B27. Thirteen of these participants reported both in 2007

and 2008 incorrect results.

Conclusion: In the SKML surveys for typing of HLA-B*27 by means of molecular biological techniques, we have seen discrepant results of samples with the HLA-B*1802 allele caused by cross reaction of exon-3 primers according to Dominquez. It is clear, that the use of only one primer set, may give falsely positive or negative results. Therefore we conclude, that it is recommended to use the results of both primer sets. With the current allele database, it is safe to report a HLA-B*27 result if both primer sets give the identical result.

Literature:

1. Domiguez, et al. Molecular typing of HLA-B27 alleles, Immunogenetics 1992; 36: 277-282
2. Olerup O. HLA-B27 typing by a group-specific PCR amplification, Tissue Antigens 1994; 43: 253-256

45. Toepassing van Jak2-mutatieanalyse in de diagnostiek van polycythemia vera en essentiële trombocytose

J. PRINS¹, M. van WIJNEN², H. KOOIJMAN¹, B.M. van der MEIJDEN²

Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Albert Schweitzer ziekenhuis, Dordrecht;

Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium¹, RIVAS Beatrix ziekenhuis, Gorinchem; Klinisch Chemisch Laboratorium², Meander Medisch Centrum, Amersfoort

Inleiding: In de kliniek wordt Jak2-mutatie analyse frequent aangevraagd bij patiënten met hemoglobinemie en/of trombocytose. Het aantonen van de verworven V617F-mutatie in het Jak2-gen speelt een prominente rol in de WHO criteria voor de diagnose Polycythemia Vera (PV) en Essentiële Trombocytose (ET).¹ In dit onderzoek is retrospectief gekeken naar verschillen in de hematologische parameters in relatie tot de Jak2-mutatie status.

Methode: In de afgelopen twee jaren is bij 156 patiënten met hemoglobinemie en 111 patiënten met trombocytose een Jak2-mutatie analyse aangevraagd. Het vaststellen van de aanwezigheid van de V617F mutatie in het Jak2-gen werd uitgevoerd met behulp van DNA geïsoleerd uit perifere bloed (detectiegrens < 3 %). De Jak2-status werd gerelateerd aan de hematologische parameters gezien bij de hoogste hemoglobine-waarde (bij PV) of trombocyten-waarde (bij ET) van de betreffende patiënt.

Resultaat: Van de 156 patiënten met hemoglobinemie bleek 28% Jak2-mutatie positief. Bij de Jak2-positieve groep werden

significant hogere waarden voor hemoglobine, hematocriet, RBC, trombocyten en leucocyten ($p < 0,0001$) aangetroffen, het MCV bleek significant lager ($p < 0,0005$). Van de 111 patiënten met trombocytose bleek 50% Jak2-mutatie positief. Ook hierbij werd bij de Jak2-positieve groep significant hogere waarden voor hemoglobine, hematocriet, RBC ($p < 0,0001$) en leucocyten ($p < 0,01$) aangetroffen, het MCV bleek significant lager ($p = 0,03$).

Conclusie: Binnen de WHO-criteria voor PV en ET speelt de verworven Jak2-mutatie een belangrijke rol. Bij de Jak2-positieve versus negatieve patiënten werden significant verschillende gezien voor de diverse hematologische parameters. Opvallend is dat de bij de WHO-criteria aangegeven hemoglobine-grenswaarden voor PV ($\sigma > 11,5$ mmol/L of $\varphi > 10,2$ mmol/L) door 5/43 van de Jak2-positieve PV-patiënten nooit werd bereikt.

Literatuur: Tefferi et al, Blood 2007; 110: 1092-1097

Overigen

46. Screening op M-proteïne: vergelijking tussen eiwitspectrum en vrije lichte ketens

A.J. BAKKER, A. BIERMA-RAM, C. ELDERMAN-van der WERF, M.L. STRIJDHAFDIG, J.J. van ZANDEN

St. Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden

Inleiding: Onderzoek naar aan-/afwezigheid van een M-proteïne is tijdrovend door het seriematige karakter alsmede de opeenvolging van de uitvoering van eiwitspectrum en immunofixatie. Met de ontwikkeling van een turbidimetrische vrije lichte keten bepaling komt dagelijkse verwerking via een chemieautomaat binnen bereik. In deze studie is onderzocht of de vrije lichte keten bepaling geschikt is als screeningsmethode om M-proteïnemie op te sporen.

Methode: 550 opeenvolgende patiënten, waarbij onderzoek naar aan-/afwezigheid van een M-proteïne werd aangevraagd, zijn geïnccludeerd. In serummonsters van deze patiënten is, naast het eiwitspectrum gevolgd door immunofixatie (conform CBO richtlijn; analyse met SPIFE (Helena)), tevens de concentratie van de vrije lichte ketens (The Binding Site) gemeten met de Modular P (Roche).

Resultaat: Referentiewaarden voor de concentratie van kappa en lambda vrije lichte ketens en de kappa/lambda ratio ($n = 254$)

werden vastgesteld via de 95%-grenzen: vrije kappa: 8,2-30,5 mg/l; vrije lambda: 8,1-27,6 mg/l en kappa/lambda ratio: 0,73-1,68. Hiervoor werden naast monsters met een M-proteïne, ook monsters van patiënten met nierfunctiestoornissen (eGFR < 60 ml/min) en acute/chronische infecties (eiwitspectrum en CRP indien beschikbaar) uitgesloten. Voor de evaluatie van M-proteïnemie gaf het eiwitspectrum een negatief resp. positief voorspellende waarde (NPV/PPV) van 98,6% en 49,5%. Met de bepaling van de vrije lichte keten concentratie werd een NPV van 94,1% en PPV van 23,8% gevonden, terwijl inclusie van ook de kappa/lambda ratio een NPV van 94,6% en PPV van 22,5% gaf te zien. Met het eiwitspectrum werden 2 monsters met een significant M-proteïne gemist, terwijl dit met de vrije lichte ketens 13 (concentratie) resp. 10 (concentratie+ratio) waren.

Conclusie: Bij een eerste screening gericht op uitsluiten van M-proteïnemie kan niet worden volstaan met uitsluitend een bepaling van de vrije lichte ketens.

47. Detection of a monoclonal gammopathy by lipemia index measurement

I.C.A. MUNNIX, M.T.M. RAIJMAKERS, W.P. OOSTERHUIS, H.A. KLEINVELD
Department of Clinical Chemistry, Atrium Medical Centre, Heerlen

Introduction: Monoclonal gammopathy is defined by the presence of an M-protein in serum. When it occurs in very high concentrations, it may cause significant interference in clinical chemistry assays. Here, we report a case in which a monoclonal gammopathy was detected by measurement of the serum lipemia index (L-index) on a Modular Analytics P module.

Methods: A 50 year old female patient was admitted to the hospital for loss of consciousness and a resulting wound on her head. Upon admission a plasma sample was drawn and serum indices, creatinine, urea nitrogen, electrolytes, glucose, total protein, CRP, and liver enzymes were measured on a Modular P analyzer.

Results: A high L-index of 4000 was found although the sample itself was perfectly clear. The other results were abnormal or suspected to be either false or not plausible, e.g. a negative glucose and a very high creatinine of 726 $\mu\text{mol/L}$. The possi-

bility of a gammopathy interference was dismissed, because of a normal total protein level in the sample. Since no satisfactory explanation could be found further investigations were initiated including the measurement of immunoglobulins. It was shown that the sample contained a very high concentration of 26 g/L M-protein of the type IgM-lambda caused by a morbus Waldenström.

Conclusion: The behaviour of M-proteins is highly unpredictable. In this case the M-protein precipitated upon dilution with saline, resulting in turbidity and an elevated L-index, and the previously unknown monoclonal gammopathy was detected by the serum L-index measurement. Therefore, when a sample has a high L-index and is not visibly lipemic, one should consider the presence of an M-protein.

Literature: Bakker et al, Clin Chem Lab Med 2007; 45: 1240

48. FGF-23: a new laboratory marker for the evaluation of hypophosphatemia

K.C.A.M. NABBE¹, Y. GROENEN¹, J.M.M. de BOER², D. TELTING¹

Department of Clinical Chemistry and Hematology¹, Department of Internal Medicine², Rijnstate Hospital, Arnhem

Introduction: Phosphate homeostasis is regulated within a narrow range by intestinal phosphate absorption, renal phosphate reabsorption, the dynamic equilibrium between extra- and intracellular phosphate and bonematrix phosphate. Recently, it was found that fibroblast growth factor (FGF)-23 is a key player in this process. Therefore, FGF-23 might be a useful laboratory marker in patients with disturbed plasma phosphate concentrations. In particular in cases of hypophosphatemia which remain unresolved with classical laboratory parameters. We compared two types of commercially available ELISA's for their performance in patients with hypophosphatemia.

Methods: Two types of ELISA's are available to detect FGF-23; the human intact FGF-23 ELISA and the human FGF-23 C-terminal ELISA (both Immotopics). The intact assay detects only full-length FGF-23, whereas the C-terminal assay recognizes both the full-length and processed C-terminal fragment of FGF-23. To compare these assays, samples of healthy controls and patients were used.

Results: The two ELISA's showed good concordance for samples with FGF-23 values within the reference range (C-terminal < 210 RU/ml; intact < 50 pg/ml). Analytical sensitivity for C-terminal assay was 6 RU/ml, whereas the sensitivity for the intact assay was 18 pg/ml. Samples of a patient with a FGF-23 producing tumor with sustained hypophosphatemia (plasma concentrations in-between 0.25 and 0.51 mmol/L, reference range 0.87 – 1.45 mmol/L) and PTH-independent renal phosphate wasting were tested and FGF-23 levels ranged from 425 to 8050 RU/ml. After surgical removal of the tumor, FGF-23 normalized within 24 hours.

Conclusion: FGF-23 is a promising laboratory parameter in the evaluation of phosphate homeostasis. This is illustrated by the case described above, which was resolved by detection of FGF-23. FGF-23 ELISA appear to be useful laboratory tools for detection of FGF-23.

49. Gebruik van de Sysmex UF 1000i[®] urineflowcytometer in de diagnostische work-up van urineweginfecties

M.M.L. DECKERS¹, W.C. van der ZWET², F. CANBOLAT^{1,2}, J. HESSELS¹

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Laboratorium Medische Microbiologie en Infectiepreventie², Deventer Ziekenhuis, Deventer

Inleiding: Urinediagnostiek middels sediment analyse of bacteriele kweken is een arbeidsintensief proces met een hoge mate van variabiliteit. De Sysmex-UF1000i is een flowcytometer waarbij urines op een geautomatiseerde en gestandaardiseerde wijze geanalyseerd worden op de aanwezigheid van cellen, cilinders, gisten en bacteriën. Bovendien worden bacteriën specifiek aangekleurd. Voorscreening van urines met de UF1000i zou het aantal microscopische sediment analyses en kweken kunnen terugdringen. Dit leidt tot een aanzienlijke versnelling van het diagnostisch traject.

Methode: In deze studie zijn 358 urinemonsters afkomstig van huisartsen en poliklinische patienten geanalyseerd met de Sysmex-UF1000i en met de standaard technieken (urinekweek, urinestrip, urinesediment, en Grampreparaat). Voor de analyses is de urinekweek als gouden standaard gebruikt.

Resultaat: In overeenstemming met eerdere studies was de reproduceerbaarheid van de UF1000i voor erythrocyten, leukocyten en bacteriën hoog. Bij kolonietallen $>10^7$ werd

voor gisten en bacteriën geringe mate van carry-over gezien, maar dit leidde in de praktijk niet tot vals positieve uitslagen. Afhankelijk van de gebruikte cut-off waarde voor een positieve kweek (> 105 KVE/ml en > 104 KVE/ml) was de npv voor urineweginfecties van de UF1000i zeer hoog, respectievelijk 100% en 99%. Indien de fabriekinstelling van de UF1000i aangepast werd naar $\text{WBC} \geq 20$ /ml OF bacteriën ≥ 50 /ml was het percentage FN uitslagen bij deze cut-off waarden respectievelijk 0% en 1.3%. Dit is veel lager dan bij het microscopisch sediment en de grampreparaten.

Conclusie: De Sysmex-UF1000i biedt de mogelijkheid tot een snelle en gestandaardiseerde manier van voorscreening van urinemonsters waarbij het aantal sedimenten en onnodig uitgevoerde kweken aanzienlijk kan worden teruggebracht. Voor urinemonsters waarbij het leukocytengetal onbetrouwbaar is (neutropenie, urinecatheters) is de Sysmex UF 1000i niet geschikt.

Dienstverlening, doorlooptijden, workflowanalyse

50. Kindvriendelijke bloedafname aan de hand van een 5-stappenplan

J.J.H. HENS¹, C. DORREPAAL²

Klinisch Chemisch Laboratorium, Afdeling Bloedafname en Trombosedienst¹, Maatschap Kindergeneeskunde², Zuwe Hofpoort Ziekenhuis, Woerden

Inleiding: Professionele houding en sfeer zijn bepalend voor de beleving van de bloedafname. Hiertoe is een 5-stappenplan uitgewerkt waarin zowel het kind (<16 jaar) als de ouder/begeleider op een juiste manier benaderd worden gedurende het bloedafnametraject, zonder interventie van de kinderarts.

Methode: Het bloedafnametraject is in vijf stappen opgedeeld: 1 Voorbereiding met aanbieden verdovende zalf; 2 Ontvangst kind en begeleider door bloedafnamemedewerker; 3 Gerust stellen, voorlichting en afspraken medewerker met kind en ouder/begeleider; 4 Keuze bloedafnamemateriaal en bloedafname; en 5 Beloning. Per stap zijn vanuit pedagogisch oogpunt kritische succesfactoren benoemd en praktisch in detail uitgewerkt. Gedurende een half jaar werken 10 bloedafnamemedewerkers begeleid door een pedagogisch medewerker en project(op)leider in zes workshops een gedetailleerd 5-stappenplan uit om kindvriendelijk te prikken. De afspraken worden per stap vastgelegd aan de hand van de procedure kindvriendelijk prikken en worden in koppels in de praktijk toegepast en geëvalueerd.

Het traject wordt afgerond met toekenning van een individuele bekwaamheidsverklaring en zichtbaar te dragen "kindvriendelijk prikken"-button. Door regelmatige onderlinge intercollegiale observatie en coaching in de praktijk blijven kennis en kunde actueel en ook na de training behouden.

Resultaat: Deze interventie heeft het aantal hulpverzoeken aan kinderartsen om te assisteren bij 600 poliklinische bloedafnames bij kinderen ingestuurd door de kinderarts van 10 tot 1 keer per half jaar gereduceerd.

Conclusie: Door een multi-disciplinaire aanpak is expertise samengebracht in een 5-stappenplan waarin de uitgangspunten van het kindvriendelijk prikken zijn vastgelegd. Het 5-stappenplan wordt ziekenhuisbreed gedragen en is gefaseerd in te voeren. Na implementatie is de procedurele werkwijze geborg door een systeem van regelmatige intercollegiale toetsing en coaching. Tevens is de hulpvraag aan kinderartsen op te assisteren bij poliklinische bloedafname vrijwel volledig komen te vervallen.

Point-of-care testing

51. Evaluatie van point-of-care-HbA1c-bepalingsapparatuur voor gebruik in de huisartsenpraktijk

P.M.J. MCLAUGHLIN, J.J. van ZANDEN, B. REITSMA, A.J. BAKKER, H. de WIT

St. Klinisch Chemisch Laboratorium, Medisch Centrum, Leeuwarden

Inleiding: Zorgverzekeraars worden in toenemende mate geconfronteerd met huisartsen die laboratorium bepalingen zelf willen uitvoeren en vragen het laboratorium om dit te borgen. Omdat HbA1c een bepaling is die zich leent voor het Point-of-Care testen (POCT), zijn de reproduceerbaarheid en correlatie voor HbA1c van twee POCT apparaten en een kleine laboratoriumanalyzer onderzocht en vergeleken met de HbA1c bepaling van het centrale laboratorium.

Methode: Voor een correlatie studie zijn 40 patiëntenmonsters gemeten op de DCAVantage (Siemens), de In2It (Biorad) en de Cobas c111 (Roche) via een volbloed (vb) analyse en na handmatige hemolyse (hem). De resultaten zijn vergeleken met de HbA1c-waarden van de Modular P (Roche) in het centrale lab (Mod). De reproduceerbaarheid is gemeten door 5 keer achter elkaar de bepaling te herhalen. Regressieanalyse is uitgevoerd volgens Passing-Bablok.

Resultaat: Initiële regressieanalyse gaf de volgende corre-

laties: DCAVantage = 1,26xMod - 1,37; In2It = 1,02xMod + 0,04; c111vb = 0,98xMod + 0,25; c111hem = 0,97xMod + 0,39. Na communicatie van deze data werd een nieuwe batch casettes voor de DCAVantage getest: DCAVantage = 1,17xMod - 0,99. De reproduceerbaarheid liet de volgende VC's zien voor HbA1c-waarden van resp. 10,5% 6,9% en 5,2%: DCAVantage, 2,2%/0,6%/1,4%; In2It, 1,7%/1,4%/3,4%; c111vb, 0,5%/0,3%/0,8%; c111hem, 0,4%/0,5%/0,5%.

Conclusie: De Cobas c111 is ondanks zijn analytische superioriteit niet geschikt voor POCT in de huisartsenpraktijk gezien de vele noodzakelijke calibraties en controles. Aangezien de VC in het klinisch relevante gebied rond 7% voor alle geteste apparaten onder de toegestane 1,7% ligt zijn alle geteste apparaten in dat gebied betrouwbaar. Gelet op hun omvang en gebruiksvriendelijkheid zijn zowel de DCAVantage als de In2It goed te gebruiken voor POCT van HbA1c in de huisartsenpraktijk.

52. Evaluatie van drie point-of-care-HbA1c-analysers

S. de LATHOUDER^{1,2}, U. HOLZMANN², J. van HELVOORT², J.G. BOONSTRA¹

Afdeling Klinische Chemie¹, Erasmus MC, Rotterdam; Star-MDC², Rotterdam

Inleiding: Het gebruik van een point of care HbA1c analyzer kan interessant zijn voor de huisartsenpraktijk. In deze studie werden drie point-of-care (POC) HbA1c analyzers onderzocht op juistheid, reproduceerbaarheid en gebruiksgemak.

Methode: De volgende POC apparaten werden geëvalueerd: in2itTM (Bio-Rad), DCA VantageTM (Siemens) en AfinionTM (Axis-Shield). ADAMSTM A1c HA-8160 (A.Menarini) werd gebruikt als referentiemethode. Er is gebruik gemaakt van restmateriaal (EDTA bloed) van routine HbA1c bepalingen (range: 4,8%-16,5%) en controle materiaal behorende bij de POC analyzers. Gebruiksvriendelijkheid werd beoordeeld

door ervaren, onervaren en niet-analisten, waarbij cijfers tussen 1 en 10 werden gegeven.

Resultaat: De methodevergelijking liet de volgende resultaten zien ten opzichte van de referentiemethode; in2it: $y=0.918x+0.506$, DCA Vantage: $y=0.900x+0.485$, Afinion: $y=0.882x+0.697$. Bij afwijkende samenstelling van het hemoglobine (o.a. HbS) werd gevonden; in2it: $y=0.875x+0.938$, DCA Vantage $y=0.900x+0.610$, Afinion $y=0.829x+1.017$. Reproduceerbaarheid, binnen- en tussen-dag, was voor de in2it respectievelijk 4.9% en 5.0%, voor de DCA Vantage 3.0% en 3.2% en voor de Afinion 0.6% en 0.6%. De Afinion werd als

meest gebruiksvriendelijk beoordeeld met een gemiddeld cijfer 8, versus een cijfer 5 voor de in2it en een cijfer 7 voor de DCA Vantage. Echter, het lukt een onervaren gebruiker van de Afinion in 40% van de gevallen niet om de meting correct uit te voeren.

Conclusie: De resultaten van de HbA1c POC analyzers komen

goed overeen met de gebruikte referentiemethode. De reproduceerbaarheid verschilt onderling sterk, echter is voor alle drie systemen goed te noemen. Alhoewel er qua bedienings- en gebruiksgemak ruimte is voor verbetering, zijn de in deze studie geëvalueerde systemen analytisch geschikt om point-of care HbA1c bepalingen uit te voeren.

Kwaliteit, referentiewaarden

53. Results of the first international round robin for the quantification of urinary and plasma hepcidin assays: need for standardization

J.J.C. KROOT¹, E.H.J.M. KEMNA¹, S.S. BANSAL², M. BUSBRIDGE³, N. CAMPOSTRINI⁴, D. GIRELLI⁴, R.C. HIDER², V. KOLIARAKI⁵, A. MAMALAKI⁵, G. OLBINA⁶, N. TOMOSUGI⁷, C. TSELEPIS⁸, D.G. WARD⁸, T. GANZ^{6,9}, J.C.M. HENDRIKS¹⁰, D.W. SWINKELS¹

Department of clinical chemistry¹, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen;

Pharmaceutical Sciences Division², King's College London, London; Department of clinical chemistry³, Imperial College HealthCare NHS Trust, Hammersmith Hospital Campus, London; Department of Clinical and Experimental Medicine⁴, University of Verona, Verona; Laboratory of Molecular Biology & Immunobiotechnology⁵, Department of Biochemistry, Hellenic Pasteur Institute, Athens; Intrinsic Life Sciences⁶, La Jolla, California; Division of Advanced Medicine⁷, Division of Nephrology Kanazawa Medical University, Ishikawa; CRUK Institute for Cancer Studies⁸, University of Birmingham, Birmingham; Department of Medicine⁹, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles; Department of Epidemiology and Biostatistics¹⁰, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen

Introduction: Hpcidin holds promise as a biomarker for the diagnosis and monitoring of disorders of iron metabolism. Up to date, various mass spectrometry (MS) based and immunochemical (IC) methods have been developed to quantify hepcidin in plasma and urine. The differences in methodology and in analytical performance hinder the comparability of data. As a first step towards method harmonization, analytical characteristics of several available hepcidin assays were compared.

Methods: Eight laboratories worldwide participated in an inter-laboratory hepcidin assay evaluation, using 5 MS-based and 3 IC-based methods. A common set of 8 human urinary samples and 7 plasma samples were distributed to each laboratory for hepcidin assay as triplicates on 4 consecutive days.

Results: The sample set means differed widely per method ranging from 7.9 to 427.1 nmol/mmol creatinine in urine and 9.8 to 124.6 nmol/L in plasma. As an indicator of the ability

of each assay to differentiate between high and low hepcidin samples (distinctive ability), the between-sample variation ranged from 68.4 to 191.5 % in urine and from 40.4 to 96.6 % in plasma. The analytical precision, indicated by the within-sample variation, ranges from 5.4 to 33.8 % in urine and from 5.3 to 31.0 % in plasma. Mutual correlations between methods were generally significant and ranged from 0.583 to 0.988 and 0.144 to 0.997 in urine and plasma, respectively.

Conclusion: Current hepcidin assays differ substantially in analytical characteristics, but generally correlate well, except for two of the participating IC methods. Ongoing initiatives should facilitate standardization by exchanging calibrators and representative samples. Furthermore, clinical studies should provide information on which analytical characteristics are pertinent for diagnostic and therapeutic purposes.

54. Methodenvergelijking voor de spectrofotometrische identificatie van een subarachnoïdale bloeding

P.M.J. MCLAUGHLIN^{1,2}, R.F.J. KEMPERMAN³, J.J. van ZANDEN¹, B. REITSMA¹, J. SMIT², A.J. BAKKER¹, F.J. DUISTERWINKEL²

St. Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Medisch Centrum Leeuwarden, Leeuwarden; Medisch Laboratorium², Ziekenhuis Nij Smellinghe, Drachten; Laboratoriumcentrum³, UMC, Groningen

Inleiding: Tijdige en correcte diagnostiek van subarachnoïdale bloedingen (SAB) is van groot belang voor de prognose en levensverwachting. Binnen 12 h na manifestatie van symptomen heeft een CT-scan een sensitiviteit van 98%. Daarna neemt de sensitiviteit van CT af en volgt, bij een negatieve CT en klinische verdenking, een lumbaal punctie voor bloedpigmentanalyse in liquor. Bloedpigmentanalyse wordt verricht met UV-Vis spectrofotometrie gevolgd door kwantificering van oxyhemoglobine, methemoglobine en bilirubine door rekenkundige bewerking van het verkregen absorptiespectrum. In de Britse richtlijnen [1] wordt hiervoor de 1e afgeleide methode van Chalmer aanbevolen [2]. Doel: Inventariseren welke rekenkundige methoden in Nederland gebruikt worden. Effecten van de verschillende rekenkundige methoden op de concentratie van de afzonderlijke bloedpigmenten vaststellen en de klinische implicaties voor de diagnostiek van een SAB evalueren.

Methode: Inventarisatie van in Nederland gebruikte rekenkundige methoden door SOP analyse. Spectrofotometrische analyse van 40 liquormonsters met bloedpigmentconcentraties in

het klinische relevante bereik voor de diagnostiek van SAB en bewerking van absorptiespectra met de methode van Chalmer [2], het iteratief rekenmodel van Duiser [3], en de 2e afgeleide methode van Stroes en van Rijn [4].

Resultaat: De eerste resultaten laten zien dat in Nederland de methode van Duiser [3] het meest wordt toegepast, gevolgd door de methode van Stroes en van Rijn [4]. De methode van Chalmer [2] wordt nauwelijks toegepast.

Conclusie: Britse richtlijnen [1] kunnen niet rechtstreeks worden toegepast op de Nederlandse situatie, daarom is het belangrijk om het effect van de in Nederland gebruikte verschillende rekenkundige methoden op de bloedpigmentconcentraties te evalueren.

Literatuur:

1. Cruickshank et al, Ann Clin Biochem 2008; 2. Chalmer. Clin Chem 2001; 3. Duiser et al. Clin Chem 2001; 4. Stroes en van Rijn. Ann Clin Biochem 1987

Human resource management

55. Elektronische jaargesprekken: een waardig alternatief?

A.J. van GAMMAREN, K. VERHEUL, A. van GEEL, C. M. COBBAERT
Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Amphia Ziekenhuis, Breda

Inleiding: Begin 2008 is het KCHL gestart met de robotisering en herinrichting van het primaire proces over drie ziekenhuislocaties. Dit omvangrijke proces stond op gespannen voet met de tijdsinvestering nodig voor het voeren van de traditionele mondelinge jaargesprekken met 220 medewerkers. Er is gezocht naar een alternatieve, pragmatische aanpak die de goedkeuring kreeg van de ondernemingsraad.

Methode: In WinToets werden elektronische jaargesprekken met open en gesloten vragen ontworpen per functiegroep. Open vragen (N = 6) waren gericht op persoonlijke motivatie, sterke/zwakke punten, verbeterpunten, toekomstvisie en persoonlijke ontwikkeling. Gesloten vragen (N = 40) hadden betrekking op werkbeleving, werkomgeving, leiding en organisatie. Uit de open vragen werden de rode draden gedestilleerd. Gesloten vragen werden gescoord in 5 categorieën, omgecodeerd naar een numeriek getal (schaal van 1 tot 9), en statistisch geanalyseerd. Schriftelijke terugkoppeling aan de medewerkers heeft plaatsgevonden.

Resultaat: De respons was 85% bij de analisten, 77% bij de bloedafnamemedewerkers en 83% bij de stafleden. Scores o.b.v. de gesloten vragen werden berekend per functiegroep per vraag, alsook overall over alle vragen per medewerker. In de database werden de scores voor alle medewerkers per functiegroep ingekleurd in vier kleurcategorieën: slecht ($\Delta.0$), matig (5.1- 5.5), voldoende (5.6-6.0), en goed (>6.0). Kleurcodering laat toe om snel en visueel knelpunten en problemen bij medewerkers en organisatie op te sporen.

Conclusie: Gestandaardiseerde jaargesprekken per functiegroep geven inzicht in de acceptatie van het veranderingsproces. Hogere functiegroepen voelen zich meer betrokken bij het veranderingsproces dan lagere functiegroepen, hetgeen zich uit in de overall gemiddelde score. Naast tijdsbesparing dragen elektronische jaargesprekken bij aan standaardisatie en objectivering van het jaargesprek. Elektronische jaargesprekken bieden onzes inziens uitkomst in tijden van personele schaarste.

56. Efficiënte personeelsplanning in een laboratorium voor klinische chemie

K.M.T. de BRUYN¹, A. van MEERKERK¹, B. KIEVITS², I. PONS¹, R.W. WULKAN¹
Afdeling Klinische Chemie¹, Maasstad Ziekenhuis, Rotterdam; Planningsbureau PLAN Consultancy & Development², Hoofddorp

Inleiding: Personeelsplanning in een klinisch chemisch laboratorium is een ingewikkeld en tijdrovend proces. Daarbij dient niet alleen rekening gehouden te worden met diensten (24-uurs bedrijf), maar ook met variabele bezetting van diverse specialistische werkplekken, afgestemd op kliniek en locaties. De wensen zijn vaak dermate specifiek, dat grote commerciële planprogramma's geen oplossing bieden. Om die reden werd onderzocht of een gebruikersvriendelijk en op maat programma kon worden ontwikkeld.

Methode: Aan de hand van interviews werd een situatieanalyse verricht en werden wensen ten aanzien van planning en eindproduct geïnventariseerd. Op basis van de verkregen informatie werden in Excel planningsmodules ontwikkeld met behulp van Visual Basic versie 6 regels.

Resultaat: Allereerst werden de ontwikkelde modules gevuld met benodigde planningsgegevens, waaronder dienstverbandpercentages, kwalificaties, type diensten, werkplekken, minimale bezetting en vrije dagen. De eerste module genereerde als output een kwartaalplanning. De tweede module leverde

per week de werkplekplanning per medewerker, dag en locatie. Beide modules hielden rekening met voorkeuren van planner en medewerkers. Vanuit de werkplekplanningsmodule werd een urenregistratiebestand gegenereerd voor de Module Urenregistratie. Hierin bleef zichtbaar op welk moment de uren werden gewerkt en welke percentages onregelmatigheidstoetslag uitgekeerd moesten worden. Tevens werd een up-load bestand gegenereerd voor het ziekenhuispersoneelsprogramma (Square) ten behoeve van salarisbetaling en registratie ziekmeldingen. Maandelijks werd automatisch een e-mail met de persoonlijke jaarurenkaart aan de medewerkers verstuurd.

Conclusie: Het ontwikkelde planningsprogramma maakt het mogelijk om planning van medewerkers en registratie van gewerkte uren kosten- en tijdefficiënt uit te voeren. Zowel de verdeling van onregelmatige diensten naar rato van dienstverband, als inroostering per medewerker op specifieke werkplekken, worden overzichtelijk gepresenteerd. De modules zijn gebruikersvriendelijk, verzorgen informatie en zijn met eigen toepassingen uit te breiden.

Automatisering, dataverwerking

57. De waarde van TRIX voor de praktijk

H.A. HENDRIKS, A.A. WIERCX, G.J. VRIELINK, W. de KIEVIET
Klinisch Laboratorium, St Lucas Andreas Ziekenhuis, Amsterdam

Inleiding: In ieder ziekenhuis wordt een archief bijgehouden van de eigen resultaten van de irregulaire antistof bepalingen. Door de toegenomen mobiliteit van de patiënten en de onvolkomenheden van het transfusiekaartje, is dit systeem niet toereikend. Niet alle antistoffen zijn na verloop van tijd meer aantoonbaar. Bij een volgende transfusie in een ander ziekenhuis kan, doordat er geen rekening gehouden kan worden met deze antistof, secundaire antistofvorming optreden met als gevolg een (vertraagde) transfusie reactie. Om deze reden is TRIX, een landelijk elektronisch register met belangrijke patiënteninformatie voor het selecteren van de juiste bloedproducten, van start gegaan. De bijdrage van TRIX voor het reduceren van

het risico op transfusiereacties in het St Lucas Andreas Ziekenhuis (SLAZ) is onderzocht.

Methode: Het SLAZ is aangesloten bij TRIX en krijgt automatisch een melding in het LIS indien de patiënt, waarvoor de functie bloedgroep historie geactiveerd wordt, aanwezig is in TRIX. Bij alle patiënten, waarbij in 2008 onderzoek gedaan moest worden naar irregulaire antistoffen, is gekeken of er een signalering vanuit TRIX heeft plaatsgevonden en of de betreffende antistof nog aantoonbaar was.

Resultaat: Bij 73 patiënten zijn irregulaire antistoffen gevonden in januari tot december 2008. Hiervan waren 17 patiënten al eerder in het SLAZ bekend met antistoffen. Van de 56 voor

het SLAZ onbekende patiënten waren 12 (21%) wel in TRIX geregistreerd. Bij 6 (11%) van deze patiënten werden antistoffen gevonden die niet meer aantoonbaar waren. Dit betrof antistoffen tegen c, E, Jk(a), Le(a), Le(b), M, Wr(a).

Conclusie: TRIX draagt in het SLAZ substantieel bij aan reductie van het risico op een transfusiëreactie. Bij 11% van de voor het SLAZ nog onbekende patiënten werd door TRIX irregulaire antistoffen gemeld die niet meer aantoonbaar waren.

58. Procesoptimalisatie van de buitenprikdienst: PrikRoute®

H. BRINKMAN¹, N. DOKTER², P. BEKS³, J.D.E. van SUIJLEN¹, J.A. REMIJN¹

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹, Gelre ziekenhuizen, Apeldoorn/Zutphen; TriOpSys², Utrecht; Philips Healthcare³, Eindhoven

Inleiding: Medewerkers van het KCHL nemen dagelijks bloed af bij patiënten thuis. De orders van deze patiënten worden geprint uit het laboratoriuminformatiesysteem LABOSYS (Philips Healthcare). Bij het KCHL bestond de wens de routes te optimaliseren, zodat deze efficiënter gereden zouden worden. Daarop heeft Philips een koppeling gerealiseerd met het ritplanningssysteem Intertour (PTV Benelux). De routes worden door deze applicatie geoptimaliseerd en via LABOSYS worden vervolgens per route de etiketten en routelijsten geprint.

Methode: De volgende stap was om de papieren routelijsten te vervangen door digitale exemplaren. Door gebruik te maken van deze digitale informatie op een PDA hoeven de medewerkers niet meer met een lijst op de bijrijderstoel te rijden. In samenwerking met TriOpSys is de applicatie PrikRoute® ontwikkeld, die ervoor zorgt dat de gegevens uit LABOSYS mobiel beschikbaar komen.

Resultaat: PrikRoute® leest de patiëntgegevens en route in van LABOSYS, waarop deze naar een PDA verstuurd worden.

Met een geïntegreerd navigatiesysteem kan de bloedafname-medewerker van patiënt naar patiënt navigeren, door het volgende adres in PrikRoute® te selecteren. De medewerker kan informatie opvragen (naam, adres, geslacht, opmerkingen, etc) én invoeren met betrekking tot de status van een patiënt (bijv. bloed afgenomen, niet aanwezig, geen afname, etc.). Deze informatie wordt opgeslagen per tijdstip, zodat te herleiden is op welk tijdstip iemand geprikt is en wat de status van de bloedafname was.

Conclusie: De PrikRoute® applicatie zorgt ervoor dat de gegevens vanuit LABOSYS mobiel beschikbaar worden en daarmee het logistieke proces rondom bloedafname in de buitendienst volledig digitaal kan verlopen. Naast procesoptimalisatie door efficiënte routebegeleiding zullen hierdoor tevens fouten en administratieve handelingen geminimaliseerd worden. Een belangrijke stap in het streven naar optimale kwaliteit en dienstverlening.

Overigen

59. Resultaten van reflecterend testen bij 1e-lijnslaboratoriumuitslagen van het Atrium Medisch Centrum

J.F.W. KEUREN, H.A. KLEINVELD, W.P. OOSTERHUIS

Afdeling Klinische chemie, Atrium Medisch Centrum, Heerlen

Inleiding: Reflecterend testen is een procedure waarbij de laboratoriumspecialist beoordeelt of aanvullende testen en/of commentaar nodig zijn ter ondersteuning van patiëntendiagnostiek. Er wordt gerichte diagnostiek uitgevoerd bij patiënten met voldoende pre-test waarschijnlijkheid op een aandoening. Reflecterend testen biedt de mogelijkheid om richtlijnen te effectueren en vraagt een pro-actieve houding van het laboratorium. Deze studie beschrijft de frequentie en uitkomsten van reflecterend testen bij 1e lijns patiënten in het Atrium Medisch Centrum.

Methode: Van 20 werkdagen (oktober 2008) is retrospectief bepaald bij hoeveel uitslagrapporten reflecterend testen is toegepast, wat de verdenking van de beoordelende laboratoriumspecialist was, hoeveel testen zijn toegevoegd, hoe vaak er een afwijkend patroon werd gevonden en er commentaar is bijgevoegd.

Resultaat: Per dag werden 512±44 (gemiddelde±SD) 1e lijns uitslagrapporten gegenereerd. Op grond van afwijkende test-

uitslagen werden 64±21 rapporten uitgeselecteerd met behulp van autorisatiesoftware en beoordeeld. Reflecterend testen werd toegepast bij 13.5±3.1 rapporten per dag (totaal 270), het gemiddelde aantal toegevoegde testen bedroeg 3.2±3.1. Bij 158 rapporten (59%) werd een afwijkend patroon gevonden en bij 187 rapporten (69%) werd extra commentaar toegevoegd. Verdenkingen van de beoordelende laboratoriumspecialist waren: Steatose (30% van totaal; 40% afwijkend patroon), auto-immuun schildklierfunctiestoornis (20%; 61%), anemie typering (16%; 86%), secundaire hyperparathyreoïdie bij nierfalen (4%; 60%), vitamine B12 of foliumzuur deficiëntie bij hoog MCV (3%; 71%), syndroom van Gilbert (3%, 100%), overige (19%; 40%) en rapporten waarbij geen additionele testen maar wel commentaar werd toegevoegd (6% van totaal).

Conclusie: Reflecterend testen leidt in de meerderheid van de gevallen tot een positieve bevestiging van de verdenking. Kosteneffectiviteit en klinische effectiviteit worden verder onderzocht.

60. HbA1c in 1e-lijnsdiabeteszorg: benchmark in plaats van prestatie-indicator

J.H. HOOIJBERG, F.P.W. TEGELAERS

Laboratorium voor KCHI, Medisch Centrum Alkmaar, Alkmaar

Inleiding: Over de rol van HbA1c als prestatie-indicator bestaat controverse, ook in de 1e-lijns diabeteszorg. In de Prestatie-Indicatoren Ziekenhuizen Basisset 2009¹ van IGZ wordt HbA1c omschreven als 'indicator... die aangeeft in hoeverre sprake is van geïntegreerde zorg'. Interlaboratoriumvariatie, diversiteit in patiëntenpopulaties en verschillen in frequentie van vervolging maken de interpretatie van HbA1c-gemiddelden als indicator echter moeilijk². Benchmarking van HbA1c-

gegevens geeft zorgverleners een betere analyse van de eigen werkwijze. In deze studie werd een zelfontwikkeld HbA1c-benchmarksysteem voor huisartsenpraktijken vergeleken met een "standaard" prestatie-indicator.

Methode: Er werd gebruik gemaakt van 22967 HbA1c-waarden, gemeten bij 13219 patiënten van 201 huisartsen in het jaar 2006. Data werden verkregen uit het LIS m.b.v. Labosys Reporting Tool version 1.2 (Philips Medical Systems). De pres-

tatie-indicator werd gebaseerd op praktijkgemiddelden en het benchmarkmodel op patiëntgemiddelden van HbA1c-waarden en aantal testen per jaar.

Resultaat: Voor de prestatie-indicator werd het gemiddelde HbA1c van praktijken in een grafiek uitgezet tegen de praktijkgemiddelden van het jaarlijks aantal HbA1c-bepalingen per patiënt. Twee praktijken werden nader geanalyseerd: de resultaten uit de grafiek waren 7,4% tegen 3,6 bepalingen, resp. 6,5% tegen 2,5 bepalingen. Deze resultaten gaven de praktijken géén stuurinformatie. In het benchmarkmodel werd het gemiddelde HbA1c van patiënten uitgezet tegen het aantal keren dat bij de betreffende patiënt een HbA1c was bepaald. Per

praktijk werden de resultaten van de eigen patiënten afgezet tegen de totale populatie. Door deze wijze van presenteren werd de diabeteszorg van een praktijk ten opzichte van de collega's inzichtelijker.

Conclusie: In tegenstelling tot de prestatie-indicator werden met de HbA1c-benchmarkgrafiek relevante gegevens ontsloten. Praktijken kunnen hiermee het eigen beleid meer onderbouwd aanpassen.

Literatuur:

1. Prestatie-indicatoren ziekenhuizen Basisset 2009; IGZ
2. Eijkman et al. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2005; 30: 87

Categorie 3: Klinisch

Hart- en vaatziekten, atherosclerose

61. De LOWER-studie; resultaten van een intensief gewichtsmanagement programma op risico-indicatoren van metabool syndroom

M.A.M.A. THIJSEN¹, J. SCHOLTE², A.P. van BEEK³, B.H.R. WOLFFENBUTTEL³, S. SOENEN⁴, M.S. WESTERTERP-PLANTENGA⁴, F.N.R. van BERKUM²

Klinisch laboratorium¹, Ziekenhuisgroep Twente, Almelo/Hengelo; Previtas², Ziekenhuisgroep Twente, Hengelo; Endocrinologie³, Universitair Medisch Centrum Groningen en Rijksuniversiteit Groningen, Groningen; Humane Biologie⁴, Universiteit Maastricht, Maastricht

Inleiding: Obesitas en metabool syndroom vormen een steeds groter probleem voor de volksgezondheid (1). De belangrijkste gevolgen van overgewicht zijn gestoorde glucosetofwisseling en/of insulineresistentie, mogelijk leidend tot diabetes mellitus type 2, dyslipidemie en hypertensie, en hart- en vaatziekten (2). Middels een intensief gewichtsmanagement programma kunnen obese volwassenen een gezonder lichaamsgewicht bereiken. In de Lifestyle, OverWeight, Energy Restriction (LOWER) studie worden de effecten van dieetinterventie in combinatie met een gedragstherapeutisch gewichtsmanagement programma op klinisch chemische en cardiovasculaire risico-indicatoren bestudeerd.

Methode: In groepsverband volgden 166 obese mannen en vrouwen (BMI \geq 30 kg/m²) gedurende 3 maanden het gewichtsmanagement programma. De effecten op risico-indicatoren van metabool syndroom zoals gewicht, bloeddruk, middel -en heupomtrek, body-mass index (BMI), glucose, insuline, totaal, HDL en LDL cholesterol en triglyceriden, en medicatiegebruik werden geanalyseerd.

Resultaat: Na gewichtsreductie van gemiddeld 12 \pm 4% van het initiële gewicht traden significante verbeteringen (P<0,05) op

van lichaamsgewicht, BMI en middel -en heupomtrek. Systolische en diastolische bloeddruk dalen met respectievelijk 10,2 \pm 15,6 mmHg (P<0,05) en 5,2 \pm 9,6 mmHg (P<0,05), terwijl de hartslag daalde met 8,4 \pm 10,1 slagen per minuut (P<0,05). Nuchtere bloedglucose daalde met 0,3 \pm 1,1 mmol/l (P<0,05) en insuline met 5,9 \pm 7,0 mU/l (P<0,05) resulterend in een daling van de HOMA index - als maat voor insulineresistentie - met 1,6 \pm 2,3 (P<0,05). Ook het lipidenprofiel verbeterde. Het percentage deelnemers dat op basis van NCEP-2001 criteria voldoet aan het metabool syndroom daalde van 52% naar 30%.

Conclusie: Middels een gewichtsmanagement programma kan aanzienlijke gezondheidswinst worden bereikt bij volwassenen met obesitas. Significante verbeteringen treden op in cardiovasculaire en metabole risicoparameters. Hierdoor werd het medicijngebruik van o.a. insuline bij diabetes patiënten sterk gereduceerd.

Literatuur:

1. Bos et al. Ned Tijdschr Geneesk 2007; 151: 2382
2. Olijhoek et al. Ned Tijdschr Geneesk 2005; 149: 859

62. Endothelial progenitor cells in patients with splanchnic ischemia

C.P.Y.M. SMULDERS^{1,2}, A.S. van PETERSEN¹, R.H. GEELKERKEN¹, J.J. KOLKMAN¹, I. VERMES^{1,2}, J. SLOMP¹

Department of Vascular Surgery¹, Gastroenterology and Clinical Chemistry, Medisch Spectrum Twente, Enschede; Institute for Biomedical Technology², University of Twente, Enschede

Introduction: The prognosis of acute splanchnic ischemia (ASI) is dismal if the patient presents with clear peritonitis. Unfortunately, there is lack of clinical signs to recognize ASI in an early reversible phase. We measured the concentration of endothelial progenitor cells (EPC's) as possible early diagnostic marker for SI. EPC's comprise a heterogeneous subpopulation of bone marrow mononuclear cells that have been selected for their potential to differentiate into endothelial cells. They contribute to vasculogenesis and neovascularisation by exiting the bone marrow, travelling through peripheral blood to the site of neovascularisation, and becoming incorporated within the growing vasculature. EPC's showed expression of various endothelial markers and at sites of ischemia they are incorporated into neovessels.

Methods: EPC's were characterized flowcytometrically with phenotype: CD45+/-, CD133+, CD34+, VEGFR2/KDR+.

Three different patient groups were studied: one-vessel disease (Coeliac Artery Compression Syndrome: CACS; n=8), two vessel chronic splanchnic syndrome (n=2) and control without splanchnic artery disease to calculate the reference interval (n=10).

Results: We found a reference interval of 39 \pm 17 EPC's/1.000.000 cells in the control group. Patients with CACS and two vessel chronic splanchnic syndrome gave significantly higher concentrations of EPC's (83 and 100 EPC's/1.000.000 cells respectively).

Conclusion: Specificity of a flowcytometric technique for detecting EPC's has been demonstrated. It has been shown that the concentration of EPC's is elevated in patients with SI and may thus be used as potential diagnostic marker for early ASI. The key issue however is to differentiate SI from other abdominal problems, which requires further study.

63. Organ injury in elderly patients undergoing multi-vessel coronary artery bypass grafting: a prospective randomized trial comparing three different techniques

W.B.M. GERRITSEN¹, W.J.P. van BOVEN², H.P.A. van DONGEN³, D. van LOON¹, H.J.T. RUVEN¹
Department of Clinical Chemistry¹, Department of Cardiothoracic Surgery², Department of Anaesthesiology³, Mesos Medisch Centrum Nieuwegein/Utrecht

Introduction: Cardiac surgery with cardiopulmonary bypass results in perioperative organ damage caused by systemic inflammatory response syndrome and/or ischemia-reperfusion injury. This study was designed to investigate organ injury during three different coronary artery bypass grafting (CABG) techniques: MCABG (with minimal prime volume and warm blood cardioplegia) that was newly introduced in our hospital, off-pump (OPCAB), and conventional CABG (CCABG, our current standard, consisting of high volume prime and cold crystalloid cardioplegia).

Methods: In a prospective, randomized trial sixty elective first time CABG patients, age >70 years, were included with the intention to treat three-vessel disease. Organ specific markers H-FABP, cTnT, CPK, CK-MB and pro-BNP (myocardium), CC16 (lung), S100 β (brain), I-FABP (intestine) and α -GST (liver) as well as postoperative PO₂ levels, ventilation time, transfusion consumption and adverse events were monitored.

Results: In all study groups markers showed an increase after cross-clamp release followed by a decrease during ICU stay ($p < 0.05$). The myocardial biomarkers H-FABP and Troponin-T showed significantly higher peak levels in the CCABG - and the OPCAB group compared to the MCABG group ($p < 0.01$). Significantly higher peak levels of α -GST and I-FABP levels were measured in the CCABG - and the OPCAB group compared to the MCABG group immediately after reperfusion ($p < 0.05$). On the first postoperative day PO₂ levels, ventilation times, and consumption of blood products were significantly improved in the MCABG group compared with the CCABG and OPCAB group ($p < 0.05$).

Conclusion: This study showed less organ damage using MCABG as compared to OPCAB or CCABG. Clinically this resulted in improved early postoperative oxygen transport, shorter ventilation times and reduced consumption of transfusion products.

64. Myeloperoxidase (MPO) is positively associated with ADMA, whereas CRP is negatively associated with arginine, resulting in a negative association between both inflammation markers and the arginine to ADMA ratio

L.P. van der ZWAN¹, P.G. SCHEFFER¹, J.M. DEKKER², C.D.A. STEHOUWER³, R.J. HEINE², T. TEERLINK¹
Department of Clinical Chemistry¹ and EMGO Institute², VU University Medical Center, Amsterdam; Department of Internal Medicine³, Academic Hospital Maastricht, Maastricht

Introduction: Both C-reactive protein (CRP) and the oxidative enzyme myeloperoxidase (MPO) have been linked to inflammation, endothelial dysfunction, and increased cardiovascular disease risk. We investigated if MPO and CRP are related with plasma concentrations of arginine and ADMA and/or with the arginine/ADMA ratio.

Methods: Plasma concentrations of arginine, ADMA, MPO, and CRP were measured in 369 men and 379 women (aged 50 to 87 years), participating in a population-based cohort study.

Results: Log-transformed concentrations of MPO and CRP were positively correlated ($r=0.18$; $P<0.001$). Both MPO and CRP were negatively associated with the arginine/ADMA ratio. These negative associations remained significant in a linear regression model with both MPO and CRP as indepen-

dent variables after adjustment for age and sex, and also after further adjustment for systolic blood pressure, smoking, fasting glucose, glomerular filtration rate, and plasma lipids ($P<0.001$ for both MPO and CRP; r^2 model=0.15). In a fully adjusted regression model with ADMA as dependent variable, MPO was positively associated with ADMA ($P=0.004$), whereas CRP did not significantly contribute to the model ($P=0.14$). In contrast, in a regression model with arginine as dependent variable, CRP was negatively associated with arginine ($P<0.001$), without a significant contribution of MPO ($P=0.23$).

Conclusion: Our results support the notion that MPO and CRP, by different mechanisms that both result in a reduced arginine/ADMA ratio, may be associated with a decreased nitric oxide production, possibly leading to endothelial dysfunction.

65. Towards early laboratory detection of insulin resistance

R. OOSTERHOF¹, A.C. MULLER KOBOLD¹, I.C.C. van der HORST², M.J. de JONGSTE², F.A.J. MUSKIET¹
Laboratory Center¹ and Department of Cardiology², UMC Groningen, Groningen

Introduction: The metabolic syndrome is a risk factor for diseases like diabetes mellitus type 2, cardiovascular disease, certain cancers, psychiatric disease, fertility disorders, obstetric disturbances and many others. Insulin resistance and low-grade inflammation are characteristics of the metabolic syndrome. An euglycemic insulin clamp is the golden standard for insulin sensitivity assessment. Homeostatic model assessment (HOMA; fasting serum glucose*fasting insulin/22.5) is more practical for daily usage. We established a HOMA cut-off value that might be of future use for the early assessment of risk of diseases associated with the metabolic syndrome.

Methods: 78 Apparently healthy volunteers (19-60 years; BMI 17.9-42.7 kg/m², 64.1% females) were recruited. Anthropometric data were collected. In the fasting state we measured glucose, insulin (Abbott, Architect), hsCRP (Dade Behring, BN II) and standard clinical chemical indices. Following breakfast they were exposed to a standardized 6-minute walk test to de-

termine fitness. The outcome (in meters) was corrected for age, length and gender and expressed in %.

Results: HOMA correlated with BMI ($r=0.103$; $p=0.000$) and corrected fitness ($r= -0.025$; $p=0.001$). Only BMI survived in a multivariate model, explaining 36.8% of HOMA variability. We selected subjects with Caucasian background, serum glucose <5.6 mmol/L, BMI 20-25 kg/m² and CRP <3 mg/L. Their ($n=41$) mean (95 confidence interval) serum glucose was 4.64 (4.00-5.39) mmol/L, insulin 5.13 (2.30-11.95) microU/mL, HOMA 1.07 (0.45-2.49) mmol*mU/L² and fitness 93.80 (79.06-112.94) % (corrected for age, length, gender and weight).

Conclusion: We believe that the present HOMA and corrected fitness cut-off levels may be of value for the detection of insulin resistance and the monitoring of insulin sensitivity at a stage that might still be correctable by life style adjustment.

66. Prevalence and misdiagnosis of chronic heart failure in nursing home residents: the role of B-type natriuretic peptides

M. BARENTS¹, I.C.C. van der HORST², A.A. VOORS², J.L. HILLEGE², F.A.J. MUSKIET³, M.J. de JONGSTE²
Zonnehuis Nursing Home¹, Zuidhorn; Department of Cardiology², UMC Groningen, Groningen; Laboratory Center³, UMC Groningen, Groningen

Introduction: Chronic heart failure (CHF) is prevalent among elderly people both inside and outside nursing homes. Current diagnosis is based on physical examination and additional tests. Natriuretic peptide assays have proven their usefulness in CHF diagnosis, but their current use in nursing homes is limited. We examined the number of misdiagnoses, CHF prevalence and the diagnostic value of NTproBNP and BNP for CHF in a nursing home.

Methods: Residents living in a single center were screened for CHF. Those with aphasia, cognitive impairments or metastatic cancer were excluded. Two experienced cardiologists independently decided on the diagnosis of CHF, based on medical history, physical examination, ECG, routine blood tests and echocardiography. BNP (Abbott) and NTproBNP (Roche) were

measured. The cardiologists were blinded for the outcomes.

Results: Of the 150 residents, 103 (64%; ages 79+/-11 years) were included. CHF was rejected in 13 out of 22 residents (68.2%) suspected to have CHF prior to screening. CHF was established in 24 (23.3%), of which 15 (66%) were previously undetected. Their NTproBNP was 1,871 (IQR: 539-4,262) and BNP 194 (92-460) pg/ml, as compared to 239 (118-674) and 68 (20-123) in those without CHF, respectively. The ROC-optimized cut-off level for NT-proBNP was 450 pg/ml with a sensitivity of 0.71 and specificity of 0.67. For BNP it was 100 pg/ml with a sensitivity of 0.71 and specificity of 0.70.

Conclusion: CHF prevalence was 23% and both undetected and incorrect diagnoses of CHF were common. NT-proBNP and BNP were moderately accurate for diagnosing CHF.

67. BNP and NT-proBNP as predictors of 1-year mortality in nursing home residents

M. BARENTS¹, H.H.L. HILLEGE², I.C.C. van der HORST², R.A. de BOER², J. KOSTER², F.A.J. MUSKIET³, M.J.L. de JONGSTE²
Zonnehuis Nursing Home¹, Zuidhorn; Department of Cardiology², UMC Groningen, Groningen; Laboratory Center³, UMC Groningen, Groningen

Introduction: Measurement of BNP and NTproBNP might be of use in the diagnosis, follow-up, prognosis and tailored treatment of chronic heart failure (CHF). We investigated the 1-year mortality prediction of BNP and NTproBNP in institutionalized elderly with multiple morbidities living in a nursing home, using a prospective cross-sectional study design.

Methods: Residents with serious cognitive impairments, aphasia, or metastatic cancer were excluded. Ninety-three residents (mean age 81+/-3 years, 66% female) were included and tracked for one year. At study entry, we obtained data from clinical assessment (including mobility), medical history, electrocardiography, echocardiography, and clinical chemical analyses. One general geriatrician assessed noncardiovascular diseases; a panel of cardiologists established the diagnosis of CHF. The adjusted value on 1-year mortality of 6 predefined chronic diseases, immobilization, age, sex, NTproBNP, and BNP was estimated by means of Cox proportional hazard regression analyses.

Results: Eighteen of 93 residents (19.3%) died. BNP was significantly higher in nonsurvivors compared with survivors [median 138 (interquartile range 49-753) vs. 87 (27-162) pg/mL; p=0.029]. NT-proBNP was higher, but did not reach significance [1,382 (193-5683) vs. 335 (175-900) pg/mL; p=0.059]. The mutually adjusted multivariate Cox proportional hazard analysis with the covariates revealed that BNP and NT-proBNP significantly predicted 1-year mortality (hazard ratio [HR] 1.67 and p=0.000; HR 0.60 and p=0.000, respectively). Mortality risk increased with rising BNP and NT-proBNP levels.

Conclusion: BNP and NT-proBNP are predictors of 1-year mortality independent of age, gender, and morbidity. The mortality risk increases with increasing natriuretic peptide concentrations. Plasma levels of BNP and NT-proBNP may be of use to predict prognosis in institutionalized elderly with multiple morbidity.

68. Comparison of plasma and urinary NTproBNP total variation in patients with stable chronic heart failure (CHF). Applicability for tailored treatment

A.M. SCHIMMEL¹, M.J.L. de JONGSTE², J.W.P. RÖMER³, H.N. STEWARD³, F.A.J. MUSKIET¹
Laboratory Center¹, UMC Groningen, Groningen; Department of Cardiology², UMC Groningen, Groningen; Cardiologists³, Willemstad

Introduction: BNP and NTproBNP are released in response to myocyte stretch. Their secretion exhibits a pulsatile pattern. We have previously established that their use for tailored treatment is hampered by the high intra-individual variation. Urine NT-proBNP levels may reflect long term plasma concentrations and thereby exhibit less intraindividual variation. We compared the within-day, day-to-day and week-to-week total variation (CVt) of plasma and urine NTproBNP in patients with stable CHF.

Methods: We recruited 11 patients with stable CHF (mean 61.1 years, range 36-77; 4 women; NYHA classes 2-3). Blood was collected for within-day CVt (n=6; every 2 h starting at 08:00), day-to-day CVt (n=5; collection between 08:00-10:00 on 5 consecutive days), and week-to-week CVt (n=6; collection between 08:00-10:00 on same day of the week for 6 consecutive weeks). Concomitant with blood we collected spontaneously voided urine portions or 24 h urines for NT-proBNP (Roche) measurements.

Results: Median (range) were: 1,177 (203-3,404) pg/mL for plasma NTproBNP (day 1; 08:00-10:00) and 42 (8-171) pg/mL, 6 (0-37) pg/nmol creatinine and 2 (1-18) ng/h for 24 h urine NTproBNP (day 1). Plasma NTproBNP (08:00-10:00) was correlated with the matching 24 h urinary NTproBNP. Within-day CVt of plasma and urine NTproBNP were correlated. Within-day, day-to-day and week-to-week median CVt for plasma NTproBNP (in pg/mL) were: 10.0, 19.7 and 22.5%, respectively. Median CVt for urine NTproBNP were: 46.5% (for pg/mL), 39.11% (pg/nmol creat) and 46.9% (ng/h) for within-day data; 25.6% (pg/mL), 22.6% (pg/nmol creat) and 25.0% (ng/h) for day-to-day data; and 34.7% (pg/mL), 39.9% (pg/nmol creat) and 33.5% (ng/h) for week-to-week data.

Conclusion: Neither plasma, nor urine, NTproBNP are of value for the tailored treatment of patients with CHF.

69. Increasing NTproBNP during the day in patients with heart failure is not related to changing blood pressure and heart rate. Possible consequences for therapy adjustment

A.M. SCHIMMEL¹, M.J.L. de JONGSTE², J.W.P. RÖMER³, H.N. STEWARD³, F.A.J. MUSKIET¹
Laboratory Center¹, UMC Groningen, Groningen; Department of Cardiology², UMC Groningen, Groningen; Cardiologists³, Willemstad

Introduction: Measurement of BNP and NTproBNP might be of use in the diagnosis, follow-up, prognosis and tailored treatment of chronic heart failure (CHF). We have previously established that both BNP and NTproBNP increase during the day in patients with CHF. In the present study we investigated whether this increase correlates with changing blood pressure or heart rate.

Methods: We recruited 10 patients with stable CHF living in Curaçao (mean 59.5 years, range 36-72; 4 women; NYHA classes 2-3). NTproBNP (Roche) was measured at 08:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00 and 18:00. Systolic and diastolic blood pressures and heart rate were measured every 30 min

by ambulatory blood pressure monitoring. All measurements were done in their home environments.

Results: NTproBNP increased gradually from 08:00 to 18:00. Median NTproBNP levels at 18:00 were 18.3% (IQR: 13.2-27.9) higher compared with 08:00. There were no concomitant changes in systolic and diastolic blood pressures, heart rate and rate-pressure product.

Conclusion: Gradually increasing NTproBNP during the day is likely to reflect increasing myocardial stretch caused by increasing volume load. Comparison of BNP or NTproBNP levels in the morning and at the end of the day might be important for optimization of the therapeutic regimen.

70. Cardiac troponin elevations after running are dependent on running distance

A.M.A. MINGELS¹, L.H.J. JACOBS¹, V.W. KLEIJNEN¹, E.M. LAUFER², L. HOFSTRA², W.K.W.H. WODZIG¹, M.P. van DIEIJEN-VISSER¹
Departments of Clinical Chemistry¹ and Cardiology², Maastricht University Medical Centre, Maastricht

Introduction: Cardiovascular benefits from regular exercise are widely accepted. However, clinical implications of exercise-induced cardiac biomarker elevations remain unclear. Here, we evaluated cardiac troponin (cTnT and cTnI) and NT-proBNP concentrations in runners that participated in different running events.

Methods: Runner characteristics and pre- and post-run serum were collected from 176 recreational runners (5 km, n = 43; 15 km, n = 38; 21 km, n = 10; 42 km, n = 85). cTnI was measured on the Architect i2000SR (Abbott) with LOD 0.009 ug/L, CV $\Delta\%$ 0.032 ug/L, URL 0.013 ug/L. cTnT was determined using the pre-commercial hs-cTnT assay on the Elecsys 2010 (Roche) with LOD <0.001 ug/L, CV $\Delta\%$ 0.009 ug/L, URL 0.016 ug/L. NT-proBNP was also measured on the Elecsys with LOD 0.6 pmol/L, CV $\Delta\%$ 5.9 pmol/L, URL 36 pmol/L. Post-run biomarker concentrations were corrected for the effect of dehy-

dration using the post- versus pre-run albumin concentrations. Post- versus pre-run concentrations were compared using the paired Wilcoxon Signed-Rank test.

Results: After running, cardiac troponin concentrations were significantly elevated in the 15 km, 21 km and 42 km runners ($P < 0.05$), except for cTnI in the 15 km runners. Post-run cTnT concentrations were elevated to above the URL in 0%, 13%, 40%, and 86% of the 5 km, 15 km, 21 km, and 42 km runners, respectively. Post-run cTnI concentrations were elevated in 7%, 5%, 60%, and 80% of the runners, respectively. Post-run NT-proBNP concentrations were significantly elevated but remained below the URL in >95% of the runners for all studied distances.

Conclusion: Post-run cardiac troponin concentrations were increasingly elevated to above the URL with increasing running distance, in contrast to NT-proBNP.

71. Evaluation of circulating biomarkers for abdominal aortic aneurysm

B. PULINX¹, F.A.M.V.I. HELLENTHAL², M.P. van DIEIJEN-VISSER¹, G.W.H. SCHURINK², W.K.W.H. WODZIG¹
Departments of Clinical Chemistry¹ and General Surgery², Maastricht University Medical Centre, Maastricht

Introduction: Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a common degenerative disease of the abdominal aorta with a natural course of progressive dilatation and ultimate rupture. To date, aortic diameter is the gold standard for predicting progression as well as risk of rupture. However, diameter fails to predict the expansion rate of individual AAA. The aim of this study is to evaluate several circulating protein biomarkers.

Methods: From January 2006 until present, blood samples were drawn from AAA patients enrolled in a standardized six monthly follow up regime (n=200) and from AAA patients undergoing either elective or emergency reconstruction of the abdominal aorta (n=250). The serum levels of high-sensitive C-reactive protein (CRP), Cystatin C, α -1 antitrypsin (A1AT), immunoglobulin G (IgG) and haptoglobin were analysed in a smaller subpopulation (n=101) on the BN Prospec (Dade Behring Inc., Deerfield, IL, USA).

Results: Patients were divided into 4 groups according to anterior-posterior maximal aortic diameter with group 1: 30-39mm; group 2: 40-49mm; group 3: 50-59mm and group 4: >60mm. Serum IgG, A1AT and haptoglobin concentrations of group 4 were significantly decreased compared to group 1 (p=0.000, p=0.000 and p=0.004, respectively), group 2 (p=0.000, p=0.000 and p=0.001, respectively) and group 3 (p=0.0017, p=0.002 and p=0.027, respectively). Cystatin C concentrations were the same for all different groups.

Conclusion: Our results demonstrate a decreased systemic inflammatory state in patients with larger AAA as compared to patients with smaller AAA, supporting the hypothesis that remodelling of the dilatating aortic wall is dominating in small AAA. While in larger AAA, dilatation is due to hemodynamic factors.

Endocrinologie en intermediaire stofwisseling

72. Vaststellen van referentiewaarden van vrij thyroxine met behulp van het laboratorium-informatiesysteem en het effect op de diagnostiek van schildklierfunctiestoornissen

R.K. SCHINDHELM, R.J. SLINGERLAND, A.W. HUISMAN, J.M. RONDEEL

Klinisch Chemisch Laboratorium, Isala klinieken, Zwolle

Inleiding: De indeling van primaire subklinische versus klinische schildklier-functiestoornissen is afhankelijk van het referentiewaardeninterval van fT4 welke gehanteerd wordt door het laboratorium. Het doel van deze studie was het vaststellen van het referentiewaardeninterval van fT4 en het vergelijken van dit nieuwe interval met het huidige referentiewaardeninterval op basis van een retrospectieve analyse van gegevens uit het laboratoriuminformatiesysteem (LIS).

Methode: Met behulp van een filterstrategie werden relevante patiëntenrecords geëxtraheerd uit het LIS, waarbij patiënten (ouder dan 16 jaar) (huisartsenpopulatie) geselecteerd werden waarbij eenmalig TSH en fT4 bepaald zijn. Vervolgens werden patiënten geselecteerd met een TSH binnen het referentiewaarden interval (0,4-4,0 mU/L) om het aantal patiënten met een primaire hypo- of hyperthyreoïdie te beperken. Het effect van de invoering van de nieuwe referentiewaarden werd onderzocht op door huisartsen aangevraagde schildklier diagnostiek in de periode januari 2008 tot en met juli 2008.

Resultaat: 3090 relevante patiëntenrecords werden geselecteerd (gemiddelde leeftijd 53 [16-104] jaar, 14% man). Het 95% non-parametrische referentiewaardeninterval was 11,8-22,6 pmol/L was niet significant afwijkend van het nieuwe (berekende) referentiewaardeninterval. Door de invoering van deze nieuwe referentiewaarden treden verschuivingen van subklinische naar klinische hypothyreoïdie en van subklinische naar klinische hyperthyreoïdie, waarbij de diagnose primaire klinische hypothyreoïdie toeneemt van 2,3 naar 6,9% en de diagnose primaire klinische hyperthyreoïdie stijgt van 5,1 naar 6,1% (binnen de groep met afwijkende TSH-waarden).

Conclusie: Deze methode voor het vaststellen van fT4 is een relatief gemakkelijk toepasbare methode voor het vaststellen of valideren van referentiewaarden op basis van het LIS. Echter, selectie-bias bij gebruik van het LIS is niet geheel uitsloten en kan van invloed zijn de op berekende referentiewaarden.

73. Plasma steroid profiling by tandem mass spectrometry in relative adrenal insufficiency in critical illness indicates a decreased 11-hydroxylase activity

C.M. HEMPEN¹, N. MOLENAAR², A. BEISHUIZEN², I. VERMES¹, G. van der SLUIJS VEER¹

Department of Clinical Chemistry¹, Medisch Spectrum Twente, Enschede; Department of Intensive Care², VU University Medical Center, Amsterdam

Introduction: The mechanisms underlying Relative Adrenal Insufficiency (RAI) in critically ill patients are poorly understood. We therefore studied concentrations of other adrenal steroids than cortisol. Unfortunately, immuno assays are either not available or not specific, especially in the presence of elevated concentrations of crossreactive compounds (1). We expect the LC/MS/MS to have a high potential in this field.

Methods: We successfully modified and implemented a method (1) for the profiling of 10 steroids in human blood plasma on an Applied Biosystems Qtrap 3200. Intensive care patients with a clinical suspicion for RAI underwent a standard ACTH test (patients who received etomidate were excluded) and were subsequently divided in two groups: patients with RAI (ACTH-test with cortisol <0.25 µmol/L) or without RAI.

Results: A marked accumulation of cortisol precursors in RAI could be shown, especially of 11-desoxycortisol. The average cortisol/deoxycortisol ratios in RAI (n=11) and in non-RAI (n=20) are 28 and respectively 107 mol/mol (p<0.001).

Conclusion: These results indicate a decreased activity of 11β-hydroxylase resulting in partially blocked cortisol synthesis possibly contributing to RAI in critically ill patients. LC/MS/MS should have a role in the diagnosis of RAI, unless speed is required, and might reveal its the underlying mechanisms in critical ill patients. It is analytically specific, sensitive enough and can be performed on a single blood sample. The probably decreased 11-hydroxylase activity in RAI could be a target for new therapeutic approaches.

Literature: Guo T et al. Arch Pathol Lab Med 2004; 128: 469-475

74. SHIBA: Severe Hypertriglyceridemia Induced By Alcohol

D. van den BROEK, M. ZUIDERVAART, A. van de WIEL, J.P.M. WIELDERS

Departments of Clinical Chemistry en Internal Medicine, Meander Medisch Centrum, Amersfoort

Introduction: Triggered by two cases in which triglyceride levels dropped dramatically after abstinence of alcohol and after examination of other cases of severe hypertriglyceridemia we hypothesize that Severe Hypertriglyceridemia Induced by Alcohol (SHIBA) is based on a metabolic predisposition in combination with an excessive alcohol intake.

Methods: The laboratory database was searched from 1995-2008 for severe hypertriglyceridemia >25 mmol/l. For 27 patients in the last four years (partly hospitalized) the medical records were suitable for a detailed etiology study. Confounders known for hypertriglyceridemia as well as alcohol intake were registered. The latter was either records based or reconstructed afterwards by personal interviews. Excessive alcohol intake was defined as >21 U/week for men and >14 U/week for women.

Results: We found 179 cases (28 females) with triglycerides >25 mmol/l, 52/179 > 50 and 17/179 > 80nmol/l. Predisposing conditions in the group of 27 patients included familial dyslipidemia (n=1), nephrotic syndrome (n=2), DM (n=14), non-alcoholic liver disease (n=1) and obesity (BMI>25 (n= 21) BMI>30 (n=12)). Excessive alcohol intake was prevalent in at least 14/27 patients. In the excessive drinker group only one had neither DM nor obesity. The majority (72%) had obesity, while 35% had diabetes mellitus.

Conclusion: In cases of severe hypertriglyceridemia an excessive intake of alcohol should be considered. Especially patients with obesity and/or diabetes mellitus are prone to develop SHIBA. The extreme high levels of triglycerides in susceptible individuals suggest that both an increased production of triglyceride particles as well as a reduced clearance are etiologic factors to be considered.

75. Methylmalonic acid values in healthy Dutch children

M. HOGEVEEN¹, I. van BEYNUM², A. van ROOIJ³, L. KLUIJTMANS³, M. den HEIJER⁴, H. BLOM⁵
Department of Paediatrics¹, Metabolic and Endocrine Diseases, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen; Children's Heart Centre², Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen; Department of Paediatrics³, Laboratory of Paediatrics and Neurology, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen; Department of Endocrinology and Department of Epidemiology and Biostatistics⁴, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen; Metabolic Unit⁵, Department of Clinical Chemistry, VU University Medical Centre, Amsterdam

Introduction: Plasma methylmalonic acid (MMA) is a specific marker for functional cobalamin deficiency. This deficiency can give rise to non-specific but serious symptoms in childhood such as developmental delay, convulsions and failure to thrive and may even lead to irreversible neurological damage. Aim of the study: To analyse plasma MMA concentrations in Dutch children and to evaluate possible factors influencing its concentration.

Methods: A number of 186 Dutch children aged 0-19 year were analysed cross-sectionally. Blood was collected to measure MMA, total homocysteine (tHcy), cobalamin (Cbl) and serum creatinine concentrations. In addition, information about medical history, age and sex was recorded.

Results: The geometric mean (GM) plasma MMA concentra-

tion was 0.17 $\mu\text{mol/l}$ (95% CI 0.07-0.42) and the GM tHcy was 6.6 $\mu\text{mol/l}$ (95% CI 3.1-13.9). There is a slight positive correlation between plasma MMA and age in children > 1 year ($r=0.211$, $p<0.05$). Plasma MMA concentrations were significantly higher in children with low Cbl concentrations. No significant difference in MMA, Cbl, tHcy or creatinine concentrations between sexes could be observed. Regression analysis showed that Cbl was the strongest determinant of plasma MMA (regression coefficient -0.414, $P < 0.05$). The association between MMA and Cbl is stronger at increasing age (p for trend 0.045).

Conclusion: Plasma Cbl is the main determinant of MMA in this group of Dutch children. The strength of the association increased with increasing age.

76. Vitamin D status of men and women with low energy fractures at different locations in relation to osteoporosis and dietary vitamin D

E. van der VEER, H.J. ten DUIS, J. van NIEUWPOORT, C.J. JANSEN, J.H. HEGEMAN, J.P.J. SLAETS, H.G. KREEFTENBERG

Departments of Laboratory Medicine, Traumatology, Internal Medicine, University Medical Center of Groningen, Groningen

Introduction: Vitamin D is essential to bone health, calcium absorption, muscle performance, and plays a major role in the risk of falling. Therefore, the vitamin D status and osteoporosis of patients with low energy fractures is studied in relation with i) different fracture locations, ii) risk factors such as age, gender, and BMI, and iii) intake of vitamin D3.

Methods: The 25Hydroxyvitamin D (25OHvitD) was measured in serum of 1127 patients, aged > 50 years.

Results: Patients with hip, and lower leg fractures, and those with simultaneous multiple fractures, had lower vitamin D levels compared with patients with fractures at other locations. Except for the hip fracture, age was not different between the different fracture location groups. Vitamin D deficiency (<50nmol/L 25OHvitD) is more common in the patients with fractures, even in the summer, when compared with healthy

women living at the same 53°N latitude. Men with fractures have a lower vitamin D status than the women with fractures. Especially, the men aged 50-55 years old had deficient vitamin D levels (67%), compared with 38% of the women of the same age, increasing till 87% respectively 76% for the age groups over 80 years old. A third of the men in their fifties with fractures had osteoporosis. Patients with combined consumption of a multivitamin and fatty fish showed slightly higher 25OHvitD levels (plus 9nmol/L, $p=0.0085$). Low BMI levels showed lower 25OHvitD levels and more osteoporosis.

Conclusion: Osteoporosis was present in 40% of the fracture patients, whilst 60% of the men and 54% of the women were 25OHvitD deficient. In guidelines for assessing the patient's risk of future fracture and osteoporosis, the vitamin D status should be included.

77. Salivary cortisol as an alternative for serum cortisol in the low-dose adrenocorticotrophic hormone stimulation test in the diagnosis of adrenal insufficiency?

R.K. SCHINDHELM, J.M.M. RONDEEL
Department of Clinical Chemistry, Isala clinics, Zwolle

Introduction: Salivary cortisol is unaffected by cortisol binding globulin and may very well reflect free serum cortisol levels. The aim of the present study was to compare the salivary cortisol response with the serum cortisol response in a low-dose (1 microgram) ATCH test in a clinical setting and to determine the optimal cut-off value of salivary cortisol as an alternative to serum cortisol.

Methods: We measured serum and salivary cortisol responses to intravenous administration of 1 μg ACTH in 51 patients referred to the Department of Clinical Chemistry for ACHT-testing. Serum cortisol levels were assessed before and 20 and 30 minutes after ACTH-administration and salivary cortisol levels were assessed before and 30 minutes after ACTH administration.

Results: Mean cortisol levels at baseline, 20 and 30 minutes were 0.445 $\mu\text{mol/l}$ (SD:0.212), 0.653 $\mu\text{mol/l}$ (SD:0.222) and 0.681 $\mu\text{mol/l}$ (SD:0.232), respectively. Basal serum cortisol

levels were significantly correlated with serum cortisol levels at 20 and 30 minutes ($r=0.79$ and $r=0.72$, respectively, both $P<0.001$). Median basal salivary cortisol levels were 8.35 nmol/l (IQR:3.75-14.23), whereas salivary cortisol at 30 minutes equaled 35.9 nmol/l (IQR:21.05-46.15). Basal salivary cortisol was significantly correlated with salivary cortisol levels at 30 minutes ($r=0.53$; $P<0.001$). A salivary cortisol level at 30 minutes of 23.5 had a maximum sensitivity and specificity of 78.1% and 66.7% as compared to the serum cortisol cut-off values of >0.50 $\mu\text{mol/l}$ which was used to indicate adequate adrenal function.

Conclusion: The salivary low-dose ACTH-test yields results that parallel the response of circulating cortisol to ACTH. However, the sensitivity and specificity of the salivary cortisol levels are too low to be adequate as an alternative to the serum cortisol measurements.

78. Urinary free metanephrines: faster, better?

W.H.A. de JONG¹, B. PEASTON², T.P. LINKS³, E.G.E. de VRIES⁴, I.P. KEMA¹

Department of Laboratory Medicine¹, University Medical Center, Groningen; Department of Clinical Biochemistry², Freeman Hospital, Newcastle Hospitals NHS Trust, Newcastle; Department of Endocrinology³, Department of Medical Oncology⁴, University Medical Center, Groningen

Introduction: For biochemical diagnosis of pheochromocytoma, quantification of urinary total (free + conjugated) metanephrine (MN) and normetanephrine (NMN) is still a commonly used test. Total metanephrines (MNs) can a.o. be influenced by diet when compared to free MNs. Also, laborious and poorly controlled acid- or enzymatic hydrolysis step in sample preparation of total MNs can be eliminated when measuring free MNs. Aim of this study was to investigate the diagnostic sensitivity of urinary free MNs in comparison with total MNs.

Methods: On-line solid phase extraction coupled to high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection (XLC-MS/MS) was used for measurement of 24 hrs urinary free MN and NMN concentrations. Total MN and NMN were measured using isotope dilution gas chromatography with mass spectrometric detection. Total analysis times per sample were 8 minutes and 1 hr, respectively. Sam-

ples from 120 healthy subjects were used for reference values. Stored samples from 62 histologically proven pheochromocytoma patients were used for assessing diagnostic sensitivity. Biological variation was studied in 26 healthy subjects.

Results: Reference intervals for urinary free MN and NMN were 4.6-20.4 and 6.9-29.0 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine, respectively. Excretion of MNs follows a circadian rhythm. There is significant ($p < 0.01$) positive correlation between free and total fraction for both MN and NMN in 62 pheochromocytoma patients. Free fraction is elevated in all pheochromocytoma patients with elevated total MNs.

Conclusion: Measurement of urinary free MNs has at least the same sensitivity as total MNs. Analysis is faster by use of an automated method (high-throughput) without hydrolysis. It is anticipated this method is also better since it is less influenced by exogenous factors such as diet.

79. Vitamin D deficiency and hypovitaminosis D in the elderly living in Curaçao

T.J.M. LEENDERS¹, F.H.A. van EIJNDHOVEN², A.J. DUIT³, E. van der VEER¹, F.A.J. MUSKIET¹

Laboratory Center¹, UMC Groningen, Groningen; Nursing Home Betesda² and Red Cross Blood Bank³, Curaçao

Introduction: Low vitamin D status is causally related to rickets, osteomalacia, osteoporosis and low neuromuscular status, and associated with cardiovascular disease, diabetes mellitus types 1 and 2, cancer, autoimmune diseases and infections. Insufficient exposure to direct sunlight (heavy clothing, veils, sunscreens), age, colored-skin, high-fat mass, fat malabsorption, liver disease and living at high latitude are among the risk factors for low vitamin D status [i.e. 25-hydroxyvitamin D; 25(OH)D]. Kidney disease may cause low 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)2D]. There is no consensus on 25(OH)D cut-off levels; <25 nmol/L is definitely deficient, while <50 nmol/L and <75 nmol/L are often used as cut-offs for insufficiency/hypovitaminosis D. Curaçao (12 degrees 10N, 69 degrees 0W) is characterized by whole year abundant sunshine (8-10 hours/day). We investigated the vitamin D status of risk groups living in Curaçao.

Methods: We determined the vitamin D status of 55 elderly

people [median 83 years (60-96); 36 females] who were nursed by community nurses or lived in Curaçao retirement or nursing homes. We also studied 8 rehabilitating orthopedic patients [72 years (38-90); 1 female]. Most had little or no exposure to direct sunlight. Serum 25(OH)D, calcium, phosphate, PTH and creatinine were measured. Those exhibiting elevated creatinine, PTH or both had their 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)2D] examined.

Results: The percentage elderly with 25(OH)D below 25, 50 and 75 nmol/L amounted to: 9, 33 and 76%, respectively. Two orthopedic patients were vitamin D deficient. Four elderly had combined high creatinine and PTH, and decreased 1,25(OH)2D.

Conclusion: Abundant sunshine is no guarantee for vitamin D sufficiency. More attention is needed for vitamin D deficiency in risk groups and treatment of low 1,25(OH)2D in elderly with poor kidney function.

80. Vitamin D status of preterm born infants at term age is rather determined by maternal status than by postnatal nutrition

E.M. AMESZ¹, A. SCHAAFSMA², E. van der VEER³, H.N. LAFEBER¹, F.A.J. MUSKIET³

Department of Pediatrics¹, Division of Neonatology, Vrije Universiteit Medical Center, Amsterdam; Research & Development Leeuwarden², Friesland Foods, Leeuwarden; Laboratory Center³, UMC Groningen, Groningen

Introduction: Vitamin D status of preterm infants at discharge and how it is affected by postdischarge nutrition is rather unknown. We investigated the course of vitamin D status from discharge till 6 months of corrected age (CA), and its associations with bone mineral density (BMD) and parameters of bone turnover.

Methods: Using an RCT design, we examined serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] levels, BMD, serum intact parathyroid hormone (iPTH), procollagen type 1 amino-terminal propeptide (P1NP), urinary helical peptides (UHP) and growth in length. At term age, preterm infants ($n=102$) were randomized to enriched (PDF; 100 IU vitamin D3/kg/day) or standard formula (TF; 85 IU vitamin D3/kg/day). Human milk fed preterm infants served as a reference.

Results: Serum iPTH levels were lowest at >85 nmol/L 25(OH)D. At term age and 6 months CA, 40% and 27% of the infants had 25(OH)D levels <85 nmol/L, respectively. Improvement of 25(OH)D was associated with BMD gain and decreased UHP. P1NP at 3 months CA was correlated with 25(OH)D at 6 months CA. PDF caused higher 25(OH)D increment than TF. Growth in length between term and 6 months CA was higher in the PDF than in the human milk fed group.

Conclusion: Preterm infants need 25(OH)D levels >85 nmol/L to reach lowest iPTH levels and low UHP levels. Improved vitamin D status is associated with BMD gain and occurred notably at 100 IU vitamin D/kg/day. The vitamin D status at birth is, however, the most important determinant.

81. Een Koreaans adoptiekind met een stoornis in de groeihormoon-IGF-1 as

J.S. KAMPHUIS¹, L. LUNSHOF², F.G.E. BAKHUIS¹, J.D.E. van SUIJLEN¹

Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium¹, Kind en Jeugd², Gelre ziekenhuizen, Apeldoorn en Zutphen

Inleiding: Op een leeftijd van 6 maanden werd patiënt M (Koreaans meisje) geadopteerd, waarna op 1-jarige leeftijd een groeiachterstand werd geconstateerd. Nader onderzoek liet o.a. hemiplegie links zien als gevolg van corticale dysgenese en afbuiging van gewicht en lengte (<-3SD). Mogelijke oorzaken van kleine lichaamslengte werden nader onderzocht.

Methode: Groeicurve Chromosomenonderzoek Laboratorium onderzoek Clonidine test IGF-1 generatietest.

Resultaat: Anamnese liet een sterk afbuigende groeicurve zien (-3SD), waarbij de biologische ouders een normale lengte (+0.5 resp. 0.3 SD) vertoonden. Lichamelijk onderzoek toonde een achtergebleven skeletleeftijd op basis van X-hand. Algemeen laboratoriumonderzoek in bloed (fT4, TSH, kreatinine, ureum, ...) liet geen bijzonderheden zien. Differentiaaldiagnose: coeliakie, syndroom van Turner of groeihormoon deficiëntie/resistentie. Behalve negatief serologisch onderzoek voor coeli-

akie (anti-tTG IgA, IgA) en een normaal karyotype (46, XX) is een te lage concentratie waargenomen van IGF-1 en IGF-BP3 op een leeftijd van 4 en 6 jaar (resp. <-1SD en <-2SD). Een clonidine stimulatietest liet vervolgens een sterke stijging van GH zien na 60 min. (165 mU/l) ten opzichte van startwaarde (10.7 mU/l), hetgeen een GH-deficiëntie uitsluit (GH > 60 mU/l). Differentiaaldiagnose: partiële groeihormoon resistentie met als mogelijke oorzaak een stoornis in de GH-receptor of een afwijkend GH-eiwit. Een normale IGF-generatietest (oplopen IGF-1 concentratie na toediening exogeen GH) impliceert een afwijkend GH-eiwit, daar de signaaltransductie via de GH-receptor blijkbaar op een normale manier verloopt. Nader onderzoek van het GH-eiwit volgt.

Conclusie: Biologisch inactief GH, mogelijk op basis van een afwijkend GH-eiwit, is de oorzaak van achtergebleven groei bij patiënt M.

Bloedvorming, bloedstolling, transfusie

82. De plaats van de factor-V-bepaling bij de laboratoriumdiagnostiek van een verlaagde anabole activiteit van de lever

A.J. van der SLOT-VERHOEVEN^{1,4}; L.T.H. VLASVELD², J.C. EIKENBOOM³, A. CASTEL¹

Afdeling Klinisch Chemisch & Hematologisch Laboratorium¹, Ziekenhuis Bronovo, Den Haag;

Afdeling Interne Geneeskunde², Ziekenhuis Bronovo, Den Haag; Afdeling Trombose en Hemostase³, LUMC, Leiden;

Afdeling Klinische Chemie⁴, LUMC, Leiden

Inleiding: De lever speelt een belangrijke rol bij de synthese van stollingsfactoren en de vitamine K- afhankelijke carboxylering van de factoren II, VII, IX en X. De activiteit van stollingsfactoren is daardoor een zeer gevoelige maat voor de status van de anabole activiteit van de lever. Echter, ook een vitamine K-deficiëntie zal leiden tot een verlaagde activiteit van een aantal stollingsfactoren. Om onderscheid te maken tussen een vitamine K-deficiëntie en een verlaagde anabole activiteit van de lever worden naast een protrombinetijd vaak de activiteiten van de factoren VII en V bepaald. Dit respectievelijk als maat voor de aanwezigheid van vitamine K- en niet-vitamine K-afhankelijke stollingsfactoren. In de praktijk rijst de vraag of factor V wel de beste marker is. Mogelijk is antitrombine beter.

Methode: In een retrospectief onderzoek zijn in 170 patiënten in het LUMC, gediagnosticeerd met ernstige leverziekten, en

in 88 patiënten in Bronovo, met de verdenking verlaagde anabole leveractiviteit, de uitslagen van protrombinetijd, factor V, factor VII (Normotest) en antitrombine vergeleken.

Resultaat: In de Leidse populatie had 7,6% van de patiënten klinisch ernstige leverfunctiestoornissen, maar werd in het laboratorium een normale of zelfs verhoogde factor-V-activiteit gevonden. In Bronovo was dit percentage 19%. Alle patiënten hadden een verlaagde antitrombine-activiteit. In slechts 2% in beide groepen werd een verlaagde factor V-activiteit met normale antitrombine-activiteit gevonden.

Conclusie: Factor V is niet altijd verlaagd bij ernstige anabole afwijkingen van de lever. De factor V-activiteit blijkt daarom niet de beste marker om te differentiëren tussen vitamine K-deficiëntie en verlaagde anabole activiteit van de lever. Antitrombine is een betere discriminator.

83. De “Thomas”-plot en het inschatten van de ijzerstatus bij anemische patiënten in de huisartsdiagnostiek

M.P.G. LEERS, J. KEUREN, W. OOSTERHUIS

Afdeling Klinische Chemie & Hematologie, Atrium Medisch Centrum, Heerlen

Inleiding: Bij een ontstekingsproces is het vaak lastig om onderscheid te maken tussen ijzergebrek, anemie van chronische ziekte of combinatie's hiervan. De acute fase reactie beïnvloedt in nadelige zin de hoogte van de conventionele ijzerstatusgerelateerde parameters. Daar de “Thomas”-plot (Ret-He vs ratio sTfR/log ferritine) in mindere mate beïnvloed wordt door ontstekingsfactoren, is het doel van deze studie om 1) cut-off waarden vast te stellen voor de Thomas-plot en 2) na te gaan of de “Thomas”-plot toegevoegde waarde heeft bij het classificeren van anemieën.

Methode: 133 huisarts-patiënten met verlaagd Hb. Naast de gebruikelijke parameters werden ook soluble transferrine-receptor (sTfR), Ret-He en de ratio sTfR/log ferritine bepaald. Alle aanvragen werden beoordeeld op de conventionele manier (JK) en vervolgens nogmaals door een tweede persoon gebruikmakend van de “Thomas”-plot. Aan de hand van overeenkomstige resultaten werden AUC en cut-off waarden voor Ret-He en de

ratio bepaald. Voor discrepante classificaties werd middels gezamenlijke bespreking geprobeerd een consensus te bereiken.

Resultaat: 107 patiënten werden gezamenlijk overeenstemmig geïnclassificeerd. ROC-curve analyse aan de hand van deze overeenkomstige resultaten laten een optimale cut-off zien van 2,5 voor de ratio sTfR/log ferritine (AUC= 0.969) en 1,998 fmol/L voor de Ret-He (AUC= 0,927). Gebruik van deze cut-off waarden in de Thomas-plot leidt voor de gehele reeks van testpatiënten (n=133) tot een specificiteit van 91%, sensitiviteit van 92%, PPV van 87% en NPV van 95% voor het voorspellen van anemie door ijzergebrek. Van de 26 discrepant geïnclassificeerde patiëntenresultaten konden er 17 juist geïnclassificeerd worden met behulp van de “Thomas”-plot.

Conclusie: De “Thomas”-plot blijkt een goede methode om de ijzerstatus van de patiënt te beoordelen, vooral wanneer men twijfelt tussen een anemie van chronische ziekte of anemie door ijzergebrek.

84. Adherence to recommendations for laboratory monitoring for heparin-induced thrombocytopenia in hospitalized patients treated with low molecular weight heparin

M. ten BERG^{1,2}, P. van den BEMT^{1,3}, A. HUISMAN², F. SCHOBEN^{1,4}, T. EGBERTS^{1,4}, W. van SOLINGE^{1,2}
Department of Pharmacoepidemiology and Pharmacotherapy¹, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Utrecht University, Utrecht; Department of Clinical Chemistry and Haematology², University Medical Center, Utrecht; Department of Hospital Pharmacy³, Erasmus Medical Center, Rotterdam; Department of Clinical Pharmacy⁴, University Medical Center, Utrecht

Introduction: In Summary of Product Characteristics and clinical guidelines it is recommended to monitor the platelet count in patients treated with low molecular weight heparin (LMWH) in order to detect heparin-induced thrombocytopenia (HIT) early when it occurs. When HIT is suspected it is recommended to test for the presence of heparin platelet factor-4 antibodies (HPF4-Ab), and to start alternative anticoagulation. This study aimed to investigate adherence to these recommendations in inpatients treated with LMWH.

Methods: Retrospective cohort study within the Utrecht Patient Oriented Database (UPOD), including inpatients without thrombocytopenia-related conditions, who were exposed to dalteparin or nadroparin for at least five days during the period 2004-2005. The percentage of episodes of LMWH exposure in which platelet count monitoring was performed according to the recommendations was determined. In patients with possible

HIT, defined as drop of at least 50% in platelet count within day 5-stopdate/day 10 of treatment, the frequency of testing for HPF4-Ab and the frequency of initiating treatment with alternative anticoagulation (i.e. danaparoid) were determined.

Results: 6,804 patients with 7,770 episodes of LMWH treatment were included. Adherence with platelet count monitoring recommendations varied between 23.0% for surgical patients treated with prophylactic-dose LMWH and 41.8% for patients exposed to unfractionated heparin (UFH) in 100 days before LMWH treatment. In the 74 patients with suspected HIT adherence to testing for HPF4-Ab was 5.4% and adherence to initiating alternative anticoagulation was 0%.

Conclusion: The results of this study suggest that adherence to recommendations for laboratory monitoring for HIT is low. We should work on policy and tools for recommended drug-laboratory monitoring to secure the safe use of drugs like LMWH.

85. Reference values for 67 hematocytometry parameters as determined by the Sysmex XE-5000 analyser

J.M. PEKELHARING, R. de JONGE, J.B. LOKHOFF, J.S. SODIKROMO, M. SPAANS, R. BROUWER, S. de LATHOUDER
Reinier de Graaf, Delft; Erasmus Medisch Centrum, Rotterdam

Introduction: Compared with other hematology analysers and with earlier versions of this instrument, the Sysmex XE-5000 analyser produces 67 blood parameters (and 9 other body fluid parameters). In order to establish the value of all new parameters for use in a clinical setting, it is necessary to know what results can be expected when analysing samples from healthy persons. To answer this question, blood samples from 309 healthy hospital employees were analysed using the Sysmex XE-5000.

Methods: After a publicity campaign in our clinic, we obtained voluntary blood samples from 133 male and 176 female hospital employees. The samples were analysed in full mode (including differentials and reticulocyte measurements). ESR was measured in the same tube. In serum taken at the same time some selected chemistry tests were done: LD, Bilirubin and Ferritin.

Results: Our results describe for the first time the reference values for a number of new parameters. A summary of the new parameters follows here. IRF (Immature reticulocytes) m/f: 1.6-10.5 %Ret-He (filling of reticulocytes) m/f: 1940-2390 amolD-He (differential filling of erys and retis) m: 287-453 amol f: 239-451 amolIPF (immature platelets) m/f: 0.8-6.3 % or 2.3-12.7 x 10E9/INeut-X (degranulation) m/f: 128-138 chIG ("bands") m/f: <0.06 % or <0.06 x 10E9/IFor many parameters we found that different ranges should be used for males and females.

Conclusion: Reference ranges for 67 known and new hematology parameters were established. In our study we did not take a sample from the general population, but from healthy and working hospital employees, which no doubt lead to more ideal and narrower reference ranges than when blood samples from the general population were obtained.

86. Diagnosing iron-deficiency anaemia among patients with a chronic inflammatory disease

E.C. van DONGEN-LASES¹, A.M. LINNSEN², F. de VEGT², P.L.C.M. van RIEL³, D.W. SWINKELS¹, A.E. van EDE³
Departments of Clinical Chemistry¹, Epidemiology, Biostatistics and Health Technology Assessment² and Rheumatology³, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen

Introduction: Iron deficiency anaemia (IDA) among patients with anaemia of chronic disease (ACD) is difficult to diagnose with certainty. The aim of our study was to explore the value of hepcidin, reticulocyte haemoglobin equivalent (Ret-He), erythrocyte haemoglobin equivalent (RBC-He) and delta haemoglobin equivalent (Delta-He) in diagnosing IDA among ACD patients in comparison to the conventional diagnostic parameters mean cell volume, ferritin and transferrin saturation.

Methods: Hundred-six patients with rheumatoid arthritis participated in this explorative cross-sectional study. Fresh EDTA-anticoagulated blood samples of all patients were analysed for Ret-He, RBC-He and Delta-He on a Sysmex XE-5000 automated haematology analyzer. Delta-He was defined as Ret-He minus RBC-He. Serum hepcidin levels were measured by weak cation exchange chromatography followed by mass spectrometry. The presence and type of anaemia (IDA, ACD or both) was determined by conventional laboratory tests.

Results: Receiver operator characteristic (ROC) analysis showed that hepcidin had the highest discriminating power in the diagnosis of IDA (either with or without ACD), with an area under the curve (AUC) of 0.85 (95 % confidence interval = 0.71 – 1.00). RBC-He had only a slightly lower performance, with an AUC of 0.83 (0.67 – 0.95). Also Ret-He turned out to be useful for this diagnostic purpose (AUC = 0.77; 0.59 – 0.99), but Delta-He did not lead to a better identification of IDA as coincidence would do. The percentage total agreement between the conventional classification and the classifications based on hepcidin or RBC-He measurement alone was 75 % and 72 %, respectively.

Conclusion: The analytical performance of hepcidin and RBC-He indicates that these markers are useful for the differentiation between the different types of anaemia in patients with a chronic inflammatory disease.

87. Ernstige anemie in een Nederlandse familie met een hemoglobine variant Hb Debrousse (beta96 [FG3] Leu>Pro)

M. van WIJNEN¹, P. van BALEN², P.H.G. HOGEMAN³, S. WITTEBOL², R.J. KRAAIJENHAGEN¹
Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Afdeling Interne Geneeskunde², Kindergeneeskunde³, Meander Medisch Centrum, Amersfoort

Inleiding: Bij een 39 jarige vrouw werd middels routine onderzoek een gecompenseerde niet-immuungemedieerde hemolyse geconstateerd. Dit bleek te berusten op de aanwezigheid van een zeldzame instabiele hemoglobine variant met hoge zuurstof affiniteit: Hb-Debrousse (heterozygoot beta96 [FG3] Leu>Pro). Kort na deze diagnose werden zij en haar 4-jarige zoon opgenomen met een zeer diepe anemie.

Methode: Hb elektroforese werd uitgevoerd op de Capillarys (Sebia). Sequencing werd uitgevoerd op de ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Resultaat: Bij opname had patiënte tekenen van een infectie met een opvallend laag Hb (2.9 mmol/L), normaal MCV, verhoogd LDH (1950 IU/L), negatieve directe Coombs en lage reticulocyten. Aangezien patiënte bekend was met een Hb Debrousse, werd er Parvovirus B19 serologie en PCR ingezet. Dit toonde een actieve B19 infectie. Twee dagen later werd haar zoon opgenomen met een hemolytische crisis (Hb 3.9

mol/L). Ook in dit geval was er sprake van een actieve B19 infectie en werd de Hb Debrousse variant aangetoond. Moeder en zoon herstelden na enkele dagen.

Conclusie: Hier beschrijven wij een nederlandse familie met de zeldzame hemoglobine variant: Hb Debrousse (beta96 [FG3] Leu>Pro). Deze hemoglobine variant is geassocieerd met een chronisch gecompenseerde hemolyse. In het geval van een Parvovirus B19 infectie kunnen deze patiënten in een (voorbijgaande) apastische crisis raken. Aangezien een B19 infectie veel op jonge leeftijd voorkomt en een deel van de volwassenen deze infectie nog niet heeft doorgemaakt is het raadzaam om in het geval van een ernstige hemolytische anemie bij een virale infectie, naast intrinsieke erythrocyt afwijkingen ook te denken aan een mogelijke onderliggende hemoglobine variant.

Literatuur: Lacan et al. Am J Hemat 1996; 51: 276-281.

88. Interpretatie van resultaten van het anemieprotocol door een laboratoriumspecialist resulteert in een sterke toename van het aantal nieuw gevonden patiënten met een hemoglobinopathie

H.J. ADRIAANSEN, J.A. REMIYN, H.J. LEURDIJK, J.D.E. van SUIJLEN
Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Gelre Ziekenhuizen, Apeldoorn en Zutphen

Inleiding: Bij verdenking op anemie in de eerste lijn wordt frequent een anemieprotocol gebruikt. Dit protocol, veelal gebaseerd op de NHG-standaard Anemie, beoogt middels aanvullende bepalingen de oorzaak van de anemie op te sporen. De eerste differentiatie is op basis van de MCV. In 1998 zijn we gestart met een anemieprotocol. Afhankelijk van de MCV worden aanvullende analyses verricht. Hb-pathie analyse wordt niet automatisch gedaan. De uitslagen werden t/m 2007 zonder gericht commentaar verzonden. In 2008 zijn we gestart met het interpreteren van de uitslagen door een laboratoriumspecialist. Vraagstelling is of een dergelijke activiteit meerwaarde heeft. De eerste analyse betreft de detectie van patiënten met een hemoglobinopathie. Hiervoor werden resultaten van 2007 en 2008 met elkaar vergeleken.

Methode: Voor beide jaren werd de periode januari t/m november geanalyseerd. Vergeleken werden de volgende aantallen: aanvragen anemieanalyse, gevonden anemieën, microcytaire

anemieën (MCV <80 fl), Hb-pathie analyses t.b.v. de eerste lijn en vastgestelde hemoglobinopathieën.

Resultaat: Aanvraag anemieanalyse met tussen haakjes gevonden anemieën: in 2007 41.682 (5367) in 2008 45.666 (6673). Microcytaire anemie respectievelijk 1534 en 1803 keer. In ruim 90% betrof het ijzerebreksanemie. Hb-pathie analyses voor een patiënt uit de eerste lijn: in 2007 41 keer, in 2008 127 keer (50 keer direct door huisarts aangevraagd en 77 keer naar aanleiding van het anemieprotocol). beta-thalassemie werd het vaakst gevonden: in 2007 10 keer en in 2008 46 keer. Gerichte Hb-pathie analyse naar aanleiding van het anemieprotocol resulteerde in >70% tot de diagnose hemoglobinopathie, met name beta-thalassemie, alfa-thalassemie en HbE.

Conclusie: Interpretatie van resultaten van een anemieanalyse genereert meer gerichte Hb-pathie diagnostiek. Dit resulteert in een viervoudige toename van het aantal nieuw gevonden patiënten met een beta-thalassemie.

89. Dose requirement and bleeding tendency of oral anticoagulation depends on genotype

J.W.P.H. SOONS, P. VERSCHUURE, J.G. LEUVERMANS
Clinical laboratory, St. Anna Hospital, Geldrop, The Netherlands

Introduction: Interindividual variation in dose requirement and bleeding tendency in patients receiving oral anticoagulation can possibly be caused by polymorphisms in the cytochrome P450 enzyme CYP2C9 or mutations in the enzyme vitamin-K-epoxide-reductase (VKOR). This study describes the effects of the genotypes CYP2C9*1, *2 and *3 and VKORC1 -1639 G>A mutations on the dose requirement of acenocoumarol and phenprocoumon. Also the bleeding tendency in the patient population was studied and correlated to the genotype for both acenocoumarol and phenprocoumon.

Methods: 164 patients were included in this study. 121 received phenprocoumon and 43 received acenocoumarol. All patients were genotyped for the abovementioned mutations. The dose requirement to obtain the target PT-INR of each patient was measured and normalized on the mean dose requirement of the wild types for both anticoagulants. The bleeding tendency was

scored and subdivided into minor bleedings (bruises, nose and eye bleedings) and major bleedings (cerebral, joint and gastrointestinal bleedings).

Results:

Conclusion: Patients with a VKORC1 -1639 G>A mutation and/or a CYP2C9*2 and/or *3 polymorphisms need a significant lower dose anticoagulant compared to their wild types. The decrease in dose requirement is higher in patients receiving acenocoumarol. About one third of the patients receiving oral anticoagulation have had a bleeding. Three quarters of those bleedings is found in patients that have a VKORC1 mutation or a CYP2C9*2 or *3 mutation. The reduced dose requirement and the higher bleeding tendency found in patients with a mutation suggest that involvement of the genotype in obtaining the dose needed will reduce the number of bleedings.

90. Evaluatie van hemoglobinopathiediagnostiek in de regio Midden Holland.

G.W.A. LANSBERGEN¹, I.H. van ROOYEN-NIJDMAN¹, F.G. VERSTEEGH², P.J.M.J. KOK¹, J.M.M.H. THOMAS¹, P.C. GIORDANO³

Afdeling Klinische Chemie¹, Groene Hart Ziekenhuis, Gouda; Afdeling Kindergeneeskunde², Groene Hart Ziekenhuis, Gouda; Afdeling Hemoglobinopathieën Lab-Humane en Klinische Genetica³, Universitair Medisch Centrum, Leiden

Inleiding: Het Groene Hart Ziekenhuis heeft een adherentie van ca. 200.000 inwoners in de regio Midden Holland met een diversiteit aan etnische achtergronden. In het klinisch chemisch lab te Gouda vindt al ruim 12 jaar diagnostiek plaats voor hemoglobinopathieën. Dit onderzoek is een evaluatie van deze periode waarin vele verschillende hemoglobinopathieën zijn opgespoord, evenals er nieuwe mutaties zijn gevonden.

Methode: In de periode 1996-2008 is voor 2426 patiënten in de regio hemoglobinopathie-onderzoek verricht. Middels gerichte aanvragen, belaste familie-anamnese en/of n.a.v. HbA1c-metingen is er gescreend op hemoglobinopathieën met HPLC. Indien van toepassing is er DNA-analyse verricht. Van alle gescreende patiënten zijn de labuislagen opgenomen in een database.

Resultaat: Van alle 2426 gescreende patiënten bleken er 648 een thalassemie te hebben. Daarvan had 32% (206) een heterozygote beta-talassemie, 24% (156) een heterozygote alfa+-thalassemie, 9% (60) HbAS, 5% (36) heterozygote alfa-0-thalassemie en 29% (190) overige. Nieuw gevonden mutaties van hemoglobinopathieën zijn bekend als Hb-Gouda, Hb-Groene Hart, Hb-Bleuland.

Conclusie: In ruim twaalf jaar tijd is er een gedetailleerde database opgebouwd van alle gevonden hemoglobinopathieën. Naast de meest voorkomende thalassemieën zijn er vele bijzondere varianten opgespoord en nieuwe mutaties gevonden. Vandaag de dag staat hemoglobinopathie-diagnostiek in Gouda nog steeds hoog in het vaandel. Middels een speciaal pakket op het aanvraagformulier vragen zowel medisch specialisten, huisartsen als verloskundigen hemoglobinopathie-diagnostiek aan.

91. Effectiveness of autologous platelet gel in total knee replacement

R.C.R.M. VOSSSEN¹, J.M.R. DRENT¹, N.P. KORT², B.J.W. THOMASSEN²

Departments of Clinical Chemistry¹ and Orthopedics², Orbis Medical Center, Sittard

Introduction: Management of effective haemostasis and wound healing is important for successful outcome after total knee replacement (TKR). Therefore, the clinical application of autologous platelet gels is investigated as a haemostatic agent which has the potential to improve tissue healing. In our study, 58 TKR patients were randomly allocated in a GPS or control group. Intra-operatively a combination of autologous platelet rich plasma (PRP) and thrombin, prepared with the GPS device, was sprayed on the surrounding tissues in the knee joint. Outcome was evaluated by measuring Hb and CRP levels, VAS pain score and clinical evaluation with questionnaires. However, no significant differences were found in the GPS and control group. To further analyse the effectiveness of the GPS device additional laboratory analyses in 10 patients were performed.

Methods: Pre-operative citrated blood of 10 GPS patients was

collected for the GPS device (60 ml) and platelet analyses (7 ml) by flowcytometry, using CD61 and CD62 (P-selectin on activated platelets) before and after in vitro platelet activation. After surgery, the PRP and PPP prepared with the GPS device, were also analysed by flowcytometry and bacteriological screening.

Results: Pre-operative platelet activation was disturbed in 3 patients. After surgery, PRP activation in 4 patients was inadequate. The platelet count in GPS derived PRP of 3 patients was lower than expected whereas it was significantly higher than expected in PPP of 4 patients.

Conclusion: Although the number of test patients was small, a clear trend was noticed for suboptimal platelet count and activation in the GPS derived PRP. This might explain the lack of difference in clinical outcome. Furthermore, the procedure of GPS adds a potential infection risk to TKR.

92. Homozygote mutatie in het TMPRSS6-gen coderend voor matriptase-2 veroorzaakt microcytaire anemie

R. BROUWER¹, E.T.G. WIEGERINCK¹, K.L. van ROOIJEN², M. CUIJPERS³, E.C. van DONGEN-LASES, T.J.M. de WITTE³, D.W. SWINKELS¹

Afdeling Klinische Chemie¹, UMC St Radboud, Nijmegen; Afdeling Interne Geneeskunde², Meander Medisch Centrum, Amersfoort; Afdeling Hematologie³, UMC St Radboud, Nijmegen

Inleiding: Toename van het ijzerregulerende hormoon hepcidine verlaagt de ijzerbeschikbaarheid voor de erytropoëse. De laatste jaren zijn verschillende regulatiemechanismen voor de hepatische hepcidinesynthese ontrafeld. Deze nieuwe inzichten kunnen bijdragen om oorzaken van tot nog toe onbegrepen anemieën op te sporen, zoals in de gepresenteerde casus wordt aangetoond.

Methode: Bij een kaukasische vrouw, geboren in 1968, werd op 12 jarige leeftijd een microcytaire anemie vastgesteld. Orale ijzersuppletie bleek niet effectief. Na uitgebreide anemiediagnostiek zijn alle bekende oorzaken (waaronder beenmerg- en darmpathologie, inflammatie) uitgesloten. Door intraveneuze ijzersuppletie stegen Hb en MCV tot subnormale waarden met een significante klinische verbetering. Het serumferritine werd relatief hoog (tot 400 ug/L), terwijl serumijzer (tot 8 umol/L) en transferrine verzadigingsfractie (13-16%) verlaagd bleven. Hepcidineconcentratie in urine werd gekwantificeerd middels SELDI-TOF massaspectrometrie. Genetische analyses werden uitgevoerd voor hepcidine-regulerende genen.

Resultaat: Ondanks ijzerdeficiëntie en afwezigheid van inflammatie, had de patiënte een hoog urine hepcidineconcentratie. Met sequentieanalyse werden geen pathologische mutaties gevonden in bekende hepcidine-regulerende genen (HFE, Tfr2, HJV, HAMP), maar wel in het recent ontdekte TMPRSS6 gen, coderend voor serine protease matriptase-2. Natief matriptase-2 knipt de bone morphogenetic proteïne-coreceptor hemojuveline en remt daardoor een belangrijke stimulerende route voor hepcidinesynthese. De homozygote mutatie leidt tot een aminozuursubstitutie (Cys702Phe), waardoor een disulfide brug wordt verbroken en vermoedelijk de conformatie van het actieve deel wordt verstoord.

Conclusie: Wij beschrijven een patiënte met een microcytaire anemie veroorzaakt door een nieuwe homozygote mutatie in het TMPRSS6 gen. Een verminderde activiteit van matriptase-2 leidt tot een (relatief) verhoogde hepcidineconcentratie waardoor de functionele ijzerbeschikbaarheid inadequaat is.

93. Procoagulant properties of human alternatively spliced tissue factor

A.N. BÖING¹, C.M. HAU¹, V.Y. BOGDANOV², A. STURK¹, R. NIEUWLAND¹

Department of Clinical Chemistry¹, Academic Medical Center, Amsterdam; Division of Hematology and Medical Oncology², The Samuel Bronfman Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York

Introduction: Tissue factor (TF), a 45 kDa transmembrane protein, initiates coagulation. Recently, an alternatively spliced form of TF (asTF) was reported to be present in several cell types and human plasma. Procoagulant properties of asTF, however, are still disputed. Therefore, we developed an expression construct to evaluate possible procoagulant properties of human asTF expressed in cell culture.

Methods: RNA was isolated from human endothelial cells, and asTF cDNA was used in the GateWay cloning system (Invitrogen). Constructs were transfected into TF-deficient Mia PaCa-2 cells. Coagulant activity of whole cells and lysates of asTF-transfected cells, mock-transfected (EGFP) cells, and untransfected cells was tested in a thrombin generation test, with and without antibodies against TF, VII(a) or XII(a). For comparison, Mia PaCa-2 cells were transfected with full length human TF cDNA.

Results: Apparent molecular weights of alternatively spliced

TF and full length TF were 27 kDa and 45 kDa, respectively. We were unable to confirm unambiguously secretion of asTF in the culture supernatant of asTF-transfected cells. Not only cells transfected with full-length TF but also those transfected with asTF generated thrombin upon reconstitution of normal human microparticle-free plasma. Thrombin generation was strongly inhibited by antibodies against VII(a) or TF but not by anti-XII(a). Untransfected- and mock-transfected cells, however, also initiated VIIa-dependent thrombin generation, and the amount of thrombin generated was comparable to that of asTF-transfected cells.

Conclusion: Compared to controls (untransfected or mock-transfected) cells, no additive procoagulant properties of asTF expressed in Mia PaCa-2 cells could be demonstrated. From our experiments it can not be excluded that native asTF, which circulates in normal human plasma, associates with membranes of Mia PaCa-2 cells thereby initiating extrinsic coagulation.

94. Tissue factor is raft-associated in purified plasma membranes

A.N. BÖING, C.M. HAU, A. STURK, R. NIEUWLAND

Department of Clinical Chemistry, Academic Medical Center, Amsterdam

Introduction: Tissue factor (TF), a 45 kDa transmembrane protein, initiates coagulation. Previously, TF was shown to be localized in lipid raft domains of total membrane preparations of various TF-expressing cell types. In the present study, we determined the RAFT association of human TF in total cell membrane preparations, and in purified fractions of plasma membranes and intracellular membranes.

Methods: Total RNA was isolated from human umbilical vein endothelial cells, and TF cDNA was used in the GateWay cloning system (Invitrogen). The TF construct was transfected into TF-deficient Mia PaCa-2 cells. To study the RAFT association of TF in the total cell membrane preparation, TF-transfected cells were lysed with Triton-X100 (1% v/v), followed by Optiprep gradient centrifugation (16 hours; 33,000rpm, SW41 Ti). The distribution of TF in purified membrane fractions was determined by lysing TF-transfected cells in a nitrogen bomb

(1050 Psi, 20 minutes), followed by Percoll gradient centrifugation. After removal of Percoll, purified plasma- and intracellular membranes were incubated with Triton-X100, followed by Optiprep gradient centrifugation. After ultracentrifugation, nine fractions were collected to study the RAFT association of TF by Western blot analysis.

Results: Transfected MiaPaCa-2 cells expressed human TF, which was functionally active in a thrombin-generation test. In the total cell membrane preparations as well as in purified plasma membranes, TF completely colocalized with caveolin. In the intracellular membrane fraction, hardly any TF was detectable.

Conclusion: TF is completely associated with RAFTS in purified plasma membranes. The almost completely lack of TF in intracellular membranes suggests that the intracellular transport of TF to the plasma membrane is a highly efficient process.

Infectie, afweer, allergie

95. Conformational change in beta-2-glycoprotein I induces immunogenicity and causes anti-thrombotic Ab production

E.A.T. van BERKEL*, C. MAAS*, B. de LAAT, R. URBANUS, P.G. de GROOT, M.F.G. GEBBINK

Department of Clinical Chemistry and Haematology, Laboratory for Thrombosis and Haemostasis, University Medical Center, Utrecht

*These authors contributed equally to this work.

Introduction: APS (anti phospholipid syndrome) is an autoimmune disease characterised by venous and arterial thrombus formation and recurrent pregnancy loss. The disease is associated with high levels of antiphospholipid antibodies (Ab), reactive to phospholipids in the presence of a cofactor. The most prevalent cofactor is the plasma protein beta-2-glycoprotein I (β 2GPI). Not much is known about the aetiology of this disease. β 2GPI undergoes a conformation change upon binding to anionic lipids. Importantly, proteins that undergo conformational changes can adopt amyloid-like properties and, as we reported earlier, this correlates to their immunogenicity. We therefore hypothesize that binding of β 2GPI to phospholipids

results in the formation of amyloid-like properties and that this shape change is sufficient to induce immunogenicity of β 2GPI.

Methods: Human β 2GPI was either left untreated (native β 2GPI), incubated with cardiolipin (CL- β 2GPI) or subjected to reducing and alkylating conditions (RA- β 2GPI) and the amyloid like properties were analysed using classical amyloid detection techniques. The immune response in terms of Ab response evoked by the β 2GPI formations was determined after immunization in mice. In addition, pathological Ab formation was determined by analysis of serum Abs against domain I of β 2GPI and LAC was performed with isolated murine plasma.

Results: We show that cardiolipin binding to β 2GPI induces amyloid-like fibril formation. These amyloid like properties can be mimicked in vitro by denaturation (reducing and alkylation) of the protein. More importantly, both CL- β 2GPI and RA- β 2GPI -in contrast to native β 2GPI- can evoke an in vivo

immune response leading to IgG formation with pathological properties characteristic for APS patient Abs.

Conclusion: The introduction of amyloid-like properties in β 2GPI can induce immunogenicity and may contribute to pathological Ab formation in APS.

Lever- en darmpathologie

96. Evaluatie van het lactasegenpersistentie-polymorfisme C-13910>T als alternatief voor de lactose H2-ademtest bij verdenking op lactose malabsorptie

J.J.H. HENS^{1,2}, K. HAAPAPPEL³, J.M.M.H. THOMAS^{1,3}, P.J.M.J. KOK^{1,3}

Vakgroep Klinisch Chemici Midden Holland/West Utrecht¹; Zuwe Hofpoort Ziekenhuis²; Resultaat Verantwoordelijke Eenheid Laboratoria³, Woerden; Klinisch Chemisch Laboratorium³, Groene Hart Ziekenhuis, Gouda

Inleiding: De H2-ademtest is een eenvoudige test om lactose malabsorptie te diagnostiseren. Na orale lactose inname wordt langdurig de waterstof excretie gemeten. In deze studie wordt het single nucleotide polymorfisme (SNP) C-13910>T, dat van invloed is op de persistentie van het lactasegen, geevalueerd als diagnostisch alternatief voor de lactose H2-ademtest. Deze SNP bevindt zich 13,9 kb upstream van het lactasegen.

Methode: Bij 39 patienten (6 - 77 jaar) waarbij op aanvraag van een arts een 50-gram lactose H2-ademtest werd uitgevoerd is tevens bloed afgenomen om het lactasegen persistentie polymorfisme C-13910>T te bepalen na Real Time-PCR amplificatie en smeltkurve analyse op een LightCycler-platform (Roche).

Resultaat: Acht patienten (20,5%) hadden een CC genotype van het C-13910>T polymorfisme passend bij primaire lactose malabsorptie. Zeven van deze patienten, waaronder een kind van 7 jaar, toonden ook een afwijkende positieve H2-ademtest.

Negen van de 16 patienten met een CT genotype, waaronder een kind van 6 jaar, en 14 van de 15 patienten met een TT genotype toonden een negatieve H2-ademtest. Vijf van de 16 patienten met een CT genotype, waaronder een kind van 7 jaar, gaven zowel een afwijkend beeld in de H2-ademtest als een stijging in serumglucose te zien in de periode 2 uur na lactose inname.

Conclusie: De aanwezigheid van het CC genotype van het C-13910>T lactasegen persistentie polymorfisme, dat bij volwassenen met primaire lactose malabsorptie is geassocieerd, correleert goed met een positieve lactose H2-ademtest. De correlatie van het CT- en TT-genotype met een negatieve lactose H2-ademtest is minder sterk. Screening op het CC genotype voorafgaand aan een lactose H2-ademtest kan een belastend onderzoek bij patienten en met name ook kinderen met primaire lactose malabsorptie voorkomen.

Nierziekten

97. Pregnancy-associated plasma protein-A and volume status in haemodialysis patients: preliminary results of a longitudinal study

L.H.J. JACOBS¹, A.M.A. MINGELS¹, V.W.C. KLEIJNEN¹, W.K. WODZIG¹, J. van de KERKHOF², J.P. KOOMAN², M.P. van DIEIJEN-VISSER¹

Department of Clinical Chemistry¹, University Hospital Maastricht; Department of Internal Medicine², Division of Nephrology, University Hospital Maastricht

Introduction: Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) is a potential marker for unstable atherosclerotic plaques and it has been linked to adverse outcomes in patients with acute coronary syndromes. Recent studies have shown elevated PAPP-A concentrations in haemodialysis (HD) patients and suggest a link with mortality. This study examined the relationship between PAPP-A and a number of parameters commonly used for risk stratification in HD patients.

Methods: 44 HD patients were followed for 6 months during which serum concentrations of PAPP-A, and cardiac troponin T (cTnT) were assessed every two months. Volume distribution was simultaneously measured by multifrequency bioimpedance (BIA). PAPP-A reference values were determined in a population of healthy men (n=156) and women (n=131).

Results: At baseline, 5 out of 44 patients showed PAPP-A concentrations >75 mIU/L, whereas all other measurements were

<23 mIU/L. Excluding these extremes, mean PAPP-A concentrations in the HD patients were: 12.5 mIU/L (\pm 5.1) in men and 9.1 mIU/L (\pm 2.7) in women, compared to 6.0 mIU/L (\pm 2.5) and 4.6 mIU/L (\pm 1.3) in the reference population. PAPP-A concentrations in patients with a history of ischaemic cardiac damage (ICD) correlated with the BIA-derived phase-angle ($r = -0.898$, $p < 0.01$) and with cTnT concentrations ($r = 0.624$, $p < 0.05$). No correlations with PAPP-A were found in patients without ICD.

Conclusion: Both changes in volume status and cardiac biomarkers have been linked to increased mortality in HD patients. The fact that PAPP-A correlates with these parameters in patients with ICD, suggests a potential role for PAPP-A as a marker for cardiovascular disease in HD patients. Further research is needed to investigate the role of PAPP-A in cardiovascular disease and to study the cause and significance of the unexplained extreme values.

98. Fatty acid-binding protein as marker for renal injury; a review

M.M.A.L. PELSERS

Afdeling Klinische Chemie, Academisch Ziekenhuis, Maastricht

Introduction: The assessment of biomarkers to detect renal injury has been studied before, but the sensitivity and specificity of urinary and serum profiles of these markers still need to be improved. One of the promising new markers for detection of renal injury is the family of 15 kDa cytoplasmic fatty acid-binding proteins (FABPs). Remarkably, however, the application of FABP as marker for renal injury due to ischaemia, toxic heavy metals or in end-stage renal failure has only recently been investigated.

Methods: The present status of two types of FABP in the kidney (heart-type (H-FABP), located in the distal tubular cells, and liver-type (L-FABP), which is located in the proximal tubular cells), is reviewed for sensitive detection of renal injury. This review is based on an overview of the literature on clinical

diagnostics applying plasma and urinary H-FABP as well as L-FABP levels in renal toxicity, kidney transplantation or as clinical parameter in end-stage renal failure.

Results: H-FABP has been shown to be a proper marker for detection of ischaemic injury in tissue perfusates of non-heart-beating donor kidneys. Urinary L-FABP has been evaluated recently more explicitly and shows significant elevations in progressive end-stage renal failure as well as after ischaemic injury due to renal transplantation or cardiac bypass surgery.

Conclusion: H- and L-FABP have been shown to be useful markers for rapid detection and monitoring of renal injury. Further study of the diagnostic and prognostic use of these FABP types will require further commercialization of automated and rapid assays for proper clinical application.

Gynaecologie/obstetrie

99. The minor allele of the FADS1 gene polymorphism is associated with lower erythrocyte arachidonic acid (AA) content in pregnant women, notably after supplementation of docosahexaenoic acid (DHA)

D.A.J. DIJCK-BROUWER¹, B. SANJABI¹, S.A. van GOOR¹, P. TERPSTRA², I.P. KEMA¹, M. HADDERS-ALGRA³, F.A.J. MUSKIET¹

Laboratory Medicine¹, Epidemiology², Department of Pediatrics³, University Medical Center Groningen, Groningen

Introduction: AA and DHA are considered conditionally essential during pregnancy. DHA status seems insufficient during pregnancy, and many DHA supplementation studies are conducted. However, adequate status of both AA and DHA seems important. Minor alleles of genetic variants of the FADS1 (delta-5 desaturase) are associated with lower serum phospholipid AA contents. We investigated the association between a tag single nucleotide polymorphism (SNP) of the FADS1 gene and erythrocyte fatty acids (FA) before and after supplementation with DHA in pregnancy.

Methods: In week 16 and 36 of pregnancy, blood samples were collected for erythrocyte FA composition and DNA isolation. Linkage Disequilibrium analysis of the FADS1 gene resulted in a tag SNP (rs174545, C major allele; G minor allele). Women received placebo, DHA (220 mg/day) or DHA+AA (220 mg each/day) from week 16 of pregnancy.

Results: We analyzed 86 and 101 genotype-erythrocyte FA

pairs before and after supplementation (38 DHA, 33 DHA+AA, 30 placebo) respectively. Before supplementation, GG subjects showed lower erythrocyte AA, 22:4 ω 6, 22:5 ω 6 and LCP ω 6 and higher erythrocyte 18:2 ω 6, 20:3 ω 6 and DHA/AA as compared with CC subjects. CG subjects showed higher 20:3 ω 6 compared with CC subjects and higher AA, 22:4 ω 6, LCP ω 6 and lower DHA/AA as compared with GG subjects. In CC subjects, DHA increased erythrocyte DHA and DHA/AA and DHA+AA increased DHA, as compared to placebo. In CG subjects, DHA increased erythrocyte DHA but decreased AA, 22:4 ω 6 and LCP ω 6, whereas DHA+AA decreased erythrocyte LCP ω 6 compared with placebo. AA tended to be lower in GG subjects receiving DHA compared with DHA+AA.

Conclusion: The FADS1 minor allele was associated with lower AA status in pregnant women. More important, DHA supplementation decreased AA status in GG subjects.

100. The course of peripartum depressive symptoms is associated with gene polymorphisms of MAOA, 5-HTTLPR and COMT

B. DOORNBOS¹, D.A.J. DIJCK-BROUWER², I.P. KEMA², S.A. van GOOR², J. KORF¹, F.A.J. MUSKIET²

University Center for Psychiatry¹, Laboratory Medicine², University Medical Center Groningen, Groningen

Introduction: Depressive disorders are complex diseases that do not follow Mendelian inheritance law. Their genetic basis is anchored in 'disease susceptibility genes' that precipitate depression by environmental triggers, such as mild or severe life events. Polymorphisms of monoamine-related genes have particularly been associated with depression following life-events (Caspi et al.). The peripartum is a physiologically and psychologically challenging period, characterized by fluctuations in depressive symptoms, therefore facilitating prospective investigations in this gene x environment interaction.

Methods: We included 89 pregnant women, who filled out the Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS) in week 16 and 36 of pregnancy, and week 6 and 12 postpartum. We analyzed MAOA, 5-HTTLPR and COMT polymorphisms in their DNA samples.

Results: We found a significant interaction between the course of depressive symptoms and polymorphisms in 5-HTTLPR ($p=0.019$); MAOA ($p=0.044$) and COMT ($p=0.026$), and MAOA*COMT ($p<0.001$) in a repeated measure analysis. Par-

ticularly women carrying the combination of the low activity variants of MAOA and COMT showed increased EPDS scores at week 36 of pregnancy and 6 weeks postpartum ($p<0.001$), but not during early pregnancy or 12 weeks postpartum. We hypothesize that due to the low activity of MAOA and COMT these women have less capacity to neutralize the stress-evoked release of catecholamines, which might be experienced as a high sympathetic-tone associated anxious and depressive feelings.

Conclusion: These results support our previous findings that COMT and MAOA low activity variants modify the stress-response (Jabbi et al.). This study suggests their role in peripartum depressive symptoms, emphasizing that particular combinations of these polymorphisms may exhibit strong effects in specific periods.

Literature:

1. Caspi et al, Science 2003; 5631: 386;
2. Jabbi et al, Mol Psych 2007; 5: 483

101. Supplementation of a low dose of DHA or DHA+AA does not influence peripartum depressive symptoms in a small population based sample

B. DOORNBOS¹, S.A. van GOOR², D.A.J. DIJCK-BROUWER², A. SCHAAFSMA³, J. KORF¹, F.A.J. MUSKIET²
Graduate School of Behavioral and Cognitive Neuroscience, University Center for Psychiatry¹, Laboratory Medicine², University Medical Center Groningen, Groningen; Friesland Foods³, Leeuwarden

Introduction: The decrease of maternal docosahexaenoic (DHA) status during pregnancy has been associated with postpartum depression, especially in women with a low intake of DHA. Since the DHA intake in the Netherlands is low, we investigated whether supplementation of low doses of DHA or DHA plus arachidonic acid (AA) during pregnancy and lactation could prevent depressive symptoms and sleep disturbances in this period.

Methods: Women were supplemented with placebo, DHA (220 mg/day) or DHA+AA (220 mg each/day) from week 16 of pregnancy till three months postpartum. Fatty acid analyses were performed in the available plasma samples at 16 and 36 weeks of pregnancy. Depressive symptoms were measured in weeks 16 and 36 of pregnancy and six weeks postpartum using the

Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS) and within one week postpartum using a blues questionnaire. Indices of sleep quality were determined using a validated questionnaire.

Results: 119 women completed the study. The average frequency of fish intake was low, 0.94 times per week, and did not differ between the groups. The supplementation groups did not differ in mean EPDS scores or changes in EPDS scores, nor in incidence or severity of postpartum blues. Red blood cell DHA, AA and DHA/AA ratio did not correlate with EPDS or blues scores. Indices of sleep quality did not differ between the groups.

Conclusion: Supplementation of 220 mg DHA/day or DHA+AA (220 mg each/day) does not influence peripartum depressive symptoms, in a population based sample with low background DHA intake.

102. Differential courses of peripartum depressive symptoms, identified with Latent Class Analysis are not associated with polymorphisms in mono-aminergic genes

B. DOORNBOS¹, P. de JONGE¹, S.A. van GOOR², M.A.C. TANKE¹, D.A.J. DIJCK-BROUWER², I.P. KEMA², F.A.J. MUSKIET², J. KORF¹
Graduate School of Behavioral and Cognitive Neuroscience, University Center for Psychiatry¹, Laboratory Medicine², University Medical Center Groningen, Groningen

Introduction: The increased incidence of depression during the peri-partum suggests that pregnancy induces depression in genetically vulnerable women. This vulnerable subgroup can be identified based on the course of their depressive symptoms. As mono-aminergic metabolism fluctuates during the peri-partum, the genetic vulnerability might be explained by functional polymorphisms in mono-aminergic genes. We investigated if subgroups identified with Latent Class Analyses (LCA) were related to functional polymorphisms in three candidate genes involved in mono-aminergic metabolism: the 5-HT transporter, MAOA and COMT genes.

Methods: LCA was applied to a dataset of EPDS questionnaires filled in by 101 women during pregnancy (16 and 36 weeks) and postpartum (6 and 12 weeks). LCA scores were related to functional polymorphisms in the promoter region of

the 5-HT transporter and MAOA genes and one in the COMT gene.

Results: Three classes were identified with LCA, which were characterized as 1) postpartum depression (N=8, 8%) 2) no depressive symptoms (N=70, 69%) and 3) depressed during pregnancy (N=23, 23%). None of the gene polymorphisms were related to any of the classes.

Conclusion: This study identified two small subgroups from a large cohort of healthy pregnant women based on the course of the depressive symptom. These subgroups were not related to any of the mono-aminergic candidate genes, contradicting our previous findings. These results emphasize that clinically identified subgroups do not share the same characteristics as subgroups based on a genetic analyses, which puts the clinical applicability of genetic analysis in clinical practice in perspective.

103. Low docosahexaenoic acid (DHA) status in pregnancy relates to activation of the kynurenine pathway; results from a pilot-study

S.A. van GOOR¹, W.H.A. de JONG¹, D.A.J. DIJCK-BROUWER¹, B. DOORNBOS², I.P. KEMA¹, F.A.J. MUSKIET¹
Laboratory Medicine¹, Psychiatry², University Medical Center Groningen, Groningen

Introduction: Tryptophan (trp) is converted to serotonin/melatonin by trp-5-hydroxylase, or to niacin via the kynurenine (kyn) pathway by L-tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) or indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO). At least 2 intermediates in the latter pathway, i.e. 3-hydroxykynurenine (oxidative stress) and quinolinic acid (overstimulation NMDA receptor), are neurotoxic. IDO is induced during inflammation and pregnancy. Placental IDO depletes trp to inhibit local T-cell functioning to prevent fetal rejection. The omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids (LCP) eicosapentaenoic acid (EPA) and DHA have potent anti-(neuro)inflammatory properties by their ability to resolve inflammation. Arachidonic acid (AA) is known for its pro-inflammatory, but also resolving properties. We investigated whether DHA, AA, DHA/AA-ratio, EPA and EPA/AA-ratio are related to the kyn pathway activity, as estimated from kyn, trp and trp/kyn-ratio.

Methods: We collected erythrocytes and EDTA-plasma from 24 healthy women in their 36th pregnancy week. The women

participated in a DHA, DHA+AA or placebo intervention study. Erythrocyte fatty acids were quantified by gas chromatography and flame ionization detection. Plasma trp and kyn were analyzed by high-throughput on-line solid phase extraction-liquid chromatographic-tandem mass spectrometry.

Results: Trp proved unrelated to erythrocyte fatty acids. We found a negative correlation for both DHA ($r = -0.461$; $p = 0.027$) and EPA ($r = -0.441$; $p = 0.035$) with kyn. Both DHA ($r = 0.421$; $p = 0.045$) and DHA/AA ($r = 0.442$; $p = 0.035$) were positively related to the trp/kyn ratio.

Conclusion: DHA and EPA status seem inversely related to IDO activity. Our finding might point at the importance of adequate omega-3 LCP status in pregnancy, which is implicated in (postpartum) depression, maternal selective attention, gestational length and infant growth and neurodevelopment. A larger sample and additional cytokine measurements are needed to confirm our results.

104. General movement quality proves sensitive to dietary DHA/AA ratio in a randomized controlled trial with DHA and AA supplementation during pregnancy and lactation

S.A. van GOOR¹, D.A.J. DIJCK-BROUWER¹, B. DOORNBOS², J.J.H.M. ERWICH³, A. SCHAAFSMA⁴, F.A.J. MUSKIET¹, M. HADDERS-ALGRA⁵
Laboratory Medicine¹, Psychiatry², Obstetrics and Gynecology³, Pediatrics⁵, University Medical Center Groningen, Groningen; Friesland Foods⁴, Leeuwarden

Introduction: Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 ω 3) and arachidonic acid (AA; 20:4 ω 6) are important for neurodevelopment. The neonatal neurological examination according to Prechtl and assessment of general movement (GM) quality are sensitive techniques to assess subtle differences in neurological condition during early infancy. GMs are classified as normal optimal, normal suboptimal, mildly abnormal or the clinically relevant definitely abnormal. We investigated whether supplementation of DHA and AA during pregnancy and lactation improves the infant's neurological condition.

Methods: Healthy women were randomly assigned to placebo (n=36), DHA (220 mg/day, n=42) or DHA+AA (220 mg each/day, n=41) from week 17 of pregnancy till 12 weeks postpartum. Their infants were neurologically examined according to Prechtl at 2 weeks. GM quality was assessed at 2 and 12 weeks.

Results: Neurological condition according to Prechtl did not differ between the groups. Infants in the DHA group showed the highest rate of mildly abnormal GMs, especially at 12 weeks. The placebo and DHA+AA group, with comparable dietary DHA/AA ratios, showed similar GM quality. GM quality at 2 weeks related to maternal near term AA status.

Conclusion: The sensitivity of GM quality to changes in DHA/AA balance may reflect a specific sensitivity of white matter for altered fatty acid intakes, since GM quality is related to white matter integrity. Brain regions differ in DHA and AA contents, indicating region specific regulation of fatty acid handling. White matter DHA and AA contents and the DHA/AA ratio are low. This may suggest that white matter AA and DHA contents are less well regulated or that white matter has a low preference in the hierarchy of AA and DHA accretion.

105. General movement quality proves sensitive to Mead acid and is related to the DHA/AA ratio in a U-shaped manner

S.A. van GOOR¹, A. SCHAAFSMA², J.J.H.M. ERWICH³, D.A.J. DIJCK-BROUWER¹, F.A.J. MUSKIET¹
Laboratory Medicine¹, Obstetrics and Gynecology³, University Medical Center Groningen, Groningen; Friesland Foods², Leeuwarden

Introduction: Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 ω 3) and arachidonic acid (AA; 20:4 ω 6) are important for neurodevelopment. Mead acid (20:3 ω 9) is a marker of essential fatty acid (EFA) deficiency. Assessment of general movement (GM) quality is a sensitive technique to assess subtle differences in neurological condition during early infancy. GMs are classified as normal optimal (normal), normal suboptimal (normal), mildly abnormal (abnormal) or the clinically relevant definitely abnormal (abnormal). We investigated whether infant red blood cell (iRBC) DHA, AA, DHA/AA and Mead acid are related to GM quality.

Methods: Healthy women were randomly assigned to placebo (n=36), DHA (220 mg/day, n=42) or DHA+AA (220 mg each/day, n=41) from week 17 of pregnancy till week 12 postpartum. Twelve weeks postpartum, GM quality of the infants was assessed and iRBC were collected for fatty acid analysis by gas chromatography with flame ionization detection.

Results: Infant RBC-DHA did not relate to GM quality. Higher iRBC-AA was associated with less abnormal GMs. The iRBC-DHA/AA ratio related to the occurrence of abnormal GMs in a U-shaped manner. There was a strong positive relation between iRBC-Mead acid and the incidence of abnormal GMs that reached a nadir at 0.40 g/100 g fatty acids.

Conclusion: The brain developmental trajectory reflected by abnormal GMs at a low iRBC-DHA/AA ratio may be different from the developmental trajectory at a high ratio. High infant Mead acid may point at an intrauterine relative EFA deficiency. Its presence at 12 weeks may be a remnant of suboptimal maternal glucose/insulin homeostasis during pregnancy. The latter may interfere with neurodevelopment. GM quality has proven to be a sensitive neurodevelopmental tool for DHA/AA balance and EFA status.

Neurologie, psychiatrie, KNO en oogheelkunde

106. Cerebrospinal fluid alpha-synuclein does not discriminate between dementia disorders

P.E. SPIES^{1,4}, R.J.F. MELIS^{1,4}, M.J.C. SJÖGREN^{1,4}, M.G.M. OLDE RIKKERT^{1,4}, M.M. VERBEEK^{2,3,4}
Department of Geriatric Medicine¹, Laboratory of Pediatrics and Neurology², Department of Neurology³, Alzheimer Centre⁴, Nijmegen

Introduction: Alpha-Synuclein is the major constituent of Lewy bodies found in neurons in dementia with Lewy bodies (DLB) and might be of diagnostic value as a biomarker for DLB. We hypothesized that, as a consequence of increased accumulation of alpha-synuclein intraneuronally in DLB, the levels of alpha-synuclein in cerebrospinal fluid (CSF) of DLB patients would be lower than in other dementias. Our objective was to investigate the CSF levels of alpha-synuclein in several dementia disorders compared to control levels and to investigate the diagnostic value of CSF alpha-synuclein as a marker to discriminate between DLB and other types of dementia.

Methods: We developed an assay to quantify alpha-synuclein concentrations in CSF. We analysed the levels of alpha-synuclein in CSF of 40 DLB patients, 131 patients with Alzheimer's disease, 28 patients with vascular dementia, and 39 patients with frontotemporal dementia.

Results: Detection limit of the alpha-synuclein assay is 3.8 ng/ml and the assay is linear until 300 ng/ml. Inter-assay and intra-assay coefficients of variation are below 15% in a wide range of concentrations. Mean recovery of the assay is 94%. The 95% upper limit of the reference range (p95) in a group of neurological controls above the age of 45 years is 62 ng/ml. We did not find any significant differences in CSF alpha-synuclein levels between DLB patients and patients with AD, VaD or FTD.

Conclusion: We conclude that in clinically diagnosed patients, alpha-synuclein does not appear to be a useful biomarker for the differentiation between DLB and other types of dementia.

Literature:

1. van Geel et al, J Neurosci Meth 2008; 168: 182-185
2. Spies et al, J Alzh Dis 2009; in press

107. Impact van het CYP2C19*17-polymorfisme op de metabolisering van antidepressiva

H.M. LOOVERS^{1,2}, A. de VOS¹, J. van der WEIDE^{1,2}

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Ziekenhuis St. Jansdal, Harderwijk; GGz Meerkanten², Ermelo

Inleiding: Behandeling met antidepressiva wordt gekenmerkt door grote individuele verschillen in respons. Verschillen in bloedspiegel worden voor een groot deel veroorzaakt door verschillen in metabole activiteit. Polymorfismen in CYP genen kunnen leiden tot afwijkende metabole activiteit. Onderzoek heeft aangetoond dat CYP2C19*17 de metabolisering van verschillende CYP2C19-afhankelijke medicijnen kan verhogen. Op het gebied van antidepressiva zijn de data echter beperkt. In dit onderzoek is nagegaan of het CYP2C19*17 polymorfisme effect heeft op de metabole ratio van drie antidepressiva (citalopram, amitriptyline en clomipramine).

Methode: Alle patiënten die op GGz Meerkanten behandeld zijn, waarvan zowel bloedspiegels als DNA beschikbaar zijn, zijn geïncubeerd in dit onderzoek. Een real-time PCR assay met dual-labeled fluorescente probes is ontwikkeld voor

de bepaling van het CYP2C19*17 allel. De CYP2C19*2 en CYP2C19*17 polymorfismen zijn beide bepaald.

Resultaat: In totaal zijn 708 patiënten geïncubeerd in dit onderzoek, waarvan 429 (61%) homozygoot voor het wildtype (*1) allel, 248 (35%) heterozygoot voor CYP2C19*17 en 31 (4%) homozygoot voor CYP2C19*17. De allelfrequentie van CYP2C19*17 is 0,22. De metabole ratios laten voor citalopram en amitriptyline een duidelijke CYP2C19 afhankelijkheid zien (citalopram: *2/*2 = 4,28; *1/*1 = 2,72; *17/*17 = 2,36; amitriptyline: *2/*2 = 4,35; *1/*1 = 1,38; *17/*17 = 0,91). De data voor clomipramine laten geen verlaging van de MR zien bij aanwezigheid van het CYP2C19*17 allel (*2/*2 = 2,51 *1/*1 = 1,35; *17/*17 = 1,71).

Conclusie: Het polymorfisme CYP2C19*17 leidt tot een lagere metabole ratio van citalopram en amitriptyline, maar niet van clomipramine.

108. Cerebrospinal fluid amyloid beta40 is decreased in cerebral amyloid angiopathy

M.M. VERBEEK^{1,2,4}, B.P.H. KREMER^{2,4}, M. OLDE RIKKERT^{3,4}, P.H.M.F. van DOMBURG⁵, M.E. SKEHAN⁶, S.M. GREENBERG⁶

Department of Neurology¹, Laboratory of Pediatrics and Neurology², Geriatric Medicine³, Alzheimer Centre⁴, Donders Centre for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen; Department of Neurology⁵, Maasland Hospital, Sittard; Department of Neurology⁶, Hemorrhagic Stroke Research Center, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston

Introduction: Deposition of the amyloid beta protein (Abeta) in cerebral amyloid angiopathy (CAA) occurs in a majority of Alzheimer's disease (AD) patients, but also as a sporadic condition in the elderly. CAA consists of both Abeta40 and Abeta42 whereas (diffuse) senile plaques in AD are primarily composed of Abeta42. Cerebrospinal fluid (CSF) levels of Abeta42 are decreased in AD, whereas concentrations of total tau (t-tau) and phosphorylated tau protein (p-tau) are elevated. Analysis of CSF Abeta40, Abeta42, t-tau and p-tau concentrations in CAA may provide insight into the molecular mechanisms of cerebrovascular amyloid deposition and possibly serve as a molecular biomarker.

Methods: We measured CSF levels of Abeta42, Abeta40, p-tau181, and t-tau in 17 non-demented patients with a clinical diagnosis of sporadic or familial CAA, 72 patients with probable AD and 58 control subjects.

Results: CSF Abeta42 concentration in CAA was 42.4% of controls; in AD this was 51.6%. CSF Abeta40 concentrations were 72.7% of control levels in CAA; in AD this was 92.8%. In CAA patients, CSF t-tau was 184% of control levels and p-tau181 concentrations were 138% of control levels; in AD t-tau was 332% of control and p-tau181 was 230% of controls. The combination of Abeta42 and t-tau discriminated CAA from controls with an area under the curve of 0.98.

Conclusion: Our data show decreased CSF Abeta40 in CAA patients, consistent with neuropathological evidence that Abeta40 is selectively trapped into the cerebral vasculature. CSF measurements might be used in conjunction with neuroimaging to identify CAA during life.

109. Neuron Specifiek Enolase (NSE) als prognostische marker bij coma na reanimatie: een pilotstudie bij patiënten op de Intensive Care Unit

H.J. VERMEER¹, A. GIEZEMAN², P.A.D. BOUMA³

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium¹, Intensive Care², Neurologie³, Tergooiziekenhuizen, Hilversum

Inleiding: Een veelvoorkomende vraag is de prognose van een patient die na een Out of Hospital Cardiac Arrest (OHCA) comateus blijft. Ieder jaar worden in Nederland ongeveer 24.000 personen binnen en buiten het ziekenhuis gereanimeerd en circulatieherstel treedt op bij ongeveer 30-40% (1). Bij lang durende coma wordt de prognose als functie van de tijd somberder. Naast beeldvormend onderzoek en klinische variabelen, kan biochemisch onderzoek, zoals neuron specifiek enolase (NSE) en S100-eiwit, bijdragen aan het voorspellen van de neurologische uitkomst van patienten met een postanoxisch coma (1-3).

Methode: Aangezien er nog veel onduidelijkheid is over de diagnostische waarde en de klinische beslissingsgrens van deze markers, is op de afdeling Intensive Care van de Tergooiziekenhuizen een prospectieve pilot gestart waarbij NSE-concentraties bij patienten met een postanoxisch coma na OHCA zijn gemeten en gerelateerd aan de neurologische uitkomst bij deze patienten. De NSE-bepalingen werden daarbij met behulp van een immunoassay in serum gemeten op een

Cobas 6000 analyzer (Roche Diagnostics), op meerdere dagen gemeten en tevens werd het effect van een koelingsprotocol bij de patiënt bestudeerd.

Resultaat: Bij 95% (n=21) patienten bleek een beslissingsgrens NSE = 33 µg/l onderscheidend; een lagere NSE-waarde correleerde met goede prognose en >33 µg/l gaf als uitkomst dood of slechte neurologische uitkomst. Bloedafname tijdens koeling van de patient lijkt geen invloed te hebben op de NSE-concentratie.

Conclusie: Bepaling van NSE draagt bij aan de prognose van neurologisch herstel na een OHCA. Er lijkt geen negatief effect op de voorspellende waarde te bestaan van NSE-concentraties gemeten tijdens koelingsprocedures.

Literatuur:

1. Horn et al, Ned Tijdschr Geneesk 2008; 152: 3082
2. Zandbergen et al, Neurology 2006; 66: 623
3. Wijdicks et al, Neurology 2006; 67: 203

Oncologie

110. Analyse en toepasbaarheid van de nucleofosminemutaties bij acute myeloïde leukemie

F.A.J.T.M. van den BERGH¹, Ö. BINGÖL¹, J. SLOMP¹, M.R. de GROOT², A. HEIJS-OUDE GROENEGER¹
Afdelingen Laboratorium¹ en Interne Geneeskunde², Medisch Spectrum Twente, Enschede

Inleiding: Acute myeloïde leukemie (AML) is een heterogeen ziektebeeld waarbij in de WHO-classificatie een belangrijke rol is weggelegd voor zowel morfologie, immunofenotypering als detectie van chromosomale afwijkingen. Bij 40-50% van alle adulte de novo AML-patiënten zijn met klassieke cytogenetische technieken abnormaliteiten afwezig en is nadere subtypering van deze intermediaire risicogroep niet goed mogelijk. Dankzij het ontdekken van nieuwe mutaties o.a. in het nucleophosmine gen (NPM1) lijkt nadere classificatie mogelijk waardoor beter inzicht wordt verkregen in prognose en behandelstrategie.

Methode: Onlangs is door Gorello c.s. een snelle kwantitatieve real-time RT-PCR assay ontwikkeld waarmee detectie van een aantal NPM1 mutaties gemakkelijk is te bepalen. De praktische uitvoerbaarheid van real-time kwantitatieve PCR (RT-PCR) van de mutaties NPM1 A en B werd door ons getest bij 49 volwassen AML patiënten.

Resultaat: De mutaties NPM1 A en B blijken in hoge frequentie (ca. 40%) voor te komen bij volwassen patiënten met de novo AML en een normaal karyotype en vaak in combinatie met mutaties in het fms-like tyrosine kinase 3 gen (internal tandem repeats, FLT3/ITD en D538 mutaties).

Conclusie: Toepassing van RT-PCR op RNA, geïsoleerd uit perifeer bloed of beenmerg, leidt tot snelle en betrouwbare bepaling van de beide NPM mutaties bij AML patiënten. Dit is van belang voor diagnostiek en prognose met name bij AML-patiënten met een normaal karyotype. Tevens behoort kwantificering van de NPM-mutatie, en daarmee bepaling van de tumorreactiviteit tot de mogelijkheden.

Literatuur: Gorello, et al, Leukemia 2006; 20: 1103-1108

111. 'Cancer drug screening on a chip' Lab-on-a-Chip device for drug screening to improve and personalize cancer therapy

F. WOLBERS¹, H.R. FRANKE², A. van den BERG¹, I. VERMES³

BIOS, the Lab-on-a-Chip Group¹, MESA+ Institute for Nanotechnology, University of Twente, Enschede; Department of Obstetrics and Gynaecology² and Department of Clinical Chemistry³, Medisch Spectrum Twente, Hospital Group, Enschede

Introduction: Nowadays, cancer patients are treated according to the tumour's location and histological features. However, it is not ensured that the prescribed drug will tackle the cancer, as due to genetic variation every patient has an individual response to therapy. A Lab-on-a-Chip (LOC) device was developed to, before starting therapy, select 'the right drug in the right dose for the right person', i.e. provide personalized medicine. LOC devices promote the use of lower quantities of cells to perform high-throughput drug screening and detailed cellular analysis. Here, the degree of apoptosis was assessed. Our main interest arrives at breast cancer, therefore in initial experiments the MCF-7 cell line was used. However, this LOC device is applicable for other cancer types to fine-tune therapy and treatment at the individual level.

Methods: The LOC device consists of a main channel which broadens into a small culture chamber (0.5 cm², depth 44µm). MCF-7 cells were cultured for 1 day in the chip before the

chemical stimulus was added. Effects were analyzed optically in real-time and quantified by measuring both the total area coverage in time and the occurrence of round cells.

Results: Both tumour necrosis factor- α /cycloheximide and doxorubicin demonstrated apoptotic features. Accompanied, the area coverage decreased 2-fold and the number of round cells increased 4-6 times in time, as compared to untreated cells. Staurosporine, which initiated necrosis, showed no stable changes in these parameters.

Conclusion: These results demonstrate the potential of this LOC device to understand cancer biology and translate this knowledge towards the clinic to improve healthcare towards personalized medicine. Next experiments are focused on using a patient's own tumour cells, combined with electrical measurements.

Literature: Wolbers, thesis 2007; ISBN 987-90-365-2499-5

112. Diagnostic utility of multiparameter flow cytometry analysis in myelodysplastic syndromes

E.W.M. KEMNA^{1,2}, J. SLOMP¹, M. de GROOT¹, L.W.M.M. TERSTAPPEN², A.A. POOT², I. VERMES^{1,2}

Medisch Spectrum Twente¹, Hospital Group, Enschede; Institute for Biomedical Technology², Faculty of Science and Technology, University of Twente, Enschede

Introduction: Myelodysplastic syndromes (MDS) encompass hematopoietic stem cell disorders characterized by myeloid dysplasia, increased apoptosis and hyper-proliferative bone marrow (BM). Diagnosis is based on clinical information, morphologic and cytogenetic features of peripheral blood and BM. The aim of the present study was to improve the diagnosis and classification of MDS by quantitative assessment of hematopoietic differentiation pathways by multi-parameter flow cytometry (FC).

Methods: A panel of eight quadruple immunostainings was developed to characterize erythroid, granulocytic, monocytic and mono/myeloblasts differentiation pathways. Apoptosis and proliferation were measured by using Annexin V/PI and Ki67, respectively. Twenty-five normal BM and 30 BM from patients with a suspicion for MDS were analyzed. Subsequently, a FC

score system was applied to obtain objective classification of patient data and an apoptosis score system was developed. Eleven of the 30 MDS suspicious BM were confirmed as MDS by morphologic and cytogenetic features.

Results: The FC score system classified 91% (10/11) of the MDS patients correctly. The unrecognized MDS was morphologically distinct through the presence of ringsideroblasts. FC analysis showed aberrant CD7 expression on myeloid progenitors ($p < .001$), characteristic for MDS, in two MDS suspicious BM where morphology and cytogenetics were inconclusive. A significant change in apoptotic rates in different cell compartments of MDS patients was shown ($p < .01$). When applying the apoptosis score system 60% (6/10) was marked as suspicious for MDS. The apoptosis:proliferation ratio identified 57% (4/7) MDS patients.

Conclusion: The quantitative assessment of hematopoietic differentiation pathways improved the diagnosis and classification of MDS, especially when morphology and cytogenetics were

inconclusive. Apoptosis and proliferation measurements of BM may further aid in the diagnosis, classification and subsequent treatment of MDS patients.

113. CEA in activated macrophages. New diagnostic possibilities for tumor markers in early colorectal cancer?

D. JAPINK¹, M.N. SOSEF¹, M. NAP², M.P.G. LEERS³

Department of General Surgery¹, Department of Clinical Pathology², Department of Clinical Chemistry and Hematology³, Atrium Medisch Centrum Parkstad Heerlen

Introduction: Serum tumormarkers show low sensitivity, making them unsuitable for early detection of cancer. Activated macrophages (AM) from peripheral bloodsampling can accumulate tumormarker substances and facilitate early detection in prostate cancer. Can CEA containing macrophages (CEACM) detect colorectal cancer (CRC) at earlier stages than serum CEA?

Methods: Peripheral blood was collected from patients with CRC (n= 48), inflammatory colorectal disease (n=5) and healthy controls (n=18). After separating and labeling AM with CD14-APC/CD16-FITC, AM were intracellularly labeled

with anti-CEA antibody and flowcytometrically analyzed. Serum CEA and CRP were measured.

Results: The fraction-size of CEACM discriminated between controls and CRC patients, irrespective of AJCC-stage. (AJCC stage I – IV, p=<0.0001) Serum CEA values were only significantly elevated in AJCC stage II, III and IV (p= 0.02, 0.006 and <0.0001). Combining CEACM with CRP-levels separated CRC from inflammatory colorectal disease.

Conclusion: CEACM combined with CRP appears to have diagnostic potential in early CRC.

114. MUC1 568 A/G genotype-dependent cancer antigen 15-3 levels in breast cancer patients

A. KRUIT¹, M.M. TILANUS-LINTHORST², J.G. BOONSTRA³, R.H.N. van SCHAIK³, J.C. GRUTERS⁴, J.M.M. van den BOSCH⁴, H.J.T. RUVEN¹

Departments of Clinical Chemistry¹ and Pulmonology⁴, St Antonius Hospital, Nieuwegein; Departments of Surgical Oncology² and Clinical Chemistry³, Daniel den Hoed Cancer Center, Erasmus MC University Medical Center, Rotterdam

Introduction: Cancer Antigen 15-3 (CA 15-3) is a mucin-like glycoprotein, namely MUC1, that is widely used as a tumor marker for monitoring treatment and recurrence of invasive breast cancer. Last year, we reported an association between the single nucleotide polymorphism (SNP) MUC1 568 A/G and variation in serum levels of CA 15-3 in healthy Dutch women. Whether this finding might be of clinical rather than merely academic relevance serum CA 15-3 levels and MUC1 568 A/G were assessed retrospectively in a cohort women with and without breast cancer.

Methods: CA 15-3 was measured in 208 healthy women, in 67 with benign disease, and in 162 women with breast cancer. All subjects were genotyped for the MUC1 568 A/G polymorphism.

Results: Significant differences were observed between mean CA 15-3 levels of control subjects grouped according to the MUC1 568 genotype (mean±SD): AA (10.3±3.8), AG (15.9±5.0) and GG (19.0±5.6) U/ml, p<0.0001. Similar (median) results were observed in women with benign breast disease: AA (10.2), AG (14.2) and GG (16.6) U/ml, p<0.0001, and those with breast cancer: AA (10.4), AG (17.1) and GG (23.9) U/ml, p<0.0001.

Conclusion: The MUC1 568 A/G polymorphism strongly influences CA 15-3 levels in women with either benign or malignant breast tumors. Our findings demonstrate the limitations, at least for MUC1, of using a single reference interval for CA 15-3 and raises the question whether previous studies on CA 15-3 and breast cancer monitoring need re-investigation by taking the MUC1 568 A/G into account.

115. Interferentie van fulvestrant met de bepaling van oestradiol bij patiënten met gemetastaseerd mammacarcinoom

F.A. LINDEBOOM¹, J.W. JANSSEN¹, J.M. ZUETENHORST²

Afdeling Klinische Chemie¹, Interne Geneeskunde/Oncologie en Hematologie², Sint Franciscus Gasthuis, Rotterdam

Inleiding: Een op de negen vrouwen ontwikkeld gedurende het leven mammacarcinoom. Daarmee is het de meest voorkomende maligniteit bij vrouwen. In meer dan de helft van de patiënten is de tumor gevoelig voor oestrogenen. Bij deze patiënten kan gekozen worden voor een hormonale therapie, welke de groei van de gemetastaseerde mammacarcinoom kan afremmen. Gedurende de behandeling met hormonale therapie wordt gestreefd naar lage endogene oestradiol waarden om de werking te optimaliseren. Fulvestrant (Faslodex[®]) is een oestrogenreceptor antagonist die wordt toegepast bij de behandeling van gemetastaseerd, oestrogeengevoelig mammacarcinoom. Recent bleken bij een tweetal postmenopauzale patiënten met gemetastaseerde mammacarcinoom de oestradiol waarden onder gebruik van Fulvestrant onwaarschijnlijk hoog. Het vermoeden rees dat Fulvestrant de oestradiol bepaling beïnvloedde.

Methode: Oestradiol werd bepaald in een serie mannelijk testsera waaraan verschillende hoeveelheden Fulvestrant was

toegevoegd. Ter vergelijking werd oestradiol op vier verschillende analysers bepaald in drie verschillende laboratoria. De bepalingen werden uitgevoerd met de volgende analysers: Immulite[®] (Siemens), Elecsys[®] (Roche), RIA (Erasmus MC) en de Architect i2000SR[®] (Abbott).

Resultaat: In alle geteste sera werd een verhoging van de oestradiol waarde gezien evenredig met de fulvestrant concentratie. Tussen de verschillende analysers bleek een grote variatie in de gerapporteerde oestradiol waarden te worden gevonden.

Conclusie: Bij het gebruik van Fulvestrant is het bepalen van oestradiol met immunoassays onbetrouwbaar. Fulvestrant kan leiden tot een vals verhoogde oestradiolwaarde. Er is een grote variatie tussen de mate van verstoring per analyser. Medicijnen kunnen een laboratorium bepaling beïnvloeden. Wees op uw hoede bij ongeloofwaardige en onverwachte uitslagen. Overleg tussen arts en klinisch chemisch laboratorium kan uitkomst bieden.

116. Follow-up of prostate cancer bone metastases by bonemarkers

D. van den BROEK, J. van BEZOOIJEN, J.M.H. de KLERK, H. J. BLOEMENDAL, J.P.M. WIELDERS
Departments of Clinical Chemistry, Urology, Nuclear Medicine and Internal Medicine, Amersfoort

Introduction: Bone metastases frequently occur in patients with prostate cancer. In order to evaluate the possible use of bone-markers in an ongoing phase/II trial about the combined effect of treatment with Rhenium-186-HEDP and Docetaxol, we tested the discriminating power of bone markers in a pilot study.

Methods: Two groups of patients with prostate cancer were compared. Group one consists of 31 patients diagnosed with metastatic bone disease, confirmed by bone scintigraphy using Tc-99m-labelled phosphate complexes. Group two consists of 18 patients without metastatic bone disease. PSA, P1NP, beta-crosslaps, osteocalcin and PTH were measured on the Cobas E601 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Results were analysed by means of the Mann Whitney U test.

Results: A significant difference ($p < 0,05$) between patients with and without bone metastasis was found for beta-crosslaps (0,02) and P1NP (0,04). Osteocalcin, PSA and PTH showed a weak significant difference ($p < 0,5$).

Conclusion: Bone markers are elevated by metastatic bone disease, especially P1NP (marker of bone formation) and beta-crosslaps (marker of bone turn-over) showed a significant increase in metastatic bone disease. Use of these markers will be further evaluated in a planned randomised phase II study comparing Docetaxol with Docetaxol plus Rhenium-186-HEDP in hormone refractory prostate cancer patients.

117. Een onzichtbaar IgD-M-proteïne

J.G. BOONSTRA¹, G. BEZEMER², M. van AGTEREN²
Afdeling Klinische Chemie¹ en Afdeling Nefrologie², Erasmus MC, Rotterdam

Inleiding: IgD M-proteïnen worden soms lastig herkend door zowel de lage concentratie waarin zij voorkomen, als het brede aspect van de band. Deze casus beschrijft een patiënte waarbij een IgD M-proteïne noch met het eiwitspectrum, noch met een immunofixatie met pentavalent antiserum zichtbaar was.

Methode: Electroforese en immunofixatie werd uitgevoerd met behulp van het Hydragel-Hydrasys systeem (Sebia).

Resultaat: Een 80-jarige vrouw werd op de polikliniek Nefrologie gezien in verband met een stijgende kreatinine concentratie. Haar voorgeschiedenis vermeldde een geruptureerde levercyste. Recent was een cystadenoom gezien, met doorbraak naar de rechter nier. Laboratoriumonderzoek toonde verhoogde concentraties calcium (3,34 mmol/l) en alkalische fosfatase (144 U/L) in serum en 0,32 g/l eiwit in urine, terwijl overige parameters binnen de referentierange waren. Een botscan toonde geen voor maligniteit verdachte haarden. Vervolg onderzoek was negatief voor ANA, ANCA en anti-GBM

antistoffen, terwijl verlaagde concentraties vitamine D en PTH werden gezien. Omdat een multipel myeloom werd overwogen werd M-proteïne onderzoek in serum aangevraagd. In het eiwitspectrum en de immunofixatie met pentavalent antiserum werd geen M-proteïne gezien. Vanwege uitblijvende diagnose werd een nierbiopsie verricht, waarin de patholoog aankleuring voor kappa ketens zag. Hierop werd een gevoelige immunofixatie van het serum ingezet met monovalente antisera, immunofixatie van urine en de bepaling van serum vrije lichte ketens. Dit onderzoek toonde in serum een M-proteïne IgDkappa (0,8 g/l) met vrije kappa ketens, een afwijkende kappa/lambda ratio (71) en 0,04 g/l monoklonaal IgDkappa in urine.

Conclusie: Een IgD M-proteïne kan gemist worden wanneer enkel serum onderzoek middels eiwitspectrum en immunofixatie met pentavalent antiserum wordt uitgevoerd. Bij gerichte verdenking op een M-proteïne is tevens electroforese van urine, of de bepaling van serum vrije lichte ketens, noodzakelijk.

Acute zorg, IC, toxicologie

118. Een man met flecaïnide-intoxicatie

J.J. van ZANDEN¹, M. LACOR², B. WILFFERT³, P. KINGMA², P.M.J. MCLAUGHLIN¹
Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Leeuwarden; Intensive Care², Medisch Centrum Leeuwarden, Leeuwarden; Afdeling Ziekenhuisfarmacie³, Zorggroep Noorderbreedte, Leeuwarden

Inleiding: Een patiënt met een voorgeschiedenis van paroxysmaal atriumfibrilleren, waarvoor Sintrom en Flecaïnide werd voorgeschreven, was tijdens het werk onwel geworden met bewustzijnsverlies en snurkende ademhaling. Na reanimatie werd de patiënt op de IC volgens protocol 24 h gekoeld bij 32°C. Tijdens dit proces ontstond een anurie, waarbij patiënt ter opheffing van de ontstane metabole acidose CVVH onderging. Gedurende de opname werden diverse hartritmes waargenomen tevens werden bij opname geen expliciet verhoogde cardiacmarker enzymen gezien (Trop < 0,03; CK 374, CK-MB 45), daarom werd gedacht aan een mogelijke flecaïnide intoxicatie. Aangezien mutaties in cytochroom p450 2D6 (CYP2D6) enzymen kunnen leiden tot een veranderd metabolisme van flecaïnide werden deze aanvullend geanalyseerd.

Methode: Urine sediment analyse, flecaïnide spiegel bepaling en CYP2D6 DNA mutatie analyse.

Resultaat: Bij microscopisch urinesediment analyse werden zowel "oval fat macrophages" aangetroffen alsmede "fatty

casts", hierdoor werd de diagnose ATN als gevolg van cardiale shock aannemelijk. De diurese kwam na 16 h spontaan op gang waarna CVVH werd gestaakt. Flecaïnide plasmaspiegel 4 h na IC opname was nog steeds licht verhoogd 1.1 mg/L (ref 0.45-0.90) en patiënt bleek CYP2D6 *4/*9 mutaties te hebben wat overeenkomt met een intermediair CYP2D6 metabolisme, op de grens van langzaam metabolisme.

Conclusie: Het voorschrijven van flecaïnide bij ritme stoornissen is niet zonder gevaar aangezien per individu deze stof anders gemetaboliseerd wordt. Een lagere dosis zou bij deze patiënt mogelijk de cardiale depressie hebben kunnen voorkomen. De Kennisbank van de KNMP adviseert bij bekend zijn van het genotype CYP2D6 intermediair metaboliseerder uit voorzorg de plasmaconcentratie te monitoren en een ECG te maken en bij langzame metaboliseerders bovendien zelfs de dosis te halveren. Deze casus illustreert ons inziens het belang van gericht farmacogenotyperen.

119. Associatie tussen seleniumconcentratie en complicaties na een subarachnoïdale hersenbloeding

P.J.W. DENNESEN¹, R.D. OUDE ENGBERINK², G.A.E. PONJEE²

Afdeling Intensive Care¹, Medisch Centrum Haaglanden, Den Haag; Afdeling Klinische Chemie², Medisch Centrum Haaglanden, Den Haag

Inleiding: Het overlijdensrisico in de eerste uren na een subarachnoïdale hersenbloeding (SAB) is aanzienlijk (33%). De prognose van de patiënten die de acute fase overleven wordt beïnvloed door secundaire effecten ten gevolge van het bloed rondom de hersenen. Het vrijgekomen ijzer veroorzaakt een verhoogde oxidatieve stress wat weefselschade veroorzaakt. Het micronutriënt selenium is direct betrokken bij het functioneren van het anti-oxidatieve systeem [1]. In deze studie wordt onderzocht of een verlaagd selenium verband houdt met een verhoogde kans op secundaire complicaties na een SAB.

Methode: Er werden 57 patiënten met een SAB geïncludeerd. De selenium concentratie in serum werd dagelijks gemeten (atoom absorptie spectrofotometer) gedurende 10 dagen vanaf opname. De neurologische toestand bij binnenkomst werd vastgesteld met het scoringsstelsel van de World Federation Neurologic Surgeons (WFNS). De hoeveelheid bloed op de CT-scan werd geïnterpreteerd met de gemodificeerde Fischer-schaal. Na 3 maanden werd de mate van neurologisch herstel

vastgesteld met de Rankin disability-score. Per uitkomstmaat werd onderscheid gemaakt tussen twee groepen waarbij groep-1 als 'mild' werd geïnterpreteerd en groep-2 als 'ernstig'.

Resultaat: Het algemene verloop van de selenium concentratie laat een daling zien op dag 3-4 na opname die zich herstelt binnen enkele dagen. De opnameconcentratie is lager voor groep-2 als gekeken wordt naar WFNS (0.77 vs 0.94 µmol/L, P=0.01) en Fischer-score (0.86 vs 0.99 µmol/L, P=0.009). De minimale selenium concentratie was lager voor groep-2 met de Rankin disability-score (dag4, 0.73 vs 0.91 µmol/L, P=0.004).

Conclusie: Een lager seleniumgehalte lijkt gerelateerd aan een slechtere klinische toestand bij binnenkomst en een groter bloedinggebied in de hersenen. Het tijdsverloop suggereert een verband tussen mate van selenium-depletie en kans op verminderd neurologisch herstel.

Literatuur: Brown KM et al, Public Health Nutr. 2001; 4(2B): 593-599

120. Oxidatieve stress beïnvloedt de expressie in perifere leukocyten van genen betrokken bij de Nuclear Factor kappa B (NFkB) pathway

E.M.L. SMETS¹, N. OOSTRA¹, M. CHEVALLIER¹, J. OOMES¹, V.A.W.M. UMANS², M.F.M. van STIJN³, A.P.J. HOUDIJK³

Laboratorium voor Klinische Chemie, Hematologie en Immunologie¹, afdeling Cardiologie², afdeling Chirurgie³, Medisch Centrum Alkmaar, Alkmaar

Inleiding: Talrijke acute en chronische aandoeningen zijn geassocieerd met oxidatieve stress, gekenmerkt door een verhoogde concentratie reactieve zuurstofradicalen. NFkB vervult een sleutelrol in de reactiescascade geïnduceerd door oxidatieve stress. Omdat bestraling een potente bron is van oxidatieve stress, werden perifere leukocyten in vitro bestraald met 6 Gy. Uit microarray op deze bestraalde leukocyten bleek dat de NFkB-pathway significant beïnvloed werd. Tumor necrosis factor alpha induced protein-6 (TNFAIP6) en NFkB inhibitor alpha (NFkBIA) werden hieruit geselecteerd voor verder onderzoek bij patiënten van de Intensive Care Unit (ICU) en patiënten met acuut myocardinfarct (AMI); beide geassocieerd met verhoogde oxidatieve stress.

Methode: RNA werd geïsoleerd uit perifere leukocyten van EDTA-bloed van 15 ICU-patiënten en 6 gezonde vrijwilligers. Bij 8 AMI-patiënten werd bij opname in 10, 16 en 24 uur na symptomen bloed afgenomen voor RNA-isolatie. Genexpressie van TNFAIP6 en NFkBIA werd in duplo gekwantificeerd

met real-time PCR met glucuronidase-beta als referentiegen. De verschillende patiëntencategorieën werden vergeleken met de Mann-Whitney test.

Resultaat: Expressie van TNFAIP6 is significant verhoogd bij ICU-patiënten vergeleken met gezonde vrijwilligers (p=0.039); NFkBIA vertoonde een trend naar verhoogde expressie, evenwel niet statistisch significant (p=0.080). Bij AMI-patiënten was expressie van NFkBIA bij opname in 10 en 16 uur na symptomen significant verhoogd vergeleken met gezonde vrijwilligers (p=0.014, p=0.022 resp. p=0.039); na 24 uur was het verschil niet significant (p=0.200). Er was geen significant verschil in de expressie van TNFAIP6 bij AMI-patiënten.

Conclusie: Oxidatieve stress beïnvloedt in vivo de expressie van genen in perifere leukocyten betrokken bij de NFkB-pathway. Het effect op de genexpressie is afhankelijk van de manier waarop de oxidatieve stress geïnduceerd wordt. Kwantificering van genexpressie kan mogelijk gebruik worden voor detectie en behandeling van oxidatieve stress.

Erfelijke stofwisselingsziekten

121. Severity of iron overload of proband determines serum ferritin levels in families with HFE-related hemochromatosis: The HEMochromatosis Family Study

E.M.G. JACOBS^{1,2}, J.C.M. HENDRIKS³, C.Th.B.M. van DEURSEN⁴, H.G. KREEFTENBERG⁵, R.A. de VRIES⁶, J.J.M. MARX⁷, A.F.H. STALENHOF⁸, A.L.M. VERBEEK³, D.W. SWINKELS¹

Department of Clinical Chemistry¹, Radboud University Nijmegen Medical Center, Nijmegen;

Department of Hematology², Radboud University Nijmegen Medical Center, Nijmegen; Department of Epidemiology

and Biostatistics³, Radboud University Nijmegen Medical Center, Nijmegen; Department of Internal Medicine and

Gastroenterology⁴, Atrium Medical Center, Heerlen/Brunssum; Department of Internal Medicine⁵, University Medical

Center Groningen; Department of Hepato-Gastroenterology⁶, Rijnstate Hospital, Arnhem; Eijkman

Winkler Institute⁷, University Medical Center, Utrecht; Department of Internal Medicine⁸, Radboud University

Nijmegen Medical Center, Nijmegen

Introduction: In families of patients with clinically detected hereditary hemochromatosis (HH) early screening has been suggested to prevent morbidity and mortality. Here, we aim to

identify determinants for iron overload in first-degree family members of C282Y homozygous probands with clinically detected HH.

Methods: Data on HFE-genotype, iron parameters, demographics, lifestyle factors and health, were collected from 224 Dutch C282Y homozygous patients with clinically diagnosed HH and 735 of their first-degree family members (FDFM), all participating in the HEMochromatosis FAmily Study (HEFAS)(1).
Results: The best predictive multivariable model forecasted 45% of variation of the serum ferritin levels. In this model severity of iron overload in the proband significantly predicted serum ferritin levels in FDFM. Other significant determinants in this model consisted of C282Y homozygosity, compound

heterozygosity, age at testing for serum ferritin and supplemental iron intake, whereas a low body mass index showed a protective effect.

Conclusion: This study provides a model to assess the risk of development of iron overload for relatives of probands with HH. These results might be instrumental in the development of an optimal strategy for future family screening programs.

Literature: Jacobs et al, Neth J Med 2007; 65: 425

122. Hepcidin suppression and defective iron recycling account for dysregulation of iron homeostasis in heme oxygenase-1 deficiency

A.E.R. KARTIKASARI¹, F.A.D.T.G. WAGENER², A. YACHIE³, E.T.G. WIEGERINCK¹, E.H.J. M. KEMNA¹, D.W. SWINKELS¹

Department of Clinical Chemistry¹, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen; Department of Pharmacology and Toxicology², Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen; Department of Laboratory Sciences³, School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa

Introduction: Heme oxygenase-1 (HO-1) contribution to iron homeostasis has been postulated, since it facilitates iron recycling by liberating iron mostly from heme catabolism. This enzyme also appears to be responsible for the resolution of inflammatory conditions.

Methods: In a patient with HO-1 deficiency, inflammation and dysregulation of body iron homeostasis, including anemia and liver and kidney hemosiderosis, are evidenced. Here we postulated that HO-1 is critical in the regulation of ferroportin, the major cellular iron exporter, and hepcidin, the key regulator of iron homeostasis central in the pathogenesis of anemia of inflammation.

Results: Our current experiments in human THP-1 monocytic cells indicate a HO-1-induced iron-mediated surface-ferroportin expression, consistent with the role of HO-1 in iron recycling. Surprisingly, we observed low hepcidin levels in the

HO-1-deficient patient, despite the presence of inflammation and hemosiderosis, both inducers of hepcidin. Instead, we observed highly increased soluble transferrin receptor levels. This suggests that the decreased hepcidin levels in HO-1 deficiency reflect the increased need for iron in the bone marrow due to the anemia. Using human hepatoma cells, we demonstrate that HO-activity did not have a direct modulating effect on expression of HAMP, the gene that encodes for hepcidin. Therefore, we argue that the decreased iron recycling, may, in part, have contributed to the low hepcidin levels.

Conclusion: These findings indicate that dysregulation of iron homeostasis in HO-1 deficiency is the result of both defective iron recycling and erythroid activity-associated inhibition of hepcidin expression. This study therefore shows a crucial role for HO-1 in maintaining body iron balance.

Overigen

123. Daily variations in serum and urine hepcidin levels of healthy controls: implications for clinical studies

J.J.C. KROOT¹, J.C.M. HENDRIKS², J.M.M. LAARAKKERS¹, S.M. KLAVER¹, E.H.J.M. KEMNA¹, H. TJALSMA¹, D.W. SWINKELS¹

Department of Clinical Chemistry¹, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen; Department of Epidemiology and Biostatistics², Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen

Introduction: Several tests have been developed recently to reliably measure the iron regulatory hormone hepcidin in urine and serum. In this study we expand our previous work on the within-subject variability and the between subject variability of hepcidin.

Methods: We determined serum and urine hepcidin levels of 24 healthy controls (11 men and 13 women), by time-of-flight mass spectrometry, at four different time points during the day. A linear mixed model for repeated data was used to distinguish three components of the total variability in the measurements as there is: within-day-within-subject variability, the between-subject variability and the additional residual or (pre)analytical variability.

Results: Differences in diurnal hepcidin patterns were ob-

served between urine and serum. Urine levels remained similar in the course of the morning, and significantly increased during the afternoon, whereas serum levels significantly increase throughout both morning and afternoon. Furthermore, in serum the (pre)analytical variability (28.6%) is smaller than the between-subject (48.1%) and within-day-within-subject variability (30.3%) compared to urine variability (97.2% vs. 67.7% and 77.3%, respectively). High serum ferritin levels were associated with higher serum hepcidin levels, but not with urine levels. Transferrin saturation did not correlated with hepcidin levels.

Conclusion: To minimize variability we recommend i) to standardize for sampling time and ii) to measure serum hepcidin levels.

124. Hypomagnesiëmie door protonpompremmers

M.A.C. BROEREN, E. GEERDINK, H.L. VADER, W. van den WALL BAKE
Klinisch Laboratorium, Máxima Medisch Centrum, Veldhoven

Inleiding: Tijdens de autorisatie van de laboratoriumuitslagen zijn een tweetal patiënten opgevallen met een zeer lage magnesiumconcentratie in plasma waarvan de oorzaak niet kon worden vastgesteld. Een recent artikel in de *British Medical Journal* gaf aan dat omeprazol, een protonpompremmer, in sommige gevallen kan leiden tot een hypomagnesiëmie. Beide patiënten gebruikten omeprazol en er is onderzocht of dit medicijn ook bij hen de oorzaak was van de lage magnesiumspiegel.

Methode: Bij gebruik van omeprazol en magnesiumsuppletie (oraal MgO) hadden beide patiënten een laagnormale magnesiumconcentratie in plasma. Eerst is de magnesiumsuppletie stopgezet. Toen het magnesium daalde tot 0.35 mmol/L is omeprazol omgezet in ranitidine, een H₂-receptorantagonist. Twee keer per week is magnesium, kalium, calcium, fosfaat, vitamine D en PTH in bloed vervolgd, 1 keer per week de magnesiumuitscheiding in een 24-uurs urine.

Resultaat: Beide patiënten ontwikkelden een hypomagnesiëmie na stopzetting van de suppletie. Hierdoor daalde ook hun calcium- en kaliumspiegels. De hypomagnesiëmie normaliseerde na omzetting van omeprazol naar ranitidine. De magnesiumconcentraties in urine waren onmeetbaar laag, maar stegen nadat de magnesiumspiegels normaliseerden. Bij één van de twee patiënten is de procedure herhaald voor pantoprazol. Hetzelfde fenomeen vond plaats.

Conclusie: Omeprazol kan een levensbedreigende hypomagnesiëmie veroorzaken. De lage magnesiumconcentratie in urine geeft aan dat de opname van magnesium geremd wordt. De vergelijkbare resultaten voor pantoprazol geven aan dat het effect optreedt bij meerdere protonpompremmers en dat het effect mogelijk plaats vindt bij alle protonpompremmers.

Literatuur: Shabajee, et al. *BMJ* 2008; 337: 173-175

125. A multi-drug resistance gene polymorphism predicts clinical response on methotrexate in juvenile idiopathic arthritis patients

M.C.F.J. de ROTTE¹, M.H. HEIJSTEK², R.H.N. van SCHAIK¹, N.M. WULFFRAAT², R. de JONGE¹
Department of Clinical Chemistry¹, Erasmus University Medical Center, Rotterdam;
Department of Pediatric Immunology², Wilhelmina Children's Hospital, University Medical Center, Utrecht

Introduction: Methotrexate is the most widely prescribed Disease Modifying AntiRheumatic Drug (DMARD) in the treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA) (1). Its use is complicated by a highly variable response and frequent side effects (2). We hypothesized that Multi Drug Resistance gene (MDR1) polymorphisms reduce MTX efflux from the cell and thereby increases drug efficacy and side effects (3-5).

Methods: In 183 JIA patients, MTX efficacy and adverse effects were compared among genotypes at three months intervals during the first year of treatment. MTX efficacy was defined by the American College for Rheumatology (ACR) paediatric 30 definition (6). Patients were classified as good clinical responders or non-responders at each visit. Adverse effects included hematological toxicity, liver toxicity, renal toxicity, pneumonitis, and gastrointestinal intolerance. The following polymorphisms were determined: MDR1 1236C>T, 2677G>T/A and 3435C>T.

Results: The MDR1 3435TT variant was associated with good clinical response at three months (OR=2.2 [95%-CI: 1.0-4.5];

P=0.04), six months (OR=1.7 [95%-CI: 0.84-3.3]; P=0.15), nine months (OR=2.7 [95%-CI: 1.2-5.8]; P=0.01) and twelve months (OR=2.1 [95%-CI: 0.97-4.5]; P=0.06) of MTX therapy. The MDR1 1236C>T and 2677G>T/A polymorphisms were not associated with response to MTX treatment. None of the investigated polymorphisms were related to side effects.

Conclusion: The MDR1 3435C>T polymorphism is associated with MTX efficacy in JIA. It could be useful to include this polymorphism in a clinical-pharmacogenetic model to predict the efficacy of MTX in JIA and individualize dosing schemes.

Literature:

1. Minden et al, *J Rheumatol* 2002; (3): 622-628; 2. Ortiz-Alvarez et al, *J Rheumatol* 2004; (12): 2501-2506; 3. Cascorbi et al, *Pharmacol Ther* 2006; 12 (2): 457-473; 4. Ranganathan. *Pharmacogenomics* 2008; 9(4): 439-451; 5. Bohanec Grabar et al, *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64 (11): 1057-1068; 6. Giannini et al, *Arthritis Rheum* 1997; 40 (7): 1202-1209

126. A patient with false hyperlactatemia after ingestion of ethylene glycol

I. HUBEEK¹, R. OOSTVOGELS², E.W.M. ter BRAAK², H. KEMPERMAN¹
Departments of Clinical Chemistry and Haematology¹ and Internal Medicine², UMC Utrecht, Utrecht

Introduction: A 32-year old female patient was admitted to the emergency department of our hospital after an attempted suicide by intentional ingestion of an unknown substance. She was unconscious, hemodynamically stable with a blood pressure of 140/85 mmHg and pulse frequency of 90 bpm. Body temperature was 37.3°C. Respiratory frequency was 16/minute, the oxygen saturation was 96%. Laboratory results showed a metabolic acidosis (pH 7.22, bicarbonate 9.1 mmol/l, pCO₂ 22 mmHg). Electrolytes, creatinin level, lever enzyme activities and CRP were normal, but hyperlactatemia (29.6 mmol/L) was present.

Methods: Analyses were performed on a Rapidlab blood gas analyzer (Siemens) and a DxC800 Chemistry analyzer (Beckman). **Results:** Considerable hyperlactatemia (29.3 mmol/L measured on a blood gas analyzer) appeared to remain present for at least 12 hrs and could not be explained clinically. The osmolar gap was 78 mosmol/kg. We had previously published that glyco-

late, a metabolite of ethylene glycol having almost the same chemical structure as lactic acid (CH₂OH-COO and CH₃-CHOHCOO-), can cause falsely elevated lactic acid measurements, we repeated the measurements on a Beckman DxC800 chemistry analyzer. To our surprise the lactic acid level was only 2.5 mmol/L. This discrepancy of lactate levels on two different methods and our previous observations were in line with the plasma ethylene glycol level (5.3 g/L). Continuous hemofiltration and administration of ethanol were started. The patient was on hemofiltration for eleven days (creatinin 854 µmol/L). Four weeks later renal function had almost completely recovered (creatinin 131 µmol/L).

Conclusion: It is important to be aware of falsely elevated lactate after ethylene glycol poisoning, since it can lead to misdiagnosis and a delay in adequate treatment.

Literatuur: Fijen. *Intensive Care Med* 2006; 4: 626