

## Posterabstracts

Samenvattingen van de posterpresentaties tijdens de Nationale Wetenschapsdag  
Klinische Chemie op 19 april 2012 te Amersfoort

### Categorie 1 Analytisch

#### Hemocytometrie, flowcytometrie, hemostase

##### 1. Measuring Rivaroxaban in a clinical laboratory setting, using common coagulation assays, Xa inhibition and thrombin generation

P.J. MOLENAAR, J. DINKELAAR, A. LEYTE

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

**Introduction:** Rivaroxaban, a direct Xa inhibitor, is one of the new oral antithrombotic agents for which laboratory monitoring is thought to be unnecessary in most cases due to predictable pharmacokinetics. Circumstances are conceivable however in which reliable laboratory testing of Rivaroxaban is desirable. The aim of the present in-vitro study was to investigate and compare the analytical and practical use of Rivaroxaban monitoring with routine screening assays, thrombin generation and anti-Xa activity, in a clinical laboratory setting.

**Methods:** Rivaroxaban was added to 9 normal donor plasmas and to a normal pooled plasma in concentrations up to 1000 µg/L. Prothrombin Time (PT), Activated Partial Thromboplastin Time (APTT), Endogenous Thrombin Potential (ETP) and anti-Xa activity were measured in all donor samples. Responsiveness to Rivaroxaban and imprecision of Rivaroxaban recovery were assessed.

**Results:** Low intra-, but high inter-individual imprecision was found for PT displaying (unlike aPTT) a linear dose-response relationship. Imprecision was much lower when directly measuring anti-Xa activity. Responsiveness of ETP lag-time was high, but of ETP AUC was low, illustrating that the main effect of Rivaroxaban Xa inhibition lies in delaying thrombin formation rather than in preventing it.

**Conclusion:** Despite a high inter-individual imprecision of the PT, this relatively fast and cost friendly assay is sensitive to Rivaroxaban and integrates its effects on the global coagulant state of patients. Anti-Xa activity assays can be run to assess the actual Rivaroxaban concentration and in the future ETP could serve as a fine tuned haemostatic balance indicator for patients using Rivaroxaban.

### Categorie 1 Analytisch

#### Immunoassay, (bloedgroepen-)serologie

##### 2. Interfering antibodies in thyroid immunoassays is platform dependent

A. ALBERSEN<sup>1,2</sup>, I. REVET<sup>1,2</sup>, L.S.M. BOESTEN<sup>2</sup>, J.W. JANSSEN<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry and Hematology<sup>1</sup>, Sint Franciscus Gasthuis, Rotterdam, The Netherlands. Department of Clinical Chemistry and Hematology<sup>2</sup>, IJsselland ziekenhuis, Capelle aan den IJssel, The Netherlands*

**Introduction:** Discrepancies between thyroid function tests and the patient's clinical status should question immunoassay validity. In this study we evaluate several interfering antibodies on four different thyroid hormone immunoassays and the gold standard equilibrium dialysis in order to investigate possible strategies to overcome these.

**Methods:** We performed FT4 measurements on four different analyzers (Modular, Roche; Immulite 2500, Siemens; DXi, Beckman Coulter; Vitros Eci; Ortho Clinical Diagnostics) and compared these to the gold standard equilibrium dialysis. Two patients with aberrant free T4 (FT4) results, one patient with human anti-mouse antibodies (HAMA's), one patient with rheumatoid factor (RF) and two external quality control samples were included in this study. All samples were measured before and after treatment with scantibodies or protein A/G agarose beads.

**Results:** HAMA (2464 ng/mL) and RF (440 IU/mL) positive samples showed no interference on four different FT4 immuno-

assays compared to the dialysis method. Aberrant FT4 patient results were only encountered in the Immulite immunoassay whereby the results were falsely elevated. This interference was eliminated after treatment with protein A/G agarose beads but not scantibody treatment. Furthermore, no thyroid hormone auto-antibodies were detected using gel electrophoresis. Unexpectedly the two patients with aberrant FT4 results were positive for anti-thyreoglobuline (anti-TG). Scantibody and protein A/G treatment had no significant effect on FT4 results in the external quality control samples.

**Conclusion:** HAMA's, RF and anti-TG exhibit no interference on the Modular, DXi, Vitros analysers compared to the dialysis method in the current study. Anti-TG was shown to be a possible cause of interference in the Immulite immunoassay resulting in falsely elevated FT4 results. Blood samples treated with protein A/G or scantibodies gave reproducible FT4 results for all analyzers.

Categorie 1 Analytisch

## Vlamfotometrie, AAS, massaspectrometrie

### 3. Automated mass spectrometric analysis of total plasma and saliva testosterone using XLC-MS/MS

H.J.R. van FAASSEN, I.P. KEMA

*Department of Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen*

**Introduction:** The use of testosterone assays is increasing as new research insights link testosterone to a number of different diseases and conditions. The Endocrine Society recently published a statement about the discrepancies and inaccuracies of various testosterone assays, especially when analyzing female or pediatric plasma samples. In this light we aimed to develop a sensitive and highly specific automated on-line solid-phase extraction method coupled to high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (XLC-MS/MS) to quantify testosterone in pediatric, female and male plasma and in male saliva samples.

**Methods:** 250  $\mu$ L plasma was pretreated by using a novel protein disrupting buffer to release testosterone from its binding proteins. Subsequently 25  $\mu$ L plasma or 50  $\mu$ L saliva equivalent was injected onto the automated solid-phase extraction system (Spark Holland) and pre-purified using C8-sorbent (Spark Holland). Reversed phase chromatography was applied using

a core-shell Halo C18-column (Advanced Materials Technology). Mass spectrometric detection was operated in selective reaction monitoring mode using a quadrupole tandem mass spectrometer (Quattro Premier, Waters) with positive electrospray ionization.

**Results:** Total run-time was 8 min. The method was validated according to CLSI evaluation guidelines. Intra- and inter-assay analytical variation were <8%. Linearity in the 0-60 nmol/L calibration range was excellent ( $r^2 >0.99$ ). Quantification limit was 0.06nmol/L and 0.02nmol/L in plasma and saliva. Several endogenous steroids were tested for interference, but no interferences were detected.

**Conclusion:** We have developed a sensitive and specific method for the measurement of total plasma and salivary testosterone with limited sample handling. Ongoing research is performed to increase the sensitivity of this method to measure female and pediatric saliva samples.

Categorie 1 Analytisch

## Overigen

### 4. Serum osmolaliteit bij zwangeren

A.B. VROLING, J.J.H. HENS, P.J.M.J. KOK

*Klinisch Chemisch Laboratorium, Groene Hart Ziekenhuis, Gouda*

**Inleiding:** Osmometrie wordt gebruikt in de diagnostiek om de water en elektrolyt balans te controleren en kan zowel uit urine als uit serum worden gemeten. Verstoringen in deze balans kunnen tot klachten als dorst, verwarring, misselijkheid, hoofdpijn, traagheid, aanvallen of coma leiden. Na de aanschaf van een Menarini Arkay OM 6050 osmo station hebben we naast de validatie ook een referentiewaarden onderzoek gedaan. Omdat tijdens de evaluatie bleek dat een serum monster van een zwangere persoon lagere waarden gaf dan de andere hebben we besloten om in het referentiewaardenonderzoek ook een groep zwangeren mee te nemen. Er is geen referentiewaardenonderzoek voor osmolaliteit in urine gedaan.

**Methode:** In het onderzoek hebben we serummonsters gemeten van patiënten geboren voor 1950 (ouder dan 61, 89 patiënten), geboren tussen 1950 en 1990 (21 tot 61 jaar oud, 151 patiënten) en zwangeren die voor het PSIE onderzoek in de 12de week

kwamen (100 patiënten). Alle patiënten hadden voor allergie, autoimmuun of zwangerschapsonderzoek serum afgestaan. Alle data is geanalyseerd met behulp van het Bhattacharya tool van André Naus.

**Resultaat:** Uit de metingen die we gedaan hebben kwamen de volgende waarden: de groep van 21-61 jaar oud: gemiddeld 284 (4,6) 95% interval 275-293; de groep ouder dan 61: gemiddeld 287 (4,9), 95% interval 277-296; 12e week zwangerschapsscreening: gemiddeld 274 (2,4) 95% interval 270-279.

**Conclusie:** Het nieuwe referentiewaardengebied wat toepasbaar is in het GHZ uit serum is 275-295. Opvallend is dat de zwangeren gemiddeld 11 mOsmol lager zijn dan niet zwangeren, dit is in de literatuur vaker beschreven en kan worden verklaard door de aanmaak van relaxine door het chorion, wat een stimulerend effect heeft op de productie van ADH, waardoor water wordt vastgehouden.

Categorie 1 Analytisch

## Fotometrie, electrochemie, sensortechnologie

### 5. Evaluatie van de Enterprise POC meter (EPOC) voor de Spoedeisende Hulp

S.M. BUURMAN<sup>1</sup>, C. HERINGHAUS<sup>2</sup>, C.M. COBBAERT<sup>1</sup>

*Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>1</sup>, Spoedeisende Hulp<sup>2</sup>, Leids Universitair Medisch Centrum, Nederland*

**Inleiding:** Op SEH zijn snelle bepaling en beschikbaarheid van bloedgasen, metabolieten en elektrolyten van belang bij reanimatiepatiënten voor verdere beslissingen omtrent het medisch handelen. In dat verband is de EPOC meter (Epocal) gevalideerd t.o.v. de Rapidlab 865 bloedgasanalyser (Siemens). **Methode:** Reproduceerbaarheid van de EPOC parameters is getest met Eurotrol Gas-ISE-metabolites controle materiaal. De methodevergelijking is uitgevoerd met vers patiëntenmateriaal (N=30) dat binnen 10 sec aangeboden werd op beide apparaten. Klinische uitwisselbaarheid van meetresultaten per parameter

(N=9) is getoetst met de "two instrument comparison" rekenmethode (EP Evaluator, Rhoads). Per parameter en per monster is een error index berekend, zijnde de ratio van het verschil van (Y-X) t.o.v. TEa. EPOC meetmethoden zijn klinisch equivalent aan Rapidlab 865 meetmethoden als de absolute waarde van Y-X kleiner is dan TEa in minimaal 95% van de monsters. **Resultaat:** De overall reproduceerbaarheid is <2% voor alle parameters, behalve voor de pO<sub>2</sub>. Voor EPOC lactaat is de overall CVa 1,5-2,0%, en daarmee beter dan de Siemens CVa. Uit de methodevergelijkingen blijkt dat alle EPOC pH en lac-

taat meetresultaten klinisch uitwisselbaar zijn met die van de Rapidlab 865. De EPOC Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, glucose, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>. Het bepalen daarentegen genereren meetresultaten die in 10-87% van de monsters niet klinisch uitwisselbaar zijn met die van de Rapidlab 825.

*Conclusie:* Het belang van POCT bloedgas-elektrolyet-metabooliet analyses met korte doorlooptijden voor kritische patiënten

is bekend. In dat verband laat de evaluatie van de EPOC een exceptioneel goede reproduceerbaarheid zien voor alle testparameters, echter met klinisch relevante verschillen t.o.v. centrale bloedgasanalyseapparatuur voor 7/9 parameters. De behoefte aan een kwaliteitskeurmerk voor POCT-meters wordt met deze resultaten duidelijk geïllustreerd.

## 6. Uitstekende vergelijkbaarheid hs-Troponine T tussen twee laboratoria in het normale gebied

J.E. KOOTSTRA-ROS<sup>1</sup>, L.J. van PELT<sup>1</sup>, C.M. COBBAERT<sup>2</sup>

*Laboratorium voor Algemene Hematologie en Chemie<sup>1</sup>, Afdeling Laboratoriumgeneeskunde, UMCG, Groningen, Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>2</sup>, LUMC, Leiden*

*Inleiding:* Het UMCG heeft hs-Troponine T (hsTnT) bepaald in een groot bevolkingsonderzoek. Er ontstonden twijfels over de juistheid van de assay in het lage gebied omdat er opvallend veel waarden onder de LOB van de assay (<3 ng/l) werden gevonden. Om dit verder te onderzoeken werd een onderlinge vergelijking uitgevoerd met het LUMC.

*Methode:* Er werden 40 monsters met een lage hsTnT concentratie uitgewisseld tussen het LUMC en het UMCG. Deze monsters zijn op beide locaties in duplo bepaald. De lotnummers van het reagens en de calibratoren van de hsTnT assay

verschillen.

*Resultaat:* Tweeëndertig van de 40 monsters hadden een concentratie in het normale bereik (tot 14 ng/l). De vergelijkbaarheid tussen de resultaten van het LUMC en het UMCG was goed, met een bias kleiner dan 1 ng/l.

*Conclusie:* De interlaboratoriumvergelijking van hsTnT in het normale gebied liet, ondanks verschillen in lotnummers van reagens en calibratoren, een uitstekende vergelijkbaarheid zien. Dit is een opvallend goed resultaat voor een immunoassay.

## 7. Vitamine D deficiëntie lijkt af te nemen in de regio Den Bosch

M.M.G.J. van BORREN, L.H.J. JACOBS, P. van 't SANT

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

*Inleiding:* Nadat in 2008 de gezondheidsraad het advies 'Naar een toereikende inname van vitamine D' heeft uitgebracht, is het aantal aangevraagde vitamine D (VitD) bepalingen enorm gestegen. In deze studie onderzoeken we of de VitD-status in onze huisartsenpopulatie, de aanvraag-indicatie en het VitD-suppletiebeleid van de huisarts hierdoor is veranderd. Daarnaast onderzoeken wij of de VitD-status correleert met HbA1c, calcium, fosfaat en kreatinine waarden in plasma.

*Methode:* Alle eerste VitD aanvragen tussen januari 2009 en juni 2011 zijn bestudeerd. Aanvraagindicaties, met uitsluiting bij enige suppletie, zijn onderzocht met behulp van een enquête (n=73). VitD-deficiëntie is gedefinieerd als <30 nmol/L bij mannen <70 jaar zowel als vrouwen <50 jaar, boven die leeftijden <50 nmol/L.

*Resultaat:* Het aantal VitD aanvragen steeg maandelijks, van 30 in januari 2009 tot >200 in juni 2011 en werd twee keer frequenter bij vrouwen dan bij mannen aangevraagd. Een groot

percentage van de huisartspatiënten bleek VitD-deficiënt (70% in de winter versus 40% in de zomer) en slechts een klein percentage had een VitD>80 nmol/l (3% in de winter versus 20% in de zomer). Bovenop de seizoensvariatie was in de periode 2009-2011 een opmerkelijke geleidelijke 30% afname in het aantal VitD-deficiënte huisartspatiënten waarneembaar bij een onveranderd patroon in de UV-index (De Bilt). Uit de enquête bleek dat de huisarts vaker bij andere indicaties dan botproblemen VitD aanvraagde en vaker VitD suppleerde. Een relatie tussen VitD en calcium, fosfaat, kreatinine, HbA1c of albumine werd niet gevonden.

*Conclusie:* Een groot percentage van de huisartspatiënten waarbij VitD-bepaling is aangevraagd blijkt VitD-deficiënt. Het percentage neemt echter sterk af en wordt niet verklaard door suppletie. Mogelijk oorzaak is de toename in het aantal VitD-aanvragen en de veranderde aanvraag-indicatie, waardoor meer VitD-sufficiënte huisartspatiënten worden gemeten.

## 8. Monitoring serial creatinine results in kidney transplant patients using the Statsensor POCT device

C.M. COBBAERT, F. ROMIJN, C.L. van LINT, P.J.M. van der BOOG

*Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Leids Universitair Medisch Centrum, The Netherlands*

*Introduction:* Reference Change Values (RCV) are advocated as an appropriate tool for monitoring changes. In our hospital post-kidney transplant patients monitor their whole blood creatinine using a Statsensor POCT device (Nova Biomedical). To give nephrologists an indication of improvement or deterioration of kidney function, RCV were determined for Statsensor and central lab creatinine methods.

*Methods:* RCV are determined using a split sample comparison approach. Hitherto, middle and ring finger pricks were taken from kidney transplant patients and whole blood Statsensor measurements were performed. In addition, venous blood was sampled in lithium heparin tubes and in serum separation tubes (SST). Heparinized blood was used for replicate whole blood creatinine measurements using the Statsensor device. Serum creatinine was measured in SST tubes, using an enzymatic creatinine method from Roche. RCV were calculated as

$2.8 (CVa_2 + CVb_2)^{1/2}$  ( $P < 0.05$ ).

*Results:* Using the Statsensor, average creatinine levels in post-kidney transplants are  $161 \pm 86 \mu\text{mol/L}$  and  $154 \pm 81 \mu\text{mol/L}$  in finger prick respectively heparinized venous whole blood. Corresponding serum creatinine levels are  $172 \pm 82 \mu\text{mol/L}$ . Average overall CVa for Statsensor was 10.4% and 5.2-6.6% using the finger prick respectively venous whole blood results; overall CVa is <1.5% for the central lab serum creatinine method. RCV are 35% and 23% for Statsensor in fingerprick respectively heparinized venous whole blood, compared to 15.5% for the central lab method.

*Conclusion:* Our data illustrate that RCV are highly affected by overall CVa of POCT-devices. Insufficient precision of the Statsensor causes a 2.25-fold increase in RCV as compared to the central lab method. A quality mark for POCT-devices is recommended to guarantee desirable analytical performance.

## 9. Observationele procesanalyse op SEH naar aanleiding van hoge in-vitro hemolyse prevalentie

J.M. GILLIS<sup>1</sup>, J.M. BEERLAGE<sup>1</sup>, B. de GROOT<sup>2</sup>, C. HERINGHAUS<sup>2</sup>, C.M. COBBAERT<sup>1</sup>

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>1</sup>, Spoedeisende Hulp<sup>2</sup>, Leids Universitair Medisch Centrum, Nederland

**Inleiding:** In-vitro hemolyse op de Spoedeisende Hulp (SEH) is een erkend probleem en komt op SEH afdelingen vaker voor dan op andere afdelingen. Als gevolg van een overschrijding van de hemolyse-index wordt in het LUMC voor desbetreffende bepaling geen uitslag gerapporteerd. Dit kan leiden tot een vertraging in de behandeling van patiënten en een verlenging van de behandelduur op de SEH met gevolgen voor de hele zorglogistiek.

**Methode:** Met als doel oorzaken van in-vitro hemolyse te detecteren is er op de SEH van het LUMC een observationele procesanalyse uitgevoerd. Het volledige proces van bloedafname tot verwerking van monsters op het lab is geobserveerd. Verder is geanalyseerd welke factoren invloed hebben op het voorkomen van hemolyse en de mate van hemolyse van monsters gemeten op de Modular Analytics P800/E170 (Roche).

**Resultaat:** In 2010 zijn op de SEH in totaal 3,89% (7516 totaal)

van de uitslagen niet gerapporteerd als gevolg van hemolyse, ten opzichte van een gemiddelde van 0,66% (19831 totaal) over alle afdelingen. 20,2% van de monsters had een hemolyse-index > 20 (komt overeen met een vrij hemoglobine concentratie van 20 µmol/L), waarbij LD niet meer gerapporteerd wordt en 2,3% een hemolyse-index > 200, waarbij een 18-tal bepalingen niet gerapporteerd worden. Ongeveer de helft van de bloedafnames wordt verricht met een infuusnaald (47%), de andere helft door middel van een venapunctie met rechte naald (42%). Significant meer hemolyse (index > 20) trad op bij bloedafname met infuusnaald (19%) in vergelijking met venapunctie (8%).

**Conclusie:** Bloedafname door middel van een venapunctie met rechte naald leidt tot minder hemolyse. Om de hemolyse op de SEH te verminderen worden medewerkers getraind om de veneuze bloedafname state-of-the-art te verrichten.

## 10. Vals verlaagde glucosewaarden bij een ernstig acidotische patiënt

J.M. GILLIS<sup>1</sup>, J.D. van HEMEL-RINTJAP<sup>2</sup>, C.M. COBBAERT<sup>1</sup>, B.E.B.P. BALLIEUX<sup>1</sup>, N. de JONGE<sup>1</sup>

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>1</sup>, Intensive Care<sup>2</sup>, Leids Universitair Medisch Centrum

**Inleiding:** In deze casus wordt een ernstig acidotische patiënt beschreven, waarbij met een POCT glucosemeter vals verlaagde glucosewaarden zijn. Op de spoedeisende hulp wordt een 47-jarige man opgenomen nadat hij door de huisarts verminderd aanspreekbaar in een koud, nat bed was gevonden. Patiënt is bekend met alcohol abusief gebruik en diabetes mellitus type 1. Er bleek sprake van een hyperglycemische ketoacidose (pH 6,84) en ernstige hypothermie (T = 28,1 °C). Na een week is de patiënt zonder opgetreden complicaties ontslagen. Tijdens de autorisatie werden sterk verschillende glucosewaarden gevonden bij gebruik van verschillende analysers.

**Methode:** De bloedglucose van de patiënt is op verschillende tijdstippen bepaald met behulp van de hexokinase-methode op de Modular P800 (Roche), de glucoseoxidase-methode op de Rapidlab 1265 en 865 bloedgasanalysers (Siemens) en de glucosedehydrogenase-methode op de POCT Precision XceedPro glucosemeter (Abbott).

**Resultaat:** Bij binnenkomst op de spoedeisende hulp werden de volgende glucose uitslagen gemeten: 51,6 mmol/l (arterieel, Rapidlab 1265) en 56,1 mmol/l (Modular P800). Na 1½ uur werd op de afdeling een glucose van 13,1 mmol/l (Precision XceedPro) gemeten. Na drie uur was de glucose gedaald naar 43,6 mmol/l (Rapidlab 865), terwijl met behulp van de POCT meter een glucose van 20,7 mmol/l werd gemeten bij een pH van 7,11. De glucosewaarde met behulp van de POCT bleek discrepant als gevolg van de sterke acidose van de patiënt.

**Conclusie:** De lage pH van de patiënt interfereert met de glucosebepaling op de Abbott glucosemeter. Door de vals verlaagde glucosewaarden kan de ernst van een hyperglycemie onderschat worden. De Abbott Precision XceedPro glucose meter is daarom niet geschikt om bloedglucose waarden te meten bij patiënten met een verdenking op (keto)acidose.

## 11. Friedewald equation already underestimates low-density lipoprotein cholesterol at triglyceride concentrations of >2 mmol/L

L. van der HEUL-NIEUWENHUIJSEN, S. STEK, M. TAX, F. VERHEIJEN, E. VERMEER

Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium, Albert Schweitzer Ziekenhuis, Dordrecht

**Introduction:** Abnormal low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) levels are strongly associated with cardiovascular disease because these promote atherosclerosis. The Friedewald method to estimate the cholesterol content of the serum LDL-c has been used since 1972. According to most literature studies, LDL-c cannot accurately be estimated from the Friedewald equation at triglyceride concentration exceeding 4.52 mmol/L (400 mg / 100 mL). However, in practice, at some Dutch clinical laboratories even higher triglyceride concentrations are used to calculate LDL-c, up to a cut-off level of 8.0 mmol/L.

**Methods:** Total cholesterol, HDL-c, LDL-c and triglycerides were measured on an Olympus AU2700 (Beckman-Coulter) analyzer. We investigated 100 subjects with triglyceride concentration <2.0 mmol/L and 234 subjects with increased triglyceride concentrations between 2.0 and 7.0 mmol/L. Directly measured LDL-c concentrations were compared to calculated (by Friedewald equation) LDL-c concentrations.

**Results:** We found that in our population LDL-c derived from Friedewald is significantly underestimated at triglyceride concentrations >2.0 mmol/L. The mean LDL-c, at a triglyceride concentration of 2.0 mmol/L, according to Friedewald (2.19 mmol/L) was already 28% lower (-0.87 mmol/L) than the mean determined by direct measurement (3.06). At triglyceride concentration of 4.0 mmol/L, the estimated LDL-c (2.49 mmol/L) is already 64% (-1.4 mmol/L) lower than the directly measured LDL-c (3.89 mmol/L).

**Conclusion:** We conclude that the Friedewald formula cannot be accurately used when triglyceride concentrations exceed 2.0 mmol/L on an Olympus AU2700. So laboratories should be more aware of the falsely decreased LDL-c values estimated by Friedewald, as we think other systems will have the same problem. Obviously, unreliable LDL-c can flaw the therapeutic outcome of cardiovascular patients, as clinical decision rules are based on direct LDL-c.

**Hemocytometrie, flowcytometrie, hemostase**

**12. False prolongation of the activated partial thromboplastin time (aPTT) in inflammatory patients: interference of C-reactive protein**

A.P. van ROSSUM<sup>1</sup>, L.Th. VLASVELD<sup>2</sup>, L.J.M. van den HOVEN<sup>1</sup>, C.W.M. de WIT<sup>3</sup>, A. CASTEL<sup>1</sup>  
*Laboratory for Clinical Chemistry and Hematology<sup>1</sup>, Department of Internal Medicine<sup>2</sup>, Emergency Department<sup>3</sup>, Hospital Bronovo, The Hague, The Netherlands*

*Introduction:* To estimate the bleeding risk in patients undergoing an invasive procedure the aPTT and PT are used to evaluate secondary haemostasis. We noted a number of patients with a prolonged aPTT but normal PT an increased bleeding tendency. This phenomenon particularly occurred in patients with an inflammatory response as reflected by an elevated level of CRP.

*Methods:* To study the influence of CRP on the aPTT both CRP and aPTT were determined in 59 patients visiting the emergency department. The aPTT was measured using the Cephascreen assay as well as a kaolin-based aPTT assay (both Stago). Plasma from healthy donors were spiked with human CRP (Sigma-Aldrich) in a concentration up to 200 mg/L. CRP-interference in two other commonly used aPTT reagents Actin FS (Siemens) and HemosIL SyntASil (IL) was studied as well. *Results:* Using the Cephascreen aPTT assay we showed

a correlation between the CRP level and the length of the aPTT (Cephascreen=0.024\*[CRP]+28.9), while the kaolin-based aPTT was not influenced by CRP (Kaolin=-0.0018\*[CRP]+29.1). Rising CRP concentrations resulted in Cephascreen aPTT prolongation far above reference range. Spiking of normal plasma with CRP increased the Cephascreen with 5.8 seconds (i.e. above reference range) as compared to an increase of the Kaolin reagent of only 1.6 seconds. Spiking of normal plasma with CRP resulted in a dose-dependent increase of 3.5 seconds at 200 mg/L using Actin FS and 2.1 sec. in the HemosIL SyntASil assay.

*Conclusion:* In conclusion, we demonstrate that CRP interferes with aPTT assays resulting in a prolongation of the aPTT. The degree of prolongation is dependent on the height of the CRP level and the type of the aPTT assay used.

**13. Microparticle analysis by flowcytometry depends on well defined pre-analytical conditions**

M. van SCHILFGAARDE<sup>1</sup>, S.V. OUSSOREN<sup>1</sup>, M.C. TRAPPENBURG<sup>2</sup>, W.E. TERPSTRA<sup>2</sup>, A. LEYTE<sup>1</sup>  
*Departments of Haematology and Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Internal Medicine<sup>2</sup>, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam, The Netherlands*

*Introduction:* Circulating microparticles are thought to be important in thrombotic disease and many separate laboratories perform studies on numbers and properties of microparticles but data are often difficult to compare. Variables in pre-analytical conditions as well as flowcytometric detection of circulating microparticles were investigated.

*Methods:* Standard methods used to obtain blood and perform flowcytometry for MPs on the BD FACS Calibur were as published. Only steps under review (centrifugation, freezing, FACS settings, fluorescent labeling) were varied. Measurements of Megamix beads were performed as proposed by the ISTH SSC Workshop on microparticle enumeration.

*Results:* Flowcytometric analysis of Megamix beads and MPs showed good separation of the different sizes on side scatter (SSC) but not on forward scatter (FSC). Variations in freezing

and centrifugation displayed considerable effect on the FACS derived numbers of Annexin V positive microparticles per sample. Although extensive centrifugation reduced the number of microparticles per sample it did not reduce the AnnexinV negative background in the microparticle gate. This indicates that all spin protocols used showed poor separation between small platelets and MP and that centrifugation steps to obtain low background platelets may lead to loss of MP before FACS analysis can take place.

*Conclusion:* MP detection by flowcytometry does not benefit from adaptation of instrument settings to fluorescent beads. A one step centrifugation protocol to obtain MP-rich plasma at low speed may be preferred. Importantly, within study consistency regarding centrifugation and freezing steps is important for MP measurements.

**14. Validation of the body fluid module on the new Sysmex XN-1000 for counting blood cells in cerebrospinal fluid and other body fluids**

C. FLEMING, R. BROUWER, J. LINDEMANS, R. de JONGE  
*Department of Clinical Chemistry, Erasmus MC University Medical Center Rotterdam, The Netherlands*

*Introduction:* We evaluated the body fluid (BF) module on the new XN-1000 for counting blood cells.

*Methods:* One hundred and eighty seven (73 CSF, 48 CAPD, 46 ascites, and 20 pleural fluid) body fluid samples were used for method comparison between the XN-1000 and manual microscopy (Fuchs-Rosenthal chamber and stained cytospin slides) for counting RBC and WBC (differential).

*Results:* Good agreement was found for counting WBCs ( $y=1.06x+0.09$ ,  $n=67$ ,  $r^2=0.96$ ) and mononuclear cells (MNs) ( $y=1.04x-0.01$ ,  $n=40$ ,  $r^2=0.93$ ) in CSF. However, the XN-1000 systematically counted more polymorphonuclear cells (PMNs) ( $y=1.48x+0.18$ ,  $n=40$ ,  $r^2=0.99$ ) compared to manual microscopy. Excellent correlation for RBCs  $>1 \times 10^9/L$

( $y=0.99x+116.56$ ,  $n=26$ ,  $r^2=0.99$ ) in CSF was found. For other fluids (CAPD, ascites and pleural fluid) excellent agreement was found for counting WBCs ( $y=1.06x+0.26$ ,  $n=109$ ,  $r^2=0.98$ ), MNs ( $y=1.06x-0.41$ ,  $n=93$ ,  $r^2=0.96$ ), PMNs ( $y=1.06x+0.81$ ,  $n=93$ ,  $r^2=0.98$ ) and RBCs ( $y=1.04x+110.04$ ,  $n=43$ ,  $r^2=0.98$ ). By using BF XN-check, the lower limit of quantitation (LLoQ) for WBC was  $5 \times 10^6/L$ . Linearity was excellent for both the WBCs ( $r^2=0.99$ ) and RBCs ( $r^2=0.99$ ) and carry over never exceeded 0.05%.

*Conclusion:* The BF module on the XN-1000 is a suitable tool for fast and accurate quantification of WBC (differential) and RBC counts in CSF and other body fluids in a diagnostic setting.

## 15. PANDA; preclassificatie van hematologische maligniteiten in perifeer bloed

M.M.J.F. KOENDERS<sup>1</sup>, Y. KLUITERS - de HINGH<sup>1</sup>

*Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium en Trombosedienst<sup>1</sup>, St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg*

**Inleiding:** PANDA, dat staat voor peroxidase activity and nuclear density analysis, is een systeem dat de gebruiker in staat stelt de perox- en baso-cytogrammen van de Siemens hematologie-analyzer (ADVIA(2)120) in één snelle handeling te analyseren en te interpreteren. Met behulp van dit systeem kunnen met name de leukemieën worden gepreclassificeerd. In deze studie is het PANDA classificatiesysteem gevalideerd.

**Methode:** In deze studie zijn 153 patiënten geïncludeerd met een hematologische maligniteit. De perifeer bloedcytogrammen zijn retrospectief met behulp van het PANDA classificatiesysteem geïnterpreteerd.

**Resultaat:** Het PANDA classificatiesysteem heeft 85% van de patiënten met de diagnose acute myeloïde leukemie (AML) accuraat gepreclassificeerd. Tevens was het mogelijk om AML met behulp van PANDA verder te classificeren op basis van de oude FAB-subtypes, met name een M2, M3, M4, en M5 subtype. De diagnose acute lymfatische leukemie (ALL) en

chronische lymfatische leukemie (CLL) kon in, respectievelijk, 100% en 79% van de patiënten juist worden gepreclassificeerd. Dit in tegenstelling tot de diagnoses chronische myeloïde leukemie (CML), myelodysplastisch syndroom (MDS) en non-hodgkin lymfoom (NHL) die slechts in, respectievelijk, 0%, 7% en 5% van de patiënten accuraat gepreclassificeerd werden. **Conclusie:** Het PANDA classificatiesysteem is een makkelijke en snelle methode die elke gebruiker, met of zonder expertise, in staat stelt om ADVIA(2)120-cytogrammen te interpreteren. De resultaten laten echter zien dat het PANDA classificatiesysteem in zijn huidige vorm alleen geschikt is om de diagnoses AML, ALL en CLL te preclassificeren. Voor de diagnoses CML, MDS en NHL is het systeem niet of minder geschikt. Geconcludeerd kan worden dat het PANDA classificatiesysteem een educatieve rol kan innemen in het laboratorium maar dat het systeem in zijn huidige vorm niet geschikt is als diagnostische tool.

## 16. Low platelet count evaluation on the new Sysmex XN2000 haematology analyzer

M.G. SCHOORL, J. OOMES, M.I. SCHOORL, J. van PELT

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

**Introduction:** In thrombocytopenic subjects, especially when a decision on platelet (PLT) transfusion has to be made, high accuracy and precision of low PLT count is essential for appropriate decisions. The recently introduced haematology analyzer Sysmex XN2000 is equipped with three methodologies for PLT counting: impedance (PLT-I), optical (PLT-O) and a new fluorescence (PLT-F) method. The PLT-F methodology is based on a Fluorocell fluorescent dye and an extended counting volume. The precision of the PLT-F counting methodology in patients with PLT count  $<50 \times 10^9/L$  was investigated and compared with the ICSH CD61-ImmunoPLT flowcytometric reference method (1). For comparison, PLT-I and PLT-O were analysed on the Sysmex XN2000 and the routinely used Sysmex XE2100 analyser.

**Methods:** Blood samples with PLT  $<50 \times 10^9/L$  ( $n=37$ ) were analysed on the Sysmex XN2000 and XE2100 analysers. The CD61-ImmunoPLT method was performed on a Beckman Coulter FC-500 flowcytometer.

**Results:** At a level of  $20 \times 10^9/L$  PLTs, reproducibility for PLT-I, PLT-O and PLT-F on the XN2000 demonstrated coefficients of variation of 9.3%, 8.5% and 3.0% respectively. Correlation between PLT-O on XN2000 and XE2100 yielded  $r>0.977$ . Linear regression analysis for PLT-F compared with the CD61-ImmunoPLT method is determined as  $PLT-F=0.71 \cdot CD61 - 0.8$  ( $r=0.988$ ). Linear regression analysis for PLT-F compared with PLT-O on XN2000 is determined as  $PLT-F=1.05 \cdot PLT-O - 2$  ( $r=0.975$ ). Using the transfusion threshold of  $20 \times 10^9/L$  PLTs, linear regression analysis for PLT-F compared with PLT-O on XN2000 is determined as  $PLT-F=0.90 \cdot PLT-O - 0.4$  ( $r=0.956$ ). **Conclusion:** The new PLT-F method demonstrated excellent results for reproducibility in samples with PLT concentrations  $<50 \times 10^9/L$ . With respect to the transfusion threshold, PLT-F could be helpful to make better decisions for PLT transfusions.

*Literature:* 1. ICSH. Am J Clin Pathol 2001;115:460-464.

## 17. Leukocyte differentiation by flow cytometry: comparison of two different flow cytometric protocols with microscopy and hematology analyzer

G.J.M. van de GEIJN, M. van DIJK, J.W. JANSSEN, M.H. BEUNIS, T.L. NJO

*Department of Clinical Chemistry (KCHL), Sint Franciscus Gasthuis, The Netherlands*

**Introduction:** Leukocyte differential counting is performed frequently as a diagnostic tool. When the automated leukocyte differential generated by a hematology analyzer does not meet specific criteria, a microscopic differential is performed. Disadvantages of microscopy are the limited number of counted cells and significant statistical and inter-observer variation. Several laboratories published flow cytometric protocols to perform single-tube leukocyte differential counts. Advantages over microscopy are the increased number of counted cells (several ten-thousands) and the objective immunological definitions of the leukocyte populations. Comparison of the different protocols on a single data set has not been reported yet. We compared 2 different flow cytometric leukocyte differentiations: Leukoflow, developed by us, and Cytodiff™ (Beckman Coulter) with the results from hematology analysers and microscopy.

**Methods:** For 110 EDTA blood samples we compared leukocyte differentiation by a hematology analyzer (LH750, Beck-

man Coulter), microscopy (2x200 cells) and flow cytometry using both Leukoflow and Cytodiff™ protocols (5-color FC500 flow cytometer; Beckman Coulter).

**Results:** Correlations between the hematology analyzer and both flow cytometric methods are comparable (all  $>0.9$ , except for monocytes: 0.69 and 0.73 for Leukoflow and Cytodiff™ respectively). Preliminary analysis showed that both Leukoflow and Cytodiff™ methods correlated equally well with microscopical differentiation. The poorest correlations were observed for blasts, immature neutrophils and basophils. The automated gating software provided with the Cytodiff™ protocol gives correct gating results for most samples (~75%).

**Conclusion:** Leukocyte differentiation by flow cytometry is technically feasible and can be an alternative to screen samples flagged by hematology analyzers for microscopical review. For use in a routine diagnostic setting, automatic gating software is an advantage, preferably supplied with a system to flag aberrant results.

## 18. Differentiatie tussen bacteriële en niet-bacteriële infecties bij COPD patiënten met exacerbatie op de SEH

S. DENKER<sup>1</sup>, J.G.M. KOELEMAN<sup>3</sup>, E. BIRNIE<sup>4</sup>, G.J. BRAUNSTAHL<sup>1</sup>, T.L. NJO<sup>2</sup>, G.J.M. van de GEIJN<sup>2</sup>  
*Longziekten<sup>1</sup>, Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium<sup>2</sup>, Medische Microbiologie en Infectieziekten<sup>3</sup>, Leerhuis<sup>4</sup>, Sint Franciscus Gasthuis, Rotterdam*

**Inleiding:** Bij chronisch obstructieve longziekten (COPD) komen frequent benauwdheidsaanvallen (exacerbaties) voor, waarvan ongeveer 30% met een bacteriële oorzaak. Voor het correct starten met antibiotica is het belangrijk bacteriële en niet-bacteriële exacerbaties goed te onderscheiden. Hiervoor worden het sputum-aspect, absolute leukocytengetal, CRP en thoraxfoto's gebruikt. Ongeveer 60% van de exacerbaties krijgt antibiotica, er is dus sprake van overbehandeling, met als risico resistentieontwikkeling. Wij testen of bacteriële en niet-bacteriële COPD exacerbaties beter onderscheiden kunnen worden met extra diagnostische bloedtesten.

**Methode:** Bij COPD patiënten die zich op de SEH presenteerden met een exacerbatie COPD (patiëntengroep) en COPD patiënten die ter controle op de longpoli kwamen (controlegroep), werden naast de gebruikelijke diagnostiek ook extra laboratorium bepalingen gedaan: automatische leukocyten differentiatie (hematologie analyzer) en immunologische flowcytometrische leukocyten differentiatie (Leukoflow/Cytodiff™). Inclusie criteria: COPD GOLD klasse 1-4, geen recent antibiotica of prednison gebruik, geen systemische ziekte of maligniteit. Op basis

van klinisch beloop en sputumkweek is de patiëntengroep retrospectief ingedeeld in bacteriële en niet-bacteriële exacerbaties. Met ROC-curves is gekeken welke test deze groepen het beste kan onderscheiden op basis van de 'area under the curve' (AUC).

**Resultaat:** Geïnccludeerd werden patiënten met bacteriële (n=7) en niet-bacteriële exacerbatie COPD (n=10) en COPD patiënten zonder exacerbatie (n=18). De celpopulaties die bacteriële exacerbaties het beste kunnen onderscheiden zijn: eosinofielen, (AUC: 0,792) en CD4 positieve T-cellen (Leukoflow), (AUC: 0,778). Het onderscheidend vermogen van deze 2 celpopulaties is hoger dan het absolute aantal leukocyten (AUC: 0,543) en vergelijkbaar met CRP (AUC: 0,778).

**Conclusie:** Voor het differentiëren van bacteriële versus niet-bacteriële exacerbaties COPD is de absolute leukocyten concentratie slecht bruikbaar. Veelbelovend zijn de CD4-positieve T-cellen, bepaald met Leukoflow. Het absolute aantal eosinofielen lijkt een goed onderscheidende parameter, die eenvoudig bepaald kan worden.

## 19. Evaluation of the new Sysmex XN2000 haematology analyser

M. SCHOORL, K. UMMENTHUM, M. CHEVALLIER, J. van PELT  
*Department of Clinical Chemistry, Haematology & Immunology, Medical Center Alkmaar, The Netherlands*

**Introduction:** Performance characteristics of the new Sysmex XN2000 haematology analyser were evaluated by executing precision, carry-over, sample stability and reference values studies. Correlation studies were performed against the Sysmex XE2100 analyser and included all haematology parameters as well as manual WBC differential counts according to the CLSI guidelines H20-A2.

**Methods:** K2EDTA anticoagulated blood samples from apparently healthy blood donors (male/female: 143/119) were analyzed within 4 hours after collection. Intra-assay variation was determined in ten-fold at three levels for WBC, RBC, Hb, platelets (PLT-I and PLT-O) and reticulocytes. Inter-assay variation was performed with XN-Check level 2 on ten different days. Carry-over was established according to the ICSH recommendation. Stability of parameters was performed over 72 hours at 2-8°C.

**Results:** Results concerning intra- and interassay variation of all parameters have yielded appropriate results within the

specifications of the manufacturer. Carry-over yielded excellent results for WBC, RBC, Hb, PLT-I, PLT-O and reticulocytes (< 0.10%). The effect of time up to 48 hours does not obviously effect results, except for MCV, RDW, MPV and PDW. After 72 hours only slight differences were observed for the 5-part WBC-screening and parameters for reticulocytes maturation. Linear regression analysis for complete blood cell counts yielded correlation coefficients of  $r > 0.97$ . Parameters for 5-part WBC-screening yielded correlation coefficients of  $r > 0.95$ , except for basophils ( $r = 0.80$ ). Correlation between 5-part WBC-screening and manual WBC differential counts yielded  $r > 0.90$ , except for monocytes ( $r = 0.76$ ) and basophils ( $r = 0.55$ ). Mean values of the apparently healthy blood donors were compared with the regional reference ranges for adults. Results indicated no reason for adjustment.

**Conclusion:** According to results of the apparently healthy blood donors, we conclude that the Sysmex XN2000 haematology analyser yields excellent analytical performance.

## 20. Instrument-dependent interference of Howell-Jolly bodies in reticulocyte enumeration

M. van BERKEL, E. BESSELAAR, P. KUIJPER<sup>1</sup>, V. SCHARNHORST  
*Clinical Laboratory and Internal Medicine, Catharina Hospital Eindhoven, The Netherlands, Clinical Laboratory<sup>1</sup>, Máxima Medical Centre Veldhoven, The Netherlands*

**Introduction:** Reticulocyte enumeration in peripheral blood is an important diagnosticum in the evaluation of erythropoiesis. In this case report, a splenectomised patient with a marked reticulocytosis in combination with normal number of erythrocytes containing adequate haemoglobin content is presented. The erythrocytes of the patient contained a substantial number of Howell-Jolly bodies, which are RNA remnants in erythrocytes that are normally removed by the spleen. The patient's blood was analysed on three different automated haematology analysers. Each analyser displayed a different reticulocyte concentration, due to a dissimilar grade of interference of Howell-Jolly bodies in reticulocyte analysis.

**Methods:** Blood was collected in K3EDTA containing tubes

(vacutainer 3688610, Becton Dickinson) and blood counts were measured within 6 hours on a Beckman Coulter LH 750, a Sysmex XE-5000 and a CellDyn Sapphire automatic haematology analyser. As a reference method, reticulocytes were manually counted after supravital Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining.

**Results:** In the presence of Howell Jolly bodies, a strong discrepancy between automatic reticulocyte counting on three systems using different methods was observed. Beckman Coulter LH 750 automated counter produced a reticulocyte number of 49/nL, resembling the BCB staining and manual counting (54/nL). In contrast, both Sysmex XE-5000 and Cell-Dyn Sapphire counted false elevated numbers of reticulocytes (94/nL and 377/nL respectively).

*Conclusion:* Overall, use of polynucleotide specific dyes in state-of-the-art haematology analysers such as Sysmex XE-5000 and CellDYN Sapphire may cause pseudoreticulocytosis in the presence of Howell-Jolly bodies or other nucleic acid remnants. This is not observed using a RNA-specific dye in

Beckman Coulter LH50 instruments. This case underlines that hematology analysers using RNA-specific dyes for the detection of reticulocytes in hyposplenic or splenectomised patients are to be used.

## 21. Evaluatie van de leucodif vlaggen van de ADVIA 2120i binnen de huisartsenpopulatie

Y.C.M. KLUITERS-de HINGH, M. HEEZIUS, B. van HINTUM  
KCHL, St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg

*Inleiding:* Hematologie analysers geven in perifeer bloed een analyse van het bloedbeeld en mogelijk een leucocytendifferentiatie. Bij aanwezigheid in de leuco-diff van afwijkende cellen of vermoeden daarop geven de analysers (morfologische) vlaggen mee, "flaggings", die kunnen leiden tot een handdif. Om het aantal handdiffen te reduceren is er gekeken naar de sensitiviteit en specificiteit van de analyser vlaggen van de ADVIA 2120i binnen de aanvragen van de huisartsen.

*Methode:* Bij 336 microscopische diffen voor huisartsen zijn alle analyser-vlaggen teruggezocht (N=336). De gerapporteerde uitslagen werden beoordeeld, gekeken werd (1) welke vlaggen veelvuldig voorkwamen, (2) de relevantie van de handdif voor de klinische vraagstelling/ antwoord en (3) de sensitiviteit en specificiteit van de vlaggen.

*Resultaat:* Van 336 handdiffen voor de huisartsen zijn er 331 uitgevoerd op basis van een analyser-vlag en 5 enkel ter con-

trole van lage trombocytenuitslag. De top 3 van vlaggen binnen die 331 was BLAST+ (76), LS+ (84) en %LYMF>50% (46). De losse LS+ vlag leverde in enkele gevallen een linksverschuiving op met licht toegenomen percentage witte voorstadia (max 7%). Een losse BLAST+ of LYMF vlag leverde weinig ernstige pathologie op "slechts" atypische lymf +.

*Conclusie:* De waarde van een losse LS+ vlag is zeer beperkt, met in enkele gevallen 5-10% staafkernige granulocyten of metamyelocyten. Een CRP en/of toegenomen totaal aantal neutrofielen duiden in deze ook op een infectie dus de klinische meerwaarde van een handdif is in deze situatie te verwaarlozen. Opvallend was de zeer lage specificiteit van de BLAST+ en %LYMF vlaggen, die vooral atypische lymfocyten (+) in de rapportage van de handdif geven. Door het slechte onderscheid in ernst van atypische lymfocyten (+) is verdere analyse nodig voordat overgegaan kan worden tot afschaffen van deze vlaggen.

### Categorie 1 Analytisch

#### Immunoassay, (bloedgroepen-)serologie

## 22. Accuracy of six routine 25-hydroxy vitamin D assays; influence of vitamin D binding protein concentration

A.C. HEIJBOER<sup>1</sup>, M.A. BLANKENSTEIN<sup>1</sup>, I.P. KEMA<sup>2</sup>, M.M. BUIJS<sup>3</sup>  
*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, VU Medical Center, Amsterdam; Department of Laboratory Medicine<sup>2</sup>, University Medical Center Groningen<sup>2</sup>; Medial Diagnostic Centers<sup>3</sup>, Hoofddorp, The Netherlands*

*Introduction:* Recent recognition of its broad pathophysiological importance has triggered an increased interest in 25-hydroxy vitamin D [25(OH)D]. By consequence, throughput in 25(OH)D testing has become an issue for clinical laboratories and several automated assays for determination of 25(OH)D are now available. The aim of this study was to test the accuracy and robustness of these assays by comparing their results to those of an ID-XLC-MS/MS method. A specific focus was put on the influence of vitamin D binding protein (DBP) by using samples with various concentrations of DBP.

*Methods:* five automated assays (Architect, Centaur, iSYS, Liaison and Elecsys), one radioimmunoassay (Diasorin) preceded by extraction, and an ID-XLC-MS/MS method were used to measure 25(OH)D concentrations in plasma samples of 51 healthy individuals, 52 pregnant women, 50 hemodialy-

sis patients and 50 intensive care patients. DBP levels in these samples were determined using an ELISA method.

*Results:* Most of the examined 25(OH)D assays showed significant deviations in 25(OH)D concentration from that determined by the ID-XLC-MS/MS method. As expected, DBP concentrations were higher in samples of pregnant women and lower in samples of IC patients compared to healthy controls. In four of the five fully-automated 25(OH)D assays, an inverse relationship between DBP concentrations and deviations from the ID-XLC-MS/MS results could be observed.

*Conclusion:* 25(OH)D measurements performed with most immunoassays suffer from inaccuracies which are DBP concentration dependent. Laboratory specialists, clinicians, researchers, reviewers and authorities should therefore carefully consider the method used when interpreting results of 25(OH)D measurements.

## 23. PTH referentiewaarden in relatie tot vitamine D status, kreatinine en leeftijd

M.M.L. DECKERS<sup>1,2</sup>, R.T. de JONGH<sup>3</sup>, P. LIPS<sup>3</sup>, B. PENNINX<sup>4</sup>, J.H. SMIT<sup>4</sup>, N.M. van SCHOOR<sup>5</sup>, M.A. BLANKENSTEIN<sup>2</sup>, A.C. HEIJBOER<sup>2</sup>

*Klinisch Laboratorium<sup>1</sup>, Sint Lucas Andreas Ziekenhuis, Amsterdam; Afdeling Klinische Chemie<sup>2</sup>, afdeling Interne Geneeskunde<sup>3</sup>, Afdeling Psychiatrie<sup>4</sup>, AmsterdamVU Medisch Centrum<sup>5</sup>; Afdeling Epidemiologie en Biostatistiek<sup>5</sup>, EMGO Institute for Health and Care Research*

*Inleiding:* PTH assays zijn slecht gestandaardiseerd. In de nefrologie richtlijn (KDIGO) is hier op ingespeeld door 2-9x ULN van PTH als behandelindicatie aan te houden. Daarnaast wordt in de bijsluiters vaak niet vermeld of bij het vaststellen van de referentiewaarden rekening gehouden is met de vitamine D status. In deze studie is de relatie tussen vitamine D status van de patiënt, nierfunctie, leeftijd en PTH bestudeerd.

*Methode:* In gezonde ouderen (LASA studie, n=749, 55-65 jaar) en gezonde volwassenen (NESDA studie, n=694, 18-65 jaar) is 25-hydroxyvitamine D (25OHD) in serum en PTH in EDTA-plasma bepaald. 25(OH)D is gemeten met een RIA (LASA studie, Diasorin) en LC-MS-MS (NESDA studie) en PTH met de Architect (Abbott). De referentiewaarden voor PTH uit de bijsluiters zijn 1,8-7,2 pmol/l zonder vermelding van vitamine D status.



**Resultaat:** Referentiewaarden voor PTH zijn geanalyseerd in 4 subgroepen: 25(OH)D <25, 25-50, 50-75 en >75 nmol/l. De groepen 25(OH)D 50-75 en 25(OH)D>75 zijn samengevoegd aangezien de referentiewaarden niet significant verschillend waren. Zoals verwacht zijn PTH referentiewaarden in de vitamine D deficiënte en insufficiënte groep significant hoger dan de vitamine D sufficiënte groep (25(OH)D>50). De referentiewaarden voor PTH voor de vitamine D sufficiënte groep was

2,7-11,18 pmol/l (LASA) en 2,3-9,3 pmol/l (NESDA). Dit verschil kan verklaard worden door verschil in leeftijd en kreatinine. Lineaire regressie toonde kreatinine en leeftijd als confouders van het verband tussen 25(OH)D en PTH. Echter ook na correctie was het verband tussen 25(OH)D en PTH sterk. **Conclusie:** Gezien de hoge prevalentie van vitamine D deficiëntie is het van belang bij het vaststellen van referentiewaarden voor PTH een vitamine D deficiëntie uit te sluiten.

## 24. Absolute and relative changes of cardiac troponin I and T in emergency department patients measured with sensitive troponin assays

V. SCHARNHORST<sup>1</sup>, K. KRASZNAI<sup>2</sup>, M. van 't VEER<sup>2</sup>, R.H. MICHELS<sup>2</sup>

*Clinical Laboratory<sup>1</sup> and Cardiology<sup>2</sup> Department, Catharina Hospital, Eindhoven, The Netherlands*

**Introduction:** The new-generation of sensitive assays for cardiac troponin (cTn) has low detection limits and improved precision. Consequently, they lowered the 99th-percentile cut-off value for myocardial infarction, causing higher frequencies of positive test results. Therefore, serial testing is important with low concentrations to discriminate myocardial infarction from other causes of elevated cTn. We evaluated the short-term variation of cTn and determined absolute concentration changes and reference change values (RCVs) for cardiac troponin T and I in emergency department (ED) patients.

**Methods:** To assess short-term variation, we collected blood from patients presenting with cardiac chest pain upon arrival in the ED, 2, 6 and 12 hours later. cTn was measured with high-sensitivity assays for cardiac troponin T (hsTnT; Roche Diagnostics) and I (TnI-ultra; Siemens Diagnostics). cTn results from patients without acute coronary syndrome or stable

angina were used to calculate short-term changes in cTnI and reference change values.

**Results:** The 95th percentiles of the change in cTn were calculated to be 8.3 ng/L for hsTnT and 0.028 µg/L for TnI-ultra. Within-individual and total CV were 11% and 14% for hsTnT and 18% and 21% for TnI-ultra, respectively. RCVs were 38% (hsTnT) and 57% (cTnI ultra). The corresponding lognormal RCVs were +46%/-32% for hsTnT and +76%/-43% for TnI-ultra.

**Conclusion:** The short-term variation of cTn is low in ED patients free of ischemic myocardial necrosis. Around the 99th percentile cut-off, RCVs and absolute changes in cTn concentration are comparable. cTn variation exceeding physiological variation can be used to identify ED patients with acute myocardial necrosis.

## 25. Toegevoegde waarde van fx77 bij kinderen

G.W.A. LANSBERGEN<sup>1,2</sup>, G.J. VRIELINK<sup>3</sup>, M.M.L. DECKERS<sup>3</sup>

*Afdeling Klinische Chemie<sup>1</sup>, Groene Hart Ziekenhuis, Gouda, Resultaat verantwoordelijke eenheid laboratoria<sup>2</sup>, Zuwe Hofpoort Ziekenhuis, Woerden, Afdeling Klinisch Laboratorium<sup>3</sup>, Sint Lucas Andreas Ziekenhuis, Amsterdam*

**Inleiding:** Voor de laboratoriumdiagnostiek van voedselallergie voor kinderen <4 jaar wordt gebruik gemaakt van een gecombineerd inhalatie- en voedselpanel (infantscreening) dat de voedselallergenen pinda, koemelk-eiwit, en kippenei-eiwit bevat naast inhalatieallergenen. Het voedselpanel en de kinderscreening van Phadia is recent uitgebreid met hazelnoot, cashewnoot, sesamzaad, kiwi en tomaat (voedselpanel fx77). Uit een eerste evaluatie door beide centra bleek de toegevoegde waarde van de fx77 screening bij negatieve voedsel screening in de patiëntengroep >4 jaar, waarbij met name hazelnoot sensibilisatie werd gevonden. In deze studie is de patiëntengroep <4 jaar geanalyseerd.

**Methode:** Bij 76 kinderen <4 jaar in Gouda en omstreken en 321 kinderen in regio Amsterdam is de fx77 screening uitgevoerd naast de infantscreening op de Immunocap 250. Positief geteste sera zijn uitgesplitst in de afzonderlijke losse allergenen.

**Resultaat:** In respectievelijk Gouda en Amsterdam waren 18% en 19% van de patiënten zowel fx77 als infantscreening positief, in 61% en 55% beiden negatief en in 3% en 2% was fx77 positief en infantscreening negatief. In de groep met een negatieve infantscreening leverde een aanvullende fx77 weinig extra informatie op. Ook uit statusonderzoek bleek dat het niet uitvoeren van een fx77 screening in deze groep patiënten niet geleid zou hebben tot het missen van klinisch relevante allergie. Dit is in tegenstelling tot de patiënten >4 jaar waarbij respectievelijk in 15% en 10% van de negatieve fx5 screeningen een positieve fx77 wordt gevonden. Een oorzaak van dit verschil kan de geringe mate van blootstelling aan noten of geringe sensibilisatie zijn voor boompollen in deze kinderen.

**Conclusie:** Aanvullend testen op fx77 bij een negatieve infantscreening heeft geen meerwaarde tenzij er een duidelijke anamnestiche aanwijzing is voor noten-allergie.

## 26. The new Roche Vitamin D Total assay: fit for its purpose?

J.M.A. EMMEN<sup>1</sup>, J.P.M. WIELDERS<sup>2</sup>, A.K. BOER<sup>3</sup>, J.M.W. van den OUWELAND<sup>4</sup>, H.L. VADER<sup>1</sup>

*Laboratory for Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Máxima Medical Center Veldhoven; Department of Clinical Chemistry<sup>2</sup>, Meander Medical Center, Amersfoort; Clinical Laboratory<sup>3</sup>, Catharina Hospital Eindhoven; Department of Clinical Chemistry<sup>4</sup>, Canisius-Wilhelmina Hospital, Nijmegen*

**Introduction:** Measurement of serum 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) is used to assess vitamin D status. We evaluated the analytical performance of a new automated assay, Elecsys Vitamin D Total, which is based on competitive protein binding.

**Methods:** The Elecsys assay was tested for imprecision, linear-

ity and sensitivity in the lower concentration range at three test-sites and compared to a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method, a high-performance liquid chromatography (HPLC) method and the Liaison 25(OH) vitamin D total immunoassay (Diasorin).

**Results:** Imprecision testing with human serum specimens showed within-run CVs of <6% and between-run CVs of <8%. The assay was linear from at least 33 to 111 nmol/L and showed equivalent 25(OH)D levels for matched serum and heparinized plasma samples. The Elecsys assay correlated well with LC-MS/MS ( $r^2 = 0.88$ ;  $y = 1.06x - 6.87$  nmol/L), HPLC ( $r^2 = 0.91$ ,  $y = 0.90x + 3.03$  nmol/L) and the Liaison assay ( $r^2 = 0.86$ ,  $y$

$= 1.19x + 2.80$  nmol/L). Some of the samples showed large between-method differences.

**Conclusion:** The new Elecsys assay fulfilled present analytical performance requirements and showed close agreement to other well established methods for 25(OH)D analysis, making it fit for assessment of vitamin D status.

## 27. Multicenter comparison study of current methods to measure 25-hydroxyvitamin D in serum

M.J.W. JANSSEN<sup>1</sup>, C.C. BEKKER<sup>1</sup>, L.S.M. BOESTEN<sup>2</sup>, M.M. BUIJS<sup>3</sup>, A.C. HEIJBOER<sup>4</sup>, F.A.L. van der HORST<sup>5</sup>, F.J. LOUPATTY<sup>6</sup>, J.M.W. van den OUWELAND<sup>7</sup>, J.P.M. WIELDERS<sup>8</sup>  
*Laboratory of Clinical Chemistry and Hematology<sup>1</sup>, VieCuri Medical Center, Venlo, General Clinical Laboratory<sup>2</sup>, IJsselland Hospital, Capelle a/d IJssel, Medial Diagnostic Centers<sup>3</sup>, Hoofddorp, Department of Clinical Chemistry<sup>4</sup>, Endocrine Laboratory, VU University Medical Center, Amsterdam, Department of Clinical Chemistry<sup>5</sup>, Reinier de Graaf Groep, Delft, Department of Clinical Chemistry<sup>6</sup>, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam, Department of Clinical Chemistry<sup>7</sup>, Canisius Wilhelmina Hospital, Nijmegen, Department of Clinical Chemistry<sup>8</sup>, Meander Medical Center<sup>8</sup> Amersfoort*

**Introduction:** Measurement of 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) in serum is generally considered a reliable indicator of vitamin D status. There has been an increase in diversity of 25(OH)D assays over the last few years prompting us to evaluate the performance of new and established methods. For this, current commercially available assays were compared with two different ID-LC-MS/MS methods using patient samples, DEQAS samples and SRM 972.

**Methods:** Blood was drawn at one site from random outpatients (N=60) after informed consent. DEQAS samples (N=6) were obtained from the scheme organiser and SRM 972 (N=4) was bought from NIST. Sample aliquots were prepared, frozen and transported to participating centers. Method comparison was performed according to CLSI EP9 specifications. Evaluated assays were chromatographic methods ID-LC-MS/MS (two different methods, in-house) and ClinRep HPLC (Recipe), a protein binding method COBAS 25(OH)D total (Roche, new) and immunochemical methods COBAS monoclonal 25(OH)

D3 (Roche, no longer on the market), Liaison (Diasorin), RIA (Diasorin), Architect i2000 and i1000 (Abbott), ADVIA Centaur (Siemens) and iSYS (IDS).

**Results:** With these outpatient samples, and in comparison with the ID-LC-MS/MS method, Deming regression parameters slope, intercept and R were found to be within the ranges [0.57-1.07], [-1.7-6.9] and [0.67-0.98], respectively. Chromatographic methods showed complete detection of 25(OH)D2 in DEQAS and SRM samples. However, the protein binding and immunochemical methods could only partially detect this compound. The compound 3-epi-25(OH)D3 was completely detected by chromatographic methods and partially detected by only the protein binding assay.

**Conclusion:** Significant bias exists between LC-MS/MS and many, but not all, other 25(OH)D assays currently on the market tested in this study. Protein binding and immunochemical methods do not (completely) detect 25(OH)D2 and 3-epi-25(OH)D3.

## 28. Multicenter analytical evaluation of the Architect 25-hydroxyvitamin D assay

M.J.W. JANSSEN<sup>1</sup>, C.C. BEKKER<sup>1</sup>, F.A.L. van der HORST<sup>2</sup>, J.S. KAMPHUIS<sup>3</sup>, F.J. LOUPATTY<sup>4</sup>, J.M.W. van den OUWELAND<sup>5</sup>, J.P.M. WIELDERS<sup>6</sup>  
*Laboratory of Clinical Chemistry and Hematology<sup>1</sup>, VieCuri Medical Center, Venlo, Department of Clinical Chemistry<sup>2</sup>, Reinier de Graaf Group, Delft, Department of Clinical Chemistry<sup>3</sup>, Gelre Hospital, Apeldoorn, Department of Clinical Chemistry<sup>4</sup>, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis Amsterdam, Department of Clinical Chemistry<sup>5</sup>, Canisius Wilhelmina Hospital, Nijmegen, Department of Clinical Chemistry<sup>6</sup>, Meander Medical Center Amersfoort*

**Introduction:** Measurement of 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) in serum is the accepted standard procedure to assess vitamin D status. The more laborious chromatographic methods (LC-MS/MS, HPLC) are considered to be the most accurate for determination of 25(OH)D. Automated one-phase immunoassays, on the other hand, are simple high-throughput methods suitable for consolidated chemistry platforms. We examined the performance of the new Architect 25(OH)D immunoassay in a multicenter setting.

**Methods:** CLSI EP5 imprecision was studied at 3 clinical sites with identical sets of 3 reagent lots on Architect i2000 instruments. For this, 10 human serum pools with various 25(OH)D concentrations were prepared. Limit of quantification (LOQ) was determined according to CLSI EP17 protocol and defined as the 25(OH)D concentration at 20%CV. For CLSI EP9 comparison studies blood was drawn at one site from random outpatients (N=60) after informed consent. Sample aliquots were

prepared, frozen and transported to participating centers.

**Results:** Mean (N=9) intracenter intralot imprecision varied from 3.0 to 15.6%CV in the concentration range 16-92 nmol/L. LOQs were determined as 10.8, 11.2 and 13.5 nmol/L for the separate centers. Mean (N=3) intracenter interlot imprecision varied from 5.0 to 22.0%CV. Architect i2000 method comparison studies revealed significant bias with LC-MS/MS (R=0.94, slope 0.87, intercept 6.9), Recipe HPLC (R=0.91, slope 0.78, intercept 7.2) and the Diasorin immunoassay (R=0.97, no significant slope, intercept 6.9), the latter on which clinical decision points have been based. Full resemblance was obtained between Architect i2000 and i1000.

**Conclusion:** The Architect 25(OH)D immunoassay provides a precise and analytically sensitive method for routine measurement of 25(OH)D. Significant bias exists with the established methods.

## 29. Time-dependent degradation of circulating cardiac troponin T after acute myocardial infarction using Roche antibodies

E.P.M. CARDINAELS<sup>1</sup>, A.M.A. MINGELS<sup>1</sup>, F.W. PRINZEN<sup>2</sup>, M.P. van DIEIJEN-VISSER<sup>1</sup>

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

**Introduction:** Cardiac troponin T (cTnT) and I (cTnI) are widely used as the standard biomarkers in the diagnosis of acute myocardial infarction (AMI). However, it is still controversial whether cTnT is susceptible to fragmentation when released into the blood stream. The purpose of this study was therefore to characterize the molecular forms of circulating cTnT, detected by the antibodies of the Roche cTnT immunoassay.

**Methods:** Eighteen AMI patients (ST elevated) undergoing rapid revascularization (10 males, 8 females; age range 44 - 75 years) were included in this study. For all patients, serum samples were drawn at hospital admission and 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 hours after admission. In each sample, cTnT was measured (4th generation Roche immunoassay) and subjected to immunoprecipitation and Western blotting using the same

antibodies as the Roche immunoassay.

**Results:** Intact cTnT (40 kDa) was only observed during the first 4 to 8 hours after admission (n=3). At the peak cTnT concentration (4h-12h), mainly 29 kDa and  $\leq 18$  kDa fragments were found in all patients. Later on (>24 hours after admission), the 29 kDa fragment disappeared and only  $\leq 18$  kDa fragments remained present in the patients sera.

**Conclusion:** In serum of AMI patients, predominantly degradation products of cTnT were detected by the Roche immunoassay. Intact cTnT was only present during the first few hours after infarction. Since different cTnT fragments were found in time, the biphasic release kinetics typically seen in AMI patients is estimated to result from the half-lives of the different cTnT forms present in the circulation.

## 30. Verbetering van de fT4 assay, verbetering voor de patiënt?

M. van ZWAM<sup>1,2</sup>, S.C. ENDENBURG<sup>1</sup>

*Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium<sup>1</sup>, Ziekenhuis Gelderse Vallei, Ede, Laboratorium Klinische Chemie<sup>2</sup>, UMC St Radboud, Nijmegen*

**Inleiding:** In 2009 introduceerde de firma Siemens een vernieuwde fT4 assay voor de Immulite platforms, met als doel 1) een kortere incubatietijd, 2) overeenstemming met de Centaur platforms en 3) de mogelijkheid om zowel serum als heparine plasma te kunnen gebruiken. Sinds de introductie van dit reagens vinden wij echter regelmatig een verhoogde fT4 uitslag bij een normale TSH. Na contact met de aanvrager bleek de patiënt echter vaak geen hyperthyroïdie-klachten te hebben. Dit was reden voor verder onderzoek, omdat interferentie kan optreden bij o.a. (auto)antilichamen, dysalbuminemie en medicatie.

**Methoden:** Analyse van fT4 en TSH vond plaats in serum op de Immulite 2500 (fT4 reagens L5KFT4 en lotnummers 104 en hoger). Eventueel vervolgonderzoek werd verricht op diverse platforms (Cobas 6000 van Roche, Immulite 2000 & ADVIA Centaur & Dimension Vista van Siemens, UniCel DxC 860i van Beckmann). Aanwezigheid van heterofiele antilichamen

werd bepaald met behulp van Heterophilic Blocking Tubes (Scantibodies), en auto-antilichamen tegen thyroxine werden bepaald in het Erasmus MC.

**Resultaat:** Bij een groot aantal patiënten werden normale fT4 waarden gevonden, nadat hetzelfde materiaal geanalyseerd werd op platforms van firma's anders dan Siemens, terwijl dit bij platforms van Siemens variabel was. Indien bepaald konden heterofiele antilichamen niet worden aangetoond. Bij één patiënt werden auto-antilichamen gevonden tegen thyroxine. Deze resultaten waren reden tot het informeren van huisartsen, medisch specialisten en overige aanvragers over mogelijke bepalingproblematiek. Er werd intern een protocol opgesteld en de firma Siemens werd nauw bij dit probleem betrokken.

**Conclusie:** De vernieuwde fT4 assay heeft bij een aantal patiënten tot onjuiste resultaten geleid. Deze resultaten waren bij sommige aanvragers reden voor onterechte behandeling van de patiënt voor hyperthyroïdie.

## 31. Atransferrinemie door aanwezigheid van IgM M-proteïne

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

*Klinisch Chemisch Laboratorium, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen*

**Inleiding:** De aanwezigheid van M-proteïnes kan aanleiding geven tot rapportage van verkeerde waarden van verschillende geautomatiseerde klinische chemische testen (1). Bij een 62-jarige patiënte die poliklinisch werd gezien wegens een normocyttaire anemie vonden we een onwaarschijnlijk laag transferrine van 2  $\mu\text{mol/l}$  (ref. 22-40  $\mu\text{mol/l}$ ), suspect voor storing door een M-proteïne.

**Methoden:** De transferrine werd initieel bepaald met behulp van een immunochemische analyse (Roche, Modular). Vervolgonderzoek vond plaats met PEG-precipitatie, een andere immunochemische analysemethode (Abbott, Architect) en chromatografie. Chromatografisch werd de concentratie transferrine berekend aan de hand van een ijklijn van de carbohydraat deficiënt transferrine (CDT) bepaling. M-proteïne diagnostiek vond plaats met behulp van gel-elektroforese.

**Resultaat:** Na PEG-precipitatie werd een transferrinewaarde van 14  $\mu\text{mol/l}$  gevonden. Immunochemische analyse op een ander platform en CDT-analyse gaven beide 20  $\mu\text{mol/l}$ . Een M-proteïne type IgM werd aangetoond (circa 42 g/l), welke in ver-

band werd gebracht met de fout verlaagde transferrinewaarde. De reactiecurve van de oorspronkelijke transferrinebepaling bleek indicatief voor storing door het optreden van turbiditeit in de vroege reactiefase (1). De lipemische index van het plasma was, in tegenstelling tot andere publicaties, niet afwijkend (L-index 220) (2). Storing van de transferrinebepaling door M-proteïnes is, voor zover ons bekend, niet eerder beschreven in de Nederlandse of Engelse literatuur.

**Conclusie:** Bij een onverwacht lage transferrineconcentratie dient men alert te zijn op mogelijke storing door een M-proteïne.

**Literatuur:**

1. Bakker J et al. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1240-43.
2. Munnix I.C.A. et al. Detection of a monoclonal gammopathy by lipemia-index measurement. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2009; 34: 248-249.

### 32. Analytical evaluation of a new automated protein binding based assay to determine total 25-hydroxyvitamin D concentrations

W.P.J. FRANKEN, J. VINGERHOED, M.M. BUIJS  
*Medial Diagnostic Centers, Hoofddorp, The Netherlands*

*Introduction:* Requests for measuring 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] concentrations have increased enormously in recent years. The determination of 25(OH)D concentrations using the reference method is both time-consuming as well as labour intensive. Therefore automated platforms have been developed for this assay. In this study a new automated protein binding assay (Elecys® Vitamin D (25-OH) total) was evaluated.

*Methods:* Over 400 patient samples and controls have been tested. Within-run and total assay variation were tested according to protocol EP-5A. Functional sensitivity, defined as the lowest analyte concentration that can be measured with a CV < 20%, various reagent lots and different sample types were investigated (serum vs. Li-heparin and K2-EDTA plasma). The assay was compared to another automated 25(OH)D platform (IDS iSYS 25-OHD).

*Results:* Total assay variation was < 13% at 31–87 nmol/L. Functional sensitivity was < 15 nmol/L. There was a good correlation between serum and Li-heparin ( $r = 0.99$ ;  $y = 0.96x + 2.55$ ), as well as between different reagent lots ( $r = 0.99$ ;  $y = 1.04x - 4.18$  and  $r = 0.99$ ;  $y = 1.06x - 3.48$ ). Comparison with IDS iSYS ( $n = 328$ ) yielded acceptable correlation ( $r = 0.91$ ;  $y = 1.07x - 5.50$ ) and clinical equivalence although individual differences were reported. Further analysis with a direct comparison against LC-MS/MS is required, because it is unclear whether the individual differences can be contributed to the new Roche assay or to the IDS-iSYS.

*Conclusion:* The new Elecys® Vitamin D (25-OH) total assay seems to be an adequate alternative to measure 25(OH)D concentrations on a routine basis.

Categorie 1 Analytisch

**Chromatografie: HPLC, GC, CE**

### 33. Assay-specific pitfalls of catecholamine HPLC assays

J.A.P. BONNS<sup>1</sup>, B. HAVEKES<sup>2</sup>, P.G.A. VOLDERS<sup>3</sup>, C. de ZWAAN<sup>3</sup>, I.P. KEMA<sup>4</sup>, W.K.W.H. WODZIG<sup>1</sup>, P.P.C.A. MENHEERE<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Department of Internal Medicine<sup>2</sup>, Division of Endocrinology, Department of Cardiology<sup>3</sup>, Maastricht University Medical Center, Maastricht, Department of Laboratory Medicine<sup>4</sup>, University Medical Center, University of Groningen*

*Introduction:* A 25-year-old woman was admitted to our emergency department with collapse, recurrent chaotic atrial and ventricular arrhythmias, and dilated cardiomyopathy. The arrhythmias were treated with labetalol and metoprolol. Because of the clinical presentation pheochromocytoma-induced tachycardia and cardiomyopathy were suspected. Subsequently, extremely high epinephrine concentrations were measured in blood and urine in support of the suspected diagnosis. However, since metanephrine levels were not elevated and imaging revealed no signs of pheochromocytoma, these inconsistencies lead to a suspicion of false-positive epinephrine levels. The aim was to show that the high epinephrine concentrations originated from labetalol.

*Methods:* A comprehensive experiment was planned to unravel possible influences of labetalol on the epinephrine results. Therefore, the patient was readmitted to the cardiology

medium care unit. During her stay, the only variable that was changed was the dose of labetalol. Blood and twenty-four hour urine samples were collected during all days and were measured using different HPLC methods.

*Results:* Blood epinephrine concentrations were extremely high when the patient was on labetalol. These serum concentrations decreased during labetalol dose reduction and cessation, with an increase upon reintroduction of labetalol. Interestingly, urine samples showed no elevated epinephrine concentrations. Discordant results for the urinary catecholamine analysis with two different HPLC methods were discovered.

*Conclusion:* This case clearly illustrates the potential assay-specific pitfalls and stresses the importance to know the nature of the method used. Clinical chemists and clinicians should be aware of the type of assays used in their laboratory and should take into account their specific characteristics.

### 34. Eiwitelektroforese: vergelijking agarosegelektroforese met de V8 capillaire elektroforese

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

*Inleiding:* Onderzoek naar de aan-/afwezigheid van een M-proteïne via agarosegelektroforese is tijdrovend door het seriematige karakter en de opeenvolging van de uitvoering van eiwitspectrum en immunofixatie. In deze studie is onderzocht of het onderzoek van het eiwitspectrum met capillaire elektroforese een betrouwbaar en sneller alternatief is voor het opsporen/uitsluiten van M-proteïnemie.

*Methode:* Methode: 1010 opeenvolgende patiënten (inclusief 242 bekend met M-proteïne), waarbij diagnostiek voor opsporen en het vervolgen van een M-proteïne was aangevraagd, zijn geïncludeerd. In de serummonsters van deze patiënten is, naast het eiwitspectrum gevolgd door immunofixatie (conform CBO richtlijn; analyse met SPIFE (Helena)), tevens het eiwitspectrum middels capillaire elektroforese met de V8 (Helena; SP-ZOOM programma) uitgevoerd

*Resultaat:* Van de 768 niet-bekende patiënten werd op grond van agarosegelektroforese bij 593 geen vervolgonderzoek nodig geacht. In 78/175 waarbij vervolgonderzoek werd uitgevoerd, werden monoklonale banden aangetoond. Op basis van capillaire elektroforese werd bij 402 geen vervolgonderzoek nodig geacht; waarbij 5 op grond van agarosegelektroforese/immunofixatie monoclonale bandjes (<2 g/l) bevatten. Op grond van capillaire elektroforese werd voor 366 wel vervolgonderzoek nodig geacht; bij 73/366 werden monoklonale banden aangetoond. Van de 242 patiënten bekend met een M-proteïne was deze met agarosegelektroforese/immunofixatie bij 6 niet meer aantoonbaar. Met capillaire elektroforese werd bij 128 patiënten het M-proteïne rechtstreeks aangetoond, bij 110 werd wel en bij 4 geen vervolgonderzoek nodig geacht. De regressiegegevens van de meetbare concentraties M-proteïne

zijn: capillaire elektroforese = 1.09x agarosegelelektroforese - 0.70;  $r = 0.984$ ; bias: 0.13;  $n = 126$ .

**Conclusie:** Met de V8 capillaire elektroforese worden duidelijk logistische voordelen (positieve monsteridentificatie, snel-

lere verwerking, immunoreflex typing, minder personele inzet) geboekt. Dit gaat samen verminderde detectie van M-proteïnes met geringe concentratie.

### 35. Sodium measurements in urine by the patient at home: limitations and perspectives

P.W. SCHENK<sup>1</sup>, T. HOEKSTRA<sup>2</sup>, F.P.H.T.M. ROMIJN<sup>1</sup>, A.M. KOLB<sup>1</sup>, F.W. DEKKER<sup>2</sup>, C.M. COBBAERT<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup> and Department of Clinical Epidemiology<sup>2</sup>, Leiden University Medical Center, The Netherlands*

**Introduction:** In several conditions including diabetes, it has proven useful if patients can monitor specific analytes in a home setting. For hypertensive patients, it might be valuable to self-monitor their sodium intake by assessing sodium excretion in urine.

**Methods:** We aimed to validate a novel system intended for POC sodium measurements between 10 and 400 mmol/L in human urine. This system, consisting of disposable syringes + LabChips and the Medimate Multireader, determines sodium concentrations by moving boundary and capillary zone electrophoresis and conductivity detection. The system was compared to the Roche Modular ISE and IL 943 flame photometer, and precision, linearity and lower limit of quantitation were determined. Ease of use was also evaluated by two experienced laboratory technicians.

**Results:** We compared the Multireader to the ISE and flame photometer for 38 different 24-hour urine specimens (range,

33-195 mmol/L): 7 and 3 results, respectively (>5%), were outside the allowable total error interval (+/- 28.8%), with a negative bias in the lower range (especially below 60 mmol/L). Multireader CVs were 6.6% and 16.4% at a level of 156 and 52 mmol/L sodium, respectively (with CVs in the 1-2% and 0.1-0.2% range for ISE and flame, respectively). Multireader results were nonlinear, especially above 300 mmol/L, and the lower limit of quantitation was >30 mmol/L (with CV=20.5% at 30 mmol/L, as compared to CV=0.4% for flame measurement). Ease of use was considered inadequate due to numerous material limitations.

**Conclusion:** The POC method was clinically not equivalent to ISE (standard laboratory method) and flame photometry (gold standard). Although the novel system obviously holds a promise, its analytical performance and ease of use still have to be improved.

#### Categorie 1 Analytisch

#### Vlamfotometrie, AAS, massaspectrometrie

### 36. Salivary cortisol LC-MS/MS assay for evaluating adrenal response in children with asthma

B.S. van der VEEN<sup>1</sup>, S.M. HEIJSMAN<sup>2</sup>, M. APPELHOF<sup>1</sup>, T. de VRIES<sup>2</sup>, A.W.A KAMPS<sup>2</sup>, A. WOLTHUIS<sup>1</sup>

*Stichting Klinisch Chemisch Laboratorium (KCL) Leeuwarden<sup>1</sup>, The Netherlands, Medical Center Leeuwarden<sup>2</sup>, Department of Pediatrics, Leeuwarden, The Netherlands*

**Introduction:** Measurement of salivary cortisol levels in response to exercise is a patient-friendly method to study the function of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA). Assessment of HPA is of interest in children with asthma using inhalation corticosteroids (ICS). Our objective was to develop and validate a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) salivary cortisol assay for use in research concerning adrenal responses in children treated with ICS.

**Methods:** Saliva was collected with Salivettes and internal standard (cortisol-1,2-d<sub>2</sub>) was added. After dichloromethane extraction and chromatographic separation on a C18-column, detection was done by Electrospray Ionisation and selected reaction monitoring.

**Results:** The method was linear from 0.8 nmol/L (limit of quantitation) to at least 250 nmol/L with intra- and interassay CV's <13.1% at a level of 2.0 nmol/L and <5.4% at 20 nmol/L. For intra- and interassay accuracy, means deviated <10.8% from the target concentration at a level of 2.0 nmol/L and <9.2%

at 20 nmol/L. Recoveries ranged between 100.0 and 115.3%. Method comparison with Roche ECLIA revealed the following correlation: LC-MS/MS = 1.53x ECLIA - 0.42 ( $r^2 = 0.85$ ,  $n = 23$ ). In addition, a small set of samples was analyzed with the LC-MS/MS method of University Medical Center Groningen (UMCG): LC-MS/MS = 1.04x LC-MS/MS (UMCG) + 0.04 ( $r^2 = 1.00$ ,  $n = 9$ ). Salivary cortisol levels measured with our assay before and immediately after a single inhalation of fluticasone-dipropionate (an ICS) were similar ( $8.4 \pm 4.0$  and  $8.7 \pm 4.1$  (mean  $\pm$  sd);  $n = 30$ ). Salivary cortisol levels were increased 15 minutes after exercise in healthy children ( $1.4 \pm 0.3$  vs  $3.4 \pm 2.3$ ;  $n = 9$ ).

**Conclusion:** We developed and validated a salivary cortisol LC-MS/MS assay in which a single inhalation of fluticasone (the most prescribed ICS) did not interfere with the measurement. Therefore, this assay can be used for non-invasive studies of exercise-induced adrenal response in ICS-treated children.

### 37. Fast separation of 25-hydroxyvitamin D3 from 3-epi-25-hydroxy vitamin D3 in human serum by LC-MS/MS; variable 3-epi-25-hydroxyvitamin D3 prevalence in infants, children and adults

J.M.W. van den OUWELAND, A.M. BEIJERS, H. van DAAL

*Department of Clinical Chemistry, Canisius-Wilhelmina Hospital Nijmegen, The Netherlands*

**Introduction:** Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is becoming increasingly popular for the measurement of 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) in human serum. A limitation of most LC-MS/MS methods is that these are likely to overestimate true 25(OH)D concentrations from co-elution of the 3-epi-25(OH)D3 metabolite. We here

describe a modification of an established LC-MS/MS method (Ouweland 2010), that allows fast separation of 25(OH)D3 from 3-epi-25(OH)D3 in human serum. We further investigated the prevalence of the 3-epi-25(OH)D3 metabolite in serum of various age groups.

**Methods:** Major modification of our standard LC-MS/MS

method was the use of a pentafluorophenyl-propyl (PFP) column. 25(OH)D3 concentrations and the relative content of 3-epi-25(OH)D3 were measured in sera from infants (<1 yr of age, n=51), children (1-10 yrs of age, n=74) and adults (>18 yrs of age, n=104).

**Results:** 25(OH)D3 and 3-epi-25(OH)D3 were near base-line separated with elution times of 4.32 and 4.42 min, respectively within a total run time of 6.5 min. We could detect the presence of 3-epi-25(OH)D3 in all sera from infants and children and in 75% of sera from adults. The mean (median; range) percentages were 11.1% (9.3%;2.3-49.2%) in infants, 6.2% (5.7%;2.5-

20.0%) in children and 3.5% (3.1%;<2-10.6%) in adults.

**Conclusion:** The presence of 3-epi-25(OH)D3 in nearly all human sera necessitates the use of an LC-MS/MS method that separates 3-epi-25(OH)D3 from 25(OH)D3 for accurate detection of 25(OH)D3. By using a PFP column, 25(OH)D3 and 3-epi-25(OH)D3 can be separated within 6.5 min, making this method fast and attractive for routine measurement of 25(OH)D in clinical laboratories.

**Literature:** Ouweland et al. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2010, 878:1163.

### 38. A new UPLC-ESI-MS/MS based stable isotope dilution method for the detection and quantification of methotrexate in plasma

E. den BOER<sup>1</sup>, S.G. HEIL<sup>1</sup>, B.D. van ZELST<sup>1</sup>, R. MEESTERS<sup>2</sup>, B.C.P. KOCH<sup>3</sup>, T.M. LUIDER<sup>2</sup>, R. de JONGE<sup>1</sup>  
*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Department of Neurology<sup>2</sup>, Hospital Pharmacy<sup>3</sup>, Erasmus MC, University Medical Centre Rotterdam, the Netherlands*

**Introduction:** High dose methotrexate (MTX) is used in the treatment of proliferative diseases such as acute lymphoblastic leukemia. Therapeutic drug monitoring of plasma methotrexate is important to monitor efficacy and adverse events. We aimed to develop and validate a low-cost, high-specificity mass-spectrometry-based method for the determination of MTX in plasma for patient diagnosis and pharmacokinetic studies.

**Methods:** Samples were analysed by LC-MS/MS using a Waters Symmetry C18 column (2.1 mm x 150 mm, 3.5 µm) with an isocratic mobile phase of 21% methanol and 10 mmol/L ammonium bicarbonate (pH10). Detection was done using a Waters Acquity UPLC coupled to a Waters Quattro Premier XE (Waters Corporation, Etten-Leur, Netherlands). The electrospray (ESI) was operated in the positive ionization mode and the following selected reaction monitoring mass transitions

were used: m/z 455.2>308.2 for MTX and m/z 458.2>308.2 for MTX-d3. The analysis consisted of simple sample preparation and fast, 3 min run time.

**Results:** A linear range of 0-50 µmol/L was obtained (r<sup>2</sup>>0.99). A coefficient of variability (CV) of <6% for intraday and <10% for interday precision was found. Average recovery was 99% with a <6% CV. No significant matrix effects were found. The LLOQ, defined as the lowest concentration where CV<20% and S/N>1:10, was 5 nmol/L. Method comparison with the Abbott AxSym FPIA immunoassay showed excellent agreement (LC-MS/MS=0.98\*FPIA-7.3).

**Conclusion:** we developed a specific and sensitive stable isotope dilution LC-ESI-MS/MS method to monitor MTX levels in plasma within the clinically relevant range. The method can be easily applied in clinical laboratories because it combines simple sample treatment with robust LC-MS/MS.

### 39. Verbeterde Cushing speekseldiagnostiek m.b.v. eigen UPLC-MS/MS methode die onderscheid maakt tussen cortisoN en cortisol

A.K. BOER<sup>1</sup>, D. van de HEUVEL<sup>1</sup>, E. LENTJES<sup>2</sup>  
*Algemeen klinisch laboratorium<sup>1</sup>, Catharina-ziekenhuis, Eindhoven, Lab Klinische Chemie en Haematologie<sup>2</sup>, Universitair Medisch Centrum Utrecht*

**Inleiding:** De afgelopen jaren heeft de middernacht speekselcortisol zijn intrede gedaan in de Cushing-diagnostiek. Veelal betreft het dan een immunologische cortisol-bepaling. Groot nadeel is dat de meeste immunologische cortisol-bepalingen sterk kruisreageren met cortisol-precursors en -metabolieten. Voor cortison bijvoorbeeld kan dit oplopen tot meer dan 31%. Wij hebben een massaspectrometrische bepaling opgezet die zeer specifiek onderscheid maakt tussen cortisol en cortison.

**Methode:** Bijna 300 patiënten waarvoor door de arts een plasmacortisol was aangevraagd, hebben vrijwillig geparticipeerd aan dit onderzoek en hebben gedurende 1 minuut gekauwd op een watje van een Salivette. Daarnaast zijn ruim 50 middernacht-speeksels geanalyseerd met zowel een immunologische als massaspectrometrische techniek. Het speeksel werd met behulp van vloeistof-vloeistof extractie met dichloormethaan gekwantificeerd ten opzichte van een isotoop gelabelde interne standaard op een Waters Acquity UPLC-MS/MS systeem.

**Resultaat:** De opgezette LC-MS/MS methode voor cortisol

en cortisoN is zeer specifiek omdat enerzijds de UPLC de componenten chromatografisch scheidt en anderzijds de MS kijkt naar specifieke massaovergangen. Zonder de chromatografische scheiding zal een natuurlijke isotoop van cortisoN in de massaovergang van cortisol worden meegenomen. Een eerste subset-analyse suggereert dat speekselcortisoN mogelijk ook gebruikt kan worden bij remmings- en stimulatietesten. Bij de middernachtspeeksels differentieert speekselcortisoN beter tussen onbehandelde Cushingpatiënten (n=3) en (maligne) hypertensiepatiënten (n=47) dan speekselcortisoL (zowel immunologisch als met LC-MS/MS bepaald)

**Conclusie:** Non-invasieve speekseldiagnostiek is een belangrijke additionele tool om hypercortisolisme te kunnen diagnosticeren. Hierbij is het wel essentieel om onderscheid te maken tussen speekselcortisol en speekselcortison. Een massaspectrometrische techniek die onderscheid maakt tussen cortisol en cortison is derhalve mogelijk superieur aan de huidige immunologische speeksel-cortisolbepalingen.

#### 40. A new stable isotope dilution LC-ESI-MS/MS method for the quantification of methotrexate polyglutamates in red blood cells

E. den BOER<sup>1</sup>, R. MEESTERS<sup>2</sup>, B. van ZELST<sup>1</sup>, T.M. LUIDER<sup>2</sup>, S.G. HEIL<sup>1</sup>, R. de JONGE<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Department of Neurology<sup>2</sup>, Erasmus MC, University Medical Centre Rotterdam, Rotterdam, the Netherlands*

**Introduction:** The folate antagonist methotrexate (MTX) is the anchor drug in the treatment of rheumatoid arthritis. The therapeutic effects of MTX are attributed to the intracellular levels of MTX, present as polyglutamates (MTXPGn). We developed a new LC-ESI-MS/MS based assay to separately determine MTXPGn in red blood cells (RBC) using stable isotope dilution for the quantification of the MTXPGn.

**Methods:** Samples were analysed by LC-MS/MS using a Waters Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 mm x 100 mm, 1.7 µm) with a 5-100% organic gradient of 10 mmol/L ammonium bicarbonate (pH10) and Methanol. Detection was done using a Waters Acquity UPLC coupled to a Waters Quattro Premier XE with the electrospray operating in the positive ionization mode. The analysis consisted of simple sample preparation and 6 minute run time. Linearity, stability, precision, the lower limit of quantitation

(LLOQ) and recovery were assessed according to FDA guidelines. **Results:** A linear range of 0-250 nmol/L was obtained for all MTXPGn ( $r^2 > 0.99$ ). The coefficient of variation (CV) for all MTXPGn ranged from 1-4% for intraday precision and 6-15% for interday precision. Samples were stable for at least 1 week at 4°C and 1 month at -80°C. For all MTXPGn, recovery ranged from 98-100% and absolute matrix effect ranged from 85-102%, whereas the relative matrix effect ranged from 95-99% for all MTXPGn. The LLOQ, defined as the lowest concentration where CV < 20% and S/N > 1:10, was 1 nmol/L.

**Conclusion:** The LC-ESI-MS/MS method we developed for the measurement of MTXPGn in RBC is both sensitive and precise within the clinically relevant range. The method can be easily applied in clinical laboratories because it combines simple pre-treatment with robust LC-MS/MS.

#### 41. Geautomatiseerde LC-MS/MS bepaling van cortisol en cortison in urine en speeksel zonder analytische interferentie van prednison en prednisolon

W.H.A. de JONG, C.P. van der LEY, I.P. KEMA

*Afdeling Laboratoriumgeneeskunde, Universitair Medisch Centrum Groningen*

**Inleiding:** Een cortisolbepaling in 24-uurs urine of om middernacht in speeksel is de manier om overactiviteit van de bijnierschors als het syndroom van Cushing aan te tonen. Verder is speeksel cortisol een marker voor het monitoren van stressreacties. Het nadeel van immunoassays is kruisreactiviteit met cortison en de farmaca prednisolon en prednison. Ook bij vloeistofchromatografische technieken is het lastig om deze componenten te scheiden van het te bepalen cortisol. Door de chemische en fysische overeenkomsten van de genoemde componenten kan ook massaspectrometrie interferentie vertonen. Met de hier beschreven methode is het mogelijk om de vier componenten juist te kwantificeren in zowel urine, speeksel als liquor.

**Methode:** Online solid-phase extractie (SPE, Spark Holland) werd gekoppeld aan HPLC met isotop dilutie tandem massaspectrometrische detectie (XLC-MS/MS). SPE werd uitgevoerd met Hysphere C18HD cartridges (Spark Holland). Volledige chromatografische scheiding van de vier componenten werd verkregen op een Luna Phenyl-Hexyl Kolom (Phenome-

nex) met detectie volgens positieve electrospray tandem massaspectrometrie (Quattro Premier, Waters) in multiple reaction monitoring.

**Resultaat:** De combinatie van specifieke quantifier en qualifier massaovergangen per component (en hun gedeutereerde interne standaarden) met de chromatografische scheiding, interfereren prednisolon en prednison niet met cortisol. Totale analysetijd (inclusief monstervoorbewerking) bedraagt 10 min met retentietijden van 5,9 (prednisolon), 6,1 (cortisol), 6,4 (prednisolon) en 6,6 minuten (cortison). De kwantificeringslimiet is < 0,1 nmol/l. Totale precisie voor cortisol en cortison in urine en speeksel is op alle concentratieniveaus < 6,5%.

**Conclusie:** Met XLC-MS/MS is het mogelijk geautomatiseerd cortisol en cortison in zowel urine als speeksel volledig te scheiden van de interferenten prednison en prednisolon. Ook in patiënten onder behandeling met dergelijke corticosteroiden kan de werkelijke cortisol en cortison waarde betrouwbaar worden bepaald.

#### 42. Development and validation of a testosterone assay using liquid chromatography tandem mass spectrometry

H.H. van ROSSUM<sup>1</sup>, J.D. FAIX<sup>2</sup>, R. ZHANG SHI<sup>2</sup>

*Clinical Chemistry and Hematology laboratory<sup>1</sup>, Bronovo Hospital, The Hague, Department of Pathology<sup>2</sup>, Stanford University, Palo Alto, CA, USA*

**Introduction:** Measurement of low testosterone concentrations (<2 nmol/L) by immunoassay is associated with poor accuracy and large imprecision. This limits its use in the analysis of pediatric and female samples. In order to overcome the limitations we developed a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MSMS) testosterone assay.

**Methods:** Sample preparation was based on liquid-liquid extraction using tert-butyl methyl ether. After reverse phase chromatography and electrospray ionization (ESI), testosterone was detected and quantified by multiple reaction monitoring (MRM) on an API-5000 instrument (AB Sciex). The transitions monitored were 298.4->97.1 and 298.4->109.1 for testosterone and 292.4->97.0 for d3-testosterone (internal standard). Validation of the assay included reproducibility, lower limit of quantification (LLOQ), linearity, sample stability, accuracy/correlation with reference labs and immunoassay (Centaur),

and assay interference by drugs and structurally related compounds.

**Results:** The total run time of the LC-MSMS method was 5.5 minutes. Total CVs were 5% at 0.47 nmol/L, 3.6% at 3.75 nmol/L and 3% at 7.0 nmol/L. LLOQ was 70 pmol/L, assay linearity was confirmed and serum samples were stable for at least one week after phlebotomy. Adequate correlation ( $r^2=0.94$ ) between Centaur immunoassay and LC-MSMS was established (n=25). The majority of female samples tested were below the immunoassay analytical measurement range, while all were quantifiable using our LC-MSMS assay. No interference was observed for the drugs tested, as well as physiological concentrations of structurally related compounds.

**Conclusion:** A rapid testosterone assay using LC-MSMS was developed that demonstrated adequate analytical properties for measurement of low testosterone concentrations.

## Categorie 1 Analytisch

### Moleculaire biologie

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

E.M. van BEEK<sup>1</sup>, R. VIJZELAAR<sup>2</sup>, A. VERHEUL<sup>1</sup>, W. RIFI<sup>2</sup>, W. KORTLANDT<sup>1</sup>  
*Laboratory of Clinical Chemistry and Hematology<sup>1</sup>, Diakonessenhuis, Utrecht; MRC-Holland BV<sup>2</sup>, Amsterdam*

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

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

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

**Results:** We screened a group of 100 patients, using low, intermediate or high doses of coumarin, for the presence of VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms. We found that particular combinations of genetic variation in VKORC1 and CYP2C9 associate with clinically significant coumarin dose requirements.

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

#### 44. Evaluatie van de Alpha-Globine StripAssay<sup>TM</sup> voor de analyse van 21 alpha-thalassemie puntmutaties en deleties

M. VEUGER<sup>1</sup>, C. VELEMA<sup>1</sup>, A. SPAANS<sup>1</sup>, C. POSTMA<sup>1</sup>, J.L. KERKHOFFS<sup>2</sup>, F. HUDIG<sup>1</sup>  
*Klinisch Chemisch en Hematologisch laboratorium<sup>1</sup>, Afdeling Hematologie<sup>2</sup>, Hagaziekenhuis, Den Haag*

**Inleiding:** In Den Haag, een stad met ca 50% inwoners van buitenlandse afkomst, wordt het aantal dragers van een hemoglobinopathie geschat op 4%. Bij verdenking alpha-thalassemie wordt binnen het Hagaziekenhuis een alpha-3.7 deletie PCR uitgevoerd. Indien de uitslag negatief of homozygoot is, wordt er verdere analyse naar alpha-4.2, -SEA en -MED deleties d.m.v. drie afzonderlijke PCRs uitgevoerd. Indien afwezig dan wordt vervolg onderzoek in het LUMC aangevraagd.

**Methode:** Om alpha-thalassemie onderzoek in het Hagaziekenhuis te verbeteren werd een Alpha-Globin StripAssay<sup>TM</sup> van Vienna Lab geëvalueerd waarbij 21 mutaties/deleties getest worden welke meer dan 90% van de meest relevante alpha-genmutaties behelzen. De stripassay is gebaseerd op een drietal multiplex PCR amplificaties voor de amplificatie van de alpha1 en alpha2 genen alsmede de meest voorkomende alpha gen-deleties. Door gebruik te maken van gebiotinyleerde

primers kunnen de PCR producten geanalyseerd worden door middel van reverse-hybridisatie op strips met allel-specifieke oligonucleotide probes.

**Resultaat:** Voor de evaluatie werden patiëntenmonsters gebruikt met bekende mutaties/deleties en vergeleken met de stripuitslagen. Onder andere konden een heterozygote en homozygote 3.7-deletie, heterozygote 4.2-, MED-, SEA-, en FIL deletie, compound heterozygote 3.7/4.2, 3.7/SEA, 4.2/SEA deletie en alpha2 IVS 1-5nt deletie bevestigd worden op de strip-assay.

**Conclusie:** Er kan gesteld worden dat de Alpha-Globin Strip-Assay een robuuste assay is waarmee op eenvoudige wijze getest kan worden op 21 alpha-gen mutaties/deleties. Nadeel zijn de relatief hoge kosten van de strip en daarom is er besloten om de strip alleen in te zetten indien de alpha-3.7 deletie PCR negatief of homozygoot is.

## Categorie 1 Analytisch

### Overigen

#### 45. Effect van hartfalenmedicatie op de elektrolytenconcentratie na bloedafname

L.H.J. JACOBS<sup>1</sup>, M. van ECK<sup>2</sup>, S.L.M. PETERS<sup>3</sup>, C.J.M. van SCHIJNDEL<sup>1</sup>, P. van 't SANT<sup>1</sup>, M.M.G.J. van BORREN<sup>1</sup>  
*Laboratorium Klinische Chemie en Hematologie<sup>1</sup>, Cardiologie<sup>2</sup>, Jeroen Bosch ziekenhuis, 's-Hertogenbosch, Farmacologie<sup>3</sup>, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam*

**Inleiding:** Bij patiënten met hartfalen (HYHA III-IV) wordt de bloedafname vaak thuis verricht. In deze monsters bleek de kaliumconcentratie soms sterk verhoogd te zijn (>8 mmol/l). Echter op de spoedeisende hulp werden bij deze patiënten normale kaliumwaarden gevonden. De oorzaak van deze kaliumafwijking kon niet worden verklaard aan de hand van preanalytische factoren (tijd tot analyse, temperatuur of hemolyse). Nadere bestudering van deze patiënten leert dat ze vaak een cocktail aan medicijnen, zoals diuretica, inotropica, chronotropa en anti-hypertensiva gebruiken. In deze studie onderzoeken wij eerst de toevoeging van deze medicijnen aan bloedmonsters van "gezonde" poli-patiënten de elektrolytencon-

centratie beïnvloeden, en vervolgens in welke mate de ingenomen medicijnen (in vivo) werkelijk de elektrolytenconcentratie na bloedafname beïnvloeden bij patiënten met hartfalen.

**Methode:** Bloedmonsters van HF patiënten (n=150) worden bewaard bij verschillende temperaturen (4°C, 21°C en 37°C) en op verschillende tijdstippen geanalyseerd op de bloedgasanalyser Rapidlab 1265 (Siemens). Multi-variante analyses worden gebruikt om de invloed van individuele medicijnen op de elektrolytenconcentraties aan te tonen. Plasmaconcentraties van de medicijnen met een significant effect zullen worden bepaald.

**Resultaat:** Bloedmonsters van 'gezonde' poli-patiënten laten bij 4°C een kaliumstijging van 0.14±0.01 mmol/l/uur (n=24)



zien. De kaliumstijging kan oplopen tot 0.5 mmol/l/uur en 1.0 mmol/l/uur respectievelijk na toevoeging van 300 nmol/l ouabaïne (digitalis) of 100 µmol/l furosemide. Valsartan (100µmol/l) bleek geen significante kaliumstijging te geven.

*Conclusie:* Uit deze studie blijkt dat hartfalenmedicatie de elektrolytenconcentratie na bloedafname kan beïnvloeden in “gezonde”poli-patiënten. Of dit ook werkelijk gebeurt bij patiënten met HF zal uit verdere studie moeten blijken.

#### 46. Plasma, de oplossing voor foutieve kreatinewaarden?

A.M.J. KOOIJMAN-BUITING, M. de RUITER-ELKERBOUT, M. van ROOSMALEN, L. de WIDTH, A.M. van DELFT, M. de GRAAF  
*Saltra, Utrecht*

*Inleiding:* Saltra kent reeds jaren problemen met de Jaffé-bepaling uit serum op verschillende routine analysers. Door afwijkende kreatinewaarden (achteraf vals verhoogd ( $\pm 0,06\%$ ); foutieve meetcurve zonder errormelding) werden patiënten onnodig doorgestuurd naar de 2e lijn. Vanwege de problemen is een referentie-bepaling voor kreatinine op de LCMS gezet en zijn verschillende enzymatische kreatinebepalingen met elkaar vergeleken.

*Methode:* De Jaffé-bepaling werd routinematig verricht op de Cobas Integra 800 (Roche), Advia 2400 (Siemens) en AU 2700 (BeckmanCoulter). Enzymatische kreatinebepalingen (Olympus; Sentinel; Diasys; Biomed; Audit) werden op de AU 2700 vergeleken met de Jaffé (Olympus) en de referentietechniek (LCMS). Binnen- en tussenvariatie van controle materiaal en een patiëntenvergelijking werden verricht. Daarna werden twee enzymatische bepalingen (Sentinel en Diasys) op de AU gezet, waarvan alle meetcurven (10.000 resp. 3000) werden bekeken.

*Resultaat:* Alle enzymatische kreatinebepalingen vielen

binnen de gestelde eisen van de firma. De verschillen bij de patiëntenvergelijking blijken gering te zijn. Diasys gaf tot 2x verhoogde uitslagen bij lipemische monsters (meetcurven normaal); 0,1% van de meetcurven bij Sentinel waren slecht, echter uitslagen kwamen overeen met Jaffé. Pogingen om de enzymatische bepaling softwarematig aan te passen komen niet van de grond.

*Conclusie:* De Jaffé-kreatinebepaling uit serum geeft met enige regelmaat foutieve uitslagen. Hierop heeft Saltra enzymatische kreatinebepalingen van verschillende firma uitgetest. Alle firma's m.u.v Diasys geven dezelfde resultaten als de Jaffé. De slechte plots (0,1%) van Sentinel hebben geen invloed op de uitslagen daar de meetpunten buiten het storingsgebied vallen. Om beter in de regio te kunnen aansluiten is Saltra tijdens de testfase overgegaan op Li-heparine. Toeval of niet, maar in deze periode nu reeds 3 maanden is geen enkele meetcurve meer foutief. Saltra heeft daarop besloten de Jaffé-bepaling te continueren, maar dan in heparineplasma.

Categorie 2 Bedrijfsvoering

#### Dienstverlening, doorlooptijden, workflowanalyse

#### 47. Website reflecterend testen voor de eerste lijn

W.P.H.G. VERBOEKET - van de VENNE, H.H.B. MUYRERS, J.H.C.M. PANTUS, H.A. KLEINVELD, W.P. OOSTERHUIS  
*Afdeling Klinische Chemie en Hematologie, Atrium Medisch Centrum Parkstad, Heerlen*

*Inleiding:* Laboratoriumonderzoek wordt in de eerste lijn veelal toegepast om patiënten met bekende aandoeningen te monitoren. Een tweede toepassing betreft diagnostiek, waarbij vaker ziekten worden uitgesloten dan aangetoond. In de eerstelijnsgezondheidszorg is de differentiaaldiagnose meestal weinig specifiek en wordt er vaak screenend laboratoriumonderzoek ingezet. In dergelijke gevallen kunnen - onverwachte - afwijkingen in de laboratoriumuitslagen gevonden worden die kunnen duiden op bepaalde pathologie. Aanvullend laboratoriumonderzoek kan dan een diagnose vaak bevestigen of uitsluiten.

*Methode:* Voor de herkenning en interpretatie van afwijkende (patronen van) uitslagen kan het laboratorium - als onderdeel van de consultverlening aan huisartsen - met reflecterend testen behulpzaam zijn. De laboratoriumspecialist interpreteert hierbij afwijkende uitslagen en beoordeelt of aanvullende testen nodig zijn. Meestal wordt de rapportage voorzien van commentaar. De gelanceerde website [www.reflectivetesting.com](http://www.reflectivetesting.com) geeft gedetailleerde informatie over deze vorm van consultver-

lening voor de eerste lijn.

*Resultaat:* Reflecterend testen werd door ons laboratorium geïntroduceerd bij 155 huisartsen in de regio Oostelijk Zuid-Limburg in juni 2006. In 2010 is de website verschenen in het Nederlands. De website kan op verschillende manieren gebruikt worden: zoeken naar een specifieke laboratoriumtest, of zoeken naar een specifieke aandoening/ziekte. Vervolgens wordt informatie gegeven over mogelijk vervolgonderzoek, onderbouwing (indien mogelijk volgens evidence based richtlijnen), mogelijke commentaarteksten om het rapport te completeren en een begeleidend voorbeeld. De website is nu ook beschikbaar in het Engels; in de toekomst zal de website nog vertaald worden in het Spaans.

*Conclusie:* De website is een geavanceerd, nuttig, en bruikbaar hulpmiddel voor laboratoriumspecialisten om de procedure van reflecterend testen in de eerste lijn te kunnen introduceren c.q. uit te voeren. De consultfunctie van de laboratoriumspecialist kan middels deze werkwijze verder versterkt worden.

#### 48. Poliflow: een elektronisch oproepsysteem voor een optimale regulatie van de patiëntenstroom

J.E. KOOTSTRA-ROS, E. ALBERTS, K. KOOI  
*Afdeling Laboratoriumgeneeskunde, Universitair Medisch Centrum Groningen*

*Inleiding:* Sinds 2009 wordt bij de polikliniek bloedafname in het UMCG gebruik gemaakt van een zelfontwikkeld elektronisch oproepsysteem genaamd poliflow. Met behulp van dit systeem wordt een duidelijk en actueel overzicht gegeven van het aantal bemande prikplekken, de bezetting hiervan en de eventuele wachttijd voor patiënten.

*Methode:* Patiënten melden zich bij de baliemedewerker. Aan de hand van het actuele poliflow overzicht worden patiënten naar een vrije prikcabine, of (indien nodig) naar de wachtkamer verwezen. Hierbij wordt vanzelfsprekend rekening gehouden met cito aanvragen. Vanuit de wachtkamer worden patiënten door middel van een televisiescherm opgeroepen. De

medewerkers kunnen vanuit de prikcabines en pauzeruimte zelf zien hoeveel patiënten er nog wachten. Hierdoor kunnen zij zelf hun pauzes inplannen op de meest geschikte momenten. Poliflow kan tevens worden gebruikt om achteraf analyses uit te voeren van de wachttijden gedurende de dag. Met behulp van deze gegevens wordt de inzet van medewerkers op de prikpoli geoptimaliseerd.

**Resultaat:** In de periode 01-07-2011 tot 15-12-2011 zijn gemiddeld 422 patiënten per werkdag geprikt, met een minimum van 279 en een maximum van 590 patiënten per dag. 85% van de patiënten is binnen vijf minuten geholpen (gemiddelde wacht-

tijd 1:18 minuten), 12,5% binnen vijf tot tien minuten (gemiddelde wachttijd 6:50 minuten) en de resterende 2,5% moet meer dan 10 minuten wachten (gemiddelde wachttijd 12:46 minuten). Gedurende de dag zijn gemiddeld 9,6 medewerkers aanwezig voor de daadwerkelijke bloedafname, met een minimum van 2 op rustige en een maximum van 12 op drukke dagdelen.

**Conclusie:** Poliflow wordt succesvol gebruikt om de inzet van prikpoli medewerkers te optimaliseren. Daarnaast stelt poliflow de polimedewerkers in staat om minimale wachttijden voor patiënten te realiseren.

## Categorie 2 Bedrijfsvoering

### Point-of-care testing

#### 49. Evaluation of feasibility aspects of point of care creatinine testing in ambulatory elderly: a pilot study in community pharmacy

A.F.J. GEERTS<sup>1</sup>, G.H.P. de KONING<sup>1</sup>, K.M.K. de VOOGH<sup>2</sup>, A.C.G. EGBERTS<sup>1,3</sup>, P.A.G.M. de SMET<sup>4,5</sup>, W.W. van SOLINGE<sup>1,2</sup>

*Division of Pharmacoepidemiology and Clinical Pharmacology<sup>1</sup>, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Faculty of Science, Utrecht University; Department of Clinical Chemistry and Haematology<sup>2</sup>, Department of Clinical Pharmacy<sup>3</sup>, University Medical Center Utrecht; Departments of Clinical Pharmacy and IQ Healthcare<sup>4</sup>, Radboud University Medical Centre, Nijmegen; Scientific Institute Dutch Pharmacists<sup>5</sup>, The Hague*

**Introduction:** The prevalence of impaired renal function in the Netherlands is high. In patients with impaired renal function it is necessary to adjust drug therapy to prevent medication errors. Without adjustment adverse drug reactions can become manifest. Adherence to laboratory monitoring recommendations varies from 28-75% and could be improved by computerized tools and collaboration among health care professionals. However, in most community pharmacies, actual laboratory test results are not real-time available. In this pilot study feasibility aspects of Point of Care Testing (POCT) of creatinine were evaluated in community pharmacy in ambulatory elderly at risk for impaired renal function.

**Methods:** Patients of 70 years or older on maintenance therapy for renally cleared drugs for diabetes or cardiovascular diseases were eligible for POCT of creatinine. After consent, testing was performed by well-trained pharmacy employees.

A pharmacist assessed the clinical relevance of electronically generated drug alerts based on the actual kidney function and gave a therapeutic advice to the physician if applicable. Feasibility aspects were evaluated with a questionnaire for patients, physicians and pharmacy employees.

**Results:** Kidney function was unknown in 149 (39%) of the eligible patients. 54 patients (36%) gave consent for POCT of whom 46 (31%) visited the pharmacy in the study period and underwent POCT. By use of POCT, monitoring of creatinine improved with 12% and 5 (11.0%) patients had impaired renal function. Evaluation of the questionnaires showed that POCT was feasible for each of the stakeholders.

**Conclusion:** The use of POCT can improve creatinine monitoring by 12% in patients at risk for impaired renal function. It is a feasible technique in community pharmacy for patients, physicians and pharmacists.

#### 50. Performance of five different C-reactive protein point-of-care tests compared to a laboratory reference standard

M. MINNAARD<sup>1</sup>, A.C. van de POL<sup>1</sup>, J. de GROOT<sup>1</sup>, S. van DELFT<sup>2</sup>, R. HOPSTAKEN<sup>2</sup>, T.J.M. VERHEIJ<sup>1</sup>, N.J. de WIT<sup>1</sup>  
*Julius Center for Health Research and Primary Care<sup>1</sup>, University Medical Center Utrecht, The Netherlands, Department of Clinical Chemistry<sup>2</sup>, General Practitioners Laboratory, Salto, Utrecht, The Netherlands*

**Introduction:** Rapid testing for C-reactive protein (CRP) in primary care practices leads to improved diagnosis of lower respiratory tract infections and decreases unnecessary antibiotic prescription. Several CRP point-of-care (POC) tests are currently available. Before implementation agreement with the laboratory reference standard needs to be tested. Also, user-friendliness of the CRP assay is an important issue in daily practice. This study aims to compare the analytical performance and user-friendliness of five CRP POC tests for implementation in primary care practice.

**Methods:** All five currently available POC tests were evaluated. The diagnostic agreement between the various CRP POC tests and the laboratory reference standard (Olympus AU2700) was assessed using Bland-Altman plots. The user-friendliness of the various CRP POC tests is evaluated by General Practitioners (GPs) and GP assistants using a questionnaire combining available objective information about the devices with

more subjective information.

**Results:** All POC tests, apart from the Eurolyser smart, show good agreement with the laboratory standard at low CRP values. However, with increasing CRP values the diagnostic agreement with the standard decreases for all POC tests. In these high CRP regions, Afinion shows a consistent overestimation of CRP values, both Nycocard and QuikRead Go show a consistent underestimation of CRP values. Eurolyser shows both an overestimation and an underestimation of CRP values. In our study Afinion, QuikRead Go and Eurolyser were regarded as most user-friendly assays.

**Conclusion:** The Afinion, QuikRead Go, QuikRead 101 and Nycocard tests showed sufficient agreement with the laboratory standard. Based on our combined findings regarding diagnostic performance and user-friendliness, we recommend Afinion, with in succession QuikRead Go, QuikRead 101 and Nycocard as alternatives for use in General Practice.

## 51. CRP met Point of Care methodes

N. BROUWER, J. van PELT

Laboratorium Klinische Chemie, Medisch Centrum Alkmaar

**Inleiding:** Volgens de NHG standaard Acute hoesten 2011 mag alleen bij gecompliceerde luchtweginfecties antibiotica voorgeschreven worden, vanwege toenemende resistentie voor antibiotica. Een CRP bepaling wordt hierbij als aanvullend onderzoek geadviseerd. Sinds het verschijnen van deze richtlijn, is de vraag naar Point of Care (POCT) CRP testen vanuit de eerste lijn toegenomen. Om de huisarts een weloverwogen keuze te kunnen laten maken hebben wij drie types POCT CRP bepalingen vergeleken met onze laboratorium test voor CRP.

**Methode:** Met 100 EDTA-samples met CRP waarden van 1-200 mg/l is een correlatiestudie uitgevoerd met de Actim (Alere) strips (vingerprik, semikwantitatief), de Eurolyser (Keten4Care, vingerprik, kwantitatief) en de AQT90 (Radiometer, veneuze afname, kwantitatief) in vergelijking tot de Beckman DXC860i CRP bepaling. De AQT90 is getest met een vaste hematocriet (Htc) waarde (0,42 l/l) en met ingebouw-

de Htc-module. Voor de Actim strips is gekeken naar correlatie (4 categorieën), inter-waarnemer variatie en effect van te laat (na 15 min.) aflezen. Met Analyse-it (Excel) is een Passing & Bablok regressie uitgevoerd.

**Resultaat:** Ten opzichte van de Beckman bepaling was de regressie van de Eurolyser  $-3,1 + 1,00x$ . De regressie van de AQT90 was  $-0,1 + 1,21x$  en met Htc module  $4,6 + 1,00x$ . De CRP categorie van de 94 geteste Actim strips verschilde 32x 1 categorie en 1x 2 categorieën. Er is 12x inter-waarnemer variatie waargenomen en 22 strips werden vals-positiever na 15 min. **Conclusie:** De Eurolyser en AQT90 met Htc-module laten een goede correlatie zien met de Beckman CRP analyse en zouden in de huisartspraktijk gebruikt kunnen worden als CRP sneltest. De Actim strips geven een indicatie van het CRP maar zijn minder betrouwbaar om te gebruiken als sneltest in de huisartspraktijk.

## 52. Counting leucocytes in a point of care setting: a comparison to routine hematology analyzers

M. NOORDEGRAAF, P. van 't SANT, J. LEUVENINK

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

**Introduction:** The use of Point of care testing (POCT) in hospitals and physicians' practice is expanding rapidly. Leukocyte count and differentiation is an important tool in diagnosing infections. Recently Hemocue launched a POCT analyzer, to count white blood cells in finger prick blood. Aim of this study was to evaluate its performance compared to routine hematology analyzers.

**Methods:** the Hemocue WBC diff analyzer is able to count and differentiate WBC using a microcuvette. Blood is drawn into the cuvette. In the cuvette red blood cells are lysed and white blood cells are stained. Cells are counted and analyzed by using image analysis. Samples from patients were first counted on routine hematology analyzers Sysmex-Xe and Advia 2120i. Data was compared by using Analyse-it for Excel.

**Results:** We analyzed data on  $n=100$  patients with Sysmex-XE and  $n=68$  patients with Advia2120i. Method comparison according to Passing and Bablok showed good correlation for WBC counts ( $-0,03 + 1,01x$ ), neutrophil counts ( $0,1 + 0,93x$ ) and lymphocyte counts ( $-0,22+0,98x$ ) between WBC diff analyzer and Advia 2120i. Equally good correlation was observed with Sysmex-XE.

**Conclusion:** measurements on a Hemocue WBC diff analyzer correlate well with the Sysmex-XE and Advia2120i. The analyzer could be of use in a POCT setting in a physicians' practice. Therefore we are currently investigating the predictive value of neutrophil lymphocyte count ratio compared to CRP for bacterial infections.

Categorie 2 Bedrijfsvoering

**Kwaliteit, referentiewaarden**

## 53. Structured handoff at shift change in a clinical laboratory

N. de JONGE, B.E.B.P. BALLIEUX, P.W. SCHENK, C.M. COBBAERT

Department of Clinical Chemistry, Leiden University Medical Center, The Netherlands

**Introduction:** The laboratory plays a crucial role in patient safety. Miscommunication during shift handover is a well known risk in other high risk environments. We therefore developed structured handoff procedure.

**Methods:** We implemented a structured handoff for the clinical chemist on call. The handoff is based on best practices in other high risk environments, such as air traffic control and off shore oil (Patterson et al., 2004; Parke & Mishkin, 2005; Grimm, 2011) and includes clear responsibilities and the use of a checklist.

**Results:** The use of structured checklist resulted in a continuous and thorough overview of clinical chemist on call of the status of all relevant aspects of the laboratory.

**Conclusion:** The structured handoff resulted in several improvements: shorter duration and less escalation of technical, IT and analytical quality issues, improved service towards clinicians and contribution to continuous education.

**Literature:** Patterson ES, et al. Int J Qual health Care 2004; 16: 125-32. Parke B and Mishkin A. Proceedings of the International Association for the Advancement of Space Safety Conference sponsored by ESA, NASA, and JAXA, Nice, France, 25-27 October, 2005. Forsman RW. Why is the laboratory an afterthought for managed care organizations? Clin Chem 1996; 42: 813-6. Patterson ES, et al. Handoff strategies in settings with high consequences for failure: lessons for health care operations. Int J Qual health Care 2004; 16: 125-32. Parke B and Mishkin A. Best Practices in Shift Handover Communication: Mars Exploration Rover Surface Operations. Proceedings of the International Association for the Advancement of Space Safety Conference sponsored by ESA, NASA, and JAXA, Nice, France, 25-27 October, 2005. Grimm E. Shift-to-shift communication - What can labs learn from NASA and other highly reliable organization? Clinical Laboratory News 2011.

## 54. Invloed van centrifugatie condities op stolling-en chemie bepalingen

M. NOORDEGRAAF, M.A. KARIMAN, E. SAMUELS, R.M.J. HOEDEMAKERS

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

*Inleiding:* Op ons laboratorium is recent een volledig geautomatiseerde labstraat voor routine bepalingen geïnstalleerd. Voor het waarborgen van een goede doorlooptijd is het wenselijk om één centrifugeprogramma te gebruiken voor het afdraaien van buizen ten behoeve van stolling-en chemiebepalingen.

*Methode:* Bij 77 klinische patiënten werden 2 citraat-en 2 heparinebuizen bloed afgenomen. Buizen werden afgedraaid met de centrifugatie-tijd en snelheid, die tot dan toe werd gebruikt voor stolling (8 minuten, 3300g) of chemie (10 minuten, 1300g) of met de voor de labstraat gewenste universele centrifugetijd-en kracht (8 minuten, 3000g). Het trombocytenaantal in de citraatbuis werd gemeten met behulp van de Sysmex XE-2100. K en LD werd bepaald uit de heparinebuis met behulp van de Dimension Vista 1500 (Siemens).

*Resultaat:* Te hoge trombocytenaantallen kunnen storen op stollingsbepalingen. Volgens (inter)nationale richtlijnen moet

het trombocytenaantal  $<10 \times 10^9/l$  zijn. Na afdraaien met een snelheid van 3000g wordt deze richtlijn gehaald (gemiddeld trombocytenaantal 6,5; SE 0,56; 95% CI 5,4 tot 7,6). Daarnaast bevestigen wij recent onderzoek, waarin wordt gesteld dat hogere centrifugetemperatuur een positief effect heeft op trombocytenaantal: wij vinden een gemiddeld trombocytenaantal van 3,2 (SE 0,5) bij afdraaien bij 15°C en een aantal van 2,1 (SE 0,7) bij 22°C. Te hard afdraaien leidt tot destructie van erythrocyten (hemolyse) in heparinebuizen. Methodevergelijking volgens Passing en Bablok laat geen significante verschillen zien voor LD ( $y = 1,051x + 4,1216$ ) en Kalium ( $y = 1,0435x - 0,1261$ ) tussen beide methoden.

*Conclusie:* Ten behoeve van de doorlooptijd van een volledig geautomatiseerde labstraat is het mogelijk om één centrifugeprogramma te gebruiken, zonder dat dit ten koste gaat van de kwaliteit van stolling-en chemie bepalingen.

## 55. Undetected discrepancies between pO2 and sO2 values in arterial blood gases; know your QC material

M.W.M. SCHELLINGS, P.H.M. KUIJPER, D.L. BAKKEREN

Klinisch Laboratorium, Máxima Medisch Centrum, Veldhoven

*Introduction:* Our ICU detected discrepancies between pO2 and related sO2 levels, the latter being too high for the related pO2.

*Methods:* 14 arterial samples were compared on our ABL800-flex blood gas analyzers (ABL1 and ABL2).

*Results:* Mean pO2 was comparable, however, our ABL2 reported higher sO2 values (ABL1  $92 \pm 6.2\%$  vs. ABL2  $95 \pm 4.3\%$ , paired t-test:  $P < 0.01$ ). This prompted us to review our Radiometer Worldwide Data Check (WDC) scores, which showed no abnormalities. Unfortunately, the discrepancy was not noted in the final authorization step, probably due to a combination of VALAB settings and unawareness of this problem by the clinical chemist, since the QC reports were normal. Radiometer replaced the ABL2 hemolyzer unit. The cause was a defect in the hemolyzer unit cuvette, leading to defective flow-through of the washing solution. A new comparison revealed

no differences in pH, pO2 and sO2. However, timely detection of similar problems in the future still was not guaranteed. Interestingly, re-analysis of ABL2 QC showed 5 outliers in the last 70 data points before hemolyzer replacement. The outliers were noted by our technicians that time, and QC was repeated on ABL2, which produced normal results. Since no cause was found, daily laboratory practice continued unchanged, until the remark from our ICU. The degree of falsely elevated results is minor in the normal range of arterial samples as these are situated on the oxygen-hemoglobin-dissociation plateau.

*Conclusion:* This report indicates that outliers in Radiometer QC material already may reveal blood gas analyzer dysfunction, although most QC results are within the normal range. Therefore, analysis of individual QC results is necessary to control blood gas analyzer function, and is preferable over the WDC reports.

### Categorie 2 Bedrijfsvoering

#### Automatisering, dataverwerking

## 56. Digitaal logboek – Papierloze registratie van onderhoud, lotnummers reagentia, storingen en overdrachten

M. van der HORST, R.H.J. BRUIJNS

Klinisch Chemisch Laboratorium, Scheper Ziekenhuis, Emmen

*Inleiding:* Laboratoria hebben een veelheid aan te registreren lotnummers, uitgevoerd onderhoud en storingen. Vaak bestaat er ook een systeem voor overdracht van werkzaamheden. Moderne analyseapparatuur voorziet voor een deel in opslag van deze registraties. Er blijft echter een groot deel over dat niet geautomatiseerd wordt opgeslagen. Registratie vindt dan 'op papier' plaats. De nadelen daarvan zijn o.a.: een slechte inzichtelijkheid en geen waarschuwingfuncties.

*Methode:* Het KCL van het Scheper Ziekenhuis heeft een database ontwikkeld die de registratie van vier zaken bijhoudt: onderhoud, lotnummers, storingen en overdracht. Op basis van login wordt onderscheid gemaakt tussen databaseadministrators, beheerders en gebruikers met elk hun eigen rechten/mogelijkheden. De database is ontwikkeld m.b.v. VBA-tools in MS-Access en is gedistribueerd als runtime versie door een logonprocessor. Er bestaat een zgn. frontend en een backend zodat meerdere gebruikers gelijktijdig toegang hebben tot de database. De frontend staat lokaal geïnstalleerd en de backend

bevindt zich op een shared netwerkschijf.

*Resultaat:* Het ontwikkelde elektronische logboek maakt melding van uit te voeren onderhoud. In gebruik zijnde reagentia die de expiratedatum zijn overschreden worden gemeld. Registratie van storingen met de bijbehorende oplossingen zijn goed inzichtelijk. Het programma geeft medewerkers en de leiding eenvoudig inzicht in uitgevoerd onderhoud en behandelde storingen. Eenvoudig is te traceren welke lotnummers gedurende een periode in gebruik zijn geweest. De elektronische overdracht wordt door medewerkers als plezierig ervaren door de grote beschikbaarheid. De meeste registratieformulieren konden worden afgeschaft.

*Conclusie:* Het ontwikkelde elektronisch logboek is een duidelijke kwaliteitsverbetering ten opzichte van de 'manuele' situatie. Voor zowel leidinggevend als medewerkers is er sprake van een transparanter beeld van de vier genoemde items. T.a.v. het kwaliteitshandboek kunnen we spreken van een duidelijk voorbeeld van 'documinderen'.

## 57. Digitale microscopie (DM96): Multi-locatie toegankelijkheid in een real-time setting

S.M. SMITS, A. MEEUES-van BAKEL, J.N.M. van LEEUWEN, W.H.E NIJKAMP-VERSTEEG, E.H. SLAATS, A. LEYTE

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

**Inleiding:** Het geautomatiseerde digitale morfologie systeem Cellavision DM96 (Sysmex) biedt een betrouwbare en snelle morfologische analyse van perifeer bloed en draagt bij aan de kwaliteitsverbetering (Ceelie et al., 2007). Hier beschrijven we de netwerkconstructie van het hemocytometrie/ hematomorfologie systeem voor drie samenwerkende (hematologisch) klinisch chemische laboratoria in het Onze Lieve Vrouwe Gasthuis (OLVG), Flevoziekenhuis en MC-Zuiderzee.

**Methode:** Bij de implementatie van het DM96-systeem is een bestaande constructie waarbij data wordt uitgewisseld tussen de drie ziekenhuizen middels 100 Mb verbindingen uitgebouwd. Een DM96-server is geïnstalleerd binnen een VM-Ware omgeving in het OLVG. In zowel het OLVG als het Flevoziekenhuis is een DM96-analyser verbonden met de DM96-server, die toegankelijk is vanaf de drie laboratoria voor inzage en validatie. Het OLVG en Flevoziekenhuis maken hiervoor gebruik van DM96-cliënt software. MC-Zuiderzee, kan via de Remote Review Software (RRS) toegang krijgen tot de DM96-database voor beoordeling van preparaten die zijn ingescand

op de andere laboratoria. Bovendien zal met RRS de DM96-database ook toegankelijk zijn vanuit een externe locatie.

**Resultaat:** Met de introductie van het DM96-systeem kunnen (historische) data worden geraadpleegd vanuit een centrale digitale archiefdatabase op iedere locatie en op ieder willekeurig tijdstip. Hierdoor zijn patiëntenresultaten veel toegankelijker geworden, en kan real-time ondersteuning door een specialist plaatsvinden. Interessante gedigitaliseerde beelden kunnen locatie-overstijgend worden gebruikt voor onderwijsdoeleinden en als testcases in de Competency Software om de onderlinge verschillen tussen gebruikers te monitoren.

**Conclusie:** De multi-locatie toegankelijkheid van het DM96-systeem in een real-time setting heeft de workflow efficiënter gemaakt en de kwaliteit van de morfologische analyse van perifeer bloed verder verbeterd. Uiteindelijk heeft dit geleid tot een gestandaardiseerde microscopische differentiatie over de drie laboratoria.

*Literatuur:* Ceelie et al. J Clin Pathol 2007; 60:72.

## Categorie 2 Bedrijfsvoering

### Overigen

## 58. Preanalytical variability and its impact on clinical laboratory processes and hospital costs

J.E. KOOTSTRA-ROS<sup>1</sup>, S. CHURCH<sup>2</sup>, E. ALBERTS<sup>1</sup>, K. KOOP<sup>1</sup>

*Department of Laboratory Medicine<sup>1</sup>, University Medical Center Groningen, The Netherlands, Preanalytical Systems<sup>2</sup>, BD Diagnostics, Oxford, UK*

**Introduction:** It has been established that the preanalytical phase accounts for the largest proportion errors in the laboratory testing cycle. This can lead to increased costs through the need to redraw and retest samples, delays in patient management and the potential for inappropriate patient treatment.

**Methods:** At the University Medical Center Groningen a BD Laboratory Consulting Services engagement was implemented in order to better understand the impact of these errors. The engagement comprised a review of the preanalytical phase on four different hospital wards to identify procedures/practices that could either impact sample quality, and therefore test results, or patient or health care worker safety. A further element was to investigate the potential costs of preanalytical errors in order to determine opportunities for targeted investment, for example training.

**Results:** Many of the procedures and practices observed such

as patient identification, sharps' disposal, use of safety devices and centrifugation were performed in accordance with recommendations, guidelines or best practice. 2.2% of the tubes had labelling issues, such as incorrect, unreadable or wrongly positioned barcode labels. 99% of the tubes were not mixed at all or not mixed according to manufacturer's recommendations. 0.4% of the samples were rejected, most common reasons for specimen rejection were underfilled tube and insufficient sample. Using the data from the engagement a model was developed to estimate the financial impact of the errors. It was estimated that the total cost of specimen rejection for hospitalised patients is €192.453 at UMCG.

**Conclusion:** This approach of identifying specific errors in the preanalytical phase and the costs involved, helps to optimise procedures and processes, leading to more reliable laboratory results and ultimately cost reduction.

## 59. Vitamine B-12 deficiënties: meer diagnostiek of meer suppleren?

L.H.J. JACOBS<sup>1</sup>, L.M.G. STEUTEN<sup>2</sup>, P. van 't SANT<sup>1</sup>, G.C.M. KUSTERS<sup>1,2</sup>

*Laboratorium Klinische Chemie en Hematologie<sup>1</sup>, Jeroen Bosch ziekenhuis, 's-Hertogenbosch, Department Health Technology and Services Research (HTSR)<sup>2</sup>, Universiteit Twente, Enschede*

**Inleiding:** Een veelgebruikt stroomdiagram voor de analyse van vitamine B-12 deficiënties adviseert om bij waarden <100 pmol/l te suppleren en bij waarden > 200 pmol/l geen verdere actie te ondernemen. Bij B-12 concentraties tussen de 100 en 200 pmol/l is het advies om een functionele deficiëntie op te sporen met behulp van methylmalonzuur (MMA). Preliminair onderzoek laat zien dat maar zo'n 30% van alle patiënten met B-12 tussen de 100 en 200 pmol/l verhoogde MMA concentraties heeft. De diagnostiek voorkomt hiermee onnodig suppleren, maar is relatief duur. In dit onderzoek voeren wij een kostenminimalisatie studie uit van een aantal mogelijke ma-

nieren om B-12 deficiënties te diagnosticeren en te behandelen.

**Methode:** Bij patiënten met B-12 >100 en <200 pmol/l nemen we de volgende opties: 1) analyseren van functionele deficiënties m.b.v. MMA en vervolgens bij deficiënties oraal (hoog gedoseerd) of intramusculair suppleren. 2) Standaard B-12 suppleren in orale of intramusculaire vorm. Bij alle opties wordt na 6 maanden het B-12 gehalte bepaald om het effect van suppleren te onderzoeken. Kosten die worden meegenomen zijn directe kosten voor de gezondheidszorg (kosten MMA en B-12 bepalingen, kosten B-12 ampullen incl. opslag apotheek, kosten huisarts), en directe kosten voor de patiënt bij orale suppletie.

**Resultaat:** De gemiddelde verwachte kosten per patiënt per jaar voor MMA testen gevolgd door oraal of intramusculair suppleren zijn respectievelijk €140,99 en €159,98. Standaard B12 suppleren kost €79,02 voor oraal vs. €138,86 voor intramusculair.

**Conclusie:** Bij patiënten met B-12 concentraties >100 pmol/l en <200 pmol/l blijkt direct oraal suppleren de goedkoopste optie. Gezien de relatieve onbekendheid van behandelaars met oraal suppleren is het aanbevolen om na 6 maanden de effectiviteit van het suppleren te onderzoeken.

### Categorie 3 Klinisch

#### Bloedvorming, bloedstolling, transfusie

##### 60. Sunitinib associated pseudothrombocytopenia: a cause of erroneous platelet transfusion

A. ALBERSEN<sup>1</sup>, L. PORCELIJN<sup>2</sup>, J. SCHILDERS<sup>3</sup>, P. HAMBERG<sup>3</sup>, T. NJO<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry and Hematology<sup>1</sup>, Department of Internal Medicine<sup>3</sup>, Sint Franciscus Gasthuis, Rotterdam, The Netherlands, Sanquin Diagnostics Services<sup>2</sup>, Amsterdam, The Netherlands*

**Introduction:** Pseudothrombocytopenia (PTCP) is an in vitro anticoagulant-induced agglutination of platelets by auto-anti-platelet antibodies. This occurs commonly, not exclusively, in EDTA anti-coagulated blood whereby the target antigen is the platelet membrane glycoprotein (GP) IIb/IIIa complex.

**Methods:** A 63-year old male patient with metastatic renal cell carcinoma undergoing sunitinib treatment was admitted with fatigue and nausea. No bleeding symptoms were observed. Platelet counts in EDTA- and citrate anticoagulated blood samples were  $19 \times 10^9/L$  and  $8 \times 10^9/L$ , respectively. Due to the apparent thrombocytopenia the patient received platelet concentrates.

**Results:** In vitro platelet clumping was most abundant in citrate- ( $11 \times 10^9/L$ ) followed by EDTA- ( $15 \times 10^9/L$ ) and heparin ( $114 \times 10^9/L$ ) anticoagulated blood samples. This effect was partially reversible after placing blood samples at 37 °C. No clumping was observed in blood smears obtained directly from capillary blood samples, substantiating an in vitro phenomenon. Pre-supplementation with amikacin in citrate-,

EDTA- and heparin vacutainers did not reduce in vitro platelet agglutination. Blood collection at 37 °C diminished, but did not eliminate, in-vitro agglutination in all three anticoagulants. The indirect platelet immunofluorescence test (iPIFT) revealed strong platelet reactive IgM antibodies whereas the monoclonal antibody specific immobilisation of platelet antigens (MAIPA, IgM conjugate) was negative for the GPIIb/IIIa, -Ib/IX and -V. An iPIFT with Glanzmann (GPIIb/IIIa negative) donor platelets also showed positive IgM antibody reactions, confirming the negative GPIIb/IIIa MAIPA. Sixteen days after discontinuing sunitinib, no PTCP and no platelet reactive antibodies could be detected.

**Conclusion:** We report a rare case of sudden onset of PTCP associated with sunitinib use. The IgM auto-antibodies responsible for in vitro agglutination are multi anticoagulant-dependent but temperature- and amikacin independent. Remarkably, they demonstrated specificity to platelet antigens other than GPIIb/IIIa, -Ib/IX and -V.

### Categorie 3 Klinisch

#### Gynaecologie/obstetrie

##### 61. Actief en totaal vitamine B12 in het eerste trimester van de zwangerschap

H. RUSSCHER, J. LINDEMANS, S.G. HEIL

*Afdeling Klinische Chemie, Erasmus Universitair Medisch Centrum, Rotterdam*

**Inleiding:** Vanwege een toenemend verbruik, maar ook een veranderende water-, zout- en hormoonhuishouding dalen de concentraties van totaal vitamine B12 tijdens de zwangerschap. Vitamine B12 is in het eerste trimester essentieel voor de organogenese en deficiënties zijn geassocieerd met neurale buisdefecten, pre-eclampsie en intra-uteriene groeivertraging.

**Resultaat:** Referentiewaarden voor totaal vitamine B12 in zwangeren (73-411 pmol/l) zijn twee keer zo laag als de concentraties in gezonde niet-zwangere vrouwen (145-637 pmol/l), terwijl die van actief vitamine B12 ( $19-93$  pmol/l) tussen beide

populaties niet verschillen (niet zwangeren: 21-117 pmol/l). In het eerste trimester (<18 weken) zijn zowel actief B12 als totaal vitamine B12 negatief gecorreleerd met de zwangerschapsduur (Pearson correlatie respectievelijk -0,086 ( $p < 0,001$ ) en -0,082 ( $P < 0,001$ )). Deze lichte daling is voor beide parameters gelijk.

**Conclusie:** De daling van totaal vitamine B12 tijdens de zwangerschap lijkt niet veroorzaakt te worden door een daling van actief vitamine B12. Waarschijnlijk worden de lagere totaal vitamine B12 concentraties veroorzaakt door een afname van het vitamine B12 bindende eiwit haptocorrine. Vitamine B12 dat gebonden is aan haptocorrine is fysiologisch niet actief. Het actief vitamine B12 lijkt daarom tijdens de zwangerschap een betere merker om een vitamine-B12 deficiëntie aan te tonen dan totaal vitamine B12.

### Categorie 3 Klinisch

#### Hart- en vaatziekten, atherosclerose

##### 62. Do serial c troponin T levels in serum of patients with first ST-elevation myocardial infarction correlate with infarct size?

C. COBBAERT<sup>1</sup>, M. BOOTSMA<sup>2</sup>, H. BODEN<sup>2</sup>, T.A.N. AHMED<sup>2</sup>, A. van der LAARSE<sup>2</sup>, F. ROMIJN<sup>1</sup>, M.J. SCHALIJ<sup>2</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup> and Department of Cardiology<sup>2</sup>, LUMC, Leiden*

**Introduction:** Guidelines advocate the use of troponin assays for detection of AMI (1). However, whether serial troponin T

(hs-cTnT) assay results are a surrogate measure of infarct size is not yet known.

**Methods:** Serial cTnT values up to 24h, and serial CK activities up to 48h were determined in 158 consecutive patients (61±12 y, 76% men) who underwent primary PCI for first STEMI. Cumulative releases (Q) of CK and cTnT in the first 24 and 48 h (only CK) per L of serum were calculated. Q48(CK) has proven to correlate well with infarct size.

**Results:** In a multivariate regression model to predict Q48(CK) log(hs-cTnT) values were far the best predictors. hs-cTnT24 correlate with Q48(CK) ( $r=0.704$ ), which increased to 0.813 if only 75 patients with time-to-peak (TTP) CK <12 h were selected. If, just like CK, all cellular cTnT would be liberated by the infarcted cardiomyocyte, the g-eq-Q24(CK)/ g-eq-Q24 (hs-cTnT) should be 1.0, but we calculated a ratio  $11.9\pm 2.08$ . This ratio differed between 75 patients with successful reper-

fusion (TTP CK<12h) and 73 patients with slow or incomplete reperfusion (TTP CK  $\geq 12$ h), being  $8.53\pm 0.39$  and  $15.3\pm 2.89$ , respectively ( $p=0.02$ ).

**Conclusion:** The cTnT value at 24h is an independent predictor of infarct size but reveals a suboptimal correlation with infarct size due to variable release of cTnT from the infarcted cardiomyocyte (11.7% in patients with successful reperfusion and 6.5% in patients with slow or incomplete reperfusion). The variability of cTnT release reduces the value of serial hs-cTnT levels as surrogate measure of infarct size.

**Literature:** (1) Thygesen et al. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007; 28: 2525-2538.

### 63. Relations of saturated fatty acids (SAFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) in erythrocytes (RBC) and serum cholesterol esters (CE) with total cholesterol (TC), LDLC, HDLC and the TC/HDLC ratio in a study population with different ethnicities and diets

B. RUIZ-NÚÑEZ, D.J. de GRAAF, R.S. KUIPERS, M.F. LUXWOLDA, D.A.J. DIJCK-BROUWER, F.A.J. MUSKIET  
*Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen (UMCG), The Netherlands*

**Introduction:** Dietary fatty acid (FA) intakes relate to serum lipids/lipoprotein-cholesterol (i.e. TC, LDLC, HDLC and TC/HDLC). TC/HDLC is the SCORE coronary artery disease (CAD) risk factor. FA intakes are reflected in the status parameters CE-FA and RBC-FA. However, serum lipid/lipoprotein-cholesterol may not be independent CAD risk factors, but rather proxies of chronic systemic low grade inflammation.

**Methods:** We investigated relationships between SAFA and PUFA in CE and RBC with lipids/lipoprotein-cholesterol in healthy subjects, differing in ethnicity and diet, i.e. Chole, Maasai-Ruvu, Maasai-Wasso, Sengerema, Hadzabe (Tanzania) and Dutch. CE-FA and RBC-FA were analyzed with gas chromatography, lipids/lipoprotein-cholesterol using Roche Modular.

**Results:** The TC/HDLC medians for Chole, Maasai-Ruvu, Maasai-Wasso, Sengerema, Hadzabe and Dutch were: 4.1; 3.3; 4.2; 3.6; 3.2; and 3.3 mol/mol, respectively. We found consistent positive ('unfavorable') relations between 14:0, 16:0 and SAFA

in CE and RBC with TC, LDLC and TC/HDLC, and inverse ('unfavorable') relations with HDLC. Consistent inverse ('favorable') correlations were found for 18:2 $\omega$ 6, 18:3 $\omega$ 3, 20:5 $\omega$ 3 and PUFA. The relations were subject to large inter-individual variations. As derived from TC/HDLC, the extremes for CE-16:0, CE-14:0, RBC-14:0, CE-SAFA, RBC-SAFA, CE-18:2 $\omega$ 6, RBC-18:2 $\omega$ 6, CE-PUFA and RBC-PUFA corresponded with 75, 75, 50, 80, 50, 53, 53, 53 and 75% CAD risk differences, respectively.

**Conclusion:** The status parameters CE-FA and RBC-FA correlate with serum lipids/lipoprotein-cholesterol similar to dietary intakes. In the entire group, the largest differences in CAD risk are conveyed by CE-SAFA, CE-16:0, CE-14:0 and RBC-PUFA. Our data also suggest that people of Chole and the Maasai-Wasso have the highest CAD risk, while the Dutch have the lowest. This is, however, highly counterintuitive and probably indicates that these associations do not really reflect causality with CAD risk.

### 64. Reproducibility of cardiac troponin T elevations in endurance athletes during standardized exercise trials

L.J.J. KLINKENBERG<sup>1</sup>, P.T. RES<sup>2</sup>, L.J.C. van LOON<sup>2</sup>, M.P. van DIEIJEN-VISSER<sup>1</sup>, S.J.R. MEEEX<sup>1</sup>  
*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Maastricht University Medical Center (MUMC,) the Netherlands, Department of Human Movement Sciences<sup>2</sup>, School for Nutrition, Toxicology and Metabolism (NUTRIM), Maastricht, the Netherlands*

**Introduction:** Cardiac troponins (cTn) are the biochemical gold standard to diagnose acute myocardial infarction. Elevated cTn levels, however, are not restricted to acute coronary syndrome, but also frequently observed in healthy individuals during and after prolonged exercise. To better understand, and further characterize the exercise cTn profile, it is important to determine whether an individual cTn elevation is a reproducible phenomenon, or merely a sporadic observation. This study examined the reproducibility and predisposing factors of exercise-induced cardiac troponin T (cTnT) elevations in a standardized laboratory-based setting.

**Methods:** Thirty-one male endurance-trained competitive cyclists completed two identical standardized exercise trials on a cycle ergometer, at one week interval. High-sensitivity cTnT concentrations were examined before, during, and immediately after exercise.

**Results:** cTnT concentrations were above the limit of detection (3.0 ng/L) in 53% and 61% of cyclists before trial 1 and 2, respectively, and in 77% of cyclists immediately after exercise in both trials. Median cTnT post-exercise concentrations were significantly increased from baseline in both trials (3.5 ng/L and 3.3 ng/L before to 5.6 ng/L and 5.4 ng/L, post-trial 1 and 2, respectively, both  $p < 0.001$ ) and were strongly correlated ( $r = 0.73$ ,  $p < 0.001$ ). 79% of the total variation in post-exercise cTnT concentrations could be explained by baseline cTnT levels ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** Exercise-induced cTnT release is a reproducible phenomenon of which the magnitude is strongly dependent on basal cTnT levels. Basic research focused on the mechanism of cTn release may aid in the debate whether exercise-troponin elevations are benign or rather a reflection of cardiovascular risk.

## 65. High-sensitivity cardiac troponin T: risk stratification tool in patients with stable chest-pain

A.M.A. MINGELS<sup>1</sup>, I.A.P.G. JOOSEN<sup>2</sup>, M.O. VERSTEYLEN<sup>2</sup>, E.M. LAUFER<sup>2</sup>, M.H.M. WINKENS<sup>2</sup>, J.E. WILDBERGER<sup>3</sup>, M.P. van DIEIJEN-VISSER<sup>1</sup>, L. HOFSTRA<sup>4</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Department of Cardiology<sup>2</sup>, Cardiovascular Research Institute Maastricht, Department of Radiology<sup>3</sup>, Maastricht University Medical Center (MUMC), the Netherlands. Cardiology Center Netherlands<sup>4</sup>, Utrecht, the Netherlands*

**Introduction:** Recent studies have demonstrated the association between increased concentrations of high-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT) and the incidence of myocardial infarction, heart failure, and mortality. However, most prognostic studies to date focus on the value of hs-cTnT in the elderly or general population. The value of hs-cTnT in symptomatic patients visiting the outpatient department remains unclear.

**Methods:** We studied 1,088 patients (follow-up 2.2±0.8 years) with stable chest-pain who underwent coronary calcium scoring and coronary computed tomography. Traditional cardiovascular risk factors and concentrations of hs-cTnT, N-terminal pro-brain-type natriuretic peptide (NT-proBNP) and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) were assessed. Study endpoint was the occurrence of late revascularization (>90 days), acute coronary syndrome, and cardiac mortality.

**Results:** A total of 42 patients suffered from a cardiac event. Hs-cTnT was a significant predictor for the composite end-

point (highest quartile Q4 >6.7 ng/L, HR 3.55, 95%CI 1.88-6.70, P<0.001). Survival analysis showed that hs-cTnT had significant predictive value when corrected for traditional risk factors, also when these were combined in the Framingham algorithm (Chi-square change P<0.05). To further illustrate, in patients with hs-cTnT in Q4 versus <Q4, a more than 3-fold increase in cardiovascular risk was noticed when corrected for Framingham risk score (HR 3.11, P=0.001). This was noticed to a lesser extent when hs-cTnT was corrected for coronary calcium scoring or CT angiography assessment (hs-cTnT Q4, HR 2.73 and 2.47, respectively; both P=0.007). This was not the case for hsCRP and NT-proBNP.

**Conclusion:** Hs-cTnT is a useful prognostic biomarker in patients with stable chest-pain visiting the outpatient department. We show that hs-cTnT is an independent predictor for cardiac events, also when corrected for traditional cardiovascular risk factors.

## 66. Myopathy during statin-therapy in the daily practice of an outpatient cardiology clinic: prevalence, predictors and relation with vitamin D

I.J. RIPHAGEN<sup>1</sup>, E. van der VEER<sup>1</sup>, F.A.J. MUSKIET<sup>1</sup>, M.J.L. de JONGSTE<sup>2</sup>

*Laboratory Medicine<sup>1</sup>, Cardiology, Thoraxcenter<sup>2</sup>, University Medical Center Groningen, The Netherlands*

**Introduction:** The mechanism of statin-related myopathy is unknown, while its prevalence is probably underestimated. An association between statin-related myopathy and vitamin D deficiency has been reported. In this pilot study we assessed the prevalence of myopathy in statin users attending to the outpatient clinic of the Department of Cardiology of a University Hospital from October 2009 to March 2010. We also searched for predictors of myopathy and investigated whether the myopathy was associated with vitamin D deficiency.

**Methods:** Consecutive statin-treated patients completed an assisted structured questionnaire. Serum creatine kinase (CK) and 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) were measured. Patients with rheumatic diseases, muscle diseases, (poly)neuropathy and peripheral arterial disease were excluded from predictor analysis.

**Results:** One-hundred-four statin-treated patients completed the questionnaire. 25(OH)D was measured in 93. Twenty patients with possibly confounding co-morbidities were excluded. Twenty-eight (33.3%) of the remaining 84 reported myopathy, 20 (23.8%) reported myalgia and 5 (6.0%) had myositis. Rhabdomyolysis was not observed. Time spent outdoors during winter (≤ 6 h/week; OR: 10.61; 95% CI: 1.91-58.88), BMI (1.35; 1.07-1.69), total number of prescribed drugs (1.39; 1.05-1.83), consumption of fish (≥1/week; 0.19; 0.04-0.89) and CK (1.02; 1.00-1.03) were predictors of myopathy in multivariate analysis.

**Conclusion:** In the present setting: 1) 1 out of 3 patients reported myopathy, 2) BMI, CK, number of prescribed drugs, time spent outdoors and fish consumption were myopathy predictors, and 3) myopathy and 25(OH)D were unrelated.

## 67. Relation between serum cholesterol ester (CE) and red blood cell (RBC) fatty acids (FA) as parameters of the FA status in a study population differing in ethnicity and diet

B. RUIZ-NÚÑEZ, D.J. de GRAAF, R.S. KUIPERS, M.F. LUXWOLDA, D.A.J. DIJCK-BROUWER, F.A.J. MUSKIET  
*Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen (UMCG), The Netherlands*

**Introduction:** The contents of a FA in CE and RBC (in g/100 g FA; g%) are both parameters of FA status. Whether each of these provides a reliable reflection of FA dietary intakes/de novo FA synthesis under all circumstances is unknown. Also the relative sensitivities of CE-FA and RBC-FA for FA-status assessment are unknown.

**Methods:** Using capillary gas chromatography/flame ionization detection, we measured CE-FA and RBC-FA in various groups: Chole (n=40), Maasai-Ruvu (n=41), Maasai-Wasso (n=63), Sengerema (n=30), Hadzabe (n=15) (all living in Tanzania) and Dutch (n=31). These groups differ in ethnicity and diet. Corresponding FA in RBC and CE were correlated by linear regression analysis. Comparison of the slopes provided a measure of status parameter reliability, while the magnitudes of the slopes were indices of parameter sensitivities.

**Results:** In the entire group each investigated RBC-FA exhibited a significant linear positive relationship with the corre-

sponding CE-FA, except for SAFA. The coefficients of variation, calculated from the slopes of the RBC-FA vs. CE-FA correlations for the various groups decreased in the order LA (linoleic acid)<16:1ω7<EPA (eicosapentaenoic acid)<DHA (docosahexaenoic acid)<14:0<20:3ω9<18:1ω9<AA (arachidonic acid)<18:0<MUFA (mono-unsaturated FA)<ALA (alpha-linolenic acid)<16:0<PUFA (poly-unsaturated FA). For the whole population, the magnitudes of the slopes of the RBC-FA (x-axis) vs. CE-FA correlations increased in the order 18:0<16:0<DHA<20:3ω9<PUFA<MUFA<AA<EPA<18:1ω9<ALA<LA<14:0<16:1ω7.

**Conclusion:** Measurements of LA, 16:1ω7, EPA and DHA in either CE or RBC seem to be reliable reflections of dietary intake and de novo FA synthesis (i.e. 16:1ω7). Measurements of LA and 16:1ω7 in CE provide more sensitive status parameters than measurements in RBC, while measurements of DHA and AA in RBC seem to be more sensitive than in CE.



## 68. What you see is not what you get: cardiac troponin T is completely degraded in serum of AMI patients

A.M.A. MINGELS, T. van ROOIJ, W.K.W.H. WODZIG, M.P. van DIEIJEN-VISSER  
*Department of Clinical Chemistry, Maastricht University Medical Center, the Netherlands*

**Introduction:** Cardiac troponins (cTn) are the recommended biomarkers to diagnose and monitor an acute myocardial infarction (AMI). Recently, Bates et al. reported that the predominant form of circulating cTnT after AMI is intact and free cTnT [1]. They used gel filtration chromatography (GFC) to characterize serum cTnT and cTnI conformation, but assigned elution profiles solely based on the elution characteristics of globular calibration proteins.

**Methods:** Serum samples were obtained from 9 AMI patients at 3 hours (min-max 2-5) and 15 hours (min-max 9-17) post-admission. Samples were fractionated by GFC (Sephacryl-S100) and cTnT and cTnI concentrations were measured using the 4th generation (Roche) and Axsym (Abbott) assays, respectively. Calibration was performed using globular proteins (14-75 kDa), purified cTn T-I-C complex (77 kDa), and free cTnT (35 kDa). Internal serum markers were albumin (68 kDa) and NT-proBNP (approximately 13 kDa). Subsequently, fractions were

subjected to immunoprecipitation, SDS-PAGE, and Western Blot analysis using the commercial Roche cTnT antibodies.

**Results:** GFC elution profiles of purified cTn complex and cTnT showed main cTnT peaks at 40 mL and 44 mL, respectively. Albumin and NT-proBNP consistently eluted at 48 and 60 mL, respectively. In AMI serum 3 and 15 hours after admission, the main cTnT peak eluted at 42 mL and 60 mL, respectively. Western Blot characterized these peaks as 29 kDa and <18 kDa cTnT fragments, respectively.

**Conclusion:** Our extensive calibration and Western Blots show that circulating cTnT in AMI serum is completely degraded. We show that cTnT elutes earlier as might be expected from elution characteristics of globular proteins. Hence, previous results of Bates et al. [1] are clearly misinterpreted.

*Literature:* [1]. Bates et al. Clin Chem 2010;56:952-958.

### Categorie 3 Klinisch

#### Endocrinologie en intermediaire stofwisseling

## 69. Daily serum testosterone during the menstrual cycle by ID-LC-MS/MS

H.N. BUI<sup>1</sup>, P.M. SLUSS<sup>1</sup>, S. BLINCKO<sup>2</sup>, M. BLANKENSTEIN<sup>1</sup>, A.C. HEIJBOER<sup>1</sup>  
*Dept. of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, VU University Medical Center, Amsterdam, Clinical Pathology Core Laboratory<sup>2</sup>, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA*

**Introduction:** Testosterone levels in normally cycling women are generally assumed to be elevated during ovulation. The clinical relevance of changing testosterone levels during the menstrual cycle, however, is unclear, due to poor performance of current direct immunoassays for testosterone at low concentrations.

**Methods:** To address this issue, an isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (ID-LC-MS/MS) method with sufficient reliability and sensitivity(1) was used to measure testosterone in serum samples obtained daily during the menstrual cycles of 25 healthy women, characterized by biochemical and physical examination. Since ID-LC-MS/MS is not accessible to all clinical laboratories, we also evaluated the performance of a next-generation direct immunoassay.

**Results:** Performance of the ID-LC-MS/MS method was comparable to the reference method(2) (weighted Deming regression analysis  $y=1.007x-0.056\text{nmol/L}$ ;  $r=0.9998$ ). Analysis of the new immunoassay results compared to ID-LC-MS/MS yielded  $y=1.095x+0.104\text{nmol/L}$  ( $r=0.90$ ). Testosterone levels were significantly higher mid-cycle, although a peak was not

discernable in all individuals. Intra-individual variation exceeded the group average in the menstrual cycle; the ratio of extremes (max/min) found in individuals ranged from 1.6-3.7. Apart from a persistent positive bias, the immunoassay measured the same testosterone profiles. The reference interval was 0.30-1.69nmol/L for ID-LC-MS/MS and 0.50-2.00nmol/L for the immunoassay.

**Conclusion:** Our ID-LC-MS/MS method measured low testosterone levels accurately. The new immunoassay had acceptable performance compared to ID-LC-MS/MS across the entire analyte range measured in women. On average, the elevation of testosterone levels during ovulation is statistically significant, although not relevant for clinical practice since the day-to-day variation is higher and independent of menstrual cycle-related changes. In light of the high intra-individual variation, we recommend measuring testosterone on at least 2 independent occasions for diagnostic purposes.

*Literature:* 1. Bui. Ann Clin Biochem 2010. 2.Thienpont. Clin Chem. 2008.

## 70. Determinants of vitamin D status in East-African populations

M.F. LUXWOLDA, R.S. KUIPERS, I.P. KEMA, E. van der VEER, D.A.J. DIJCK-BROUWER, F.A.J. MUSKIET  
*Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen (UMCG), The Netherlands*

**Introduction:** Sufficient vitamin D status may be defined as the evolutionary established circulating 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] matching our Paleolithic genome.

**Methods:** We studied serum 25(OH)D [defined as 25(OH)D2 + 25(OH)D3] and its determinants in 5 East-African ethnical groups across the lifecycle: Maasai (MA) and Hadzabe (HA) with traditional life styles and low fish intakes, and people from Same (SA; intermediate fish), and Sengerema (SE; high fish) and Ukerewe (UK; high fish). Samples derived from non-pregnant adults (MA, HA, SE), pregnant women (MA, SA, SE), mother-infant couples at delivery (UK), infants at delivery and their lactating mothers at 3 days (MA, SA, SE), and lac-

tating mothers at 3 months postpartum (SA, SE). Erythrocyte docosahexaenoic acid (RBC-DHA) was determined as a proxy of fish intake.

**Results:** The mean $\pm$ SD 25(OH)D of non-pregnant adults and cord serum were 106.8 $\pm$ 28.4 and 79.9 $\pm$ 26.4 nmol/L, respectively. Pregnancy, delivery, ethnicity, RBC-DHA and age were determinants of 25(OH)D. 25(OH)D increased slightly with age. Ethnicity related to sunlight exposure. RBC-DHA was positively related to 25(OH)D, notably 25(OH)D2. Pregnant MA (147.7 vs. 118.3) and SE (141.9 vs. 89.0) had higher 25(OH)D than non-pregnant counterparts (MA, SE). Infant 25(OH)D at delivery in UK was about 65% of maternal 25(OH)D.

*Conclusion:* Our ancient 25(OH)D amounted to about 110 nmol/L and sunlight exposure, rather than fish intake, was the principal determinant. The fetoplacental unit was exposed to high 25(OH)D, possibly by maternal vitamin D mobilization

from adipose tissue, reduced insulin sensitivity, trapping by vitamin D binding protein, diminished degradation, or some combination.

## 71. Traditionally living populations in East-Africa have a mean serum 25-hydroxyvitamin D concentration of 115 nmol/L

M.F. LUXWOLDA, R.S. KUIPERS, I.P. KEMA, D.A.J. DIJCK-BROUWER, F.A.J. MUSKIET  
*Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen (UMCG), The Netherlands*

*Introduction:* Cutaneous synthesis by UVB exposure is our principal source of vitamin D. Our current clothing habits and reduced time spent outdoors put us at risk of the many insufficiency diseases that are related to vitamin D's calcemic and non-calcemic functions. Populations with traditional lifestyles with lifelong, year round exposure to tropical sunlight might provide us with information on the optimal vitamin D status from an evolutionary perspective.

*Methods:* We measured the sum of serum 25-hydroxyvitamin D2 and D3 [25(OH)D] concentrations of 35 pastoral Maasai (34±10 years, 43% male) and 25 Hadzabe hunter-gatherers (35±12 years, 84% male) living in Tanzania. They have skin type VI, have a moderate degree of clothing, spend the major part of the day outdoors, but avoid direct exposure to sunlight

when possible. Their 25(OH)D concentrations were measured by LC-MSMS.

*Results:* The mean (range) serum 25(OH)D concentrations of the Maasai and Hadzabe were 119 (58-167) and 109 (71-171) nmol/L, respectively. These concentrations were not related to age, gender or body mass index.

*Conclusion:* People with traditional lifestyles, living in the cradle of mankind, have a mean circulating 25(OH)D concentration of 115 nmol/L. Whether this concentration is optimal under the conditions of the current western lifestyle is uncertain and should as a possible target be investigated with concomitant appreciation of other important factors in calcium homeostasis that we have changed since the agricultural revolution.

## 72. Accuracy of 1st and 2nd generation testosterone assays and improvement through sample extraction

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

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

*Introduction:* Testosterone immunoassays have shown to overestimate testosterone concentrations in the low measuring range. Interference is observed most prominently in samples with low testosterone concentrations, i.e. women, children and hypogonadal men. We studied the accuracy of seven commercially available testosterone immunoassays, including two 2nd generation testosterone assays, and possible improvement through sample extraction, by comparison with isotope dilution liquid chromatography tandem-mass spectrometry (ID-LC-MS/MS).

*Methods:* Testosterone concentrations were measured before and after diethyl ether sample extraction in 68 sera categorized by ID-LC-MS/MS as < 4.0 nmol/L and 48 sera > 4.0 nmol/L. Subsequently, samples were measured by Abbott Architect®i2000 1st (I) and 2nd (II) generation, Beckman Coulter Access®, Siemens ADVIA Centaur®, Siemens Coat-a-Count®, Siemens Immulite® 2000 and the 2nd generation (II) Roche Cobas®.

*Results:* When comparing immunoassays with ID-LC-MS/MS using untreated samples in the measuring range < 4.0 nmol/L, slopes, intercepts and correlation coefficients were found in the range of 0,79-1,79, -0,19-0,75 nmol/L, and 0,59-0,92, respectively. As a result of sample extraction, 6 out of 7 immunoassays showed improved correlation with ID-LC-MS/MS. For untreated samples in the measuring range > 4.0 nmol/L, slopes in the range of 0,73-1,05, intercepts -0,05-1,22 nmol/L and correlation coefficients 0,92-0,99 were found. Sample extraction in this range did not necessarily improve the performance of immunoassays.

*Conclusion:* Immunoassays generally overestimate testosterone concentrations in the low range, however second generation assays show an enhanced performance. As diethyl ether sample extraction significantly improved the accuracy of 6 immunoassays in the low testosterone range, there is still room for improvement.

Categorie 3 Klinisch

**Bloedvorming, bloedstolling, transfusie**

## 73. Severe immune thrombocytopenia after consumption of English walnuts

R. ACHTERBERGH<sup>1</sup>, H.J. VERMEER<sup>1,2</sup>, L. PORCELIJN<sup>3</sup>, W. DEENIK<sup>1</sup>, B.R. CURTIS<sup>4</sup>, R.H. ASTER<sup>4</sup>, K. DAEMEN-GUBBELS<sup>1</sup>

*Department of Internal Medicine<sup>1</sup>, Tergooi Hospitals, Hilversum, The Netherlands, Department of Clinical Chemistry<sup>2</sup>, Albert Schweitzer Hospital, Dordrecht, The Netherlands, Sanquin Blood Supply<sup>3</sup>, Amsterdam, The Netherlands, Platelet & Neutrophil Immunology Lab<sup>4</sup>, BloodCenter of Wisconsin, Milwaukee, USA*

*Introduction:* Many drugs are known that can induce immune thrombocytopenia (IT). Although rarely, also certain foods and herbals have been implicated as triggers for this condition.

However, whether antibodies are responsible is controversial. We studied a 70 year-old man that ingested English walnuts followed by a deep thrombocytopenia. For the first time, we

could identify high-titer IgG antibodies directed against a substance in walnut extract, being also reactive with platelets. This case report will be published in *The Lancet* (in press) (2).

**Methods:** As the patient repeatedly suggested a relation between his illness, purpura and consumption of walnuts, we performed an in hospital walnut provocation challenge.

**Results:** Platelet count before challenge was  $233 \times 10^9/L$ . The patient developed fever ( $38.7^\circ C$ ), haematomas at venapuncture sites, nausea and vomiting starting 4 hours after challenge with 100 grams of walnuts. Importantly, no symptoms of a possible allergic reaction were seen. Platelets drop and the platelet count was  $4 \times 10^9/L$  at 15 hours post challenge. As in previous episodes, after four days the platelet count spontaneously

recovered to normal. Specific IgE levels against tree nuts were measured in his blood but were all normal. Further studies showed a strong IgG response against GPIIb/IIIa on platelets (titer 1:32), only in the presence of a saline extract made from ground English walnuts (*Juglans regia*). Control experiments with normals did not show this phenomenon.

**Conclusion:** This is the first convincing case demonstrating an IgG mediated immune mechanism that cause thrombocytopenia after consumption of walnuts.

**Literature:** 1) Royer et al. *Eur J Haematol* 2010;84:421-429. 2) Achterbergh et al. *Lancet*, in press.

#### **74. The association between clozapine exposure and FL3-fluorescence of neutrophil granulocytes: a potential biomarker for compliance to therapy?**

J.W. DOUMA<sup>1</sup>, I. WILTING<sup>1,2</sup>, M.J. ten BERG<sup>3</sup>, J.H. den BREEIJEN<sup>1,2</sup>, A. HUISMAN<sup>3</sup>, T.C.G. EGBERTS<sup>1,2</sup>, W.W. van SOLINGE<sup>2,3</sup>

*Department of Clinical Pharmacy<sup>1</sup>, UMC Utrecht, Department of Pharmacoepidemiology and Clinical Pharmacology<sup>2</sup>, Faculty of Science, Utrecht University, Department of Clinical Chemistry and Haematology<sup>3</sup>, UMC Utrecht*

**Introduction:** Increased FL3-fluorescence of neutrophil granulocytes measured on a Abbot Cell-Dyn haematology analysers has previously been observed in schizophrenic patients treated with the antipsychotic drug clozapine. This study was aimed to investigate the association between FL3-fluorescence and clozapine use in order to determine whether FL3-fluorescence is a potential biomarker for compliance to treatment with clozapine.

**Methods:** A retrospective cohort study within the Utrecht Patient Oriented Database (UPOD) was conducted. The study cohort comprised all patients of 18 years and older hospitalized at the UMC Utrecht between 2007 and 2010 with a blood cell count, excluding intensive care patients and patients without any registered medication use. The association between clozapine use and FL3-fluorescence of neutrophil granulocytes was determined by calculating the sensitivity and specificity for different cutoff values for the FL3-fluorescence. For 26 in-

dividual patients (10 starters with clozapine, 10 current users and 6 patients discontinuing clozapine) the FL3-fluorescence was followed in time.

**Results:** 38,141 patients were included, of whom 124 (0.33%) were treated with clozapine. Clozapine users had a higher mean FL3-fluorescence (91, sd 12) than non-users (70, sd 4;  $P < 0.01$ ). At a cutoff value of 80 (mean + 3 sd), the specificity was 0.99 and the sensitivity was 0.75. All clozapine users with low FL3-fluorescence had a dosage  $< 50$  mg or were labeled as non-compliant. FL3-fluorescence reached a maximum after 4 weeks of clozapine use. After discontinuation of clozapine the FL3-fluorescence fades within 4 weeks to the original level.

**Conclusion:** Clozapine use in the normal dosage for schizophrenia enhances the FL3-fluorescence of neutrophil granulocytes. The possible use of this finding for monitoring compliance should be investigated further.

#### **75. Allo anti-D antistofvorming na Rhesus-D incompatibele stamceltransplantatie**

M. OOSTENDORP, K.M.K. de VOOGHT

*Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht*

**Inleiding:** ABO-incompatibiliteit bij allogene stamceltransplantatie is van belang bij de bloedgroepbepaling, de selectie van bloedproducten voor transfusie en bij beoordeling van het complicatierisico. Dat incompatibiliteit van andere bloedgroepsystemen tevens van klinisch belang is wordt hierbij aangetoond aan de hand van twee Rhesus-D positieve patiënten, bij wie een allo anti-D antistof werd gevonden na stamceltransplantatie met een Rhesus-D negatieve donor.

**Methode:** Bloedgroeps-serologische bepalingen werden uitgevoerd in de LISS techniek (Ortho) en de albumine techniek.

**Resultaat:** Het betreft twee mannelijke Rhesus-D positieve patiënten van 57 en 55 jaar waarbij een stamceltransplantatie is uitgevoerd met Rhesus-D negatieve donoren ivm een hematologische maligniteit. Conditionering was in beide gevallen niet-myeloablatief. Bij beide patiënten was vanaf respectievelijk 5,5 en 9 maanden post transplantatie een persisterende allo anti-D antistof aantoonbaar. Bij eerder onderzoek tot 2 maanden na transplantatie werden geen irregulaire antistoffen ge-

vonden. Beide patiënten vertonen 100% donorchimerisme en de bloedgroep is in het LIS gewijzigd van Rhesus-D positief naar negatief rond 12 maanden na transplantatie.

**Conclusie:** Bij stamceltransplantatie van Rhesus-D positieve patiënten met Rhesus-D negatieve donoren bestaat het risico op vorming van allo anti-D antistoffen, ondanks het gebruik van immuunsuppressiva. Daarnaast bleken beide patiënten tussen transplantatie en serologische detectie van de anti-D getransfundeerd te zijn met Rhesus-D positieve trombocytenconcentraten (respectievelijk 3 en 8 maal). Naast resterende patiëntenerythrocyten kan ook dit de oorzaak zijn geweest van de Rhesus-D alloimmunisatie. Kennis van het Rhesus-D fenotype, en wellicht ook van andere klinisch belangrijke bloedgroepsystemen, van zowel stamceldonor als patiënt is van belang voor tijdige identificatie van irregulaire antistoffen. Tevens wordt geadviseerd om vanaf de stamceltransplantatie trombocyten-transfusies compatibel met het Rhesus-D fenotype van de stamceldonor te geven.

## 76. Effect of SSRI's on platelet function: citalopram is a more potent platelet function inhibitor than paroxetine

T.C. van HOLTEN<sup>1</sup>, M. ROEST<sup>1</sup>, J. RIPHAGEN<sup>2</sup>, C. JANSEN<sup>3</sup>, P. NAARDING<sup>3</sup>, H.J. ADRIAANSEN<sup>2</sup>, Ph.G. de GROOT<sup>1</sup>, J.A. REMIJN<sup>2</sup>

*Department of Clinical Chemistry and Haematology<sup>1</sup>, University Medical Centre Utrecht, The Netherlands. Department of Clinical Chemistry and Haematology<sup>2</sup>, Gelre Hospitals, Apeldoorn/Zutphen, The Netherlands, GGNet Mental Health<sup>3</sup>, Apeldoorn, The Netherlands*

**Introduction:** Serotonin is a major component of platelet dense-granules and is released upon platelet activation and thereby itself promotes platelet activation. Platelets take up serotonin via serotonin transporters and selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI's) inhibit this uptake, thereby potentially affecting platelet function. Some studies have shown increased risk of bleeding with SSRI's. To investigate the influence of SSRI's on platelet function, we compared the effects of the SSRI's: paroxetine and citalopram, on platelet responsiveness in a case-control study.

**Methods:** Thirteen patients and twenty controls were enrolled in this study. Patients were included at GGNet Mental Health in Apeldoorn. The patients were taking either paroxetine or citalopram on therapeutic basis, but no other anti-depressants or any anti-platelet medication. Blood was collected from patients and healthy volunteers after obtaining informed consent. SSRI's levels and platelet serotonin concentration were determined and to investigate platelet responsiveness we used flow

cytometry and PFA-100 with several platelet agonists.

**Results:** Paroxetine and citalopram levels were on average within the therapeutic range. Platelet responsiveness measured with flow cytometry at different agonist concentrations, showed significantly reduced platelet reactivity by citalopram, while paroxetine did not affect platelet responsiveness. Furthermore, we did not observe any effects of the SSRI's with the PFA-100.

**Conclusion:** Our results show that citalopram inhibits platelet responsiveness as measured with flow cytometry. No effects were observed using PFA-100, therefore we propose that this assay is not sensitive enough to detect any effects of SSRI's on platelet function. The reduced platelet responsiveness in the citalopram-administered patients coincided with reduced serotonin levels. Altogether, our results show that citalopram has a stronger inhibiting effect on platelet responsiveness compared with paroxetine.

## 77. Het belang van erythropoïetine en de JAK2(V617F) mutatie bij Polycythemie Vera (PV)

W. KORTLANDT, A. VERHEUL  
*Diakonessenhuis, Utrecht/Zeist*

**Inleiding:** Bij een gesignaleerde erythrocytose wordt doorgaans de diagnose polycythemie Vera (PV) overwogen. Inmiddels is bekend dat meer dan 90% van de patiënten met PV positief is voor de JAK2(V617F) mutatie. PV is een myeloproliferatieve aandoening met een autonome aanmaak van erythrocyten. In respons zal daarbij doorgaans de erythropoetine (EPO) aanmaak worden onderdrukt. De vraag is in hoeverre de EPO concentratie kan worden gebruikt als eerste parameter in de differentiaaldiagnose voor PV.

**Methode:** Er is onderzoek gedaan bij ruim 200 patiënten waarbij JAK2 werd aangevraagd. De JAK2(V617F) mutatie werd aangetoond met een MPLA methode (MRC-Holland). Fragmentanalyse vond plaats met capillaire electroforesis (Beckman). De Epo concentratie werd bepaald op een Immulite (DPC)

**Resultaat:** Bij 220 patiënten werd 25x een V617F mutatie aangetoond. Van deze groep werden 16 patiënten gediagnostiseerd

als PV. De overige JAK2 positieve patiënten kregen de diagnose ET (essentiele trombocytomie). Van de patiënten met PV hadden 13 patiënten (80%) een EPO waarde  $\leq 2$  IU/l. Andere EPO waarden bedroegen 3, 5 en 6 IU/l. Het Hb van onbehandelde patiënten varieerde tussen de 9,8 en 14,7 mmol/l. Van de JAK2(V617F) negatieve patiënten had één der patiënten een EPO  $< 2$  IU/l en 2% van de patiënten een EPO van 2 IU/l. Eén patiënt met een Hb van 14 mmol/l en een EPO  $< 1$  was JAK2(V617F) negatief maar positief voor een nieuwe mutatie in het JAK2 gen.

**Conclusie:** Bij een vermoeden van PV levert het aantonen van de JAK2(V617F) mutatie de bevestiging. Bij een normaal EPO  $> 5$  IU/l kan in afwezigheid van bloedverlies de differentiaal diagnose PV met zekerheid komen te vervallen. Bij een verlaagd EPO en een zeer hoog Hb dient aan een alternatieve JAK2 mutatie te worden gedacht.

## 78. Ernstige AIHA op basis van anti-I: grote verschillen tussen in vivo en in vitro

K.J.M. BOONEN<sup>1</sup>, T.H.A. KOX<sup>2</sup>, W. PETERS<sup>2</sup>, V. SCHARNHORST<sup>1</sup>.  
*Algemeen Klinisch Laboratorium<sup>1</sup>, Inwendige Geneeskunde<sup>2</sup>, Catharina Ziekenhuis, Eindhoven*

**Inleiding:** Een 80-jarige dame met blanco voorgeschiedenis meldde zich met klachten van oedemateuze enkels bij de huisarts. Deze liet bloedonderzoek verrichten waarin bij toeval een Hb van 4,5 mmol/l werd geconstateerd. De patiënte werd daarop doorverwezen naar de SEH. In de laboratorium-uitslagen bij opname was duidelijk sprake van een hemolytische anemie, en aanvullend onderzoek werd ingezet.

**Methode:** Aanvullend onderzoek: bloeduitstrijk, irregulaire screening, koude agglutinen, cryoglobulinen, PNH-test (flow-cytometrie), uitgebreide IAT.

**Resultaat:** Er werd een positieve IAT gevonden met anti-C3d. De screening op irregulaire antistoffen was positief met een positieve autocontrole. Echter, voorverwarmd in de PEG-techniek was de screening negatief. Koude agglutinen waren positief bij 16 °C, maar niet bij 30 °C en werden geïdentificeerd als kli-

nisch irrelevant. Cryoglobulinen en de PNH-test waren negatief en de microscopische beoordeling van de bloeduitstrijk liet geen afwijkingen zien. Omdat een antistof-specificiteit anti-I werd vermoed, werd serum van de patiënte getest met eigen erythrocyten (I pos, i neg), navelstreng-erythrocyten (I neg, i pos), en donor erythrocyten (I pos, i neg) met dezelfde bloedgroep. Het patiëntenserum agglutineerde niet de navelstreng-erythrocyten, maar wel alle andere erythrocyten. Dit maakte de specificiteit anti-I waarschijnlijk.

**Conclusie:** Opvallend was dat in het lab de antistoffen niet aantoonbaar waren bij kamertemperatuur, terwijl patiënte duidelijk een ernstige hemolytische anemie doormaakte en niet opknapte met 3 weken prednison-behandeling. Als waarschijnlijkheidsdiagnose werd uiteindelijk toch auto-immuun hemolytische anemie op basis van koude antistoffen (anti-I) gesteld.

Volgens literatuur reageert deze vaak niet goed op prednison en kan behandeling met anti-CD20 (Rituximab®) overwogen worden. Deze patiënte is na 3 weken dan ook behandeld met

Rituximab®. Na 4 giften (wekelijks) in combinatie met prednison was patiënte in remissie, wat zij 6 maanden later nog steeds was.

### Categorie 3 Klinisch

#### Lever- en darmpathologie

#### 79. Glucose concentraties gemeten op 30 en 60 minuten na lactose belasting zijn afdoende voor een adequate lactose tolerantie test

H.H. van ROSSUM<sup>1</sup>, A.P. van ROSSUM<sup>1</sup>, E. van GEENEN<sup>2</sup>, A. CASTEL<sup>1</sup>

*Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium<sup>1</sup> en Afdeling Maag-, Darm- en Leverziekten/Interne Geneeskunde<sup>2</sup>, Bronovo Ziekenhuis, Den Haag*

*Inleiding:* De lactose tolerantie test (LTT) wordt uitgevoerd in het kader van de diagnostiek van een lactasedeficiëntie. Ondanks dat deze test al decennia lang wordt gebruikt, is de relevantie van de individuele glucose afnamepunten na lactosebelasting niet eerder onderzocht en daardoor onduidelijk. Omdat de LTT voor zowel de patiënt als het laboratorium een intensieve test is, is gekeken welke glucoseafnames daadwerkelijk noodzakelijk zijn.

*Methode:* Alle LTTs die in Bronovo in de jaren 2006-2010 zijn uitgevoerd werden geïncludeerd. De LTT werd als volgt uitgevoerd; de nuchtere patiënt werd belast met 50 gram lactose. De glucoseconcentraties werden bepaald op 0 (T0), 30 (T30), 60 (T60), 90, 120 en 150 minuten na lactose belasting. Een glucose toename van <1.2 mmol/l ten opzichte van T0 op alle tijdstippen werd beschouwd als een positieve LTT, wijzend op

lactase deficiëntie. De LTT is vervolgens geïnterpreteerd in de afwezigheid van de verschillende afnamepunten en deze resultaten zijn vergeleken met de originele uitslag van de LTT.

*Resultaat:* 446 LTTs werden geïncludeerd. 337 LTTs waren negatief, 106 LTTs waren positief en 3 LTTs werden uitgesloten wegens overgeven na belasting of het ontbreken van T0, T30 of T60. Afwezigheid van glucoseconcentraties gemeten 90, 120 en 150 minuten na belasting veranderde in geen enkel geval de uiteindelijke conclusie. Bij afwezigheid van T30 of T60 zou respectievelijk 45% en 12% van de positieve LTTs, vals positief zijn geweest.

*Conclusie:* Voor een optimale LTT zijn glucosebepalingen na 0, 30 en 60 minuten afdoende. Bij het ontbreken van T30 of T60 met een positief LTT resultaat is het raadzaam de LTT te herhalen wegens het grote risico op een vals positief resultaat.

#### 80. DNA-test is geschikt voor screening naar primaire lactose intolerantie

R. CASTEL, M. van de WERKEN, H.J. VERMEER, F.M. VERHEIJEN

*GKCL, Albert Schweitzerziekenhuis, Dordrecht*

*Inleiding:* Primaire lactose intolerantie komt voor bij twee derde van de wereldbevolking. Bij hen vermindert vanaf het vijfde levensjaar de productie van lactase in de dunne darmwand, en hiermee verliezen zij het vermogen om lactose te kunnen verteren. De meest gangbare test om lactose tolerantie aan te tonen is de H2-ademtest. De H2-ademtest is patiënt-onvriendelijk: de test duurt lang en lactose intolerante patiënten kunnen nog tot lang na de test klinische klachten ondervinden. Er zijn DNA polymorfismen bekend die correleren met primaire lactose intolerantie. Wij hebben een vergelijkende studie uitgevoerd tussen de H2-ademtest en het C≤T-polymorfisme in het MCM6 helicase gen.

*Methode:* Bij 477 patiënten van 15 jaar en ouder is naast een H2-ademtest ook een DNA-test uitgevoerd. Mutatieanalyse is verricht door middel van PCR-sequentie van het met lactose intolerantie geassocieerde -13910 C/T-polymorfisme in het 13de intron van het MCM6 helicase gen. De uitslagen van de H2-ademtest en DNA-test zijn met elkaar vergeleken.

*Resultaat:* Van de in totaal 477 patiënten werd bij 198 (42%) patiënten het genotype T/T vastgesteld. Hiervan hadden 7 (4%) patiënten een positieve H2-ademtest. Bij 193 (40%) patiënten werd het genotype C/T vastgesteld. Hiervan hadden 16 (8%) patiënten een positieve H2-ademtest. Bij 86 (18%) patiënten werd het genotype C/C vastgesteld. Hiervan hadden 79 (92%) patiënten een positieve H2-ademtest.

*Conclusie:* Primaire lactose intolerantie kan met hoge waarschijnlijkheid worden uitgesloten bij het genotype T/T, en met hoge waarschijnlijkheid worden aangetoond bij het genotype C/C. Dit laat zien dat het aantal H2-ademtesten met meer dan de helft kan worden gereduceerd door eerst een DNA-test te verrichten.

*Literatuur:* Waud et al. Ann Clin Biochem. 2008;45:50-58. Campbell et al. Sci Prog. 2005;88(Pt 3):157-202. Haberkorn et al. Clin Chem Lab Med. 2011 Sep 21.

### Categorie 3 Klinisch

#### Nierziekten

#### 81. Nierinsufficiëntie na hart-chirurgie: heeft meten van NGAL zin?

A.J. BAKKER<sup>1</sup>, L. de BOER<sup>1</sup>, H. SYPERDA<sup>1</sup>, M. KOOPMANS<sup>2</sup>, M.A. KUIPER<sup>2</sup>

*St. Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>1</sup>, Leeuwarden, Intensive Care<sup>2</sup>, Medisch Centrum Leeuwarden, Leeuwarden*

*Inleiding:* Voor vroegtijdige herkenning van patienten die nierfunctiestoornissen ontwikkelen wordt het meten van NGAL (Neutrofiel Gelatine-geassocieerd Lipocalin) gesuggereerd. In dit onderzoek is het gebruik van NGAL bekeken bij 192 patiënten die hart-chirurgie hadden ondergaan. Omdat het door de leverancier aanbevolen EDTA plasma om logistieke redenen

minder gewenst is voor de routine chemie analyser, is tevens de geschiktheid van heparine-plasma onderzocht.

*Methode:* Bij 192 opeenvolgende patiënten is NGAL gemeten in EDTA-bloed dat direct na opname op de IC na een hart-operatie is afgenomen en in EDTA-bloed dat de ochtend daaropvolgend is afgenomen. Voor de vergelijking van EDTA-plasma

en Heparineplasma is gelijktijdig afgenomen EDTA-bloed en Heparinebloed van IC- en dialysepatiënten gebruikt. NGAL is gemeten op de modular P analyzer (Roche) met de turbidimetrische kit van Bioporto (ST001RA).

**Resultaat:** De bepaling van NGAL bleek tijdens dit onderzoek goed reproduceerbaar: QC1-gemiddeld:  $195 \pm 6.2 \mu\text{g/l}$ , VC1=3.2%; QC2-gemiddeld:  $491 \pm 13.1 \mu\text{g/l}$ , VC2=2.7%; N=34). Voor de vergelijking tussen EDTA-plasma en Heparineplasma werd een prima correlatie gevonden: Heparine =  $1.01 \times \text{EDTA} + 5.6$ ; bias (heparine-EDTA): 10.4; R: 0.9978. NGAL direct na de hart-operatie gemeten geeft hogere resultaten dan de vol-

gende ochtend ( $178$  vs.  $113 \mu\text{g/l}$ ). Het verschil tussen mannen (gemiddeld:  $207 \mu\text{g/l}$ ) en vrouwen (gemiddeld:  $157 \mu\text{g/l}$ ) is beperkt. Pre-OK is de NGAL hoger als de eGFR afwijkend is (eGFR normaal vs. eGFR afwijkend:  $180$  vs.  $271 \mu\text{g/L}$ ). Een daling van de eGFR  $>20$  ml/min wordt voorafgegaan door een hoger NGAL (delta eGFR  $<20$  ml/min vs. delta eGFR  $>20$  ml/min:  $180$  vs.  $270 \mu\text{g/l}$ ).

**Conclusie:** Voor de bepaling van NGAL is heparineplasma evengoed te gebruiken als EDTA-plasma. NGAL direct na OK gemeten, lijkt geen goede voorspeller van nierfunctiestoornissen in het postoperatieve verloop na een hart-operatie.

## 82. De derdegeneratie-PTH(1-84)-bepaling in dialyse patiënten

M.M.J.F. KOENDERS<sup>1</sup>, F. APPERLOO<sup>2</sup>, R. TRIEPELS<sup>1</sup>

*Klinisch Chemisch Hematologisch Laboratorium en Trombosedienst<sup>1</sup>, Interne Geneeskunde (Nefrologie)<sup>2</sup>, St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg*

**Inleiding:** Recentelijk is de derdegeneratie-PTH(1-84)-immunoassay van Diasorin op de markt gebracht. In tegenstelling tot tweedegeneratie-immunoassays, reageert deze assay niet met inactieve PTH-fragmenten zoals PTH(7-84). Accumulatie van deze inactieve PTH-fragmenten is patiëntafhankelijk en komt met name voor in dialysepatiënten. In deze studie is een uitgebreide klinische correlatiestudie uitgevoerd die als doel heeft inzicht in de klinische outcome van uremische dialysepatiënten te verbeteren.

**Methode:** De patiëntafhankelijke correlatie tussen de Liaison (Diasorin) en Cobas Elecsys e6000 (Roche) is in kaart gebracht voor een populatie dialysepatiënten ( $n = 100$ ). Gedurende 1 jaar is de concentratie PTH in deze patiënten 3-maandelijks gemeten met beide methodes. Verschillen zijn gecorreleerd aan nierfunctie, concentratie fosfaat en therapie.

**Resultaat:** Ondanks een gemiddelde correlatiecoëfficiënt groter dan 0,975 ligt het procentuele meetverschil tussen de

Liaison en de Cobas tussen de -50% en -70%. Dit percentage is patiëntafhankelijk, maar is per patiënt stabiel. Het procentuele meetverschil is niet afhankelijk van de nierfunctie, de concentratie PTH of fosfaat.

**Conclusie:** Door afwezigheid van kruisreactiviteit met PTH-fragmenten resulteert de PTH(1-84)-assay van Diasorin in lagere concentraties PTH. De mate van deze daling varieert per patiënt en resulteert in klinische non-uniformiteit. Omdat de clinicus de concentratie PTH gebruikt voor therapeutische interventie op basis van de NKF (National Kidney Foundation) en K-DOQI (Kidney-Dialysis Outcome Quality Initiative) richtlijnen kan deze variabele bias resulteren in niet adequate behandelplannen. Het is aannemelijk dat invoering van de PTH(1-84)-assay resulteert in een accurate inschatting van de actieve fractie PTH. Echter, of de PTH(1-84)-assay een verbeterde klinische outcome geeft in deze patiënten is tot op heden nog niet bewezen.

Categorie 3 Klinisch

Gynaecologie/obstetrie

## 83. Gestational age dependent changes of the fetal brain, liver and adipose tissue fatty acid compositions in a population with high fish intake

R.S. KUIPERS<sup>1</sup>, M.F. LUXWOLDA<sup>1</sup>, P.J. OFFRINGA<sup>2</sup>, E.R. BOERSMA<sup>3</sup>, D.A.J. DIJCK-BROUWER<sup>1</sup>, F.A.J. MUSKIET<sup>1</sup>  
*Laboratory Medicine<sup>1</sup>, University Medical Center Groningen, The Netherlands; St. Maarten<sup>2</sup>, Netherlands Antilles; Kaapstad<sup>3</sup>, South Africa*

**Introduction:** There are no data on the intrauterine fatty acid (FA) compositions of brain, liver and adipose tissue of infants born to women with high fish intakes.

**Methods:** We analyzed the brain ( $n=18$ ), liver ( $n=14$ ) and adipose tissue ( $n=11$ ) FA compositions of 20 stillborn infants with different gestational ages (range 8-38 weeks) born to Tanzanian women with low linoleic acid (LA) intakes and high intakes of docosahexaenoic (DHA) and arachidonic (AA) acids from local fish.

**Results:** With advancing gestation, brain saturated-FA (SAFA; in g/100 g FA), polyunsaturated-FA (PUFA), DHA, 20:3 $\omega$ 6, 22:4 $\omega$ 6 and 22:5 $\omega$ 6 increased, while monounsaturated-FA (MUFA), 20:3 $\omega$ 9, 22:3 $\omega$ 9 and AA decreased. Decreasing brain AA might be caused by increasing AA-metabolism to 20:3 $\omega$ 6, 22:4 $\omega$ 6 and 22:5 $\omega$ 6. In the liver, SAFA, PUFA and LA

increased, while MUFA decreased with gestation. The steep increase of (mostly de novo synthesized) SAFA in adipose tissue coincided with relative decreases of MUFA, PUFA, DHA, LA and AA with advancing gestation. Compared to Western infants, the currently studied African infants had higher DHA, lower AA, and a higher DHA/AA-ratio in brain and adipose tissue, while the LA content of adipose tissue was lower.

**Conclusion:** The low LA and high DHA and AA intakes by the mothers of these infants might support optimal  $\alpha$ -linolenic (ALA) vs. LA competition for "5D" and "6D"-activities and DHA vs. AA antagonism. Conversely, the Western diet, characterized by high LA and lower DHA and AA intakes, might disturb these evolutionary conserved mechanisms aiming at an optimal  $\omega$ 3/ $\omega$ 6-balance.

#### 84. Gestational age dependent content, composition and intrauterine accretion rates of fatty acids in fetal white adipose tissue

R.S. KUIPERS<sup>1</sup>, M.F. LUXWOLDA<sup>1</sup>, P.J. OFFRINGA<sup>2</sup>, I.A. MARTINI<sup>1</sup>, E.R. BOERSMA<sup>3</sup>, D.A.J. DIJCK-BROUWER<sup>1</sup>, F.A.J. MUSKIET<sup>1</sup>  
*Laboratory Medicine<sup>1</sup>, University Medical Center Groningen, The Netherlands; St. Maarten<sup>2</sup>, Netherlands Antilles; Kaapstad<sup>3</sup>, South Africa*

*Introduction:* Little is known about the gestational age (GA) dependent content, composition and intrauterine accretion rates of fatty acids (FA) in fetal white adipose tissue (WAT).

*Methods:* To acquire this information, we collected abdominal subcutaneous WAT samples from 40 preterm and term fetuses. Their GA ranged from 22 to 43 weeks. FA were expressed as mg/g wet WAT and g/100g FA (g%). Intrauterine WAT FA accretion rates were estimated for appropriate (AGA) and large (LGA) for gestational age infants.

*Results:* From 25 to 40 weeks gestation, saturated-FA (SAFA) increased from 83 to 298 mg/g WAT and monounsaturated-FA (MUFA) from 83 to 226 mg/g WAT, while polyunsaturated-FA (PUFA) increased insignificantly from 18.0 to 23.2 mg/g WAT. As percentages of total FA, SAFA increased from 46 to 55 g%,

MUFA decreased from 44 to 41g%, and PUFA from 10.3 to 4.26 g%. Docosahexaenoic (DHA) and arachidonic acid (AA) accretion rates in WAT during the 3rd trimester for AGA infants were 88 and 193 mg/week, respectively. Contemporaneous DHA and AA accretion rates for 4500 g LGA infants were 184 and 402 mg/week, respectively. Compared to the whole 3rd trimester, increment rates during the last 5 weeks of gestation were about 2-fold higher.

*Conclusion:* FA accretion rates, notably those of DHA and AA, may be important for designing nutritional regimens for preterm infants. The current WAT-DHA and WAT-AA accretion rates are considerably lower than previously reported in the literature.

#### 85. Fetal intrauterine whole body linoleic, arachidonic and docosahexaenoic acid contents and accretion rates

R.S. KUIPERS<sup>1</sup>, M.F. LUXWOLDA<sup>1</sup>, P.J. OFFRINGA<sup>2</sup>, E.R. BOERSMA<sup>3</sup>, D.A.J. DIJCK-BROUWER<sup>1</sup>, F.A.J. MUSKIET<sup>1</sup>  
*Laboratory Medicine<sup>1</sup>, University Medical Center Groningen, The Netherlands; St. Maarten<sup>2</sup>, Netherlands Antilles; Kaapstad<sup>3</sup>, South Africa*

*Introduction:* There is no information on the whole body fatty acid (FA) contents of preterm or term infants, although scattered information on the FA-composition of many organs is available.

*Methods:* We collected data on the weights, lipid contents and FA-compositions of the quantitatively most important fetal organs of appropriate for gestational age (AGA) Western infants. From these we estimated the total body contents of linoleic (LA), arachidonic (AA) and docosahexaenoic (DHA) acids at 25, 35 and 40 weeks of gestation.

*Results:* Western infants accrete FA in the order of LA>AA>DHA at all stages during pregnancy and the highest accretion rates are reached in the last 5 weeks of gestation, i.e. 342 mg LA, 95 mg AA and 42 mg DHA/day. At term, most of

the infant's LA, AA and DHA is located in adipose tissue (68, 44 and 50%, respectively), with substantial amounts of LA also located in skeletal muscle (17%) and skin (13%); of AA in skeletal muscle (40%) and brain (11%); and of DHA in brain (23%) and skeletal muscle (21%). The term AGA infant has accreted about 21 g LA, 7.5 g AA and 3 g DHA, which constitutes a gap of 12 g LA, 3.3 g AA and 1.5 g DHA compared to a 35 weeks old AGA infant.

*Conclusion:* The current fetal LA, AA and DHA pool sizes and accretion rates may especially be useful to estimate the preterm infant's requirements and the maternal LCP needs during pregnancy. Since they derive from populations with typically Western diets they do not necessarily reflect 'optimality' or 'health'.

#### 86. Toegevoegde waarde van de meting van het hemoglobine content van reticulocyten (CHR) en de MCV bij de diagnose van ijzer deficiëntie bij anemische vrouwen post partum

E.M. van WIJK<sup>1</sup>, C. RAMAKERS<sup>1</sup>, D. van der WOUDE<sup>2</sup>, J. VERZIJL<sup>3</sup>, J.M.A. PIJNENBORG<sup>2</sup>  
*KCHL<sup>1</sup>, Elisabeth ziekenhuis, Tilburg, Afd. Gynaecologie<sup>2</sup>, Tilburg, Farmacie<sup>3</sup>, TweeSteden ziekenhuis, Tilburg*

*Inleiding:* Post partum anemie (PPA) treedt frequent op en is een belangrijke risicofactor voor maternale morbiditeit. De in de literatuur genoemde prevalentie van PPA varieert van 22 tot 27%. Anemie wordt gedefinieerd als Hb < 6,5 mmol/l. In deze studie werd het gebruik van de CHR en MCV onderzocht om werkelijk ijzergebrek post partum vast te stellen teneinde onnodige toediening van ijzer preparaten te vermijden.

*Methode:* 300 vrouwen met post partum meer dan 500 ml bloedverlies of klinische tekenen van anemie werden verdeeld in een controle groep (Hb >6,5 mmol/l, n=150) en een anemie groep (Hb < 6,5 mmol/l, n=150). PPA-vrouwen kregen Ferro-Fumaraat gedurende 4 weken. De effectiviteit van de behandeling werd geëvalueerd door Hb, MCV, CHR en ferritine direct post partum (T0) en na 4 weken (T4) te meten. Gebruikmakend van cut-off waarden voor ijzerdeficiëntie van respectievelijk 80 fl (MCV), 1,74 fmol (CHR) en 15 g/l (ferritine) op T0 werd de PPA-

groep voor elk van deze 3 parameters verdeeld in 2 subgroepen, één suggestief voor ijzerdeficiëntie (onder de cut-off), de ander zonder aanwijzing voor ijzerdeficiëntie (boven de cut-off).

*Resultaat:* Onafhankelijk van de parameter of de subgroepindeling toonde de delta-Hb concentratie (T4-T0) een vergelijkbare stijging in alle onderzochte PPA-subgroepen. Alle drie de parameters in de PPA-subgroepen onder hun respectievelijke cut-off waarde toonden een significante verbetering naar normalisatie, terwijl de PPA-subgroepen boven hun respectievelijke cut-off waarden niet verbeterden.

*Conclusie:* De etiologie van de anemie bij PPA vrouwen is niet altijd ijzerdeficiëntie. Door gebruik te maken van Hb, MCV en CHR kan op eenvoudige wijze werkelijk ijzergebrek bij PPA-vrouwen worden vastgesteld, daarbij onnodige ijzer toediening in deze vrouwen met voldoende ijzervoorraad voorkomend.

### 87. Myelin basic protein-containing peripheral blood mononuclear cells as novel biomarker to monitor disease activity in Multiple Sclerosis patients

M.H.J. VOGT<sup>1</sup>, R. DRENT<sup>2</sup>, F.J. HULSMANS<sup>2</sup>, M. LEERS<sup>3</sup>, J. ten KATE<sup>2</sup>, R. HUPPERTS<sup>2</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Laurentius hospital, Roermond; Department of Clinical Chemistry<sup>2</sup>, Orbis Medical Center, Neurology or Radiology, Sittard; Department of Clinical Chemistry<sup>3</sup>, Atrium Medical Center, Heerlen*

**Introduction:** MRI is the predominant technique to diagnose Multiple Sclerosis (MS) as well as to monitor disease progression and disease activity. Biochemical analysis of blood or CSF plays only a minor role in diagnosis and prognosis of MS. Particularly for disease activity monitoring there is an urgent need for a cost-effective assay, which can be performed on a regular basis in easy accessible material. In this study, we evaluated a flow cytometry-based assay that enables the detection of myelin basic protein (MBP)-containing immune cells in blood of MS patients.

**Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from 24 MS patients and 14 healthy controls using Ficoll-Paque. After permeabilization of cells with IntraPrep intracellular MBP was detected with a rat anti-MBP-specific monoclonal antibody and a PE-labelled mouse anti-rat antibody. The percentage of MBP-positive cells was analyzed

by flow cytometry. Results were compared to the number of gadolinium-enhanced MRI lesions (active lesions) as was determined in a subgroup of MS patients.

**Results:** MBP-positive cells were significantly ( $p=0.03$ ) increased in blood of MS patients compared to the healthy controls, in which no MBP-positive cells could be detected. There was a high heterogeneity in percentage of MBP-positive cells within the MS patient group, ranging from undetectable to 1.4% of the PBMC. The percentage of positive cells significantly correlated with the number ( $p=0.006$ ,  $\rho=0.8$ ) and volume ( $p=0.018$ ,  $\rho=0.72$ ) of active MRI lesions.

**Conclusion:** The percentage of MBP-containing cells in blood of MS patients significantly correlated with the number of active MRI lesions in MS patients, indicating that the novel biomarker assay may be used to monitor disease activity in MS patients.

### 88. Optimizing blood pigment analysis in cerebrospinal fluid for diagnosis of subarachnoid haemorrhage – a practical approach

R.J. VERHEUL<sup>1</sup>, I.M.E. ALONS<sup>2</sup>, G.A.E. PONJEE<sup>3</sup>, K. JELLEMA<sup>2</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Department of Neurology<sup>2</sup>, Medisch Centrum Haaglanden The Hague, The Netherlands; LabWest B.V.<sup>3</sup>, The Hague, The Netherlands*

**Introduction:** To rule out a subarachnoid haemorrhage (SAH), after a normal head Computer Tomography (CT) a lumbar puncture is routinely performed. Photospectrometry is used to detect bilirubin in cerebrospinal fluid (CSF). A high sensitivity is reached with CSF analysis but low specificity causes additional research with risk of complications and high costs. Our goal was to investigate practical solutions for improving specificity of CSF research.

**Methods:** Two different CSF interpretation methods were retrospectively evaluated in patients presenting with acute headache and normal CT. The Leiden method is an iterative model using a standard calculation, whereas the English guideline uses the original spectrum in combination with a decision tree.

**Results:** 361 patients were included, 47 had a raised bilirubin concentration using the Leiden method (13%). In 9 patients a

SAH was diagnosed, in the other patients the Leiden test was positive due to other reasons (viral meningitis, hyperbilirubinaemia e.g.). In total 117 most recent spectra could be re-evaluated using the English guideline. Out of the 47 patients with raised bilirubin, 24 were interpreted using the English guideline: 7 were 'consistent with SAH' (6% of all spectra) and 6 of them had a SAH. There were no SAHs diagnosed in patients with a 'negative' Leiden or English method.

**Conclusion:** Our data show that a raised CSF bilirubin concentration calculated using the Leiden method seems to have a lower specificity than the English guideline. True sensitivity and specificity however cannot be calculated due to the lack of a gold standard. For practical reasons it seems advantageous to use the Leiden method as a screening method, and, if a positive result is found, use the English guideline.

### 89. Motor development is positively related to DHA status in breastfed African and Dutch infants

M.F. LUXWOLDA<sup>1</sup>, R.S. KUIPERS<sup>1</sup>, E.R. BOERSMA, S.A. van GOOR<sup>1</sup>, D.A.J. DIJCK-BROUWER<sup>1</sup>, A.F. BOS<sup>2</sup>, F.A.J. MUSKIET<sup>1</sup>

*Laboratory Medicine<sup>1</sup>, Department of Pediatrics<sup>2</sup>, Division of Neonatology, Beatrix Children's hospital, University Medical Center Groningen (UMCG), The Netherlands*

**Introduction:** Docosahexaenoic (DHA) and arachidonic (AA) acids are important for neurodevelopment. We investigated the relation between erythrocyte (RBC) DHA and AA contents and neurological development, by assessment of General Movements (GMs), in populations with substantial differences in fish intakes.

**Methods:** We included 3 months old breastfed infants of 3 Tanzanian tribes; Maasai (low fish  $n=5$ ); Pare (intermediate fish  $n=32$ ); Sengerema (high fish  $n=60$ ) and a Dutch population (low-intermediate fish  $n=15$ ). GMs were assessed by motor op-

timality score (MOS) and the number of observed movement patterns (OMP; a MOS sub score). RBC-DHA and AA contents were determined by capillary gas chromatography.

**Results:** There were no between-population differences in MOS. OMP of Sengerema infants (high fish) was higher than OMP of Dutch infants (low-intermediate fish). OMP related positively to infant age ( $p<0.001$ ) and RBC-DHA ( $p=0.011$ ), and was unrelated to ethnicity and RBC-AA.

**Conclusion:** Movement quality of 3 months old infants is positively related to stable high DHA status.



## 90. No delusions about diluting; 25% hyponatremia in female ravers on ecstasy

G.D. van DIJKEN<sup>1</sup>, R.E. BLOM<sup>1</sup>, K.M.K. de VOOGHT<sup>2</sup>, R.J. HENÉ<sup>3</sup>, W.H. BOER<sup>1</sup>  
*Department of Nephrology<sup>1</sup>, Department of Clinical Chemistry and Haematology<sup>2</sup>, Department of Nephrology<sup>3</sup>, University Medical Center Utrecht, The Netherlands*

**Introduction:** Ecstasy users are under the opinion to drink plenty of fluids to prevent dehydration and hyperthermia. Also, ecstasy is assumed to release ADH (anti-diuretic hormone), which induces hyponatremia. More than 30 cases of symptomatic dilutional hyponatremia related to the use of "ecstasy" have been reported, with high mortality and there are mainly females involved. It is likely that these case reports represent only the tip of the iceberg. Therefore, we decided to study the incidence of hyponatremia in subjects using ecstasy during an indoor rave party.

**Methods:** The study was performed at an indoor techno-event, people of the dancing crowd were asked to participate in this study, a questionnaire was taken and blood was drawn and directly analyzed for sodium and potassium by use of a point of care analyzer (iSTAT, Abbott). The use of ecstasy was confirmed by a urine test.

**Results:** The mean ( $\pm$ SD) plasma sodium concentration (mmol/l) in people using ecstasy is significantly lower ( $137,9 \pm 2,2$ ) than in those not using the drug ( $140,1 \pm 2,0$  p < 0.001). Most cases of hyponatremia occurred in females, in whom the incidence was 26,7% (8/30 females). Fluid intake in ecstasy users is significantly higher (p < 0.01) than in non-users.

**Conclusion:** Of all females using MDMA, approximately 25% developed a mild hyponatremia. They are therefore probably at risk of developing severe symptomatic hyponatremia. Not using ecstasy is obviously the best option to prevent hyponatremia. However, millions of people use the drug every weekend, so strategies should be developed to prevent hyponatremia. Fluid restrictions should be taught to ecstasy users. Health care workers treating ecstasy intoxications, should be aware not to give readily fluids in emergency settings.

## 91. CXCL13 in liquor is een goede biomarker voor neuroborreliose en neurolues

M.M. VERBEEK, A. VERSLEYEN, P. KOOPMANS, L. van der VELDEN, A. WARRIS, F. STELMA  
*Afdelingen Neurologie, Laboratoriumgeneeskunde, Medische Microbiologie, Kindergeneeskunde, Interne Geneeskunde, UMC St. Radboud Nijmegen*

**Inleiding:** Het is vaak lastig de klinische diagnose neuroborreliose of neurolues vast te stellen, met name bij patiënten met specifieke klachten, of - in het geval van neurolues - bij patiënten met HIV infectie. Een goede biomarker voor het aantonen van deze ziektebeelden is van groot belang voor correcte diagnose en behandeling.

**Methode:** We hebben een ELISA ontwikkeld voor de kwantificering van CXCL13 in liquor. Liquor van patiënten met bewezen neuroborreliose of neurolues en met diverse andere neurologische (infectie) ziekten en niet-neurologische controles, werd geanalyseerd met behulp van deze ELISA. Resultaten van het onderzoek worden vergeleken met literatuur.

**Resultaat:** De CXCL13 concentratie in liquor van niet-neuro-

logische controles is < 800 pg/ml. De CXCL13 concentratie is zeer sterk verhoogd in liquor van onbehandelde patiënten met neuroborreliose en neurolues is sterk verhoogd. De CXCL13 concentratie is normaal in liquor van patiënten met diverse andere neurologische (infectie-) ziekten. Behandeling van neuroborreliose patiënten met antibiotica leidt tot een snelle daling van de CXCL13 concentratie. Sensitiviteit en specificiteit van de test is beide > 95%. Literatuurstudie bevestigt deze zeer goede test-karakteristieken.

**Conclusie:** De analyse van CXCL13 in liquor is een uitstekende biomarker voor het aantonen of uitsluiten van neuroborreliose en neurolues.

Categorie 3 Klinisch

Acute zorg, IC, toxicologie

## 92. Disseminated intravascular coagulation in critically ill patients; in vitro functional analysis of related changes in microparticle- induced clot formation

S.V. OUSSOREN<sup>1</sup>, M. van SCHILFGAARDE<sup>1</sup>, P.J. MOLENAAR<sup>1</sup>, R. NIEUWLAND<sup>2</sup>, A. STURK, A. LEYTE<sup>1</sup>, J.P.J. WESTER<sup>3</sup>  
*Departments of Haematology and Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Intensive Care Medicine<sup>3</sup>, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam, Clinical Chemistry<sup>2</sup>, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands*

**Introduction:** Disseminated intravascular coagulation (DIC) often occurs in critically ill patients with sepsis. Coagulation triggers cells to become activated or to undergo apoptosis, resulting in the release of microparticles. Microparticles are vesicles from cell membranes exposing phosphatidylserine, which facilitates thrombin generation and clot formation. To obtain insight in the role of microparticles in the haemostatic balance in DIC due to sepsis, numbers and origin of microparticles, microparticle-mediated thrombin generation and fibrin generation were investigated.

**Methods:** Blood was collected at admission of patients to the intensive care unit and at day seven, when DIC had subsided. Control blood was collected from matched patients at day one in the ICU. Each group contained 10 patients.

**Results:** DIC patients had less microparticles compared to control patients. At the second blood withdrawal, DIC patients still had low numbers of microparticles compared to controls.

Microparticles in DIC patients were of different cellular origin and more often expressed markers related to cellular response to infection than those in control patients. DIC patients showed a significantly less thrombin generation in plasma (p < 0.01), but thrombin generation per microparticle was increased compared to control patients. Microparticle-dependent fibrin generation results revealed an important role of tissue factor-mediated coagulation in DIC patients but not in control patients.

**Conclusion:** DIC patients have lower numbers of circulating microparticles, altered subsets of microparticles, and these microparticles trigger tissue factor-dependent coagulation. In this extreme form of systemic activation of coagulation, procoagulant microparticles may be involved in massive coagulation activation leading to depletion of clotting factors, but may also be formed and possess more procoagulant capacity secondary to such depletion.

### 93. Consequences of a single dose of 2.000.000 IU vitamin D3 in two nursing home residents

J.M.W. van den OUWELAND<sup>1</sup>, M.M.I.J. DRABBE<sup>2</sup>, H.W.H.A. HUNTJENS-FLEUREN<sup>3</sup>, E.J. VOLLAARD<sup>3</sup>  
*Dept. of Clinical Chemistry<sup>1</sup> and Clinical Pharmacy<sup>3</sup>, Canisius-Wilhelmina Hospital, Nijmegen, Nursing home Waelwick<sup>2</sup>, Ewijk Beuningen*

**Introduction:** Administration of a single high dose of vitamin D3 is increasingly used as a strategy for rapid normalization of the blood calcidiol concentration in patients with a low vitamin D status. In a nursing home near Nijmegen all residents receive 100.000 IU vitamin D3 three times a year as a concentrated solution (2 ml Vitamin D3 aquosum FNA 50.000 IU/ml).

**Methods:** By mistake two residents (M, 90yr; F, 95yr) were administered a whole bottle of 40 mL vitamin D3 concentrate, thus receiving 2.000.000 IU each. This was reported to the pharmacy immediately, so we had the opportunity to monitor the clinical and biochemical outcome of the overdose soon after intake.

**Results:** Peak blood calcidiol concentrations were observed 8 days after intake (527 and 422 nmol/L (ref 50-200), respectively). Remarkably, serum calcium levels only slightly increased up to 2,7 mmol/L (ref: 2,20-2,65) between 1 and 14

days after intake. Increases of plasma phosphate and creatinine levels remained within the reference range. No adverse clinical symptoms were noted.

**Conclusion:** It appears that a single dose (100 times higher than the maximum physiological daily dose of vitamin D3 from sunlight) does not result in immediate clinical or biochemical toxicity. Nevertheless, we cannot be certain that this dosing error is innocuous because it has recently been shown that a fourfold lower yearly dose (500.000 IU) for 3 to 5 years caused a significant 26% increase in osteoporotic fractures (Sanders 2010). Therefore the question remains which biochemical data can be used to demonstrate toxicity from a single high dose of vitamin D3.

*Literature:* Sanders et al. JAMA 2010;303:1815.

Categorie 3 Klinisch

#### Overigen

### 94. Metformine dosering en nierfunctie in poliklinische patiënten. 'Een zure kwestie?'

R.D. OUDE ENGBERINK<sup>1</sup>, L. WINKELMOLEN<sup>2</sup>, R. ROELOFS<sup>2</sup>, A.G. VLUG<sup>5</sup>, L.J. VLEMING<sup>3</sup>, G.A.E. PONJEE<sup>4</sup>, E.B. WILMS<sup>2</sup>, N. GEELHOED-DUIJVESTIJN<sup>5</sup>

*Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium<sup>1</sup>, HagaZiekenhuis, Den Haag; Apotheek<sup>2</sup>, Haagse Ziekenhuizen, Den Haag; Interne Geneeskunde<sup>3</sup>, HagaZiekenhuis, Den Haag, Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>4</sup>, Interne Geneeskunde<sup>5</sup>, MCHaaglanden, Den Haag*

**Inleiding:** Metformine is het meest voorgeschreven geneesmiddel bij diabetes mellitus type 2. Een zeldzame bijwerking van metformine accumulatie door verminderde uitscheiding is een potentieel fatale lactatacidose. De bijsluiter adviseert om de dosering aan te passen bij verminderde nierfunctie. Grote meta-analyses tonen echter geen relatie tussen metformine en het voorkomen van deze bijwerking. Het doel van deze studie is (1) het in kaart brengen van metformine voorschriften in relatie tot de nierfunctie in een poliklinische setting en (2) de associatie tussen nierfunctie, metforminespiegels en lactaatconcentratie bestuderen.

**Methode:** In deze pilot studie werden 86 poliklinische, met metformine behandelde diabetespatiënten geïnccludeerd. Uit routine bloedmonsters werden eenmalig de volgende parameters gemeten: lactaat, metformine, kreatinine (MDRD) en HbA1c. De dataset werd ingedeeld naar 'normaal' en 'verhoogd' lactaat (referentiewaarde 0,7 - 2,1 mmol/l) en 'normaal' en 'verhoogd' metformine (therapeutische spiegel <2,5 mg/l).

**Resultaat:** Van de 86 geïnccludeerde patiënten hadden er 12 (14%) een MDRD ≤30 ml/min., 29 (34%) een MDRD >30 en ≤50 ml/min. en 44 (51%) een MDRD >50 ml/min. 24 patiënten (28%) hadden een verhoogd lactaat waarbij de metformineconcentratie 3,11 mg/l was (versus 1,65 mg/l bij een normaal lactaat; p<0,0001). 28 patiënten (33%) hadden een verhoogde metforminespiegel met een MDRD van 42ml/min. (versus 61 ml/min. bij een normale metforminespiegel; p<0,01).

**Conclusie:** Deze studie toont aan dat in de dagelijkse praktijk behandeling met metformine ook wordt gecontinueerd bij patiënten met een verminderde nierfunctie. Metformine accumulatie lijkt geassocieerd met een verhoogd lactaat en een verminderde nierfunctie. In dit kader is voorzichtigheid geboden bij metforminedoseringen. Verder onderzoek hieraan wordt verricht met multivariate analyse, waarbij variabelen als metforminedosering, glucose instelling en de comorbiditeit hartfalen worden meegenomen.

### 95. Prediction of clinical non-response to methotrexate treatment in juvenile idiopathic arthritis

M. BULATOVIĆ<sup>1</sup>, M.W. HEIJSTEK<sup>1</sup>, E.H.P van DIJKHUIZEN<sup>1</sup>, N.M. WULFFRAAT<sup>1</sup>, S.M.F. PLUIJM<sup>2</sup>, R. de JONGE<sup>3</sup>  
*Pediatric Immunology<sup>1</sup>, UMCU-WKC, Utrecht, Public Health<sup>2</sup>, Clinical Chemistry<sup>3</sup>, Erasmus MC, Rotterdam*

**Introduction:** Methotrexate (MTX) is a cheap and efficacious drug in juvenile idiopathic arthritis (JIA) treatment. If JIA patients are unresponsive to MTX, early and effective combination treatment with biologicals is required to prevent joint damage. We developed a prediction model to identify JIA patients not responding to MTX.

**Methods:** In a cohort of 183 JIA patients, clinical variables and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes involved in the mechanism of action of MTX were determined at the start of MTX treatment. These variables were used to construct a prediction model for non-response to MTX treatment during the first year of treatment. Non-response to MTX was defined

according the American College of Rheumatology (ACR) 70 criteria. The prediction model was validated in a cohort of 104 JIA patients.

**Results:** The prediction model included: erythrocyte sedimentation rate and SNPs in genes coding for methionine synthase reductase (MTRR), multidrug resistance 1 (MDR-1/ABCB1), multidrug resistance protein 1 (MRP-1/ABCC1), and proton-coupled folate transporter (PCFT). The area under the receiver operating characteristics curve (AUROC) was 0.73 (95%CI: 0.64-0.81). The prediction model was transformed into a total risk score (range 0 to 11). At a cut-off score of ≥3, sensitivity was 78%, specificity 49%, positive predictive value was 83%

and negative predictive value 41%. In the validation cohort, the AUROC was 0.65(95%CI: 0.54-0.77).

*Conclusion:* The prediction model we developed and validated

combines clinical and genetic variables to identify JIA patients not responding to MTX treatment. This model could assist clinicians in making individualized treatment decisions.

## 96. Sterk verhoogde serum ACE-activiteit: denk aan familiere ACE-hyperactiviteit

R. CASTEL, M. van de WERKEN, M. SABOERALI, I. TCHETVERIKOV, H.J. VERMEER, F.M. VERHEIJEN  
*GKCL, Albert Schweitzerziekenhuis, Dordrecht*

*Inleiding:* Bij ongeveer 70% van de patiënten met sarcoïdose wordt een verhoogde serum angiotensineconverterend enzym (ACE)-activiteit gemeten. Meestal betreft dit een milde verhoging van <3x de bovengrens van de referentiewaarde. Wij beschrijven een 40-jarige vrouw en een 56-jarige man bij wie op basis van een geringe verdenking op sarcoïdose een serum ACE-activiteit was aangevraagd. Bij beide patiënten was de ACE-activiteit sterk verhoogd: 125 en 138 E/l (referentiewaarde: <20 E/l). Deze laboratoriumuitslagen werden geïnterpreteerd als een aanwijzing voor sarcoïdose. Sarcoïdose kon echter niet worden bevestigd met uitgebreid radiologisch vervolgonderzoek en broncho-alveolaire lavage.

*Methode:* Bij familieleden van beide patiënten werd de serum ACE-activiteit gemeten, en op DNA-niveau naar mutaties gezocht in het ACE-coderende gen middels sequentie analyse.

*Resultaat:* Bij de moeder van de 40-jarige vrouw werd ook een zeer sterk verhoogde ACE-activiteit gemeten: 120 E/l. Bij haar vader en dochter werd een normale ACE-activiteit gemeten

(<20 E/l). DNA-diagnostiek liet zien dat zowel de 40-jarige vrouw als haar moeder drager zijn van de Pro1199Leu mutatie (heterozygoot). In de familie van de 56-jarige man werd bij zijn zoon een sterk verhoogde ACE-activiteit gemeten van 132 E/l. Bij zijn moeder en een ander familielid werd een normale ACE-activiteit gemeten. DNA-diagnostiek is ingezet bij deze familie.

*Conclusie:* Familiere ACE-hyperactiviteit is een zeldzame laboratoriumbevinding die voor zover bekend niet leidt tot klinische klachten. Als bij laboratoriumonderzoek een sterk verhoogde ACE-activiteit wordt gemeten (>4x de bovengrens van de referentiewaarde), dient eerst familiere ACE-hyperactiviteit te worden overwogen, om te voorkomen dat ongeïndiceerde, uitgebreide vervolgdagnostiek wordt ingezet.

*Literatuur:* Kramers et al. Ned Tijdschr Geneesk 2003;147(11)  
Kramers et al. Circulation 2001;104:1236-40. Eyries et al. J Biol Chem 2001;276:5525-32.