

## Posterabstracts

Samenvattingen van de posterpresentaties tijdens het 66e Congres van de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde op 18 en 19 april 2013 te Veldhoven.

### Categorie 1 Analytisch

#### Hemocytometrie, flowcytometrie, hemostase

##### 1. Automated microscopy; evaluation of the DM96 and the Hemofaxs

M.M.J.F. KOENDERS, I. van GELDER - van VUGT, M. HEEZIUS - de VET, A. van de WESTELAKEN, Y. KLUITERS - de HINGH

*Department of Clinical Chemistry & Laboratory Hematology, St. Elisabeth Hospital, Tilburg, The Netherlands*

**Introduction:** During the last years, automated microscopy has made significant progress. Recently, the automated microscope Hemofaxs (TissueGnotics) was introduced. In contrast to the DM96 (CellaVision), a well-known digital microscopy system, the Hemofaxs is a self-learning system that offers a tailor-made cell classification for each customer. In this study, we evaluated slides of peripheral blood for morphological examination on the DM96 and the Hemofaxs.

**Methods:** Both automated microscopy systems were evaluated for several performance characteristics; accuracy of pre classification, within- and between-run imprecision, and time-efficiency. Methods were comparable to the study performed by Ceelie et al. (1). (Post-)classification performed by two independent technicians was used as golden standard.

**Results:** Correct initial cell classification (pre classification) by the DM96 or the Hemofaxs was respectively, 65% and 79%.

The DM96 pre classified 2,7% of the abnormal cells as normal cells and 3,3% of the normal cells as abnormal. For the Hemofaxs these percentages were 5,7% and 9,9%. A good (VC < 5%) within- and between-run reproducibility was observed in both the DM96 and the Hemofaxs. Time-efficiency studies indicated that the total analysis time for the DM96 and the Hemofaxs were shorter compared to manual differentiation, respectively 29,3 and 28,5 min compared to 34,3 min.

**Conclusion:** Based on the pre classification accuracy and the time-efficiency studies, the Hemofaxs was superior to the DM96. However, the pre classification accuracy of both systems was inadequate and should be increased by altering the staining procedure (DM96) or relearning the system to a tailor-made classification (Hemofaxs).

*Literature:* (1) Ceelie et al. J Clin Pathol 2007; 60: 72-79.

#### Fotometrie, electrochemie, sensortechnologie

##### 2. Interferentie van therapeutische monoklonale gammaglobulines (biologicals) bij M-proteïne elektroforese onderzoek

J. RUINEMANS - KOERTS<sup>1</sup>, C. VERKROOST<sup>2</sup>, Y. SCHMIDT - HIELTJES<sup>1</sup>, K. WIEGERS<sup>3</sup>, M. van LUIN<sup>2</sup>, M. THELEN<sup>3</sup>

*Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium<sup>1</sup>, Rijnstate ziekenhuis, Arnhem; Apotheek<sup>2</sup>, Rijnstate ziekenhuis, Arnhem; Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium<sup>3</sup>, Amphia ziekenhuis, Breda*

**Inleiding:** Therapeutische monoklonale gammaglobulines (biologicals) kunnen in principe een zichtbare monoklonale band geven in het eiwit-elektroforese/immunofixatiepatroon, en daarmee ten onterechte de aanwezigheid van een M-proteïne suggereren. Voor de volgende veel gebruikte therapeutische monoklonale gammaglobulines is onderzocht waar deze in het eiwit-elektroforese patroon liggen en in hoeverre deze, gezien de lage therapeutische concentraties, een zichtbare band geven: Rituximab (MabThera®), Infliximab (Remicade®), Trastuzumab (Herceptin®), Bevacizumab (Avastin®), Natalizumab (Tysabri®), Abatacept (Orencia®), Panitumumab (Vectibix®), Tocilizumab (RoActemra®).

**Methode:** De biologicals werden verdund in 0,9% NaCl of serum (gezonde donor) tot een concentratie van 1 g/l en tot een gemiddelde therapeutische bloedwaarde concentratie. Deze bloedwaarde concentraties zijn ontleend aan de Summary Product Characteristics (SPC) (EMA-website). Monsters werden geanalyseerd middels gel-elektroforese en immunofixatie met apparatuur/reagentia van Helena (SAS 3 en 4) en Sebia (Hydragel) conform instructie van de leveranciers.

**Resultaat:** Dit onderzoek geeft de eiwit-elektroforese/immunofixatiepatronen voor 8 veel gebruikte monoklonale therapeutische gammaglobulines voor zowel apparatuur/reagentia van Helena als Sebia. Alleen voor de therapeutische bloedwaarde concentraties van Rituximab en Bevacizumab was een monoklonale band zichtbaar in zowel het eiwit-elektroforese als immunofixatiepatroon met de Helena en Sebia techniek. Het betreft in beide gevallen een IgG-kappa.

**Conclusie:** De laboratoriumspecialist dient zich bewust te zijn van het feit dat bij het vinden van een lage concentratie M-proteïne (< 1 g/l) dit eventueel veroorzaakt kan zijn door een biological. Kennis van de plaats van diverse biologicals in het elektroforesepatroon en verificatie of de patiënt een biological gebruikt middels het EPD of via de arts is dan noodzakelijk. De auteurs stellen hun elektroforese/immunofixatiepatronen beschikbaar voor andere laboratoria.

*Literatuur:* www.ema.europa.eu

### 3. Pseudohypernatraemia

N. HULSMAN<sup>1\*</sup>, A.M.C.P. JOOSEN<sup>2\*</sup>, F.J. SCHUITEMAKER<sup>1</sup>, M.H.M. THELEN<sup>2</sup>

*Intensive Care Unit<sup>1</sup> and Department of Clinical Chemistry and Haematology<sup>2</sup>, Amphia Hospital, Breda.*

*\*Both authors contributed equally.*

**Introduction:** Low sodium concentrations trigger investigation of possible pseudohyponatraemia due to hyperlipidaemia or hyperproteinaemia. Increased sodium concentrations, however, rarely trigger exclusion of pseudohypernatraemia. In our intensive care unit we have observed large differences in sodium concentrations between blood samples obtained simultaneously with systematically higher sodium concentrations in samples analysed on chemistry analysers compared to samples analysed on blood gas analysers. Clinically relevant differences up to 6 mmol/l raised the question which value was correct. **Methods:** Chemistry analysers measure plasma sodium in

strong dilution assuming a normal plasma water fraction of 93%. This assumption is true in the majority of cases but false in critically ill patients with extremely low protein concentrations.

**Results:** Pseudohypernatraemia is reported when in fact the physiologically relevant plasma water sodium level is normal. This potentially leads to inappropriate treatment.

**Conclusion:** We advise to restrict sodium measurement in ICU patients, and indeed any patient with extremely abnormal plasma protein or lipid concentrations, to direct methods on blood gas analysers.

### 4. Discussie- en leerpunten bij de validatie van de hemolyse- en lipemie-index op een chemie-analyzer

S.M.I. GOORDEN, L. van GALEN, B. ROBBEN, M.M. BUIJS

*ATAL-Medial Diagnostische Centra, Hoofddorp*

**Inleiding:** Hemolyse en lipemie in plasmamonsters zijn notoire interferenten in (immuno)chemische bepalingen en kunnen leiden tot zowel vals verlaagde als vals verhoogde uitslagen. Een uitgebreide validatie van deze indices wordt regelmatig doorlopen voor de ingebruikname van nieuw aangeschafte apparatuur. Er bestaat een NCCLS protocol 'Interference Testing in Clinical Chemistry', waarbij verschillende interferenten worden ingemengd in poolplasma's. Echter, tijdens onze validatie hebben we verschillende discussiepunten geïdentificeerd die hier worden besproken.

**Methode:** Volgens het protocol wordt hemolysaat gemaakt door erythrocyten van willekeurige monsters te liseren, wat vervolgens wordt ingemengd in plasmapools verkregen van andere proefpersonen/patiënten. We vergelijken deze benadering met het matchen van erythrocyten en plasma van patiënten bij het valideren van de metaboolt ferritine, op de Modular E-module (Roche). Bij het valideren van de lipemie-index wordt

volgens het protocol een vetemulsie, zoals Lipofundin/Intralipid, ingemengd in plasmapools. Deze aanpak is vergeleken met het meten van humane lipemische monsters voor de indirecte ISE-bepalingen op de Modular P-module (Roche).

**Resultaat:** Wanneer de erythrocyten niet gematched worden, zien we een groter effect van hemolyse op ferritine, dan met gematchte erythrocyten. Bij gebruik van Intralipid vinden we geen interferentie op de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> en Cl<sup>-</sup> bepalingen. Echter, we vinden wel relevante verschillen tussen de Na<sup>+</sup> en Cl<sup>-</sup> waardes in lipemische monsters, gemeten voor en na ultracentrifugatie.

**Conclusie:** Het NCCLS protocol zou verbeterd kunnen worden door erythrocyten, gebruikt voor het maken van het hemolysaat, te verkrijgen van dezelfde proefpersonen/patiënten als het plasma voor de plasmapools. De validatie van de lipemie index voor ISE-bepalingen dient uitgevoerd te worden door zowel het innemen van Lipofundin/Intralipid in plasmapools als het meten van humane lipemische monsters.

### 5. Onverwacht effect van LipoClear reagens op de bepaling van het C-reactive protein

J.M.W. van den OUWELAND

*Klinisch Chemisch Laboratorium, Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen*

**Inleiding:** Een 46-jarige man met buikkoliken presenteerde zich op de spoedeisende hulp met verdenking van een acute pancreatitis. Het overgrote deel van de aangevraagde bepalingen, waaronder de CRP, kon niet worden gerapporteerd in verband met het sterk lipemisch en hemolytisch aspect van het plasma. In een poging de lipiden te verwijderen werd het plasma behandeld met een non-ionic polymeer reagens, LipoClear (StatSpin). De CRP concentratie was met 2 mg/l onverwacht normaal (ref <4 mg/l). CRP meting in verdund plasma (1:5 met fysiologisch zout) was met 39 mg/l wel verhoogd. De dagerna was CRP wel meetbaar in onverdund plasma en liep op tot 242 mg/l. Nader onderzoek werd gedaan naar het ongewenste effect van LipoClear op de CRP bepaling.

**Methode:** Patiëntplasma van een dag later werd onverdund gemeten, na 1:5 verdunning, na ultracentrifugatie (30 min, 14.100 g, Eppendorf Minispin Plus) en na incubatie met LipoClear (3

min, 4000 g, StatSpin Express 4). Tevens werden een drietal willekeurige plasmamonsters met normaal aspect en verhoogde CRP concentratie geselecteerd (146, 148 en 166 mg/l) en werd CRP na behandeling met LipoClear overgemeten.

**Resultaat:** De CRP concentraties in het onverdunde (163 mg/l), verdunde monster (144 mg/l) en na ultracentrifugatie (160 mg/l) kwamen goed met elkaar overeen, in tegenstelling tot de CRP uitslag (2 mg/l) na incubatie met LipoClear. In drie willekeurige plasmamonster daalde het CRP gemiddeld met 93% (uitslag 6, 8 en 19 mg/l) na incubatie met LipoClear. Het precieze mechanisme is niet verder onderzocht.

**Conclusie:** De firma adviseert om LipoClear niet te gebruiken voor meting van lipiden, fosfaat en immunoglobulinen. Aan dit rijtje kan op basis van onze bevindingen CRP worden toegevoegd.

## Hemocytometrie, flowcytometrie, hemostase

### 6. Evaluation of MDS-flagging during routine hematological analysis

M.M.J.F. KOENDERS<sup>1</sup>, P. TAAL<sup>2</sup>, Y. KLUITERS - de HINGH<sup>1</sup>, E. van WIJK<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry & Laboratory Hematology<sup>1</sup>, St. Elisabeth Hospital, Tilburg; Siemens Diagnostics<sup>2</sup>, Breda, The Netherlands*

**Introduction:** In a recent paper, Rocco et al. (1) introduced a set of algorithms that can generate a dysplasia-flag on a complete blood count (CBC). This flag can be used to mark patients needing further hematological evaluation for MDS. In this study, the performance of the dysplasia-flag was evaluated. **Methods:** The described algorithms were programmed in Hemalink middleware (Siemens) connected to four Advia 2120 hematology analyzers (Siemens). Five different patterns are recognized and flagged as dysplasia: 1) Morphological abnormal granulocytes, thrombocytopenia, and a blast-flag. 2) Cytochemical abnormal granulocytes, monocytosis, and a blast-flag. 3) Cytochemical abnormal granulocytes, hypochromasia erythrocytes (RBC) and reticulocytes (RET). 4) Monocytosis and thrombocytopenia. 5) Two populations of RBC/RETA total of 45.000 CBCs was included. Using known clinical data it was analyzed for which patients/CBCs the dysplasia-flag was generated correctly.

**Results:** 583 (1.3%) of the 45.000 CBCs generated a dysplasia-flag. 18% of the flagged CBCs were derived from MDS-patients (true positives). The 82% of false positives were mainly caused by CBCs derived from patients with solid tumours. The 5 patterns gave a true positive percentage of 88.2% (pattern 1), 32.0% (pattern 2), 0% (pattern 3), 13% (pattern 4), and 50.0% (pattern 5).

**Conclusion:** Using the current algorithms, the dysplasia-flag generated too much false positives. Pattern 2, 3 and 4 hardly generate a true positive result for MDS. On the other hand, pattern 1 and 5 show a good to moderate percentage. The algorithms have to be further improved in order to accurately detect MDS. Furthermore, to obtain insight in the sensitivity, a retrospective study has to be set up to evaluate the percentage of MDS-patients falsely negative for the dysplasia-flag.

*Literature:* (1) Rocco et al. Leukemia Res 2011; 35: 1623-1627.

### 7. Automated hematology analyzers fail to detect lymphocyte vacuolization in inborn errors of metabolism

M. OOSTENDORP<sup>1</sup>, P.M. van HASSELT<sup>2</sup>, S. NIERKENS<sup>3</sup>, A. HUISMAN<sup>1</sup>

*Laboratory of Clinical Chemistry and Haematology<sup>1</sup>; Department of Metabolic Diseases, Wilhelmina Children's Hospital<sup>2</sup>; Department of Immunology<sup>3</sup>, University Medical Center Utrecht, The Netherlands*

**Introduction:** Vacuolated lymphocytes are found in a wide range of metabolic disorders, with juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL3, Batten's disease) being most commonly associated with this lymphocyte vacuolization. NCL3 is a neurodegenerative lysosomal storage disease, with an onset at 4-10 years. The presenting symptom is loss of vision, with cognitive decline becoming apparent years thereafter. Lymphocyte vacuolization in a young patient presenting with progressive blindness provides an important diagnostic clue for NCL3. However, automated hematology analyzers appeared unable to detect these morphologically abnormal lymphocytes.

**Methods:** To further investigate the discrepancy between automated analysis and microscopic evaluation of blood smears, peripheral blood from 4 NCL3 patients was measured using different analytical techniques on three commonly applied hematology analyzers (Abbott Cell-Dyn Sapphire, Abbott Cell-Dyn 1800 and Sysmex XE-2100). Blood smears were prepared

and stained with May-Grünwald-Giemsa using an automated slide maker stainer (Abbott Cell-Dyn SMS).

**Results:** Peripheral blood smear analysis revealed extensive lymphocyte vacuolization. Automated blood count analysis showed no flagging on all three hematology analyzers and all results were within reference range, despite the grossly abnormal lymphocyte appearance in these patients. In addition, lymphocyte vacuolization appeared progressive with patient age (both percentage of vacuolated lymphocytes and number of vacuoles per lymphocyte).

**Conclusion:** The presence of vacuolated lymphocytes strengthens the suspicion that the patient suffers from NCL3 or an inborn error of metabolism in general. As these lymphocytes are not detected by automated hematology analyzers, microscopic evaluation of peripheral blood smears provides important, rapid and cheap first-line evidence for these patient categories and may provide a biomarker for disease severity.

### 8. Flowcytometrie bij het multiple myeloom

K.J.M. BOONEN, C. van den NIEUWENHOF, V. SCHARNHORST

*Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina ziekenhuis, Eindhoven*

**Inleiding:** Maligniteit van plasmacellen werd tot op heden vastgesteld op basis van monoklonaliteit en morfologische eigenschappen van plasmacellen. Er is de afgelopen jaren meer bekend geworden over aberrante CD-marker expressie bij maligniteit van plasmacellen. Daarnaast zijn de mogelijkheden om plasmacellen te selecteren met gating strategieën groter geworden met de komst van 5 of meer kleuren flowcytometrie. Het doel van deze studie was het opstellen en valideren van een panel van monoklonale antistoffen voor flowcytometrie om aberrante marker expressie en monoklonaliteit van een plasmacelpopulatie vast te stellen.

**Methode:** Gating van plasmacellen vond plaats op CD138/CD38 dubbel positieve cellen. Het testpanel bestond uit CD56, CD19, CD20, CD117, CD33, CD52, Cykappa, Cylambda, CyIgA en CyIgG. Er werd vergeleken met uitkomsten van de mi-

croscopische beoordeling van beenmergpreparaten, pathologie (PA) van het botbiopt en capillair elektroforese van monoklonale eiwitten.

**Resultaat:** Bij alle microscopisch maligne plasmacellen werd afwijkende marker-expressie gevonden. Ook de overeenkomst met PA en elektroforese was goed. Een 100% scheiding tussen maligne en reactieve plasmacellen werd in de geteste populatie verkregen louter op basis van CD19 expressie. CD45 (70%) en CD56 (80%) lieten ook vaak afwijkende expressie zien. Van CD45 en CD52 werd ook in 2 microscopisch benigne monsters een afwijkend expressiepatroon gevonden, terwijl aberrante expressie van de overige markers alleen bij maligne populaties werd gezien. Bij de bepaling van de zware en lichte keten monoklonaliteit kwamen immunofluorescentie microscopie en flowcytometrie soms niet met elkaar overeen.

*Conclusie:* Het gebruikte panel geeft een goede scheiding tussen maligne en reactieve plasmacellen op basis van aberrante marker expressie. De overeenkomst met microscopie, PA en

elektroforese is goed. Flowcytometrie van zware en lichte ketens dient verder te worden geoptimaliseerd.

## 9. Evaluation of the new StaRRsed Inversa 24M analyser

Ma. SCHOORL, Mi. SCHOORL, J. van PELT

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

*Introduction:* The StaRRsed Inversa 24M is an analyser for determination of the erythrocyte sedimentation rate (ESR) according to the Westergren method. The diluted blood (EDTA:sodiumcitrate = 4:1) is drawn up into one of the 24 Westergren pipettes. The ESR is measured at either 30 (T30) and/or 60 (T60) minutes. The T30 result is extrapolated to a calculated T60 result. Performance characteristics and correlation studies of the calculated and measured T60 results of Inversa were assessed against StaRRsed InteRRliner and Alifax Test-1 analysers.

*Methods:* From the daily routine K2EDTA blood samples (n=355) were at random selected and analyzed within 4 hours after collection. Intra-assay variation was determined in tenfold with a patientpool and BioRad Liquichek™ Sedimentation Rate Controls. For inter-assay reproducibility, the Liquichek controls were used on ten different days. Correlation studies were performed against the InteRRliner and Alifax Test-1

analyser. For clinical evaluation samples with M-protein, low Hb (<5.0 mMol/L), icterus (bilirubin 40-350 μMol/L) and lipemia (triglycerides 2.5-6.5 mMol/L) were selected.

*Results:* At a level of 35 mm/hour results concerning intra- and interassay variation yielded appropriate results of CV <4%. At T60 correlations between calculated Inversa and measured Inversa, InteRRliner or Alifax yielded  $r=0.978$ ,  $0.962$  and  $0.867$  respectively. Calculated T60 Inversa results for samples with low Hb (n=28), icterus (n=11) or lipemia (n=15) correlated well with measured Inversa and InteRRliner ( $r>0.99$ ). For samples with M-proteins (n=19) correlations between calculated T60 Inversa and measured Inversa and InteRRliner resulted in  $r=0.96$  and  $0.90$  respectively.

*Conclusion:* We conclude that the Inversa yields good analytical performance. The calculated T60 ESR result is a reliable method for a rapid Westergren ESR. Regarding to the capacity, the StaRRsed Inversa 24M is suitable for small laboratories.

## 10. Overeenkomst hemocytometrische parameters CELL-DYN Sapphire, Sysmex XT-4000 en XE-5000: een uitgebreide validatie

M. van BERKEL, R. de BOER, A. ROEST, D. van de KERKHOF

*Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina Ziekenhuis, Eindhoven*

*Inleiding:* Sysmex hematologie analysers XT-4000 en XE-5000 zijn state of the art apparatuur met vernieuwde onderscheidende technologie. Voor implementatie op het algemeen klinisch laboratorium zijn beide typen apparaten uitgebreid gevalideerd en vergeleken met de Abbott CELL-DYN Sapphire (CD). Tijdens de validatie zijn 21 hematologische parameters vergeleken tussen de Sysmex en Abbott apparatuur. Tevens zijn de OPEN en de CLOSED mode als volwaardig gescheiden analyse systemen gevalideerd. Ook is de sensitiviteit van nieuwe parameters gemeten in het IMI kanaal en NRBC kanaal vastgesteld door te vergelijken met de microscopische beoordeling.

*Methode:* Voor de validatie zijn de volgende parameters geëvalueerd: precisie (EP5), overeenkomst (EP9), interferentie (lipemie), carry-over van de body fluid modes, precisieprofiel, lineariteit, stabiliteit en de sensitiviteit van de gegenereerde alarmen.

*Resultaat:* Alle parameters zijn goed reproduceerbaar op beide apparaten in beide modi en vallen over het algemeen binnen toelaatbare imprecisie voor de desbetreffende parameter (<10%). Geen van de geteste parameters heeft een significante bias ten opzichte van meting op de CD, met uitzondering van de erythrocyten parameters RDW, Hb, Ht en (dientengevolge) MCHC en het basofielen aantal. De Sysmex heeft minder last van interferentie door lipemie dan de CD. Uit het vergelijk met de microscopische beoordeling blijken zowel de Sysmex XE-5000 als de XT-4000 adequaat te vlaggen op afwijkende monsters (sensitiviteit > 95%).

*Conclusie:* De Sysmex apparatuur geeft geen klinisch relevante verschillen met de Cell Dyn Sapphire en blijkt voor verschillende parameters superieur te zijn. Bovendien is Sysmex apparatuur minder gevoelig voor 'resistente erythrocyten' en interferentie door lipemie.

## 11. Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban using UPLC-MS/MS and comparison with coagulation assays for therapy monitoring

E.M.H. SCHMITZ<sup>1</sup>, D. van den HEUVEL<sup>2</sup>, K. BOONEN<sup>2</sup>, L. BRUNSVELD<sup>1</sup>, D. van de KERKHOF<sup>2</sup>

*General Clinical Laboratory<sup>1</sup>, Catharina Hospital Eindhoven; Department of Biomedical Engineering<sup>2</sup>, University of Technology Eindhoven<sup>2</sup>, The Netherlands*

*Introduction:* Over the last several years, novel oral anticoagulants (NOACs) have been developed. Monitoring of NOACs appeared to be important, e.g. in patients having deviating posture, diminished renal function or in emergency (bleeding) situations. Many new coagulation assays have been developed, because conventional coagulation assays are not suitable for adequate monitoring. Our goal is the development of a reference UPLC-MS/MS technique for the quantification of dabigatran, rivaroxaban and apixaban, comparison with several coagulation tests and determination of target values for peak and trough plasma concentrations.

*Methods:* Plasma and full blood were spiked with dabigatran, rivaroxaban and apixaban for calibration (23-750 ng/mL) and quality control. Internal standards of the NOACs were added, followed by protein precipitation using acetonitrile. Analysis was done with UPLC-MS/MS using a two-step Multiple Reaction Monitoring (MRM) monitoring mode. Validation of the method was done by determining specificity, matrix effects, precision, LLOQ, LLOD, carry over, recovery and stability. Target values are determined at several time points in an in-clinic orthopedic population and out-clinic cardiologic population.

*Results:* All calibration lines were good ( $r^2 \geq 0.99$ ) and no significant difference could be seen between plasma and full blood calibration lines. Stability tests showed adequate stability during sample storage and freeze-thaw cycles. Specificity was good and LLOD/LLOQ were  $<1$  ng/mL. Matrix effects and carry over were absent. For dabigatran, rivaroxaban and apixaban, the recovery was respectively 73%, 78% and 104%;

bias was respectively  $\leq 6\%$ ,  $\leq 17\%$  and  $\leq 19\%$ ; total precision was respectively  $\leq 7\%$ ,  $\leq 8\%$  and  $\leq 10\%$ .

*Conclusion:* An adequate method for dabigatran, rivaroxaban and apixaban was developed and validated. Target values are determined and compared to coagulation assays in an in-clinic orthopedic and out-clinic cardiologic patient population.

## 12. Evaluation of the HemoCue WBC DIFF system for point-of-care counting of total and differential white cells in pediatric samples

H. RUSSCHER, N. van DEURSEN, R. de JONGE

*Department of Clinical Chemistry, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands*

*Introduction:* Leukocyte count and differentiation is an important tool in diagnosing infections. Recently, HemoCue launched a POCT analyser, able to count and differentiate white blood cells (HemoCue WBC DIFF system) in 10  $\mu$ L finger prick blood using a microcuvette.

*Methods:* The total leukocyte and differential counts of 199 capillary EDTA blood samples from children up to 12 years of age were tested in parallel by the HemoCue WBC DIFF system to assess the precision and accuracy designed according to CLSI EP9-A2. Reference counts were obtained by a standardised Sysmex-XE5000 automated cellcounter (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

*Results:* In the tests for precision, the HemoCue DIFF system showed for the total WBC count a maximum CV of 3.6% and for the differential WBC count a maximum CV of 7.6% (neutrophils, lymphocytes) or a maximum SD of  $0.07 \times 10^9/L$  (monocytes, eosinophils and basophils), fulfilling the accep-

tance criteria for pediatric samples. In the tests for accuracy, orthogonal regression analysis and measurements of correlation coefficients ( $r$ ) showed good results for total WBC ( $-0.2+1.02x$ ,  $r=0.98$ ), neutrophils ( $0.2+0.95x$ ,  $r=0.97$ ), lymphocytes ( $0.02+1.10x$ ,  $r=0.94$ ) and eosinophils ( $0.002+1.01x$ ,  $r=0.93$ ) between the HemoCue DIFF system and Sysmex XE5000. The result for monocytes was  $0.06+0.52x$ ,  $r=0.61$ , while calculations for basophils were not performed due to a low count. The flagging frequency was 15%, acceptable compared with standardized automated cellcounters.

*Conclusion:* The HemoCue WBC DIFF system is reliable for counting and differentiating WBCs in pediatric samples. It correlates well with the Sysmex-XE5000 automated cell counter with acceptable flagging frequency. It is simple to use and provides a rapid provision of results that could facilitate adequate decision making leading to improved clinical outcomes.

## 13. Kruisreactiviteit bij nieuwe anticoagulantia bepalingen

M. HULSEBOS, R.F.M. OUDE ELFERINK

*LabNoord, Groningen*

*Inleiding:* Onderzoek naar de invloed van coumarine, dabigatran/ rivaroxaban/ laag molecuair heparine (LMWH) mengsels op de nieuwe anticoagulantia bepalingen. Hierbij worden de Direct Thrombin Inhibitor Assay (DTI; dabigatran), Berichrom Heparin (Berhep; laag molecuair heparine) en Berichrom Heparin (Berriv (zonder AT3 reagens); rivaroxaban) van firma Siemens vergeleken met de Hemoclot Thrombin Inhibitors (HTI; dabigatran), Biophen Heparin (Hyphep; laag molecuair heparine) en DiXaI (rivaroxaban) bepalingen van firma Hyphen.

*Methode:* De kruisreactiviteit werd bepaald met mengsels van steeds twee kalibratoren (LMWH, Rivaroxiban, Dabigatran), waarbij er vijf levels werden gemeten: 0/100%, 20/80%, 50/50%, 80/20% en 100/0% van de betreffende anticoagulan-

tia. De mengsels werden gemeten met de nieuwe anticoagulantia bepalingen van de firma's Siemens en Hyphen, waarna de invloed (kruisreactiviteit) kon worden vastgesteld.

*Resultaat:* Coumarine en dabigatran vertonen geen kruisreactiviteit met de nieuwe anticoagulantie bepalingen van beide firma's. LMWH heeft geen invloed op DTI, maar wel op de HTI (dabigatran), Berriv (gering) en DiXaI (sterk) (rivaroxiban). Rivaroxaban heeft invloed op de Berihop (sterk), op de Hyphep bepaling (zeer sterk) (LMWH), geen op de DTI en wel op de HTI bepaling (dabigatran).

*Conclusie:* Geconcludeerd kan worden dat de nieuwe anticoagulantia bepalingen van firma Siemens minder kruisreactiviteit hebben dan de nieuwe anticoagulantia bepalingen van firma Hyphen.

## 14. Storing van de fibrinogeenbepaling door fibrineafbraakproducten tijdens trombolysie

F. WEERKAMP<sup>1</sup>, M.P.M. de MAAT<sup>2</sup>

*MaasstadLab onderdeel Klinische Chemie<sup>1</sup>, Maasstad Ziekenhuis, Rotterdam; Afdeling Hematologie<sup>2</sup>, Erasmus MC, Rotterdam*

*Inleiding:* Trombolytica zoals urokinase worden ingezet om bij levensbedreigende vaatafsluitingen stolsels op te lossen. Deze middelen zetten plasminogeen om in plasmine, dat vervolgens het fibrinenetwerk afbreekt. Ongewenst neveneffect is het verhoogde risico op bloedingen. De vaatchirurgen in het Maasstad Ziekenhuis staken de trombolysie indien de fibrinogeenconcentratie in het bloed van de patiënt daalt onder de 1 g/l. De Sysmex CS2100i stollingsanalyzer geeft bij deze monsters echter regelmatig een 'fibrinogen curve error' (code 0008.0032). De fibrinogeenuitslag wordt dan niet gerapporteerd.

*Methode:* Onderzocht werd in welke situaties de 'fibrinogen

curve error' optreedt en hoe vaak dit voorkomt. Om een laboratorium- of methodespecifiek probleem uit te sluiten, werden monsters verstuurd naar het Erasmus MC, waar de fibrinogeenconcentratie werd bepaald met behulp van de Sysmex CS2100i, KC4 (Amelung) en totaal fibrinogeen ELISA. Literatuur en firma werden geraadpleegd om de oorzaak en ernst van de foutcode te kunnen inschatten.

*Resultaat:* De 'fibrinogen curve error' treedt op bij vrijwel alle patiënten met trombolysetherapie, bij lage fibrinogeenwaarden (0,5 - 1,6 g/l). De foutmelding treedt al snel na het starten van de trombolysie op, bij D-dimeren tussen 3 en  $>80$  mg/l. De door het

Maasstad Ziekenhuis gevonden waarden komen goed overeen met die in het Erasmus MC, gemeten met de Sysmex CS2100i en de KC4. Uit de literatuur is bekend dat hoge concentraties afbraakproducten van fibrine en fibrinogeen de polymerisatie van fibrine remmen, waardoor de fibrinogeenbepaling volgens Clauss verlaagde waarden meet. ELISA geeft vals-verhoogde waarden, omdat deze ook fibrine-degradatieproducten aantoon

*Conclusie:* Het is aannemelijk dat de fibrinogeenbepaling volgens Clauss de functionele fibrinogeenconcentratie in de patiënt het beste benadert. In het Maasstad Ziekenhuis worden fibrinogeenwaarden met een 'fibrinogeen curve error' voortaan gerapporteerd aan de kliniek.

## 15. De hemocytometrisch bepaalde Granulatie-Index (GI) ter vervanging van de arbeidsintensieve, subjectieve manuele microscopische beoordeling van toxische granulatie van neutrofiële granulocyten

M.P. ZIJLSTRA, M.P.G. LEERS

*Afd. Klinische Chemie & Hematologie, Atrium Medisch Centrum Parkstad, Heerlen*

*Inleiding:* Ontstekingsreacties worden microscopisch gekenmerkt door de aanwezigheid van toxische granulatie in de neutrofiële granulocyten. De aanwezigheid en mate van granulatie wordt in de meeste laboratoria manueel beoordeeld door een subjectieve microscopische beoordeling van een bloeduitstrijk preparaat. De automatische hematologie analyzer XE-5000 (Sysmex) kan de mate van granulatie van de neutrofielen herkennen door een verschuiving in de zogenaamde NEUT-X waarde. Met behulp van deze NEUT-X waarde kan een granulariteits index (GI) berekend worden. Deze GI is in de literatuur beschreven als objectieve maat voor de granulariteit van de neutrofiële granulocyten en kan hierdoor de microscopische beoordeling vervangen.

*Methode:* De Granulatie index wordt ingedeeld aan de hand van de standaarddeviatie-waarden van de NEUT-X waarde van een controle groep gezonde persoon. (GI-0 is de waarde van het gemiddelde plus en min 1SD. GI 1 is de bovengrens van

GI-0 plus 1 SD etc.). De GI verdeling is voor ons laboratorium berekend op basis van 115 controles. Vervolgens werden van 160 perifere bloedmonsters die microscopisch werden beoordeeld de toxische granulatie beoordeeld (range 0 tot 3+). Van deze monsters werden de bijbehorende NEUT-X waarden en GI index bepaald.

*Resultaat:* De 5 onderzochte groepen van controle en toxische granulatie (0, 1, 2 en 3+) lieten een duidelijke significante stijging zien in GI wanneer de toxische granulatie aanwezig is en toeneemt.

*Conclusie:* De NEUT-X en diens gevolg de GI bepaling is een geautomatiseerde, objectieve parameter die in een 24/7 situatie beschikbaar is, die goed correleert met de handmatig en vrij subjectieve microscopische beoordeling van de toxische granulatie. Hierdoor zou het de tijdrovende en arbeidsintensieve beoordeling van de toxische granulatie kunnen vervangen.

## Immunoassay, (bloedgroepen-)serologie

### 16. A multicenter evaluation of a new automated method for measurement of anti-cyclic citrullinated peptide

M. NOORDEGRAAF<sup>1</sup>, A. WOLTHUIS<sup>2</sup>, F. PETERS<sup>3</sup>, R. HOEDEMAKERS<sup>1</sup>

*Laboratory of Clinical Chemistry and Haematology<sup>1</sup>, Jeroen Bosch Hospital, 's Hertogenbosch; Laboratory of Clinical Chemistry, Medical Center Leeuwarden<sup>2</sup>; Laboratory of Clinical Chemistry<sup>3</sup>, Hospital Bernhoven, Oss, The Netherlands*

*Introduction:* Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory auto-immune disease. RA is mostly diagnosed based on clinical manifestations but serological tests against auto-antibodies are available. The presence of cyclic citrullinated peptides antibodies (aCCP) is strongly associated with a more severe, destructive disease course. Recently, a new test for the measurement of aCCP antibodies on the IMMULITE 2000(XPi) platforms was developed by Siemens Healthcare. Here we investigated the performance of this new anti-CCP test in three different hospital laboratories.

*Methods:* Serum aCCP levels were determined by aCCP IgG assay for IMMULITE 2000(XPi) systems (Siemens Healthcare), ImmunoScan RA Elisa test (Eurodiagnostica) or aCCP IgG assay on the Modular system (Roche Diagnostics). The evaluation protocol consisted of within-run imprecision and between-run imprecision on three levels, assessment of alternative materials and a method comparison. Methods were

compared by Passing and Bablok regression.

*Results:* Within run imprecision for aCCP IgG assay for IMMULITE 2000(XPi) was 6.8% at a level of 7.0 U/ml and between-run imprecision was 5.6% at a level of 8.4 U/ml. Method comparison according to Passing and Bablok showed good correlation of samples measured on two different Immulite analyzers ( $0.21 + 0.96x$  (n=40)). This study showed 100% agreement between positive and negative samples collected in serum and lithium-heparin (n=20) with good correlation ( $-0.12 + 1.08x$ ). Comparison of the IMMULITE 2000(XPi) aCCP test with aCCP on Immunoscan RA ELISA (n=112) and aCCP on the Modular system (n=140) resulted in a concordance of 90.2% and 94.8% respectively.

*Conclusion:* The aCCP assay on the IMMULITE 2000(XPi) has good performance characteristics and shows good concordance with the Immunoscan RA Elisa test and aCCP test on the Modular systems.

### 17. Measurement of Dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS): a comparison of Isotope-Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (ID-LC-MS/MS) and seven currently available commercial immunoassays

R.M. BÜTTLER<sup>1</sup>, A. KRUIT<sup>2</sup>, M.A. BLANKENSTEIN<sup>1</sup>, A.C. HEIJBOER<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, VU University Medical Center, Amsterdam; Eurofins Medical Laboratory<sup>2</sup>, Breda, The Netherlands*

*Introduction:* Dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) is an important marker of the adrenal gland. Its assessment is required in several adrenal diseases, such as adrenal tumours, adrenal insufficiency and congenital adrenal hyperplasia. Most

clinical laboratories assess DHEAS using commercially available immunoassays. The aim of the present study was to investigate the accuracy of currently available commercial DHEAS assays.

**Methods:** Our ID-LC-MS/MS method was described earlier (1). The intra-assay CV is 4.1%. Seven currently available DHEAS assays were compared to our ID-LC-MS/MS method by assessing 75 serum samples (concentration range 0.06 - 20.6 µmol/L measured by ID-LC-MS/MS) by each method as well as performing recovery experiments and dilution series. Data obtained in the present study were also compared to data of the Dutch, British and German External Quality Assessment Schemes (EQAS).

**Results:** Three methods agreed well with ID-LC-MS/MS (R between 0.93 and 0.99 and slopes ranging from 0.92 to 1.07) and showed good recoveries (range 76 - 115%). Four methods showed standardization problems (slopes were 0.84, 1.14, 1.20

and 1.28) and recoveries in these methods were 61 - 85 %, 103 - 126 %, 115 - 136 % and 126 - 142 %, respectively. Intra-assay coefficient of variation were < 5.5% in six methods; one assay had an unacceptably high intra-assay coefficient of variation of 18%. Linearity was good in all methods. Our data are in agreement with data obtained in three EQAS's.

**Conclusions:** Some of the currently available DHEAS methods show standardization problems and/or a high variation. These problems have potentially adverse clinical consequences. We advise the manufacturers to improve their assays and laboratories to scrutinize the DHEAS method they employ.

**Literature:** (1) Büttler et al, Clin Chim Acta; 2012; 246-247.

## 18. C3-epimer cross-reactivity of automated vitamin D immunoassays

J.M.W. van den OUWELAND<sup>1</sup>, A.M. BEIJERS<sup>1</sup>, H. van DAAL<sup>1</sup>, M.G.L.M. ELISEN<sup>2</sup>, G. STEEN<sup>3</sup>, J.P.M. WIELDERS<sup>4</sup>  
*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Canisius Wilhelmina Hospital, Nijmegen; Department of Clinical Chemistry<sup>2</sup>, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam; Department of Clinical Chemistry, Bronovo Hospital, Den Haag; Department of Clinical Chemistry<sup>4</sup>, Meander Medical Center, Amersfoort, The Netherlands*

**Introduction:** Presence of the 3-epi-25-hydroxyvitamin D3 (3-epi-25(OH)D3) metabolite affects quantification of 25(OH)D3 in most routine liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods and to an unknown extent in present immunoassays. We studied the recovery of added and native 3-epi-25(OH)D3 in five immunoassays.

**Methods:** An LC-MS/MS method separating 25(OH)D3 and 3-epi-25(OH)D3 was used as reference method to study 3-epi-25(OH)D3 cross-reactivity in currently available automated immunoassays (Abbott Architect, Siemens Centaur, DiaSorin Liaison, IDS iSYS) and one competitive protein binding assay (CPB)(Roche Elecsys). Native samples used were adult plasma and neonatal plasma samples containing significant concentrations of 3-epi-25(OH)D3. Analytical recovery was determined by addition of exogenous 3-epi-25(OH)D3 to neonatal and adult plasma samples.

**Results:** None of the four immunoassays showed cross-reactivity to 3-epi-25(OH)D3 in either native or spiked plasma samples. Although the CPB assay showed a 50% cross-reactivity to 3-epi-25(OH)D3 from exogenous addition, the 3-epi-25(OH)D3 was hardly recognized in native samples, containing up to 58% of 3-epi-25(OH)D3. Compared to LC-MS/MS, the DiaSorin Liaison assay showed a marked positive bias in neonatal plasma samples, not related to 3-epi-25(OH)D3 cross-reactivity.

**Conclusion:** 3-epi-25(OH)D3 is not recognized by presently used automated immuno- or CPB assays in native samples. Exogenous 3-epi-25(OH)D3 added to human plasma is not suitable for analytical recovery testing, as is shown by the CPB assay. Caution is warranted when using samples spiked with vitamin D metabolites for testing analytical specificity or external quality assurance in immuno- or protein binding assays.

## 19. Influence of sample type and delayed separation from cells on measurement of B-type natriuretic peptide with the Architect system

M.J.W. JANSSEN, M.H. VELMANS, N. WILLEMSE  
*Laboratory of Clinical Chemistry and Haematology, VieCuri Medical Center, Venlo, The Netherlands*

**Introduction:** The use of heparin plasma or serum as an alternative to EDTA plasma is of particular interest for B-type natriuretic peptide (BNP) measurements. Plastic lithium heparin and serum tubes containing a gel layer are commonly used for the determination of routine biochemical parameters, including cardiac markers. The goal of this study was to determine the feasibility of measuring BNP using heparin plasma, serum and EDTA plasma retrieved from plastic gel tubes with the Abbott Architect i2000 system. The influence of delayed separation from cells in the valid tubes was subsequently investigated.

**Methods:** Venous blood from 34 consecutive patients admitted at the division of cardiology was collected in four Becton Dickinson vacutainer test tubes: regular (non-gel) EDTA, EDTA-gel, heparin-gel and serum-gel. Stability in whole blood was examined using venous blood drawn from 9 patients.

**Results:** BNP measured on the Architect was systematically underestimated in serum-gel when compared to regular EDTA (slope 0.67; R=0.994). A low-grade but significant difference was observed with heparin-gel (slope 1.12; intercept -6.0 ng/L; R=0.996). EDTA-gel showed no significant difference compared to regular EDTA (R=0.999). The mean percentage change of BNP concentration in whole blood over 4, 8 and 24 hours delayed separation from cells is, respectively, -6.8, 1.4 and -17.9 in the regular EDTA tube, and -9.4, -3.8 and -19.1 in EDTA-gel.

**Conclusions:** Heparin plasma and serum do not seem to be a suitable alternative to EDTA plasma for measurement of BNP using the Architect system. The recently introduced EDTA-gel tube turned out to be valid. BNP is shown to be stable in whole blood for at least 8 hours when collected in regular EDTA or EDTA-gel tubes.

## 20. Evaluation of the Tosoh Bioscience 25OH vitamin D assay

J.P.M. WIELDERS<sup>1</sup>, R. te STROET<sup>1</sup>, S. MARIVOET<sup>2</sup>  
*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Meander Medical Centre, Amersfoort, the Netherlands; Tosoh Europe NV<sup>2</sup>, Tessenderlo, Belgium*

**Introduction:** Reliable 25(OH)vitamin D3 (25OHD3) assays are needed for the growing demand for measuring the vita-

min D status. TOSOH company introduced end 2012 its ST AIA-PACK 25-OH Vitamin D assay (Tosoh25OHD kit), which

claims to measure both 25OHD3 and 25OHD2 in equimolar way. We tested precision and linearity, imprecision profile and LOQ, sample stability and correlation with the Roche assay.

**Methods:** We used an EP10 and EP5 protocol (EPEvaluator) for basic precision and linearity testing. Method correlation with the Roche Elecsys Vitamin Dtotal was performed with 75 left over serum samples. Sample stability was tested by three freezing - thawing cycli of 5 different sample pools and by storage of these 5 pools up to 4 days at room temperature and at 4 °C. The Tosoh analyzer AIA-900 and the Tosoh25OHD kit were used as prescribed by Tosoh.

**Results:** Three freezing and thawing cycli decreased the original 25OHD concentration on average with less than 5 %. The TOSOH assay correlated very well with Roche Dtotal: Tosoh = 0.87 Roche + 3.3 ng/mL. The LOQ at 10 % CV is less than 4.6 ng/mL (11.5 nmol/L). Linearity over the range 10-40 ng/mL is fine. From the EP10 protocol we calculated a within run CV of 4.9% at 11.4 ng/mL and a CV of 2.2% at 41.9 ng/mL.

**Conclusion:** This simple evaluation shows that the analytical results of the new Tosoh 25OHD kit are very satisfactory for measuring serum 25OHD in patients samples. Additional testing, for example measuring traceability to NIST standards and recovery of 25OHD2 would complete the picture.

## Chromatografie: HPLC, GC, CE

### 21. Evaluatie van HbA1c middels capillaire elektroforese met de Capillarys 2 Flex Piercing analyzer

A.J. BAKKER, A. Vlieg, M. SOBAHI, B.S. van der VEEN, A. WOLTHUIS

St. Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden

**Inleiding:** HbA1c kan met verschillende methoden (HPLC, Immunochemie) worden gemeten. Onlangs is capillaire elektroforese aan dit arsenaal toegevoegd. Wij hebben de Capillarys-2-Flex-Piercing (C2FP) analyzer (CE, Sebia) vergeleken met de Integra-800 (Immunochemie, Roche) en de Tosoh-G8 (HPLC, Sysmex).

**Methode:** Alle methoden werden gebruikt overeenkomstig de instructies van de leveranciers. De calibratie van de Integra-800 was aangepast overeenkomstig het advies van Roche Nederland. De reproduceerbaarheid werd getest met een 15-daags EP-15 protocol (triplo analyse van 3 controlemonsters). Tevens werden zowel routinemonsters als monsters met een abnormaal hemoglobine vergeleken.

**Resultaat:** Voor de drie controleniveaus (40, 60 en 85 mmol/mol) was de range voor binnenrun resp. tussenrun variatie voor de Integra: 1,6-2,2%/2,4-3,7%, voor de Tosoh-G8: 0,5-1,5%/1,1-2,1% en voor de C2FP (per individueel capillair): 0,8-2,1%/0,7-2,8%. Voor de HbA1c routinemonsters werden de volgende correlaties gevonden (N=265):

$C2FP=1,05 \times \text{Integra} + 1,73$ ,  $r=0,9915$ , bias(C2FP-Integra): 3,893;  $C2FP=0,94 \times \text{Tosoh-G8} + 0,27$ ,  $r=0,9968$ , bias(C2FP-Tosoh-G8): -3,42;  $\text{Tosoh-G8}=1,12 \times \text{Integra} + 1,02$ ,  $r=0,9913$ , bias(Tosoh-G8-Integra): 7,31. Monsters met een Hb-pathie (55) of HbF (8) geven met de Integra bij 10/63 een fout-laag resultaat, bij de Capillarys bij 10/60 geen resultaat en meldt de Tosoh-G8 bij 9/63 een te laag schotelgetal en bij 39/63 de waarschuwing van de mogelijkheid van een abnormaal Hb. Bij het onderlinge vergelijk van deze monsters vallen bij C2FP-Integra, C2FP-Tosoh-G8 resp. Tosoh-G8-Integra 4/50, 20/50 en 20/52 buiten de 99%-range voor de bias bij de normale monsters.

**Conclusie:** Qua reproduceerbaarheid presteert de Capillarys-2 vergelijkbaar met de Tosoh-G8 en beter dan de Integra-800. Bij monsters met een Hb-pathie heeft de Tosoh-G8 duidelijk meer problemen om een HbA1c resultaat te produceren dan de Integra en de Capillarys-2. De laatste 2 hebben problemen met monsters met overwegend HbF. Alleen de Integra-800 blijkt HbA1c via de filterkaartjes procedure te kunnen meten.

### 22. Bloedafnamebuis-interferentie bij een LC-MSMS testosteron-bepaling

H.H. van ROSSUM<sup>1</sup>, R.Z. SHI<sup>2</sup>, R.A.R. BOWEN<sup>2</sup>

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium<sup>1</sup>, Bronovo ziekenhuis, Den Haag; Department of Pathology<sup>2</sup>, Stanford University, Palo Alto, USA

**Inleiding:** Tijdens de ontwikkeling van een LC-MSMS testosteron bepaling, werden we geconfronteerd met aanzienlijke en significante interferentie door verbindingen die werden geïntroduceerd bij gebruik van bepaalde bloedafnamebuizen. Deze verbindingen hadden dezelfde massatransities en retentietijd als testosteron. Naar aanleiding van deze bevinding werd de bron en mate van interferentie voor verschillende afnamebuizen onderzocht.

**Methode:** De testosteron-bepaling maakte geen gebruik van een derivatiseringsstap en was gebaseerd op een vloeistof-vloeistof extractie met tert-butyl methyl ether als monstervoorbewerking. De analyse werd verricht middels reverse-phase vloeistofchromatografie, ESI-ionisatie in de positieve modus en multiple reaction monitoring (289,4->97,1; 289,4->109,1 voor testosteron) op een API 5000 massaspectrometer (AB Sciex). Testosteron-d3 werd als interne standaard gebruikt. Verschillende bloedafnamebuizen werden geïncubeerd, met dubbel houtskool gestript serum, een laag (0,63 nmol/l) en hoger (10 nmol/l) testosteron monster, gedurende verschillende

tijdsintervallen. Verder werd gekeken wat de oorzaak van de interfererende verbindingen was door coating-, gel- en dop-materiaal van buizen met interfererende verbindingen te incuberen in gestript serum.

**Resultaat:** Er werd significante interferentie waargenomen bij gebruik van bepaalde bloedafnamebuizen. De voornaamste bron van interfererende verbindingen was de scheidingsgel van de bloedafnamebuizen van Becton-Dickinson. De mate van interferentie nam toe bij langere incubatietijden en was vooral zichtbaar bij de 289,4->97,1 massatransitie. Het is ons helaas niet gelukt om door aanpassingen aan de methode testosteron te scheiden van de interfererende verbindingen.

**Conclusie:** Bij gebruik van bepaalde bloedafnamebuizen werd significante interferentie waargenomen in onze LC-MSMS testosteron bepaling. Toepassing van de ratio van beide testosteron transities als controle parameter, kan deze interferentie ondervangen. Deze casus illustreert dat ook het controleren van de geschiktheid van afnamebuizen een belangrijk onderdeel uitmaakt van een (LC-MSMS) methodevalidatie.



### 23. Fully automated sample preparation of vitamin B1 and vitamin B6 in whole blood by using the TECAN EVO-150

F.A.L van der HORST, L. KOOLMEES, M. PLEUNES, Y. van LEUSDEN  
*Department of Clinical Chemistry, Reinier de Graaf Groep, SSDZ, Delft*

**Introduction:** Sample preparation of chromatographical tests is often labour intensive and prone to human errors. Automation of sample preparation has not been deployed extensively in medical laboratories. Here we present a fully automated sample preparation of vitamin B1 and vitamin B6 in whole blood as an example. To our knowledge this is the first study presented on a complex fully automated high volume sample preparation for these vitamins.

**Methods:** Our method is based on that of Chromsystems for the combined determination of Vitamin B1 and B6 in whole blood. After thawing the frozen samples, these were placed in the TECAN EVO150 for subsequent automated processing. Aliquoted volumes were reduced and optimized to fit the 96-wells SBS format, used for processing the samples. Incubation times and temperatures were optimized. After processing, the samples were analysed using liquid chromatography with a

locally developed common 150x3 mm RP-18 system combined with fluorescence detection. For internal and external quality assessment SKML reference materials were used.

**Results:** The analytical performance of the automated sample handling was better than the manual procedure. The between run reproducibility of the TECAN was < 7% in contrast to that of the original procedure (e.g < 14%) for both analytes. Based on the EP9 protocol, results of automated method correlated well with the Chromsystems method (e.g. within 10%). Based on the SKML external quality assessment scheme, the accuracy of the automated method was excellent.

**Conclusion:** Automation of complex sample handling by using the TECAN EVO150 is an attractive alternative for manually performed procedures. Next to this, the operational costs of complex sample handling are significantly reduced with automation.

### Vlamfotometrie, AAS, massaspectrometrie

### 24. Feasibility study: immunoaffinity extraction coupled online with LC-MS/MS for the quantification of total plasma testosterone

H.J.R. van FAASSEN<sup>1</sup>, R. BISCHOFF<sup>2</sup>, I.P. KEMA<sup>1</sup>

*Department of Laboratory Medicine<sup>1</sup>; University Medical Center Groningen; Department of Analytical Biochemistry<sup>2</sup>; University of Groningen*

**Introduction:** Immunoaffinity extraction in combination with LC-MS/MS combines the specificity of immunoaffinity extraction with the selectivity of mass spectrometric detection. Recent publications show the applicability of offline immunoaffinity extraction in combination with LC-MS/MS for low molecular weight biomarker testing. We explored the possibility of coupling immunoaffinity extraction online with LC-MS/MS to quantify total plasma testosterone.

**Methods:** Polyclonal and monoclonal antibodies against testosterone were Protein-A purified and immobilized on a high performance resin developed in our lab. After addition of deuterated testosterone, 250 µL plasma was pretreated after disrupting protein binding to release testosterone. A 25 µL plasma equivalent was analyzed using the immunoaffinity- or C8-sorbent. Reversed phase chromatography was performed with mass spectrometric detection on a quadrupole tandem mass spectrometer with positive electrospray ionization. Extraction and elution parameters were optimized with respect to

ion suppression and reusability. Results were compared to SPE on the C8-cartridge.

**Results:** Total analysis for the online immunoaffinity clean-up was 4 min in comparison to 2.5 min for the C8-clean-up. Ion suppression experiments showed that immunoaffinity extraction gives comparable results to C8-extraction (~10% suppression). Immunoaffinity cartridges could be used up to at least 9 times without significant decrease in extraction efficiency and proved to be stable over a period of 6 months at 6 °C.

**Conclusion:** We showed that it is feasible to combine online immunoaffinity extraction with LC-MS/MS for the determination of total plasma testosterone. The immunoaffinity extraction performs in terms of speed and ion suppression comparable to traditional C8-extraction. Currently we are investigating the possibility of combining different antibodies on one cartridge to capture different classes of compounds. This would enable the quantification of disease specific biomarker panels.

### 25. In-line LC-MS/MS methode voor het meten van cortisol in haar

A. van der VEEN<sup>1</sup>, C.P. van der LEY<sup>1</sup>, H.J.R. van FAASSEN<sup>1</sup>, R.A. KOSTER<sup>2</sup>, I.P. KEMA<sup>1</sup>

*Afdeling Laboratoriumgeneeskunde<sup>1</sup>; Afdeling Klinische Farmacie en Apotheek<sup>2</sup>, Universitair Medisch Centrum Groningen, Groningen*

**Inleiding:** Sinds enkele jaren evalueren we het meten van cortisol in haar. Het blijkt dat onder andere (steroïde) metabolieten die zich in het lichaam bevonden in haar worden opgeslagen en meeschuiven met het groeiende haar. Hierdoor is het mogelijk het cortisolverloop van de afgelopen maanden aan te tonen. Wij onderzochten de mogelijkheid om in-line solid phase extractie in combinatie met massaspectrometrische detectie als analyse techniek toe te passen.

**Methode:** Haarmonsters van 50 mg werden tevoren gewassen met dichloormethaan. Daarna werden haarfragmenten verpulverd met behulp van een ball mill in aanwezigheid van methanol. In-line solid phase extraction werd uitgevoerd met Hypsphere C18HD cartridges. Chromatografische scheiding werd uitgevoerd op een Luna Phenyl-Hexyl kolom. Massaspectro-

metrische detectie van cortisol werd uitgevoerd in negatieve mode en multiple reaction monitoring.

**Resultaat:** De totale analysetijd inclusief extractie bedroeg 9 minuten. De gemeten cortisolconcentraties van 6 verschillende gezonde vrijwilligers lagen tussen de 1,9 en 19,8 pg/mg. De haar cortisol concentraties van twee Cushing patiënten bedroegen 14 en 17 pg/mg. De interassay variatiecoëfficiënten op drie verschillende niveaus tussen 1,0 en 20 pg/mg waren als volgt 12,4, 6,2 en 5,5% (n = 6). Het was mogelijk om in verschillende opeenvolgende haarsegmenten, van 1 cm, verschillen in cortisolconcentraties aan te tonen. De natuurlijke terugloop in cortisolconcentratie als gevolg van veroudering van haar werd bevestigd en bedroeg ca. 1,4 pg/mg afname per centimeter segment.

*Conclusie:* Het is aangetoond dat met bovenstaande methode cortisol in haar met voldoende gevoeligheid en specificiteit te meten is met XLC-MS/MS. Pilotexperimenten laten zien dat de ontwikkelde extractiemethode ook geschikt is voor het

kwantificeren van diverse andere steroïden en metabolieten. De ontwikkelde XLC-MS/MS methode is geschikt voor het high-throughput meten van grote series haarmonsters.

## 26. Automated mass spectrometric quantification of cortisol and melatonin in saliva

H.J.R. van FAASSEN<sup>1</sup>, R.P.H. BISCHOFF<sup>2</sup>, I.P. KEMA<sup>1</sup>

*Department of Laboratory Medicine<sup>1</sup>; Department of Pharmacy<sup>2</sup>, University of Groningen, The Netherlands*

*Introduction:* Disruption of circadian rhythm can have serious health implications. Cortisol and melatonin show circadian rhythm and both are of interest in several research areas such as depression and metabolic syndrome. For field studies saliva is often the specimen of choice as participants can perform the sampling procedure at home. We developed an online solid phase extraction LC-MS/MS method for the combined analysis of cortisol and melatonin in saliva and which is applicable in a routine clinical mass spectrometry laboratory.

*Methods:* Saliva was collected with the Cortisol Salivette. Salivettes were centrifuged according to protocol and saliva was collected. Storage of samples was at -80 °C. After thawing of stored samples, deuterated internal standards were added to 250 µL saliva, subsequently 50 µL saliva equivalent was injected onto the Symbiosis system. Online sample extraction was performed with Oasis HLB cartridges and chromatographic separation was achieved within 7.5 min on a Luna Phenyl-

Hexyl column. Mass spectrometric detection in positive ionization mode was performed with a quadrupole tandem mass spectrometer.

*Results:* Intra- and inter-day precision were <10% at three different levels for both components. Linearity was excellent for cortisol and melatonin ( $r^2 > 0.99$ ). LLOQ for cortisol and melatonin was determined at 0.1 nM and 5 pM respectively, which is adequate for quantifying these hormones in saliva. There was no analytical interference from cortisone, as it was chromatographically separated from cortisol.

*Conclusion:* We developed a sensitive and specific method for the combined analysis of cortisol and melatonin in saliva. With slight modifications, the method can be used for serum samples as well. Currently the method is clinically validated in several studies in which the relation between circadian rhythm and psychiatric diseases is investigated.

## Moleculaire biologie

### 27. De invloed van het CYP3A4\*22 polymorfisme op serumconcentraties van quetiapine in psychiatrische patiënten

K. van der WEIDE<sup>1</sup>, J. van der WEIDE<sup>1,2</sup>

*Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>1</sup>, Ziekenhuis St. Jansdal, Harderwijk, GGz Centraal<sup>2</sup>, locatie Veldwijk, Ermelo*

*Inleiding:* Polymorfismen in cytochroom P450 (CYP450) enzymen zijn voor een groot deel verantwoordelijk voor interindividuele verschillen in plasma concentraties van CYP450-afhankelijke geneesmiddelen. CYP450 3A4 (CYP3A4) is betrokken bij het metabolisme van meer dan 50% van de voorgeschreven geneesmiddelen. Recent is een polymorfisme gevonden (CYP3A4\*22) dat, in tegenstelling tot de eerdere bekende polymorfismen, wel leidt tot een verminderd actief enzym. Dit heeft een vertraagde afbraak van het geneesmiddel en mogelijk bijwerkingen tot gevolg. Wij onderzochten in welke mate de aanwezigheid van dit polymorfisme een effect had op de uiteindelijke serumspiegels van patiënten die het antipsychoticum quetiapine kregen, een middel dat uitsluitend door CYP3A4 wordt gemetaboliseerd.

*Methode:* 238 patiënten die zijn behandeld met quetiapine, en van wie serumspiegels en dosisinformatie bekend waren, werden ge genotypeerd voor CYP3A4\*22 door middel van allel-

specifieke PCR, met als controle restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyse.

*Resultaat:* Draggers van het CYP3A4\*22 allel (wt/\*22 en \*22/\*22; n=31) hadden een 1,6-voud hogere serumspiegel van quetiapine dan wildtype patiënten (n=207; p=0,03) bij een vergelijkbare gemiddelde dosis (345 mg/dag in wildtype versus 364 mg/dag in draggers; p=0,67). De concentratie-dosis ratio (C/D) lag 33% hoger in draggers dan in wildtype patiënten (p=0,01). Het aantal patiënten dat een te hoge spiegel bereikte (>500 µg/l) lag ook hoger in \*22-allel draggers (16,1% versus 2,9%; p=0,007).

*Conclusie:* Draggers van het CYP3A4\*22 allel laten een verhoogde serumconcentratie van quetiapine zien bij een vergelijkbare dosis. Analyse van dit polymorfisme zou kunnen worden gebruikt om patiënten te identificeren die het risico lopen een te hoge dosis quetiapine te ontvangen.

### 28. CYP3A4\*22: eindelijk een farmacogenetische marker voor CYP3A4?

R.H.N. van SCHAIK, L. ELENS, D.A. HESSELINK, V. HAUFROID, A. MATHIJSSSEN, A. de GRAAN, T. van GELDER  
*Depts. Clinical Chemistry, Internal Medicine, Oncology and Hospital Pharmacy, Erasmus MC Rotterdam, The Netherlands; Dept. Oncology, University of Sydney, Australia*

*Inleiding:* CYP3A4 is betrokken bij het metabolisme van 55% van alle geneesmiddelen. Er zijn 21 DNA varianten beschreven van dit gen, die echter niet klinisch significant zijn vanwege lage allelfrequenties (<0,1%) of het ontbreken van een duidelijk effect (CYP3A4\*1B). In 2011 is een nieuwe variant beschreven, CYP3A4\*22 (intron 6 C>T (1), welke mogelijk klinisch relevant is. Doel van de studie was het vaststellen van de allelfrequentie in de Caucasische bevolking, het vaststellen van de effecten van deze variant op klassieke CYP3A4 fenotypingsprobes alsmede correlaties bestuderen met 4 klinisch toegepaste geneesmiddelen.

*Methode:* TaqMan analyse in de Rotterdam Study (n=6.285), erythromycine (n=45), midazolam (n=108), tacrolimus (n=185), cyclosporine (n=172) en paclitaxel (n=239) behandelde patiënten.

*Resultaat:* CYP3A4\*22 had een allelfrequentie van 6% (waaronder 13 (0,2%) homozygoten). Midazolam concentraties waren 32% hoger (p<0,01) in CYP3A4\*22 dragers terwijl de door CYP3A4 gevormde metaboliet in de erythromycine ademtest 40% lager was (p=0,032), passend bij een verlaagde CYP3A4 activiteit. CYP3A4\*22 dragers hadden een sterkere reductie in zowel totaal als LDL-cholesterol, passend bij een lagere

CYP3A4 activiteit en hierdoor hogere simvastatinespiegels. Tacrolimus doseringsbehoefte was 51% lager ( $p=0,018$ ) voor CYP3A4\*22 dragers om dezelfde dalspiegels te bereiken. Het effect was onafhankelijk van CYP3A5 genotype. Cyclosporine-behandelde CYP3A4\*22 dragers hadden een 20% lagere kreatinine-klaring ( $p=0,002$ ), passend bij verhoogde nefrotoxiciteit op cyclosporine. Paclitaxel-gerelateerde graad 3 neurotoxiciteit bleek significant geassocieerd met CYP3A4\*22 status (OR19,1;  $p=0,001$ ).

*Conclusie:* Met een allelfrequentie van 5% en significante effecten op het metabolisme van midazolam, erythromycine, simvastatine, tacrolimus, cyclosporine en paclitaxel lijkt CYP3A4\*22 mogelijk een klinisch relevante farmacogenetische marker te zijn.

*Literatuur:* (1) Wang et al. Pharmacogenomics. 2011;12:481-92.

## Overigen

### 29. Carbamylation of albumin is a cause for the discrepancy between various albumin assays

M.B. KOK<sup>1</sup>, D. de HASETH<sup>2</sup>, F. TEGELAERS<sup>1</sup>, B. van DAM<sup>2</sup>, J. van PELT<sup>1</sup>

*Laboratory of Clinical Chemistry, Hematology and Immunology; Department of Internal Medicine<sup>2</sup>, Medical Center Alkmaar, The Netherlands*

*Introduction:* Several investigators have reported discrepancies between the bromocresol purper (BCP), bromocresol green (BCG) and immunonephelometric assays in a dialysis population. Differences have been observed up to 12 g/L. The cause of these observations has not yet been fully elucidated. This study compared the abovementioned assays. Furthermore, we investigated whether hemodialysis or carbamylation of albumin affected these assays.

*Methods:* Samples obtained from pre- and post-hemodialysis patients were analyzed with three different albumin assays. The effect of carbamylation was investigated by carbamylating human albumin in vitro using an isocyanate. Isocyanate reacts with the e-amino group of lysine to form homocitrulline. The homocitrulline content was determined in hydrolysates of patient plasma samples and in modified albumin to determine the extent of carbamylation.

*Results:* No differences were observed between samples pre-

and post-hemodialysis group, thereby ruling out interference of hemodialysis. In the control group BCG averaged 6 g/L higher when compared to immunonephelometry, whereas BCP averaged 1 g/L higher. In the dialysis group BCG averaged 5 g/L higher when compared to immunonephelometry, whereas BCP averaged 2 g/L lower. The largest observed difference was between BCP and BCG and was 11 g/L. Carbamylation of albumin in vitro resulted in a severe underestimation of albumin concentrations as measured by BCP. BCG and immunonephelometry were affected to a lesser extent. Homocitrulline content of hydrolysates was increased in both the carbamylated albumin as well as in the dialysis population.

*Conclusion:* Both BCP and BCG methods are not suitable for measuring albumin in a hemodialysis population. BCG overestimates the albumin concentration by 4-10 g/L. Carbamylation of albumin is the main attributor to the discrepancy found with BCP and leads to underestimation of 0-6 g/L.

### 30. Performance evaluation of the CellaVision Image Capture System (CICS) in peripheral blood films

S.M. SMITS, A. LEYTE

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

*Introduction:* Automated imaging processes have been successfully introduced where stained blood films are scanned by a computer-driven microscope. The CellaVision DM96 automatically provides a preliminary differential count of white blood cells (WBCs) on blood smears that is verified by a morphologist. A new system, the CICS, extends the CellaVision digital microscopy technology to satellite labs and can be used to manually capture digital images of blood smears. These images are transferred into an existing DM System at the core laboratory for differential count of WBCs by a morphologist without pre classification by the system. The aim of this study was to investigate the ability of the CICS to examine peripheral blood smears.

*Methods:* A total of 200 peripheral blood smears (100 normal and 100 pathological) were analyzed on the CICS in a multi-location setup and results were compared with the DM96 method

to establish the accuracy and short-term imprecision. For establishing the long-term imprecision, two blood smears were analysed for 20 days with the CICS.

*Results:* Evaluation of accuracy in 199 samples demonstrated a good correlation for the CICS compared with the DM96. Regression coefficients ranged from 0.97 ( $r^2 = 0.94$ ) for monocyte counts to 0.99 ( $r^2 = 0.98$ ) for neutrophil counts. The two methods did not significantly differ by either a constant amount or a proportional difference for the cell types analysed. The long-term imprecision was less than 5% for all analysed cell types. Comparison of the short-term imprecision demonstrated that the SD% did not differ by more than 1.1% between the DM96 method and the CICS method for the cell types analysed.

*Conclusion:* The CICS has proven to be capable in the morphological analysis of peripheral blood smears.

### **31. Low vacuum and discard tubes reduce hemolysis in samples drawn from intravenous catheters**

C. DUCKERS<sup>1</sup>, N.A.L.R. PETERS<sup>2</sup>, J.J.P. van DIJCK<sup>2</sup>, J.M.J. HOEIJMAKERS<sup>2</sup>, M.J.W. JANSSEN<sup>1</sup>  
*Laboratory of Clinical Chemistry and Hematology<sup>1</sup>; Emergency Department<sup>2</sup>, VieCuri Medical Center, Venlo, The Netherlands*

*Introduction:* In-vitro hemolysis is a great challenge to emergency departments where blood is drawn from intravenous catheters (IVC). Although high quality samples can be obtained by straight needle venipuncture, IVC are preferred for various reasons. The aim of this study was to identify blood collection practices that reduce hemolysis while using IVC.

*Methods:* The study was conducted at an emergency department where blood is drawn in >90% of cases from IVC (18 or 20 gauge). Hemolysis, measured spectrophotometrically, was compared between syringe and vacuum tubes. The following practices were tested in combination with vacuum collection; a luer-slip adapter, a luer-lock adapter, low vacuum tubes, and 6 mL discard tubes. Each intervention lasted 1 week and retrieved 154 to 297 samples. As reference, hemolysis was also measured in vacuum tubes retrieved from departments where

only straight needle venipuncture is performed.

*Results:* Vacuum collection led to more hemolytic samples compared with syringe tubes (24% versus 16% respectively,  $p=0.008$ ). No difference in hemolysis was observed when using the luer-slip or the luer-lock adapter. The use of discard (17% hemolytic,  $p=0.045$ ) and low vacuum tubes (12% hemolytic,  $p<0.001$ ) substantially decreased hemolysis. None of the interventions reduced the hemolysis rate to the level observed when drawing blood by straight needle venipuncture (3%,  $p<0.02$ ).

*Conclusion:* In summary, using discard and low vacuum tubes can both reduce hemolysis while drawing blood from IVC. Of these measures the use of a low vacuum tube is preferred considering the less volume of blood and the amount of tubes drawn. In order to guarantee high quality samples, however, drawing blood directly from IVC has to be avoided.

### **Investeringsbeleid, budgetbewaking, kostprijberekening**

### **32. Cost effectiveness of implementing a multimarker assay for early exclusion of NSTEMI**

M. KIP, L. STEUTEN, R. KUSTERS  
*Department of Health Technology and Services Research, University of Twente, Enschede, The Netherlands, Jeroen Bosch Ziekenhuis, Den Bosch, The Netherlands*

*Introduction:* Chest pain patients represent a large proportion of all acute hospitalizations, indicating the need for effective diagnostic strategies. Although cardiac troponin is the marker of choice to diagnose NSTEMI, serial troponin measurements remain necessary to exclude NSTEMI, indicating the potential benefit of a multimarker assay. This study describes the incremental cost effectiveness of a multimarker assay in excluding NSTEMI

*Methods:* Decision analytic modeling was used to determine the incremental cost effectiveness of a multimarker assay with higher analytical performance on both direct hospital costs and patient's discharge, compared to the current serial troponin measurement. Cost effectiveness was determined for varying analytical performances of the multimarker assay, reported as sensitivity and negative predictive value (NPV), and for three alternative implementation strategies

*Results:* Direct hospital costs of patients suspected of NSTEMI using the conventional serial troponin measurement are €989. A multimarker assay at the time of a patient's entrance at the CPU, combined with additional troponin assays after two and six hours (as in the current setting), results in direct hospital costs of €904, €863, or €798, and decrease as the analytical performance of the multimarker assay increases.

*Conclusion:* In this study an early economic evaluation was performed. Although this involves uncertainty in input variables, the strategy of implementing the multimarker assay with a given analytical performance followed by two additional troponin measurements was found to be most cost effective.

*Literature:* 1. Bassand JP, et al. Eur Heart J. 2007; 28: 1598-660. 2. Wang K, et al. N Engl J Med. 2003; 349: 2128-35. 3. Forberg JL, et al. BMC Emerg Med. 2006; 6: 6. 4. Keller T, et al. J Am Coll Cardiol. 2010; 55: 2096-106.

### **Dienstverlening, doorlooptijden, workflowanalyse**

### **33. Reflecterend testen in het klinisch chemisch laboratorium verbetert het zorgproces bij patiënten in de eerste lijn**

W.P.H.G. VERBOEKET - van de VENNE, H.A. KLEINVELD, W.P. OOSTERHUIS  
*Discipline Klinische Chemie, Atrium Medisch Centrum Parkstad, Heerlen*

*Inleiding:* Reflecterend testen is een procedure waarbij de laboratoriumspecialist aanvullende testen en/of interpretatief commentaar toevoegt aan een laboratoriaanvraag, na beoordeling (reflectie) van de resultaten. Deze vorm van consultverlening wordt voornamelijk toegepast bij eerstelijns diagnostiek. Door middel van een gerandomiseerde klinische trial is geëvalueerd wat de effectiviteit van reflecterend testen is voor het zorgproces van de patiënt.

*Methode:* Gedurende een aantal maanden werden uitslagrapporten, waarbij reflecterend testen werd toegepast, geïncordeerd. Direct na inclusie werden de rapporten at random verdeeld over een interventie- en een controlegroep ( $n=600$ , 300

per groep). Huisartsen van patiënten in de interventiegroep ontvingen behalve de testuitslagen, ook de door de laboratoriumspecialist toegevoegde testen met interpretatief commentaar. In de controlegroep ontvingen de huisartsen alleen de resultaten van de oorspronkelijke - door hen aangevraagde - testen. Na zes maanden werd informatie verzameld over laboratoriumonderzoek, behandelingen en/of verwijzing naar een specialist en ander diagnostisch onderzoek. Ook werd informed consent gevraagd aan de patiënten, om specifieke informatie uit het huisartsinformatiesysteem, zoals medische voorgeschiedenis en medicijngebruik, te mogen inzien.

*Resultaat:* In totaal retourneerden 269 patiënten het informed

consent formulier (interventiegroep n=148, controlegroep n=121). Reflecterend testen was nuttig/zinvol in 95% van de gevallen. In de interventiegroep werd een intentie tot een adequate behandeling c.q. actie door de huisarts waargenomen in 74% van de gevallen, in vergelijking tot 45% in de controlegroep. Een daadwerkelijke verbetering van het zorgproces

werd waargenomen in 70% van de gevallen in de interventiegroep, in tegenstelling tot 46% in de controlegroep ( $p < 0,001$ ). *Conclusie:* Reflecterend testen bewerkstelligt een significante verbetering van het zorgproces van de patiënt. Dit is de eerste grote gerandomiseerde trial naar de effectiviteit van reflecterend testen.

### 34. Verbetering van logistiek rondom het bloedafnameproces

M. SCHOORL, E.B.G. DEKKER, J. van PELT

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

*Inleiding:* Veranderingen in het zorgstelsel initiëren concurrentie tussen de ziekenhuizen en bij de laboratoria. Patiënten (cliënten) kiezen een ziekenhuis. Daarbij wordt o.a. gelet op korte wachttijden, goede service, aandacht en optimale (na-) zorg.

*Methode:* Op grond van de resultaten van de patiënttevredenheidsonderzoeken en het belang van een efficiënte bedrijfsvoering is er een project gestart om de logistiek rondom het bloedafnameproces in het afnamelaboratorium van het MCA door te lichten en te verbeteren.

*Resultaat:* Per dag bezoeken circa 250 cliënten het afnamelaboratorium, zij kunnen globaal in 3 stromen worden ingedeeld: routine-bloedafname, cito-bloedafname en afgifte materialen. Voor logistieke procesbeheersing van de verschillende patiëntenstromen is in 2011 het Q-Matic Patiënt Begeleidingsstelsel geïmplementeerd, dat de cliënt 'real time' informeert over o.a. de te verwachten wachttijd van een patiëntenstroom. Tegelijkertijd zijn bij de implementatie normen gedefinieerd

voor acceptabele wachttijden, maximale wachttijden en totale verblijfsduur in het afnamelaboratorium. Eén jaar ervaring met het Q-Matic systeem leert dat de gestelde norm voor cito-bloedafname (= totale wachttijd bij minimaal 95% minder dan 10 minuten) vrijwel wekelijks wordt gehaald. Het percentage cliënten voor routine-bloedafname met een totale verblijfsduur langer dan 20 minuten (gestelde norm maximaal 10%) laat een zeer sterke verbetering zien van 40% naar 22%. Kort voor de implementatie van het Q-Matic systeem is de mate van klanttevredenheid getoetst. De score met betrekking tot informatie omtrent de mogelijke wachttijd en de beleving van een acceptabele wachttijd bleek zeer gemiddeld: 3,4 (schaal 1-5). Eén jaar na de implementatie van het Q-Matic systeem is de beleving en waardering voor de wachttijd sterk gestegen tot 4,2.

*Conclusie:* Implementatie van het Q-Matic systeem heeft geleid tot een overzichtelijke patiëntenstroom, een significante verbetering van de wachttijden en tevreden cliënten.

### 35. Less or more? Vervolgdiagnostiek naar aanleiding van afwijkende schildklierwaardes in de huisartsenpopulatie

S.M.I. GOORDEN<sup>1</sup>, J. KOOREN<sup>1</sup>, W. de RONDE<sup>2</sup>, M.M. BUIJS<sup>1</sup>

*ATAL-Medial Diagnostische Centra<sup>1</sup>; Kennemer Gasthuis Haarlem<sup>2</sup>*

*Inleiding:* Schildklierfunctieonderzoek wordt frequent aangevraagd door huisartsen bij patiënten met klachten van moeheid en algemene malaise. Meestal blijkt de schildklierfunctie niet afwijkend of is er een primaire schildklierdysfunctie. Discrepancies in schildklierfunctietesten, zoals een laag-normaal TSH met een laag fT4 kunnen passen bij een centrale schildklierdysfunctie t.g.v. hypofysepathologie waarbij mogelijk ook uitval van andere endocriene assen. Gezien het potentieel ernstige karakter hiervan is een snelle identificatie van deze patiënten gewenst. Laboratoriumspecialisten kunnen hierbij van toegevoegde waarde zijn.

*Methode:* Bij verschillende eerstelijnspatiënten met discrepante schildklieruitslagen is additioneel labonderzoek ingezet naar de functie van de hypofyse-bijnieras en fertiliteitsas inclusief prolactine. Naar aanleiding van de resultaten vond afstemming met de huisarts en internist-endocrinoloog plaats.

*Resultaat:* We beschrijven twee casussen waarbij bovenstaand beleid is gevolgd. De eerste casus betreft een 57-jarige vrouw met moeheid en kouwelijkheid en de volgende labuitslagen:

TSH: 3,24 (0,3-4,2) mU/l, fT4: 7,4 (12-22) pmol/l, cortisol: 0,06 (0,06-0,54) umol/l, FSH: <1 (>25) U/l en prolactine: 1,09 (0,07-0,51) U/l. De internist-endocrinoloog diagnosticeerde een niet-producerend hypofysair macroadenoom. De tweede casus betreft een 57-jarige man met algemene malaise en de volgende labuitslagen: TSH: 0,31 mU/l, fT4: 7,4 pmol/l, cortisol: 0,86 umol/l, LH: 4 (2-9) U/l, totaal testosteron: 3 (4,6-31) nmol/l en prolactine: 0,33 U/l. Echter, bij consult bij de internist-endocrinoloog, 10 dagen later, waren alle assen genormaliseerd (TSH: 2,76 mU/l, fT4: 12,3 pmol/l, LH: 7 U/l, totaal testosteron: 31 nmol/l). Anamnestic leek de tijdelijke onderdrukking te passen bij een periode van psychische stress. *Conclusie:* De laboratoriumspecialist kan duidelijk toegevoegde waarde hebben bij het adequaat en snel identificeren van patiënten met hypopituitarisme in de huisartsenpopulatie. Echter, overdiagnostiek ligt op de loer, aangezien ogenschijnlijk afwijkende uitslagen niet altijd door hypofysepathologie veroorzaakt worden.

### 36. The use of simulation techniques to analyse critical pathways. Application to the logistics of emergency samples in a clinical chemistry department

F.A.L. van der HORST<sup>1</sup>, A. de WITT<sup>2</sup>, A. VERBREACK<sup>2</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Reinier de Graaf Group, SSDZ, Delft, The Netherlands; Faculty of Technology Policy and Management<sup>2</sup>, Technical University Delft, The Netherlands*

*Introduction:* Operational performance can be optimized by using several methodologies, such as Lean Six Sigma, Business Process Redesign or Critical Pathways. Although these methodologies are highly valued, they lack predictivity of the outcome of alternative operational options. This is mainly due

to the lack of instrumentation to calculate the impact of upstream operational alterations on downstream process steps. In contrast, we have shown that process simulation is an important tool for such impact analysis in complex multi-actor systems (1). Here we present the applicability of simulation

methodologies to analyse and optimize the logistics of STAT samples in a combined routine environment of a medical laboratory.

*Methods:* An Arena discontinue simulation model was build based on information of all external and internal sample logistics. Production features were extracted from the LIMS. Process characteristics and shortcomings were obtained with standard techniques, such as interviews.

*Results:* The validity of the Arena model was confirmed by a high concordance of the outcomes with the native behaviour of the system. The mutual dependencies of the (downstream) steps was clearly visualized by the Arena model. Fluctuations in the turnaround time of STAT-samples was mainly caused

by non-conformities of the human involvement in the process. That is, the waiting time could strongly be reduced by operational restrictions.

*Conclusion:* Simulation of processes proved to be very informative to end-users to optimize processes and quantitatively forecast the impact of alterations on downstream process steps, without actually changing them in daily practices.

*Literature:* (1) Widjaya R, van der Horst FAL, Seck M. Performance Improvement in Healthcare Processes. In proceeding of: Enterprise and Organizational Modeling and Simulation - 7th International Workshop, EOMAS 2011

### **37. The use of simulation techniques to improve complex workflow. Application to the optimization of the Abbott Accelerator track**

F.A.L. van der HORST<sup>1</sup>, E. van LANGELAAR<sup>2</sup>, M. SECK<sup>2</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Reinier de Graaf Group, SSDZ, Delft, The Netherlands; Faculty of Technology Policy and Management<sup>2</sup>, Technical University Delft, Delft, The Netherlands*

*Introduction:* Automated track systems are solutions to improve logistics of medical laboratories. Surprisingly, optimization of these complex systems is mainly done by 'rule of the thumb'. Previously we demonstrated that simulation is an interesting tool to optimize (1). Here we present to use of an object oriented discontinue Arena simulation model for the optimization of processes on the Abbott Accelerator track at our hospital

*Methods:* An object oriented simulation model was build in Arena, based on the configuration and characteristics of the track system in our laboratory. Unknown features of the Impeco track were mapped by using retro engineering of combined time stamps from video captures, data obtained for track listings and extracts from LIMS. The object oriented architecture of the model ensured the possibilities to adapt to other configurations and adopt to new features.

*Results:* The simulation model had a comparable behaviour

under routine conditions of the native system. The model also strongly followed the recovery profile of the system after maintenance. Based on this the model was expected to be valid for further behavioural experiments. The system performance was influenced by the number of tracks and belt speed. Preliminary results indicate that processing capacity of the I/O and storage module causes limitations for further optimization.

*Conclusion:* Object oriented simulation of the Abbott Accelerator track is a novel and interesting methodology to optimize the performance of the track. Mayor advantage of this approach is that the productivity is not compromised during the experiments.

*Literature:* (1) Widjaya R, van der Horst FAL, Seck M. Performance Improvement in Healthcare Processes. In proceeding of: Enterprise and Organizational Modelling and Simulation - 7th International Workshop, EOMAS 2011

### **38. Resultaten van 1 jaar MMA reflexmeting in de eerste lijn**

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

*Klinisch Chemisch Laboratorium Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen*

*Inleiding:* Sinds 1 januari 2012 wordt in ons laboratorium bij vitamine B12 (B12) aanvragen door de eerste lijn een reflexmeting op methylmalonzuur (MMA) uitgevoerd. Het doel is om de diagnostische opbrengst voor het screenen naar een functioneel B12 tekort te vergroten (1).

*Methode:* B12 (ref:150-700 pmol/l) en MMA (ref: <0,34 µmol/l) (2) werden respectievelijk met ECLIA (Roche) en LC-MS/MS (Waters) bepaald (3). MMA werd nabepaald bij B12 uitslagen tussen de 100 en 200 pmol/l (1). In het afgelopen jaar is bij 21% (1681/8013) van alle B12 aanvragen een MMA nabepaald.

*Resultaat:* Op basis van alleen de B12 meting heeft 8% van de patiënten een B12 tekort (B12 <150 pmol/l). Op basis van een verhoogd MMA heeft 7% een functioneel B12 tekort. Dit betreft echter niet de zelfde categorie patiënten als die van de

B12 meting; de helft van de verhoogde MMA uitslagen is afkomstig van patiënten met een B12 concentratie <150 pmol/l en de andere helft komt van patiënten met een B12 concentratie tussen de 150-200 pmol/l.

*Conclusie:* Deze studie bevestigt de toegevoegde waarde van de MMA reflexmeting voor het vaststellen van een functioneel B12 tekort bij, met name, intermediaire B12 concentraties (100-200 pmol/l). Nader onderzoek is nodig om de klinische meerwaarde van een op MMA gebaseerd screeningsprotocol vast te stellen.

*Literatuur:* 1. Wiersinga et al. Ned Tijdschr Geneesk. 2005;149:2789-94. 2. van den Ouweland et al. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk. 2011;36:263-4. 3. van den Ouweland et al. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk. 2011;36:260-2.

### **Point-of-care testing**

#### **39. Validatie van de HemoCue® WBC DIFF Analyzer**

D. POLAND, Y. van der HEIDE, M. SPANJERSBERG, J.H. HOOIJBERG

*Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Slotervaartziekenhuis, Amsterdam*

*Inleiding:* HemoCue heeft in 2010 een POC test voor een 5-part leucocytdifferentiatie ontwikkeld. Recent is een verbeterde

software versie geïnstalleerd om het systeem te optimaliseren. Wij hebben gekeken naar de regressie, precisie en intra-opera-

tor variabiliteit (capillair versus veneus).

**Method:** De HemoCue® WBC DIFF telt +/- 1000 cellen. 10 µl bloed wordt opgezogen in de WBC DIFF cuvette en m.b.v. methyleenblauw worden de kernen gekleurd. Beeldanalyse software differentieert tussen de verschillende cellen. De resultaten worden weergegeven binnen 5 minuten (zowel absoluut als in %). Bij 144 patiënten zijn de totale WBC en 5-part DIFF gemeten op de Abbott Cell Dyn Sapphire en de HemoCue® WBC DIFF Analyzer. Voor de EP5 evaluatie is gebruik gemaakt van Biorad Liquichek Hematology A (3 levels).

**Resultaat:** De resultaten voor de Deming regressie: totale WBC (3,1-37,8x10<sup>9</sup> /l);  $y=0,96x-0,09$ , Neutrofielen;  $y=0,93x+0,26$ , Lymfocyten;  $y=0,93x+0,12$  en N/L ratio (Neutro/Lymfo);  $y=0,67+0,21$ . De VC% within run (WR) en between day (BD)

voor de totale WBC; low 5,3 (WR) en 4,4 (BD), medium 7,1 (WR) en 3,8 (BD), high 3,3 (WR) en 2,8 (BD). De intra-operator variatie (n=6) tussen de capillaire N/L ratio (HemoCue) en veneuze N/L ratio (Cell Dyn) was:  $y=0,70x+0,23$  (R=0,91).

**Conclusie:** De HemoCue® WBC DIFF Analyzer correleert goed met de Cell Dyn. De imprecisie voor de within run en between day zijn bruikbaar als periodieke controle. De intra operator variatie is van belang wanneer de HemoCue® WBC DIFF Analyzer gebruikt gaat worden in bv huisartsen praktijken of op de SEH. Indien gekeken wordt naar de N/L ratio komen de uitslagen gemeten uit een capillair monster (HemoCue® WBC DIFF) goed overeen met een veneus monster gemeten op de Cell Dyn.

#### 40. Performance van de Clearview Simplify D-dimeer test

J. KLEIN GUNNEWIEK, T. PEETERS

*Afdeling Klinische Chemie en Hematologie, Ziekenhuis Gelderse Vallei, Ede*

**Inleiding:** In het kader van een mogelijke diep veneuze trombose (DVT) is, juist vanwege de hoge negatief voorspellende waarde, behoefte aan een POCT D-dimeer test in de huisartsenpraktijk. In de NHG Standaard DVT wordt op basis van de score van de eerstelijns beslisseregels in combinatie met de uitslag van de D-dimeer test de waarschijnlijkheid op DVT vastgesteld. Hierbij wordt geen onderscheid gemaakt tussen een D-dimeer uitslag verkregen via het laboratorium of een POCT device. In deze studie is de performance van de POCT D-dimeer (ClearView Simplify) vergeleken met die van het laboratorium (CA-7000).

**Method:** Bij 50 patiënten is een D-dimeer bepaling uitgevoerd op de CA-7000 (Siemens) en de ClearView Simplify (Alere Health BV). Met name patiënten met D-dimeer waarden tussen 0,5 en 1,5 mg/l zijn geselecteerd. De ClearView testuitslagen zijn door twee analisten onafhankelijk van elkaar geïnterpreteerd.

De afkapwaarde voor de CA-7000 en ClearView bedraagt, volgens opgave van de firma's, respectievelijk 0,5 en 0,8 mg/l.

**Resultaat:** In 25% van de gevallen bleek een D-dimeer waarde gemeten op de CA-7000 van >0,8 mg/l een negatieve uitslag te geven in de ClearView test. D-dimeer waarden gemeten op de CA-7000 met een negatieve ClearView uitslag varieerden van 0,87 tot 1,55 mg/l.

**Conclusie:** De afkapwaarde van de ClearView D-dimeer test ligt hoger dan de afkapwaarde zoals beschreven in de NHG Standaard DVT en de afkapwaarde, die in het laboratorium wordt gehanteerd. In onze handen kunnen D-dimeer waarden tot 1,55 mg/l negatief scoren in de ClearView test. Gebruik van de ClearView POCT D-dimeer test door de huisarts kan leiden tot verschillen in vervolgdagnostiek en behandeling.

#### Kwaliteit, referentiewaarden

#### 41. A multicenter evaluation of dysthyroxinemia in a defined patient cohort results in regional harmonization of reference ranges

J.A.P. BONNS<sup>1</sup>, M.H.J. VOGT<sup>2</sup>, M.J.W. JANSSEN<sup>3</sup>, A.J.M. NAUS<sup>2</sup>, W.P. OOSTERHUIS<sup>4</sup>, J. ten KATE<sup>5</sup>, P.P.C.A. MENHEERE<sup>1</sup>

*Central Diagnostic Laboratory<sup>1</sup>, Maastricht University Medical Center; Department of Clinical Chemistry and Hematology<sup>2</sup>, Laurentius Hospital, Roermond; Department of Clinical Chemistry and Hematology<sup>3</sup>, Viecuri Medical Center, Venlo; Department of Clinical Chemistry and Hematology<sup>4</sup>, Atrium Medical Center, Heerlen; Department of Clinical Chemistry and Hematology<sup>5</sup>, Orbis Medical Center, Sittard-Geleen, The Netherlands*

**Introduction:** In the region Limburg (the Netherlands) each laboratory uses a different immunoassay platform for determination of TSH and FT4. With the frequent transfer of patients within the region, harmonization of test result interpretation is necessary. In this multicenter study, we investigated dysthyroxinemia classification between participating laboratories and developed improvement procedures.

**Methods:** Two ring surveys with an interval of 2 years were performed. Four patient groups (n=100) with different dysthyroxinemia classification were based on biochemical results of the Autodelphia analyser (MUMC). Reference limits of all participating laboratories were taken in account. Serum samples were sent to four participating laboratories. In each group the percentage of patients classified with dysthyroxinemia was calculated and differences were analyzed by the Fisher's exact test.

**Results:** After the first survey, the percentage of patients with hyperthyroxinemia was more than 20% lower in three labora-

tories compared to the others. Bhattacharya analysis of FT4 data revealed that the upper reference limit of FT4 was 20 to 30% too high for two laboratories. Adjustments of reference ranges appeared to be effective in the second survey. A third laboratory reported significantly lower percentages (> 20%) of patients with hyperthyroxinemia in the second survey. New FT4 reference ranges were determined for this laboratory, that resulted in an adequate classification of hyperthyroxinemia.

**Conclusion:** This study illustrates the potential of a multicenter evaluation of dysthyroxinemia in a biochemical defined patient cohort. Especially, classification of hyperthyroxinemia differed between laboratories, mainly due to incorrect reference ranges. Adjustments of reference ranges resulted in better agreement of dysthyroxinemia classification. Even using internal and external quality assurance programmes, application of the described procedure is advised in order to prevent inadequate reference ranges.

## Automatisering, dataverwerking

### 42. GASTON – Uw elektronische laboratoriumsPECIALIST

A.K. BOER

*Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina Ziekenhuis, Eindhoven*

**Inleiding:** De medische zorg binnen ziekenhuizen wordt steeds complexer. Niet alleen het aantal diagnostische en therapeutische mogelijkheden neemt voortdurend toe, maar ook het aantal medische richtlijnen/protocollen stijgt gestaag. Om de zorgprofessional hierbij te ondersteunen ontwikkelde het Catharina Ziekenhuis samen met de Technische Universiteit Eindhoven, de beslissingsondersteuning software "GASTON".

**Methode:** GASTON is een softwarepakket dat ALLE beschikbare digitale informatie binnen het ziekenhuis kan ontsluiten en deze informatie kan structureren en analyseren volgens zelf te definiëren beslisregels en stroomschema's. Bovendien kan het op grond hiervan de vereiste actie(s) ondernemen, zoals het waarschuwen van de zorgprofessional met pop-up's/ werkljsten/ e-mails, het analyseren van aanvraagpatronen en het automatisch de interpreteren en genereren van (vervolg)diagnostiek. Ook patiëntendossiers kunnen worden geanalyseerd.

**Resultaat:** Om GASTON bruikbaar te maken binnen de klinische chemie hebben we nieuwe importfilters ontwikkeld en

is een universele nomenclatuur geïntroduceerd. Hierdoor hebben we inmiddels al een pallet aan klinisch chemische tools kunnen ontwikkelen. 1) Dankzij Gaston wordt bijvoorbeeld de opsporing van patiënten met een mogelijke heparine-geïnduceerde-trombopenie zo'n 2-3 dagen versneld. 2) De interpretatie van een zestal laboratoriumbepalingen m.b.t. vitamine B12 deficiëntie wordt door GASTON vrijwel foutloos afgehandeld. 3) Met GASTON hebben we bijvoorbeeld 800 patiëntendossiers binnen 2 uur volledig geanalyseerd ten aanzien van labbepalingen, klinische gegevens, medicatiegebruik en medische samenvatting (waaronder de klinische conclusie/diagnose).

**Conclusie:** GASTON is een flexibel softwarepakket dat zeer goed te gebruiken is binnen de klinische chemie. Omdat niet alleen laboratoriumbepalingen, maar ALLE elektronische informatie binnen het ziekenhuis door Gaston kan worden ontsloten, is GASTON zeer goed in staat om de consultfunctie binnen de klinische chemie naar het volgende hogere plan te tillen.

Categorie 3 Klinisch

### Hart- en vaatziekten, atherosclerose

### 43. Within-day and between-week variation of cardiac troponin in patients with chronically elevated cardiac troponin concentrations

L.J.J. KLINKENBERG<sup>1</sup>, J.-W. van DIJK<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; Department of Human Movement Sciences<sup>2</sup>, NUTRIM School for Nutrition, Toxicology and Metabolism, Maastricht University Medical Center*

**Introduction:** Acute myocardial infarction is defined by a cardiac troponin concentration above the 99th percentile together with a rising and/or falling pattern. Defining significant changes requires knowledge of both biological and analytical variation. Although these measurements by definition can only be performed with healthy individuals, this population may not be representative for patients where cardiac troponin measurement is of clinical interest. Therefore, we evaluated within-day and between-week variation of cardiac troponin in patients with chronically elevated cardiac troponin concentrations under highly standardized conditions.

**Methods:** Twenty-three diabetes type 2 patients were studied on three occasions with intervals of one week. Within-day variation was assessed under inactivity, as well as under daily physical activity and blood samples were collected at standardized times (9 occasions between 08.30 and 19.30 hr). Cardiac

troponin T was measured with a high-sensitivity assay (Roche Diagnostics) and reference change values (RCV) were computed according to the analytical and intra-individual variances (CVA, CVi).

**Results:** Within-day CVA and CVi values were 2% and 14% under inactive conditions, and 2%, 13% under physical activity, respectively. Inactive and active within-day RCVs were 40% and 36%, respectively. Between-week CVA and CVi values were 2% and 10%, resulting in a RCV of 28%.

**Conclusion:** Within-day biological variation of cardiac troponin in patients with chronically elevated cardiac troponin concentrations is lower compared to the biological variation previously demonstrated in healthy individuals. Our results suggest that a short-term change of >40% can be used in attempting to diagnose acute myocardial injury.

### 44. Variation of cardiac troponin I and T measured with sensitive assays in hemodialysis patients

M. van BERKEL<sup>1</sup>, D.A. GEERSE<sup>2</sup>, C.J.A.M. KONINGS<sup>2</sup>, V. SCHARNHORST<sup>1</sup>  
*Clinical Laboratory<sup>1</sup>; Department of Internal Medicine<sup>2</sup>, Catharina Hospital, Eindhoven, The Netherlands*

**Introduction:** Myocardial infarction (MI) is defined as a change in cardiac troponin with appropriate clinical symptoms and at least one troponin result exceeding the 99th percentile. The 99th percentile strongly depends on the reference population used to determine this value. It is essential to discriminate acute cardiac damage from other causes of troponin elevation. In this study, we investigated inter individual variation of troponin measured with a sensitive cTnI en hs-cTnT assay in hemodialysis patients.

**Methods:** This study was a prospective study with 206 chronic hemodialysis patients. cTnI and cTnT was determined using cTnI-ultra assay (Siemens) and hs-cTnT assay (Roche). Patients

with a history of cardiac events were excluded from analysis. The 99th percentile of absolute changes (97 patients with 764 results of cTnI and 77 patients with 599 results of cTnT) were obtained by calculating the variation of troponin between samples drawn with a 3 monthly interval for 16 months.

**Results:** cTnI and cTnT mean absolute values in patients with no history of a cardiac event exceeded the 99th percentile reference values reported for the respective assays. The overall 99th percentile of change for TnI was 0.20 ug/L and 113 ng/L for cTnT. Patients (n=5) analysed with MI exceeded this 99th percentile of variation significantly, with an minimal change from individual specific baseline TnT of 146 ng/L.



*Conclusion:* We have established reference intervals for variation of cTnI and cTnT in hemodialysis patients. Preliminary data suggest that cTnT levels in hemodialysis patients with an

acute MI exceed the 99th percentiles of variation for cTnT. This suggests that for every dialysis patient a baseline troponin may contribute to an early diagnosis of MI.

#### 45. Explaining cardiac troponin T concentrations in patients with chest discomfort: incremental value of renal function in addition to coronary atherosclerosis

E.P.M. CARDINAELS<sup>1</sup>, M.O. VERSTEYLEN<sup>2</sup>, I.A. JOOSEN<sup>2</sup>, B.L. KIETSELAER<sup>2</sup>, H.J. CRIJNS<sup>2</sup>, L. HOFSTRA<sup>2</sup>, O. BEKERS<sup>1</sup>, M.P. van DIEIJEN - VISSER<sup>1</sup>, A.M.A. MINGELS<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Maastricht University Medical Center; Department of Cardiology<sup>2</sup>, Maastricht University Medical Center, The Netherlands*

*Introduction:* Identifying patients with cardiovascular risk remains an ongoing challenge. We and others have demonstrated the association of high-sensitivity cardiac troponin T (cTnT) with the severity of coronary atherosclerosis, as well as the prognostic value of cTnT on the incidence of cardiovascular events (1). However, it remains to be elucidated to what extent renal impairment contributes to this elevation of cTnT levels.

*Methods:* A total of 1088 patients were enrolled presenting with chest discomfort at the outpatient department. Computed tomography (Brilliance 64, Philips Healthcare) was used to measure the coronary calcium score as well as the extent of coronary atherosclerosis. Next to cTnT (hsTnT, Cobas 6000, Roche Diagnostics) also serum creatinine (Synchro LX20, Beckman Coulter) and cystatin C (BN ProSpec, Siemens) were measured to estimate the glomerular filtration rate (eGFR\_CKD-EPI, eGFR\_MDRD and eGFR\_cysC). Regression analysis was applied to examine the association with high-sensitivity cTnT concentrations.

*Results:* Univariate regression analysis demonstrated that increasing hsTnT concentrations (median 4.1 ng/L, IQR <3.0-6.7 ng/L) were associated with lower eGFR\_cysC-values ( $b=-0.269$ ;  $p<0.001$ ) and higher calcium scores ( $b=0.190$ ;  $p<0.001$ ). In the unadjusted multiple regression model, eGFR\_cysC and calcium scores were both found to be independent predictors ( $b=-0.289$ ;  $b=0.142$ ; both  $p<0.001$ , respectively). Similar results were found when eGFR was estimated by serum creatinine levels. These associations remained valid after adjustment for traditional cardiovascular risk factors.

*Conclusion:* In patients presenting with chest pain an elevated cTnT is not only associated with more extensive coronary disease but also with a decreased renal function. Whether renal impairment is a marker for coronary atherosclerosis or that it hampers cTnT excretion, or both, is subject of further studies.

*Literature:* (1) Mingels et al. Plos One. 2012;7(4):e35059.

#### Endocrinologie en intermediaire stofwisseling

#### 46. Diagnostic value of testosterone (T), free testosterone (fT), and free androgen index (FAI) in polycystic ovary syndrome

H.N. BUI<sup>1</sup>, P.M. SLUSS<sup>2</sup>, S. BLINCKO<sup>3</sup>, D.L. KNOL<sup>4</sup>, M.A. BLANKENSTEIN<sup>1</sup>, A.C. HEIJBOER<sup>1</sup>

*Dept. of Clinical Chemistry<sup>1</sup> and Dept. of Epidemiology and Biostatistics<sup>4</sup>, Neuroscience Campus Amsterdam, VU University Medical Center, Amsterdam; Clinical Pathology Core Laboratory<sup>2</sup>, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA; Abbott Diagnostics<sup>3</sup>, Wiesbaden, Germany*

*Introduction:* The introduction of more accurate methods for T-analysis, such as liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) or next-generation immunoassays, may assist in reaching a consensus on the definition of hyperandrogenism, one of the diagnostic criteria of polycystic ovary syndrome (PCOS). The objective of the study was to determine reliable reference intervals for T, fT, and FAI and to test the discriminative value of these parameters in a PCOS-population using accurate methods.

*Methods:* Serum was obtained daily during a normal menstrual cycle from 25 healthy women (743 data-points). A single serum was obtained from 43 PCOS-patients. T was measured by LC-MS/MS and by Architect® 2nd Generation Testosterone Immunoassay. Sex hormone-binding globulin was measured to calculate fT (Vermeulen) and FAI ( $[T]/[SHBG]*100$ ).

*Results:* The values found in PCOS-patients were 1.5 nmol/L

(0.6-3.2), 31 pmol/L (9-60), and 3.8 (0.8-15) (median (range)) for T, fT, and FAI, respectively, by LC-MS/MS. By immunoassay, this was 1.6 nmol/L (0.7-2.9), 32 pmol/L (12-62), and 4.3 (1.1-16), respectively. The reference intervals (central 95%) were calculated taking the underlying data structure into account,  $T=0.3-1.6$  nmol/L and  $0.5-2.0$  nmol/L,  $fT=5.2-26$  pmol/L and  $7.2-33$  pmol/L, and  $FAI=0.4-2.9$  and  $0.6-4.4$ , by LC-MS/MS and immunoassay, respectively. The area under the curve of receiver operator characteristic plots were 0.84, 0.91, and 0.91 for T, fT, and FAI, respectively, by LC-MS/MS and 0.83, 0.90, and 0.89, respectively, by immunoassay. The parameters showed no distinct pattern across the menstrual cycle in all individuals indicating that the day of sampling is clinically not relevant.

*Conclusion:* Apart from providing reliable reference ranges, our data confirm the importance of taking SHBG into account when assessing androgen status in patients evaluated for PCOS.

#### 47. Changes in sCD163 following 3 months caloric restriction are not related to changes in BMI, estimated adipose tissue mass and glucose homeostasis in obese women

J.J.G. HILLEBRAND<sup>1</sup>, F.N.R. van BERKUM<sup>2</sup>, A.H.L. MULDER<sup>1,3</sup>

*Clinical Chemistry<sup>1</sup> and Internal Medicine<sup>2</sup>, ZGT Hengelo; Medlon, Enschede<sup>3</sup>*

*Introduction:* Obesity is known as a state of low-grade chronic inflammation. With increasing adiposity, macrophages accumulate in adipose tissue (AT) and glucose homeostasis deteriorates. CD163, a macrophage-specific scavenger receptor, and its extracellular part sCD163 have been proposed as biomark-

ers for AT inflammation and predictors of development of type 2 diabetes and its metabolic complications (1). These promising data could, however, not always be confirmed by others (2). *Methods:* We measured changes in BMI, % AT mass, glucose homeostasis and serum sCD163 levels in obese, insulin

resistant women before and after a 3-month period of caloric restriction. Patients were allocated to one of four energy-restricted diets with 33% of energy requirement, but different macronutrient composition (3). We hypothesized that changes in serum sCD163 levels would be associated with changes in BMI, % AT and glucose homeostasis.

**Results:** After 3 months of caloric restriction, mean BMI, % AT mass, and fasting insulin levels decreased, while HOMA improved. Caloric restriction reduced serum sCD163 levels, however changes in serum sCD163 were not related to changes in BMI, % AT, serum insulin nor HOMA. Changes in serum

sCD163, BMI, % AT, serum insulin and HOMA were also not related to diet group.

**Conclusion:** These data show that serum sCD163 decreases following caloric restriction in obese women which was not related to changes in BMI, AT and glucose homeostasis. Thus, we found no evidence for a possible role of sCD163 as a biomarker of disturbed early type 2 diabetes.

**Literature:** (1) Moller et al. Clin Chem. 2011; 57: 291-29. (2) Aron-Wisnewsky. J Clin Endocr Metabol. 2009; 94: 4619-23. (3) Soenen et al. Physiol Behav. 2012;107:374-80.

#### 48. Cushing's syndroom door interactie van antiretrovirale therapie met cosmetische crème

M.M.L. DECKERS<sup>1</sup>, J.W. BOSMA<sup>2</sup>, L. van MANENSCHIJN<sup>3</sup>, E.F.C. van ROSSUM<sup>3</sup>, R. MAATMAN<sup>4</sup>, J. VEENSTRA<sup>2</sup>

*Klinisch Laboratorium<sup>1</sup>, St Lucas Andreas Ziekenhuis, Amsterdam; Interne geneeskunde<sup>2</sup>, St Lucas Andreas Ziekenhuis, Amsterdam; Interne Geneeskunde<sup>3</sup>, Erasmus MC, Rotterdam; Klinisch Laboratorium<sup>4</sup>, Ziekenhuis groep Twente, Medlon, Hengelo*

**Inleiding:** Interactie van antiretrovirale therapie met medicatie kan leiden tot ernstige bijwerkingen door remming van cytochrom P450-3A4 activiteit. In dit case report beschrijven we een patiënte die behandeld wordt met antiretrovirale therapie (o.a. ritonavir) vanwege een HIV-infectie. Na een vakantie in Thailand bemerkte ze een opgezwollen gezicht, moeheid en amenorroe. Het cortisol was sterk onderdrukt in bloed en 24-uurs urine. Anamnestic gebruikte de patiënte geen medicatie die steroïden bevatte, maar wel cosmetische crèmes die in Thailand waren gekocht.

**Methode:** Om de oorzaak van de onderdrukte hypofyse-bijnier-as (HPA-as) te achterhalen werd een steroïdprofiel in urine bepaald met GC-MS. Daarnaast werd de cortisol concentratie in hoofdhaar geanalyseerd om retrospectief de gemiddelde concentratie cortisol van het afgelopen jaar te bestuderen. Vervolgens werden drie van de vier crèmes onderzocht op de mogelijke aanwezigheid van steroïden.

**Resultaat:** In het steroïdprofiel van de urine was een prednisolon-achtige component aantoonbaar en was de productie van alle overige bijniersteroïden onderdrukt. Deze component was verdwenen nadat het gebruik van de crèmes was gestopt. Daarnaast was de cortisol concentratie in hoofdhaar verlaagd tijdens gebruik van de crèmes en dit herstelde na het stoppen van het gebruik van de crèmes. Analyse van drie van de vier crèmes kon de aanwezigheid van een steroïd tot nu toe niet bevestigen. Nadat gestopt is met deze crèmes steeg het cortisol en verdwenen de symptomen.

**Conclusie:** Hoewel het steroïde niet exact is gekarakteriseerd concluderen wij dat de remming van cytochrom P450 activiteit door ritonavir leidde tot stapeling van een glucocorticoïd-achtige substantie resulterend in Cushing's syndroom en onderdrukking van de HPA as. Daarnaast toont deze casus aan dat het gebruik van multidisciplinair vervolgonderzoek behulpzaam kan zijn in het opsporen van steroïden.

#### 49. Het vitamine D-lemma in de huisartsenpraktijk

R.J.A.C. ROELOFSEN - de BEER<sup>1</sup>, E.A. SCHOUTEN - OERLEMANS<sup>2</sup>, H.J. de JONG<sup>3</sup>, J. MUTHU<sup>4</sup>, F.W.M. SEESING<sup>5</sup>, P.C. DIRVEN-MEIJER<sup>6</sup>, S.C. ENDENBURG<sup>1</sup>, J.M.T. KLEIN GUNNEWIEK<sup>1</sup>

*Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium<sup>1</sup>; Ziekenhuis Gelderse Vallei, Ede, huisartsen te Bennekom<sup>2</sup>, Veenendaal<sup>3</sup>, Ede<sup>4</sup>, Wageningen<sup>5</sup> en Renswoude<sup>6</sup>*

**Inleiding:** Vitamine D deficiëntie staat al geruime tijd in de belangstelling. Het verband tussen vitamine D en osteoporose, fracturen en vallen bij ouderen is overtuigend aangetoond: een lage 25(OH)D waarde vergroot de kans hierop. Daarnaast lopen er grootschalige onderzoeken naar de relatie tussen vitamine D en aandoeningen zoals verschillende soorten kanker, hart- en vaatziekten en infecties. De stortvloed aan onderzoek en adviezen levert vaak tegenstrijdige informatie op en ook over de bewijskracht en interpretatie zijn de meningen verdeeld. Op basis hiervan moet de huisarts omtrent vitamine D deficiëntie een helder beleid zien te formuleren dat recht doet aan de nieuwste kennis en inzichten, maar geen onnodig risico oplevert voor de patiënt. In deze studie is in de regio Gelderse Vallei een rondgang langs huisartsen gemaakt om een beeld te krijgen van diagnostiek en aanpak van vitamine D deficiëntie.

**Methode:** Op basis van het aanvraagpatroon voor de vitamine

D bepaling is een selectie gemaakt van 5 huisartsen. Deze huisartsen zijn bevraagd op hun beweegredenen om de vitamine D bepaling wel of niet aan te vragen en op het suppletiebeleid dat zij vervolgens hanteren.

**Resultaat:** Huisartsen zijn alert op een vitamine D tekort bij patiënten met onverklaarde vermoeidheid of osteoporose en bij ouderen en allochtonen. Een aantal huisartsen suppleert met 400 of 800 IE per dag zoals de Gezondheidsraad bij risicogroepen aanraadt, zonder vooraf de vitamine D spiegel te bepalen. Anderen bepalen eerst de vitamine D status om met een op-laaddosis de deficiëntie weg te kunnen werken en gaan daarna over op een dagelijkse onderhoudsdosis.

**Conclusie:** Totdat wetenschappelijk onderzoek meer duidelijkheid geeft over het beste vitamine D beleid, zal het D-lemma onder huisartsen wat betreft diagnostiek en suppletieregime blijven bestaan.

**50. Kwantificeren van het aantal eenheden te transfunderen packed cells leidt tot reductie van bloedverbruik**

M.M.C. SIMONS - HANEVEER, A.J. van GAMMEREN

*Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Amphia Ziekenhuis, Breda*

*Inleiding:* De 4-5-6-flexinorm introductie heeft geleid tot meer bewust omgaan met de indicatie bloedtransfusie. De norm geeft aan wanneer transfusie geïndiceerd is, maar geeft niet aan hoeveel er toegediend moet worden. Het opnemen van een nieuw beslisschema, gebaseerd op leeftijd, de pretransfusie Hb-concentratie en de cardiale belasting van de patiënt, leidt tot de vraag of en tot de vraag hoeveel er moet worden getransfundeerd. Het schema is erop gericht om bij hemodynamisch stabiele patiënten de posttransfusie Hb-concentratie niet boven 6,0 mmol/l uit te laten komen.

*Methode:* De leeftijd, de pre- en post transfusie Hb-concentratie en de cardiale belasting van de patiënt werden zowel voor als na de introductie van het nieuwe beleid in kaart gebracht. Er is een vergelijkingstudie gedaan tussen de situatie voor en na introductie van het nieuwe beleid. In deze vergelijking is de hemoglobineconcentratie pre- en posttransfusie, het aantal

aanvragen en het aantal eenheden per getransfundeerde patiënt per aanvragende afdeling geanalyseerd.

*Resultaat:* De gemiddelde pre-transfusie concentratie daalt met 0,21 mmol/l (van 5,04 mmol/l naar 4,83 mmol/l). Het aantal packed cells per getransfundeerde patiënt daalt gemiddeld met 0,19 (van 1,67 naar 1,48). Het aantal aanvragen voor transfusie daalt na introductie gemiddeld met 17%. Het aantal getransfundeerde eenheden bij hemodynamisch stabiele patiënten daalt gemiddeld met 27%. In absolute aantallen erythrocytenconcentraties betekent dit een geschatte reductie van 8% packed cells op jaarbasis.

*Conclusie:* Het nieuwe beslisschema in het transfusiebeleid is handzaam en leidt in de praktijk tot minder bloedtransfusie. Het nieuwe beslisschema beperkt overmatige transfusie. Bij alle afdelingen is de gemiddelde posttransfusie Hb-concentratie na transfusie lager dan 6,0 mmol/l.

**51. Rapid increases and decreases of astaxanthin in plasma and erythrocytes (RBC) of healthy volunteers following a single oral dose: reflections of a large distribution volume?**

B. RUIZ - NÚÑEZ<sup>1</sup>, G.E. SCHUISTEMAKER<sup>2</sup>, D.A.J. DIJCK - BROUWER<sup>1</sup>, F.A.J. MUSKIET<sup>1</sup>

*Department of Laboratory Medicine<sup>1</sup>, University Medical Center Groningen; Ortho Institute<sup>2</sup>, Gendringen, The Netherlands*

*Introduction:* Astaxanthin is a carotenoid from the xanthophyll family, providing the pink-red color to some algae and animals like flamingoes, salmon, shrimps and crayfish. Astaxanthin is a unique antioxidant that spans across cell membranes and does not possess pro-oxidative properties. No data are available on plasma and RBC astaxanthin kinetics following a single oral astaxanthin dose and subsequent short term supplementation. We investigated plasma and RBC kinetics of astaxanthin during 3 days after a single dose and during subsequent short-term supplementation.

*Methods:* We administered 40 mg astaxanthin (from Haematococcus pluvialis; Cyanotech) with a fat-containing breakfast to 4 healthy volunteers (28-41 years of age). Blood was collected at baseline (t0) and at 2-72 hours after intake. Three days after the initial dose, 20 mg astaxanthin/day was administered at dinner during 17 days. RBC and plasma astaxanthin were determined with HPLC-UV/VIS.

*Results:* At baseline, plasma and RBC astaxanthin amounted to 81±51 nmol/L and 63±16 nmol/mL packed cells, respectively. After the single dose, astaxanthin increased within 4 and 6 h in plasma and RBC respectively, reached summits in plasma (281±123 nmol/L) and RBC (149±70 nmol/L packed cells) at 12 h and subsequently decreased to baseline levels within 72 h. Upon daily supplementation, astaxanthin steadily increased until day 10 in plasma (186±5 nmol/L) and until day 15 in RBC (76±33 nmol/L packed cells).

*Conclusion:* Astaxanthin is readily absorbed and becomes rapidly incorporated into RBC. Rapid incorporation into RBC, rapid decreases, higher plasma and RBC astaxanthin after a single dose as compared to steady state contents following a much higher accumulative dose, and the substantial inter-individual differences in responses may reflect astaxanthin's large distribution volume.

**52. Supplementation of sickle cell disease (SCD) patients with astaxanthin increases erythrocyte (RBC) astaxanthin and may improve hematological indices**

B. RUIZ - NÚÑEZ<sup>1</sup>, S.A. de ROOIJ<sup>1</sup>, P.J. OFFRINGA<sup>2</sup>, G.E. SCHUISTEMAKER<sup>3</sup>, H.S.M. BOOI<sup>4</sup>, D.A.J. DIJCK - BROUWER<sup>1</sup>, F.A.J. MUSKIET<sup>1</sup>

*Department of Laboratory Medicine<sup>1</sup>, UMCG, Groningen; Department of Pediatrics<sup>2</sup>, Sint Maarten Medical Center, St. Maarten; Ortho Institute<sup>3</sup>, Gendringen; Sint Maarten Laboratory Services<sup>4</sup>, St. Maarten*

*Introduction:* Astaxanthin is a carotenoid from the xanthophyll family providing the pink-red color to some algae and animals like flamingoes, salmon, shrimps and crayfish. Astaxanthin is a unique antioxidant that spans across cell membranes and does not possess pro-oxidative properties. RBC of SCD patients are exposed to high oxidative stress. Incorporation of astaxanthin may ameliorate the hemolytic component of the disease and thereby also favorably affect the vaso-occlusive component. We investigated whether astaxanthin incorporates into RBC of SCD patients and influences selected hematological and clinical chemical parameters.

*Methods:* In a 3-months open label pilot we administered 8-12 mg (dependent on body weight) astaxanthin/day (from Hae-

matococcus pluvialis; Cyanotech) to 13 SCD patients (mean 28 years, range 6-60) in Sint Maarten. Blood was collected at baseline (t0) and after 1, 2 and 3 months (t1-t3). Plasma and RBC astaxanthin were determined with HPLC/VIS. Data were evaluated with paired-sample t-tests applying Bonferroni correction.

*Results:* Plasma and RBC astaxanthin were higher at t1-t3 (RBC mean: 120, 90, 61 nmol/L packed RBC) compared with t0 (6 nmol/L). Mean RBC distribution width (RDW) decreased slightly from t0 (19%) and t2 (18.5%) to t3 (16.7%); reticulocytes decreased slightly from t2 (8.7%) to t3 (6.0%); and total and indirect bilirubin increased slightly from t0 (50 and 48 µmol/L) to t1 (54 and 55 µmol/L). There were no changes in Hb.

*Conclusion:* Astaxanthin is readily absorbed and incorporated into RBC of SCD patients, reaching a rapid steady state. Lower RDW and reticulocyte count, but not bilirubin, suggest that

the high RBC turnover in SCD was favorably affected. Randomized controlled trials are necessary to investigate whether astaxanthin ameliorates symptoms of SCD patients.

### 53. The first case of a beta-thalassemia in combination with Hemoglobin ErnZ in the Netherlands

W. BRUMMELHUIS<sup>1</sup>, C.L. HARTEVELD<sup>2</sup>, L.A. BOVEN<sup>3</sup>, A. HUISMAN<sup>4</sup>

*Dept of Internal Medicine<sup>1</sup>, University Medical Center Utrecht;* *Dept of Human and Clinical Genetics<sup>2</sup>, Leiden University Medical Centre;* *Dept of Clinical Chemistry<sup>3</sup>, Meander Medical Center, Amersfoort;* *Dept of Clinical Chemistry and Haematology<sup>4</sup>, University Medical Center Utrecht, The Netherlands*

*Introduction:* We describe the clinical and haematological characteristics of the first observed case of a beta-thalassemia in combination with a Hemoglobin ErnZ in the Netherlands.

*Methods:* We identified the Hemoglobin ErnZ variant in 2 unrelated subjects. Hematological data were obtained with an automated haematology analyser. Hemoglobin variant analysis was performed using HPLC and or Capillary Electrophoresis. The beta-globin gene was sequenced with automated sequencing.

*Results:* We identified the first case of Hemoglobin ErnZ in the Netherlands and the first case of a beta-thalassemia in combination with haemoglobin ErnZ. The subject with beta-thalassemia in combination with Hemoglobin ErnZ was a 39 year old female of Turkish origin. The hematological profile was typical-

ly for a heterozygous beta (+) thalassemia with a mild microcytic anemia and an elevated HbA2 with no other features. The Hb ErnZ carrier was a 24 year old male (ethnicity unknown), clinically asymptomatic and found by chance during a routine molecular analysis to exclude genetic risk for beta-thalassemia major in the offspring of a carrier couple seen at the genetic centre for counselling.

*Conclusion:* In the present study, the Hb ErnZ variant is demonstrated for the first time in the Dutch population. The present report shows that the Hb ErnZ variant is not clinically or hematologically significant, but can be encountered by chance during routine screening to exclude genetic risk or during confirmation of beta-thalassemia trait at the DNA level.

### 54. Routinematig screening en preventie van hoge ferritinewaarden

H.J.L.M. ULENKATE, C. VERSLUYS

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

*Inleiding:* Chronisch te hoge ferritinewaarden zijn gerelateerd aan orgaanschade met toegenomen risico op morbiditeit en mortaliteit. Echter, hierop wordt niet routinematig gecontroleerd. Het doel is op structurele basis hoge ferritinewaarden van patiënten te controleren: 1) screening ferritinewaarden bij polytransfusees, 2) reductie aantal ferritinewaarden >1000 µg/l, 3) detectie potentiële hemochromatose patiënten, 4) voldoen aan CBO-richtlijn en registratie aan TRIP.

*Methode:* 1) Maandelijks wordt een rapport gegenereerd met het aantal bloedzakken dat patiënten krijgen samen met de ferritinewaarden. Van patiënten die >10 bloedzakken ontvangen, wordt nagegaan of ze als polytransfusee gemarkeerd worden. Wanneer een ferritinewaarde ontbreekt, wordt via codering automatisch een ferritinebepaling toegevoegd bij de eerstvolgende bloedafname. 2) Elke ferritinewaarde >1000 µg/l genereert een laboratoriuminterpretatie voor de laboratoriumspecialist. 3) De laboratoriumspecialist runt een query van alle verhoogde ferritinewaarden om te screenen op hemochromatose.

*Resultaat:* 1) Het aantal polytransfusees met ontbrekende ferritinewaarden is gereduceerd tot bijna nul. Alle polytransfusees

zijn geregistreerd, hebben een recente ferritinewaarde en behandeling wordt overwogen om de verhoogde ferritinewaarde te normaliseren. Maandelijks wordt nagegaan of er nieuwe polytransfusees bijkomen. 2) We verwachten een reductie in de vorming van irregulaire antistoffen vergeleken met vorig jaar. 3) De ferritinescreening draagt naar verwachting bij aan een reductie van het aantal getransfundeerde bloedzakken of ijzersuppletie of in de overweging van ijzerchelatie. 4) De transferrinesaturatie wordt toegevoegd als reflextest bij patiënten met een verhoogd ferritine om vervolgens een mogelijke hemochromatose te bevestigen met genmutatieonderzoek.

*Conclusie:* Screening op te hoge ferritinewaarden is routinematig geïntegreerd in het laboratoriumproces en waar mogelijk geautomatiseerd. Ferritinescreening verhoogt de kwaliteit van dienstverlening van het laboratorium. Patiënten hebben hier voordeel bij, wanneer de juiste behandeling gegeven wordt door de medisch specialist. Bewaking van ferritinewaarden past bij de CBO-richtlijn en optimaliseert de registratie aan TRIP.

### 55. PNH, een eclecticische presentatie

R.J. VERHEUL<sup>1,\*</sup>, R.L.J.M. HERPERS<sup>2,\*</sup>, G.A.E. PONJEE<sup>1,3</sup>, A. CASTEL<sup>2</sup>

*Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>1</sup>, MCH-Westeinde, Den Haag; Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium<sup>2</sup>, Bronovo Ziekenhuis, Den Haag; LabWest<sup>3</sup>, MCH-Westeinde, Den Haag. \*auteurs hebben gelijke bijdrage geleverd*

*Inleiding:* De membraameiwitten CD55 en CD59 verhinderen de vorming van het "membrane attack complex" en beschermen daarmee de erythrocyten tegen afbraak door het complement systeem. Paroxysmale nachtelijke hemoglobinurie (PNH) is een zeldzame verworven klonale aandoening van de hematopoëtische stamcel waarbij het PIG-A-gen is aangedaan en de verankering van CD55 en CD59 middels een glycoposphatidyl-inositol(GPI)-anker verloren gaat. Als resultante worden de erythrocyten blootgesteld aan complement gemedieerde afbraak, leidend tot hemolytische anemie en mogelijk trombose.

*Methode:* Aan de hand van twee recente casussen uit het Me-

disch Centrum Haaglanden en het Bronovo Ziekenhuis wordt de variatie in klinische presentatie, diagnostiek en beloop van PNH beschreven.

*Resultaat:* Bij een 65-jarige dame bekend bij de cardioloog en diabeteszorg, wordt per toeval een macrocytaire, Coombs-negatieve hemolytische anemie en trombocytopenie ontdekt. Uitgebreide diagnostiek naar mogelijke oorzaken (o.a. beenmergonderzoek, IgA-Coombs), leidde na enkele maanden tot de diagnose PNH gesteund door een positieve FLAER en hoge percentages leukocyten die geen GPI-verankerde eiwitten tot expressie brachten. De tweede casus betreft een 87-jarige dame

bekend met een positieve reumafactor, trombocytopenie mogelijk op basis van auto-antistoffen en een Coombs-negatieve macrocytaire hemolytische anemie, welke gezien de positieve reumafactor werd geduid als een auto-immuun hemolytische anemie. Aanvankelijk reageert de anemie goed op de behandeling met prednison, maar later wordt deze progressief onder steroïden. Aanvullend onderzoek op basis van een bot-been-

mergpunctie en cytogenetica toont aan dat de hemolytische anemie blijkt te berusten op PNH.

**Conclusie:** De hier beschreven casuïstiek illustreert de complexiteit van PNH in de klinische praktijk. Door de zeldzaamheid en de variatie in presentatie verloopt het stellen van de juiste diagnose, en dus ook de behandeling, van PNH vaak nog verre van optimaal.

## 56. De toegevoegde waarde van historische TRIX gegevens

S.A. BARTELS, G.J. VRIELINK, H.A. HENDRIKS  
*Klinisch Laboratorium, Sint Lucas Andreas Ziekenhuis, Amsterdam*

**Inleiding:** Sinds 2007 kunnen bij het Transfusie Register Irregulaire erythrocytenantistoffen en kruisproefproblemen (TRIX) klinische relevante irregulaire antistoffen gerapporteerd worden, hetgeen de transfusiezorg verbeterd heeft. Helaas zijn niet alle ziekenhuizen in Nederland bij TRIX aangesloten en worden historische gegevens niet altijd ingevoerd. De beschreven casus demonstreert een patiënt bij wie de uitkomst op nadelige wijze beïnvloed is door het ontbreken van TRIX gegevens.

**Methode:** Casus 71-jarige man met uitgebreide voorgeschiedenis en een gecompliceerd klinisch beloop ontvangt, i.v.m. diverse hemoglobine dalingen, in totaal 21 packed cells over verschillende dagen. Aanvankelijk konden geen irregulaire antistoffen aangetoond worden, waardoor is volstaan met Type & Screen. Later was er echter sprake van een vertraagde hemolytische transfusiële reactie. Bij navraag heeft de patiënt enkele dagen later toch een transfusiekaartje van een ander ziekenhuis met antistof E en Jk(a) in bezit. Indien men op de hoogte was

geweest van de reeds bekende irregulaire antistoffen, was c-, E-, K-, en Jk(a) compatibel getransfundeerd. Bij analyse van de transfusiële reactie zijn antistoffen tegen c, E en Jk(a) gevonden, waaruit geconcludeerd kan worden dat anti-c is bijgevormd.

**Resultaat:** Ten gevolge van het niet invoeren in TRIX van historisch relevante gegevens is het beloop van de patiënt gecompliceerd met een uitgestelde hemolytische transfusiële reactie en de ontwikkeling van een extra antistof en een langdurigere opname. Het verdient aanbeveling dat alle laboratoria participeren in TRIX en, zolang dit niet het geval is, actief op zoek te gaan naar een bloedtransfusiekaartje en bloedtransfusieanamnese. Op deze manier kunnen complicaties voorkomen worden en kan de kwaliteit van de transfusiegeneskunde verbeterd worden.

**Conclusie:** Nieuw gevonden en historisch relevante irregulaire antistoffen dienen in TRIX gerapporteerd te worden, om ernstige uitgestelde hemolytische transfusiële reacties te voorkomen.

## 57. Een onverwachte oorzaak van een onverwacht positieve kruisproef

R.E.A. MUSSON, K.-A. THREELS, W.W. van SOLINGE, K.M.K. de VOOGHT  
*Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie, UMC, Utrecht*

**Inleiding:** Hoewel de CBO-consensus voorschrijft dat trombocytentransfusies AB0-compatibel gegeven moeten worden, wordt de praktijk soms gedictieerd door voorraad en beschikbaarheid. AB0-incompatibele trombocytentransfusies kunnen echter problemen veroorzaken bij vervolgttransfusies en serologisch onderzoek.

**Methode:** Serologische bepalingen werden uitgevoerd in de kolomtechniek (Ortho).

**Resultaat:** Wij beschrijven een patiënt, gediagnostiseerd met AML met myelodysplastische kenmerken, die door progressieve anemie (Hb=4,5 mmol/l), ontwikkeld tijdens een Ida/Ara-C inductiekuur, erythrocytentransfusiebehoefstig is. Overeenkomstig Type&Screen werd zijn bloedgroep bepaald als A-RhD<sup>-</sup> en de irregulaire antistofscreening was negatief, zodat twee A-RhD<sup>-</sup> erythrocyteneenheden werden geselecteerd. Kort na infusie van de tweede zak ontwikkelde de patiënt een niet-hemolytische transfusiële reactie. Kruisen van patiëntenplasma na transfusie met de donoreenheid gaf een positief resultaat, terwijl de kruisproef met patiëntenplasma vóór transfusie negatief uitviel. Irregulaire antistofscreening na transfusie en een directe antiglobulinetest op de donoreenheid waren negatief.

Een directe antiglobulinetest op de erythrocyten van de patiënt bleek positief voor IgG en negatief voor C3d. Een identificatiepanel met de "meest voorkomende" laagfrequente antigenen gaf een positief resultaat voor anti-Wra. Er was echter geen Wra-positieve donoreenheid geselecteerd; evenmin kon Wra-specificiteit worden aangetoond in het eluaat na transfusie. Vanwege kritieke transfusiebehoefte werden drie A-RhD<sup>-</sup> en één 0-RhD<sup>-</sup> erythrocyteneenheid gekruist met patiëntenplasma. Alleen de 0-RhD<sup>-</sup> eenheid gaf een negatieve uitslag. In een identificatiepanel met A-cellen bleek vervolgens de aanwezigheid van anti-A-antistoffen van de IgG-klasse in het serum van de patiënt. Omdat IgG anti-A autoantistoffen zeldzaam zijn, zijn deze antistoffen hier waarschijnlijk afkomstig van eerdere 0-RhD<sup>-</sup> trombocytentransfusies. De patiënt had deze ontvangen omdat bestraalde eenheden noodzakelijk zijn bij Ida/Ara-C-behandeling en geen bestraalde A-RhD<sup>-</sup> eenheden voorhanden waren.

**Conclusie:** Het feit dat eventuele aanwezigheid van IgG anti-A tot complicaties bij vervolgttransfusies kan leiden, onderstreept het belang van AB0-compatibiliteit bij trombocytentransfusies.

## 58. Platelet function and blood loss during coronary artery bypass surgery

S. MEZGER<sup>1</sup>, A. van der STOKKER<sup>2</sup>, P. LANEN<sup>3</sup>, H. VADER<sup>4</sup>, A. van STRATEN<sup>5</sup>, D. van de KERKHOF<sup>2</sup>  
*Department of Medical Engineering<sup>1</sup>, Eindhoven University of Technology; Clinical Laboratory<sup>2</sup>, Catharina Hospital, Eindhoven; Extracorporeal Circulation<sup>3</sup>, Catharina Hospital, Eindhoven; Clinical Laboratory<sup>4</sup>, Máxima Medisch Centrum, Veldhoven; Cardiothoracic Surgery<sup>5</sup>, Catharina Hospital, Eindhoven, The Netherlands*

**Introduction:** Coronary artery bypass surgery (CABG) is associated to major blood loss. Transfusion of platelets and plasma is often applied anticipating on heparinisation, extracorporeal circulation (ECC) and use of platelet inhibitors during sur-

gery. To prevent blood loss during surgery, clopidogrel is often stopped at least 5 days prior to surgery. In this study coagulation and platelet function were monitored during the CABG procedure in a population that stopped clopidogrel use 5 days

before the procedure (Group A) and in a population that continued clopidogrel through the procedure (Group B).

**Methods:** Patients undergoing standard CABG on ECC were included (n=60, Group A 38, Group B 22). Analyses were performed pre-surgery, during surgery and within 2 hours after arrival at the Intensive Care Unit. Thrombocyte function was analysed with Light Transmission Aggregometry (LTA), Multiple Electrode Aggregometry (MEA) and GPIIb/IIIa-expression with flow cytometry. Also, routine coagulation testing and thrombo-elastography were performed with platelet mapping. Blood loss and transfusion were registered.

**Results:** No significant difference was present in hemoglo-

bin concentration, blood loss and transfusion between Group A and B. While platelet aggregation with ADP was lower in Group B, strong agonists as collagen and TRAP was the same. The aggregation response of all agonists was decreased during the surgical procedure and returned to pre-operative values at the time of arrival at the ICU. Coagulation assays showed no significantly different results during the procedure.

**Conclusion:** Platelet function is reduced during surgery, but is restored to pre-operation values at the time of arrival at the ICU. This study illustrates that the continued use of clopidogrel through the procedure may be a weak parameter for clinical decision making on transfusion.

## 59. Afwijkende vervormbaarheid van erythrocyten met een hemoglobinopathie

P. FRANCK<sup>1</sup>, P. BUIJS<sup>2</sup>, A. SPAANS<sup>1</sup>, C. POSTMA<sup>1</sup>, F. HUDIG<sup>1</sup>, J.L. KERKHOFFS<sup>2</sup>

*Lab West / Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium<sup>1</sup>; Afdeling Hematologie<sup>2</sup>, HagaZiekenhuis, Den Haag*

**Inleiding:** Erythrocyten van patiënten met erfelijke hemolytische anemieën zijn zwak en hebben een verkorte levensduur. De verminderde vervormbaarheid van zwakke erythrocyten is in een ektactometer meetbaar. Optimale flexibiliteit is essentieel voor een functionele erythrocyt in de kleine haarvaten. De zeefwerking in de milt is mede hierop gebaseerd. Oude cellen zijn minder vervormbaar en niet in staat om de poriën van de sinussen te passeren en worden weggevangen. In onze studie wordt de relatie tussen de vervormbaarheid, het type mutatie en de ernst van de anemie bij hemoglobino(Hb)-pathieën onderzocht.

**Methode:** Meting vervormbaarheid van erythrocyten in een ektactometer met de maximale Deformabiliteit Index (DI-max) als maat. DNA analyse en capillaire elektroforese. Patiënten met een Hb-pathie, die geen bloedtransfusie hebben ondergaan.

**Resultaat:** Cellen van  $\alpha$ -thalassemie patiënten met één of twee  $\alpha$ -globine deleties hebben een grotere DI-max dan cel-

len met deleties van drie  $\alpha$ -globine allelen (HbH). Heterozygote  $\beta$ -thalassemie cellen hebben een betere vervormbaarheid / hogere DI-max dan intermediaire  $\beta$ -thalassemie cellen. Bij sikkelcellen is de vervormbaarheid van de dragers (AS) minder aangedaan dan bij homozygote SS-anemie. Een toenemende hoeveelheid HbF bij SS-cellen zorgt voor een betere vervormbaarheid.

**Conclusie:** Cellen van patiënten die doorgaans een milde anemie hebben, waaronder één of twee  $\alpha$ -deleties, heterozygote  $\beta$ -thalassemie en AS-drager, laten een verlaagde maar relatief kleine afwijking in hun vervormbaarheid zien. Mutaties die een ernstige anemie kunnen veroorzaken, waaronder HbH, intermediaire  $\beta$ -thalassemie en SS, hebben een sterk verminderde vervormbaarheid. Een verhoogd HbF heeft bij SS patiënten een klinisch gunstig effect op het sikkelproces en is meetbaar als een verbeterde vervormbaarheid. De ektactometer is een analyser die de conditie van de erythrocyten binnen verschillende vormen van Hb-pathie goed kan meten.

## 60. The predictive value of the immature platelet fraction in thrombopoietic recovery after chemotherapy and stem cell transplantation

N. van der LINDEN, L. PRINZEN, N.C.J. de WIT

*Central Diagnostic Laboratory, Maastricht University Medical Center, The Netherlands*

**Introduction:** Thrombocytopenia is often observed after chemotherapy and stem cell transplantation for hematological malignancies. A better prediction of spontaneous recovery of thrombopoiesis and thrombocyte count may reduce the number of prophylactic thrombocyte transfusions. Immature platelets may be such a predictor. They can be detected by novel hemocytometer analyzers. Previous studies have shown that the rise in immature platelets precedes recovery of the number of thrombocytes. The aim of this current study is to define a cut-off value for the immature platelet fraction (IPF) predicting platelet recovery, and evaluate whether time to recovery is influenced by different treatment regimens.

**Methods:** Samples from approximately fifty adult patients undergoing chemotherapy and/or stem cell transplantation for hematological malignancies are included. Hematological parameters were measured on both the routine Sysmex XE-5000 analyzer and our research Sysmex XN-1000 analyzer. This new

analyzer has a better precision, especially in the lower range, compared to the older versions. Parameters in the analysis will be absolute and relative IPF and high-IPF, thrombocyte count, underlying disease, treatment regimen, thrombocyte transfusions, sex and age.

**Results:** Preliminary results show that platelet recovery is preceded by a rise in the absolute and relative IPF, of respectively approximately two and three days. We also observed that the rise in the absolute and relative IPF is preceded by a rise in the absolute high-fluorescent-IPF count. With additional data we hope to determine an absolute cut-off value for thrombocyte recovery.

**Conclusion:** Conclusions in this study are pending, but our aim is to set a definite cut-off value for thrombocyte recovery and to determine if time to thrombocyte recovery depends on treatment or number of thrombocyte transfusions.

### 61. Lower baseline erythrocyte-folate is associated with non-response in rheumatoid arthritis patients on methotrexate

M.C.F.J. de ROTTE<sup>1</sup>, P.H.P. de JONG<sup>2</sup>, S.M.F. PLUIJM<sup>3</sup>, M. BULATOVIC<sup>4</sup>, J. LINDEMANS<sup>1</sup>, J.M.W. HAZES<sup>2</sup>, R. de JONGE<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Erasmus University Medical Center, Rotterdam; Department of Rheumatology<sup>2</sup>, Erasmus University Medical Center, Rotterdam; Department of Pediatric Hemato-Oncology<sup>3</sup>, Erasmus University Medical Center, Rotterdam; Department of Pediatric Immunology<sup>4</sup>, University Medical Center Wilhelmina Children's Hospital, Utrecht, The Netherlands*

**Introduction:** We investigated if baseline one-carbon metabolism biomarkers, including homocysteine, vitamin B6, vitamin B12 and folate, were associated with non-response and adverse events in rheumatoid arthritis (RA) patients on methotrexate (MTX).

**Methods:** RA patients on MTX were included from the tREACH (n=285) and the MTX-R cohort (n=102). Concentrations of plasma-homocysteine, serum-vitamin B12, serum-folate, erythrocyte-vitamin B6 and erythrocyte-folate were determined at baseline and 3 months. Non-response was assessed with baseline and 3 months disease activity score (DAS)-28 and 3 months EULAR response criteria. Adverse events were assessed with biochemical parameters and questionnaires. All analyses were corrected for baseline DAS28, age, gender, MTX dose, MTX administration route, co-medication, MTHFR677T/1298C-allele, SLC19A180A-allele and cohort.

**Results:** Mean DAS28 score at 3 months was 3.08 and 79 percent of patients had an adverse event. This was similar in both

cohorts despite higher MTX dose in the tREACH. Lower baseline erythrocyte-folate was associated with higher DAS28 at 3 months ( $\beta=-0.16$ ,  $p=0.009$ ). Erythrocyte-folate  $\leq 1278$  nmol/l had higher odds for a DAS28 $>3.2$  (OR=5.56, 95%CI=1.82-16.67). Analyses into quintiles confirmed that lower baseline erythrocyte-folate was linearly associated with higher DAS28 ( $p=0.005$ ) and more EULAR non-response ( $p=0.018$ ). Vitamin B6  $\leq 104$  nmol/l had higher odds for EULAR non-response (OR=5.56, 95%CI=1.30-25.00). None of the other biomarkers was associated with non-response. Baseline biomarkers and 3 months-baseline change were not associated with adverse events.

**Conclusion:** Lower baseline erythrocyte-folate and erythrocyte-vitamin B6, but not plasma-homocysteine, serum-vitamin B12 and serum-folate, were associated with more non-response of RA patients on MTX after 3 months. None of the one-carbon metabolism biomarkers was associated with adverse events.

### 62. Klinische validatie van calprotectine in feces

I.J.M. van der LINDEN, Z. BOZKURT, H. BROOS, A.M.C.P. JOOSEN, M.J.M. de GROOT

*Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Amphia ziekenhuis, Breda*

**Inleiding:** De frequentie van patiënten met buikklachten en chronische diarree op de poli van de Internist is hoog. Om de diagnose van buikklachten te stellen zijn vaak een invasieve endoscopie en histologisch onderzoek noodzakelijk. Identificatie van patiënten met een laag risico op onderliggend darmlijden zou het aantal onnodige endoscopieën en de daarmee gepaard gaande kosten drastisch kunnen verlagen. De bepaling van calprotectine in feces kan hierbij nuttig zijn.

**Methode:** De bepalingen van calprotectine in feces met behulp van CALPRO ELISA CAL0100 (CALPRO AS, Lysaker, Noorwegen), CALPRO ELISA CAL0170 (CALPRO AS, Lysaker, Noorwegen), en Elia Calprotectin (ThermoFischer Scientific, Nieuwegein, Nederland) zijn met elkaar vergeleken (n=41). Daarnaast zijn de calprotectine uitslagen vergeleken met de kliniek van de patiënt op basis van anamnese, klachten, colo-

scopie en pathologie uitslagen.

**Resultaat:** Het methodevergelijk laat een slechte correlatie zien tussen de verschillende methodes (CAL0100 vs EliA,  $r=0,58$ ; CALP0170 vs EliA  $r=0,61$ ). In de klinische validatie blijkt de Elia Calprotectine de patiëntgroepen zonder IBD en met IBD het best te onderscheiden. De mediane calprotectine concentratie in de IBD groep is 557 mg/kg (range: 137-3350), in de niet-IBD groep 21 mg/kg (5-133), in de remissie groep 54 mg/kg (15-100) en in de groep met andere ontstekingsbeelden 31 mg/kg (15-773). De gehanteerde afkapwaarde is 50 mg/kg.

**Conclusie:** Het bepalen van calprotectine in feces met behulp van de Elia calprotectine test (ThermoFischer Scientific) is een waardevolle, niet-invasieve eerste screening voor patiënten met buikklachten ter differentiatie tussen IBD en IBS.

### 63. Methotrexate polyglutamate concentrations in erythrocytes are a potential tool for therapeutic drug monitoring of methotrexate non-response in rheumatoid arthritis

M.C.F.J. de ROTTE<sup>1</sup>, E. den BOER<sup>1</sup>, P.H.P. de JONG<sup>2</sup>, S.M.F. PLUIJM<sup>3</sup>, M. BULATOVIC<sup>4</sup>, N.M. WULFFRAAT<sup>4</sup>, J. LINDEMANS<sup>1</sup>, J.M.W. HAZES<sup>2</sup>, R. de JONGE<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>; Department of Rheumatology<sup>2</sup>; Department of Pediatric Hemato-Oncology<sup>3</sup>; Erasmus University Medical Center, Rotterdam; Department of Pediatric Immunology<sup>4</sup>, University Medical Center Wilhelmina Children's Hospital, Utrecht, The Netherlands*

**Introduction:** In rheumatoid arthritis (RA) patients methotrexate (MTX) plasma concentrations decrease in a few hours, whereas MTX polyglutamates (MTX-PG) are accumulated intracellular over months inside cells, and therefore may be a tool for therapeutic drug monitoring (TDM).

**Methods:** This study included RA patients treated with MTX from two longitudinal cohorts: 285 from the tREACH study and 102 from the MTX-R study. We measured MTX with a tail of 1, 2, 3, 4 and 5 glutamates in erythrocytes at 3, 6 and

9 months after MTX-start with an LC-MS/MS assay. As outcome measure for MTX non-response we defined disease activity score (DAS) 28 at 0, 3, 6 and 9 months. Adverse events were measured as laboratory parameters and with questionnaires. All analysis were adjusted for age, gender, DAS28 at baseline, MTX-dose, MTX-route of administration, co-medication and study cohort.

**Results:** Mean DAS28 decreased from 4.76 (SD=1.26) to 3.07 (SD=1.20) after 3 months, to 2.91 (SD=1.22) after 6 months and

to 2.67 (SD=1.15) after 9 months. 79% of patients had an adverse event after 3 months 81% after 6 months and 81% after 9 months. MTX-PG median concentrations after 3 months were for MTX-PG1: 12 nmol/L (interquartile range=9-21), MTX-PG2: 9 nmol/L (IR=6-11), MTX-PG3: 19 nmol/L (IR=13-23), MTX-PG4: 7 nmol/L (IR=3-10), MTX-PG5: 2 nmol/L (IR=1-3) and total MTX-PG: 54 nmol/L (IR=42-70). Lower MTX-PG2 ( $\beta=-0.15$ ,  $p=0.004$ ), MTX-PG3 ( $\beta=-0.12$ ,  $p=0.020$ ) and total

MTX-PG ( $\beta=-0.16$ ,  $p=0.003$ ) concentrations were associated with higher DAS28. None of the MTX-PGs was associated with adverse events.

*Conclusion:* In this first longitudinal study, Lower MTX-PG2,3 and total erythrocyte MTX-PG concentrations were associated with MTX non-response over the first 9 months treatment and are therefore a potential tool for TDM of MTX in RA.

#### 64. Soja allergie: is een uitbreiding van de voedselmengseltest zinvol?

I.A. HAAGEN

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

*Inleiding:* Het aantonen van specifiek IgE voor een voedselallergeen kan duiden op een allergie voor dat allergeen maar is niet noodzakelijk. De interpretatie van de IgE-testuitslagen kan worden ondersteund door het gebruik van allergeencomponenten. Gly m4, kruisreactief met het berkenpollenallergeen Bet v1, is een allergeencomponent van soja net als het Gly m5 en Gly m6. IgE antistoffen tegen het Gly m4 kunnen de oorzaak zijn van een oraal allergie syndroom (OAS) maar kunnen ook heftige reacties veroorzaken na inname van grote hoeveelheden kort verwerkte sojaproducten, zoals sojamelk. IgE antistoffen tegen Gly m5 en/of Gly m6 kunnen systemische reacties veroorzaken.

*Methode:* In 2011 heeft het HKCL Gly m4 toegevoegd aan de afzonderlijke testen (Kippenei-eiwit (f1), Koemelk (f2), Vis (kabeljauw, f3), Tarwe (f4), Pinda (f13), Soja (f14)) volgend op een positieve voedselmengseltest fx5 (ImmunoCAP, Thermo

Fisher Scientific). Bij een positieve reactie op soja maar een negatief resultaat voor IgE-Gly m4 is IgE tegen Gly m5 en Gly m6 bepaald.

*Resultaat:* In 36% van de ingestuurde patiëntensera zijn IgE antistoffen tegen soja aantoonbaar. In deze groep heeft 53% antistoffen tegen Gly m4. Van de sera negatief voor IgE tegen Gly m4 heeft 34% antistoffen tegen Gly m5 en/of Gly m6. In de 67% van de sera waarin geen antistoffen tegen soja aangetoond werden waren bij 19% wel antistoffen tegen Gly m4 aantoonbaar.

*Conclusie:* Het toevoegen van Gly m4 aan het fx5 voedselmengsel en het verder typeren van de antistoffen voor Gly m5 en/of Gly m6 is een waardevolle aanvulling op de diagnostiek van soja allergie en kan men meer zekerheid krijgen of de antistoffen klinisch relevant zijn.

#### Lever- en darmpathologie

#### 65. Klinische validatie van twee bepalingmethoden voor Calprotectine

M.B. KOK, J. van PELT

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

*Inleiding:* Calprotectine in faeces is een maat voor inflammatie in de tractus digestivus. Calprotectine wordt gebruikt om onderscheid te maken tussen Inflammatory Bowel Disease (IBD) en prikkelbaardarmsyndroom (PDS). Een uitslag onder de referentiegrens sluit inflammatie en daarmee IBD uit met als gevolg dat geen panscopie of colonscopie hoeft te worden uitgevoerd. Gezien het sterk toegenomen aantal aanvragen in het Medisch Centrum Alkmaar is een klinisch validatie uitgevoerd van twee bepalingmethoden voor calprotectine: Buhlman ELISA (Alere), en Immunocap 250, EliA (Fisher Scientific (Phadia)).

*Methode:* Voor de vergelijking van de twee methodes voor calprotectine zijn 58 patiëntenmonsters geëvalueerd. De monsters zijn geselecteerd in een breed concentratiegebied (6-2300 mg/kg) op basis van de uitslag van de verzendbepaling (Medlon Medische Diagnostiek). Voorafgaand aan verzending is een extractie uitgevoerd volgens de methodespecifiek aangeleverde procedure. De uitslagen zijn vergeleken met de gestelde diagnose in patiëntbrieven, endoscopieverslagen en bevindingen

van de pathologie. Op basis van deze gegevens is een concordantieplot gemaakt.

*Resultaat:* EliA: er wordt een concordantie van 90% gevonden. Er zijn drie vals-positieve uitslagen gevonden. Er zijn drie vals-negatieve uitslagen waargenomen. De vals-negatieve extracten waren donker en bevatten restanten faeces. Mogelijke oorzaak kan zijn: het meepipetteren van een kleine hoeveelheid faeces-residu na de centrifugestap tijdens het maken van het extract. ELISA: er is een concordantie van 79%. Er zijn 12 vals-positieve uitslagen gevonden. Er zijn geen vals-negatieve uitslagen waargenomen.

*Conclusie:* In het MCA is gekozen voor de EliA. Deze methode heeft een hogere concordantie dan de Buhlman ELISA. Hiernaast vergt het uitvoeren van de bepaling op Immunocap 250 aanzienlijk minder analistentijd. Aangezien patiënten gediagnostiseerd met PDS in het MCA periodiek worden gevolgd met calprotectine, worden de vals-negatieve uitslagen geaccepteerd.

#### 66. De toepassing van de ELF-test in de screening naar leverfibrose

A. BIKKER<sup>1</sup>, P.W. FRIEDERICH<sup>2</sup>, R.J. KRAAIJENHAGEN<sup>1</sup>, J.P.M. WIELDERS<sup>1</sup>

*Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>1</sup>; Maag-Darm-Leverziekten<sup>2</sup>, Meander Medisch Centrum, Amersfoort*

*Inleiding:* Voor de diagnose leverfibrose is leverbiopsie de gouden standaard. Dit is een belastende ingreep met kans op (ernstige) complicaties (0,5% van de patiënten). Leverfibrose wordt vaak pas in een gevorderd stadium ontdekt. De Enhanced Liver Fibrosis (ELF)-score is ontwikkeld als non-invasieve methode, waarbij met behulp van een algoritme bestaande uit hyaluro-

nan, TIMP-1 en PIIINP een score wordt berekend. Eerder onderzoek heeft een sterke correlatie tussen fibrose ernst en de ELF-score aangetoond. De ELF-score heeft verder een betere prognostische waarde dan een leverbiopsie. De ELF-score is echter niet eerder vergeleken tussen patiënten uit de eerste lijn (zonder leverfalen) en patiënten met bewezen fibrose. Het doel



van deze pilot-studie is het onderzoeken van de toepasbaarheid van de ELF-test bij de diagnostiek van (vroege) leverfibrose.

**Methode:** Controle patiënten (CTRL, n=10) en patiënten met bewezen leverfibrose (FIB, n=8). Gemeten relevante (lever) parameters: (AF,  $\gamma$ GT, ALAT, ASAT, totale bilirubine), Hb, trombocyten, albumine (ALB), CDTL (alleen CTRL). Alle parameters vallen voor de CTRL groep binnen de referentie waarden.

**Resultaat:** Er wordt geen significant verschil waargenomen in ELF-score (mediaan (IQR)); FIB vs. CTRL; 9,2 (1,2) vs. 10,4 (1,8)). 80% van de CTRL en 63% FIB patiënten hebben een

ELF-score van  $\geq 9,8$  (standaard afkapwaarden van 7,7 en 9,8.  $\geq 9,8$  zeer sterke verdenking op leverfibrose). Binnen de fibrose groep wordt er een correlatie gevonden tussen de ELF-score en de mate van fibrose ( $r=0,758$ ,  $p \leq 0,05$ ).

**Conclusie:** Het inzetten van de ELF test als non-invasieve screening voor leverfibrose lijkt voornamelijk niet gerechtvaardigd. Mogelijk is de test inzetbaar om bij sterke verdenking fibrose aan te tonen en biopsie te vermijden. Additioneel is de test mogelijk geschikt voor stratificatie van de verschillende stadia en prognose van leverfibrose.

## Gynaecologie/obstetrie

### 67. Interrelationships between maternal docosahexaenoic acid in erythrocytes, milk and adipose tissue suggest that the optimal human milk DHA content is 1 g%. Data from four Tanzanian tribes differing in lifetime stable intakes of fish

M.F. LUXWOLDA, R.S. KUIPERS, J.H. KOOPS, S. MULLER, D. de GRAAF, D.A.J. DIJCK - BROUWER, F.A.J. MUSKIET

Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen, The Netherlands

**Inleiding:** Little is known about the interrelationships between maternal and infant erythrocyte (RBC) docosahexaenoic acid (DHA), milk-DHA and maternal adipose tissue (AT)-DHA.

**Methode:** We studied these relations in 4 tribes in Tanzania (Maasai, Pare, Sengerema, Ukerewe), differing in their lifetime intakes of fish. Samples were taken at delivery, and after 3 days and 3 months exclusive breastfeeding.

**Resultaat:** We found that intrauterine 'biomagnification' is a sign of low maternal DHA status, that genuine 'biomagnification' occurs during lactation, that lactating mothers with low DHA status can not augment their infant's DHA status and that lactating mothers lose DHA independent of their DHA status. A maternal RBC-DHA of 8 g% corresponds with a mature milk-DHA of 1.0 g% and with subcutaneous and abdominal (omentum) AT-DHA contents of about 0.39 and 0.52

g%, respectively. Consequently, 1 g% DHA might be a target for Western human milk and infant formula that comes along with milk arachidonic-, eicosapentaenoic- and linoleic acid contents of 0.55, 0.22 and 9.32 g%, respectively. With increasing DHA status, RBC-DHA reaches a plateau of about 9 g%, while RBC-DHA plateaus more readily than milk and adipose tissue DHA.

**Conclusie:** Compared with the average Tanzania-Ukerewe woman, the average USA women has four times lower AT-DHA content (0.4 vs. 0.1 g%) and five times lower mature milk-DHA output (301 vs. 60 mg/day), which contrasts with her estimated 'only' 1.8-2.6 times lower mobilizable AT-DHA (19 vs. 35-50 g) and points at a state of 'DHA starvation in the midst of plenty'.

### 68. Hemoglobinopathie screening bij zwangeren in het MCH. Evaluatie na Haagse feasibility studie

R.J. VERHEUL<sup>1</sup>, G.A.E. PONJEE<sup>1,2</sup>, I. KUIPERS<sup>1</sup>, J. LIND<sup>3</sup>

Klinische Chemie en Hematologie<sup>1</sup>; Gynaecologie<sup>2</sup>, MC Haaglanden, Den Haag; LabWest<sup>2</sup>, Den Haag

**Inleiding:** Een recente studie over hemoglobineopathie (HbP) dragerschap screening bij zwangeren in de Haagse regio (1) laat zien dat kosteneffectiviteit zou kunnen worden behaald door het voorkomen van ernstige HbP bij het kind. Op dit moment is het MCH het enige ziekenhuis in de Haagse regio waar deze screening standaard door de gynaecologen wordt uitgevoerd. Echter, welke resultaten dit oplevert is nochtans onbekend.

**Methode:** Vrouwen tussen 14 en 46 jaar waarbij een HbP-onderzoek werd aangevraagd tussen 1 januari en 30 juni 2012 via de afdeling gynaecologie of een verloskundigenpraktijk werden geïdentificeerd middels het laboratoriuminformatiesysteem (GLIMS). Van zwangeren waarbij een HbP werd aangetoond, werd nagegaan of de partner-screening was uitgevoerd (via het ziekenhuisinformatiesysteem (EZIS)) en, bij een positieve uitslag, welke consequenties hieraan verbonden werden.

**Resultaat:** In totaal werden 661 vrouwen gescreend. Hierbij werden 47 zwangeren (7%) met een HbP dragerschap opge-

spoord (20 alfa-thalassemieën (verschillende mutaties), 11 heterozygote beta-thalassemieën, 9 HbAS, 5 HbAC, 4 HbAE en 2 overige). Van 35 partners (74%) was een HbP-uitslag terug te vinden (van 6 partners was het onderzoek eerder uitgevoerd); van overige partners vanwege uiteenlopende redenen niet. Uit de 35 bekende paren werden 3 risicoparen geïdentificeerd (1 paar met beiden een heterozygote alfa-thalassemie, 2 paren met risico op sikkelcelziekte). Zij zijn verwezen naar de klinisch geneticus voor counseling; uiteindelijk werd geen risicozwangerschap afgebroken.

**Conclusie:** Bij de HbP-screening in het MCH bleek 7% van alle zwangeren draagster van een Hb-pathie en uiteindelijk werden in een half jaar drie risicoparen geïdentificeerd. Het verder uitbreiden van de screening lijkt hiermee geïndiceerd.

**Literatuur:** (1) Kaufmann et al. Prenat Diagn. 2011; 31: 1259-63.

### 69. Supplementation advice of 400 IU/day is inadequate for vitamin D deficient (<50 nmol/L) pregnant women

L.C.C. BORST<sup>1</sup>, M.J. DUK<sup>1</sup>, E.A.M. TROMP<sup>2</sup>, J.P.M. WIELDERS<sup>3</sup>

Dept of Obstetry and Gynaecology<sup>1</sup>, Meander Medical Center, Amersfoort; Antonius Academy<sup>2</sup>, St. Antonius Hospital, Nieuwegein; Dept. of Clinical Chemistry<sup>3</sup>, Meander Medical Center, Amersfoort, The Netherlands

**Introduction:** The Dutch Health Council recommends an additional vitamin D intake of 400 IU/day during pregnancy. We in-

vestigated the efficacy of this advice for deficient pregnant women, with respect to reaching the 30 nmol/L calcidiol level (Dutch

Health Council recommendation) as well as the 50 nmol/L level (American Institute of Medicine recommendation).

**Methods:** In a retrospective study we analysed laboratory and clinical data of 394 vitamin D deficient pregnant women (calcidiol <50 nmol/L) living in the Netherlands and receiving either 400 IU or 800 IU/day vitamin D3 for >2 months during pregnancy.

**Results:** We found a mean increase in calcidiol of 14 nmol/L in response to 400 IU/day (n= 263) and 23 nmol/L in response to 800 IU/day (n=131). The increase was also dependent of baseline calcidiol level, season and treatment centre. After >2 months of 400 IU/day, 16% showed calcidiol levels below 30 nmol/L. For the severely deficient subgroup (baseline level <25 nmol/L), 41% did not reach the 30 nmol/L threshold. After >2

months of 800 IU/day, 5% of the whole group had calcidiol levels below 30 nmol/L and 15% of the severely deficient did not achieve 30 nmol/L. Additionally, a threshold of 50 nmol/L was not reached by 58% of deficient and 81% of severely deficient pregnant women supplemented with 400 IU/day, compared to 36% resp. 67% in case of 800 IU/day.

**Conclusion:** Supplementation with 400 IU/day during pregnancy is inadequate to reach a calcidiol threshold of 30 nmol/L for (part) of initially deficient women, being the group that needs supplementation most. Supplementation with 800 IU/day gives significant better results.

**Literature:** Gezondheidsraad 2012: Evaluatie van de voedingsnormen voor vitamine D.

## Acute zorg, IC, toxicologie

### 70. Kan beenmerg afgenomen met een intraossale canule voor laboratoriumonderzoek gebruikt worden?

M.A. FRANSSEN<sup>1</sup>, H.A. KLEINVELD<sup>2</sup>, D. BUSSMANN - WILLEMS<sup>1</sup>, M.T.M. RAIJMAKERS<sup>2</sup>  
*Spoedeisende Hulp<sup>1</sup>; Klinisch Chemisch & Hematologisch Laboratorium<sup>2</sup>, Atrium Medisch Centrum Parkstad, Heerlen*

**Inleiding:** Bij patiënten op de SEH kan niet altijd een vasculaire toegang worden verkregen. Voor de toediening van infuusvloeistoffen wordt dan gebruik gemaakt van een intraossale canule (i.e. botnaald). Indien beenmerg uit deze botnaald voor klinisch chemisch laboratoriumonderzoek gebruikt kan worden, zou sneller een diagnose gesteld kunnen worden. Er is echter nog onvoldoende bewijs voor een dergelijke toepassing in de praktijk. In dit onderzoek is gekeken naar de preanalytische kwaliteit van dergelijk materiaal en de vergelijkbaarheid met veneus bloed.

**Methode:** In een prospectieve beschrijvende opzet werden volwassen patiënten in een (semi)-acute situatie zoals shock en reanimatie, waarbij twee vasculaire toegangswegen noodzakelijk zijn, ingesloten. Materiaal afgenomen uit de botnaald en een perifere lijn werd ter analyse van klinische chemische en hematologische parameters op het laboratorium aangeboden. In deze interim-analyse is naast de vergelijking van de laboratoriumuitslagen gekeken naar de preanalytische kwaliteit van het beenmerg.

**Resultaat:** In anderhalf jaar studie is het slechts bij zeven patiënten gelukt om deze in de studie te includeren. Van de zeven monsters zijn twee monsters afgekeurd voor analyse, omdat deze macroscopisch gesteld waren. Van de vijf gebruikte monsters was de preanalytische kwaliteit slecht, waarbij één of meerdere preanalytische afwijkingen werden geconstateerd zoals lipemie (n=2), sterke hemolyse (n=4) en kleine stolsels (n=1). Daarnaast kon in vier gevallen op basis van volume of kwaliteit geen stollingsonderzoek worden uitgevoerd. Gezien de lage kwantiteit en kwaliteit van de monsters kunnen er geen uitspraken gedaan worden over de klinische vergelijkbaarheid. **Conclusie:** Gezien de lage frequentie dat beenmergmateriaal wordt aangeboden voor analyse en de slechte preanalytische kwaliteit is beenmerg uit een intraossale canule ongeschikt voor de kwantitatieve bepaling van klinische chemische en hematologische parameters.

### 71. Reductie van iatrogen bloedverlies op de Intensive Care

K.L.M. COENE<sup>1</sup>, V. SCHARNHORST<sup>1</sup>, A. ROOS<sup>2</sup>  
*Algemeen Klinisch Laboratorium<sup>1</sup>; Intensive Care<sup>2</sup>, Catharina Ziekenhuis, Eindhoven*

**Inleiding:** Bij patiënten op de Intensive Care (IC) wordt veelvuldig bloed afgenomen voor diagnostische doeleinden. Tijdens een langdurig IC-verblijf kan het totale volume aan afgenomen bloed dusdanig oplopen dat een vergroot risico op anemie ontstaat. Verwachting is dat maatregelen om dit iatrogene bloedverlies te reduceren geassocieerd zijn met verminderde transfusiebehoefte. In dit project zijn EDTA-, heparine- en citraatbuizen met kleinere volumina gevalideerd en ingevoerd op de IC van het Catharina Ziekenhuis Eindhoven.

**Methode:** Over een periode van drie maanden is het totale aantal bloedafnames per IC patiënt geïnventariseerd met behulp van het laboratorium informatie systeem (GLIMS). De praktijk van bloedafname op IC is gedurende twee weken geanalyseerd met een observationele studie en een enquête onder verpleegkundigen. Bloedafnamebuizen (Vacutainer, BD) met kleinere volumina zijn gevalideerd ten opzichte van de huidige buizen in zowel een populatie gezonde vrijwilligers als een populatie IC patiënten.

**Resultaat:** Door de bevindingen uit de data-analyse, de observationele studie en de enquête te combineren, blijkt dat het gebruik van kleinere volumina buizen de bloedafname bij IC patiënten gemiddeld met 13,3% (3,6 ml op 27 ml) per dag zou kunnen reduceren. Door het uniformeren van bloedafnames in astrupen en uit lijnen zou de totale reductie op kunnen lopen tot 25% per patiënt per dag. De validatie van de kleine volumina buizen laat zien dat de uitslagen niet significant verschillen van die gevonden met de huidige buizen.

**Conclusie:** De invoering van kleine volumina bloedbuizen op de IC en scholing van verpleegkundigen kan zorgen voor een significante reductie van het afgenomen bloedvolume per patiënt per dag. Het effect van deze bloedbesparende maatregelen op de transfusiebehoefte bij IC patiënten zal retrospectief geanalyseerd worden.

## Overigen

### 72. Red blood cell immunization after bone allograft transplantation

L. PRINZEN<sup>1</sup>, H.M. STAAL<sup>2</sup>, S.J.M. ROUWETTE<sup>1</sup>, E.A.M. BECKERS<sup>3</sup>, R.H.M. ten BROEKE<sup>2</sup>, L.W. van RHIJN<sup>2</sup>, Y.M.C. HENSKENS<sup>1</sup>

*Central Diagnostic Laboratory<sup>1</sup>; Department of Orthopedics<sup>2</sup>; Department of Internal Medicine, subdivision Hematology<sup>3</sup>, Maastricht University Medical Center, The Netherlands*

**Introduction:** In this case report, we provide evidence for the possibility of red blood cell allo-immunization after bone-allograft transplantation.

**Methods:** Here, we present a 13-year-old boy who received a bone-allograft due to impending bilateral hip-luxation. Type and screen, as well as allo-antibody analysis were performed according to protocol.

**Results:** Five months post-surgery, during pre-op screening for a second hip-surgery, he was shown to have developed three different alloantibodies: anti-D, anti-C and anti-E, which were induced by the bone allograft. This was proven by the Rhesus phenotype of the donor.

**Conclusion:** Red blood cell allo-immunization is a possible adverse event when a patient is exposed to allogenic red blood cells. These antibodies may cause transfusion reactions when incompatible blood is administered. More importantly, these antibodies may cause severe, or even fatal, hemolytic disease of the fetus or newborn, stretching the importance of preventing antibody formation, especially in young women. This case demonstrates the importance of selecting rhesus phenotype and K compatible bone allografts. Furthermore, we would like to point out the possibility of alloantibody formation after bone allograft transplantation to clinical chemists, as this may elucidate previously unexplained antibody formation.

### 73. Myeloid marker S100A8/A9 and lymphocyte marker soluble interleukin 2 receptor: Biomarkers of hidradenitis suppurativa disease activity?

C.W. DIEPENHORST - WIELAND<sup>1</sup>, T. VOGL<sup>2,3</sup>, A. ORDELMAN<sup>1</sup>, H.G.M. VLOEDGRAVEN<sup>1</sup>, L.H.A. VERWOOLDE<sup>1</sup>, J. M. RENSEN<sup>1</sup>, J. ROTH<sup>2,3</sup>, J. BOER<sup>4</sup>, J. HESSELS<sup>1</sup>

*Laboratory for Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Deventer Hospital, Deventer; Institute of Immunology<sup>2</sup>, University of Münster, Germany; Interdisciplinary Centre of Clinical Research<sup>3</sup>, University of Münster, Germany; Department of Dermatology<sup>4</sup>, Deventer Hospital, The Netherlands*

**Introduction:** Hidradenitis suppurativa (HS) is a chronic inflammatory and debilitating disease of the skin. No biomarkers for this disease exist. We set out to test if Angiotensin Converting Enzyme (ACE), lysozyme, soluble interleukin (IL)-2 Receptor (sIL-2R) and S100A8/A9 (calprotectin) are elevated in patients suffering from HS.

**Methods:** Serum was collected from 29 HS patients suffering from different stages of the disease and from 51 controls. ACE, lysozyme, sIL-2R and S100A8/A9 were measured. Clinical observation of disease activity was scored according to the Hurley grading system and by a physician global disease score (PGS) of disease severity.

**Results:** Serum levels of lysozyme and ACE were not increased above the normal reference values in controls or HS patients. sIL-2 and S100A8/A9 levels were significantly higher in HS patients than in controls ( $P < 0.001$  for sIL-2 and S100A8/A9).

Based on the receiver operating characteristic (ROC) curves, the optimum sIL-2R and S100A8/A9 cut-off values were 375 U/mL and 680 ng/mL respectively with a sensitivity of 0.79 and specificity of 0.78 for sIL-2R and 0.86 and 0.88 for S100A8/A9. No correlations with Hurley classification scores were found. However, when using PGS of disease activity to categorize patients, S100A8/A9 but not sIL-2R levels tended to be higher in patients suffering from more active disease.

**Conclusion:** S100A8/A9 and sIL-2R but not ACE or lysozyme are elevated in serum of patients suffering from HS. However, there is no correlation between S100A8/A9 or sIL-2R levels and disease stage according to the Hurley classification system. Further research is needed to study the potential of S100A8/A9 to score disease activity in larger cohorts of patients and to predict disease flares.

### 74. Vitamin D status in professional soccer players of different ethnical origin

G. van der SLAGMOLEN, F.J. van HELLEMONDT, J.P.M. WIELDERS

*Meander Medical Center, Amersfoort, The Netherlands*

**Introduction:** Vitamin D is known for its role in calcium homeostasis and bone metabolism. Amongst other non-calcemic effects, 25(OH) vitamin D3 (25OHD3) deficiency leads to muscle complaints and weakness, hence the 25OHD3 level might be important for optimizing athletes physical performance. We investigated the prevalence of 25OHD3 deficiency and the ethnical variation in 25(OH)D3 concentrations among professional soccer players.

**Methods:** Cross-sectional survey of 87 professional soccer players (aged 18-35) from one Belgian and two Dutch first division soccer teams. Blood samples were collected between October 2009 and March 2010. 25OHD3 was measured using an electro-chemiluminescence immunoassay (Roche), normal values: 50-130 nmol/L.

**Results:** For 47 players (54%) we found a 25OHD3 concentration  $< 50$  nmol/L and 16 subjects (18.4%) were  $< 30$  nmol/L.

Concentrations were lowest for black players ( $n=20$ ): all  $< 50$  nmol/L and 9/20  $< 30$  nmol/L. For Latin-American players 10/15 (66.7%) had 25OHD3  $< 50$  nmol/L and 5/15 (33.3%)  $< 30$  nmol/L. For Caucasian players 21 of 52 players (40.4%) were  $< 50$  nmol/L and 2/52  $< 30$  nmol/L.

**Conclusion:** Prevalence of vitamin D deficiency in professional soccer players was unexpected high. All black athletes and two-thirds of the Latin-Americans showed a vitamin D deficiency (25OHD3  $< 50$  nmol/L). Muscle strength and performance for elderly is optimal for levels  $> 50$  nmol/L (1). We and others suggest that especially dark skinned soccer players and athletes in general may improve their performance by keeping their 25OHD3 level above 50 nmol/L all year round. Further research is needed on the effect of vitamin D deficiency in healthy athletes.

## 75. Diagnostiek bij auto-immuunziekten. Twee nieuwe ELISA's voor de detectie van anti-dsDNA antistoffen

S.A. GROOT, M.A.C.M. BRAKENHOFF, C.E.T. van der KROFT, I.A. HAAGEN

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

*Inleiding:* Systemische lupus erythematosus (SLE) behoort tot de auto-immuun ziekten en wordt gedefinieerd aan de hand van de (geactualiseerde) classificatiecriteria volgens de American College of Rheumatology (ACR). Eén van de 11 classificatiecriteria is het aantonen van de aanwezigheid van antistoffen tegen het dsDNA. De aanwezigheid van deze anti-dsDNA antistoffen is specifiek voor SLE, maar ze worden niet altijd waargenomen. De bepaling kan ook worden aangevraagd om het beloop van de ziekte te vervolgen en dient dan kwantitatief uitgeslagen te worden. Omdat elke test gebruik maakt van verschillende dsDNA preparaten en verschillende coatings, kent elke test fout-positieve en fout-negatieve resultaten. Deze studie beschrijft de (klinische) validatie van twee nieuwe anti-dsDNA ELISA's, zie methode, tov de kliniek, de Crithidia IIF (indirecte immunofluorescentietest, INOVA) en de anti-dsDNA-FEIA/ELiA (Thermo Fisher Scientific).

*Methode:* Patiënt(-sera) zijn geselecteerd op basis van een positieve ANA-IIF op HEp-2 (INOVA). De ELISA's voor evaluatie:

1. anti-dsDNA-NcX (IgG) ELISA, EUROIMMUN, Biognost, België, waarbij gebruik is gemaakt van opgezuiverde nucleosomen als linker; 2. HighAvidity dsDNA (IgG) ELISA, INOVA, Werfen Group, San Diego, USA.

*Resultaat:* Zowel de anti-dsDNA-NcX ELISA als de HA dsDNA ELISA vertoont een goede concordantie met de kliniek, respectievelijk 63% en 62%, tov de Crithidia IIF (67%). Wanneer alleen patiënten met onbehandelde SLE, volgens de klinische status, geïncludeerd worden is de specificiteit voor dsDNA-NcX ELISA 62%% en voor de HA dsDNA ELISA 73%% en is de concordantie met de kliniek 62% respectievelijk 71% en voor de Crithidia IIF 72%.

*Conclusie:* De specificiteit van de anti-dsDNA-NcX ELISA en de HA dsDNA ELISA is in onze patiëntengroep vergelijkbaar met die van de Crithidia IIF en vertoont een goede concordantie met de kliniek. De ELISA's zijn kwantitatief en kunnen geautomatiseerd uitgevoerd worden.