

Analyse

Vakblad voor
biomedisch laboratoriummedewerkers



Analist en Onderzoek:

Onderzoek naar oogmelanomen voor
betere prognose en kans op overleving

Moleculaire detectie
van bloedbaaninfecties

Wat is het?

Vaccins met dendritische cellen
als nieuwe behandeling voor
asbestkanker?

Revolutionair PCR gastro panel

- ✓ Resultaat in 3 uur
- ✓ Geen DNA extractie
- ✓ Geen manuele pipetteer stap
- ✓ Panel:
Salmonella, VTEC (Shiga Toxin 1/Shiga Toxin 2), Shigella, Campylobacter, Cryptosporidium, Giardia

Spoedig leverbaar:
Entamoeba histolytica, Norovirus, Yersinia enterocolitica

Reeds twee lopende validaties in Nederland.



EntericBio
realtime

QuikRead go[®]



Resultaat in 3 minuten

- ✓ Compacte automatische analyser
- ✓ Snelle en betrouwbare resultaten met laboratorium nauwkeurigheid vanuit een vingerprik
- ✓ Bi-directioneel koppelbaar

ELISA automaten



ImmunomatTM

De verrassend betaalbare betrouwbare 4 plaat ELISA automaat van Virion \ Serion



Gemini Combo[®]

Volledig geautomatiseerde ELISA en IFA processor voor de kleinere series



DS2[®]

De bekende 2 plaat ELISA processor

PIIINP bij MTX behandeling

- ✓ Bij leverfibrose stijgt PIIINP waarde in het bloed
- ✓ Reductie leverbiopsieën mogelijk
- ✓ UniQ PIIINP RIA geeft betrouwbaar resultaat
- ✓ Opgenomen in Europese psoriasis richtlijn 2011



CRP
CRP + Hb
hsCRP + Hb



Strep A



wrCRP

Nieuw

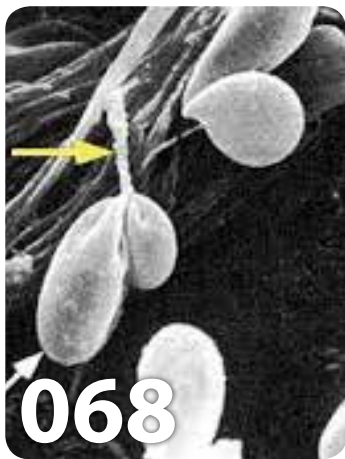
- ✓ Kleiner volume
- ✓ Houdbaar bij kamertemperatuur

Distributie in Nederland:

MEDIPHOS
MEDICAL SUPPLIES

Mediphos Medical Supplies BV • Industrieweg 12B 6871 KA Renkum
• tel.: 0317-351838 • e-mail: info@mediphos.com

als kwaliteit en service tellen....



068 De fragmentocyt - Een complexe bepaling, maar een essentieel puzzelstukje in de diagnostiek

P. Kromhout

Fragmentocyten zijn een belangrijke indicatie voor het stellen van de diagnose Trombotische Micro Angiopathie (TMA). Dit is een direct levensbedreigende aandoening waar snel medisch handelen geboden is. Ondanks de belangrijkheid van dit onderzoek, is er nog weinig literatuur die duidelijk aanwijzing geeft hoe de diagnostiek naar fragmentocyten eenduidig gedaan moet worden.



075 De detectie van 20 Human Papillomavirus types in een single-tube assay

J. Ossel, A. Brink

Het humaan Papillomavirus (HPV) is een virus dat epitheelcellen kan infecteren. De verschillende HPV types zijn ingedeeld in twee groepen op basis van carcinogeniteit; de low risk (lr) HPV types en de high risk (hr) HPV types. De meest voorkomende hrHPV types zijn HPV 16 en 18. Zij veroorzaken samen 70% van alle baarmoederhalskankers. In dit artikel wordt de detectie van 20 HPV types in een single-tube assay besproken.



080 Moleculaire detectie van bloedbaaninfecties

Sepsis is een gegeneraliseerde ontstekingsreactie veroorzaakt door een infectie. Deze infectie manifesteert zich vaak in de bloedbaan, daarom is bloedkweek de gouden standaard in sepsis diagnostiek. De laatste jaren zijn er diverse initiatieven gestart om alternatieve, snellere diagnostiek voor bloedbaaninfecties te ontwikkelen waaronder het MARS project.

083 Vaccins met dendritische cellen als nieuwe behandeling voor asbestkanker?

Bij DC-immunotherapie worden mensen behandeld met autologe (eigen) dendritische cellen (DC's). DC's zijn cellen die de omgeving screenen op schadelijke indringers. In deze klinische studie kweken wetenschappers monocytten van uit het bloed tot DC's die tumorfragmenten presenteren. Deze opgekweekte DC's worden door middel van een vaccinatie protocol teruggegeven aan de patiënt.

086 Uitreiking Zilveren Vlam

091 Lorenzo Salden winnaar studenten posterprijs

087 Langzamerhand wordt het voorjaar!

093 Analist & Onderzoek

089 Vakbeurs 2015

094 Opleidingen

090 Boekrecensie

095 Agenda

091 Persbericht E-learning

Uitgave

Nederlandse vereniging van
bioMedisch laboratoriummedewerkers
NVML-leden ontvangen Analyse gratis.

Voor vragen over contributie, adreswijzigingen
of andere administratieve zaken rond Analyse
kunt u contact opnemen met het bureau van
de NVML.

Redactiecoördinatie en eindredactie

Annerieke Nieuwenhuijse
E-mail: nvml.redactie@nvml.nl

Redactie

mw. M. de Bie, Pathologie,
St. Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg
mw. R. Blom, bureaumedewerker NVML
mw. I. Linde, Infectieziekten, GGD, Amsterdam
dhr. R. Lindenbergh, Algemeen Medisch
Laboratorium (AML), Antwerpen
mw. dr. W.W.J. van de Sande, Medische Microbio-
logie en Infectieziekten, Erasmus MC, Rotterdam

Vormgeving en opmaak

Celina Koekenbier | www.insight-design.nl

Coverfoto

www.bigstockphoto.com

Druk

BDU

Advertentie-exploitatie

Business Service Centre
Mw. M. van der Vegt
Tel.: 0572 - 820995 / 0572-348200
e-mail: mirandavandervegt@home.nl

Oplage

2500 exemplaren

Advertenties & kopij

Geldend advertentietarief: Tarievenlijst 2015

Sluitingsdatum advertenties

Voor nummer 4: 17 juli 2015

Inleverdata kopij

De redactie ziet korte berichten (bijvoorbeeld
over opleidingen) voor Analyse 4 graag uiterlijk
7 juli 2015 tegemoet. Analyse 4 verschijnt op
dinsdag 28 juli en Analyse 5 op dinsdag 29
september.

Copyright

Het overnemen van artikelen is alleen toegestaan
na toestemming van de redactiecoördinator.

De NVML aanvaardt geen enkele
aansprakelijkheid voor de gepubliceerde
advertenties; evenmin houdt het opnemen
van advertenties en industriële informatie een
aanbeveling van de NVML in.

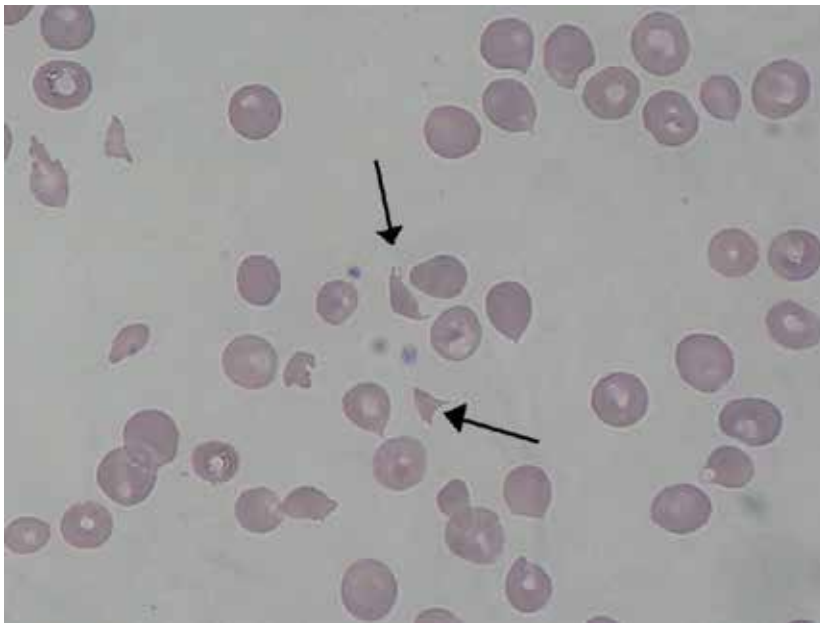
ISSN 0166-7688

De fragmentocyt

Een complexe bepaling, maar een essentieel puzzelstukje in de diagnostiek

Patrick Kromhout, Klinische Chemie, St. Antonius Ziekenhuis, locatie Utrecht

Fragmentocyten zijn een belangrijke indicatie voor het stellen van de diagnose Trombotische Micro Angiopathie (TMA). Dit is een direct levensbedreigende aandoening waar snel medisch handelen geboden is. Ondanks de belangrijkheid van dit onderzoek, is er nog weinig literatuur die duidelijk aanwijzing geeft hoe de diagnostiek naar fragmentocyten eenduidig gedaan moet worden. De aanwezigheid en de gradatie van fragmentocyten gebeurt nog veelal op basis van een onderbuik gevoel. Steeds meer wordt er moeite gedaan om een vastomlijnde definitie te geven waar fragmentocyten aan moeten voldoen. Ook de mate van vóórkomen wordt steeds beter gekwantificeerd wat wel of niet klinisch relevant is. Dit artikel beschrijft hoe fragmentocyten ontstaan, welke ziektebeelden hierbij horen, hoe op dit moment de aanbevolen richtlijn in de diagnostiek is en aan de hand van een casus wordt de belangrijkheid van deze diagnostiek geïllustreerd.



Figuur 1 Een microscopische bloeduitstrijk waarbij met pijlen de fragmentocyten zijn aangegeven.

Het woord fragmentocyt is de Nederlandse benaming van de term schizocyt of schistocyt (1-4). Schizocyt is afgeleid van het Griekse woord *shistos*, wat verdeeld, deelbaar of afgescheiden betekent. Het Griekse woord *schizein* betekent knippen, klieven of scheiden. Een fragmentocyt is dus een deel van een erythrocyt (zie figuur 1) dat in de bloedbaan mee stroomt met de andere bloedcellen. Er zijn een aantal redenen bekend waarbij fragmentocyten (kunnen) ontstaan. Het signaleren en opgeven van frag-

mentocyten kan voor de arts een belangrijke aanwijzing zijn om aan een bepaalde diagnose te denken. Soms vraagt de arts zelf om in een bloeduitstrijk specifiek naar fragmentocyten te kijken. Toch blijkt dit in de praktijk lastig om te bepalen. Wanneer spreken we van een fragmentocyt? Sommige andere pathologische verschijningen onder de erythrocyten, lijken namelijk ook op fragmentocyten. Hoeveel fragmentocyten moet je zien, voordat men spreekt van afwijkend? Waar moet je in de

bloeduitstrijk kijken om een goede weergave te geven? Onderling kan de interpretatie nogal verschillen of een bloeduitstrijk fragmentocyten bevat of niet. Geef je het aantal fragmentocyten op in aantal per gezichtsveld, in percentage ten opzichte van het aantal erythrocyten of met behulp van 1+, 2+ of 3+ kwantificering? In dit artikel wordt hier dieper op ingegaan en wordt er aan de hand van een casus geïllustreerd hoe belangrijk de opgave van fragmentocyten is.

Het ontstaan van fragmentocyten

Fragmentocyten kunnen op diverse manieren in de bloedcirculatie ontstaan. Zo zijn er eenmalige gebeurtenissen die kunnen leiden tot fragmentatie. Denk bijvoorbeeld aan brandwonden of blootstelling van het lichaam aan extreme hitte. In sommige gevallen kunnen ook marathondwedstrijden of andere extreme omstandigheden ervoor zorgen dat in de haarvaten van bijvoorbeeld de voeten, erythrocyten kapot gaan. Dit zijn echter eenmalige gebeurtenissen en bij gezonde personen zal de milt de fragmentocyten verwijderen uit de circulatie.

Een tweede categorie van mogelijke oorzaken van fragmentatie zijn mechanische oorzaken. Dit kan bij-

voorbeeld voorkomen bij medische ingrepen zoals een bypass operatie waarbij de hart-longmachine gebruikt wordt, een trombectomie (via een katheter door de slagader een stolsel verwijderen), of het hebben van een kunsthartklep of vaatwandprothese.

Een derde groep van mogelijke oorzaken zijn vaatwand problemen. Door ziekten als arteriosclerose of andere vaatwandproblemen, ontstaat een ontstekingsmechanisme van de vaatwand. Hierdoor ontstaat fibrine vorming aan de vaatwand, wat ervoor zorgt dat erythrocyten worden doorgesneden (zie figuur 2). Het gevolg hiervan is het ontstaan van hemolytische anemie. De doorgesneden erythrocyt wordt uiteindelijk een zogenaamde micro sferocyt, die kleiner en sterker gekleurd is dan de normaal aanwezige erythrocyten. De micro-sferocyten moeten niet worden verward met gewone sferocyten. Sferocytose is een aangeboren mutatie, veelal veroorzaakt door een mutatie in het bèta spectrine. Micro sferocytose is verworven en komt door het fragmenteren van de erythrocyt. Door de gelijkenis met sferocyten, worden deze vormen micro-sferocyten genoemd.

De laatste categorie van oorzaken bestaat uit de zogenaamde trombotische micro angiopathie. De ziektebeelden die hierbij horen zijn TTP/ITP, HUS, DIS, pre-eclampsie/HELLP syndroom, maligne hypertensie, etc. In de casus wordt een patiënte met een TTP besproken en na de casus

wordt er meer verteld over de verschillen en overeenkomsten van deze groep ziektebeelden.

Diagnostisch onderzoek naar fragmentocyten

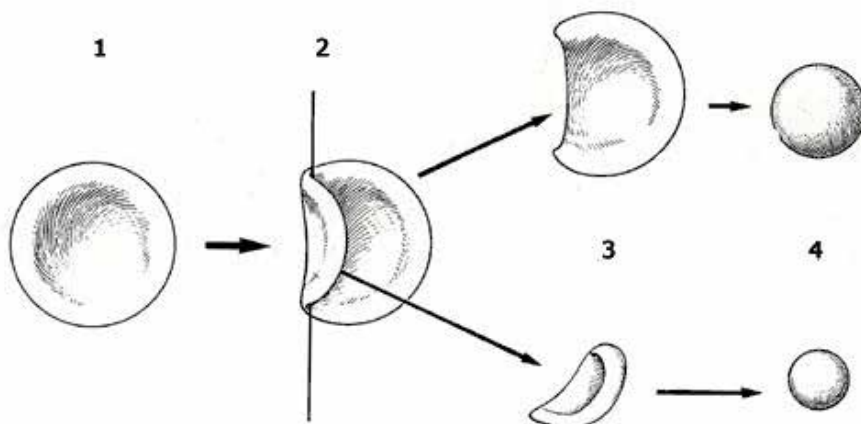
Het antwoord op de vraag wat nu wel of niet een fragmentocyt is, blijft lastig te definiëren. De literatuur geeft hier ook geen pasklaar antwoord op. Hieruit blijkt een duidelijke behoefte aan een definitie die helder maakt wanneer een bepaalde vorm tot een fragmentocyt gerekend moet worden en wanneer niet. De French Group of Cellular Haematology heeft gepoogd om een definitie te maken. Deze is als volgt gedefinieerd: RBC fragmenten in de vorm van een driehoek, sikkels, helm met een recht snijvlak (dus een kleinere RBC dan initieel) en minstens twee hoeken (als gevolg van in vivo fragmentatie door fibrine draden (zie figuur 3-7)). Deze definitie wordt in veel laboratoria als richtlijn aangehouden, maar blijkt in de praktijk al lastig genoeg. Men heeft wel eens testen gedaan met foto's van vermeende fragmentocyten. Deze zijn naar experts en medewerkers gestuurd die dagelijks dit soort beoordelingen maken. Er is gevraagd naar de mening van de persoon in kwestie om de plaatjes te kwalificeren en vervolgens op basis van de definitie. Hierbij werd aangegeven dat men volgens het 'onderbuike gevoel' meer fragmentocyten zou tellen dan op basis van de opgegeven definitie. Hieruit blijkt dat er nog veel onderzoek en discussie nodig is om fragmentocyten te

beoordelen. Neem het voorbeeld van figuur 8. Dit is een microscopisch gezichtsveld van een patiënt met een ijzerebreksanemie en poikilocytose. Hierin zitten geen fragmentocyten en deze passen ook niet bij het klinisch beeld van de patiënt. Toch zullen sommigen bepaalde cellen wel als fragmentocyt bestempelen.

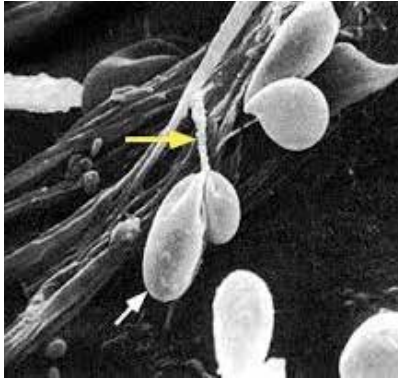
De International Council for Standardization in Haematology (ICSH) is een internationale organisatie die probeert om met experts wereldwijd samen tot één standaard aanbevolen richtlijn te komen op hematologie gebied. Zij hebben in 2012 ook een richtlijn voor fragmentocyten opgesteld. De definitie van de Franse groep is voor een groot deel overeend gebleven (zie figuur 9), maar zij hebben deze wel aangevuld. Zo wordt de aan- of afwezigheid van een centrale bleekheid van een fragmentocyt als indicator toegevoegd om te bepalen of er sprake is van fragmentocyten, of dat het gaat om bizarre vormen bij poikilocytose (zie figuur 10). Ook benoemen zij de micro-sferocyten als onderdeel van fragmentocyten.

Kwantificeren

Hoe geef je op dat er fragmentocyten in een bloeduitstrijkje zitten? En de ernst hiervan? Geef je dit al op als je er zo nu en dan één tegenkomt? Of moeten er een x aantal aanwezig zijn, voordat het pathologisch is? Tel je het aantal per gezichtsveld, of ten opzichte van het percentage erythrocyten? In Nederland wordt het difboekje over het algemeen als leidend



Figuur 2 Een schematische weergave hoe erythrocyten in het bloedvat door middel van fibrinedraden doorgesneden worden. De fragmentocyten veranderen in zogenaamde micro-sferocyten. Deze micro-sferocyten worden ook tot de fragmentocyten gerekend en dienen meegeteld te worden bij het fragmentocyten diagnostiek volgens de aanbeveling van de ICSH.



Figuur 3 Een elektronenfoto van een erythrocyt die in vivo door een fibrinedraad wordt doorgesneden, waardoor een fragmentocyt ontstaat. Waarbij met pijlen de fragmentocyten zijn aangegeven.



Figuur 5 De karakteristieke sikkelvorm die sommige fragmentocyten als vorm hebben.

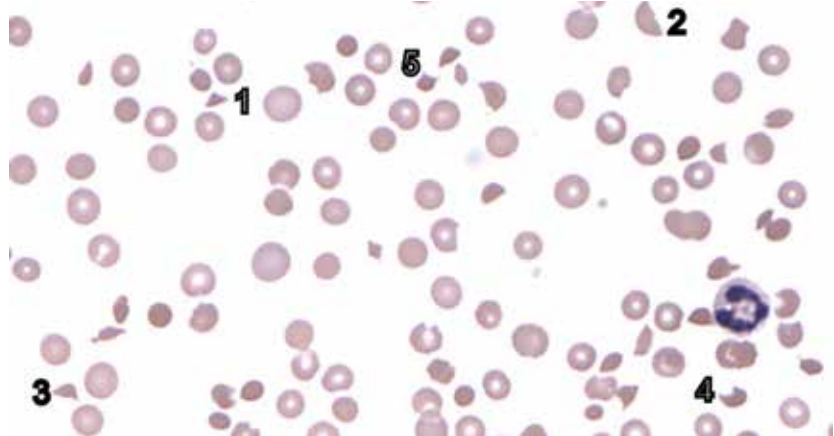
gezien en deze doet de volgende aanbeveling in kwantificatie van fragmentocyten:

0,5 – 2 %	:	+
2 – 5 %	:	++
> 5 %	:	+++

NB. De percentages worden berekend over minimaal 1000 beoordeelde erythrocyten.

Voorbeeld: In een uitstrijk ziet men in vier gezichtsvelden van 250 erythrocyten, 16 fragmentocyten. Dan zijn dit er 16 op de 1000 erythrocyten → 1,6%. Er wordt dan 1+ aan fragmentocyten opgegeven.

De ICSH heeft <1% fragmentocyten per 1000 erythrocyten omschreven als de normaalwaarde. Vanaf 1% en meer is het relevant verhoogd en dient dit opgegeven te worden. Eventueel kan men <1% fragmentocyten opgeven, als het microscopisch beeld aanleiding geeft voor een abnormaal beeld. Verder heeft de ICSH in zijn aanbeveling een stroomdiagram geplaatst hoe men dient te handelen bij de aanwezigheid van fragmentocyten, of als men in de werkdiagnose de verdenking heeft van een ziektebeeld waarbij fragmentocyten voorkomen (zie figuur 11).



Figuur 4 In dit microscopische bloeduitstrijk zitten diverse soorten fragmentocyten die volgens de definitie hiertoe behoren. 1) driehoek 2) erythrocyt met een recht snijvlak 3) helm 4) sikkel en 5) kattenkop.



Figuur 6 De Napoleon hoed heeft veel weg van de helmvormige fragmentocyten.



Figuur 7 Sommige fragmentocyten hebben twee hoornachtige puntjes, waardoor de vorm veel weg heeft van kattenkopjes.

Casus (5)

Trombotische trombocytopenische purpura (TTP) is een zeldzaam hematologisch syndroom. De ziekte behoort tot de groep van trombotische microangiopathiën en wordt gekenmerkt door hemolytische anemie, trombocytopenie met mogelijk neurologische stoornissen, nierinsufficiëntie en koorts. De klinische manifestatie wordt veroorzaakt door het ontstaan van trombocytengregagaten in de microcirculatie met als gevolg ischemie van eindorganen. Sinds een aantal jaren ziet men als etiologische achtergrond van verworven TTP de vorming van autoantistoffen tegen het Von Willebrand-factor-klievend protease (ADAMTS-13; deze afkorting staat voor 'a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs') en wordt de ziekte gezien als een auto-immuunaandoening. TTP gaat samen met andere auto-immuunaandoeningen, waaronder lupus erythematoses disseminatus (SLE). TTP en SLE delen een aantal klinische kenmerken zoals koorts, klachten van het centrale zenuwstelsel, nieraandoeningen en hemolytische anemie.

Het stellen van een juiste diagnose is complex wanneer bij een patiënt zowel symptomen van SLE als van TTP aanwezig zijn. Gezien de hoge sterfte door een niet adequaat behandelde acute TTP is een tijdige diagnose van groot belang. De effectiefste behandeling is langdurige plasmaferese onder toediening van corticosteroiden. Infusie met donor trombocyten geeft een verdere verslechtering van het klinische beeld en is niet geïndiceerd.

In deze casus wordt de ziektegeschiedenis beschreven van een patiënte die reeds bekend was volgens SLE en zich presenteerde met een acute TTP. Er wordt stilgestaan bij de waarde van het laboratoriumonderzoek voor het stellen van de diagnose in de acute fase.

Patiënt A, een 41-jarige vrouw, werd in de nacht gezien op de Eerste Hulp. Bij haar was op 27-jarige leeftijd SLE gediagnosticeerd. Drie jaar later waren er aanwijzingen voor cerebrale SLE in verband met depressieve klachten, maar dit vermoeden kon toen met MRI-onderzoek niet bevestigd worden.

De huidige klachten waren een week voor opname begonnen met een tandvleesontsteking. Hiervoor kreeg zij van de huisarts amoxicilline voorgeschreven, waarop zij een allergische huidreactie kreeg. De amoxicilline werd vervangen door claritromycine. De avond voor opname ontstond bij de patiënte ontremd gedrag met afatische stoornissen. Haar echtgenoot trof haar zittend aan op bed, terwijl zij schokkende bewegingen maakte met hoofd en armen en schuim op haar mond had. Zij had geen bewustzijnsverlies.

Patiënte werd in eerste instantie door de neuroloog gezien, die een CT-scan van het cerebrum liet verrichten. Hierbij waren geen afwijkingen te zien. Vervolgens werd de internist in consult gevraagd. Deze zag een delirante, zieke vrouw, hemodynamisch stabiel met een lichaamstemperatuur van 38,5°C. Over het hart en de longen waren geen afwijkingen hoorbaar. De huid vertoonde petechiën en purpura. Tevens werden afwijkingen geconstateerd aan de nagelriemen van beide handen. Patiënte werd opgenomen op de afdeling Reumatologie met als werkdiagnose 'exacerbatie van SLE'.

Aanvullend bloed- en urineonderzoek werd aangevraagd. De resultaten daarvan staan in de tabel. Patiënte had een hemolytische anemie (lage Hb- en haptoglobinewaarde, verhoogde LDH-activiteit) met anisocytose: een grote verdelingsbreedte van de erythrocytenpopulatie (RDW). Er werd een ernstige trombocytopenie gevonden. De stollingsparameters protrombinetijd, geactiveerde partiële tromboplastinetijd (APTT) en fibrinogeenconcentratie hadden geen afwijkende uitslag.

Omdat deze laboratoriumuitslagen onvoldoende onderscheid mogelijk maakten tussen actieve SLE en trombotische microangiopathie werden een directe antiglobulinetest en een fragmentocyten telling uitgevoerd. De directe antiglobulinetest was negatief, maar het bloedbeeld bevatte een groot aantal fragmentocyten: meer dan twintig

per tweehonderd erythrocyten (zie figuur 12). Op basis van het klinische beeld en de afwijkingen in het bloed werd de voorlopige diagnose 'TTP' gesteld. Er werd bloed afgenomen voor vervolgonderzoek naar de activiteit van het ADAMTS-13.

De patiënte kreeg twee eenheden gefiltreerde erythrocyten toegediend en werd na het instellen van behandeling met prednisolon 1 mg/kg overgeplaatst naar een ziekenhuis waar plasmaferese kon plaatsvinden. Bij aankomst onderging zij direct éénmaal plasmaferese. De dag erna verslechterde het klinische beeld met daarbij een linkszijdige hemiparese met afasie. Vervolgens kreeg patiënte gedurende drie dagen gemiddeld tweemaal daags plasmaferese met plasmawisseling, in totaal acht maal. Daarop herstelde het klinische beeld. Het trombocytenaantal en de LDH-waarde normaliseerden. Patiënte kreeg nog enkele dagen infusies met eenheden vers bevroren plasma, in totaal tien. Zeven dagen na opname werd zij teruggeplaatst naar het eerdere ziekenhuis, waar haar gedurende drie dagen nog zeven eenheden vers bevroren plasma werden toegediend. Er was een goed herstel, met name van het neurologische beeld. Inmiddels was bekend dat de ADAMTS-13-activiteit afwezig was. Dit bevestigde de diagnose 'TTP'.

Op de vijfde dag na overname trad er een snelle daling op van het trombocytenaantal. Er werden dit keer geen neurologische verschijnselen waargenomen. Enige tijd later werden er aanwijzingen in het bloed gevonden voor hemolyse. Er werd geconcludeerd dat er sprake was van een recidief-TTP. De patiënte werd wederom overgeplaatst voor plasmaferese. Deze keer werd zij gedurende drie weken intensief behandeld. Hierna kon zij volledig hersteld naar huis. Zij bleef onder controle van zowel de internist als de reumatoloog. Het trombocytenaantal bleef stabiel binnen de referentiewaarden. De patiënte had bij de laatste follow-up geen aantoonbare restverschijnselen van de TTP en ook de SLE bleef rustig. Twee maanden nadat zij was ontslagen

uit het ziekenhuis werd bij controleonderzoek nogmaals de ADAMTS-13-activiteit bepaald. Deze was toen weer normaal.

Beschouwing

Deze klinische beschrijving illustreert hoe complex het stellen van een werkdiagnose kan zijn wanneer er mogelijk meer ziektebeelden aanwezig zijn. Op basis van het klinische beeld en de ziektegeschiedenis bestond in eerste instantie de werkdiagnose uit een exacerbatie van SLE. Voor het onderkennen van TTP is in de acute fase gericht laboratoriumonderzoek met de juiste interpretatie daarvan belangrijk. Het laboratoriumonderzoek zal daarom gebruikt worden als leidraad in de beschouwing van deze casus.

Uit de uitslagen van het bloed- en het urineonderzoek, weergegeven in de tabel, blijkt in eerste instantie dat patiënte een hemolytische anemie en een trombocytopenie had. Gezien het klinische beeld kon de hemolytische anemie passen bij een actieve SLE, namelijk op basis van auto-immuniteit, of passen bij een trombotische microangiopathie, op basis van mechanische afbraak van erythrocyten. Met een directe antiglobulinetest, ook wel directe Coombs-test genoemd, en een fragmentocyten telling kan men hiertussen differentiëren. Uit het bloedonderzoek, verricht bij binnenkomst van de patiënte, bleek dat de directe antiglobulinetest negatief was en de hemolytische anemie derhalve waarschijnlijk niet veroorzaakt werd door verhoogde fragiliteit van de erythrocyt op basis van antistofbinding. Onderzoek van het bloeduitstrijkje voor de leukocyten-tendifferentiatie toonde echter een groot aantal fragmentocyten aan (zie figuur 12). Dit duidde op een trombotische microangiopathie en de werkdiagnose voor patiënte werd bijgesteld.

Een grote RDW, vastgesteld bij geautomatiseerde elektronische meting, kan een vroege laboratoriumindicatie zijn voor het verrichten van een handmatig leukocyten differentiatie onderzoek. Hiermee kan het aantal fragmentocyten worden gekwantificeerd. De combinatie

met anemie en trombocytopenie is suggestief voor trombotische microangiopathie en onderzoek naar fragmentocyten is dan raadzaam. Echter, hoge waarden van de RDW zijn niet specifiek en worden onder andere ook gevonden bij een bloedtransfusie of een ijzergebreks-anemie.

Laboratoriumonderzoek is noodzakelijk om tussen de verschillende trombotische microangiopathieën te kunnen differentiëren. De differentiaaldiagnose voor trombotische microangiopathie bestaat onder andere uit: hemolytisch-uremisch syndroom (HUS), TTP, diffuse intravasale stolling, het syndroom van Evans en het zogenaamde HELLP-syndroom. Het HELLP-syndroom houdt verband met de zwangerschap en kenmerkt zich door hypertensie, proteïnurie, hemolyse, verhoogde serum leverenzym waarden en trombocytopenie. Het syndroom van Evans wordt gekenmerkt door een auto-immuun hemolytische anemie en trombocytopenie. Daarbij verwacht men een positieve uitslag van de directe antiglobuline-test. Omdat de patiënte niet zwanger was en de directe antiglobulinetest negatief bleef, waren beide bovenstaande aandoeningen niet waarschijnlijk.

Diffuse intravasale stolling kan het gevolg zijn van een onderliggende ziekte zoals maligniteit, sepsis of zwangerschapsintoxicatie. De oorzaak is gelegen in het vrijkomen uit de vaatwand van een grote hoeveelheid weefselfactor, tromboplastine, en leidt tot het initiëren van systemische hemostase. Weefselfactor is de initiator van een cascade aan enzymatische omzettingen. Deze leidt uiteindelijk tot de vorming van fibrine uit fibrinogeen en daarbij tot het verbruik van stollingsfactoren. De fibrinedraadjes vormen afsluitingen in de microcirculatie en activeren trombocyten, die vervolgens massaal worden weggevangen. Bepaling van de prothrombinetijd en de APTT zijn beide tests die in vitro de activiteit van de stollingscascade weergeven. Fibrinogeen en andere stollings-

componenten worden bij diffuse intravasale stolling verbruikt en daardoor zijn de prothrombinetijd en de APTT sterk verlengd. Patiënte had niet-afwijkende waarden voor prothrombinetijd, APTT en fibrinogeen, wat een acute diffuse intravasale stolling uitsluit.

HUS en TTP zijn sterk gelieerd. HUS wordt gekenmerkt door hoge creatinine- en ureumwaarden in het bloed. Deze worden veroorzaakt door eind orgaan falen van de nier. Vaak betreft het een eenmalige episode die veelal voorafgegaan wordt door gastro-enteritis.

Pathogenese van trombotische trombocytopenische purpura

De combinatie van bevindingen zoals hemolytische anemie, trombocytopenie en fragmentocyten met normale protrombinetijd-, APTT- en fibrinogeenuitslagen duidt op de zeldzaam voorkomende TTP. TTP kan verworven zijn of familiair bepaald. Familiaire TTP is uiterst zeldzaam en presenteert zich op vroege leeftijd. Verworven TTP kan ontstaan na het gebruik van medicijnen, tijdens zwangerschap, bij infecties en na beenmergtransplantatie. De laatste jaren is er, zoals gezegd, meer duidelijkheid gekomen over de pathogenese van TTP en wordt het syndroom ingedeeld in de groep van de auto-immuunziekten.

Bij TTP zijn er in principe in de circulatie extra lange multimeren van de Von Willebrand-factor (VWF) aanwezig. Deze extra lange multimeren worden normaal tijdens het verlaten van de endotheelcel gesplitst door het VWF-klievend enzym ADAMTS-13. ADAMTS-13 is onder normale omstandigheden actief in plasma, maar niet bij TTP. Een uitzondering hierop is TTP na beenmergtransplantatie. Bij patiënten met een verworven TTP blijken er autoantistoffen aanwezig te zijn. Deze zorgen ervoor dat er een verminderde proteaseactiviteit is en er lange multimeren van VWF in de circulatie komen. Deze lange multimeren zijn in staat om in de microcirculatie microtrombi te

vormen. Hierdoor worden de trombocyten weggevangen en treedt er mechanische fragmentatie van de erythrocyten op. Doordat er slechts een beperkte initiatie van de stollingscascade is, heeft de patiënte niet-afwijkende of gering verlengde protrombinetijd en APTT. Dit in tegenstelling tot de reeds genoemde sterk verlengde tijden van deze stollingsparameters bij een diffuse intravasale stolling. Bij de beschreven patiënte werd bij herhaling de afwezigheid van activiteit van het ADAMTS-13-protease vastgesteld.

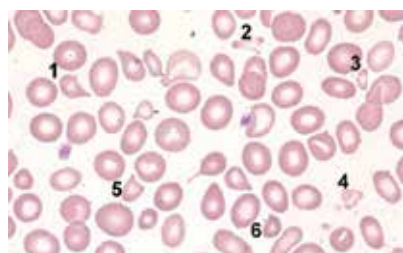
Patiënte werd na het vaststellen van de diagnose 'TTP' behandeld met een infusie van eenheden versbevoren plasma, intensieve plasmaferese en immuunsuppressiva. Na het starten van de therapie herstelde zij tot aan de tiende dag. Vervolgens kreeg zij, na een eerder herstel van het trombocytenaantal, binnen twaalf uur een trombocytopenie. TTP heeft als kenmerk dat deze aandoening gemakkelijk recidiveert wanneer er endogeen opnieuw antistoffen in de circulatie komen die het door plasmadonatie ontvangen ADAMTS-13-protease inactiveren. Langdurige plasmaferese was bij deze patiënte nodig om volledig langdurig herstel te bewerkstelligen.

De best mogelijke therapeutische behandeling bij TTP is onderwerp van discussie en studie. Om de kans op volledig herstel te bewerkstelligen is snel starten met een cyclus van veelvuldige plasmaferese (> zeven maal in zeven dagen) onder behandeling met prednison raadzaam. Om de periode tot aan de plasmaferese te overbruggen kan op het ernstige acute moment tot plasma-infusie worden overgegaan. Voor het doneren van trombocytenconcentraten geldt een contra-indicatie, tenzij er een ernstige bloeding is. In de weken na de plasmaferese cyclus moet de plasmaferese frequentie rustig worden afgebouwd, afhankelijk van remissie en recidief. Wanneer zich een recidief TTP voordoet, zal de behandelcyclus moeten worden verlengd naar gelang het klinische beloop.

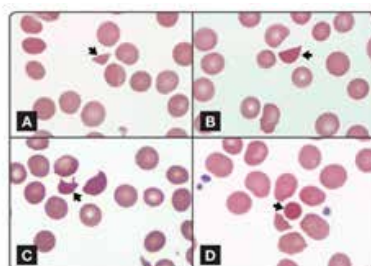
test	referentiewaarde	uitslag
bloed		
hemoglobine	7,7-9,8 mmol/l	3,4
hematocriet	0,36-0,45 l/l	0,16
erythrocyten	$3,8-5,2 \times 10^{12}/l$	1,9
MCV	82-98 fl	82
haptoglobine	0,3-2,4 g/l	< 0,1
bezinking	2-17 mm/1e h	79
C-reactieve proteïne	0-10 ng/ml	20
ALAT	0-45 U/l	15
LDH	210-450 U/l	1859
bilirubine		
totaal	1-17 µmol/l	35
geconjugeerd	0-4,0 µmol/l	7,8
trombocyten	$135-385 \times 10^9/l$	5
protrombinetijd	0,8-1,2 INR	1,1
APTT	27-37 s	31
fibrinogeen	2,0-4,0 g/l	3,0
D-dimeren	0-500 µg/l	13 541
directe antiglobulinetest	negatief	negatief
fragmentocyten	afwezig	+++*
creatinine	55-90 µmol/l	84
ureum	3,0-8,0 mmol/l	9,1
albumine	31-46 g/l	35
urine		
erythrocyten	negatief	sterk positief
leukocyten	negatief	negatief
glucose	negatief	negatief
ketonen	negatief	negatief
eiwit	negatief	negatief
nitriet	negatief	positief
pH	5,0-8,0	7,0

MCV = 'mean corpuscular volume'; ALAT = alanineaminotransferase;
LDH = lactaatdehydrogenase; INR = 'international normalised ratio';
APTT = geactiveerde partiële tromboplastinetijd.
*Meer dan 20 fragmentocyten per 200 erythrocyten.

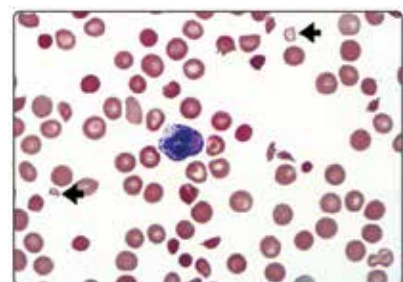
Tabel 1 De laboratorium uitslagen van patiënt A.



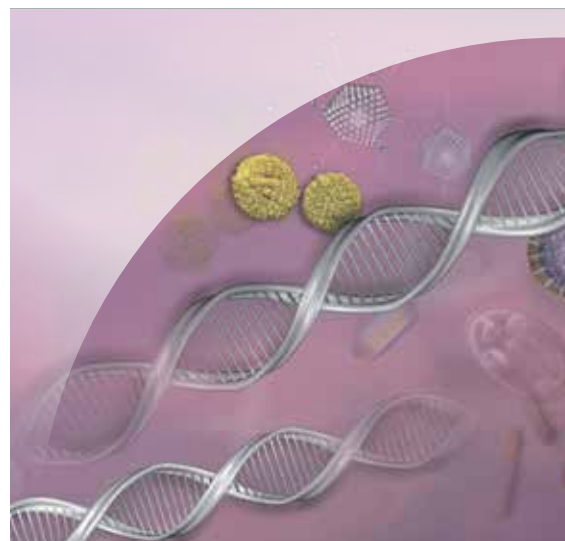
Figuur 8 Dit is een microscopische uitslag van een patiënt met ijzergebrek en poikilocytose. Dit beeld ziet er soms uit alsof er fragmentocyten in zitten. De nummers 1 tot en met 6 worden door sommigen ten onrechte voor fragmentocyten aangezien.



Figuur 9 Abnormale erythrocyten die door de ICSH aanbevelingen tot fragmentocyten moeten worden gerekend: A) driehoekige cellen, B) helm cellen, C) keratocyten (cellen met een inkeping waardoor de typische hoornachtige puntjes te zien zijn, de zogenaamde kattenkopjes), D) micro-sferocyten.



Figuur 10 De bloeduitslag van deze patiënt met TTP laat de toegenomen fragmentocyten aantallen zien. Veel fragmentocyten hebben bij deze patiënt een centraal gelegen bleekheid. In de aanbeveling staat dat fragmentocyten normaal gesproken donker gekleurd zijn, maar soms ook bleek eruit kunnen zien. De aanbeveling geeft helaas niet specifiek de graad van toegestane centrale bleekheid aan.



Complete Multiplex real-time PCR Kits

Gastro-intestinale infecties

Salmonella	Enterovirus
Campylobacter	Norovirus
Yersinia	Rotavirus
Shigella	Adenovirus
STEC	Astrovirus
EHEC	Giardia
EPEC	Cryptosporidium
EAEC	Dientamoeba
ETEC	fragilis
EIEC	Entamoeba
Sapovirus	histolytica

Hospital Acquired infecties

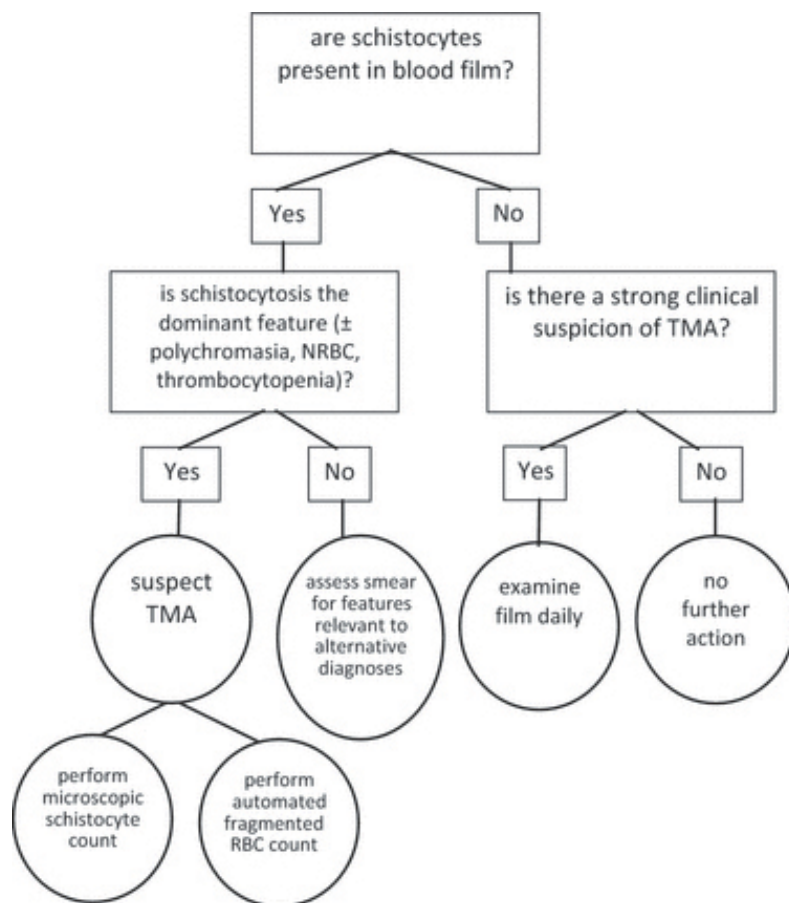
MRSA	Clostridium difficile
PVL	Toxin A/B
Clostridium difficile	Norovirus
	Rotavirus

Luchtweg infecties

Influenza A, B, H1N1v	Adenovirus
	Legionella
Parainfluenza 1, 2, 3	Pneumocystis jirovecii
RSV	
Bordetella	Mycoplasma pneumoniae
Adenovirus	

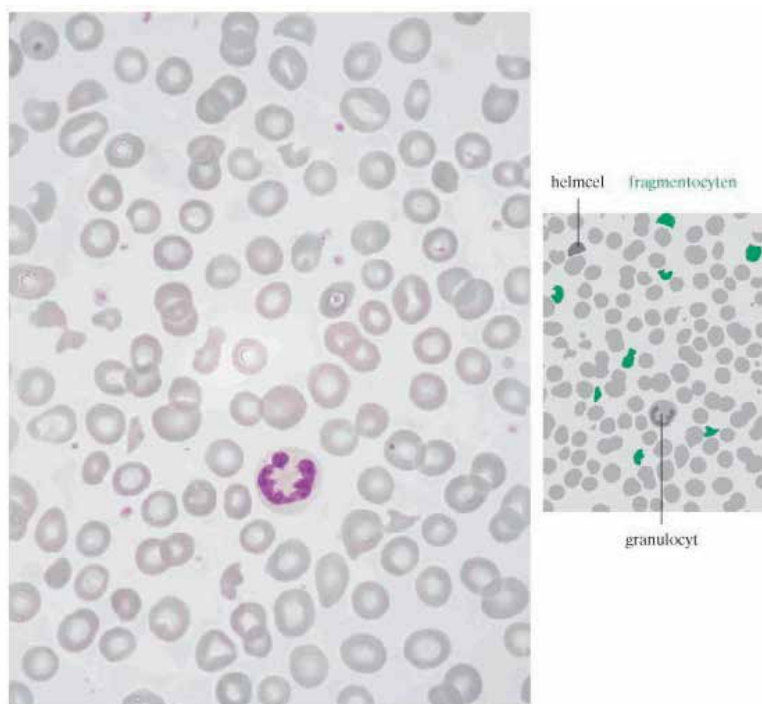
- Geschikt i.c.m. verschillende extractiemethoden en PCR cyclers
- Inclusief: Interne amplificatie- en extractie controle, Taqman Hotstart Polymerase en Positieve Controle
- Uniform PCR profile voor alle DNA en RNA kits
- Zeer gunstig prijs, competitief met home-made

vervolg op volgende pagina >



Figuur 11

Het stroomdiagram van de ICSH hoe te handelen bij verdenking van fragmentocyten of bij een werkd Diagnose waar de aan- of afwezigheid van fragmentocyten bepalend zijn, of er sprake is van betreffende diagnose.



Figuur 12

Bloeduitsmijking van patiënt A, met een fragment van een erythrocyt (helmcel), diverse andere fragmentocyten en een kernhoudende cel: een niet-afwijkende segment kernige neutrofiële granulocyt (Giemsa-kleuring, circa 750 maal vergroot).

Conclusie

Wat kan deze casus ons leren? TTP kenmerkt zich door een klinisch beeld van een hemolytische anemie en trombocytopenie en kan gepaard gaan met lichte nierinsufficiëntie, neurologische klachten en koorts. De diagnose op het acute moment wordt verder gesteld op basis van de uitslagen van het laboratoriumonderzoek. Deze uitslagen zijn: een lage Hb- en haptoglobine waarde, verhoogde LDH-uitslag, negatieve directe antiglobulinetest, niet-afwijkende of beperkt verlengde protrombintijd en APTT, een niet-afwijkende fibrinogeenwaarde en de aanwezigheid van fragmentocyten in het bloed. Ter bevestiging van de diagnose moet er bloed worden afgenomen voor de bepaling van de activiteit van het ADAMTS-13-protease. Bij een combinatie van hemolytische anemie en trombocytopenie dient men op het laboratorium alert te zijn op fragmentocyten. Vaak is aan de hand van uitslagen van de hematologieautomaat, door onder andere hoge RDW-waarden, al te zien of daar sprake van kan zijn. Op deze manier kan belangrijke tijdswinst worden geboekt. Bij klinische aanwijzingen voor een trombotische micro angiopathie zal de arts bij het klinisch laboratorium moeten vragen naar de aanwezigheid van fragmentocyten in het bloed.

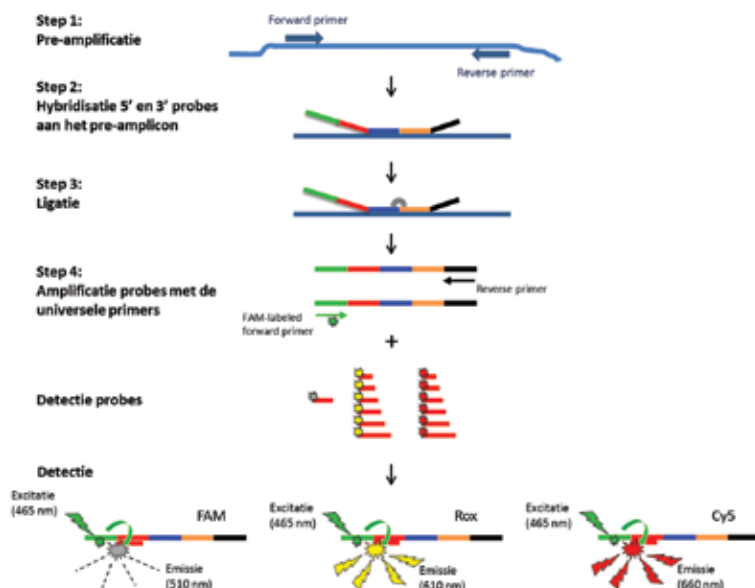
Literatuurlijst.

- 1 CAT Critically Appraised Topic Fragmentocyten: betekenis en standaardisatie Author: Apr. Annelies Fraeyman Supervisor: Dr. P. Meeus Date: 16/03/2010
- 2 "DIFboekje" Herziene versie maart 2013 Aanbevelingen van de VHL werkgroep Hematomorfologie.
- 3 G. Zini, G. d'Onofrio, C. Briggs, et al (2012), ICSH recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes. *International Journal of Laboratory Hematology*, 34: 107-116. doi: 10.1111/j.1751-553X.2011.01380.x
- 4 Fragmentocyten onder de loep; A. Hendrickx; 7-1-2005; UZ Leuven Gasthuisberg, België
- 5 Ned Tijdschr Geneesk. 2004;148:1977-81; Een vrouw met lupus erythematoses disseminatus en verworven trombotische trombocytopenische purpura.; 06-10-2004
- 6 F.M. Verheijen, L. Reedijk en R. Fijnheer

De detectie van 20 Human Papillomavirus types in een single-tube assay

J. Ossel en A. Brink, Research, PathoFinder BV, Maastricht

Het humaan Papillomavirus (HPV) is een virus dat epitheelcellen kan infecteren. Er zijn meer dan honderd verschillende HPV types bekend. Het grootste deel van de HPV types geeft geen symptomen bij infectie, sommige HPV types kunnen wratten veroorzaken en een klein deel van de HPV types kan kanker veroorzaken, waaronder baarmoederhalskanker. De verschillende HPV types zijn ingedeeld in twee groepen op basis van carcinogeniteit; de low risk (lr) HPV types en de high risk (hr) HPV types. De meest voorkomende hrHPV types zijn HPV 16 en 18. Zij veroorzaken samen 70% van alle baarmoederhalskankers. In het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker (het 'uitstrijkje') wordt detectie van hrHPV aanbevolen omdat het een betere opsporing geeft van de voorstadiën van baarmoederhalskanker, de zogenoemde cervicale intra-epitheliale neoplasie (CIN) 1, 2 en 3, waarvan CIN 2 en 3 in het algemeen direct behandeling behoeven (1).



Figuur 1 SMARTFinder® Technologie. Bron: Journal of Clinical Virology 61 (2014) 540-547

De meeste verkrijgbare HPV assays detecteren hrHPV zonder onderscheid te maken tussen de verschillende typen, ondanks de voordelen voor HPV typering. De carcinogene potentie van een individueel hrHPV type kan bijvoorbeeld van invloed zijn op de medische behandeling, op de lengte van vervolg screeningsintervallen of het aantal vervolgonderzoeken na behandeling (2). Verder is een HPV typering ook van belang om de persistentie van een HPV type te bepalen. De persistentie van een

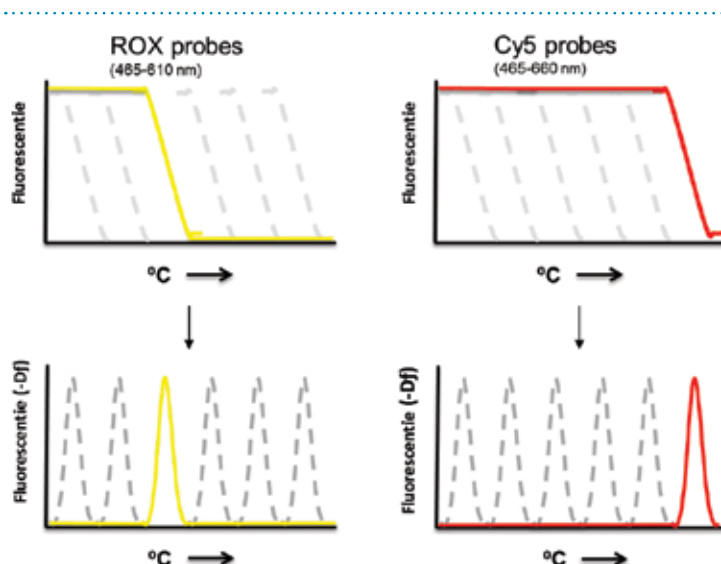
HPV type is een bekende risicofactor voor baarmoederhalskanker (3). Ook voor vaccinatiedoelinden kan HPV typering van belang zijn. De HPV vaccins zijn vooral gericht tegen HPV 16 en HPV 18. In de toekomst zullen mogelijk andere HPV types ook meer voorkomen door vaccinaties tegen HPV 16 en 18. Tenslotte kan vaccinatie voor HPV 16 en 18 ook gebruikt worden, als behandeling na een CIN 2 of CIN 3 laesie veroorzaakt door HPV 16 of 18, om herhaling van de laesie te voorkomen (4).

Design PapillomaFinder® SMART 20

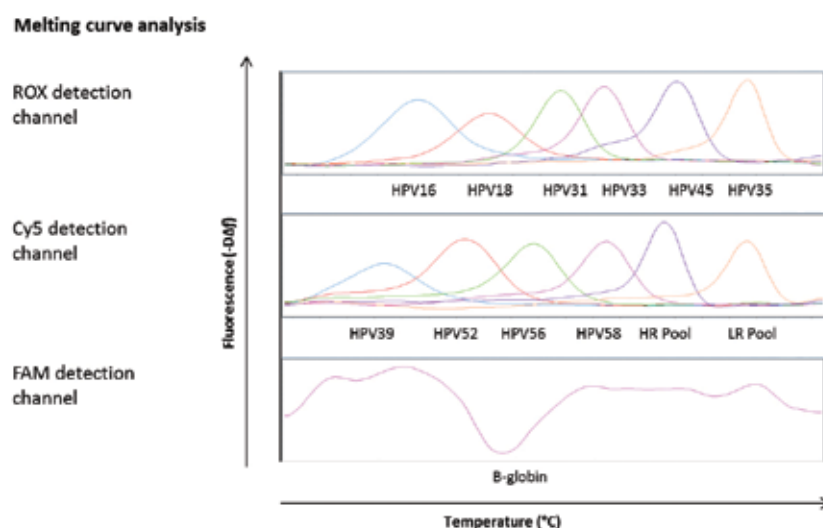
Voor het eerste ontwerp van de PapillomaFinder® SMART 20 is besloten om HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56 en 58 individueel te detecteren. Deze types veroorzaken samen 95% van de gevallen van baarmoederhalskanker (5). HPV 51, 59, 66 en 68 worden gedetecteerd in een high risk (hr) pool en HPV 6, 11, 40, 42, 43 en 44 worden gedetecteerd in een low risk (lr) pool (6). Als interne amplificatie controle hebben we gebruik gemaakt van de detectie van β -globine, afkomstig van menselijk DNA. Het β -globine signaal geeft ook een indicatie voor de kwaliteit van het DNA en de efficiëntie van monsternamen. Alle primers en probes voor de verschillende HPV types zijn ontworpen in het E6 gen, omdat dit gen intact blijft tijdens virale integratie in het humane genoom.

De meeste verkrijgbare typeringstesten maken gebruik van real-time PCR met maximaal een type specifieke triplex (7) of van bewerkelijke post-PCR methodes als sequentie-analyse of 'reverse hybridization' (8). De PapillomaFinder® SMART 20 detecteert twintig targets in een 'single-tube assay'. De PapillomaFinder® maakt gebruik van de SMART (Single tube Multiplex Amplification in Real Time) technologie, die gebaseerd is op de

[vervolg op volgende pagina >](#)



Figuur 2 'Melting curve analysis' principe



Figuur 3 'Melting curve analysis' met de PapillomaFinder® SMART 20 Bron: Journal of Clinical Virology 61 (2014) 540-547

MLPA (multiplex ligation dependent probe amplification) technologie. MLPA maakt het mogelijk om tot veertig targets te detecteren in één reactie (9). Het nadeel van de MLPA is echter, dat capillaire elektroforese nodig is voor de detectie. De SMART® technologie, PathoFinder's eigen technologie platform, zorgt ervoor dat de detectie kan plaatsvinden in een real time PCR apparaat.

De SMARTFinder® Technologie

De SMARTFinder® Technologie bestaat uit vijf basisstappen (zie figuur 1). De eerste stap is een pre-amplificatie, waarin type specifieke primers het target DNA amplificeren. In de tweede stap worden twee verschillende probes toegevoegd voor elk target, die kun-

nen hybridiseren op het geamplificeerde target DNA. De probes zijn als volgt ontworpen: beide probes bevatten een target specifieke sequentie (oranje en blauw in figuur 1), waarmee ze naast elkaar kunnen binden op het target DNA. De 5'-probe bevat daarnaast een universele forward primer sequentie (groen in figuur 1) en een stuffer sequentie (rood in figuur 1) voor detectie. De 3'- probe bevat naast de target specifieke sequentie nog een universele reverse primer sequentie (zwart in figuur 1). De pre-amplificatie en hybridisatie kunnen afzonderlijk uitgevoerd worden in een standaard thermocycler.

Wanneer beide probes gebonden zijn aan het target DNA, kunnen ze

geligeerd worden door Taq ligase in de derde stap. De geligeerde probes kunnen dan in de vierde stap exponentieel geamplificeerd worden door de universele forward en reverse primers. De forward primer bevat een inwendig FAM label, dat in het amplicon ingebouwd wordt tijdens de amplificatie. De vijfde en laatste stap is de detectie aan de hand van 'melting curve analysis'. Detectieprobes met een ROX (geel in figuur 1), Cy5 (rood in figuur 1) of black hole quencher (BHQ) (grijs in figuur 1) label zijn aanwezig in de PCR buffer. De detectieprobes bevatten verschillende labels en hebben verschillende smelttemperaturen, waardoor het mogelijk is om dertien afzonderlijke detectieprobes te detecteren.

De PapillomaFinder® SMART 20 bevat zes verschillende probes met een ROX label, zes verschillende probes met een Cy5 label en één probe met een BHQ label. De ligatie, amplificatie van de geligeerde probes en de detectie gebeuren in één reactie in een real time PCR apparaat zoals een Rotor-Gene of een LightCycler 480. De detectieprobes kunnen hybridiseren aan de stuffer sequentie dichtbij het FAM label, hetgeen resulteert in 'fluorescent resonance energy transfer' (FRET). FRET vindt plaats na excitatie van FAM bij 465nm. Het FAM label zal energie overdragen aan het ROX of Cy5 label, resulterend in de emissie van ROX of Cy5 bij respectievelijk 610nm en 660nm. In het geval van de BHQ wordt het emissie signaal van FAM gedoofd. 'Melting curve analysis' toont de aanwezigheid van de verschillende stuffer sequenties aan, resulterend in HPV typering.

Bij lage temperatuur kan de detectieprobe aan zijn stuffer sequentie hybridiseren, wanneer de temperatuur verhoogd wordt zal de detectieprobe loslaten van de stuffer sequentie bij het bereiken van zijn smelttemperatuur. Dit resulteert in een afname van het fluorescent signaal (geïllustreerd in figuur 2). De negatieve afgeleide van de fluorescentie zet de afname van fluorescent signaal om in een piekenpatroon. Zo krijgt elk target een piek bij een andere smelttemperatuur of in een ander fluorescentie kanaal.

In figuur 3 zijn de piekenpatronen voor de PapillomaFinder® SMART 20 weergegeven voor een 'melting curve

HPV type	Detectiegrens (IU)	Terecht positief	Terecht negatief	Vals negatief	Vals positief	Specificiteit	Sensitiviteit
16	13	6	64	0	0	100,0%	100,0%
18	13	4	66	0	0	100,0%	100,0%
31	10	2	66	2	0	100,0%	50,0%
33	10	4	66	0	0	100,0%	100,0%
35	25	4	66	0	0	100,0%	100,0%
39	25	4	66	0	0	100,0%	100,0%
45	13	4	66	0	0	100,0%	100,0%
51	13	4	66	0	0	100,0%	100,0%
56	13	2	66	2	0	100,0%	50,0%
59	13	4	66	0	0	100,0%	100,0%
66	13	4	66	0	0	100,0%	100,0%
68a	13	4	66	0	0	100,0%	100,0%
68b	13	4	66	0	0	100,0%	100,0%
6	13	4	66	0	0	100,0%	100,0%
11	13	4	66	0	0	100,0%	100,0%

Tabel 1 Resultaten voor the WHO HPV DNA Proficiency Panel 2011 Onderschrift: *Grijze rijen markeren HPV 31 en HPV 56 met een laag gevonden sensitiviteit door 2 gemiste infecties door multiplex PCR in multiple infectie samples.

analysis' met een LightCycler 480 apparaat. In het ROX kanaal worden HPV 16, 18, 31, 33, 45 en 35 gedetecteerd, in het Cy5 kanaal worden HPV 39, 52, 56, 58, de hr pool en de lr pool gedetecteerd. Tenslotte wordt in het FAM kanaal β -globine gedetecteerd. β -globine wordt gedetecteerd met een negatieve piek, omdat het fluorescent signaal van FAM toeneemt bij het afsmelten van de BHQ gelabelde probe. Het volledige protocol neemt vier tot vijf uur in beslag. De uitslagen kunnen dezelfde dag als de monsternamen verkregen worden.

WHO HPV DNA Proficiency Panel 2011

Om meer te leren over de sensitiviteit en de specificiteit van de test zijn er verschillende validaties uitgevoerd. Eerst is het 'WHO HPV DNA Proficiency Panel 2011' getest. Dit panel is samengesteld uit gekende concentraties van gekloneerde HPV genomen van telkens één of meer HPV typen. WHO heeft een aantal eisen opgesteld waaraan een HPV typeringsassay moet voldoen om competent te zijn. Voor HPV 16 en 18 moet minimaal 100 International Units (IU) positief gevonden worden per reactie en voor de andere HPV types in het panel moet een minimaal 1000 IU positief gevonden worden per reactie.

Dit geldt zowel voor enkelvoudige als voor de multiplex infecties.

De gevonden resultaten met de PapillomaFinder® voor het WHO HPV DNA Proficiency Panel 2011 zijn weergegeven in tabel 1. Met de PapillomaFinder® SMART 20 werd een specificiteit van 100% gevonden voor het panel van 2011. Dit betekent dat er geen kruishybridisatie gevonden werd tussen de verschillende HPV types en dat er geen vals positieve infecties zijn gevonden. De gevonden sensitiviteit is 100% voor alle enkelvoudige infecties. In multiple infecties werd HPV 31 gemist in combinatie met drie andere HPV types in 100 IU en 1000 IU. Ook werd een HPV 56 gemist in combinatie met drie andere HPV types in 100 IU en 1000 IU. Waarschijnlijk zijn beide HPV types negatief gevonden door competitie in de multiplex PCR.

Tenslotte werd de detectiegrens voor de HPV types in het panel bepaald door verdunningen te maken van de WHO samples, omdat het panel een goed gedefinieerde concentratie geeft voor de HPV types in het panel. Voor HPV 16 en 18 is een detectiegrens gevonden van 10 IU per reactie, voor HPV 31 en 33 is een detectiegrens gevonden van 25 IU per reactie en

voor de resterende HPV types is een detectiegrens van 13 IU per reactie gevonden.

Klinische samples

Na het testen van het WHO Proficiency Panel zijn klinische samples getest. Het WHO panel is opgesteld om klinische samples na te bootsen. Toch is de variabiliteit in echte klinische samples hoger door verschillen in bijvoorbeeld monsternamen, monsteropslag of mogelijk de aanwezigheid van PCR inhibitoren.

De klinische samples waren uitstrijkjes afgenomen op de afdeling Gynaecologie van het academisch ziekenhuis Maastricht. Deze uitstrijkjes waren gefixeerd in Surepath (een medium voor liquid-based cytologie) en hadden voornamelijk een diagnose van PAP3a2 of hoger. Deze diagnose geeft afwijkende cellen aan en patiënten met deze diagnose worden altijd doorverwezen naar de gynaecoloog voor colposcopie. De verkregen resultaten zijn vergeleken met de resultaten van een commercieel lab (AML-RIATOL, Antwerpen, België). Zij hebben de cytologische samples getest met hun klinisch gevalideerde kwantitatieve real time PCR die HPV types 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67 en 68 detecteert (7).

Een vergelijking voor de gevonden infecties met de PapillomaFinder® SMART 20 ten opzichte van de gevonden infecties door AML-RIATOL.

HPV type	Positief SMART (qPCR)	Negatief SMART (qPCR)	Specificiteit	Sensitiviteit
6	1 (1)	81 (81)	100%	100%
11	0 (0)	82 (82)	100%	NT
16	35 (37)‡	47 (45)	98%	92%
18	6 (12)‡	76 (70)	100%	50%
31	5 (9)‡	77 (73)	100%	56%
33	4 (5)‡	78 (77)	100%	80%
35	2 (1)*	78 (79)	99%	100%
39	1 (2)‡	81 (80)	100%	50%
45	1 (0)*	80 (81)	99%	NT
51	0 (0)	82 (82)	100%	NT
52	3 (4)‡	79 (78)	100%	75%
56	2 (2)	80 (80)	100%	100%
59	3 (4)‡	79 (78)	100%	75%
66	0 (2)‡	78 (80)	100%	0%
68	1 (1)	81 (81)	100%	100%

‡ lager aantal gevonden infecties door multiplex PCR.

* extra gevonden infecties bevestigd met sequencing

In tabel 2 is de vergelijking voor de gevonden HPV infecties tussen beide testen weergegeven. Voor de PapillomaFinder® is een hoge specificiteit gevonden voor de verschillende HPV types. Slechts een aantal HPV types zijn extra gevonden, waarvan een deel is bevestigd met sequentie analyse en een deel te verklaren is doordat de PapillomaFinder® assay extra hrHPV types detecteert. De concordantie voor de bevinding "hrHPV" (dus zonder typering) tussen PapillomaFinder® en de real-time PCR was 100%. Per HPV type echter, is de gevonden sensitiviteit voor een aantal types lager dan in de PapillomaFinder®. Een aantal HPV typen binnen meervoudige infecties zijn niet gevonden, waarschijnlijk als gevolg van multiplex PCR.

In tabel 3 is een voorbeeld gegeven van de gemiste HPV 18 infecties door multiplex PCR. HPV 18 gaf een sensitiviteit van 50% in tabel 2. In tabel 3 zijn alle HPV 18 infecties, die niet gevonden zijn met de PapillomaFinder™ assay, aangegeven met een grijze balk. Het betreft alleen meervoudige infecties waarbij het kopie aantal

teit voor een aantal types lager dan in de PapillomaFinder®. Een aantal HPV typen binnen meervoudige infecties zijn niet gevonden, waarschijnlijk als gevolg van multiplex PCR.

voor HPV 18 (onderstreept in tabel 3) beduidend lager is, dan de kopie aantallen voor de andere HPV infecties aanwezig in deze samples. De ratio in kopie aantal tussen de verschillende HPV types staat aangegeven in de laatste kolom. De laagste ratio gevonden tussen de gemiste HPV 18 en de andere aanwezig HPV types is 700. Het is dan ook niet vreemd dat deze infecties gemist worden in een multiplex PCR. Verder is het niet aannemelijk dat deze lage kopie aantallen de afwijkende cytologie veroorzaken in een sample met de aanwezigheid van een ander HPV type met een veel hoger kopie aantal.

Conclusie

De PapillomaFinder® SMART 20 heeft een sensitiviteit van 100% voor hrHPV in cytologisch materiaal. Een studie op paraffinemateriaal (data niet getoond) liet zien dat ook daarin de sensitiviteit van de test voor hrHPV 100% was. Verder werd een detectiegrens gevonden van 10 tot 25 IU per reactie. Dit maakt de test in zijn huidige format minder geschikt voor het bevolkingsonderzoek, omdat bekend is dat daarbij alleen veel hogere virale loads klinisch relevant zijn (10). De PapillomaFinder® zou teveel infecties aantonen en dat zorgt voor een lage klinische specificiteit. Dit zou opgelost kunnen worden door een klinische cut-off te bepalen of door de assay te vereenvoudigen. Het is waarschijnlijk mogelijk om de pre-amplificatie stap weg te laten of om het aantal cycli te verlagen. Dit zou een lagere analytische gevoeligheid en dus ook een hogere klinische specificiteit geven.

Een vergelijking van resultaten met de PapillomaFinder® SMART 20 ten opzichte van AML-RIATOL voor alle samples waar een HPV18 in gevonden is.

Sample nr.	HPV type PapillomaFinder	HPV type specifieke qPCR	kopieën HPV per humaan genoom equivalent	Ratio tussen de laagste en de hoogste HPV kopie aantal
13	18	18	$7.4 \cdot 10^3$	-
18	16	16, 18	$3.7 \cdot 10^4$, 0.01	$3.7 \cdot 10^6$
19	18	16, 18	0.6, $2.4 \cdot 10^3$	$4.0 \cdot 10^3$
24	35	18, 31, 35	0.03, $4.1 \cdot 10^1$, $>10^5$	$2.4 \cdot 10^3$
25	16, 18	16, 18	10^1 , $2.1 \cdot 10^2$	$2.1 \cdot 10^1$
26	16, 18	16, 18	$1.1 \cdot 10^3$, 0.4	$3.1 \cdot 10^3$
27	16, 18	16, 18	$1.6 \cdot 10^3$, $1.9 \cdot 10^2$	8.6
31	16, 18	16, 18	10^5 , 0.01	$1.0 \cdot 10^7$
32	16, 18	16, 18	10^5 , 0.03	$3.3 \cdot 10^6$
35	16, 18	16, 18	$>10^5$, 0.01	$1.0 \cdot 10^7$
36	16, 39	16, 18, 39	$3.1 \cdot 10^2$, 0.5, $1.7 \cdot 10^1$	$7.0 \cdot 10^2$
44	18, 33, 52	18, 33, 52, 59, 66	$4.3 \cdot 10^1$, $5.6 \cdot 10^1$, $1.7 \cdot 10^3$, $1.7 \cdot 10^1$, 3.0	$9.2 \cdot 10^1$

Grijs gearceerde rijen markeren de samples waarin de PapillomaFinder® een HPV 18 infecties gemist heeft. De HPV 18 infectie met bijhorend aantal kopieën per humaan genoom equivalent zijn onderlijnd. * extra gevonden infecties bevestigd met sequencing

Literatuur

- 1 Rijkart DC, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Bulkman NW, Heideman DA, et al. Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2012 Jan;13(1):78-88.
- 2 Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*. 2005 Jun 20;337(1):76-84.
- 3 Meijer CJ, Snijders PJ, Castle PE. Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecol Oncol*. 2006 Oct;103(1):12-7.
- 4 Kang WD, Choi HS, Kim SM. Is vaccination with quadrivalent HPV vaccine after loop electrosurgical excision procedure effective in preventing recurrence in patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2-3)? *Gynecol Oncol*. 2013 Aug;130(2):264-8.
- 5 Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. [Review]. 2007 Sep 8;370(9590):890-907.
- 6 Ossel J, Litjens R, Reijans MGCM, Brink A, Ummelen M, Ramaekers FC, et al. Human Papillomavirus typing by Single tube Multiplex Amplification in Real Time (SMART): the PapillomaFinder® SMART 20 assay. *J Clin Virol*. 2014;in press.
- 7 Micalessi IM, Boulet GA, Bogers JJ, Benoy IH, Depuydt CE. High-throughput detection, genotyping and quantification of the human papillomavirus using real-time PCR. *Clin Chem Lab Med*. 2012 Apr;50(4):655-61.
- 8 van den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJ, Snijders PJ. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol*. 2002;40(3):779-87.
- 9 Reijans M, Dingemans C, Klaassen CH, Meis JF, Keijder J, Mulders B, et al. RespiFinder: a new multiparameter test to differentially identify fifteen respiratory viruses. *J Clin Microbiol*. 2008 Apr;46(4):1232-40.
- 10 Snijders PJ, van den Brule AJ, Meijer CJ. The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol*. 2003 Sep;201(1):1-6.

Index Analyse 2014 op de website

Vanaf 4 maart is het register van Analyse's uit 2014 op de website van NVML te vinden. Het overzicht staat op www.nvml.nl bij 'Analyse' onder het kopje 'Archief'.

NVML Jaarverslag 2014

Na goedkeuring door de Algemene Leden Vergadering is het verslag van de NVML-activiteiten in 2014 vanaf medio juni te lezen en te downloaden op www.nvml.nl. U kunt het jaarverslag vinden op de pagina Organisatie & Jaarverslag.

The Pathology Company

It's your attention to detail that drives ours.

German design and the optical engineering excellence in our microscopes gives you ultimate clarity and confidence in your daily work.

Learn more about our Clinical Microscopy Portfolio from Leica Biosystems

LeicaBiosystems.com

Copyright©2015 Leica Biosystems Nederland Inc. All rights reserved. Leica and the Leica logo are registered trademarks of Leica Microsystems (GmbH). 95.12258 Rev A



Maak deze aantekening in uw agenda NVML Symposium Fertilititeit 24 september 2015

De Eenhoorn in Amersfoort
aanvang 12.30 uur met een broodjeslunch!

Het programma is bijna rond en zal binnenkort bekend worden gemaakt op de website van de NVML (www.nvml.nl). Deze uitnodiging geldt ook voor analisten die geen lid van de LFN zijn.

Cao UMC

Kijk op onze website www.nvml.nl
voor het laatste nieuws.

Moleculaire detectie van bloedbaaninfecties

M. Bos¹, B. van Meerbergen², A. Rubenjan¹, S. Berghmans², O. Piciu², A. Catsburg¹, G. Maertens², P. Savelkoul^{1,3,4}

1: Microbiome Ltd, Amsterdam

2: Biocartis, Mechelen

3: Afdeling Medische Microbiologie en Infectiepreventie, VUmc, Amsterdam

4: Afdeling Medische Microbiologie, MUMC, Maastricht

Bloedbaaninfecties worden al sinds het begin van de vorige eeuw gediagnosticeerd door middel van het kweken van bloed, waarna bij voldoende groei, het aanwezige micro-organisme geïdentificeerd kan worden. De tijdsduur die hier mee gemoeid is, hangt af van de groeisnelheid van het micro-organisme en de tijd die nodig is voor identificatie. Dit kan variëren van vierentwintig uur tot een aantal dagen. Deze diagnostiek is in de loop der tijd verbeterd door gebruik van verbeterde groeimedia, verbeterde detectie van groei en snellere identificatie door nieuwe methoden zoals MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry). Maar detectie van langzaam groeiende pathogenen zoals *Mycobacterium tuberculosis* en schimmels, blijft problematisch. Ook antibioticagebruik door de patiënt voorafgaand aan de bloedkweek remt of voorkomt de groei van de pathogeen in de bloedkweek (1-3).

Sepsis is een gegeneraliseerde ontstekingsreactie veroorzaakt door een infectie. Deze infectie manifesteert zich vaak in de bloedbaan, daarom is bloedkweek de gouden standaard in sepsis diagnostiek. Het sterftepercentage door sepsische shock (patiënten met sepsis die ook een sterk verlaagde bloeddruk hebben) kan tot wel 45% oplopen. Er is daarom dringend behoefte aan een betere behandeling van sepsis. Het is aangetoond dat elk uur uitstel van een behandeling met adequate antimicrobiële middelen, de mortaliteit na sepsische shock met wel 7% per uur verhoogt (4). Het is dus van het grootste belang om de veroorzaker van de infectie zo snel mogelijk te identificeren zodat de juiste antimicrobiële middelen ingezet kunnen worden. Het is duidelijk dat bloedkweek niet de optimale diagnose-snelheid levert. Daarom zijn er de laatste jaren diverse initiatieven gestart om alternatieve, snellere diagnostiek voor bloedbaaninfecties te ontwikkelen.

MARS project

Een van die initiatieven wordt gesubsidieerd door het Center for Translational Molecular Medicine (5), een Nederlands publiek-privaat samenwerkingsverband ter bevordering van translationeel onderzoek. Het MARS project, wat staat voor Molecular Diagnosis and Risk Stratification of

Sepsis, is erop gericht om testen te ontwikkelen die snel en nauwkeurig informatie geven over individuele patiënten met sepsis. Die testen moeten bijvoorbeeld vaststellen welk micro-organisme verantwoordelijk is voor de infectie en hoe ernstig de reactie op die infectie is. De testen moeten gemakkelijk en snel uit te voeren zijn in de nabijheid van de patiënt, en de arts snel informatie geven over de beste behandeling voor de patiënt.

In dit project zijn inmiddels 7500 patiënten geïncludeerd, waarvan ongeveer 1/3 met sepsis, van de IC units van het Universitair Medisch Centrum Utrecht en het AMC te Amsterdam (figuur 1). Van deze patiënten worden vele klinische parameters verzameld in een database die uniek is in zijn uitgebreidheid. Ook de verzameling van allerlei klinische monsters resulteert in een zeer uitgebreide biobank. In deze monsters worden onder andere expressieprofielen van witte bloedcellen bepaald die meer inzicht geven in de immunusstatus van de patiënt.

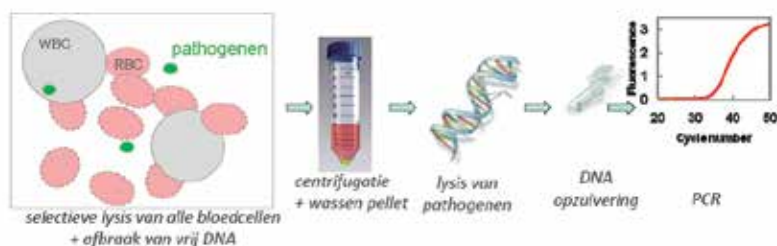
Tot nu toe zijn klinische studies met nieuwe antiseptische medicatie teleurstellend verlopen. Er wordt vanuit gegaan dat de reden hiervoor is dat de trials met te heterogene patiëntengroepen uitgevoerd zijn

(6). Sepsis kan samengaan met zowel over- als onderstimulatie van het immuunsysteem, waardoor er verschillende behandelingen nodig zijn. Hopelijk kan men met betere stratificatie van patiëntengroepen de behandeling beter afstemmen op iedere groep (personalized medicine). Binnen het MARS project ontwikkelen Biocartis, Microbiome, Check-Points en onderzoeksgroepen van de Radboud Universiteit Nijmegen nieuwe en snellere protocollen voor pathogeen-detectie in bloed.

Snelle detectie van pathogenen direct in bloed

De grootste tijdswinst die te behalen valt in de diagnose van bloedbaaninfecties is het overbodig maken van de kweekstap. Dat impliceert dat het pathogeen direct geïdentificeerd moet kunnen worden uit een vers afgenomen bloedmonster. Bij sepsis zijn de bacteriële concentraties in het bloed vaak niet hoog, dit kan zo laag zijn als slechts enkele cfu's per milliliter. De meeste biochemische methoden zijn niet gevoelig genoeg om dit te meten. PCR is een zeer gevoelige techniek die wel enkele moleculen kan aantonen, vandaar dat deze techniek vaak de basis is van nieuw ontwikkelde detectie methoden. Men kan vrij eenvoudig al het DNA uit een bloedmonster isoleren en daar een PCR op toepassen die de meest

Polaris protocol voor pathogeen DNA isolatie uit 5-10 ml bloed



Figuur 1 Opzet van de MARS studie. WP: workpackage.
Voor verder informatie zie: <http://www.ctmm.nl/nl/projecten/infectie/mars/>

voorkomende veroorzakers van bloedbaaninfecties detecteert. Echter, door de lage bacteriële concentraties zal het overgrote deel van het geïsoleerde DNA van humane origine zijn. Dit kan leiden tot remming van de bacteriële PCR (7). Het is gebleken dat met deze benadering slechts 0.2 ml bloed te gebruiken is. Dit is nadelig voor de gevoeligheid van de pathogeen detectie.

Om de gevoeligheid te vergroten zal gebruik gemaakt moeten worden van grotere volumina bloed, waarbij dan specifiek bacterieel DNA geïsoleerd moet worden. Er zijn diverse strategieën ontwikkeld die dit bewerkstelligen: het Duitse SIRS-Lab heeft een methode ontwikkeld, genaamd LOOXSTER, waarbij gebruik wordt gemaakt van het feit dat bacterieel DNA een andere methyleringsstatus heeft dan humaan DNA. Het CXXC finger protein 1 CFP1, gekoppeld aan een drager, zorgt voor specifieke binding van bacterieel DNA uit totaal bloed DNA. Een andere benadering maakt gebruik van de verschillen tussen de celwandstructuur van humane bloedcellen en bacteriële of gistcellen. De methode MolZym ontwikkeld door het bedrijf MolZym is gebaseerd op de toevoeging van chaotrope buffers aan bloed die leiden tot lysis van humane cellen maar niet tot die van micro-organismen. Het vrijgekomen humane DNA wordt vervolgens afgebroken door DNAsen (die bestand zijn tegen de chaotrope buffers) en de intacte micro-organismen

worden geogst via centrifugatie.

Door Philips en Biocartis is de zogenaamde Polaris methode ontwikkeld: hierbij worden ook specifiek humane cellen gelyseerd, in dit geval door een specifiek detergens. Het vrijgekomen humane DNA wordt hierna chemisch afgebroken door de pH conditie van de buffer (figuur 2). Dit is een groot voordeel boven enzymatische afbraak omdat chemische afbraak een veel stabiel proces is. Micro-organismen kunnen worden geogst door centrifugatie of filtratie. In principe kan dit proces toegepast worden op elk volume bloed. Succesvolle resultaten zijn in ieder geval behaald met 5 en 10 ml bloed (8).

Detectie van pathogeen DNA uit bloed

Na het verkrijgen van voldoende pathogeen DNA zonder remmende factoren zijn er diverse PCR protocollen ontworpen voor identificatie. De SeptiFast kit van Roche maakt gebruik van real-time PCR gevolgd door (een nogal bewerkelijke) smeltcurve analyse. Hiermee kunnen de vijftientig meest voorkomende bloedbaaninfectie pathogenen (zowel bacteriën als gisten) gedetecteerd worden. MolZym heeft een PCR ontwikkeld (SepsiTest) die een geconserveerd target amplificeert, wat daarna gesequenced moet worden ter identificatie van het pathogeen. Dit vergt in zijn geheel meer tijd dan real-time PCR en speciale apparatuur voor het sequencen. Het

voordeel van deze benadering is de brede schaal van detectie, meer dan 345 soorten bacteriën en gisten zijn zo identificeerbaar. Microbiome heeft een aantal multiplex PCRs ontwikkeld die de vijftien meest voorkomende sepsis pathogenen op species niveau detecteert met daarbij een brede PCR die onderscheid maakt tussen een Gram-positieve en Gram-negatieve bacterie. In geval van een bacterieel pathogeen dat niet in het specifieke panel zit, is er toch snel uitsluitel wat betreft de Gram-status van de bacterie, zodat de behandeling daarop toegespitst kan worden.

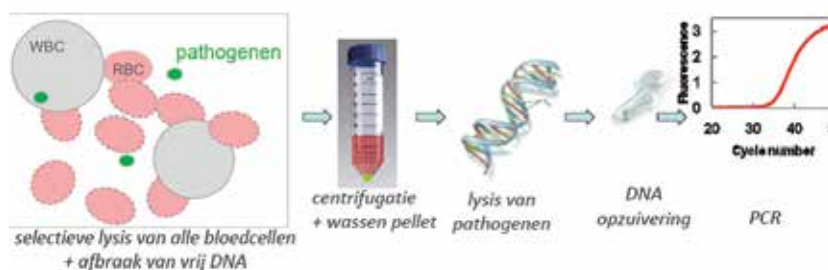
Detectie van antibioticum resistentie

De traditionele methode om antibioticum resistentie te bepalen, is het kweken van het pathogeen in aanwezigheid van een reeks aan antibioticumconcentraties. Voor een adequate sepsisbehandeling is kennis over de resistentie van de pathogeen vanzelfsprekend ook noodzakelijk. De klassieke resistentiebepaling duurt echter te lang voor optimale sepsis diagnostiek, vandaar dat Microbiome in het multiplex PCR panel gekozen heeft om enkele van de meest voorkomende resistentie-op te nemen. Dit geeft natuurlijk niet een volledig beeld van de klinisch relevante resistentie, omdat de aanwezigheid van het gen niet perse gerelateerd is aan fenotypische resistentie. Maar dit geeft voldoende informatie voor een eerste beslissing over de behandeling.

Integratie van de assays in een gesloten systeem

Voor detectie van lage pathogeen concentraties, zoals bij sepsis, is een gevoelige detectie noodzakelijk. Dit brengt als nadeel met zich mee dat ook contaminatie gemakkelijk gedetecteerd wordt, wat kan leiden tot vals-positieve uitslagen. Bronnen van contaminatie kunnen zijn de uitvoerder van de test, met name bijvoorbeeld Staphylococci en Streptococci van de huid, maar ook de reagentia die gebruikt wordt voor de test. Zo kunnen in PCR master mixen sporen van E. coli DNA zitten die meegekomen zijn met de opzuivering van het DNA polymerase wat als recombinant eiwit in E. coli geproduceerd wordt. Het is inmiddels gebleken dat veel laboratorium plastics en bloedbuizen sporen van bacterieel of fungaal DNA kunnen

vervolg op volgende pagina >



Figuur 2 Schematische weergave van het Polaris protocol voor pathogeen DNA isolatie uit 5-10 ml bloed'



Figuur 3 Geïntegreerd DNA isolatie en realtime multiplex PCR systeem. Voor verder informatie zie: www.biocartis.com/idylla

bevatten die afkomstig zijn uit water of andere omgevingsbronnen (9). Om alle gebruikte materiaal en reagentia DNA-vrij te maken, of in ieder geval het contaminerende DNA zodanig te beschadigen dat het niet meer geamplificeerd kan worden, zijn rigoureuze behandelingen noodzakelijk zoals UV- of gamma-bestraling. Sommige ingrediënten kunnen niet behandeld worden zoals het polymerase of de primers en probes nodig in de PCR.

Om vals-positieve uitslagen zoveel mogelijk te voorkomen, ontwikkelt Biocartis een apparaat waarbij bloed opgewerkt wordt met het Polaris protocol in een geheel gesloten systeem, het zogenaamde Idylla™-Enrich platform. Hierbij wordt een bloedbuis aan het systeem gekoppeld en binnen dertig minuten wordt het pathogeen DNA in ruwe vorm geïsoleerd. Dit systeem kan gekoppeld worden aan een ander gesloten systeem ontwikkeld door Biocartis, genaamd Idylla™, waarin DNA-isolatie gevolgd door real-time PCR plaatsvindt. In het Idylla™ systeem kan de sepsis multiplex PCR geïntegreerd worden. Beide systemen, inclusief de benodigde chemicaliën, kunnen geheel of gedeeltelijk bestaand worden zodat alle contaminerend DNA vernietigd wordt (Figuur 3).

Uiteindelijk zal dit resulteren in een systeem dat gebruikt kan worden door mensen zonder specifieke laboratoriumkennis.

Bloedbaaninfecties kunnen binnen twee tot drie uur gediagnosticeerd worden. Dit systeem hoeft niet in een laboratorium te staan omdat het gehele proces in een gesloten compartiment plaatsvindt. Het kan dus dichtbij de patiënt, op de afdeling geplaatst worden (point-of-care). Er zal geen tijd meer verloren gaan met transport, beschikbaarheid van personeel, wachten op de kweek enzovoorts. Daarmee heeft dit systeem het potentieel om de diagnose van sepsis revolutionair te veranderen!

Acknowledgement

Dit onderzoek is grotendeels gesponsord door CTMM, the Center for Translational Molecular Medicine, project MARS.

Literatuur

- 1 Loonen AJ, Wolfs PF, Bruggeman CA, van den Brule AJ. 2014 Developments for improved diagnosis of bacterial bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. DOI 10.1007/s10096-014-2153-4
- 2 Liesenfeld O, Lehman L, Hunfeld KP, Kost G. Molecular diagnosis of sepsis: New aspects and recent developments. 2014. *Eur J Microbiol Immunol*. 4:1-25
- 3 Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. 2012 New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clin Microbiol Rev*. 25:609-634.
- 4 Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M. 2006 Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*. 34:1589-1596.
- 5 CTMM, www.ctmm.nl
- 6 Opal SM, Dellinger RP, Vincent JL, Masur H, Angus DC 2014 The next generation of sepsis clinical trial designs: what is next after the demise of recombinant human activated protein C? *Crit Care Med* 42:1714-1721
- 7 Al-Soud WA, Rådström P. 2001 Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol*. 2001 Feb;39(2):485-93
- 8 Loonen AJ, Bos MP, van Meerbergen B, Neerken S, Catsburg A, Dobbelaer I, Penterman R, Maertens G, van de Wiele P, Savelkoul P, and van den Brule AJC. 2013 Comparison of pathogen DNA isolation methods from large volumes of whole blood to improve molecular diagnosis of bloodstream infections. *PLoS ONE* 8(8): e72349.
- 9 Mühl H, Kochem AJ, Disqué C, Sakka SG. 2010 Activity and DNA contamination of commercial polymerase chain reaction reagents for the universal 16S rDNA real-time polymerase chain reaction detection of bacterial pathogens in blood. *Diagn Microbiol Infect Dis* 66:41-49.

Prijsvraag

Wat is het?

De rubriek 'Wat is het?' is weer terug van weggeweest. Wat staat hiernaast op de foto?

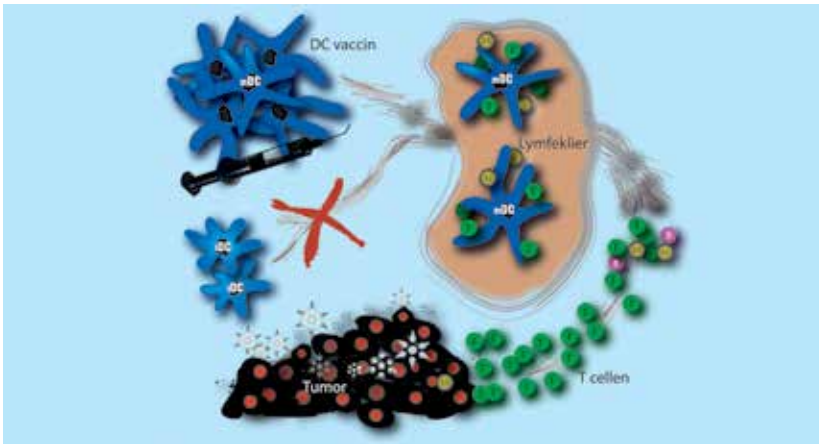
Het antwoord kun je sturen naar nvml@nvml.nl onder vermelding van 'Wat is het?'. Oplossingen kunnen ingestuurd worden tot 7 juli 2015. De winnaar ontvangt een VVV-bon ter waarde van €10,00. De winnaar en de oplossing worden bekend gemaakt in Analyse nummer 4.



Vaccins met dendritische cellen als nieuwe behandeling voor asbestkanker?

M.E.H. Kaijen-Lambers, research analist, Erasmus MC

Bij de afdeling Longziekten van het Erasmus MC in Rotterdam werk ik aan onderzoek waarbij patiënten met asbestkanker (mesotheliom) worden behandeld met dendritische cel (DC)- immunotherapie. Als research analist voer ik veel van de procedures uit samen met Koen Bezemer (research analist) onder begeleiding van Joost Hegmans (PhD). Het samenwerken binnen onze groep, maar ook met de vele andere afdelingen binnen het Erasmus MC, maken het werk leuk en ook uitdagend. Iedere keer als we een vaccin afgeven in het ziekenhuis, zien we voor wie we dit doen. Dat is mijn drijfveer om me volledig voor deze studie in te zetten. In dit artikel leg ik uit wat deze experimentele therapie precies inhoudt.



Figuur 1 Bij mesotheliom zijn lokale DC's niet meer in staat om te migreren naar de lymfeklier om daar T cellen te activeren, ze blijven in een immature staat (iDC). Na vaccinatie verplaatsen de mature DC's (mDC) zich naar de lymfeklier, T cellen kunnen nu wel geactiveerd worden en gaan richting de tumor om deze aan te vallen.'

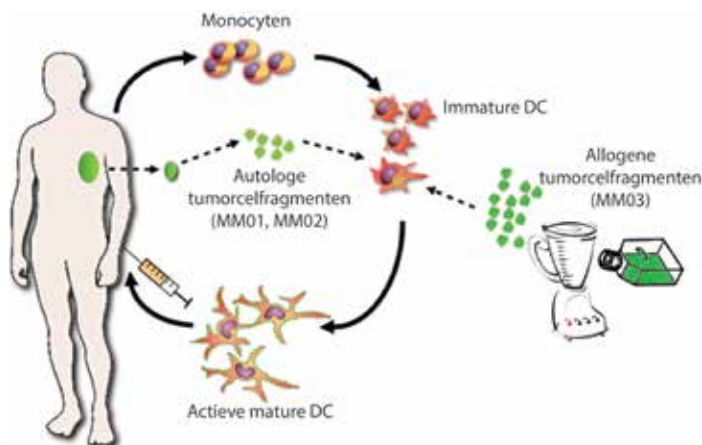
Mesotheliom is een vorm van kanker dat kan ontstaan na inademing van asbestvezels. De ingeademde asbestvezels gaan diep in de longen vastzitten en cellen van het immuunsysteem zoals macrofagen zullen deze vezels proberen te verwijderen. Asbestvezels zijn echter niet afbreekbaar en kunnen niet verwijderd worden. Hierdoor maken de macrofagen nog meer stimulerende stoffen aan, je zou kunnen zeggen dat ze gefrustreerd raken. Hierdoor ontstaat een milieu waarin gezonde mesothelcellen genetische veranderingen kunnen ondergaan en zo uitgroeien tot een kwaadaardig mesotheliom. De huidige behandeling van een mesotheliom bestaat uit chemotherapie en in sommige gevallen wordt dit gecombineerd met chirurgie of bestraling. De gemiddelde

overlevingsduur na diagnose is 9 maanden. De huidige behandelingen leveren een gemiddelde levensverlenging van slechts 3 maanden op. Als aanvulling op de bestaande behandelmethode onderzoeken we een experimentele behandeling, DC-immunotherapie, specifiek voor mensen met mesotheliom. Bij DC-immunotherapie worden mensen behandeld met autologe (eigen) dendritische cellen (DC's). DC's zijn cellen die de omgeving screenen op schadelijke indringers. Ze zijn van nature in lage aantallen aanwezig in ons lichaam, met name in de longen en de huid. Zodra DC's vreemde fragmenten herkennen, worden deze fragmenten opgenomen en afgebroken. Daarna worden delen hiervan gepresenteerd op het celoppervlak. Het presenteren van

deze fragmenten moet je zien als een soort lesmateriaal waarmee specifieke T cellen geactiveerd kunnen worden. Op het moment dat een DC in een gezonde situatie fragmenten opneemt en verwerkt, gaat het naar een lymfeklier waar ze de T-cellen onderwijzen. In het geval van de meeste kankervormen is de omgeving van de tumor sterk remmend op de werking van DC's, waardoor ze niet naar de lymfeklier migreren (figuur 1). Deze migratie van de DC naar de lymfeklier en de interactie met de T cellen is echter wel essentieel voor het op gang brengen van een goede afweerreactie. In onze klinische studie kweken we daarom in het laboratorium monocytën vanuit het bloed tot DC's, die tumorfragmenten presenteren. Deze opgekweekte DC's geven we door middel van een vaccinatie protocol terug aan de patiënt zodat de afweerreactie wel op gang komt (Figuur 1).

Een mesotheliom wordt vaak pas in een laat stadium opgemerkt. De eerste klachten ontstaan meestal doordat vocht zich ophoopt tussen de twee longvlieszen van de pleuraholte. Dit vocht, het zogeheten pleuravocht, is de reden dat patiënten zich bij de huisarts melden waarna een verwijzing richting het ziekenhuis volgt. Vaak is dit het Erasmus MC in Rotterdam omdat hier al jarenlang veel onderzoek wordt gedaan naar deze ziekte en er tal van experimentele studies uitgevoerd worden.

[vervolg op volgende pagina >](#)



Figuur 2 Monocyten vanuit het bloed worden gekweekt tot DC's, tijdens de immature fase worden tumorcelfragmenten aan de kweek toegevoegd (autoloog of allogeen). De fragmenten worden verwerkt en tot expressie gebracht door de DC's. DC's worden gecontroleerd en klaargemaakt voor vaccinatie.



Figuur 3 Een foto vanuit de cleanroom, waar we aan het kweken zijn. Goed zichtbaar is de kleding die we moeten dragen en de actieve monitoring die plaatsvindt met kweekplaten.

In onze eerdere klinische studies (in figuur 2 weergegeven als MM01 en MM02) verzamelden we dit pleuravocht van de patiënten. In dit pleuravocht kunnen tumorcellen aanwezig zijn, waarvan we fragmenten maken die worden opgenomen door DC's. Deze DC's kunnen vervolgens deze fragmenten weer presenteren aan T cellen (autoloog). Bij veel patiënten bleken er echter niet genoeg tumorcellen in het pleuravocht te zitten, waardoor deze patiënten niet behandeld konden worden met DC-immunotherapie. In onze huidige studie (MM03) hebben we de tumorcellen van de patiënt vervangen door een mix van tumorcel fragmenten van andere patiënten, die we hebben gekweekt in het laboratorium (allogeen). Hierdoor kunnen veel meer

patiënten deelnemen aan de experimentele behandeling. We bekijken in de huidige studie primair of er bijwerkingen optreden en secundair naar de reactie van het immuunsysteem van de patiënt. In figuur 2 staat het proces van DC kweek en de verschillende tumorcel fragmenten (autoloog of allogeen) die een DC kan opnemen en presenteren, van de verschillende studies weergegeven.

Wanneer een patiënt deelneemt aan een studie, starten we met een aferese. De aferese van de patiënt vindt plaats op de hemaferese unit in het ziekenhuis. De patiënt wordt in beide armen geprikt en het bloed stroomt via een aferese apparaat van de ene naar de andere arm van de patiënt. In het aferese apparaat

worden de witte bloedcellen uit het bloed van de patiënt gehaald en in een zak verzameld. De overgebleven vloeistof (plasma) en de andere cellen gaan weer terug naar de patiënt. We hebben veel cellen nodig en dit proces duurt minimaal drie uur. Al het bloed van een patiënt gaat bijna twee keer door het apparaat. Aan het einde van het proces wordt de zak, waar de verzamelde witte bloedcellen inzitten, losgekoppeld van de machine en overgedragen aan de afdeling hematologie.

Voor het kweken van DC's hebben we monocyten nodig en moet er nog een extra zuiveringsstap plaatsvinden. Monocyten brengen het antigeen CD14 tot expressie waardoor je deze monocyten kunt onderscheiden van andere 'verontreinigende' cellen. De zuivering vindt plaats door middel van een CliniMACS procedure op de afdeling Hematologie waarbij wij ondersteunen. Door CD14 op de monocyten te laten binden aan een ijzerbolletje kan het, via een kolom die magnetisch is, gescheiden worden van de ongewenste overige cellen. Deze zuivering duurt ongeveer vier uur en wordt gecontroleerd met behulp van flowcytometrie. Zodra de procedure klaar is worden de CD14 cellen officieel overgedragen aan ons en kunnen we starten met het kweken van de DC's.

Omdat het kweken van DC's schoon moet gebeuren, wordt dit uitgevoerd in een 'cleanroom'. Dit is een afgeschermd omgeving waarin zich weinig (stof)deeltjes bevinden. Bij verstoring van deze afgeschermd omgeving kunnen er nadelige gevolgen zijn voor het kweekproces. Voordat je in deze ruimte mag kweken, volg je een specifieke 'Cleanroom Gedragscursus'. Zodra de overdracht van de monocyten heeft plaatsgevonden, gaan we met twee personen de cleanroom in waar we de celkweek voor de patiënt starten. In de tiendaagse kweekprocedure waarbij we de cellen uitrijpen tot DC's, komen we op de volgende dagen in de cleanroom; op dag twee vervangen we een deel van het medium en voegen we groeifactoren (IL-4 en GM-CSF) toe die er voor zorgen dat de monocyten

tot immature DC's uitrijpen; op dag vijf oogsten we de op dat moment immature DC's, platen ze uit in zes wells platen en voegen cytokines en tumor lysaat aan het kweekmedium toe; na acht dagen voegen we medium toe met maturatie cytokines en op dag tien oogsten we de rijpe DC's. Tijdens dit kweekproces moet de steriliteit goed gemonitord worden door monsters te nemen van de lucht en de kweek. Tijdens de kweek hebben we bacterieplaten open staan om verontreiniging uit de lucht te detecteren. Aan het einde van elk kweekmoment nemen we een monster van de DC kweek en een contact afdruk van onze handschoenen die worden gecontroleerd op steriliteit.

Na het oogsten van de DC's bepalen we de maturatie status van de DC's door middel van flowcytometrie. In de cleanroom wordt het eerste vaccin klaargemaakt voor de patiënt, voor de overige vaccins worden de cellen vitaal ingevroren voor later gebruik. Omdat de veiligheid van de patiënt niet in gevaar mag komen, worden tijdens het gehele productieproces van monocytyn tot aan DC's alle handelingen geadministreerd door de analisten die de kweekprocedure hebben uitgevoerd. Deze administratie wordt daarna door verschillende personen nagekeken. Het hoofd van onze groep loopt alle stappen na en vat alle resultaten samen in een release-formulier. Vervolgens worden alle data doorgenomen en door de 'qualified person' (QP) wordt het release-formulier ondertekend. De volgende stap is de apotheker, die controleert de injectiespuit op naam, datum en inhoud en het release formulier dat is ondertekend door de QP. Na de apotheek vervolgen wij onze weg naar de patiënt, waar een afdelingsverpleegkundige en de longarts klaar staan voor ontvangst. Zij controleren nogmaals of naam, datum en inhoud kloppen met de patiëntgegevens. Zodra deze stappen genomen zijn, wordt de patiënt gevaccineerd. De patiënt krijgt in totaal twee injecties per visite, 1/3 van de cellen wordt subcutaan (onder de huid) gespoten en 2/3 van de cellen wordt intraveneus (in de bloedbaan) gegeven. De patiënt blijft twee uur op de afdeling

ter controle en mag dan naar huis. Er wordt onder andere gekeken naar de bloeddruk en temperatuur, maar ook of er ongewenste reacties optreden. In totaal krijgt de patiënt drie vaccins in een periode van zes weken, vaccins vier en vijf volgen na respectievelijk drie en zes maanden.

Daarnaast zijn er nog veel activiteiten die we als analist 'achter de schermen' uitvoeren en die cruciaal zijn voor het goed laten verlopen van deze studie. Het kweken van de monocytyn tot DC's en opladen ervan wordt door de Inspectie voor de Gezondheidszorg (IGZ) ingeschaald als ATMP (Advanced Therapy Medicinal Product). Er zijn specifieke regels vastgelegd voor ATMP's waarbij een risicoanalyse gemaakt wordt en je inventariseert of er ongewenste bijwerkingen kunnen ontstaan met alle stoffen die je gebruikt tijdens het maken van de ATMP. Dit houdt in dat we voor alle stoffen die we gebruiken tijdens de bereiding van de DC's een grondstofdossier hebben geschreven met risicoanalyse en kwaliteitseisen. Verder verwerken we de monitoringsuitslagen in de release-formulieren en zijn we verantwoordelijk voor het plaatsen van bestellingen en het verwerken van de data die we krijgen via flowcytometrie. We verwerken bloed dat tijdens de vaccinatieperiode wordt afgenomen. In een later stadium zullen we verschillende experimenten inzetten om te bekijken of het bloedbeeld van de patiënt tijdens de experimentele studie verandert. We verwachten dat een specifieke reactie op het vaccin optreedt, waarbij het immuunsysteem geactiveerd wordt. Een deel van de analyses die we zullen uitvoeren op het bloed zijn bekend, maar een deel ook nog niet. Het uitdenken hiervan doen we met onze hele onderzoeksgroep, aangevuld met studenten van onder andere de opleiding geneeskunde en of HLO. Onze praktische en theoretische kennis delen we en vullen we met elkaar aan om tot nieuwe inzichten te komen.



Auteur

Margaretha Kaijen-Lambers heeft de opleiding Biologie en Medisch Laboratorium Onderzoek aan de Avans hogeschool te Breda in 2004 afgerond. Sindsdien is zij werkzaam aan de Erasmus Universiteit te Rotterdam als research analist op de afdeling Longziekten. Daar werkt ze aan preklinisch onderzoek in verschillende diermodellen om de invloed van het immuunsysteem op de groei en ontwikkeling van asbestkanker (mesothelioom) te onderzoeken. Met deze kennis wordt getracht om een speciale vorm van immunotherapie, de dendritische cel (DC)-immunotherapie, te optimaliseren. Verder is zij mede verantwoordelijk voor het opzetten en uitvoeren van de verschillende klinische protocollen die er binnen de oncologie groep van de afdeling Longziekten lopen. Kennis uitwisseling met andere analisten en onderzoekers is daarbij cruciaal en deelname aan congressen vindt zij dan ook belangrijk. Op dit moment werkt zij onder andere aan het onderzoek waarbij dendritische cellen opgeladen worden met allogeen materiaal ter behandeling van deze kanker patiënten, waar dit artikel verder op ingaat.

Correspondentie:

m.lambers@erasmusmc.nl

Uitreiking Zilveren Vlam tijdens de Vakbeurs 2015

Op de druk bezochte tweejaarlijkse NVML-Vakbeurs is de Zilveren Vlam, de prijs voor de beste afstudeerders van MLO en HLO in het studiejaar 2013-2014, uitgereikt.



Op deze foto van links naar rechts: jurylid Sonja Groenendijk, juryvoorzitter Edwin Boel, HLO-prijswinnaar Dior Beerens, MLO-prijswinnaar Salgai Eshaq en NVML-directeur Marja Pospiech.

Voor het MLO is de winnaar mevrouw Salgai Eshaq. Zij is afgestudeerd aan de Middelbare Laboratoriumschool in Beverwijk. De titel van het verslag is: "ACTH en Cortisol". De titel zelf is niet veelzeggend, maar in het verslag is zeer helder de validatie beschreven van de bepaling van ACTH en Cortisol op een Cobas 6000 systeem. Het verslag is goed uitgewerkt, overzichtelijk en eindigt met een duidelijke aanbeveling met daarbij nog wat kritische punten die in de gaten moeten worden gehouden. De aanbeveling van de stageplek in het NKI-AVL was zeer lovend waarbij de zelfstandigheid, de goede ontwikkeling tijdens de stage en de kritische beschouwing van eigen werk maar ook van de omgeving als zeer positief zijn ervaren.

Bij het HLO is de heer Dior Beerens de winnaar. Dior Beerens is afgestudeerd aan de Avans Hogeschool in Breda. De titel van het Engelstalige verslag is: "A Lipooligosaccharide Silencing RNA regulates *Campylobacter jejuni* pathogenicity". Het verslag is geschreven als een artikel, is zeer prettig leesbaar en voorzien

goede overzichtelijke illustraties. Het werk is uitgevoerd bij de afdeling Medische Microbiologie en Infectieziekten van het Erasmus MC in Rotterdam. Er is gebruik gemaakt van veel verschillende technieken om aannemelijk te maken dat in *Campylobacter* het CRISPR-CAS systeem gebruikt wordt om sialzuur bevattende koolhydraten op het oppervlak te reguleren, wat van belang is voor virulentie.

Juryvoorzitter dhr. Edwin Boel, in het dagelijks leven arts-microbioloog in UMC Utrecht en tevens NVML-adviseur, las het juryrapport voor en overhandigde de oorkonde en geldbedrag. De prijswinnaars werden daarna ook nog in de schijnwerper gezet door een docent van hun opleiding. Salgai Eshaq heeft inmiddels een werkplek gevonden op het laboratorium van het NKI-AVL; Dior Beerens volgt momenteel een Master Infection & Immunity op Erasmus MC te Rotterdam.



Langzamerhand wordt het voorjaar!

Het is ook dit jaar mijn taak om zo eind april, begin mei een stukje vanuit het bestuur te schrijven. Vanuit de mooie Bol-lenstreek gaat het dan natuurlijk altijd een beetje over de bloeiende bollen velden en vandaag is er zelfs de kers op de taart: het bloemencorso. De regen is even opgehouden, tijd voor een paar mooie foto's.

Het thema van dit jaar is tweehonderd jaar Koninkrijk en dat is goed te zien aan de praalwagens met kronen en de gouden koets. Zelfs na zoveel keer kijken blijft het een mooi schouwspel. Alle enthousiaste mensen langs de route en de enthousiaste mensen op de praalwagens en niet te vergeten de muziekkorpsen die hun deuntje meebazen en trommelen.

Het lijkt een beetje op de NVML. Eerst het ontwerpen van de plannen (beleidsplan), dan de uitvoering, de evaluatie, het finetunen en het bijstellen. Alles uitgewerkt en uitgevoerd door enthousiaste commissie- en werkgroep leden.

Voor een succesvolle NVML zijn we niet alleen afhankelijk van dat wat we zelf denken dat goed is, maar we zijn zeker ook afhankelijk van dat wat om ons heen gebeurt. Na een aantal moeilijke jaren gaat het volgens de berichten in de media ook weer wat beter met de economie. We geven met z'n allen weer wat meer uit aan de noodzakelijke, maar ook aan de leuke dingen in het leven. De beter draaiende economie is (nog?) niet te merken binnen de laboratoriumwereld, waar we te maken hebben met een groeiende macht van de zorgverzekeraars. Deze macht blijkt uit een rem op het aantal aanvragen en opgelegde korting op de tarieven. Hieruit voortvloeiend neemt de druk op de werkgelegenheid in laboratoria toe. De NVML houdt deze ontwikkelingen nauwlettend in de gaten en zal daar waar mogelijk inspelen op situaties.

Dan is er ook nog de ISO 15189, waar de laboratoria aan moeten gaan voldoen. Een nieuwe norm met toch wel grote verschillen ten opzichte van de 'oude' CCKL-praktijkrichtlijn. Met name het deel over competenties, na- en bijscholing is aangescherpt en de norm is meer gericht op patiëntveiligheid en het elimineren van risico's. Met het uitgebreide aanbod aan congressen, symposia, bij- en nascholingen en niet te vergeten de veertien e-learningmodules kan de NVML een grote rol spelen bij de invulling van de ISO-norm.

Mei is de voorjaarsmaand, waar we toch ook wel vrolijk van worden. De winter, voor zover we die hebben gehad, is voorbij en de natuur fleurt weer op. Mei is ook de maand van de Algemene Leden Vergadering (ALV) van de NVML, waarin wij als bestuur verantwoording afleggen over het afgelopen jaar. Als bestuur ben je verantwoordelijk voor het beleid van de vereniging. Dat beleid is vastgelegd in een beleidsplan dat eens in de ongeveer drie jaar grondig onder de loep wordt genomen. Het afgelopen jaar is gebruikt om het beleidsplan 2011-2014 te evalueren. Wat ging er goed en wat kan beter, wat zijn kansen en wat zijn bedreigingen?

Rekening houdend met de ontwikkelingen binnen de hele laboratoriumwereld heeft dit geleid tot een nieuw meerjarenbeleidsplan wat tijdens de ALV zal worden gepresenteerd. De weg die we in hebben gezet zal worden voortgezet. Laboratoriumlidmaatschappen en verdere uitbreiding van de e-learningmodules zullen tot de speerpunten behoren, maar ook de 'normale' na- en bijscholingsactiviteiten blijven nadrukkelijk op het programma staan.

Nelly IJzerman
Bestuur NVML

NVML

Wilhelminapark 52, 3581 NM Utrecht. Telefoon: 030-2523792.
Telefonisch bereikbaar: maandag tot en met donderdag van 9:00 tot 14:00. Fax: 030-2541814. E-mail: nvml@nvml.nl.
Website: www.nvml.nl

Bereikbaarheid bureaumedewerkers

- Ria Blom (organisatie nascholing): maandag, dinsdag en donderdag.
- Marja Pospiech (beroepsinhoudelijke belangenbehartiging en algemene zaken): maandag tot en met donderdag.
- Alice Gosselt-Imming (organisatie nascholing): maandag, dinsdag en donderdag.
- Jenny Schoemaker (voorlichting en sociale belangenbehartiging): dinsdag t/m donderdag.

Lidmaatschap

Voor informatie en ledenadministratie kunt u contact opnemen met het bureau van de NVML.

Contributie

Lees het aanmeldingsformulier op de website: www.nvml.nl.

Opzegging

Schriftelijk vóór 1 november van het lopende jaar per post, fax of e-mail. U ontvangt hiervan een bevestiging binnen 10 werkdagen. Omdat niet al het communicatieverkeer probleemloos verloopt, adviseren wij u bij het uitblijven van de bevestiging telefonisch contact op te nemen met het bureau van de NVML.

Bestuur

Voorzitter

mw. M.J. Egbers, afdeling Medische Microbiologie, Isala Kliniek Zwolle

Penningmeester

mw. S. Versluis-van den Born, Medisch Centrum Kinderwens, Leiderdorp

Secretaris/vicevoorzitter

mw. N. IJzerman, hoofd KAM-dienst, Medial, Hoofddorp

Leden

mw. E.C. Liesting, afdeling Specieële Klinische Chemie en Hematologie, UMC Utrecht
dhr. A.J. van der Kolk, operationeel manager
KCI Deventer ziekenhuis
dhr. B. klein Brink, Manager Histopathologie, Symbiant

Aspirant bestuurslid

mw. H. Duijn, Antoni van Leeuwenhoekziekenhuis Amsterdam

Adviseurs

- prof. dr. M.A. Blankenstein, Amsterdam, klinisch chemicus
- dr. H. Hazelbag, Den Haag, patholoog
- mw. E.C. de Jong PhD, cellulair immunoloog
- dr. C.H.E. Boel, Utrecht, arts-microbioloog

NVML-Commissies en werkgroepen

Commissie Internationale Contacten

Contactpersoon: Marja Pospiech, bureau NVML.

Commissie Kwaliteit

Contactpersoon: Petra Melsen

Commissie Nascholing

Contactpersoon: Alice Gosselt-Imming en Ria Blom, bureau NVML.

Commissie/Platform Onderwijs

Contactpersoon: Marja Pospiech, bureau NVML.

Redactiecommissie

Contactpersoon Annerieke Nieuwenhuijse

Werkgroep Registratie

Contactpersoon: Marja Pospiech, bureau NVML

Commissie Sociale Belangen

Contactpersonen: Marja Pospiech en Jenny Schoemaker, bureau NVML.

Werkgroep e-learning

Contactpersoon: Nelly IJzerman

Landelijk fertiliteitsnetwerk (LFN)

Contactpersoon Sandra Versluis

Landelijk kwaliteitnetwerk (LKN)

Contactpersoon Elly Bom

Werkgroep Hoofdanalisten Medische Microbiologie (WHAMM)

Contactpersoon: Marianne Egbers

Werkgroep Hoofdanalisten Klinische Chemie (WHAKC)

Contactpersoon: Eline Liesting

Werkgroep Hoofdanalisten Pathologie (WHAPA)

Contactpersoon: John van Marsdijk

Congres



Allergie- diagnostiek

al 40 jaar waardevol

Donderdag 15 oktober 2015

Congrescentrum De Eenhoorn in Amersfoort

ThermoFisher
SCIENTIFIC

www.nvml.nl

Vakbeurs 2015

De vijfde Vakbeurs werd gehouden op donderdag 26 maart in Nijkerk.
Op deze pagina een foto impressie van de geslaagde dag.



Kritisch leren kijken naar wetenschap met het boek 'Broddelwetenschap'

W. van de Sande, PhD, Medische Microbiologie & Infectieziekten, Erasmus MC

Titel: Broddelwetenschap

Auteur: Hans van Maanen

Uitgever: Atlas Contact

ISBN: 9789045027937

Prijs: €19,99

Als wetenschappelijk onderzoeker weet ik hoe belangrijk het is om kritisch naar de literatuur te kijken. Toch zijn er nog steeds veel mensen die alle wetenschappelijke literatuur klakkeloos geloven en overnemen. Het boek 'Broddelwetenschap' van Hans van Maanen, laat je op een leuke manier zien hoe je kritisch naar de verschenen literatuur moet kijken.

'Broddelwetenschap' is een compilatie van zijn eerder verschenen columns in de Volkskrant. De columns zijn zo gebundeld in het boekje dat soortgelijke onderwerpen steeds bij elkaar staan. Het betreffen steeds onderwerpen met een hoge media-aandacht met titels als 'Ketchup goed voor het hart', 'Rode lippen, hoge fooien' en 'Grote ballen, slechte vaders'.

In elk onderzoek wordt de besproken publicatie toegelicht en nader ingegaan op de zwakkere punten van het artikel. Het betreft hier vaak de toegepaste controles, de gebruikte statistiek, de groepsgrootte van de studie, het weergeven van de statistiek of de generalisatie van resultaten. Ook wordt ingegaan op de manier waarop de wetenschapsjournalistiek deze artikelen oppikt en met pakkende titels komt om de aandacht van een groot publiek te trekken. In elk hoofdstuk komen wel een aantal van deze zwakheden aan bod en worden ze verder toegelicht.

Tevens zijn de tabellen en grafieken van de desbetreffende papers overgenomen, waarbij de zwakheden nog beter geïllustreerd worden. Aan het einde

van het boekje volgen dan nog een drietal hoofdstukken die de bevindingen uit dit boekje verder uitdiepen. In de hoofdstukken 'Een beetje kennis' en 'Impact' wordt geïllustreerd waarom verschillende studies wel de krant halen en anderen niet. En ook wat er met die studies gebeurt als ze worden overgenomen door mensen die er maar weinig kennis van hebben.

In het hoofdstuk 'Statistische vuistregels' worden verschillende statistische termen verder toegelicht en wat het psychologische verschil is tussen verschillen in terminologie. Zo kan een statistische daling van 2% naar 1%, een daling van 1% genoemd worden, maar ook een daling van 50%.

Kortom, 'Broddelwetenschap' is niet alleen vermakelijk en leest gemakkelijk weg, het is ook erg nuttig voor de analist die zelf regelmatig de wetenschappelijke literatuur moet raadplegen. Het leert je kritischer naar de wetenschappelijke literatuur te kijken en niet alle bevindingen klakkeloos over te nemen.



NVML Cursussen

Aanmelding NVML cursussen geopend

Voor de volgende NVML cursussen is het aanmeldingsformulier te vinden op de website www.nvml.nl:

	Aanmelding geopend per	Sluitingsdatum inschrijving
Hemoglobinopathiën	27 mei	1 september
Stagebegeleiding (C)	27 mei	23 september
Meewerkend leidinggevende (C)	27 mei	23 september

Let op: de planning van andere cursussen voor dit najaar is in volle gang. Kijk regelmatig op de website.

Release module 'Beenmergmorfologie'

Het e-learningaanbod van de NVML is uitgebreid met de nieuwe module 'Beenmergmorfologie'. Met deze uitbreiding is het totaal aan modules op 14 gekomen. Het streven is om voor alle disciplines binnen de medische laboratoria relevante modules aan te bieden op verschillende niveaus. Daarom is de uitbreiding met de module 'Beenmergmorfologie' een goede aanvulling op de al bestaande mogelijkheden.

In het beenmerg vindt de bloedvorming (hematopoïese) plaats. Als er reden is om te denken aan een afwijking in het beenmerg, kan een beenmergonderzoek worden aangevraagd. De arts kan dan kiezen voor een beenmergbiopsie en/of beenmergaspiraats. Deze twee onderzoeken zijn aanvullend aan elkaar. Met behulp van beenmergmorfologie kan informatie verkregen worden over de ligging van cellen ten opzichte van elkaar en over de rijpingsstadia van diverse cellijnen. Ook kan worden beoordeeld of er abnormale cellen aanwezig zijn zoals tumorcellen. Het is daarom van belang dat laboratoriummedewerkers goed op de hoogte zijn van de diagnostiek bij beenmergmorfologie. De module bestaat uit twaalf leertaken. Na de leertaken volgt een toets. Het examen bestaat uit tien vragen. Minimum niveau: post-MBO

Nieuwe weblecture: Meningitis

Deze lezing werd gehouden op donderdag 20 november 2014 tijdens het congres 'Focus op de hersenen' van de NVML. De spreker is Dr. E.C. van Dongen-Lases, klinisch chemicus AMC Amsterdam. Naast de video van de lezing is de PowerPoint er, ter ondersteuning, apart bij te downloaden. Alle lezingen zijn vrij toegankelijk voor alle deelnemers aan de e-learning.

NVML e-learning nu veertien modules

Het volledige e-learning pakket bestaat op dit moment uit veertien cursusmodules en zeven weblectures. De onderwerpen van de cursusmodules kunt u op onze

website, www.nvml.nl, vinden. De ontwikkeling van nog meer nieuwe modules is in bewerking. Er wordt onder andere gewerkt aan 'Veiligheid', 'Urinediagnostiek', 'Schildklierdiagnostiek', en 'Diagnostiek bij ESBL en Carbapenemase'.

Gezocht: vakspecialisten

Voor het ontwikkelen van de modules is de NVML afhankelijk van de medewerking van specialisten op het vakgebied. Dit wordt gecoördineerd door de werkgroep e-learning. Deze werkgroep zoekt experts op het gebied van procesvalidatie, hartenzymen, allergie, organisatie POCT en bloedtransfusie. Heeft u onlangs een artikel of PowerPoint van een van deze onderwerpen gemaakt, dan is dat een goede start voor het maken van een module. Wilt u ons hierbij helpen of meer informatie neem dan contact op met de werkgroep e-learning via nvml@nvml.nl.

Belangstelling?

Voor het volgen van de e-learning van de NVML kunnen organisaties staffels aanschaffen. Met een staffel zijn zij verzekerd van het kunnen volgen van alle bestaande en toekomstige modules voor de duur van een (kalender) jaar. Alles over de inschrijving, zowel voor organisaties als individueel, is te vinden op de website www.nvml.nl onder het kopje 'Opleiding & registratie' en vervolgens 'E-learning'. Voor meer informatie kunt u contact opnemen met de NVML via nvml@nvml.nl.

E-learning doe je met de NVML

Posterprijs

Lorenzo Salden winnaar studenten posterprijs

Dit jaar is voor het eerst de studenten posterprijs door de NVML uitgereikt. Lorenzo Salden was de winnaar met zijn poster getiteld 'Verificatie van de HemosIL, Heparine geïnduceerde trombocytopenie test'.

Lorenzo zit in het vierde leerjaar van de mbo opleiding Klinische Chemie aan het Radius College (Breda). Jurering en prijsuitreiking vonden plaats tijdens de Vakbeurs Techniek en diagnostiek op 26 maart. De prijs bestaat uit deelname aan het Europese Studentenforum van het EPBS (European Association for Professions in Biomedical Science) in oktober. Een unieke gelegenheid om met andere studenten van biomedische laboratoria opleidingen uit heel Europa in contact te komen.



Word lid!

Een persoonlijk lidmaatschap van de NVML betekent:

- Verdieping en verbreding van kennis
- Verbinden via netwerken
- Aantrekkelijk en informatief vakblad
- Korting op de contributie bij deelname aan nascholing, cursus of congres
- Voorrang op cursussen
- Belangenbehartiging en advies



"Het grote voordeel van het NVML-lidmaatschap is: korting op de contributie als je nascholing volgt!"

"Naast het inhoudelijke deel van een nascholing vind ik de onderlinge contacten in de wandelgangen altijd erg leuk: je kunt eens uitwisselen hoe het op andere laboratoria georganiseerd is."

Interesse gewekt?

Ga naar www.nvml.nl pagina 'lid worden?'



Onderzoek naar oogmelanomen voor betere prognose en kans op overleving

Sommige analisten doen naast hun 'gewone' werk ook nog onderzoek in het lab. Anderen zijn als research analist gespecialiseerd in het doen van onderzoek. Waar doen ze precies onderzoek naar en wat komt hier allemaal bij kijken? Daar proberen wij achter te komen in deze nieuwe rubriek. In deze Analyse onderzoek naar oogmelanomen door Jolanda Vaarwater.



Analist: Jolanda Vaarwater
Locatie: Erasmus MC, Rotterdam
Functie: Research Analist B

Stel jezelf even voor

Mijn naam is Jolanda Vaarwater, ik ben 33 jaar oud en werkzaam als Research Analist bij de afdelingen Oogheelkunde en Klinische Genetica van het Erasmus MC, Rotterdam. Tijdens mijn afstudeerstage van het HLO, op de afdeling Klinische Genetica, ben ik in contact gekomen met het oogmelanoom-onderzoek. Na het

succesvol afronden van mijn opleiding ben ik sinds augustus 2005 werkzaam als analist bij dit oogmelanoom-onderzoek. Dit onderzoek is een samenwerking tussen het Erasmus MC en het Oogziekenhuis Rotterdam.

Wat houdt het onderzoek in?

Oogmelanomen zijn, zoals de naam het al aangeeft, melanomen die ontstaan uit melanocyten in het vaatvlies, de cellulaire laag onder de retina. Het is de meest voorkomende intra-oculaire tumor en per jaar krijgen in Nederland ongeveer honderdtwintig mensen deze diagnose. In Rotterdam zien we ongeveer een derde van deze groep. De behandeling van een oogmelanoom bestaat uit bestraling van de tumor of verwijdering van het complete oog met tumor. Ongeacht de behandeling van de primaire tumor ontwikkelt ongeveer 50% van de patiënten binnen vijftien jaar na diagnose metastasen. Er is tot nu toe nog geen effectieve behandeling voor deze metastasen mogelijk en het merendeel van de patiënten overlijdt binnen zes maanden. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat bepaalde chromosomale afwijkingen en gen-mutaties in de tumor kunnen voorspellen of een oogmelanoom wel of niet zal metastaseren. Voor ons onderzoek gebruiken we tumorweefsel uit het verwijderde oog. Indien de tumor bestraald is, dan hebben wij geen tumorweefsel om te onderzoeken. Daarom richten wij ons ook op het ontwikkelen van nieuwe non-invasieve testen om de prognose te bepalen in bijvoorbeeld het bloed van de patiënt.

Wat is de zin van het onderzoek?

Ondanks het feit dat we goed in staat zijn te voorspellen welke patiënten metastasen ontwikkelen en welke niet, is de overleving de afgelopen twintig jaar nauwelijks verbeterd. Wij willen met ons onderzoek graag meer inzicht in de oogmelanomen verkrijgen en met deze kennis nieuwe therapieën ontwikkelen welke de overleving kunnen verbeteren.

Hoe lang duurt het onderzoek?

Het onderzoek in Rotterdam is ongeveer vijftwintig jaar geleden gestart. Inmiddels hebben we een database opgebouwd, bestaande uit meer dan 750 patiënten.

Wat is jouw bijdrage en wat is er leuk aan?

Een klein percentage (<6%) van de oogmelanomen zijn gelokaliseerd in de iris. Deze lijken een betere prognose te hebben dan tumoren gelokaliseerd op andere plaatsen in het oog. Vanwege de lage frequentie van deze tumoren is tot nu toe weinig bekend over de genetische afwijkingen in dit subtype. Momenteel ben ik daarom dan ook bezig met een onderzoek naar dit type oogmelanoom. Ook verricht ik ondersteunende werkzaamheden voor de andere onderzoekers binnen onze groep. Het begeleiden van studenten behoort eveneens tot mijn werkzaamheden.

Al deze verschillende werkzaamheden zorgen ervoor dat mijn werk erg afwisselend is. Ook is in de afgelopen jaren de ontwikkeling van nieuwe moleculaire technieken voor het detecteren van chromosomale veranderingen en gen-afwijkingen, zeer snel gegaan waardoor ik met steeds met nieuwe technieken kan werken. Dit zorgt ervoor dat mijn werk uitdagend blijft. De ultieme uitdaging van ons onderzoek blijft natuurlijk het verbeteren van de overleving van onze patiënten. Ik werk graag mee aan het mogelijk maken hiervan.

Ook jouw onderzoek in de schijnwerpers?

Stuur dan een e-mail naar nvml.redactie@nvml.nl o.v.v. 'Analist en Onderzoek'.

Hogeschool van Arnhem en Nijmegen

Cursussen, post-hbo en maatwerkopleidingen Life Sciences

Titel: Basiskennis Chemie
Datum: e-learning (vrije keus startdatum)
Omvang: 2,5 maand
Kosten: € 595,00
Locatie: n.v.t.

Titel: Labmanagement: Communicatie
Start: 8 september 2015 (4 dagen 9.00-13.00 uur)
Kosten: € 795,00
Locatie: Nijmegen

Titel: Labmanagement: Projectmanagement
Start: 8 september 2015 (3 dagen 14.00-18.00 uur)
Kosten: € 825,00
Locatie: Nijmegen

Titel: Celkweek
Datum: 17 september 2015 (9.00-16.30 uur)
Kosten: € 542,00
Locatie: Nijmegen

Titel: Down Stream processing
Start: 22 september 2015 (9 middagen)
Kosten: € 1.770,00
Locatie: Nijmegen

Titel: Labmanagement: Kwaliteitszorg
Start: 29 september 2015 (4 dagen 14.00-17.00 uur)
Kosten: € 795,00
Locatie: Nijmegen

Titel: Bloedbankkunde
Start: 29 september 2015 (11 dagen 18.00-21.00 uur)
Kosten: € 1.117,00
Locatie: Amsterdam

Titel: Advanced Imaging Technieken met CLSM
Start: 17 en 24 november 2015
(2 dagen van 9.00-16.30 uur)
Kosten: € 795,00
Locatie: Nijmegen

Titel: Immunologie
Start: 24 november 2015 (5 dagen van 18.00-21.00 uur)
Kosten: € 552,00
Locatie: Amsterdam

Voor aanmelding en aanvullende informatie over onze opleidingen kunt u terecht op onze website www.hanlifesciences.nl of mailen naar info.lifesciences@han.nl.

Hogeschool Leiden

Centrum Bioscience en Diagnostiek

Incompany maatwerk

Het CBD heeft al meer dan twintig jaar ervaring met het verzorgen van scholing op maat en is voor veel bedrijven en instellingen uitgegroeid tot een betrouwbare partner. De kracht van de CBD-aanpak is dat we specifiek trainen op wat in de werksituatie van belang is. Wij kunnen dit organiseren door middel van een individueel traject of een groepsgewijze aanpak. Zo garanderen we maximale effectiviteit.

Titel: Kwaliteitsaspecten en troubleshooting bij PCR technologie
Data: 25 september, 2 en 9 oktober 2015
Inschrijven: vóór 14 augustus 2015
Cursusprijs: € 1.150,- (bij inschrijving vóór 16 juli € 1.045,-)

Titel: Variant effect prediction (VEP)
Data: 18 september 2015
Inschrijven: vóór 7 augustus 2015
Cursusprijs: € 480,- (bij inschrijving vóór 4 juli € 435,-)

Titel: Workshop NGS in de microbiologie diagnostiek
Data: 23 september 2015
Inschrijven: vóór 12 augustus 2015
Cursusprijs: € 480,- (bij inschrijving vóór 15 juli € 456,-)

Titel: Kleurtheorie voor de dagelijkse praktijk
Data: 30 september, 7, 14 oktober, 4, 18 november en 2 december 2015
Inschrijven: vóór 19 augustus 2015
Cursusprijs: € 1.900,- (bij inschrijving vóór 22 juli € 1.735,-)

Titel: Pathologie
Data: 2, 16 oktober, 6, 20, 27 november en 4 december 2015
Inschrijven: vóór 21 augustus 2015
Cursusprijs: € 1.950,- (bij inschrijving vóór 24 juli € 1.775,-)

Titel: Histologie
Data: 15 oktober, 5, 19 november, 3, 17 december 2015 en 7 januari 2016
Inschrijven: vóór 3 september 2015
Cursusprijs: € 1.900,- (bij inschrijving vóór 6 augustus € 1.735,-)

Titel: Immunohistochemie/ELISA voor beginners
Data: 3, 10 en 11 november 2015
Inschrijven: vóór 22 september 2015
Cursusprijs: € 1.060,- (bij inschrijving vóór 25 augustus 2015 € 965,-)

Titel: ELISA theorie: achtergronden en kwaliteitsaspecten
Data: 1 en 8 oktober 2015
Inschrijven: vóór 20 augustus 2015
Cursusprijs: € 720,- (bij inschrijving vóór 23 juli 2015 € 655,-)

Titel: Hematologie
Data: 1, 8, 15, 22, 29 september, 6, 13 oktober en 3 november 2015
Inschrijven: vóór 21 juli 2015
Cursusprijs: € 1.400,- (bij inschrijving vóór 23 juni 2015 € 1.275,-)

Titel: Urineonderzoek: achtergronden en interpretatie van de teststrip en het sediment
Data: 5 november 2015
Inschrijven: vóór 24 september 2015
Cursusprijs: € 390,- (bij inschrijving vóór 25 augustus 2015 € 350,-)

Titel: Analytische QC basis: achtergronden en interpretatie
Data: 8 oktober 2015
Inschrijven: vóór 27 augustus 2015
Cursusprijs: € 200,- (voor deze cursus zijn onze kortingsregelingen niet van toepassing)

Titel: Parasitologie
Data: 2, 3, 4, 11, 12 en 13 november 2015
Inschrijven: vóór 21 september 2015
Cursusprijs: € 1.810,- (bij inschrijving vóór 24 augustus 2015 € 1.645,-)

Titel: Workshop Malaria
Data: 9 en 10 november 2015
Inschrijven: vóór 28 september 2015
Cursusprijs: € 935,- (bij inschrijving vóór 31 augustus 2015 € 850,-)

Titel: **Diagnostiek van veel voorkomende schimmelinfecties**
 Data: **19, 24 en 26 november, 1, 3 en 8 december 2015**
 Inschrijven: **vóór 8 oktober 2015**
 Cursusprijs: **€ 1.520,- (bij inschrijving vóór 10 september 2015 € 1.380,-)**

Titel: **Statistiek voor analisten**
 Data: **2 en 9 november 2015**
 Inschrijven: **vóór 21 september 2015**
 Cursusprijs: **€ 740,- (bij inschrijving vóór 24 augustus 2015 € 675,-)**

*Indien u zich minimaal vier weken voor de uiterste inschrijfdatum inschrijft, ontvangt u korting. Raadpleeg onze website voor meer informatie en inschrijfformulieren. U kunt hier tevens informatie over onze maatwerktrajecten vinden.
 Website: cbd.hsleiden.nl, tel: 071-518 87 53, fax: 071-518 84 15, e-mail: cbd@hsleiden.nl.*

Avans Hogeschool Breda

Het lectoraat Analysetechnieken in de Life Sciences van Avans Hogeschool ontwikkelt en geeft cursussen op het gebied van biomedische laboratoriumtechnieken voor bedrijven, universiteiten en instellingen. In 2014 worden de volgende internationale cursussen georganiseerd:

Titel: **Flowcytometrie, van kalibratie tot applicatie**
 Datum: **10, 17 en 24 november 2015**
 Omvang: **3 middagen**
 Locatie: **Rotterdam (Erasmus MC)**
 Kosten: **€ 600,-**

Titel: **Medische Immunologie**
 Datum: **17 en 24 september, 1, 8, 15 en 29 oktober, 5, 12, 19 en 26 november 2015**
 Omvang: **10 avonden**
 Locatie: **Utrecht (Spectra Facility)/Rotterdam (Erasmus MC)**
 Kosten: **€ 950,-**

Voor meer informatie over deze cursus verwijst ik u graag naar onze website: www.alsavans.nl. Voor vragen, neem contact op met: Secretariaat Lectoraat Analysetechnieken in de Life Science, Avans Hogeschool, Mevr. Sari van Heel-Vauhkala, Tel: +31 (0)88 525 7728; e-mail: si.vanheel-vauhkala@avans.nl

Agenda

Juni	2	Start NVML-cursus Moleculair Biologische Technieken	Utrecht
	4-6	Jaarcongres IJsland NML	Reykjavik, IJsland
	9	SKML-congres: De waarde van de expert	Ede
	16	Start NVML-cursus Moleculair-biologische technieken	Utrecht
	21-25	EuroMedLab Parijs 2015	
September	24	NVML-symposium Fertiliteit (LFN)	Amersfoort
Oktober	1	NVML-cursus Hemoglobinopathiën	Utrecht
	6-8	Labvolution – World of Lab Technology	Hannover, Duitsland
	15	NVML-congres Allergie	Amersfoort
November	3	Start NVML-cursus Stagebegeleiding (c)	Utrecht
	5	Start NVML-cursus Meewerkend Leidinggevende	Utrecht
	5	NVML-bijeenkomst WHAMM (besloten)	locatie onbekend
	17	NVML-Bijeenkomst LKN (besloten)	Amersfoort
	24	NVML-congres: Focus op de alvleesklier	Amersfoort
December	1	Start NVML-cursus Moleculair Biologische Technieken	Utrecht
	3	Start NVML-cursus Invloedrijk Communiceren	Utrecht
	10	NVML-Symposium voor Pre-analytische medewerkers	Amersfoort



* De lettertoevoeging geeft aan dat de cursus meerdere keren wordt gegeven; de inhoud is echter identiek.
 Voor meer informatie over de NVML-nascholingen kunt u terecht bij het bureau van de NVML, tel: 030-252 37 92;
 fax: 030-254 18 14; e-mail: nvml@nvml.nl. Ga via uw mobiel naar de agendapagina op de website middels de QR-code hiernaast.

* Nadere informatie via LinkedIn

Your **Power** for Health



greiner bio-one



VACUETTE® Barcode Tubes

The new generation for
increased safety and efficiency