NVML
Januari 2015 | 70ste jaargang | Nr. 1

Analyse

Vakblad voor
biomedisch laboratoriummedewerkers

Membraandeficiënties bij de erytrocyt

Erfelijke glycosyleringsziekten: analytische ontwikkelingen op het lab

NIPT-testen: chromosoomafwijkingen opsporen in bloed van moeder

Moleculaire detectie van carbapenemase-producerende bacteriën

Vakbeurs

NVML

& techniek diagnostiek

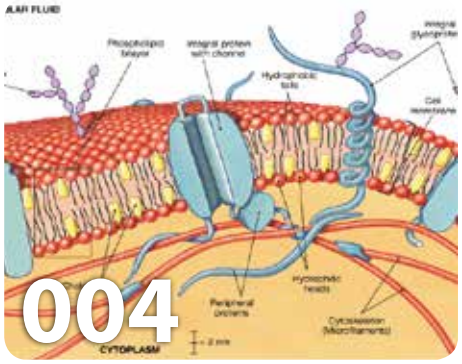
26 maart 2015 in Nijkerk
Congrescentrum 'Hart van Holland'

4 zalen
28 lezingen
standhouders

www.nvml.nl

Vakblad
Analyse
voor biomedisch laboratoriummedewerkers

IN DIT NUMMER
Nr. 1 | Januari 2015



004 Membraandeficiënties bij de erytrocyt
P. Kromhout
Een belangrijke eigenschap van erytrocyten is hun vervormbaarheid om door smalle haarvaten heen te komen. Erytrocyten zijn hier prima toe in staat, mits het cytoskelet geen gebreken heeft. Als deze er wel zijn, is de levensduur van erytrocyten een stuk korter en ontstaat vaak hemolytische anemie. In dit artikel zal de opbouw van het cytoskelet en de pathofysiologie ervan besproken worden.

008 Erfelijke glycosyleringsziekten; Analytische ontwikkelingen op het lab
D.J. Lefeber
Erfelijke metabole ziekten (stofwisselingsziekten) worden veroorzaakt door een genetisch defect in de stofwisseling. Het betreft een grote groep aandoeningen, waarvan PKU en de ziekte van Pompe bekende voorbeelden zijn. Elk afzonderlijk zijn ze vrij zeldzaam. De klinische presentatie is enorm divers en kan zich op zeer jonge leeftijd openbaren, maar ook op volwassen leeftijd. In dit artikel een overzicht van de nieuwste inzichten in de diagnostiek van deze stofwisselingsziekten.

012 Moleculaire detectie van carbapenemase-producerende bacteriën binnen 24 uur: Voorkom verspreiding in het ziekenhuis
R. Nijhuis, E. Mascini
Wereldwijd is er een toename in bacteriën die resistent zijn tegen de meest gangbare antibiotica, de zogenaamde beta-lactam antibiotica. Tot deze antibiotica behoren penicillines, cefalosporines en carbapenems. Ondanks dat er verschillende mechanismen verantwoordelijk kunnen zijn voor resistentie tegen beta-lactam antibiotica, wordt deze resistentie bij Gram-negatieve staven vooral veroorzaakt door beta-lactamase enzymen.

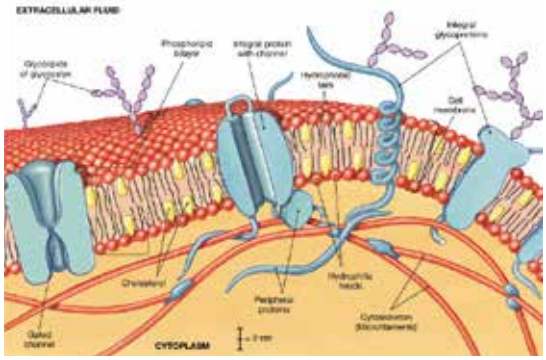
016 NIPT-testen: Bloedtest bij moeder spoort chromosoomafwijkingen op bij ongeboren kind
I.M. Bakker, C. Louwerens-Zintel, E.A. Sistermans
NIPT (Niet Invasieve Prenatale Test) is een test waarbij in het bloed van zwangere vrouwen met behulp van NGS (Next-Generation Sequencing) chromosoomafwijkingen in het foetale DNA worden gedetecteerd. Deze test wordt per 1 april 2014 in Nederland binnen de TRIDENT studie aangeboden aan zwangere vrouwen (1). Dit artikel bespreekt de resultaten van deze studie.

011 Modernisering verlof en arbeidstijden
015 Cao-Nieuws
022 Blik op onderzoek: Invloed van Point-of-care testen op de beroepspraktijk
023 Cum Laude van CCKL naar ISO
024 Kijkje in de keuken van een IVF laboratorium
024 Cao-Nieuws
025 Van het bestuur
026 Verslag WHAMM-bijeenkomst
028 Congres Fertiliteit
029 Nieuws
030 Opleidingen
031 Agenda

Membraandeficiënties bij de erytrocyt

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

Een belangrijke eigenschap van de erytrocyt is de vervormbaarheid van het celmembraan om door smalle haarvaten heen te kunnen komen. De erytrocyt is hier prima toe in staat, mits het cytoskelet geen kwantitatieve of kwalitatieve gebreken heeft. Als deze er wel zijn, zal dit de levensduur van de erytrocyt verkorten en ontstaat er vaak een hemolytische anemie met de daarbij behorende problemen. In dit artikel zal de opbouw van het cytoskelet en de pathofysiologie ervan besproken worden. Defecten of deficiënties van eiwitten uit het cytoskelet, zijn aanleiding tot tal van verschillende soorten ziektebeelden die vallen onder de noemer membraandeficiënties. Laboratorium diagnostiek vormt een hulp bij de diagnose en de daarbij behorende behandeling.



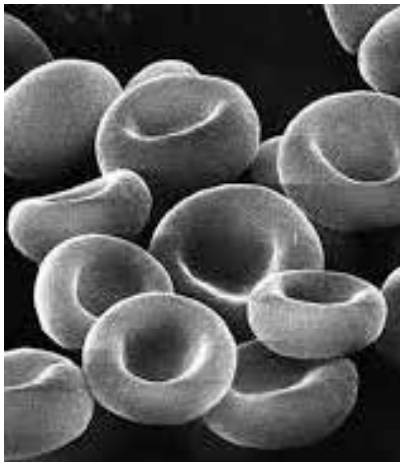
Figuur 1 De dubbele fosfolipide laag waarin de diverse eiwitten in verankerd zitten of er door heen steken. Onder het fosfolipide zit het cytoskelet dat met behulp van eiwitten is verbonden.

Het celmembraan van de erytrocyt is opgebouwd uit een dubbele fosfolipiden laag die binnenin de cel ondersteuning krijgt van het cytoskelet (figuur 1). Dit cytoskelet heeft drie hoofdfuncties (1,2). Allereerst geeft het steun en vorm aan de cel. Voortdurend wordt aan dit skelet gebouwd en afgebroken om aan de eisen van de omgeving van de cel te kunnen voldoen. De tweede functie is de geleiding van transport binnenin de cel. Langs de filamenten kunnen de grote eiwitcomplexen zich voortbewegen. De derde functie is erg belangrijk voor de erytrocyt. Het cytoskelet zorgt voor de beweging en de vervormbaarheid. In de grote vaten hebben erytrocyten hun typische schijfvormige biconcave vorm (figuur 2). Maar het grootste deel van het leven zit een erytrocyt in de haarvaten, waar de ruimte soms een derde is van de grote van een erytrocyt. Een soepele vormverandering om zich aan te passen aan de ruimte die het heeft, is essentieel voor een erytrocyt. Hoe dit mogelijk is, valt te verklaren uit het feit hoe het cytoskelet en het membraan is opgebouwd.

Het cytoskelet (1, 3, 4)

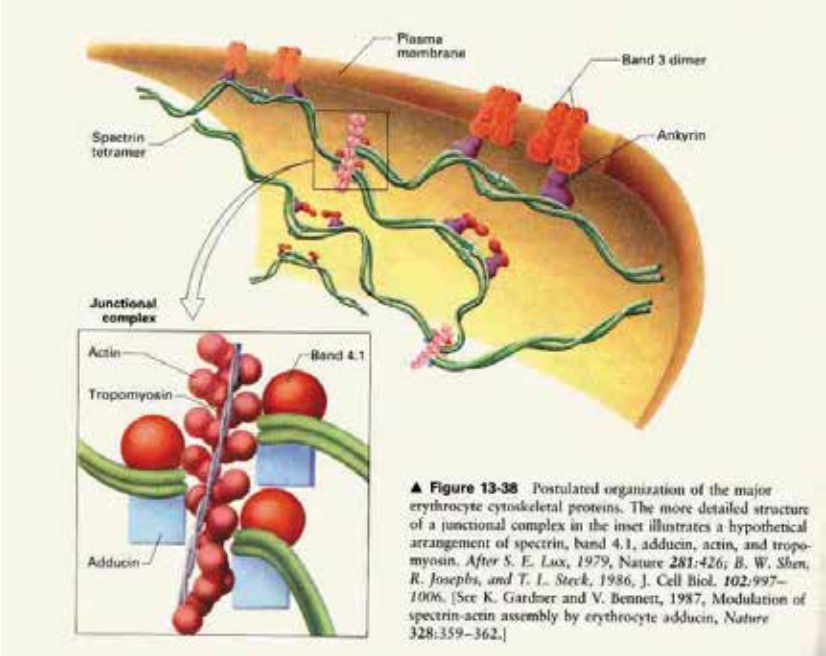
Het cytoskelet bestaat uit een aantal eiwitten die filamenten vormen en net onder het fosfolipiden membraan zitten (figuur 3). Het grootste en meest voorkomende eiwit in deze filamenten, is het spectrine. Spectrine heeft een α- en een β keten, die samen ineen-gevlochten een dimeer vormen. Deze dimeren gaan onderling een kop-kop binding aan, waardoor er een tetrameer ontstaat. Bij sommige cellen gaan deze filamenten door de dubbele fosfolipiden laag heen, maar bij de erytrocyt is dit niet het geval. In de fosfolipiden laag zitten twee anker eiwitten. De eerste is het band 3, een ionenkanaal die chloride met bicarbonaat uitwisselt. Het andere anker eiwit is het glycoforine C, dat waarschijnlijk betrokken is bij het doorgeven van externe signalen de cel in. Ankyrine en het 4.2 eiwit koppelen het spectrine aan band 3, waardoor het cytoskelet vast komt te zitten aan het celmembraan. Aan de andere kant van het spectrine, koppelt het 4.1 eiwit, spectrine vast aan actine. Meerdere tetrameren van spectrine zitten gekoppeld aan een complex van actine en myosine. Hierdoor ontstaat een hexagonaal cytoskelet netwerk (figuur 4).

Myosine en actine zijn verantwoordelijk voor het flexibele maneuvreren van de erytrocyt in de haarvaten. Het werkt als een spier die samentrekt en ontspant, waardoor het cytoskelet zijn stevigheid kan behouden, maar toch flexibel genoeg is om als cel van vorm te veranderen. Dit gaat als volgt in zijn werk (figuur 5). De actine streng is samengevlochten met het tropomyosine, die op zijn beurt plaatsen heeft voor troponine. Troponine bindt samen met tropomyosine aan actine. Het globulaire troponine heeft drie varianten. TnT hecht zich aan tropomyosine, TnC bindt calcium en TnI speelt een rol bij de actine-myosine-interactie. Troponine bedekt, samen met het tropomyosine, de specifieke bindingsplaatsen van het actinemolecuul. Deze actine streng zit evenwijdig aan het myosine filament. Het myosine bevat dunne en dikke filamenten die onder ATP in elkaar kunnen schuiven (figuur 6). De myosinekop zit aan het actine gebonden. Onder invloed van ATP hydrolyseert



Figuur 2 De typisch discoïde vorm die erytrocyten hebben in de vrije bloedbaan van de grotere vaten.

erytrocyt kan geven, is er niets aan de hand. Door defecten en mutaties in de diverse eiwitten die we hebben besproken, ontstaan er de zogenaamde membraan defecten die erin resulteren dat de erytrocyt niet meer zijn vorm kan behouden of krijgen, die nodig is om zijn taak te vervullen. Het gevolg is hemolyse of het vroegtijdig verwijderen van de erytrocyt uit de bloedbaan door de milt. De verzamelnaam van deze membraandefecten is hereditaire sferocytose (HS). Er zijn een aantal van deze membraandefecten bekend en zij geven milde tot ernstige vormen van anemie. Laten we er eens wat dieper op ingaan.



▲ **Figure 13-38** Postulated organization of the major erythrocyte cytoskeletal proteins. The more detailed structure of a junctional complex in the inset illustrates a hypothetical arrangement of spectrin, band 4.1, adducin, actin, and tropomyosin. *After S. E. Lux, 1979,* Nature *281:426; B. W. Shen, R. Josephs, and T. L. Steck, 1986,* J. Cell Biol. *102:997–1006.* [See K. Gardner and V. Bennett, 1987, Modulation of spectrin-actin assembly by erythrocyte adducin, *Nature* 328:359–362.]

Figuur 3 De diverse eiwitten die onderdeel uitmaken van het cytoskelet.

de myosinekop ATP in ADP en Pi. De myosinekop houdt beide producten echter bij zich gebonden. Hierdoor is de myosinekop in staat om een nieuwe brug te slaan met een naburig actine molecuul. Het actine zorgt dan dat Pi kan loskomen van de myosinekop en daardoor komt ook het ADP vrij. Hierdoor komt er een spanning vrij (comformatie verandering), die doet denken aan een slag met een roeispaan. Zolang er ATP is, kan deze cyclus zich weer herhalen, waardoor de dikke filamenten langs de dunne filamenten schuiven.

Zolang het cytoskelet flexibel is en het de stevigheid en vorm aan de

Horizontale- en verticale interacties (3)

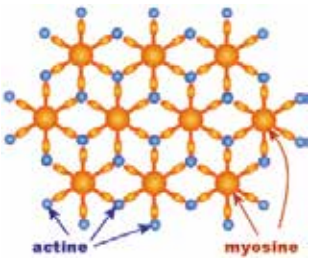
In de categorie van membraandefecten kan men een tweedeling maken. De eerste groep is de groep van horizontale interacties. Dit zijn de defecten aan het spectrine-actine netwerk zelf. Het defect zit dus horizontaal gezien, evenwijdig net onder het celmembraan. Men kan dan denken aan de α- en β ketens van het spectrine zelf. Een ander defect kan liggen aan de kop-staart koppeling om tetrameren van het spectrine te maken, of de koppeling aan het 4.1 eiwit dat nodig is om aan actine te kunnen koppelen. Al deze verbindingen en goede eiwitstructuren zijn nodig voor een goede opbouw van het netwerk. Hierdoor is de erytrocyt in staat om zichzelf te kunnen handhaven tijdens vervormingen.

Naast de horizontale interacties, hebben we ook nog een tweede groep, de verticale interacties. Dit omvat de bindingen vanaf het spectrine naar het celmembraan toe. Hierbij kunnen we denken aan de koppeling van spectrine aan het ankyrine, het 4.2 eiwit, de glycoforine C en ook nog de (zwakke) ladingsinteractie tussen spectrine en het fosfolipiden membraan van de cel. Als deze koppelingen sterk en gezond zijn, voldoet het aan zijn doel om het celmembraan goed aan het cytoskelet te houden. Bij mutaties en afwijkingen in deze horizontale- en verticale interacties, is dit in de morfologie van de erytrocyten waar te nemen. Normale erytrocyten hebben hun karakteristieke gelijkmatige vorm onder een microscopisch preparaat (figuur 7). Bij membraandefecten, zien we dat cellen van vorm gaan veranderen, afhankelijk van de soort en de ernst van de afwijking. Ook het doormaken van andere problemen of ziekten kan van invloed zijn op de vorm van de erytrocyt. Afwijkingen die we onder de microscoop kunnen zien, zijn elliptocyten (figuur 8, fragmentocyten (figuur 9), stomatocyten (figuur 10), targetcells (figuur 11), etc.

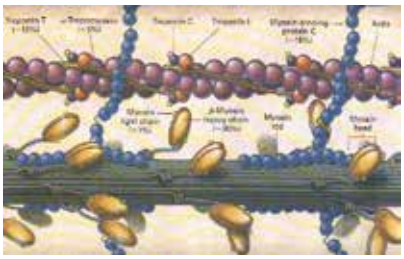
Laboratoriumdiagnostiek (4)

Membraandefecten geven vaak een milde vorm van anemie, die echter door een virusinfectie, een tekort aan foliumzuur, of groeispurt wordt verergerd. Bij algemeen onderzoek ziet men een daling in het Hb, een verhoogd reticulocyten aantal, een verhoogd LDH en bilirubine en een verlaagd haptoglobine. Kortom, er is een hemolytisch beeld zonder een duidelijke oorzaak. Kwantitatieve metingen van membraan eiwitten of een osmose resistentie test geeft vaak wel een afwijking aan, maar is niet voldoende sensitief om een membraan defect vast te stellen. Vaak wordt er een Acidified Glycerol Lysis Test (AGLT) gedaan. Dit moet echter binnen 24 uur na afname gebeuren. Hierbij wordt turbidimetrisch de lysistijd van erytrocyten in een hypotoon milieu in aanwezigheid van glycerol bepaald. Bij hereditaire sferocytose

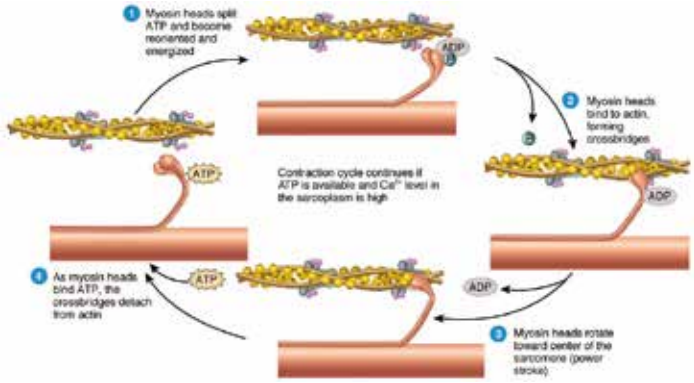
vervolg op volgende pagina >



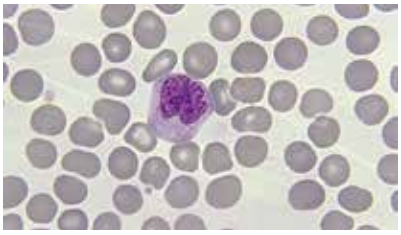
Figuur 4 De hexagonale vorm die de tetrameren van spectrine verbinden met het actine-myosine complex. Met dank aan David R. Caprette.



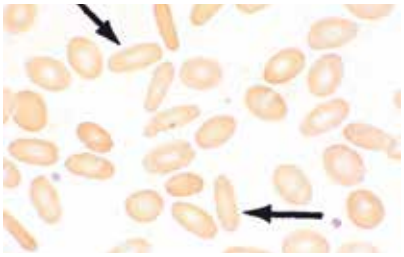
Figuur 5 De complexe structuur van actine en myosine en de daarbij behorende onderdelen die samen verantwoordelijk zijn voor de vervorming van de erytrocyt.



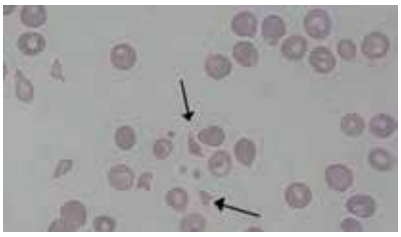
Figuur 6 Het mechanisme waardoor actine en myosine met behulp van ATP kan bewegen.



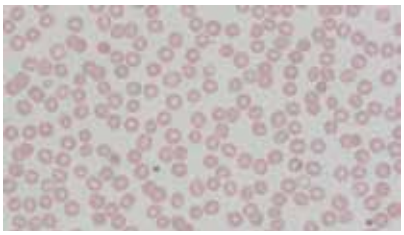
Figuur 7 De karakteristieke gelijkmatige vorm van de erytrocyt, onder de microscoop gezien.



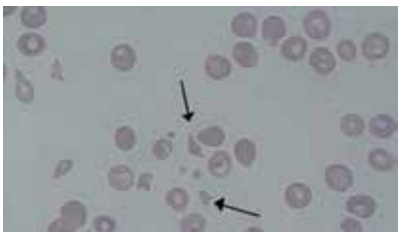
Figuur 8
Microscopisch beeld van elliptocyten.



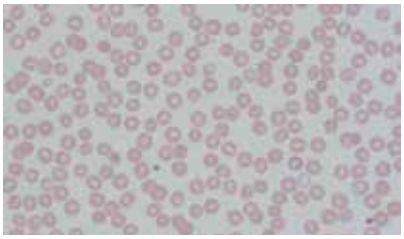
Figuur 9
Microscopisch beeld van fragmentocyten.



Figuur 10
Microscopisch beeld van Stomatocyten.



Figuur 11
Microscopisch beeld van schietschijfcellen.

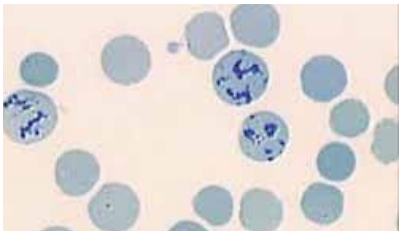


Figuur 12
Microscopisch beeld van sferocyten.

wordt een sterk verkorte lysis tijd onder deze condities gevonden. Deze test heeft een gevoeligheid van ongeveer 80%, maar is niet specifiek voor HS. Een AGLT test kan ook afwijkend zijn bij bijvoorbeeld immuun hemolytische anemie, G6PD- deficiëntie en sommige vormen van elliptocytose. Momenteel zijn er apparaten op de markt, die de vervormbaarheid van de erytrocyt bekijkt. Een voorbeeld hiervan is de LoRRca Maxsis Osmoscan van Mechatronics. Erytrocyten worden in een medium gebracht die qua osmolaliteit verschilt, waardoor ook de erytrocyt voortdurend van vorm moet veranderen. Door laserlicht wordt deze vervormbaarheid gevolgd en uitgezet tegen de osmolaliteit in een grafiek. Hieruit volgt een karakteristieke vervormbaarheidscurve die overeenkomt met een bepaald membraandefect. Dit kan dan nog verder worden uitgetypeerd door naar het gemuteerde stukje DNA te zoeken.

Type membraan defecten (5, 6)

Er zijn verschillende type erfelijke membraan afwijkingen bekend. De meest voorkomende afwijking bij mensen van Noord Europese afkomst (1:2000) is hereditaire sferocytose. Dit is een verzamelnaam van eiwit afwijkingen in het erytrocyten membraan. De primaire oorzaak is kwantitatieve of structurele afwijkingen aan het α- en/of β-spectrine, ankyrine, band 3 of eiwit 4.2. Het gevolg hiervan is een relatief verlies van het membraan oppervlak ten opzichte van het intracellulair volume. Onder de microscoop zijn de erytrocyten te zien als kleine kogelvormige erytrocyten die donkerder gekleurd zijn dan normaal (figuur 12). Het celmembraan verzwakt en kan zich niet goed meer vervormen, waardoor de milt de erytrocyt wegneemt uit de bloedbaan. Hierdoor wordt de gemiddelde levensduur van een erytrocyt verkort van 120 dagen naar 30 tot 40 dagen, met als gevolg een verhoogde aanmaak en een milde tot ernstige anemie. In 20 tot 30% van de mensen met sferocytose, is het verloop zonder symptomen. In die gevallen wordt de hemolyse gecompenseerd door de verhoogde aanmaak. Wel ziet men dan een reticulocytose (figuur 13). Bijna driekwart van de mensen met een sferocytose heeft een matige



Figuur 13
Microscopisch beeld van reticulocyten.

tot ernstige vorm van sferocytose. Men moet dan denken aan een Hb van 4-6 mmol/l. De meest ernstige vorm van sferocytose ziet men in 5% van de gevallen. Deze mensen zijn aangewezen op een transfusie afhankelijke vorm van behandeling. Deze mensen hebben een spectrine gehalte van rond de 50%. Het is goed op te merken dat de aanwezigheid van sferocyten, niet bewijst dat het om een hereditaire sferocytose gaat. Deze cellen worden namelijk ook gezien bij een auto immuun hemoytische anemie (AIHA) of bij ABO incompatibiliteit. Verder zijn de normaal waarden bij neonaten soms anders dan bij andere leeftijden. Bij verdenking bij neonaten is het daarom raadzaam de diagnose een aantal maanden later te herhalen.

Andere vormen van membraan afwijkingen worden vaak genoemd aan de hand van de vorm van de erytrocyt, zoals die onder de microscoop wordt gezien. Enkele voorbeelden zijn: hereditaire elliptocytose (HE), hereditaire pyropoikylocytose (HPP), Southeast Asian ovalocytose (SAO) en hereditaire stomatocytose (HSt).

Behandeling

Het is aan te bevelen om patiënten periodiek te volgen door een internist-hematoloog of bij kinderen door een kinderarts. Bij ernstige anemie zal de behandelend arts dit compenseren door een bloed transfusie. Patiënten hebben soms baat bij extra foliumzuur, vanwege de hemolyse. Een ander veel voorkomend probleem, zijn galstenen en een vergrote milt. In overleg met de specialist kan men er voor kiezen om de milt en/of de galblaas te laten verwijderen. De voor- en nadelen zullen goed moeten worden afgewogen. Bij een hereditaire stomatocytose is het raadzaam om de milt niet te verwijderen. De kans op een veneuze trombose is dan groter.

Literatuurlijst.

1 *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2011; 36: 265-266; Een familie met hereditaire elliptocytose: meer klinische klachten door een derde mutatie in Exon 6 van het α-spectrine gen; J. Postma, A. Spaans, M. Hardeman et al.*
2 *Atlas van de biochemie; 2e geheel herziene druk 2009; ThiemeMeulenhoff, Utrecht; J. Koolman, KH Röhm*
3 *Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 120-126; Moleculair onderzoek van erytrocytaire cytoskeletafwijkingen; D. Roos*
4 *(Diagnostiek van) hemolytische anemieën als gevolg van een membraandefect; Ned. Tijdschr voor de hematologie; jaargang 11 nr. 1 januari 2014 13-21; P.F.H. Franck, P. Wijermans*
5 *Handboek Hematologie 1e druk, 2e oplage; dr. B Löwenberg, dr. GJ Ossenkoppele, dr. T de Witte, dr. MA Boogaerts; de tijdstroom; Utrecht 2008*
6 *Nederlandse Vereniging voor Hematologie (NVH), www.hematologienederland.nl/hereditairesferocytose, M. Peters en MH Cnossen, 11-06-12*

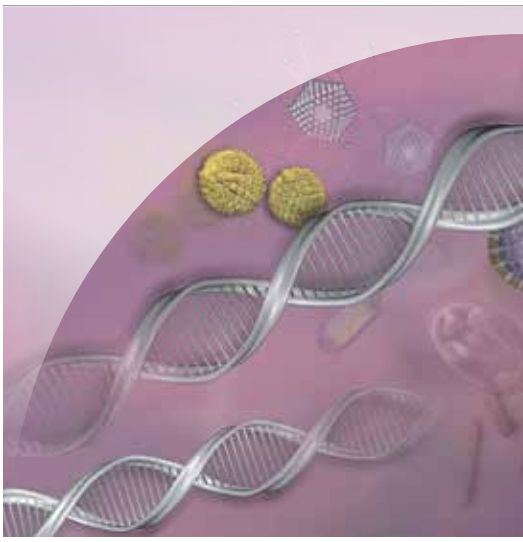
Congres Allergie:

'Waarde van allergie-diagnostiek na 40 jaar is meer dan het kost'

Op 15 oktober 2015 organiseert de NVML in samenwerking met Phadia/Thermofisher Scientific het tweejaarlijkse congres. Noteer onderstaande datum alvast in uw agenda!

Datum: 15 oktober 2015
Locatie : Congrescentrum 'de Eenhoorn' Amersfoort

r-biopharm



Complete Multiplex real-time PCR Kits

Gastro-intestinale infecties	
Salmonella	Norovirus
Campylobacter	Rotavirus
Yersinia	Adenovirus
Shigella	Astrovirus
STEC	Giardia
EHEC	Cryptosporidium
EPEC	Dientamoeba fragilis
EAEC	
ETEC	Entamoeba histolytica
EIEC	
Hospital Acquired infecties	
MRSA	Clostridium difficile Toxin A/B
PVL	
Clostridium difficile	Norovirus
	Rotavirus
Luchtweg infecties	
Influenza A, B, H1N1v	RSV
	Bordetella
Parainfluenza 1, 2, 3	Pneumocystes jirovecii

- 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

R-Biopharm AG • www.r-biopharm.com
Tel: 075 615 1046

Erfelijke glycosyleringsziekten; Analytische ontwikkelingen op het lab

Dirk J. Lefeber, Associate prof. Glycosylation Disorders, Translational Metabolic Laboratory, Radboudumc

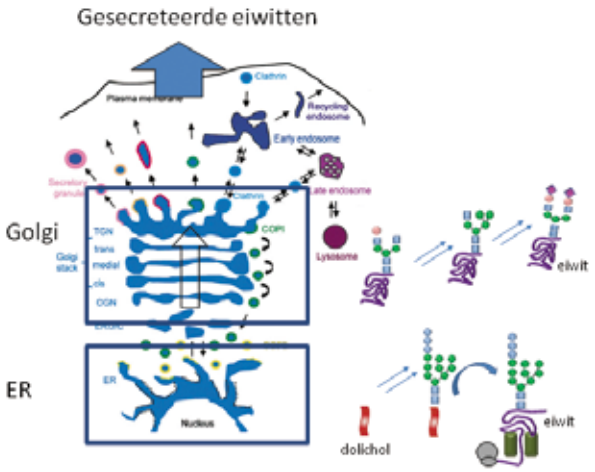
Erfelijke metabole ziekten (stofwisselingsziekten) worden veroorzaakt door een genetisch defect in de stofwisseling. Het betreft een grote groep aandoeningen, waarvan PKU en de ziekte van Pompe bekende voorbeelden zijn. Elk afzonderlijk zijn ze vrij zeldzaam. De klinische presentatie is enorm divers en kan zich op zeer jonge leeftijd openbaren, maar ook op volwassen leeftijd. Dit maakt herkenning vaak lastig en zorgt voor een forse vertraging in het stellen van een diagnose. In ons Translationeel Metabool Laboratorium (TML) ontwikkelen we nieuwe diagnostiek om hier verandering in te brengen (kijk ook op: http://youtu.be/iVZcnRZZiAQ). Daarnaast voeren we screenende diagnostiek uit in urine en bloed, aangevuld met specialistisch onderzoek in onder andere leukocyten, fibroblasten, spier, en liquor.

Box 1. Klinische symptomen bij CDG

CDG-I		CDG-II	
• Cerebellar hypoplasia	• Dilated cardiomyopathy	• Cutis laxa	• Structural brain abnormalities
• Abnormal fat distribution	• Dystonic movements	• Adducted thumbs	• Epilepsy
• Inverted nipples	• Cataract	• Skeletal dysplasia	• Immunological abnormalities
• Muscular dystrophy	• Optic Nerve atrophy	• Short stature	• Myopathy
• Deafness	• Hydrops foetalis	• Wilson-like disease	
	• Glaucoma	• Hepatosplenomegaly	
	• Ichthyosis		

Box 2. NCDG

In het Nijmegen Center for Disorders of Glycosylation (NCDG) hebben we de krachten gebundeld van klinici, genetici en biochemici om de diagnostiek, patientenzorg en het onderzoek op elkaar af te stemmen. Naast de analisten in de diagnostiek en de metabole kinderartsen, werken we hierin nauw samen met diverse afdelingen, zoals Neurologie, Genetica en Leverziekten. Onder het onderzoek vallen ook een subgroep van glycosyleringdefecten, namelijk de dystroglycanopathieën. Dit is een groep zeldzame aangeboren spierdystrofieën, waarbij de spieren langzaam zwakker worden doordat er iets misgaat bij het spiereiwit dystroglycaan. Een belangrijk onderdeel van het NCDG is het contact met ouders en patiënten. Naast de jaarlijkse CDG patiëntdagen in Nijmegen werd recent voor het eerst een wereldwijd congres georganiseerd voor patiënten, hun ouders en professionals.

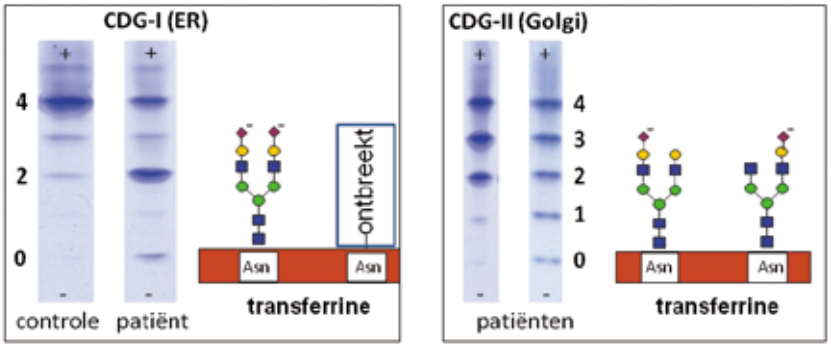


Figuur 1 N-glycosylering van eiwitten vindt plaats in twee stappen: een algemene route in het ER op het lipide dolichol, die vergelijkbaar is voor alle eiwitten en een route in het Golgi apparaat, waar eiwit- en weefselspecifieke glycosylering bekend zijn.

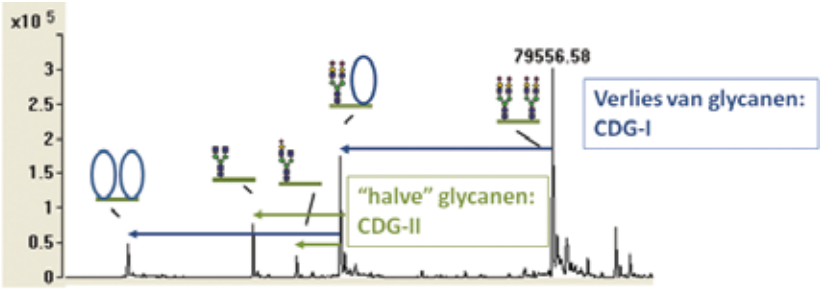
Door de introductie van nieuwe genetische technieken worden momenteel in versneld tempo veel nieuwe metabole ziekten opgehelderd. Tegelijkertijd ontstaat hiermee een grote behoefte aan biochemische technieken om: 1. De functionele relevantie van mutaties aan te tonen, 2. Om snel nieuwe diagnoses te kunnen stellen en 3. Om het beloop van therapie te kunnen volgen. Een specifieke groep ziekten die de laatste vijftien jaar fors in omvang gegroeid is, betreft de Congenitale Defecten in de Glycosylering. Na opheldering van het eerste genetische defect in 1997 zijn inmiddels al meer dan honderd verschillende subtypen bekend met een probleem in de glycosylering van eiwitten en/of lipiden.

Glycosylering en functie

Glucose is de bekendste suiker, als zoetstof of als bron van energie, en teveel ervan is slecht voor je lichaam. Naast glucose zijn er echter veel verschillende suikers, zoals mannose, galactose en siaalzuur, die als suikerketens ('glycanen') worden ingebouwd in eiwitten en lipiden. Dit proces van glycosylering vormt een cruciale derde laag van biologische informatie, bovenop de codes in het DNA (genoom) en eiwitten (Proteoom). Een goed voorbeeld hiervan is te zien in het ABO bloedgroep systeem dat volledig gebaseerd is op verschil in glycosylering, of in de aanhechting van spiercellen aan hun omgeving via een specifieke suikerketen (zie ook Figuur 4). In het algemeen spelen glycanen een belangrijke rol onder meer bij cel-cel interacties, het waarborgen van eiwitstructuur en -stabiliteit, moduleren van enzymactiviteit en celmigratie.



Figuur 2 Screening van CDG wordt uitgevoerd middels isofocusing van het eiwit transferrine in bloed. De laatste stap in de biosynthese is de aanhechting van een negatief geladen siaalzuur suiker. Bij CDG-I defecten ontbreken één of twee hele glycanen (linker deel) met als gevolg dat het profiel een verlies laat zien van 2 of 4 siaalzuren (en dus 2 negatieve ladingen). Bij CDG-II defecten zijn beide glycanen op transferrine aanwezig, maar worden deze niet volledig afgebouwd. Hierdoor kunnen één of meerdere siaalzuren ontbreken.



Figuur 3 Chip-C8-QTOF massa spectrometrie van het intacte transferrine eiwit, dat via antilichaam-beads uit 10 microliter bloedplasma geïsoleerd is. De normale glycosylering van transferrine is zichtbaar bij een massa van 79556.58 Da met twee volledige N-glycanen (zie ook Figuur 2). Het getoonde spectrum is van een patiënt met PGM1 deficiëntie. Het unieke aan dit defect is dat de afwijkende glycosylering bestaat uit een verlies van glycanen (CDG-I probleem) en half-afgebouwde glycanen (CDG-II probleem), en is daarmee direct diagnostisch voor het genetische defect.

De gevormde glycoproteïnen spelen een belangrijke rol in talrijke biologische processen in ons lichaam, zoals hersenontwikkeling, spierfunctie, het immuunsysteem en de bloedstolling.

Glycosylering vindt hoofdzakelijk plaats in de zogenaamde secretieroute van de cel, bestaande uit het Endoplasmatisch Reticulum (ER) en Golgi apparaat (Figuur 1). In deze route worden eiwitten gemaakt, gevouwen en ook gemodificeerd voordat ze hun bestemming bereiken zoals het bloed, de extracellulaire matrix, lysosoom en plasmamembraan. De belangrijkste modificatie in deze secretieroute betreft de versuikering van eiwitten (glycosylering): het aan elkaar schakelen van langgerekte suikerstaarten. Elke cel in ons lichaam heeft de volledige machinerie voor glycosylering en bijna elk eiwit dat een functie heeft aan de buitenkant van of buiten de cel wordt ook daadwerkelijk geglycosyleerd. Er worden twee hoofdtypen onderscheiden: 1. N-glycosylering van asparagine residuen, onder andere op immuunglobulines, transferrine en antithrombine, en 2. O-glycosylering van serine en threonine residuen, onder andere op de MUC eiwitten, EPO, IgA en dystroglycaan.

Erfelijke defecten in de N-glycosylering

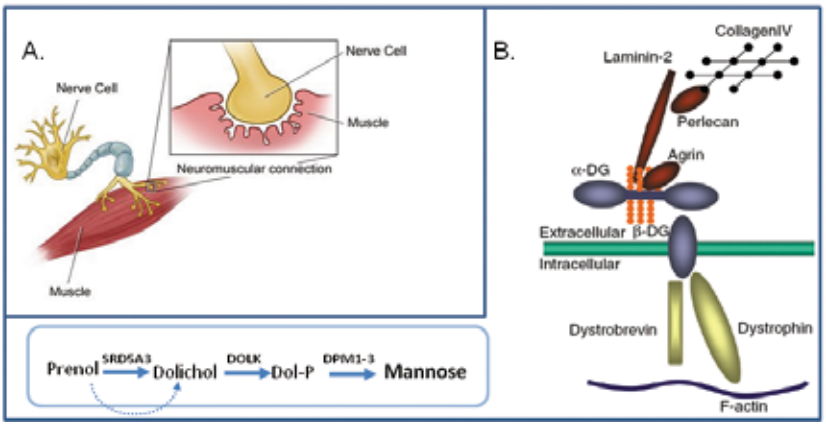
N-glycosylering van eiwitten vindt plaats in het ER en Golgi apparaat. De ER glycosylering is vrij algemeen en defecten in dit deel van de route leiden tot een functioneel probleem van een groot aantal eiwitten door het hele lichaam, en ook op een identieke manier, namelijk het ontbreken van gehele N-glycanen. Hierdoor is het goed te begrijpen dat een genetisch defect zal leiden tot een multisysteem en zeer gevarieerd ziektebeeld met vaak ernstige gevolgen, zoals leverproblematiek, hartfalen, problemen met hersenontwikkeling en –functie en afwijkende bloedstolling. De glycosylering in het Golgi apparaat kan veel specifieker zijn (eiwit- en weefselspecifiek) en de ziektesymptomen zijn ook veel gevarieerder (zie Box 1). Bij vrijwel alle CDG-varianten hebben patiënten een achterstand in de verstandelijke en motorische ontwikkeling, de ernst ervan is variabel. Daarnaast hebben ze vaak erg slappe spieren, coördinatiestoornissen en evenwichtsstoornissen. Veel CDG-patiënten hebben problemen met eten en ze groeien slecht. Patiënten kunnen afwijkingen hebben aan hun hart en andere organen, zoals de lever, de schildklier of de nieren. Deze afwijkingen kunnen ervoor zorgen dat kinderen al op jonge leeftijd komen te overlijden. Nu er veel nieuwe CDG subtypes zijn opgespoord, is het aantal verschillende klinische presentaties enorm toegenomen. De 'klassieke' presentatie van CDG als ziektebeeld waarbij meerdere organen betrokken zijn en met neurologische klachten, wordt nu aangevuld met nieuwe, meer specifieke ziektebeelden. Zo zijn er patiënten met een congenitale myasthenie (Figuur 4), met een dilaterende cardiomyopathie (het hart is verwijd ten gevolge van een ziekte van de hartspier), leverziekte, inspanningsgebonden spierklachten, spierdystrofie of skeletafwijkingen.

Patiënten worden in het metabole laboratorium opgespoord door een screening op het eiwit transferrine in bloed. Dit eiwit heeft in normale personen twee N-glycanen met aan iedere tak twee negatief geladen siaalzuren (Figuur 2). Indien de biosynthese niet goed verloopt, wordt een transferrine eiwit gevormd met daarop een kleiner aantal siaalzuren. Dit verschil in negatieve lading kunnen we goed detecteren middels isofocusing van transferrine (Figuur 2) in slechts 1 microliter plasma/serum. Een zogenaamd type I profiel geeft aan dat het gendefect in het cytoplasma of ER gelokaliseerd is. Een type II profiel geeft een lokalisatie aan van het defect in het Golgi apparaat. Om het primaire gendefect te vinden is aanvullend onderzoek nodig. Dit kan voor CDG type I defecten bestaan uit het meten van enzymen in leukocyten of fibroblasten, of een analyse van dolichol-gebonden glycanen in fibroblasten. Voor de bekende CDG-II typen wordt steeds vaker massa spectrometrie ingezet (Guillard et al 2011). Door de enorme vooruitgang in genetische technieken wordt inmiddels ook whole-exome sequencing ingezet in de diagnostiek van erfelijke ziekten. Voor diagnostiek van erfelijke defecten in de glycosylering worden speciaal door ons ontwikkelde bioinformatica filters toegepast om snel de ziektegenen aan te wijzen in de enorme hoeveelheid aan genetische varianten (Timal et al 2012).

Onderzoek – Ziektemechanismen

Omdat het een nog jonge groep stofwisselingsziekten betreft, zijn er

vervolg op volgende pagina >



Figuur 4 Spierziekten veroorzaakt door een erfelijk defect in de eiwitglycosylering. A. Congenitale myasthenie bij CDG ontstaat door een afwijkende N-glycosylering van de acetylcholine receptor. Deze bevindt zich op de spiercel en ontvangt signalen van de zenuw. Bij defecte glycosylering ontstaat er een functioneel probleem in deze signaaloverdracht tussen zenuw en spier, waardoor myasthenie symptomen optreden. B. Alfa-dystroglycaan (a-DG) is een eiwit aan de buitenkant van de spiercelmembraan. Specifieke O-mannose gebonden glycanen op dit eiwit (de oranje cirkels) zorgen voor de verbinding met de extracellulaire matrix (via binding aan Laminine-2). Als deze glycosylering deficiënt is, wordt de verbinding van de spiercel met de extracellulaire matrix verbroken en ontstaat een spierdystrofie. Een belangrijke suikerbouwsteen voor deze glycosylering is mannose. Alle genen in de biosynthese hiervan (SRD5A3, DOLK, DPM1, DPM2 en DPM3) konden wij verbinden met een erfelijke glycosyleringsziekte. Voor SRD5A3 hebben we nu aanwijzingen gevonden voor een alternatieve metabole route.

nog veel patiënten waarbij we het gendefect niet hebben kunnen opsporen. Dit heeft voor een belangrijk deel te maken met de gebrekkige kennis over de precieze mechanismen van eiwitglycosylering en de genetische factoren die dit proces beïnvloeden. We hebben nieuwe massa spectrometrische methoden ontwikkeld om heel gedetailleerd de glycosylering van eiwitten in bloed te analyseren. Dit kan door analyse van de N-glycanen van alle bloedeiwitten in één analyse: bloedeiwitten worden gedenatureerd door verhitting van 10 microliter plasma en daarna behandeld met het enzym PNGaseF dat N-glycanen van eiwitten afsplitst. De vrijgemaakte N-glycanen worden opgezuiverd en gemeten met massa spectrometrie. Dit kan door meting van de absolute massa, bijvoorbeeld met MALDI-TOF massa spectrometrie. Daarnaast is het mogelijk om een voorscheiding te doen van glycanen met identieke massa, zodat verschillende isovormen apart geanalyseerd kunnen worden. Dit doen wij momenteel met een PGC (porous-graphitized carbon) chip-QTOF. Echter gaat hierdoor de eiwitspecifieke informatie verloren en kan het glycosyleringsprofiel beïnvloed worden door variatie in de hoeveelheid van een specifiek eiwit, zoals immuunglobulines. Met een nieuwe methode kunnen we nu ook de glycaanstructuren gekoppeld aan transferrine zeer nauwkeurig bepalen. Eerst wordt het intacte transferrine eiwit gezuiverd uit 5-10 microliter bloed met anti-transferrine beads. Na elutie van de beads, wordt het gezuiverde transferrine gemeten met hoge-resolutie massa spectrometrie op een nanochip-C8-QTOF systeem (Figuur 3). Het grote voordeel van deze methode is dat er weinig materiaal nodig is, de volledige procedure slechts twee uur kost, de resultaten uiterst robuust zijn en dat directe toekenning van glycaanstructuren mogelijk is door de hoge massa resolutie. Toepassing van deze methode op een groot cohort patiënten liet unieke glycosyleringsprofielen zien voor een genetisch defect in het MAN1B1 gen deficiëntie bij patiënten met mentale retardatie (van Scherpenzeel et al 2014) en voor PGM1 deficiëntie, een inspanningsgebonden spierziekte (Tegtmeijer et al 2014). Bij deze laatste ziekte gaf het afwijkende profiel direct inzicht in het ziektemechanisme en kon een therapie op basis van galactose toegepast worden bij patiënten. Samen met toepassing van nieuwe genetische technieken in de diagnostiek, zullen we met dit soort ontwikkelingen het diagnostische traject in de komende jaren sterk verkorten.

Het ophelderen van nieuwe gendefecten leverde als meest opvallende bevinding dat het klinisch beeld uiterst specifiek kan zijn. Zo vonden we patiënten met spierdystrofie (Lefeber et al 2009, Barone et al 2012) of hartfalen (Lefeber 2011), zonder andere klachten zoals bekend bij CDG. Onderzoek naar de ziektemechanismen leerde ons dat de defecte genproducten niet alleen betrokken zijn bij de N-glycosylering van eiwitten, maar ook bij een ander type glycosylering: de O-mannosylering van het eiwit dystroglycaan (Figuur 4). Dit type glycosylering is cruciaal voor een goede spierfunctie en een defect hiervan leidt tot spierdystrofie. Het is nog onduidelijk waarom defecten in deze genen, die elkaar opvolgen in dezelfde metabole route, tot verschillende klinische symptomen kunnen leiden. Een eerste inzicht verkregen we door opheldering van het SRD5A3 gendefect (Cantagrel et al 2010, Morava et al 2010). Patiënten vertoonden neurologische en oogklachten, maar geen spierdystrofie. We konden aantonen dat patiënten met volledige afwezigheid van dit enzym toch het enzymproduct dolichol konden aanmaken. Er is blijkbaar sprake van een nog onbekende alternatieve route voor de biosynthese van dolichol. In dit onderzoeksproject, mogelijk gemaakt door een VIDI subsidie van ZONMW-NWO, zijn we inmiddels ook nieuwe biosyntheseroutes op het spoor gekomen voor de aanmaak van suikers, die tot dusver nog onbekend waren in de mens. De verwachting is dat opheldering van deze metabole routes zal leiden tot meer inzicht in het ziektemechanisme en het ontwikkelen van relatief eenvoudige vormen van therapie – door aanpassing van het dieet.

Tot slot

Nu we tot circa 70-95% van de gendefecten op kunnen sporen is het volgende doel om nu ook bij nieuwe patiënten binnen drie maanden een definitieve diagnose te kunnen stellen. Dit willen we bereiken door krachtenbundeling binnen het NCDG (Nijmegen Center for Disorders of Glycosylation, box 2). Daarnaast hebben we de eerste stappen kunnen zetten om het ziekteproces bij een deel van de CDG subtypen beter te begrijpen en ook bij een eerste defect kunnen ingrijpen. In tegenstelling tot het dogma van één algemene glycosyleringsroute, zullen we in de toekomst de unieke specificiteit van dit proces aantonen, op basis waarvan we gaan leren hoe we dit proces kunnen beïnvloeden. Kortom, er zijn nog voldoende uitdagingen, waarbij de analisten in onze groep in belangrijk mate bijdragen aan het innovatieve karakter van onze diagnostiek en onderzoek, aan het uitbouwen van ons centrum als internationaal referentiecentrum en gemotiveerd zijn door het belang van het werk voor de patiënt.

Referenties

1 *Barone R, Aiello C, Race V, Morava E, Foulquier F, Riemersma M, Passarelli C, Concolino D, Carella M, Santorelli F, Vleugels W, Mercuri E, Garozzo D, Sturiale L, Messina S, Jaeken J, Fiumara A, Wevers RA, Bertini E, Matthijs G, Lefeber DJ. DPM2-CDG: a new Congenital Disorder of Glycosylation with dystroglycanopathy and severe epilepsy. Ann Neurol 2012;72(4):550-8.*

2 *Cantagrel V, Lefeber DJ, Ng BG, Guan Z, Silhavy JL, Bielas SL, Lehle L, Hombauer H, Adamowicz M, Swiezewska E, de Brouwer AP, Blumel P, Sykut-Cegielska J, Houliston S, Swistun D, Ali BR, Dobyns WB, Babovic-Vuksanovic D, van Bokhoven H, Wevers RA, Raetz CR, Freeze HH, Morava E, Al-Gazali L, Gleeson JG. SRD5A3 is required for converting polyprenol to dolichol and is mutated in a congenital glycosylation disorder. Cell 2010;142:203-217.*

3 *Guillard M, Morava E, van Delft F, Korner C, Wevers RA, Lefeber DJ. N-glycan profiling by mass spectrometry for diagnosis of CDG-II. Clin Chem 2011;57, 593-602.*

4 *Lefeber DJ, de Brouwer APM, Morava E, Riemersma M, Schuurs-Hoeijmakers JHM, et al. Autosomal Recessive Dilated Cardiomyopathy due to DOLK Mutations Results from Abnormal Dystroglycan O-Mannosylation. PlosGenetics 2011;7:e1002427.*

5 *Lefeber DJ, Schonberger J, Morava E, Guillard M, Huyben KM, Verrijp K, et al. Deficiency of Dol-P-Man synthase subunit DPM3 bridges the congenital disorders of glycosylation with the dystroglycanopathies. Am J Hum Genet 2009;85(1):76-86.*

6 *Morava E, Wevers RA, Cantagrel V, Hoefsloot LH, Al-Gazali L, Schoots J, van Rooij A, Huijben K, van Ravenswaaij-Arts CM, Jongmans MC, Sykut-Cegielska J, Hoffmann GF, Bluemel P, Adamowicz M, van Reeuwijk J, Ng BG, Bergman JE, van Bokhoven H, Korner C, Babovic-Vuksanovic D, Willemsen MA, Gleeson JG, Lehle L, de Brouwer AP, Lefeber DJ. A novel cerebello-ocular syndrome with abnormal glycosylation due to abnormalities in dolichol metabolism. Brain 2010;133:3210-20.*

7 *Tegtmeyer L*, Rust S*, van Scherpenzeel M*, Ng B, Timal S, Raymond K, Losfeld M, He P, Ichikawa M, Veltman J, Huijben K, Shin Y, Sharma V, Adamowicz M, Lammens M, Reunert J, Witten A, Schrapers E, Matthijs G, Jaeken J, Rymen D, Stojkovic T, Stanley C, Matalon R, Burda P, Seyyedi S, Debus V, Socha P, Sykut-Cegielska J, van Spronsen F, de Meirler L, Vajro P, DeClue T, Ficicioglu C, Wada Y, Wevers R, Vanderschaeghe D, Callewaert N, Fingerhut R, van Schaftingen E, Freeze H, Morava E, Lefeber DJ* & Marquardt T*. PGM1 deficiency - phenotype, mechanism and treatment. New Eng J Med, 2014;370(6):533-42.*

8 *Timal s, Hoischen a, L Lehle, M Adamowicz, K Huijben, J Paprocka, E Jamroz, FJ van Spronsen, C Körner, C Gilissen, RJ Rodenburg, I Eidhof, L van den Heuvel, C Thiel, RA Wevers, E Morava, J Veltman, Lefeber dj. Gene identification in the Congenital Disorders of Glycosylation type I by whole-exome sequencing, Human Molecular Genetics 2012;21(19):4151-61.*

9 *Van Scherpenzeel M, Timal S, Rymen D, Hoischen A, Wuhrer M, Hipgrave-Ederveen A, Grunewald S, Peanne R, Saada A, Edvardson S, Grønborg S, Ruijter G, Kattentidt-Mouravieva A, Brum JM, Freckmann ML, Tomkins S, Jalan A, Prochazkova D, Ondruskova N, Hansikova H, Willemsen MA, Hensbergen PJ, Matthijs G, Wevers RA, Veltman JA, Morava E, Lefeber DJ. Diagnostic serum glycosylation profile in patients with intellectual disability as a result of MAN1B1 deficiency. Brain 2014;137:1030-8.*

NVML-Symposium

Onregelmatige roosters en duurzame inzetbaarheid
Een goede combinatie?

Op donderdag 21 mei 2015 organiseert de Commissie Sociale Belangen van de NVML een middagsymposium op het NVML-bureau in Utrecht.

Hoe zorg je ervoor dat je met onregelmatige diensten duurzaam inzetbaar blijft? Sommigen houden de onregelmatige dienst zonder moeite vol tot het pensioen, bij anderen kost het vanaf het begin moeite. Tijdens deze middag verneemt u de laatste inzichten over wat het draaien van onregelmatige dienst betekent voor de mens, maar ook hoe u deze diensten eenvoudiger en gezonder door kunt komen.
Draait u weekenddiensten, 24-uurs diensten, bereikbaarheidsdiensten of andere diensten? Dan is deze middag speciaal voor u.

Na de borrel zal om 17.00 uur de jaarlijkse Algemene Ledenvergadering van de NVML gehouden worden. Leden van de NVML zijn hiervoor van harte uitgenodigd.

Kijk voor meer informatie op www.nvml.nl.

Datum, tijden
Donderdag 21 mei van 13.30 tot 17.00 uur

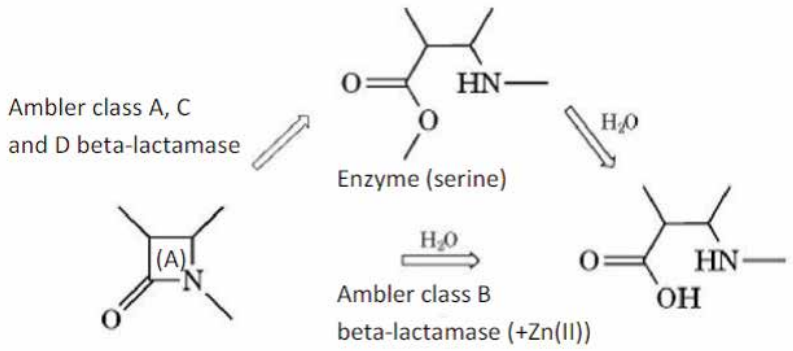
Kosten
€ 60,- (NVML-leden kunnen persoonlijk € 30,- aanvragen via de geld-terug-bon)

Aanmelding
Meer informatie een aanmelding via www.nvml.nl vóór 1 mei 2015

Moleculaire detectie van carbapenemase-producerende bacteriën binnen 24 uur:
Voorkom verspreiding in het ziekenhuis

Roel Nijhuis, analist moleculaire biologie Rijnstate, promovendus
Ellen Mascini, arts-microbioloog Rijnstate, hoofd afdeling hygiëne en infectiepreventie

Wereldwijd is er een toename te zien in bacteriën die resistent zijn tegen de meest gangbare antibiotica, de zogenaamde beta-lactam antibiotica. Tot de beta-lactam antibiotica behoren de penicillines, cefalosporines en carbapenems. Ondanks dat er verschillende mechanismen verantwoordelijk kunnen zijn voor resistentie tegen beta-lactam antibiotica, wordt deze resistentie bij Gram-negatieve staven hoofdzakelijk veroorzaakt door beta-lactamase enzymen. Deze enzymen vallen de beta-lactamring aan, het werkzame deel van het antibioticum, welke wordt afgebroken en daarmee het antibioticum inactiveert (figuur 1).

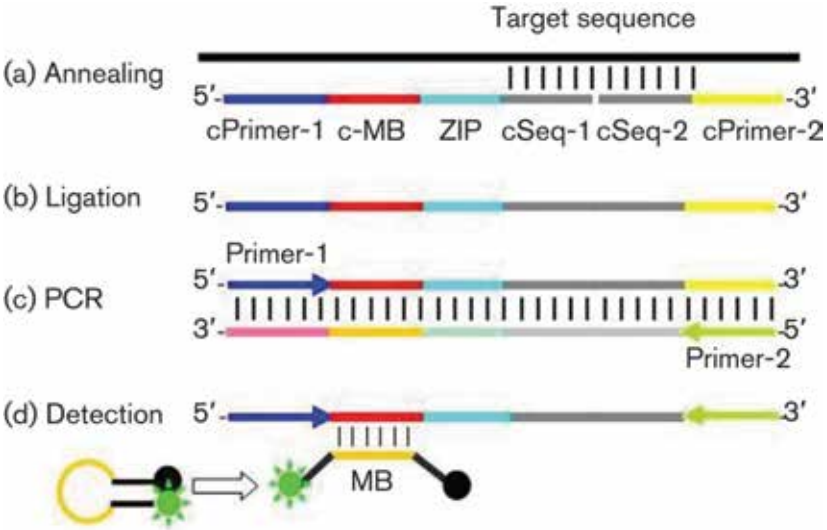


Figuur 1 Schematische weergave van de afbraak van een beta-lactam ring (A), door de verschillende groepen beta-lactamases

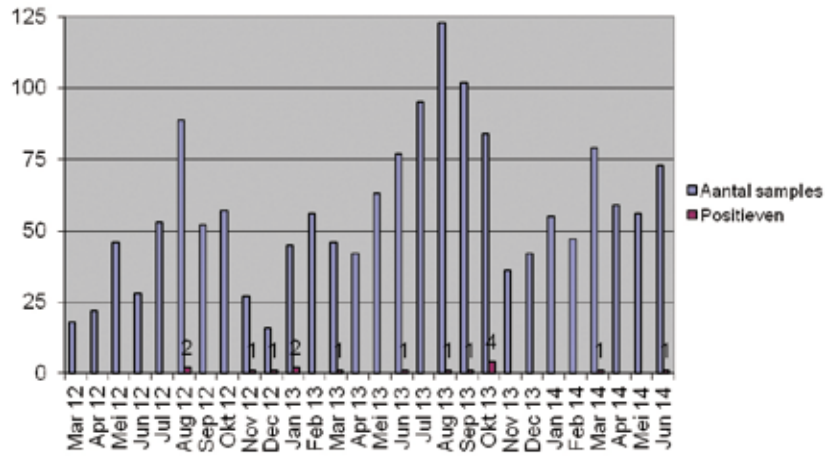
Beta-lactamases zijn geclassificeerd in vier verschillende groepen, op basis van de aminozuur volgorde: Ambler class A tot en met Ambler class D (1). Behalve Ambler class B, maken alle groepen gebruik van een vrije serine die de beta-lactamring afbreekt. Ambler class B, ook wel metallo-beta-lactamases (MBLs) genoemd, maakt gebruik van zink om de beta-lactamring af te breken. Elke beta-lactamase wordt aangestuurd door een bepaald gen, die in het chromosoom van de bacterie kan liggen of op een mobiel stuk DNA, een plasmide.

De beta-lactam antibiotica behorende tot de cefalosporines zijn onder te verdelen in klasse 1 tot en met 4. Nadat de eerste twee generaties cefalosporines niet meer bleken te werken tegen bacteriën die een beta-lactamase produceerden, werd de derde generatie cefalosporine ontwikkeld. Echter, door het veelvuldige gebruik van de antibiotica, pasten de bacteriën zich aan waardoor er opnieuw resistentie ontstond. Deze resistentie tegen de derde generatie cefalosporines werd onder andere veroorzaakt door puntmutaties in de genen welke de reeds bekende beta-lactamases aansturen. Vanwege het feit dat deze beta-lactamases in staat waren om de derde generatie cefalosporines te inactiveren, werden deze beta-lactamases de extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) genoemd. Hiervan zijn TEM- en SHV-ESBL's (beiden Ambler class A) en OXA-ESBL (Ambler class D) de meest bekende voorbeelden. Ongeveer vanaf het jaar 2000 was er een enorme toename te zien in een nieuw type ESBL, de CTX-M ESBL's (Ambler class A), welke momenteel wereldwijd het meest voorkomende type ESBL is (2).

Vanwege de toegenomen resistentie door ESBL, is men een nieuw type beta-lactam antibiotica gaan gebruiken, de carbapenems. Deze groep antibiotica bestaat uit onder andere ertapenem, imipenem en meropenem en wordt beschouwd als laatst mogelijke redmiddel om infecties veroorzaakt door ESBL producerende microorganismen te bestrijden. Echter, zoals het ook is gegaan bij de ESBLs, zijn er nieuwe beta-lactamases (carbapenemases) die de beta-lactam ring van de carbapenem antibiotica afbreken en zorgen voor resistentie. De carbapenemase enzymen zijn gecodeerd in een tiental verschillende genen, welke allemaal subvarianten hebben. De meest voorkomende genen wereldwijd zijn de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC, Ambler class A), NDM (New-Delhi metallo-beta-lactamase), VIM (Verona imipenemase) en IMP (active on imipenemase), welke allemaal tot Ambler class B behoren en tot slot de OXA-48 genen (Ambler class D). Al deze genen liggen op een plasmide, waarmee de genen van de ene naar de andere bacteriën kunnen worden overgebracht. Door deze eigenschap



Figuur 2 Principe van de Check-MDR Carba real-time PCR assay (a) Twee probes (cSeq-1 en cSeq-2) hechten aan de sequentie (specifiek voor een carbapenemase gen) waarbij een dubbelstrengs molecuul ontstaat. De probes zijn zo ontwikkeld dat er een gat overblijft van één basepaar. (b) Als allebei de probes goed zijn gebonden aan de specifiek sequentie, zal het gat van één basepaar worden opgevuld in de ligatie-stap met behulp van het ligase enzym. (c,d) Real-time PCR wordt vervolgens uitgevoerd, gebruikmakend van een algemene primerset - deze zullen binden aan cPrimer-1 en cPrimer2 - en een molecular beacon (MB) – deze zal binden aan c-MB. Detectie vindt plaats met een real-time PCR machine welke het signaal van de molecular beacon zal meten. De ZIP-sequentie, welke specifiek is voor elke probe, kan eventueel worden gebruikt voor verder onderzoek met microarray analyse.



Figuur 3 Overzicht van het aantal monsters gescreend op CPE

kan (verdere) verspreiding plaatsvinden, verantwoordelijk voor een verdere toename in resistentie.

De prevalentie van carbapenemase producerende *Enterobacteriaceae* (CPE) en het coderende gen varieert wereldwijd. In Noord-Europese landen zoals Noorwegen, Denemarken en Nederland is de prevalentie zeer laag. Dit in tegenstelling tot bijvoorbeeld India, Italië, Griekenland of Marokko, waar CPE endemisch voorkomt (3). Om de prevalentie in Nederland laag te houden en introductie van CPE in ziekenhuizen te voorkomen, heeft de werkgroep voor infectiepreventie (WIP) in de richtlijn 'Bijzonder resistente microorganismen (BRMO)' opgenomen dat gericht onderzoek naar BRMO (waaronder CPE) moet worden verricht bij patiënten met een verhoogd risico (4). Aanbevelingen over de methode van detecteren worden beschreven in de richtlijn 'Laboratorium detectie van BRMO', zoals samengesteld en gepubliceerd door de Nederlandse vereniging voor medische microbiologie (NVMM) (5).
Ook in het Rijnstate ziekenhuis wordt gericht onderzoek gedaan naar CPE, conform de richtlijn van de WIP. Echter, de toegepaste methode van diagnostiek wijkt af van de aanbevelingen die zijn beschreven in de richtlijn van de NVMM. Op het medisch microbiologisch en immunologisch laboratorium (MIL) van het Rijnstate ziekenhuis wordt diagnostiek uitgevoerd met behulp van een moleculaire detectie methode, waarmee binnen 24 uur bekend is of een patiënt drager is van één van de meest voorkomende CPE varianten of niet. In dit artikel worden de resultaten van 28 maanden onderzoek naar CPE beschreven.

Materiaal en methoden

Vanaf 1 maart 2012 zijn alle patiënten met verhoogd risico op CPE, conform de richtlijn van de WIP, routinematig gescreend op de aanwezigheid van CPE. Deze screening is uitgevoerd bij klinische patiënten die minder dan twee maanden geleden, langer dan 24 uur, in een buitenlands ziekenhuis zijn verpleegd of bij klinische patiënten die afkomstig zijn van een afdeling in een Nederlands ziekenhuis (of verpleegtehuis) waar een uitbraak met CPE heerst. Bij deze patiënten wordt een rectum uitstrijk afgenomen, welke vervolgens naar het MIL wordt getransporteerd waar de CPE diagnostiek wordt verricht. Deze diagnostiek bestaat uit twee stappen: i) overnacht incubatie in twee verschillende selectieve bouillons, waarbij de eventueel aanwezige CPE wordt verrijkt. ii) Na de ophopingsstap wordt er een DNA extractie verricht, waarbij het geïsoleerde DNA wordt gebruikt voor de detectie. Deze (moleculaire) detectie methode, de Check-MDR Carba real-time PCR assay (Check-Points, Wageningen, Nederland), is een ligatie-afhankelijke real-time PCR assay welke betrouwbaar de meest voorkomende carbapenemase genen (KPC, VIM, IMP, NDM, OXA-48) kan detecteren (6). Het principe van deze methode is uitgelegd in figuur 2. Bij een positief signaal met de Check-MDR Carba real-time PCR assay, worden de bouillons afgeënt op niet-selectieve media (Columbia bloedagar en MacConkey agar, beiden Oxoid, Basingstoke, UK) om de carbapenemase producerende bacteriën te kweken. De species wordt bepaald met behulp van 'Matrix-assisted laser desorption–ionization time of flight mass spec-

vervolg op volgende pagina >

Tabel 1: overzicht van de CPE positieve patienten

Patient	Datum	Herkomst	Isolaat	Carbapenemase
1*	Augustus 2012	Italië	*Klebsiella pneumoniae*	KPC
2	November 2012	Griekenland	*Klebsiella pneumoniae*	KPC
3	December 2012	Marokko	*Klebsiella pneumoniae*	OXA-48
4	Januari 2013	Marokko	*Enterobacter cloacae*	OXA-48
5	Januari 2013	Jordanië	*Klebsiella pneumoniae*	OXA-48
6	Maart 2013	Egypte	*Escherichia coli*	OXA-48
7	Juni 2013	Egypte	*Escherichia coli*	OXA-48
8	Augustus 2013	Turkije	*Escherichia coli*	OXA-48
9	September 2013	Spanje	*Klebsiella pneumoniae*	OXA-48
10	Oktober 2013	Bangladesh	*Citrobacter species* *Klebsiella pneumoniae*	OXA-48 OXA-48
11	Oktober 2013	Spanje	*Enterobacter cloacae*	VIM
12	Oktober 2013	Marokko	*Escherichia coli*	OXA-48
13	Oktober 2013	Marokko	*Klebsiella pneumoniae* *Enterobacter cloacae* *Enterobacter cloacae*	OXA-48 OXA-48 OXA-48
14	Maart 2014	Egypte	*Escherichia coli*	OXA-48
15	Juni 2014	Kameroen	*Escherichia coli*	OXA-48

** Patient waarvan twee monsters binnen een week zijn ingestuurd.*

** Er staat 2x Enterobacter cloacae bij patient 13 omdat de eerste Enterobacter cloacae MET ESBL is, terwijl de tweede Enterobacter cloacae ZONDER ESBL is.*

trometry' (MALDI-TOF MS, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), waarna het gevoeligheidspatroon van de gekweekte stammen wordt bepaald met Vitek2 (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Na confirmatie met de E-test worden de CPE isolaten opgestuurd naar het Rijksinsitituut voor volksgezondheid en milieu (RIVM) om het type carbapenemase te identificeren.

Resultaten en discussie

In 28 maanden tijd (vanaf 1 maart 2013 tot en met 30 juni 2014), zijn er in totaal 1588 monsters getest op de aanwezigheid van carbapenemase genen. Zoals te zien in figuur 3, was er zowel in 2012 als in 2013, net na de zomer een piek in het aantal geteste monsters. Deze piek kan worden verklaard door het feit dat er in de zomer meer mensen naar het buitenland gaan. In totaal zijn er 16 van deze 1588 monsters (1.0%) positief bevonden met de Check-MDR Carba real-time PCR assay, afkomstig van 15 verschillende patiënten. Ondanks de toename in het aantal uitgevoerde testen gedurende de zomermaanden, lijkt er echter geen toename te zijn in het aantal positieve testen gedurende dezelfde tijd.

De bouillons van deze 16 monsters zijn afgeënt op de voedingsbodems, waarbij in elk monster een CPE isolaat kon worden geïdentificeerd. Dit resultaat confirmeert de juiste bevindingen van de Check-MDR Carba real-time PCR assay. In 14 monsters is één CPE isolaat geïdentificeerd, terwijl in de overige twee monsters respectievelijk twee en drie CPE isolaten werden gevonden. Zoals eerder aangegeven is er in 16 monsters afkomstig van 15 verschillende patiënten een CPE gedetecteerd. Bij één patiënt zijn er twee monsters afgenomen binnen een week, die allebei positief zijn getest. Na kweek en identificatie van het type carbapenemase, bleek het om dezelfde bacterie (beiden KPC) te gaan. Bij de overige 14 patiënten, waarbij in totaal 17 verschillende CPE isolaten zijn geïdentificeerd, is OXA-48 veruit het meest geïdentificeerd. Naast OXA-48, die 15 keer is gevonden, werd er ook een KPC- en een VIM-carbapenemase gevonden (tabel 1). De hoge prevalentie van de OXA-48 carbapenemase in onze studie is overeenkomstig met de data (t/m week 36) uit de nationale surveillance van CPE van het RIVM, waarbij voor 2013 en 2014 respectievelijk 58.5% en 58.1% van alle CPE een OXA-48 producer bleek te zijn (7). In tabel 1 is weergegeven in welk land de patiënten, waarbij een CPE is gevonden in de rectumuitstrijk, waren opgenomen in een ziekenhuis. De patiënten zijn hoofdzakelijk afkomstig uit ziekenhuizen in Noord-Afrika (Marokko (4) en Egypte (3)) en Zuid-Europa (Spanje (2), Italië, Griekenland en Turkije (allen 1)). De overige drie patiënten zijn opgenomen geweest in een ziekenhuis in Bangladesh, Jordanië en Kameroen. Behalve Kameroen, zijn deze landen allemaal bekend met een hoge prevalentie CPE. In Marokko en Griekenland is er zelfs een endemische verspreiding van CPE, met respectievelijk OXA-48 en KPC carbapenemases. Naast endemisch in Marokko, wordt er ook in Egypte en Turkije een hoge prevalentie van OXA-48 carbapenemases gezien.

De methode zoals beschreven in deze studie gebruikt een moleculaire methode, welke de carbapenemase genen KPC, VIM, IMP, NDM en OXA-48 kan detecteren. Ondanks dat dit wereldwijd de meest voorkomende carbapenemase genen zijn, zullen andere, meer zeldzame carbapenemase genen (zoals GES of SPM carbape-

nemases) niet worden gedetecteerd met deze methode. Het is dan ook van belang om blijvend op de hoogte te zijn van de epidemiologie van CPE, zodat, in het geval van een toename in CPE met een ander type carbapenemase, de methode kan worden aangepast.

Conclusie

Deze studie beschrijft de resultaten van een nieuwe, betrouwbare screeningsmethode, die is ontwikkeld om bij hoog risico patiënten binnen 24 uur de aanwezigheid van CPE vast te stellen. Omdat snelle identificatie van CPE een enorme bijdrage levert aan een effectief infectie preventie beleid in ziekenhuizen, zal deze methode van essentieel belang zijn om verdere verspreiding van CPE tegen te gaan.

Literatuur

1 *Ambler, R. P. The structure of beta-lactamases. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 289, 321–331 (1980).*

2 *Bradford, P. A. Extended-Spectrum Beta-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. Clin. Microbiol. Rev. 14, 933–951 (2001).*

3 *Nordmann, P., Naas, T. & Poirel, L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg. Infect. Dis. 17, 1791–1798 (2011).*

4 *WIP. WIP-richtlijn BRMO (Bijzonder Resistente Micro-Organismen). at <http://www.rivm.nl/Documenten_en_publicaties/Professioneel_Praktisch/Richtlijnen/Infectieziekten/WIP_Richtlijnen/Actuele_WIP_Richtlijnen/Ziekenhuizen/WIP_richtlijn_BRMO_Bijzonder_Resistente_Micro_Organismen_ZKH>*

5 *Bernards, A. T., Bonten, M. J. M., Cohen Stuart, J. & Diederen, B. M. W. Laboratory detection of highly resistant microorganisms (HRMO). (2012).*

6 *Cuzon, G., Naas, T., Bogaerts, P., Glupczynski, Y. & Nordmann, P. Probe ligation and real-time detection of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM carbapenemase genes. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 76, 502–505 (2013).*

7 *RIVM. Registratie infectieziekten; Nationale surveillance van carbapenemaseproducerende Enterobacteriaceae (CPE). at <http://www.rivm.nl/Documenten_en_publicaties/Algemeen_Actueel/Uitgaven/Infectieziekten_Bulletin/Jaargang_25_2014/Oktober_2014/Inhoud_Oktober_2014/Nationale_surveillance_van_CPE_en_MRSA_tot_en_met_week_36_2014>*

Verklarende woordenlijst

BRMO	*Bijzonder resistente micro-organismen*
CPE	*carbapenemase producerende Enterobacteriaceae*
CTX-M	*cefotaximase - Munich*
DNA	*desoxynucleic acid*
ESBL	*extended-spectrum beta-lactamase*
GES	*Guyana ESBLs*
IMP	*vernoemde naar de activiteit tegen imipenem*
KPC	*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*
Maldi-TOF	*Matrix-assisted laser desorption–ionization time of flight mass spectrometry*
MBL	*metallo-beta-lactamase*
NDM	*New-Delhi metallo-beta-lactamase*
NVMM	*Nederlandse vereniging voor medische microbiologie*
OXA	*hydrolyse van oxacilline*
PCR	*polymerase chain reaction*
RIVM	*Rijksinsitituut voor volksgezondheid en milieu*
SHV	*sulphhydryl variabele*
SPM	*Sao Paolo metallo-beta-lactamase*
TEM	*Temoneira (naam van de patient waar deze beta-lactamase initieel is gevonden)*
VIM	*Verona imipenemase*
WIP	*Werkgroep voor Infectiepreventie*

Roel Nijhuis e-mail: rht.nijhuis@outlook.com

Cao Nieuws

Cao Ziekenhuizen
Helaas nog geen nieuwe cao

Helaas: er is nog geen nieuwe cao. De vakbonden zijn op 25 november 2014 teleurgesteld vertrokken van de onderhandelingstafel. De meningen lagen té ver uiteen, bijvoorbeeld op de volgende punten:

- Werkgevers bieden geen loonsverhoging voor 2014 en te weinig verhoging voor de komende tijd.
- Werkgevers willen de IZZ-toelage afschaffen voor aanvullende verzekering (€ 14,- per persoon per maand).
- De pensioenpremie daalt, maar werkgevers willen dit niet doorberekenen aan de werknemers.
- De vakbonden willen minder flexbanen en meer werkzekerheid, het opzetten van een interne flexpool van vaste medewerkers.

En zo zijn er nog een aantal punten. Het gehele overzicht staat op de NVML-website op de nieuwspagina.

Hoe nu verder?

Er komt waarschijnlijk binnenkort geen nieuw overleg. De kaderleden van de vier vakbonden zijn op 8 december 2014 bijeen geweest en hebben alvast bekeken welke actiemogelijkheden er zijn. In veel ziekenhuizen zijn al actiecomités opgezet.

Wil je weten of er bij jou ook actie gevoerd gaat worden, wil je je solidariteit hiermee betuigen of je aanmelden om mee te doen? Dan kun je dit doorgeven door een e-mail te sturen naar nvml@nvml.nl t.a.v. J. Schoemaker.

NIPT-testen:
Bloedtest bij moeder spoort chromosoomafwijkingen op bij ongeboren kind

Ingrid M. C. Bakker, Corrie Louwerens-Zintel, Erik A. Sistermans
Klinische Genetica, VU medisch centrum, Amsterdam

NIPT (Niet Invasieve Prenatale Test) is een test waarbij in het bloed van zwangere vrouwen met behulp van NGS (Next-Generation Sequencing) chromosoomafwijkingen in het foetale DNA worden gedetecteerd. Deze test wordt per 1 april 2014 in Nederland binnen de TRIDENT studie aangeboden aan zwangere vrouwen (1). TRIDENT staat voor 'Trial by Dutch Laboratories for Evaluation of Non-Invasive Prenatal Testing'. Alle Nederlandse Universitair Medische Centra doen hieraan mee. Doel van de studie is om in Nederland alle stappen die betrekking hebben op de NIPT in kaart te brengen om zo te bepalen of, en op welke manier, de test het best geïmplementeerd kan worden. De studie betreft de counseling van de patiënten, uitvoering van de test in de dagelijkse praktijk en de opvolging van afwijkende bevindingen. Daarnaast wordt in deze fase onderzocht hoe zwangere vrouwen (en hun partners) tot een keuze zijn gekomen om wel of niet deel te nemen aan deze studie, en wordt bij deelname naar hun ervaringen met de test gevraagd.

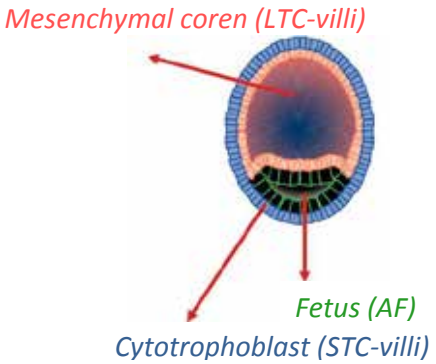
Binnen de TRIDENT studie wordt NIPT aangeboden als alternatief op de vlokkentest en vruchtwaterpunctie als aan een van de volgende voorwaarden is voldaan:

- Bij de combinatietest wordt een verhoogd risico gevonden (risico hoger dan 1:200 bij een normale nekplooimeting (NT) (a).
- Bij de zwangere is in een eerdere zwangerschap sprake geweest van een trisomie voor chromosoom 13, 18 of 21.

Er wordt binnen de TRIDENT studie gekeken naar de volgende afwijkingen: syndroom van Down (trisomie 21), syndroom van Edwards (trisomie 18) en syndroom van Patau (trisomie 13). Het grote voordeel van de NIPT is dat deze test geen risico geeft op een miskraam. Bovendien is de test al na tien weken zwangerschap mogelijk. Daarnaast is de test minder ingrijpend voor de zwangere vrouw dan een invasieve test. Tenslotte is de betrouwbaarheid hoog (aantonen van syndroom van Down > 99%).

De NIPT-test

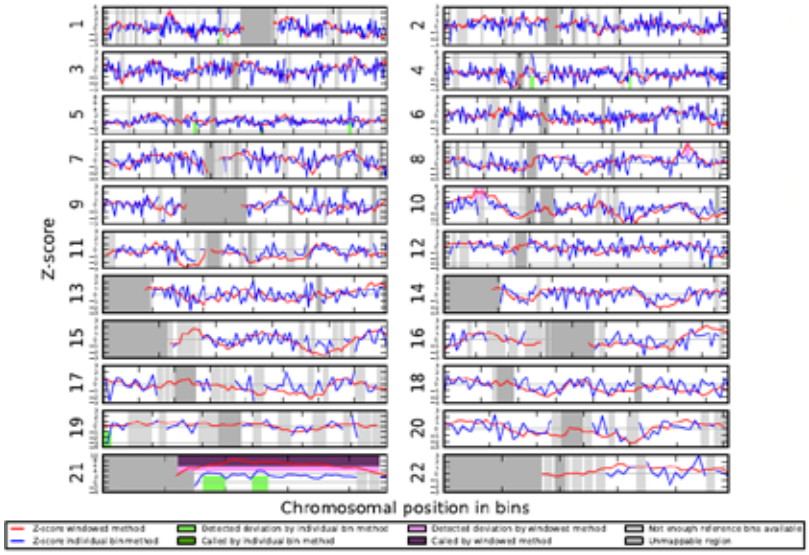
NIPT is gebaseerd op het principe dat het bloed van de zwangere vrouw celvrij foetaal DNA (cffDNA) bevat. Dit cffDNA maakt ongeveer 3 tot 15% uit van alle circulerende DNA-fragmenten in het maternale plasma, de rest is afkomstig van de moeder zelf. CffDNA zit in microparticles die worden uitgescheiden door de cytotrofoblasten in de placenta, het is dus niet helemaal 'vrij' (figuur 1).



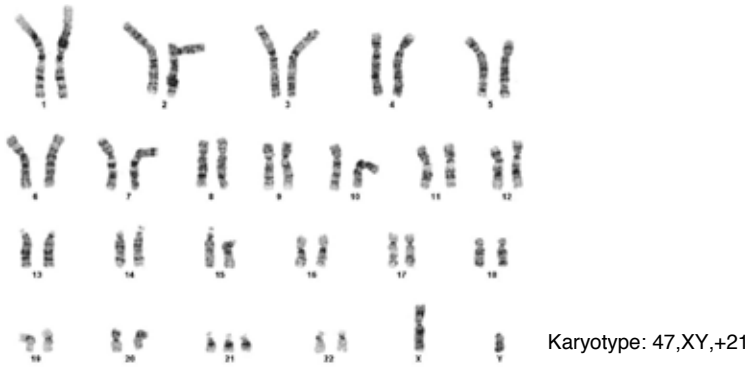
Bron: Van Opstal, D. *Department of Clinical Genetics, Erasmus MC, Rotterdam.*

Figuur 1

Binnen Nederland zijn er enkele kleine verschillen in de manier van werken. In het VUmc en het AMC worden vier EDTA bloedbuizen afgenomen van zwangere vrouwen die kiezen voor NIPT. Dit is voldoende om de test twee keer in te kunnen zetten. De buizen bloed worden zo snel mogelijk (binnen zes uur) afgedraaid om het plasma te verzamelen waarin het cffDNA zich bevindt,omdat het cffDNA snel afgebroken wordt. Het plasma wordt vervolgens bewaard bij -80 °C waar het cffDNA stabiel blijft.
Uit het bloedplasma wordt het cffDNA geïsoleerd met een QIAsymphonie robot die gebruik maakt van magnetische beads. Het cffDNA is al gefragmenteerd en die kleine stukjes DNA worden blunt end gemaakt. Dit proces is volledig geautomatiseerd met een Beckman FX robot. Vervolgens wordt een A-base toegevoegd zodat er DNA fragmenten met een A-base overhang ontstaan. De adapter heeft een T-base overhang waardoor ligatie kan plaats-



Figuur 2A



Figuur 2B

vinden wat resulteert in een NGS-library. In deze adapter zitten sequenties die het mogelijk maken een PCR te doen. Daarnaast bevat de adapter een variabele 6-basenparen sequentie, die dient als barcode en ervoor zorgt dat het DNA van elke zwangere vrouw na het poolen geïdentificeerd kan worden.
Het PCR product wordt opgezuiverd met behulp van beads en het DNA van acht zwangere vrouwen wordt gepoold. Het DNA wordt met NaOH enkelstrengs gemaakt, waarna het dankzij de adaptersequentie kan binden op een flow cell van de HiSeq2500. Hierna kan de sequentieanalyse worden gestart. Binnen acht uur wordt van iedere zwangere ongeveer 12.5 miljoen reads gegenereerd. Gedurende de hele procedure (van DNA-isolatie t/m de beoordeling van de NGS data) wordt standaard een controle sample meegenomen om zowel de technische kwaliteit als de controle op sampleverwisseling te kunnen waarborgen. Daarnaast zijn op meerdere plekken in het proces controles ingebouwd om de kwaliteit van bijvoorbeeld het sequencen te controleren.
Omdat het sequencen een complexe procedure is, duurt het zes tot acht werkdagen voordat er een uitslag is. In ongeveer 3% van de testen is geen betrouwbare uitslag mogelijk, bijvoorbeeld omdat er te weinig foetaal DNA aanwezig is.

De resultaten

De data-analyse wordt gedaan door een bio-informaticus met de op het VUmc ontwikkelde RoDA pipeline. Analyse met de RoDA pipeline bestaat uit verschillende stappen. De eerste stap is het scheiden van de data op basis van de barcode, dit wordt het 'demultiplexen' genoemd. Vervolgens worden alle reads tegen het genoom gezet. Dit kun je vergelijken met een grote puzzel waarbij de reads de puzzelstukjes zijn, en het menselijk genoom het voorbeeld. Uit validatie-experimenten is bekend hoeveel puzzelstukjes er per chromosoom teruggevonden moeten worden. Is er bij de foetus sprake van het syndroom van Down, dan zie je dat er teveel stukjes worden gevonden voor chromosoom 21. Statistisch toon je dit aan door de Z-score te berekenen voor elk chromosoom, bij een Z-score van >3 is er sprake van een trisomie (b). Met behulp van de aan het VUmc ontwikkelde WISECONDOR software is het zelfs mogelijk om met een beperkt aantal reads ook kleinere deleties of duplicaties aan te tonen, ongeveer tot 20Mb (2). Dit gebeurt door niet een Z-score te berekenen per chromosoom, maar per bin van 1 miljoen baseparen.
Een voorbeeld van een WISECONDOR rapport staat in figuur 2A (casus 1). Je ziet dat ieder chromosoom apart is weergeven. De y-as is de Z-score en de x-as is de chromosoompositie. Er wordt op twee manieren een Z-score berekend, de blauwe en de rode lijn. De blauwe lijn is de individuele Z-score per bin, de rode lijn houdt ook rekening met de vorige en volgende bins. De grijze stukken zijn gebieden waar onvoldoende data bekend zijn, bijvoorbeeld de centromeren. Als er een chromosoomafwijking is, zal een paarse band verschijnen zoals bij casus 1 te zien is bij chromosoom 21.

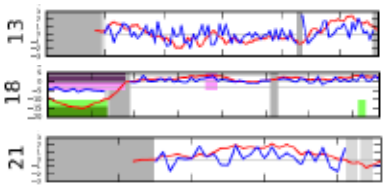
De uitslag

Bij een afwijkende uitslag van de NIPT zijn er sterke aanwijzingen dat de foetus een trisomie 21, 18 of 13 heeft. Er is een kleine kans op een afwijkende uitslag, terwijl het ongeboren kind geen trisomie heeft. Dit kan gebeuren als er sprake is van een mozaïek, waarbij de trisomie wel aanwezig is in de cytotrofoblast, maar niet in het kind (Confined Placental Mosaic, CPM (c)). Om zekerheid te krijgen is daarom bij een afwijkende NIPT uitslag een vlokkentest of vruchtwaterpunctie nodig.

Conclusie

Met behulp van NIPT is het mogelijk om in maternaal bloed chromosomale afwijkingen, zoals trisomie 21, 13 en 18, bij de foetus vast te stellen door gebruik te maken van het cffDNA

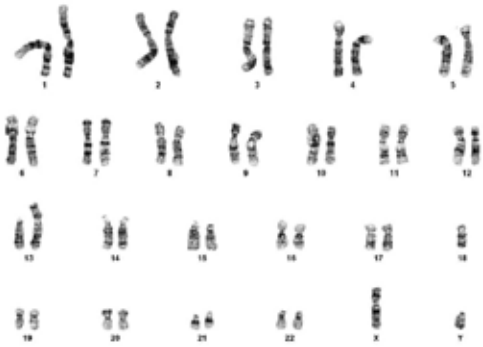
vervolg op volgende pagina >



chromosoom 18 (18p)

WISECONDOR rapport (gedeeltelijk)

Figuur 3B



Karyotype:
45,XY,der(13;18)(q10;q10)

Figuur 3B

afkomstig van de placenta (cytotrofoblasten). Tijdens de TRIDENT studie wordt onderzocht hoe we deze test het best kunnen implementeren in Nederland. Naast trisomieën kunnen ook andere grote afwijkingen aan de chromosomen aangetoond worden, zie casus 2. De TRIDENT studie zal in 2016 afgerond worden, waarna advies zal worden uitgebracht aan de minister van volksgezondheid, welzijn en sport (VWS). Deze zal op haar beurt advies vragen aan de gezondheidsraad en op basis van dat advies bepalen of, en zo ja aan wie, de NIPT test in Nederland aangeboden mag worden.

Verklarende woordenlijst:

a De combinatietest bestaat uit een bloedonderzoek, waarbij de zwangerschapshormonen Vrij-Beta-hCG en PAPP-A gemeten worden in het bloed van de moeder. Deze waarden worden samengevoegd met de dikte van de nekplooimeting (NT-meting, een echografische meting) in een risicobereke-ningsprogramma. Samen met de leeftijd van de moeder en de zwangerschapsduur geeft dit een uiteindelijk risico (en dus géén zekerheid) op een kind met het syndroom van Down.

b Een Z-score geeft aan hoeveel standaarddeviaties een observatie van het gemiddelde af zit.

c CPM = Confined Placental Mosaic. De placenta bestaat uiteen mesenchymale kern en een delende buitenlaag van (syn)cytio- en cytotrofoblasten. Beide celtypen ontstaan uit mesodermaal kiemblad. De NIPT test wordt verricht op cffDNA dat vrijkomt uit de cytotrofoblasten . De mesenchymale cellen staan in de embryogenese dichter bij de ontwikkeling van de foetus. Bij een vlokkentest wordt met name naar de mesenchymale cellen onderzoek gedaan. Vruchtwater bevat cellen afkomstig van de huid of de slijmvliezen (mond- /keelholte, spijsverteringskanaal, urinewegen) van de foetus.

d QF-PCR = Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction, een test waarmee het mogelijk is om snel een uitslag te geven op de vraag of er sprake is van trisomie 13, 18 of 21.

Referenties:

1 http://meerovernipt.nl/home

2 R. Straver et al. "WISECONDOR: Detection of fetal aberrations from shallow sequencing maternal plasma based on a within-sample comparison scheme." NucleidAcids Research (2013))

Casus 1

- Zwangere vrouw van 41 jaar
- Zwangerschapsduur: 15 weken
- NT : 2,5 mm
- Combinatietestrisico: trisomie 21 =>1: 5; trisomie 13 =>1: 35 en trisomie 18 =>1: 60

De NIPT uitslag gaf aanwijzingen voor trisomie 21, zie figuur 2A. Vervolgens is invasieve diagnostiek verricht (vruchtwaterpunctie) om de diagnose te bevestigen. Hiervoor is gebruik gemaakt van een snelle QF-PCR (d) en karyotypering, zie figuur 2B.

Casus 2

- Zwangere vrouw van 41 jaar
- Zwangerschapsduur: 13 weken
- NT : 2,6 mm
- Combinatietestrisico: trisomie 21 =>1: 200; trisomie 13 =>1: 1200 en trisomie 18 =>1: 1200

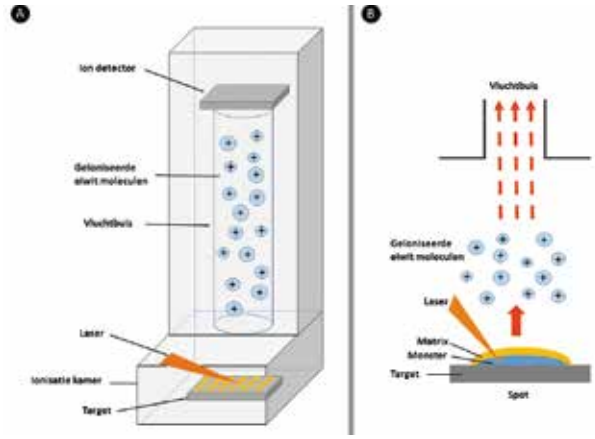
De NIPT uitslag gaf geen aanwijzing voor trisomie 13, 18 of 21. Echter wel sterke aanwijzing voor een deletie van de korte arm van chromosoom 18 (18p), zie figuur 3A. Deleties van 18p zijn vaker beschreven in de literatuur en zijn ook bekend als monosomie 18p, het 18p deletiesyndroom of het 18p- syndroom. Vervolgens is ook hier invasieve diagnostiek verricht (vruchtwaterpunctie) om de diagnose te bevestigen. Karyotypering laat zien dat de deletie 18p het gevolg is van een ongebalanceerde translocatie tussen chromosoom 13 en 18, zie figuur 3B.

Identificatie van micro-organismen

met behulp van Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

Adriaan M. van Drongelen en Johannes G. Kusters, Universitair Medisch Centrum Utrecht.

Binnen de medische microbiologie is er behoefte aan snelle, accurate en kosteneffectieve methoden voor het identificeren van micro-organismen. Tot voor kort vonden identificaties hoofdzakelijk plaats op basis van morfologische en biochemische eigenschappen van het micro-organisme, maar sinds een vijftal jaren maakt de Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) een snelle opmars. Grootste voordeel is dat met MALDI-TOF MS binnen enkele minuten micro-organismen geïdentificeerd kunnen worden, terwijl dit bij de verschillende morfologische en fenotypische methoden uren of, in sommige gevallen, zelfs dagen duurt (1).



Figuur 1 A. Schematische weergave van de onderdelen en de werking van een Massa Spectrometer. B. Schematische detail weergave van een sample-spot in de ionisatie kamer.

Het gebruik van massaspectrometrie voor microbiologische identificaties werd voor het eerst beschreven in 1975 door Anhalt en Fenselau (2). Gedurende de jaren 80 werden er verschillende desorption/ionization technieken verder ontwikkeld. Dit leidde uiteindelijk tot de definitieve doorbraak van MALDI-TOF MS in 1996. Hiervoor was het echter nodig om bacterielysaten te maken en deze te filtreren en door deze voorbewerkingen was deze methodiek nog niet geschikt voor gebruik in de routine setting. Uiteindelijk werden tussen eind jaren 90 en het begin van de eenentwintigste eeuw de eerste succesvolle experimenten gepubliceerd waarbij gebruik werd gemaakt van MALDI-TOF MS op intacte micro-organismen. Vanwege de kosteneffectieve, snelle en betrouwbare identificatie opende deze nieuwe massaspectrometrische methode de weg naar de routinematige identificaties van bacteriën (3).

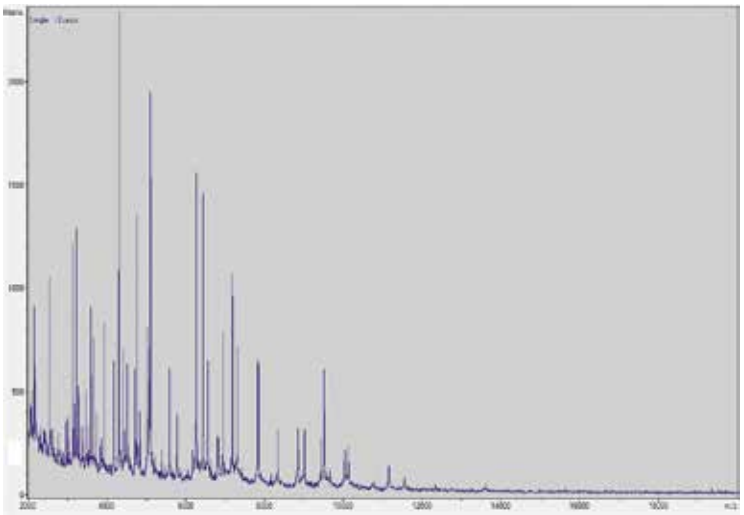
Principe

Massaspectrometrie (MS) is gebaseerd op de analyse van de massa over ladingsverhouding van individuele moleculen. De voor deze analyse gebruikte massaspectrometer bestaat uit drie basisonderdelen: een ionisatiekamer, een vluchtbuis, en een iondetector (zie figuur 1A) (4). Bij MALDI-TOF MS wordt gebruikgemaakt van een laser om de eiwitten te verdampen en een zogenaamde matrixoplossing om de micro-organismen te lyseren en de eiwitten een lading te geven. In de microbiologie wordt meestal gebruikgemaakt van een verzadigde oplossing van α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) in 30% acetonitriel, 0,1% trifluorazijnzuur (5). Het te identificeren micro-organisme wordt samen met de matrix op een target gebracht. Deze target wordt hierna in de ionisatiekamer geplaatst. Vervolgens wordt er met een laser op de target geschoten. Dit leidt tot ionisatie en desorptie van de eiwitmoleculen in het monster (4). De matrix absorbeert het grootste gedeelte van de energie, waardoor de te meten eiwitmoleculen niet fragmenteren. De geïoniseerde eiwitmoleculen komen nu vrij en worden vervolgens versneld door het hoog elektrisch veld in de ionisatiekamer en hierdoor worden ze de vluchtbuis ingeschoten (zie figuur 1B).

Omdat de kracht in het elektrisch veld op alle moleculen even groot is, zullen de eiwitmoleculen worden gescheiden op basis van hun massa over ladingsverhouding. Immers, de tijd die een molecuul er over doet om de iondetector aan het einde van de vluchtbuis te bereiken (de Time Of Flight) zal voor de kleine, lichte eiwitmoleculen korter zijn dan voor de zware. De lichte eiwitten ondervinden namelijk een hogere versnelling dan de zwaardere en zij zullen dan ook eerder de detector aan het einde van de vluchtbuis bereiken. Het resultaat is een massaspectrum, waarin de massa over ladingsverhouding (op de x-as) en de intensiteit van het signaal (op de y-as) worden weergegeven (zie figuur 2). De intensiteit van het signaal is de maat voor de hoeveelheid eiwitmoleculen die in het betreffende monster aanwezig is (4). Het verkregen massaspectrum wordt vervolgens vergeleken met een database, waarin de spectra van een groot aantal micro-organismen aanwezig zijn. Op basis van een gelijkenis met deze spectra kan de

vervolg op volgende pagina >

identiteit van het te identificeren micro-organisme worden vastgesteld. De match wordt weergegeven met een score. Hoe hoger de score, hoe groter de zekerheid van de identificatie. Voor de routinematige MALDI-TOF MS bepaling wordt er meestal gemeten in het gebied van 2000-20.000 Da. Niet alleen omdat de invloed van verontreiniging en externe factoren hier het kleinst is, maar ook omdat in dit gebied de ribosomale eiwitten liggen. Deze binnen een species geconserveerde eiwitten zijn meestal in grote aantallen aanwezig en hun moleculair gewicht is specifiek voor een bacteriële species (5). Door naar prominente ribosomale eiwit-pieken te kijken kan dan meestal ook tot een zeer betrouwbare identificatie van het bacterie-isolaat worden gekomen.



Figuur 2 Het massa spectrum van een *Haemophilus influenzae.*

Optimalisatie

In het proces van MALDI-TOF MS zijn een aantal factoren van groot belang voor het verkrijgen van goede resultaten. Dit zijn de gebruikte matrix, de preparatie van het sample, het goed functioneren van de massaspectrometer, de gebruikte database en de analyse-software.

Matrix

In het geval van de matrix is het belangrijk dat de HCCA-moleculen in de matrix goed in oplossing zijn, en er geen kristallen in de oplossing aanwezig zijn. Omdat het gebruikte oplosmiddel vluchtig is, is het van belang om deze oplossing in een goed afgesloten vaatje te bewaren. Bovendien moet de oplossing donker worden bewaard omdat HCCA lichtgevoelig is.

Sample preparatie

Voor het verkrijgen van een goed signaal dienen het sample en de matrix homogeen over de spot verdeeld te zijn. Ook mag het materiaal niet te dik aangebracht worden. Dit is een kwestie van uitproberen. Om de preparatie van de samples goed te laten verlopen is het daarom belangrijk dat analisten hier goed in getraind worden.

Goed functioneren van de massaspectrometer

Ook kalibratie, lasersterkte en het vacuüm van de massaspectrometer zijn van invloed op de meting. De massaspectrometer moet regelmatig gekalibreerd worden. Daarnaast is het verstandig om bij elke bepaling interne controles mee te nemen om zo de performance van het apparaat te kunnen monitoren.

Database/software

Als laatste heeft ook de gebruikte database een weerslag op de resultaten: de identificatie van het te testen micro-organisme hangt immers grotendeels af van of het micro-organisme goed gedefinieerd is in de gebruikte database. Het is daarom erg belangrijk om ervoor te zorgen dat er alleen betrouwbare referentiespectra in de database komen en dat de inhoud van de database de omvang van de te testen monsters dekt. In Nederland wordt op de medisch microbiologische laboratoria voornamelijk gebruikgemaakt van de MALDI-TOF MS apparatuur van Bruker en Biomérieux. Deze firma´s gebruiken een verschillende methode om hun referentiespectra in de database samen te stellen en ook de algoritme om het sample-spectrum te vergelijken met de spectra in de database verschillen aanzienlijk. Deze verschillen in aanpak hebben invloed op de uitslagen, maar welke methode het beste is zal in grote mate afhankelijk zijn van de workflow van het laboratorium.

Werkwijze

Zoals hiervoor al uitgelegd wordt er vanuit efficiency oogpunt in diagnostische laboratoria het liefst MALDI-TOF MS analyse gedaan op intacte micro-organismen. Hiertoe word een kolonie van het micro-organisme aangestipt met een houten stokje. Vervolgens wordt met dit stokje het materiaal op een spot van het target aangebracht (zie figuur 3). De meeste laboratoria testen de te identificeren micro-organismen in duplo en dus zal er meestal met hetzelfde stokje ook nog een tweede spot van de target worden gesmeerd. Hierbij is het belangrijk dat het materiaal homogeen wordt uitgesmeerd over de beide spots. Het eenmalig aantippen van een kolonie is voldoende voor het smeren van twee spots, want in de praktijk wordt eerder te veel dan te weinig materiaal opgebracht. Vervolgens wordt er 1-2 µl matrix op de besmeerde spots gepipetteerd, waarna de matrix aan de lucht dient te drogen. Wanneer de matrix droog is wordt de target in de ionisatiekamer geplaatst en kan de run worden gestart. De MALDI-TOF MS zal nu een spectrum van het monster bepalen en dit vergelijken met de spectra in de aanwezige database om zo tot een identificatie van het te testen micro-organisme te komen. Al met al kost het niet meer dan 10-15 minuten om vanuit een kolonie tot een identificatie te komen. Wanneer er meerdere monsters op een target zijn geladen, zal de tijd per monster relatief worden verkort waardoor je binnen een uur de identificatie van honderd monsters kunt uitvoeren. Indien de analyse op het intacte micro-organisme niet tot een betrouwbare identificatie leidt kan er een eenvoudige extractie worden uitgevoerd. Hoewel dit bewerkelijk is, resulteert

Figuur 3 Kolonie smeren op een target met 96 posities voor gebruik in de Bruker Microflex

dit in een betere lysis en worden ook contaminanten verwijderd, waardoor er dan vaak wel tot een identificatie kan worden gekomen.

Eigen ervaringen

Het microbiologisch laboratorium van het UMC Utrecht behoort tot een van de eerste labs die MALDI-TOF MS routinematig zijn gaan gebruiken voor de identificatie van micro-organismen. Dit gaf in het begin van het traject wat problemen. Allereerst was er weerstand bij de analisten, omdat gedacht werd dat deze methode niet voor alle bacteriën inzetbaar zou zijn. De initieel beperkte database waarin bijvoorbeeld nog nauwelijks spectra voor anaerobe bacteriën zaten sterkte hun in deze gedachtengang. Met de komst van de database updates groeide het aantal organismen in de database gestaag waardoor al snel met behulp van MALDI-TOF MS meer organismen konden worden onderscheiden dan met klassieke technieken. Tweede probleem was hoe je dit systeem moest valideren, het is immers onmogelijk om alle mogelijke micro-organismen te testen. Dit eiste een nieuwe aanpak, gebaseerd op risico-inschatting. Een gevolg van de invoering van MALDI-TOF MS voor de routinematige identificatie van micro-organismen was ook dat we regelmatig nieuwe, voor het lab onbekende, species vonden. Zeker in het begin moesten we daaraan wennen want de vraag die meteen ontstaat is dan of dit correcte identificaties waren, en zo ja, wat de klinische relevantie van deze bevinding was. Als laatste heeft zoals elke techniek ook MALDI-TOF MS zijn beperkingen, en we moesten hiermee leren omgaan. Zo kan MALDI-TOF MS sommige micro-organismen alleen tot op genus-niveau met zekerheid herkennen. Zo kan het zijn dat de MALDI-TOF een *'Bacillus anthracis'* als beste match vindt. Dit gaf zeker in het begin aanleiding tot verwarring/paniek, want *B. anthracis* is een gevreesd pathogeen. Het blijkt echter tot nu toe toch steeds om *Bacillus cereus* te gaan, wat een redelijk onschuldige omgevings bacterie is. Een ander voorbeeld is dat de MALDI-TOF MS een soms *Shigella spp.* uitslaat, terwijl het om een *E. coli* gaat – of omgekeerd, en ook dit was in het begin een beetje wennen.

Toepassingen

Initieel werd MALDI-TOF MS binnen de microbiologische laboratoria primair gebruikt voor identificatie van bacteriën waarbij Gram-negatieve bacteriën meestal wel, Gram-positieve bacteriën iets moeizamer, en gisten en schimmels eigenlijk eerder niet dan wel tot een goed resultaat leidden. Dat was enerzijds te wijten aan een gebrekkige database waarin gisten en schimmels slechts beperkt aanwezig waren. Inmiddels zijn er steeds meer van deze micro-organismen in de databases aanwezig waardoor de identificatie vaker succesvol verloopt. Bovendien zijn er verschillende protocollen ontwikkeld/geoptimaliseerd om schimmels en ook mycobacteriën te identificeren met behulp van MALDI-TOF MS. Deze protocollen zijn nog steeds erg arbeidsintensief en ook is het aantal spectra van deze micro-organismen in de databases nog beperkt. De verwachting is dat de ontwikkeling hier erg snel zal gaan, zodat routinematige ingebruikname ook hiervoor niet meer lang op zich zal laten wachten. Naast het identificeren van bacteriën en schimmels kan MALDI-TOF MS ook voor een aantal andere toepassingen gebruikt worden. Zo vindt er onderzoek plaats naar het bepalen van antibioticaresistentie met behulp van MALDI-TOF MS. De productie van β-lactamase door penicillineresistente micro-organismen kan aangetoond worden doordat deze micro-organismen de centrale β-lactamring van de antibiotica hydroliseren of decarboxyleren. Dit leidt tot een verandering van de moleculaire massa van het antibioticum en dus tot een verschuiving in het spectrum van respectievelijk +18 Da en -26 Da. Om dit te kunnen meten worden de micro-organismen twee uur samen met het betreffende antibioticum geïncubeerd. Daarna wordt het spectrum van deze vloeistof gemeten en gekeken of er een dergelijke verschuiving is opgetreden, en of het bepaalde micro–organisme dus wel of niet β-lactamase positief is (1).
Tot slot wordt er ook onderzoek gedaan naar typering van micro-organismen met behulp van MALDI-TOF MS. Door het vergelijken van de spectra van verschillende isolaten kan vastgesteld worden of ze afkomstig zijn van eenzelfde bron en of er dus mogelijk sprake is van een uitbraak. Voor deze methode is nog geen specifieke software beschikbaar, maar deze is in ontwikkeling.

Eindconclusie

Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) heeft in vijf jaar tijd gezorgd voor een revolutie in de medisch microbiologische routine laboratoria. Het is een snelle, robuuste en kosten-efficiënte methode voor de identificatie van micro-organismen. Een aantal veelbelovende nieuwe applicaties zoals typering en bepaling van antibiotische gevoeligheid (zie hierboven) zijn in ontwikkeling. Niet alleen is MALDI-TOF MS sneller en goedkoper dan de klassieke biochemische en morfologische identificatietechnieken, het is in de meeste gevallen ook betrouwbaarder. Daardoor kan je gerust stellen dat een routine microbiologisch laboratorium inmiddels eigenlijk niet meer zonder MALDI-TOF MS kan.

Literatuur

1 *Todd R. Sanderin and Plamen A. Demirev. Using Mass Spectrometry to Identify and Characterize Bacteria. Microbe – volume 9,number 1;2014*
2 *Anhalt J.P, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. Anal Chem.,47,219-225; 1975*
3 *Catharine Fenselau and Plamen A. Demirev. Characterization of intact microorganisms by MALDI Mass Spectrometry. Mass Spectrometry reviews, 20,157-171;2001*
4 *Elitza S. Theel PhD et. al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacterial and Yeast Isolates. Communiqué; 2013*
5 *Steensels D, Verhaegen J and Lagrou K. Matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory. a review. Acta Clin Belg.,66, 267- 273;2011*

Blik op onderzoek:

Invloed van Point-of-care testen op de beroepspraktijk

Dr. ing. Eric Kamst, Hoofddocent Biologie en Medisch Laboratoriumonderzoek Onderzoekdocent Kenniscentrum Zorginnovatie, Hogeschool Rotterdam

Het gebruik van point-of-care (POC) testen neemt al enkele jaren toe in zowel de eerstelijnszorg als in ziekenhuizen. Vanaf 2010 heeft het RIVM er reeds een drietal onderzoeksrapporten aan gewijd die zich richten zich op het functioneren, de betrouwbaarheid en de kwaliteitszorg van POC-tests (1,2,3). Zie ook het artikel van Gemen et al. 'Point-of-care testen; patiëntveiligheid een punt van zorg?' in Analyse nummer 6, december 2014.

Vanuit de Hogeschool Rotterdam onderzoeken wij sinds kort de impact van POC-testen op de beroepsuitoefening van onze HBO opgeleide professionals in zorginstellingen en laboratoria. We zijn momenteel in de eerste fase, die bestaat uit twintig verkennende interviews met zowel HBO'ers als hun leidinggevenden. De interviews zijn tot nu toe afgenomen door studenten van opleidingen uit het Instituut voor Gezondheidszorg van de Hogeschool Rotterdam en ondergetekende, en dit studiejaar worden studenten en docenten van de opleiding Biologie en Medisch Laboratoriumonderzoek ook hierbij betrokken.

Er zijn inmiddels acht interviews afgenomen. Enkele zaken vallen op: De term POC-test lijkt voornamelijk bekend in de ziekenhuislaboratoria en in huisartspraktijken, maar daarbuiten niet of nauwelijks. Daar zijn 'thuistest', 'zelftest' en 'sneltest' de gebruikelijke aanduidingen. Het gebruik van POC-tests en de verdere ontwikkeling ervan wordt breed gezien als een blijvende trend. De verwachting is dat het aantal vragen dat patiënten en cliënten rechtsreeks stellen aan verpleegkundigen en laboratoriumanalisten over de interpretatie van testuitslagen zal toenemen.
In deze eerste interviews zijn de leidinggevenden en academici echter nog sterk oververtegenwoordigd. Na afronding van deze interviews zal in overleg met een brede vertegenwoordiging van de beroepsgroepen, een enquête worden opgesteld die vervolgens zo breed mogelijk in en rond Rotterdam zal worden uigezet. De resultaten van dat onderzoek zullen met de relevante opleidingsteams bij de Hogeschool Rotterdam worden besproken en zijn leidend bij de keuze van vervolgprojecten om vastgestelde knelpunten te helpen oplossen.

Dit onderzoek past in de strategie van het Kenniscentrum Zorginnovatie en de Hogeschool Rotterdam om onderzoek te doen naar trends en knelpunten in de praktijk van de beroepsgroepen van onze opleidingen. De resultaten van dergelijk onderzoek zijn direct bruikbaar voor het actueel houden van de inhoud van opleidingsprogramma's. Docenten die als onderzoeker meewerken, hebben daarbij een extra mogelijkheid hun kennis van het beroepenveld uit te breiden en hun onderzoeksvaardig-heden te onderhouden.

HOGESCHOOL ROTTERDAM

Kenniscentrum Zorginnovatie

Literatuur

1. *de Vries, C.G.J.C.A. et al (2010), Point-of-care diagnostic devices. An assessment of safety related technical documentation items. RIVM report 360050025/2010: p. 1-69.*
2. *de Vries, C.G.J.C.A. et al (2012), Point-of-care testing in primary care in the Netherlands. Management of patient safety related aspects. RIVM report. 360121001/2012: p. 1-55.*
3. *Roszek, B. et al (2013), Point-of-care testen in de Nederlandse ziekenhuizen. Borging van kwaliteit en veiligheid. RIVM rapport 360125001/2013: p. 1-51*

NVML cursussen

Aanmelding NVML cursussen geopend

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

Cursus	Aanmelding geopend per	Sluitingsdatum inschrijving
Meewerkend leidinggevende (B)	6 januari	1 maart
Stagebegeleiding (B)	6 januari	1 maart
Hemoglobinopathieën	6 januari	1 maart
Malariadiagnostiek	6 januari	1 april
Moleculair biologische technieken	28 januari	15 april

Cum Laude van CCKL naar ISO

In Amsterdam Zuidoost bevindt zich een klein lab met een grote missie. KIT Biomedical Research huisvest een laboratorium waar diagnostiek, surveillance en preventie rondom leptospirosen in Nederland en vér daar buiten samenkomen. Dit laboratorium is met zes mensen relatief klein, maar heeft net als de meeste andere Nederlandse laboratoria een kwaliteitsmanagementsysteem.

Sinds 2006 is dit 'leptolab' geaccrediteerd volgens de CCKL praktijkrichtlijn. Kwaliteitsfunctionaris Mirjam Engelberts: "Als één van de eerste labs in Nederland is de koers naar de internationale ISO norm ingezet en niet zonder succes: afgelopen september is ons kwaliteitssysteem beoordeeld door het auditteam van de Raad voor Accreditatie, waarbij geen enkele afwijking is geconstateerd. We zijn zonder enig voorbehoud geaccrediteerd conform de ISO15189:2012 norm."

Leptospirosediagnostiek-hard werken

Dr. Rudy Hartskeerl, onderzoekscoördinator leptospirose: "KIT Biomedical Research is internationaal (WHO/FAO/OIE) en nationaal (RIVM) referentielaboratorium voor leptospirosen (beter bekend als de ziekte van Weil) en verwerkt als nationaal diagnostisch centrum voor klanten in Nederland monsters van patiënten verdacht van een leptospirose infectie. Daarnaast assisteren we laboratoria over de hele wereld bij hun leptospirosediagnostiek. Om dit onderzoek goed te doen, onderhouden we meer dan 300 stammen. Omdat het maken ervan heel kritisch is, produceren we ons eigen medium, de reagentia en antistoffen. De testen zijn bewerkelijk, het analytische proces is arbeidsintensief handwerk en niet te automatiseren. Daar waar klinisch-chemische en serologisch laboratoria al gauw honderden tot duizenden monsters per dag verwerken, is het op het leptospirose laboratorium met tien monsters al druk."

Kwaliteit voorop

Kwaliteit is voor KIT Biomedical Research belangrijk. Accreditatie is voor het verrichten van diagnostiek niet verplicht, maar onze partners en klanten vragen wel om kwaliteitsborging. Voor het verrichten van onze (inter-)nationale referentietaken is het hebben van een geaccrediteerd kwaliteitsmanagementsysteem wel een verplichting. Vandaar dat we ruim voordat de ISO15189:2012 voor Nederlandse laboratoria verplicht wordt het traject zijn ingegaan. Ook in veel andere landen willen laboratoria geaccrediteerd worden volgens deze ISO norm. Naast ons referentiewerk mentoren we laboratoria bij de implementatie van hun kwaliteitsmanagementsysteem en daarbij komt onze eigen ervaring goed van pas.

Leerproces

Mirjam Engelberts: "De overgang van CCKL naar ISO15189:2012 is pittig, zeker voor een klein laboratorium als het onze, omdat het dagelijkse werk ondertussen gewoon doorging. We hebben gekozen voor het hanteren van de CCKL indeling van ons handboek. Dat betekende wel een zeer uitgebreide kruisverwijzingstabel. Andere uitdagingen betroffen vooral het explicieter beschrijven van bijvoorbeeld het oplossen van klachten en afwijkingen, het confirmeren van de interne audits aan de ISO norm, het uitbreiden van de beleidscyclus waar de kwaliteitsjaarplannen en managementreviews onderdeel van vormen. Omdat we onze processen al hadden gevalideerd en omdat risicoanalyse en preventieve maatregelen daar al onderdeel van zijn, hoefden we daar geen extra aandacht aan te besteden. We hebben tijdens de transitie gelijk van de gelegenheid gebruik gemaakt om ons hele systeem eens onder de loep te nemen. Het was daarom voor zowel ons als voor de auditcommissie leuk om 'cum laude te slagen'.

Meerwaarde

Engelberts: "Naast het keurmerk van onze diagnostische dienstverlening heeft onze ervaring ook waardevolle informatie opgeleverd voor de online GLI en LQSI tools waarmee we samen met de WHO andere laboratoria, in Nederland en in de rest van de wereld, inclusief ontwikkelingslanden, helpen met het versterken van hun kwaliteitsmanagementsystemen (zie ook het artikel 'Implementatie ISO 15189 stuk eenvoudiger dankzij gratis online tool van WHO in Analyse nr 3, juni 2014). We hopen met deze nieuwe kennis over de overgang van CCKL naar ISO ook andere laboratoria te kunnen helpen met de implementatie van een ISO kwaliteitssysteem. Hartskeerl: "Want uiteindelijk delen alle medische laboratoria één doel: de patiënt dienen met goede diagnostiek."

Meer informatie over KIT en het ISO kwaliteitssysteem: www.kit.nl/quickscan

Meer informatie over de (gratis!) LSQ1 tool: http://www.kit.nl/biomedical-research/project/laboratory-quality-stepwise-implementation-tool/

Kijkje in de keuken van een IVF laboratorium

De NVML heeft namens de LFN (Landelijke Fertiliteit Nederland) begin 2014 een enquête gehouden onder LFN leden of er belangstelling is om op een IVF laboratorium te kijken. Daarvoor bleek voldoende interesse. Sandra Versluis, IVF analist bij Kinderwens Leiderdorp en tevens voorzitter van de LFN, en Leonie van den Hoven, Senior IVF analist bij RadboudUMC te Nijmegen, waren bereid om zo'n 'kijkdag' te organiseren.

Op 12 en 26 November 2014 werd het 'kijkje in de keuken' van een IVF laboratorium gepland. De inschrijving verliep via de NVML. Het aantal mensen wat zich daadwerkelijk inschreef viel een beetje tegen. Het blijft lastig om dit te regelen op een werkdag en zeker als de analist dit bezoek in eigen tijd moet doen. Sandra en Leonie hebben besloten om de mensen die zich hadden ingeschreven de kans te geven om het laboratorium te bezoeken. Ze wilde de mensen die enthousiast waren zeker dat kijkje in de keuken van het IVF laboratorium gunnen.

Het werd een leuke middag. De mensen werden ontvangen met een kopje koffie of thee. Na even kennis gemaakt te hebben, was er een presentatie voorbereid over het werk op een IVF laboratorium en de specialisatie van de kliniek die bezocht werd. Bij het RadboudUMC is dat PESA/TESE en bij kinderwens Leiderdorp de gametenbank en embryodonatie. Daarna mochten de mensen een kijkje nemen op het laboratorium. Alle werkzaamheden werden toegelicht. Vervolgens mochten de analisten alles vragen en werd er uitgebreid de tijd genomen om alle vragen te beantwoorden.

De reacties van de analisten waren zeer positief. Ze hadden het idee dat ze alles hebben kunnen zien en vragen. Ook was er genoeg tijd om beroepsmatige informatie uit te wisselen zodat iedereen met een voldaan gevoel naar huis ging. Sandra en Leonie vonden het ook erg leuk om het kijkje in de keuken te regelen. Wie weet volgt er nog eens een kijkje in de keuken, als blijkt dat meer analisten deze kans willen benutten.

Leonie van den Hoven

Cao Nieuws

Cao UMC
Cao-voorstellen van de AbvaKabo

Een aantal NVML- leden hebben hun mening gegeven over de cao-voorstellen van de AbvaKabo, waarvoor dank. Inmiddels is het pakket van wensen aangenomen in de Landelijke Advies Commissie van de AbvaKabo (vanaf 1 januari: FNV Zorg) en zullen binnenkort de eerste onderhandelingen plaatsvinden.

Ook dit pakket aan wensen komt integraal op de NVML-website op de nieuwspagina.

Enkele voorstellen zijn:
- Een loonsverhoging van 3% voor 2015
- Een bijdrage van € 10,- per werknemer per maand voor de premie ziektekosten
- Minder flexbanen en meer werkzekerheid, het opzetten van een interne flexpool van vaste medewerkers
- Bij reorganisaties een regeling waarbij medewerkers tijdelijk de mogelijkheid krijgen om 80% te gaan werken tegen 90% van het loon en 100% pensioenopbouw.

Vol goede voornemens het nieuwe jaar in!

Een mooie periode ligt weer achter ons. Een periode van samen zijn, gezelligheid in huis en lichtjes in een donker jaargetijde. Met kerst heb ik mij weer helemaal kunnen uitleven. Ik kook graag en heb samen met vrienden het kerstdiner bereid. Eerst recepten (sop's) uitzoeken, daarna oefenen, koken en genieten.

De feestdagen zijn nu voorbij en we gaan vol goede voornemens het nieuwe jaar in. Eigenlijk zou Rene Gleijm dit artikel schrijven, maar Rene heeft ons koude kikkerland verruild voor een warmer oord. Vandaar dat ik nu achter mijn laptop zit.

Rene Gleijm heeft onlangs afscheid genomen en is inmiddels geëmigreerd naar Spanje. René is vele jaren actief geweest binnen de NVML. Zo was hij een van de initiatiefnemers van de WHAKC, zat hij in de redactiecommissie en was lid van de commissie Sociale Belangen. Daarnaast heeft Rene de laatste jaren ook meegeholpen bij het organiseren van de leidinggevendendag van de NVKC. Wij zijn Rene dan ook heel erkentelijk voor zijn bijdrage aan de vereniging.

Een van de onderwerpen waarvoor Rene en ik ons hard hebben gemaakt is de toetreding en positie van pre-analyse medewerkers binnen de medische laboratoria en dus ook bij de NVML. Zo wordt bloedafname en een deel van de pre-analyse in klinisch-chemische laboratoria veelal uitgevoerd door (gewezen) analisten en doktersassistenten of verpleegkundigen. Ook de medische microbiologische- en pathologische laboratoria kennen pre-analyse medewerkers. Binnen dit deel van het vakgebied vindt op dit moment een professionalisering plaats. Het belang van een juiste monstername, de logistiek en de opslag van de monsters tot analyse wordt steeds meer op waarde geschat. Vanuit kwaliteitsoogpunt wordt er steeds meer nadruk op scholing, met name scholing van voorbehouden en risicovolle handelingen, gelegd. In de loop van dit jaar leest u daar meer over.

Tot zover mijn eerste goede voornemen. Een ander voornemen is dat de NVML blijft waken over de kwaliteit van de basisopleidingen tot (bio)medisch laboratoriummedewerker. Wij doen dit door vertegenwoordigd te zijn in vele commissies en werkgroepen. Als laatste is hier de Opleidingscommissie 'Klinisch chemisch analist' van het College Zorg Opleidingen (CZO) bijgekomen. Deze commissie adviseert over de erkenning en bewaakt de kwaliteit van de in-service opleiding tot klinisch-chemisch analist, zoals die bijvoorbeeld wordt verzorgd door de VUmc Amstel Academie.

Naast het waken over de basisopleiding biedt de NVML zelf nascholing aan voor gediplomeerde laboratoriummedewerkers. Deze nascholing is opgenomen in het register van het CRKBO. De driejaarlijkse audit heeft de NVML net weer met goed gevolg doorlopen. Raadpleegt u regelmatig onze website voor de informatie over onze nascholingsmiddagen, congressen, symposia, cursussen en e-learning. Heeft u zich al opgegeven voor de Vakbeurs Techniek & Diagnostiek?

Op het moment dat ik dit schrijf, heb ik juist bedacht welke gerechten ik wil gaan maken voor onze eerste bestuursbijeenkomst van dit nieuwe jaar: Quiche Lorraine en Tiramisu. Ben benieuwd wat de anderen meenemen en hoe mijn gerechtjes worden gewaardeerd.

Jan van der Kolk

Vakblad **Analyse**
voor biomedisch laboratoriummedewerkers

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. I. Linde, Infectieziekten, GGD, Amsterdam
dhr. R. Lindenbergh, Algemeen Medisch Laboratorium (AML), Antwerpen
mw. dr. W.W.J. van de Sande, Medische Microbiologie en Infectieziekten, Erasmus MC, Rotterdam

Vormgeving en opmaak
Celina Koekenbier | www.insight-design.nl

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 2: 13 maart 2015

Inleverdata kopij
De redactie ziet korte berichten (bijvoorbeeld over opleidingen) voor Analyse 2 graag uiterlijk 3 maart 2015 tegemoet. Analyse 2 verschijnt op dinsdag 24 maart en Analyse 3 op dinsdag 26 mei.

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

Verslag WHAMM-bijeenkomst

De Werkgroep HoofdAnalisten Medische Microbiologie (WHAMM) komt één á twee keer per jaar bij elkaar. Het doel van deze bijeenkomsten is vakinhoudelijke nascholing, discussiëren over onderwerpen die spelen in het vak en natuurlijk netwerken. Meestal komen we bij elkaar in Amersfoort als zeer centrale locatie. Maar dit keer werd de WHAMM bijeenkomst van 6 november 2014 in museum Boerhaave in Leiden georganiseerd. Er waren circa 30 aanwezigen en de dag werd mede mogelijk gemaakt door de firma Minigrip.

De volgende onderwerpen passeerden de revue (de handouts zijn beschikbaar gesteld voor de WHAMM-leden):

Gebruik van MALDI-TOFin de Medische Microbiologie

Hans Kusters, medisch moleculair microbioloog, Utrecht

In deze presentatie werd een korte uiteenzetting gegeven van het principe en workflow van de MALDI-TOF. Verder werd een samenvatting gegeven van de vergelijking tussen twee, in de routine microbiologie toepasbare systemen, Biomerieux en Bruker. Er blijken met name verschillen te zitten in open/gesloten systeem, de grootte van de database en de mogelijkheid om met Middleware te werken en de wijze waarop het resultaat gerapporteerd wordt. De beste keus is afhankelijk van setting en toepassing: Een groot aantal monsters per dag die redelijk standaard zijn, kunnen prima met de Biomerieuxmachine worden uitgevoerd. Maar als er meer variatie nodig is, past de Bruker waarschijnlijk beter bij het lab. Wat er nodig is voor introductie van deze methode wordt ook nog kort aangestipt, evenals de andere toepassingen van de methode:

- Functionele beta-lactamasetest (door bekijken of er een verschuiving is in het antibioticamolecuul)
- Gevoeligheidsbepaling door voorbehandeling met antibioticasuspensie
- Typering

Antwoorden op gestelde vragen tijdens de presentatie:

- Wat te doen bij uitval-apparaat? Vraag een bevriend lab als back-up te dienen. Zij kunnen de uitslagen in een Excel file versturen per e-mail. Of een tweede apparaat aanschaffen.
- Hoe is de ICT-ondersteuning? Er zijn kant en klare oplossingen beschikbaar die redelijk voldoen. De koppeling is vrij makkelijk, maar de stammenlijst moet wel in het LIMS-systeem staan om het resultaat ook daar naartoe te kunnen sturen.

Risico's en interventies bij zoönoses

Peter Schneeberger, arts-microbioloog, Den Bosch

Zoönoses zijn, gezien de recente gevallen van vogelgriep, een zeer actueel onderwerp. Dr. Schneeberger heeft in 1985-1988 als tropenarts in Kenia gewerkt. De besmettelijkheid en ziekmakend vermogen van een virus kan veranderen door mutatie. Een mooi voorbeeld hiervan is de griep die telkens een beetje verandert. Sommige clones zijn beter in staat om te overleven dan andere. De Spaanse griep (H1N1) uit 1918 en de H5N1 uit 1997 zijn voorbeelden van grote uitbraken met veel sterfgevallen door mutatie van een al bestaand virus. Andere uitbraken die tijdens deze presentatie zijn behandeld:

- H7N7 (vogelpest)
- Q-koorts (epidemie uit 2007). Deze epidemie had voorzien kunnen worden. In de aanloop van deze

epidemie was er namelijk al een toenemend aantal spontane abortussen onder geiten op de boerderijen waarneembaar.
- Ebola, dat ontstaan is uit vleermuizen. Factor R is het gemiddelde aantal personen dat een zieke persoon besmet. Bij R=1 blijft de epidemie in stand, bij R<1 stopt de epidemie. Bij de huidige epidemie is factor R tussen 1 en 2. Dit is niet hoog, waardoor relatief weinig maatregelen nodig zijn om deze epidemie in te perken.

Conclusie: Interventies zijn zelden adequaat: het overkomt ons en achteraf concluderen we dat we beter hadden moeten samenwerken.

De rol van de hoofdanalist in de transitie van CCKL naar ISO 15189

Patrick Corstiaans, algemeen directeur Kerteza.

Internationale erkenning van de Nederlands accreditaties was er niet. Dat is de aanleiding geweest voor het opstellen van de ISO15189 norm. Kerteza ondersteunt ziekenhuislaboratoria bij het behalen van accreditaties en bij de optimalisatie van processen. Wat niet verandert is de houding ten opzichte van het kwaliteitssysteem en ten opzichte van de kwaliteitsfunctionaris (KF). De KF heeft sturing nodig bij het opzetten van het kwaliteitssysteem om te zorgen dat het een werkbaar systeem is, zonder in onnodige details te verzanden. Afbakening is hierin essentieel. Hierin is een belangrijke rol weggelegd voor de hoofdanalist. Belangrijke kenmerken van de norm: eigen verantwoordelijkheid nemen en betrokken zijn. Het managementreview is bijvoorbeeld geen stuk van de kwaliteitsfunctionaris dat wordt opgesteld en besproken en daarna in de kast verdwijnt. Essentieel aan de ISO-norm is dat deze goed wordt gelezen. In het algemeen biedt deze norm meer ruimte, maar dus ook meer verantwoordelijkheid. Betrokkenheid van de hoofdanalist bij dergelijke beslissingen is vereist. Tevens staat er expliciet in de norm vermeld dat bevindingen uit audits door de lijnverantwoordelijke moeten worden opgepakt.

Nieuwe mogelijkheden voor serotype specifieke diagnostiek van pneumokokkeninfecties

Prof. Dr. Ir. Rijkers, Middelburg

William Osler, 1892: "Pneumonie bij kinderen en volwassenen loopt meestal goed af, maar voor oudere mensen is het de "natural friend of the old man". Het meest voorkomende ziektebeeld veroorzaakt door Pneumokokken is otitis media (90%). De meeste doden door een pneumokokkeninfectie worden veroorzaakt door pneumonie. Het komt met name voor onder jonge kinderen (jonger dan twee jaar) en oudere mensen (ouder dan zestig jaar). Er zijn 92 serotypes. Baby's worden geboren met een volledig ontwikkeld immuunsysteem met uitzondering voor het polysaccharidekapsel van gekapselde bacteriën. Daarom is een vaccin van een polysaccharide op jonge leeftijd dus niet effectief. Door het polysaccharide te koppelen aan een eiwitdrager bereik je wel een immuunrespons. Deze kennis is lang op de plank blijven liggen, omdat de noodzaak niet werd gezien vanwege het gebruik van antibiotica tegen bacteriële infecties. Zestig jaar later is deze bevinding herontdekt. Het eerste vaccin op de markt bevatte de zeven meest voorkomende serotypes die otitis media veroorzaken. In 2000 is Prevnar geïntroduceerd. Dit middel is heel effectief, met uitzondering van serotype 19A. In het nieuwste vaccin PCV13 is die functionaliteit tegen 19A er wel. Met behulp van conventionele (bloedkweek, urine-antigeen en sputumkweek) methoden wordt CAP (Community Acquired Pneumonia) in 27% van de gevallen aantoonbaar veroorzaakt door S. peumoniae. Als de serologische antistof-respons hierbij betrokken wordt is dat 54%.

Al met al een leerzame dag, die gezellig werd afgesloten met een (netwerk) borrel. Voor een volledige uitwerking van de aantekeningen kunt u een e-mail sturen naar n.a.binnekamp@westfriesgasthuis.nl.

Nadia de Weerdt-Binnekamp, unithoofd, Hoorn

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 Klinieken 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 Speciële Klinische Chemie en Hematologie, UMC Utrecht
dhr. A.J. van der Kolk, operationeel manager KCI Deventer ziekenhuis
dhr. B. klein Brink, Manager Histopathologie, Symbiant

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 Fertiliteit

Jaarlijks in het najaar een Fertiliteits(mid)dag? Als het aan de werkgroep Fertiliteit ligt wel. Een middag waar we niet alleen informatie ontvangen over ons vakgebied maar ook gelegenheid krijgen om vragen te stellen, ideeën uit te wisselen, stands te bezoeken of gewoon om elkaar weer eens te ontmoeten.

Deze derde fertiliteitsmiddag had een andere opzet; waar de vorige bijeenkomsten nog toegankelijk waren voor iedereen, had dit symposium een besloten karakter. 'Niet leden' konden weliswaar deelnemen, maar voor een volgende deelname dienen ze zich aan te melden als lid. Toch mocht Sandra Versluis, onze dagvoorzitter, na de lunch 75 deelnemers verwelkomen in congrescentrum de Eenhoorn te Amersfoort. Sandra is naast penningmeester van de NVML en voorzitter LFN werkzaam als IVF analist bij Medisch Centrum Kinderwens.

Vasectomie en Hersteloperatie

De eerste spreker van deze middag is Dr. Herman van Rooijen. Hij is als Uroloog werkzaam in het St. Elisabeth ziekenhuis in Tilburg. Hij vertelt ons over deze uiteindelijk betrouwbare, maar in principe onomkeerbare anticonceptie procedure. Vasectomie kent daarnaast ook een lange geschiedenis als onder andere behandeling voor prostaatvergroting of benigne prostatische hyperplasi (BPH), ter preventie van epididymitis na prostaatoperatie, revitalisatie, ter behandeling van overmatige masturbatie bij gevangenen en in de Eugenetica.

Dachten we in het verleden dat er een volledige Azoöspermie bereikt moest worden: Nu weten we dat een percentage van 4% van de geopereerde mannen langdurig spermatozoa in het ejaculaat zal blijven houden. Wanneer ze niet bewegen zijn deze persisterende zaadcellen –afkomstig uit de zaadblaasjes- geen teken van mislukking: Ze kunnen geen zwangerschap veroorzaken. Wanneer een semenmonster na vasectomie minder dan honderdduizend niet beweeglijke spermatozoa /ml bevat wordt deze beschouwd als niet fertiel. Hoe de telling plaats zou moeten vinden wordt hierbij ook uitgelegd. De ontwikkeling van de mannelijke anticonceptiepil oftewel de zogenaamd 'Mannenpil' is vooralsnog niet afgerond. Hier wordt nog steeds onderzoek naar verricht maar deze mannenpil is vooralsnog nog geen ideaal middel. Na sterilisatie blijkt 10% van de mannen spijt te hebben van deze ingreep. Een klein aantal van hen laat deze sterilisatie ongedaan maken. Er blijkt een grotere kans op spijt te bestaan wanneer men op jonge leeftijd dit besluit neemt en ook wanneer men alleen of gescheiden is bij sterilisatie. Het lijkt dat men tegenwoordig meer spijt heeft dan vroeger.

Vaso-vasostomie

Door het onderbreken van de zaadleiders bij de man (vasectomie), komen er geen zaadcellen meer in het sperma. Wanneer een gesteriliseerde man weer vruchtbaar wil worden, kan de ingreep ongedaan worden gemaakt door de uiteinden van de zaadleiders opnieuw met elkaar te verbinden. Het lukken van de hersteloperatie (vaso-vasostomie) is echter geen garantie dat de man vruchtbaar wordt. De hersteloperatie kan in de vorm van Vasovasotomie of vasoepididymostomie De kans dat een dergelijke operatie een kans van slagen heeft is vooral afhankelijk van de tijd tussen de sterilisatie en de hersteloperatie, de gebruikte techniek en de ervaring van de chirurg.

Controle na vasectomie: Laboratoriumprotocol

Uitleg over de wijze van controle na vasectomie vindt plaats door Drs. Cees Beijer, klinisch chemicus ATAL – Medial Hoofddorp. Hij bespreekt de richtlijnen van de Nederlandse Vereniging voor Urologie (NVU 2005) en de European Association of Urology (EAU 2012) met betrekking tot de vasectomie en de consequenties hiervan voor het laboratorium. In deze richtlijnen wordt als bovengrens honderdduizend niet beweeglijke spermatozoa per ml bij de eerste analyse aangegeven. Het verdient aanbeveling de eerste sperma analyse drie maanden na de ingreep te laten uitvoeren in een daartoe gecertificeerd laboratorium volgens de richtlijnen van de WHO en de adviezen van de NVKC. Er is sprake van steriliteit wanneer onder deze omstandigheden het ejaculaat geen spermatozoa of < 100.000 niet motiele spermatozoa per ml bevat. Is dit wel het geval dan is herhaling van het onderzoek noodzakelijk met tussenpozen van zes weken tot azoöspermie of < 100.000 niet motiele spermatozoa per ml. Wanneer na zeven maanden beweeglijke spermatozoa gevonden worden of meer dan 100.000 niet beweeglijke spermatozoa kan re-vasectomie overwogen worden.

Discussiepunten zijn het aantal malen dat een spermamonster ingeleverd moet worden. Is dit bij een monster met azoöspermie voldoende, of moet het bij azoöspermie minimaal tweemaal of zelfs driemaal worden aangetoond? Ook wordt door een derde groep artsen als criterium voor steriliteit geen of enkele niet beweeglijke spermatozoa geaccepteerd. De onzekerheid over de betrouwbaarheid met betrekking tot de uitslag azoöspermie blijft. Aandachtspunten in de deze richtlijn vormen het gebruik van een telkamer met voldoende volume en de mate van viscositeit van het semenmonster.

IUI richtlijn / plekcheck, wordt de patiënt daar beter van?

Dr. Max Curfs, klinisch embryoloog is werkzaam in het mooiste ziekenhuis van Nederland dat volgens hem in Zwolle staat en Isala heet. Deze derde spreker weet ons op beeldende wijze te boeien met voorbeelden, anekdotes over begrippen als veiligheid waar 'de patiënt' eigenlijk al automatisch vanuit gaat. Dr. Curfs leidt ons op een actieve wijze met 'zitten en staan' door zijn presentatie. Hij weet ons – met name waar het om klant bejegening en privacy gaat - een spiegel voor te houden. Wat mag je als patiënt van ons verwachten en waar gaat de patiënt automatisch vanuit.

Wet en regelgeving speelt ook bij de laboratoriumfase intra uteriene inseminatie een rol. De gescheiden werkplekken, standpunt luchtkwaliteit, de zogenaamde dubbelcheck om verwisseling te voorkomen, maar ook de wet op medische hulpmiddelen met het CE keurmerk. Laboratoria dienen per bewerking te beargumenteren en documenteren welke omgevingscondities gekozen zijn om het vereiste kwaliteits- en veiligheidsniveau ter bereiken voor het materiaal en voor de toepassing op de mens.

Hot Topics ESHRE 2014

Leonie van den Hoven, senior IVF analist in het Radboud UMC Nijmegen laat ons de 'Hot Topics' van de ESHRE 2014 in München zien. Naast lid van het ESHRE paramedisch bestuur is ze tevens bestuurslid LFN. Het bestuur van de ESHRE bestaat uit vier verpleegkundigen, vier analisten en één psycholoog. Zij organiseert een symposium voorafgaand aan het congres. Er worden sprekers uitgenodigd voor het ESHRE hoofdprogramma voor verpleegkundigen en analisten. Daarnaast screent ze artikelen ingezonden door analisten en verpleegkundigen. Ze nodigt sprekers uit voor het debat over een actueel onderwerp voor verpleegkundigen of analisten. Samen met Special Interest Groups (SIG's) wordt een symposium georganiseerd. De basis fertiliteitscursus voor paramedici is ook een initiatief van ESHRE.
Het hoofonderwerp in München is de throfactoderm biopsie. Hierbij worden enkele cellen van het trofectoderm weg gehaald om DNA onderzoek te doen. Op deze wijze wil men het beste embryo selecteren om bepaalde erfelijke eigenschappen uit te sluiten. Er worden praktijk sessies gehouden voor het nemen van deze biopsie. Dat het een schot in de roos is, blijkt uit de grote belangstelling en enthousiasme van de deelnemers. Van de opstelling met vijf microscopen met een instructeur is veelvuldig gebruik gemaakt. In haar enthousiaste presentatie vertelt ze over de resultaten van het onderzoek naar de klinische betekenis van calcium-transporten in spermatozoa. Ook wordt het doel van de embryoselectie om een zo groot mogelijke kans op een levend geboren baby na IVF te bereiken benoemd.

Op deze ESHRE bijeenkomst wordt de discussie gevoerd over het begrip Time-lapse incubatie. Is dit kostbare systeem echt anders, voegt het iets toe en wordt er beter gescoord bij de morfologie? Verschillende onderzoeken worden vergeleken. Voor de toekomst wil men streven naar cryopreservatie van embryo's met terugplaatsing in een natuurlijke cyclus. Dit in tegenstelling tot terugplaatsing van verse embryo's. De vraag daarbij is of het aantal zwangerschappen omhoog gaat en of er minder tijd nodig is om een zwangerschap te bereiken. Deze presentaties zijn na te lezen op www.ESHRE.eu. bij 'webcasts' .

Na deze laatste spreekster is er tijd voor een hapje en een drankje en napraten en netwerken. Een goede afsluiting van een interessante dag mede dankzij inspirerende sprekers. Deze dag verdient een vervolg in 2015.De LFN laat zich echter eerst nog zien op de tweejaarlijkse NVML-Vakbeurs Techniek & Diagnostiek op 26 maart 2015. Deze vijfde vakbeurs vindt plaats in de locatie 'Hart van Holland' te Nijkerk.

Benda Tomassen-Rewinkel
Fertiliteitsanalist ziekenhuis Rijnstate

Nieuwe wapens in strijd tegen resistente bacteriën

De Praktijkgids Antimicrobial Stewardship helpt Antibiotica-teams in de Nederlandse ziekenhuizen om de toenemende resistentie van bacteriën tegen te gaan. De Praktijkgids is donderdag 18 december 2014 gepresenteerd op het Nationaal Congres Antibiotic Stewardship over anti-bioticabeleid.

De toenemende resistentie van bacteriën voor de antibiotica die momenteel beschikbaar zijn, wordt wereldwijd gezien als een belangrijke bedreiging voor de volksgezondheid. Ook in Nederland was die toename de afgelopen tien jaar overduidelijk. 'Antimicrobial Stewardship' is een internationaal erkende methode om het resistent worden van bacteriën te beteugelen.

Via de Stichting Werkgroep Antibiotica Beleid (SWAB) hebben de medische beroepsorganisaties in 2012 een plan van aanpak gepresenteerd waarin deze methode centraal staat. Het plan is omarmd door de Inspectie voor de Gezondheidszorg en de minister van VWS. Doel is ervoor te zorgen dat elk Nederlands ziekenhuis eind 2015 beschikt over een goed functionerend Antimicrobial Stewardship-programma en een Antibioticateam (A-team). Met het succesvol uitvoeren van Antimicrobial Stewardship en het beperken van de resistentieontwikkeling kunnen op termijn waarschijnlijk kosten worden bespaard. Op donderdag 18 december is de 'Praktijkgids Antimicrobial Stewardship in Nederland' gepresenteerd op het tweede Nationale Congres Antibiotic Stewardship in congrescentrum de Werelt, Lunteren. De gids is een initiatief van een projectgroep van medisch specialisten, gesteund door de Stichting Werkgroep Antibiotica Beleid, en ontwikkeld door vertegenwoordigers van de meest betrokken beroepsgroepen: internisten, artsen-microbiologen, ziekenhuisapothekers, kinderartsen en intensivisten.

De Praktijkgids Stewardship is bedoeld als hulpmiddel voor A-teams-in-oprichting bij het opzetten van een programma in hun ziekenhuis. Het is een handleiding met suggesties om de verschillende elementen van een stewardship-programma vorm te geven, rekening houdend met de lokale situatie. De gids is geen éénmalig of statisch product, maar wordt geregeld bijgewerkt. Een up-to-date versie zal steeds te vinden zijn op www.Ateams.nl.

Met het beschikbaar komen van deze Praktijkgids is een belangrijke stap gezet op weg naar de invoering van Antimicrobial Stewardship in de Nederlandse ziekenhuizen.

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: **Statistiek voor laboratoriummedewerkers (basis)**
Start: **10 maart 2015 (6x dinsdag 18.00-21.00 uur)**
Kosten: **€ 776,00**
Locatie: **Nijmegen**

Titel: **GMP voor Bloedbanken**
Start: **18 maart 2015 (6 dagen 9.30-16.30 uur)**
Kosten: **€ 2.112,00**
Locatie: **Nijmegen**

Titel: **Celkweek**
Datum: **23 april 2015**
Kosten: **€ 537,00**
Locatie: **Nijmegen**

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: **Masterclass kwaliteitsanalyse van real-time PCR amplificatiecurven**
Data: **12 en 13 februari 2015**
Inschrijven: **vóór 5 februari 2015**
Cursusprijs: **€ 740,-**

Titel: **Klinische chemie**
Data: **10 februari, 3, 10, 17, 24, 31 maart, 7 en 14 april 2015**
Inschrijven: **vóór 26 januari 2015**
Cursusprijs: **€ 1.400,-**

Titel: **GMP Basis**
Data: **2 en 3 maart 2015**
Inschrijven: **vóór 19 januari 2015**
Cursusprijs: **€ 525,- (geen kortingsregeling mogelijk)**

Titel: **Workshop Genome Browsing**
Data: **5 en 6 maart 2015**
Inschrijven: **vóór 23 januari 2015**
Cursusprijs: **€ 740,-**

Titel: **Variant effect prediction (VEP)**
Data: **9 maart 2015**
Inschrijven **vóór 26 januari 2015**
Cursusprijs: **€ 480,-**

Titel: **Immunologie voor microbiologisch analisten**
Data: **12 maart 2015**
Inschrijven: **vóór 29 januari 2015**
Cursusprijs: **€ 430,-**

Titel: **De PCR van A tot Z**
Data: **27 maart, 10, 17 en 24 april 2015**
Inschrijven: **vóór 13 februari 2015**
Cursusprijs: **€ 2.190,-**

Titel: **Cursus bloedgasanalyse: achtergronden en interpretatie van uitslagen**
Data: **7 april 2015**
Inschrijven: **vóór 24 februari 2015**
Cursusprijs: **€ 390,-**

Titel: **In situ hybridisatie**
Data: **7 en 14 april 2015**
Inschrijven: **vóór 17 februari 2015**
Cursusprijs: **€ 720,-**

Titel: **Workshop High Resolution Melting (HRM) analyse**
Data: **19 maart 2015**
Inschrijven: **vóór 5 februari 2015**
Cursusprijs: **€ 520,-**

Titel: **Symposium en workshop Medische Mycologie: Mycolutie**
Data: **27 maart 2015**
Inschrijven: **vóór 1 maart 2015**
Cursusprijs: **€ 300,- (alléén symposium € 95,-)**

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: http://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: **Principles, parameters and applications of PCR**
Datum: **7 april 2014**
Omvang: **1 dag**
Locatie: **Avans Hogeschool Breda**
Kosten: **€ 400,-**

Titel: **Real time PCR in molecular diagnostics**
Datum: **8-10 april 2015**
Omvang: **3 dagen**
Locatie: **Avans Hogeschool Breda**
Kosten: **€ 900,-**

Titel: **Introduction to Next Generation Sequencing; technologies and data analysis**
Datum: **14-17 april 2015**
Omvang: **4 dagen**
Locatie: **Avans Hogeschool Breda**
Kosten: **€ 1100,-**

Voor meer informatie over deze cursus verwijs 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

Februari	5	Nascholing **Pernicieuze anemie**	Utrecht (Leidserijn)
	12	Nascholing **Pernicieuze anemie**	Delft
	12	Start NVML-cursus **Meewerkend Leidinggevende (A)**	Utrecht
Maart	3	NVML-cursus **Incidentanalyse**	Utrecht
	5	NVML-cursus **SAFER**	Utrecht
	26	NVML Vakbeurs, **Techniek & Diagnostiek**	Nijkerk
April	2	NVML-cursus **Flowcytometrie van lymfoproliferatieve aandoeningen**	Utrecht
	8	Start NVML-cursus **Meewerkend Leidinggevende (B)**	Utrecht
	21	Start NVML-cursus **Stagebegeleiding (B)**	Utrecht
	23	NVML-cursus **Hemoglobinopathieën**	Utrecht
Mei	21	Start NVML-cursus **Malaria diagnostiek**	Rotterdam
	21	**ALV**	nog onbekend
Juni	2	Start NVML-cursus **Moleculair Biologische Technieken**	Utrecht
Oktober	15	NVML-congres **Allergie**	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

Hogeschool Utrecht

Institute for Life Sciences & Chemistry

Cursussen met een effeciënt studieprogramma en erkend certificaat

Cursus: **Moleculaire Biologie (theorie)**
Startdatum: **1 september 2014**
Omvang: **12 wekelijkse bijeenkomsten van 14.30 tot 17.30 uur**
Kosten: **€ 1.250,-**
UEC-punten: **38**

Cursus: **Klinische chemie**
Startdatum: **17 september 2014**
Omvang: **12 bijeenkomsten van 18.00 tot 21.40 uur**
Kosten: **€ 1.525,- inclusief practicumkosten**
UEC-punten: **51**

Cursus: **Antibiotica en resistentie**
Startdatum: **16 oktober 2014**
Omvang: **3 bijeenkomsten van 9.30 tot 17.00 uur**
Kosten: **€ 1.150,- inclusief practicumkosten**
UEC-punten: **27**

Kijk op onze website www.cvnt.nl voor het volledige cursusaanbod of kies voor keuzemodules uit het bacheloronderwijs. U kunt denken aan cursussen als Moleculaire biologie, Immunologie, Humane Fysiologie, Virologie en Microbiologie. Een groot aantal van de cursussen start in de week van 2 februari. Prijs is 140 euro per EC. De meeste modules bestaan uit 2,5 of 5 EC.

Wilt u de opleidingsbehoefte binnen uw organisatie in huis en op maat invullen, dan kunt u contact opnemen met de studieadviseur Life Sciences via 088-481 8888 of info@cvnt.nl.

Zet in uw agenda:
Algemene Ledenvergadering
21 mei 2015
Uitnodiging met tijden en locatie volgt

Your Power for Health

greiner bio-one

Faeces hygiënisch opvangen? Fe-Col® !
Kwaliteit in pre-analyse

- Hygiënisch
- Voorkomt contaminatie met toiletwater en reinigingsmiddelen
- Eenvoudig in gebruik
- Doorspoelbaar en 100% afbreekbaar
- In GBO Faeces container naar Lab

Greiner Bio-One B.V.
A. Einsteinweg 16 Postbus 280 2400 AG Alphen a/d Rijn
Tel: (0172) 42 09 00 Fax : (0172) 44 38 01 e-mail: info@nl.gbo.com

www.gbo.com/bioscience