

Impact de la phase pré-analytique dans les différences de natrémies obtenues par techniques potentiométriques directe et indirecte

Pre-analytical phase impact in the differences in natremia obtained by direct and indirect ion selective electrodes methods

Antoine Puravet¹
Claire Dupuis²
Charlotte Oris¹
Bruno Pereira³
Clément Aubry¹
Marina Brailova¹
Bertrand Souweine²
Vincent Sapin¹
Damien Bouvier¹

¹ Service de biochimie et génétique moléculaire, CHU Clermont-Ferrand, France

² Service de médecine intensive et réanimation, CHU Clermont-Ferrand, France

³ Direction de la recherche clinique et des innovations, CHU Clermont-Ferrand, France

Résumé. La natrémie est un paramètre biologique important renseignant sur l'état d'hydratation du patient. Sa mesure peut être réalisée à la fois par des appareils multiparamétriques de laboratoire (potentiométrie indirecte) mais aussi par des automates de biologie délocalisée (potentiométrie directe). Pour un même patient, des résultats assez différents peuvent être rendus par ces deux types d'automates, entraînant une difficulté d'interprétation pour le clinicien. Deux périodes d'études d'une semaine comparant les variations de natrémie rendues par ces automates, ont été réalisées dans un service de réanimation et de soins intensifs du centre hospitalier universitaire de Clermont-Ferrand. Lors de la seconde période d'étude, un protocole de prélèvement des échantillons sanguins a été appliqué afin d'améliorer les conditions pré-analytiques. Entre les deux périodes d'études, la médiane des différences des natrémies a été réduite de façon significative, passant de 4 mmol/L à 2 mmol/L ($p < 0,001$), tout comme la proportion des patients présentant des grands écarts de natrémie (strictement supérieur à 3 mmol/L) passant de 51 % à 24,8 % ($p < 0,001$). Les patients présentant toujours des grands écarts de natrémie avaient une médiane des protéines significativement plus faible que les patients avec écarts inférieurs ou égaux à 3 mmol/L : 58,1 g/L contre 62,25 g/L respectivement ($p < 0,001$). Malgré une réduction importante des différences liée à l'application de bonnes pratiques pré-analytiques, certains patients présentaient quand-même une différence de natrémie majeure liée à la différence de techniques (variations de la phase lipidoprotéique du plasma des patients de réanimation) et aux incertitudes de mesure.

Mots clés : Pré-analytique, natrémie, potentiométrie

Abstract. Natremia is an important biological parameter providing information on the hydration state of patient's intracellular sector. Its measurement can be carried out either by multiparametric laboratory analyser (indirect potentiometry) or delocalized biology analyser (direct potentiometry). The main problem is that for a same patient, these two analysers can give quite different results, hence inducing interpretation problems for clinician. Two one-week study periods comparing the variations in blood sodium levels produced by these automatic analysers were carried out in two intensive care units of Clermont-Ferrand University Hospital. During the second study period, a protocol for collecting blood samples was applied in order to improve the pre-analytical conditions. Between the two weeks of studies, the median of the differences in natremia was significantly reduced, going from 4 mmol/L to 2 mmol/L ($p < 0.001$), as was the proportion of patients with large differences in sodium levels (strictly higher than 3 mmol/L) going from 51% to 24.8% ($p < 0.001$). The patients

Article reçu le 10 février 2021,
accepté le 28 juin 2021

Correspondance : D. Bouvier
<dbouvier@chu-clermontferrand.fr>

still presenting large variations in sodium had a median of proteins significantly lower than patients with deviations less than or equal to 3 mmol/L: 58.1 g/L against 62.25 g/L respectively ($p < 0.001$) leading to pseudo-hyponatremia (indirect potentiometry). Despite a significant reduction in differences linked to the application of good preanalytical practices, some patients nonetheless presented a major difference in natremia due to the difference of technique (variations in the lipidoprotein phase of the plasma of intensive care patients) and to the measurement uncertainties.

Key words: Pre-analytical, natremia, potentiometry

Introduction

Au cours des dernières décennies, l'innovation technologique et les progrès dans les domaines de la médecine et de la biologie ont permis d'améliorer la prise en charge des patients [1]. Une partie non négligeable de cette prise en charge concerne les analyses biologiques et les prélèvements sanguins. Dans ce cadre, la biologie délocalisée est devenue au fil des années un outil de choix pour les cliniciens afin d'obtenir des résultats de façon quasi instantanée [2]. Les appareils de gazométrie sous la responsabilité des biologistes médicaux font partie intégrante de cette biologie délocalisée. Les cliniciens ont la possibilité grâce à ces automates de répondre à des situations cliniques aiguës [2]. Parmi l'ensemble des paramètres biologiques mesurés avec les automates de biologie délocalisée, la natrémie est un paramètre particulièrement important pour les équipes soignantes [3]. En effet, les demandes de mesures de natrémie sont quantitativement très importantes au laboratoire. Ces natrémies peuvent être obtenues grâce à l'utilisation des appareils de gazométrie mais aussi à l'aide des appareils de laboratoire multiparamétriques. La principale différence entre ces automates est leur technique analytique. En effet, les appareils de gazométrie utilisent la potentiométrie directe avec mesure de la natrémie directement dans l'eau plasmatique qui représente théoriquement 93 % du plasma, la phase lipidoprotéique représentant les 7 % restants. Les appareils de laboratoire multiparamétriques utilisent la potentiométrie indirecte avec une étape de dilution du plasma et application d'un facteur de dilution qui tient compte de cette dilution et du rapport théorique 93 %/7 % des phases eau plasmatique/phase lipidoprotéique [4]. En cas de modification du rapport entre l'eau plasmatique et la phase lipidoprotéique, la natrémie rendue par la technique de potentiométrie indirecte sera surestimée (si baisse de la phase lipidoprotéique) ou sous-estimée (si augmentation de la phase lipidoprotéique) [4]. Analytiquement, une hyperprotéïnémie ou une hyperlipémie peuvent causer une pseudo-hyponatrémie [5, 6]. Le clinicien devra donc prendre en compte la valeur de natrémie rendue par les

appareils de biologie délocalisée afin de prendre en charge de manière adéquate son patient [6]. Cependant, les écarts de natrémie ne sont pas seulement dus à cette différence de technique. Les incertitudes de mesures liées aux techniques expliquent aussi entre autre des variations entre les valeurs de natrémies obtenues [7]. Pour finir, une non maîtrise du processus pré-analytique a aussi un impact sur ces discordances. L'obligation d'un juste rendu de résultat rend nécessaire une maîtrise du processus pré-analytique [8]. Entre 1996 et 2006, les erreurs de laboratoire ont diminué d'environ 34 % [9]. La répartition globale des erreurs n'a quant à elle pas été modifiée puisque les erreurs pré-analytiques restent prépondérantes. Selon une étude de 2006, sur 3 092 erreurs, 61,9 % proviennent de cette délicate phase pré-analytique [9]. Des améliorations sont donc encore nécessaires dans la maîtrise pré-analytique des échantillons [10]. Ainsi, l'utilisation d'un matériel de prélèvement adéquat, le respect des bonnes procédures de prélèvement, le respect de l'ordre de prélèvement des tubes et pour finir la maîtrise de l'envoi de l'échantillon au laboratoire sont indispensables [11].

L'objectif principal de cette étude est de démontrer qu'en maîtrisant les étapes clés du processus pré-analytique, les écarts de natrémie entre les appareils multiparamétriques de biochimie et les appareils de biologie délocalisée sont considérablement réduits malgré des techniques analytiques différentes. Cette étude a aussi pour objectifs secondaires d'étudier l'impact de la protéïnémie sur la concentration plasmatique en sodium, sans oublier l'impact certain et immuable des incertitudes de mesures.

Matériels et méthodes

Population à l'étude

Afin d'établir que le processus pré-analytique a un impact dans les écarts de natrémie, une étude a été réalisée au sein d'un service de réanimation et d'un service de soins intensifs du Centre hospitalier universitaire (CHU) de Clermont-Ferrand.

L'étude s'est déroulée sur 2 périodes du 14 au 20 octobre (période 1) puis du 23 au 29 octobre 2019 (période 2). L'ensemble des patients des services pouvaient être concernés par l'étude, seul un dosage de natrémie effectué à la fois par technique de biologie délocalisée et sur appareil multiparamétrique de biochimie était nécessaire pour y être inclus. Afin d'obtenir des résultats interprétables, le délai choisi entre la réalisation des mesures de natrémie avec les deux techniques était au maximum de 1 h 30. Si, pour un même patient, plusieurs mesures de natrémie étaient interprétables, alors l'ensemble des données étaient conservées pour l'étude.

Entre les deux semaines d'études, les patients pouvaient être les mêmes ou différents, le but n'étant pas de montrer l'efficacité du protocole chez un patient particulier mais à l'échelle d'un service entier.

Dosage des natrémies et extraction des résultats

Au sein du service de biochimie du CHU de Clermont-Ferrand, les natrémies plasmatiques (prélèvement sur tubes héparine de lithium) ont été mesurées sur appareil multiparamétrique de type Dimension Vista® (Siemens, Munich, Allemagne). Concernant les natrémies obtenues directement au sein des services (biologie délocalisée), l'automate utilisé par les 2 services était un GEM PREMIER 4000 (Werfen, Le Pré-Saint-Gervais, France). Les mêmes valeurs de référence sont utilisées pour les deux techniques (136–145 mmol/L).

Au cours de la période 1, les prélèvements ont été effectués selon les pratiques habituelles. Lors de la période 2, les infirmiers ont prélevé en suivant un protocole réalisé dans le but d'améliorer les conditions pré-analytiques (figure 1). Ce protocole expliquait clairement l'importance d'utiliser une seringue de purge avant de prélever sur les cathéters artériels des patients mais aussi l'importance de respecter un ordre des tubes et notamment de prélever avec la seringue de gazométrie en dernier.

Une extraction de l'ensemble des natrémies mesurées sur les deux périodes a été réalisée ; seuls les résultats des patients qui répondaient aux critères détaillés ci-dessus ont été analysés. Pour la période 2, les concentrations en protéines plasmatiques (valeurs de référence : 64–82 g/L) mesurées sur les appareils multiparamétriques de type Dimension Vista® ont elles aussi été extraites dans le but d'étudier l'influence de la protéinémie sur les résultats de natrémie.

Suite à l'extraction, pour chaque période et pour chaque patient, la différence entre les deux natrémies a été réalisée ($\Delta Na = [Na]_{\text{laboratoire}} - [Na]_{\text{gazométrie}}$).

Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Stata (version 15, StataCorp, College Station, États-Unis). Les données quantitatives sont présentées en médiane (et espace interquartile [EIQ], minimale [min] ; maximale [max]) après étude de la normalité par test de Shapiro-Wilk. La concordance selon la technique de dosage concernant la valeur de natrémie a été étudiée par coefficient de corrélation de Spearman et coefficient de concordance de Lin. Les résultats ont été interprétés par rapport aux recommandations rapportées dans la littérature [12] : < 0,4 : pas de concordance ; 0,4–7 : faible concordance ; > 0,7 : concordance modérée à forte. Ces analyses ont été réalisées pour chacune des deux périodes à l'étude, puis, des comparaisons des coefficients de corrélation et de concordance entre périodes ont été réalisées par transformation de Fisher. Les données quantitatives telles que la différence de natrémie entre techniques de dosage, et les protéinémies ont été comparées entre groupes par test de Mann-Whitney. Enfin, la proportion de patients présentant une différence de natrémie entre techniques de dosage (% de patients entre 0 et 3 mmol/L et % de patients entre 4 et 7 mmol/L) a été comparée entre périodes par test du Chi2. Un risque d'erreur de première espèce bilatéral de 5 % a été considéré pour l'ensemble des tests statistiques.

L'écart maximal théorique (EMT) dû aux incertitudes de mesure (IM) a été calculé pour trois différents niveaux de natrémie : 110 mmol/L, 140 mmol/L et enfin 160 mmol/L. Les incertitudes de mesures ont été évaluées avec une approche utilisant à la fois des données de reproductibilité et d'exactitude.

Pour chacun des trois niveaux (n = 110, 140 ou 160), les résultats ont été calculés en concentrations en utilisant la formule suivante :

$$EMT = \left(\frac{n * IM}{100} + \frac{n * IM_{GEM4000}}{100} \right)$$

IM = $2 * \sqrt{((\text{reproductibilité SD})^2 + (\text{incertitude de précision})^2)}$

Incertaince liée à la précision = $\sqrt{((D/\sqrt{3})^2 + \sigma D^2)}$

SD : écart type ; D : moyenne de l'écart = $(\Sigma e)/n$; e : résultat du laboratoire - moyenne de référence (groupe de pairs) ; σD : écart type de l'écart

Résultats

Influence du pré-analytique dans les écarts de natrémie

Lors de la période 1 de l'étude, au sein des services de réanimation et de soins intensifs, la médiane des différences des natrémies obtenues a été de 4 mmol/L (EIQ :

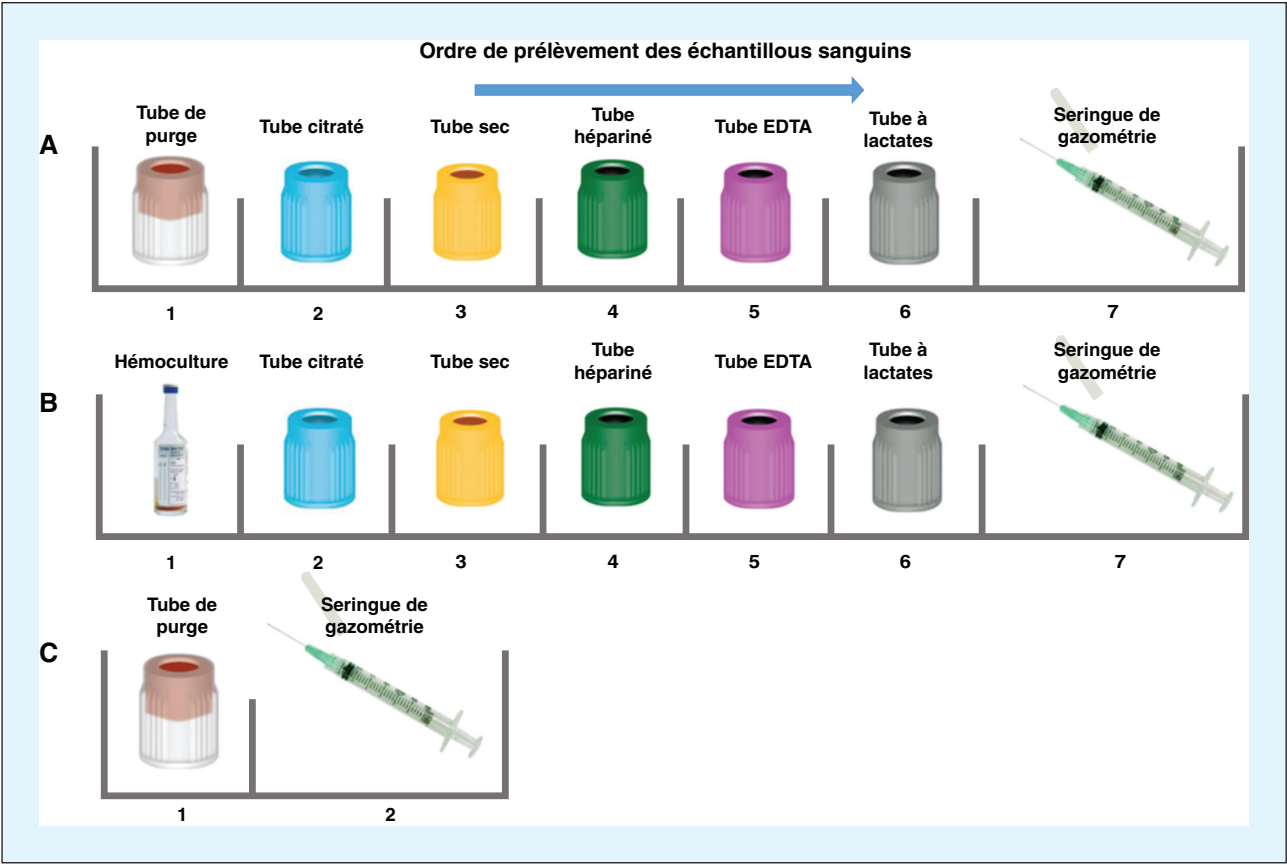


Figure 1. Chronologie de prélèvement des échantillons sanguins. **A.** Prélèvement de la seringue de gazométrie en dernier en cas de prélèvements de plusieurs échantillons sanguins. **B.** Prélèvement des flacons d'hémocultures (aérobie puis anaérobie) à la place du tube de purge si hémocultures prescrites. **C.** Prélèvement sur un tube de purge avant la seringue de gazométrie en l'absence d'autres échantillons sanguins à prélever.

Tableau 1. Étude de l'impact de la phase pré-analytique sur les différences de natrémies obtenues par techniques potentiométrique directe (GEM4000) et indirecte (Vista). Période 1 : pas de consignes pré-analytiques données à l'équipe soignante. Période 2 : Application d'un protocole de prélèvement des échantillons. EIQ : espace interquartile.

/	Période 1	Période 2	p
n	98	109	/
Médiane (EIQ/minimale/maximale) de la différence Sodium Vista – Sodium GEM4000 en mmol/L	4 (3-4/0/7)	2 (1-3/-4/7)	< 0,001
Coefficient de corrélation de Spearman entre la natrémie Vista et la natrémie GEM4000	0,90	0,93	0,19
Coefficient de concordance de Lin entre la natrémie Vista et la natrémie GEM4000	0,69 (0,62–0,76)	0,90 (0,87-0,93)	< 0,001
Nombre de patients avec différence de natrémie entre 0 et 3 mmol/L (%)	48 (49 %)	82 (75,2 %)	< 0,001
Nombre de patients avec différence de natrémie entre 4 et 7 mmol/L (%)	50 (51 %)	27 (24,8 %)	

3-4 ; min : 0 ; max : 7). L'application du protocole a permis de diminuer de manière statistiquement significative ($p < 0,001$) la médiane des différences à 2 mmol/L (EIQ : 1-3 ; min : -4 ; max : 7) lors de la période 2 de l'étude (tableau 1).

En période 1, 51 % des patients (50 sur 98) présentaient une différence de natrémie comprise entre 4 et 7 mmol/L

(valeurs hautes). Les 48 patients restant présentaient une différence comprise entre 0 et 3 mmol/L (valeurs basses). En période 2, 24,8 % des patients (27 sur 109) patients présentaient une différence de natrémie comprise entre 4 et 7 mmol/L (tableau 1). Cette différence de proportion entre les 2 périodes est statistiquement significative ($p < 0,001$) (tableau 1).

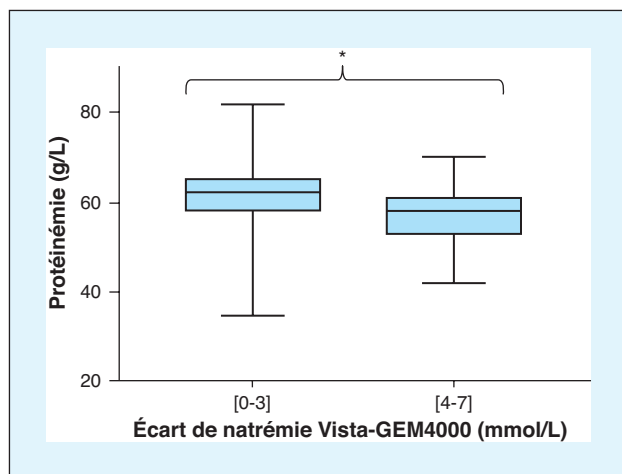


Figure 2. Médiane des protéinémies des patients en fonction des écarts de natrémies mesurés dans les services de réanimation et de soins intensifs. * : $p < 0,001$.

Entre les deux périodes, le coefficient de corrélation de Spearman a été constant puisqu'il était de 0,90 en période 1 puis de 0,93 en période 2. Ces deux valeurs proches de 1 témoignent d'une bonne corrélation pour les techniques de dosages entre les deux périodes. Le coefficient de concordance de Lin lui était de 0,69 en période 1 et 0,93 en période 2. La concordance des techniques de dosage s'est ainsi améliorée de manière statistiquement significative ($p < 0,001$) (*tableau 1*) passant de faible à modérée/forte.

Influence de la protéinémie

Les concentrations plasmatiques en protéines ont été extraites pour chaque patient lors de la période 2 de l'étude. Les patients avec un écart de natrémie supérieur ou égal à 4 mmol/L présentaient une médiane de protéines à 58,1 g/L alors que les patients avec un écart de natrémie entre 0 et 3 mmol/L présentaient une médiane à 62,25 g/L, significativement plus élevée sur le plan statistique ($p < 0,001$) (*figure 2*).

Impact immuable des incertitudes de mesure

L'écart maximal théorique dû à l'incertitude de mesure a été mesuré pour trois niveaux de natrémies : 110 mmol/L, 140 mmol/L et 160 mmol/L. Un écart théorique de 3 mmol/L a été mesuré pour le premier niveau, en revanche, pour le second et le troisième niveau, l'écart maximal théorique obtenu a été de 4 mmol/L (*tableau 2*).

Discussion

Les écarts de natrémie entre les automates de biologie délocalisée et les appareils multiparamétriques de biochi-

Tableau 2. Écart maximal théorique de natrémie dû à l'incertitude de mesure pour trois niveaux de natrémie à respectivement 110, 140 et 160 mmol/L.

Niveaux de natrémie	Écart théorique dû à l'incertitude de mesure en mmol/L
Niveau 1 : 110 mmol/L	0–3
Niveau 2 : 140 mmol/L	0–4
Niveau 3 : 160 mmol/L	0–4

mie sont une source de problèmes pour les cliniciens. Des grands écarts de natrémie peuvent aller jusqu'à une modification de la prise en charge du patient [4]. Or, une interprétation correcte du ionogramme est indispensable pour connaître l'état d'hydratation du patient [13]. Ces écarts grandissants ont nécessité la mise en place d'une étude permettant d'établir des mesures correctives dans le but de diminuer les écarts de natrémie entre les deux automates.

Une maîtrise de la phase pré-analytique est importante car en imposant un protocole plus rigoureux, notamment sur le respect de l'ordre de prélèvement des tubes dans les services, une réduction de l'écart médian des natrémies de 2 mmol/L a été obtenue, passant de 4 à 2 mmol/L. De plus, la proportion des grands écarts de natrémie a été considérablement diminuée puisque sur la seconde période, seulement 24,8 % des patients avaient un écart supérieur ou égal à 4 mmol/L contre 51 % des patients lors de la période 1. Ce protocole a donc permis une nette amélioration de la maîtrise pré-analytique des échantillons en corrigeant une dérive dans laquelle le tube de purge n'était pas utilisé et la seringue à gazométrie utilisée en premier. Une diffusion du protocole à l'ensemble des services de réanimation et de soins intensifs pourrait donc faciliter l'interprétation des bilans biochimiques pour les biologistes et les cliniciens. Dans les cas où les écarts de natrémie sont toujours supérieurs ou égaux à 4, il semble utile de s'intéresser à la protéinémie. En effet, dans la littérature, il est décrit qu'une hypertriglycémie ou une hyperprotéinémie pouvait induire une pseudo-hyponatrémie pour les appareils multiparamétriques de biochimie utilisant la potentiométrie indirecte comme technique analytique. En services de réanimation, la nutrition parentérale et les dyslipoprotéinémies sont deux grandes causes d'hypertriglycémie. Les hyperprotéinémies peuvent être pour leur part dues à la présence d'une immunoglobuline monoclonale sérique, d'une hypergammaglobuline polyclonale inflammatoire ou encore à une déshydratation [4]. Cependant, dans cette étude, le problème constaté en période 1 est une pseudo-hypernatrémie (médiane Vista-GEM positive). Par le même principe, sur ces mêmes automates, une hypo-protéinémie peut avoir l'effet inverse et induire une

pseudo-hypernatrémie. La médiane des protéines pour les patients présentant un écart de natrémie supérieur ou égal à 4 est de 58,1 g/L contre 62,25 g/L pour les patients présentant un écart de natrémie strictement inférieur à 4. Ainsi, la technique de potentiométrie indirecte peut induire une pseudo-hypernatrémie en cas de protéinémie abaissée, ce qui explique entre autre un maintien des grands écarts de natrémie entre les appareils multiparamétriques de biochimie et les automates de biologie délocalisée. En services de réanimation, les principales causes d'hypoprotéinémie sont notamment la dénutrition protéique et l'inflammation systémique. Ces deux étiologies ayant par ailleurs un lien de cause à effet.

Contrairement aux cliniciens, les biologistes sont sensibilisés aux incertitudes de mesures de leurs techniques analytiques. Ainsi, pour l'ensemble des paramètres mesurés au laboratoire et en biologie délocalisée, une légère variation des résultats est causée par ces incertitudes de mesures [14, 15]. Cela est bien évidemment vrai pour la mesure de la natrémie. Sur l'année 2020, les écarts maximaux théoriques ont été mesurés pour trois différents niveaux de natrémie, l'écart maximal mesuré était de 4 mmol/L. Cette différence peut s'étendre aléatoirement de chaque côté de la valeur de base. C'est donc une autre explication aux écarts de natrémie mesurés entre les différents automates.

Au final, les écarts de natrémie mesurés entre les appareils de biologie délocalisée et les appareils multiparamétriques de biochimie s'expliquent à la fois par une maîtrise partielle du traitement pré-analytique, par une variation de la protéinémie entraînant des pseudo-hypo- ou hypernatrémie en potentiométrie indirecte, mais aussi par les incertitudes de mesures.

Conclusion

Cette étude démontre toute l'importance de la phase pré-analytique dans l'obtention et le juste rendu de résultat. La maîtrise pré-analytique permet de limiter les écarts de natrémie entre potentiométries directe et indirecte et facilite ainsi l'interprétation biologique. Malgré une réduction importante des écarts dans la majorité des cas, certains patients présentent quand-même une différence de natrémie majeure liée à la différence de technique (et aux variations de la phase lipidoprotéique du plasma des patients de réanimation) et aux incertitudes de mesure.

Liens d'intérêt : Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec l'article.

Références

- Fortin S, Maynard S. Progrès de la médecine, progrès technologiques et pratiques cliniques : les soignants se racontent. *Anthropol Sante Rev Int Francoph* 2012 ; 5.
- Ray P, Lefèvre G. Intérêts et limites de la biologie délocalisée. In : Claessens Y-É, Ray P, eds. *Les biomarqueurs en médecine d'urgence : des données biologiques au lit du malade*. Paris : Springer, 2012, pp. 307-16.
- Offenstadt G, Das V. Hyponatremia, hypernatremia: a physiological approach. *Minerva Anesthesiol* 2006 ; 72 : 353-6.
- Zelmat MS. Direct and indirect ion selective electrodes methods: the differences specified through a case of Waldenström's macroglobulinemia. *Ann Biol Clin* 2015 ; 73 : 345-52.
- Kim G-H. Pseudohyponatremia: does it matter in current clinical practice? *Electrolyte Blood Press* 2006 ; 4 : 77-82.
- Aw TC, Kiechle FL. Pseudohyponatremia. *Am J Emerg Med* 1985 ; 3 : 236-9.
- Giroud C, Dumontet M, Vassault A, Braconnier F, Férard G. Recommandations relatives à l'expression de l'incertitude de mesure des résultats quantitatifs en biologie médicale. *Ann Biol Clin* 2007 ; 65 : 16.
- Duchassaing D. Phase pré-analytique en biochimie : processus de maîtrise de la qualité. *Rev Fr Lab* 1999 ; 317 : 27-34.
- Carraro P, Plebani M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. *Clin Chem* 2007 ; 53 : 1338-42.
- Gendt L, Szymanowicz A. Proposition pour la maîtrise de la phase pré-analytique selon la norme NF EN ISO 15189. *Bio Trib Mag* 2010 ; 36 : 50-8.
- Barbier F, Berkane Z, Dehorne J, Desch G, Dhondt J, Drouillard I, et al. Recommandations pour la maîtrise de l'étape de prélèvement des échantillons biologiques. *Ann Biol Clin* 2011 ; 68 : 69-104.
- Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research*. Londres : Chapman et Hall Edition, 1990, p. 285.
- Petitclerc T. Troubles de l'hydratation cellulaire et extracellulaire. *Immuno-Anal Biol Spec* 2007 ; 22 : 345-58.
- Matar G, Poggi B, Meley R, Bon C, Chardon L, Chikh K, et al. Uncertainty in measurement for 43 biochemistry, immunoassay, and hemostasis routine analytes evaluated by a method using only external quality assessment data. *Clin Chem Lab Med* 2015 ; 53 : 1725-36.
- Oris C, Clavel Y, Jabaudon M, Pialat A, Mohamed HA, Lioret F, et al. Method validation of a set of 12 GEM® Premier™ 4000 blood gas analyzers for point-of-care testing in a university teaching hospital. *Pract Lab Med* 2018 ; 10 : 21-33.