

Voordrachten

Samenvattingen van de voordrachten tijdens het 56e Congres van de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde op 16 en 17 april 2003 te Lunteren

Sessie 1 Klinische onderwerpen I

09.00 – 09.15 uur

Soluble tissue factor released by cultured human umbilical vein endothelial cells is microparticle-associated and triggers thrombus formation in vivo

M.N. ABID HUSSEIN¹, É. BIRD¹, E.W. MEESTERS², N. OSMANOVIC¹, F.P.H.TH.M. ROMIJN³, G.M.T. VOGEL⁴, D.G. MEULEMAN⁴, A. STURK¹, R. NIEUWLAND¹

Department of Clinical Chemistry¹, Academic Medical Center of the University of Amsterdam, Amsterdam; Department of Internal Medicine², Slotervaart Hospital, Amsterdam; Department of Clinical Chemistry³, Leiden University Medical Center, Leiden; Pharmacology⁴, Section General Pharmacology, Organon, Oss

Introduction: Human plasma contains non-cell-bound soluble TF (sTF). In vitro, endothelial cells release microparticles (MP) exposing functional TF. In this study we investigated whether sTF is associated with MP of endothelial origin (EMP) and whether such EMP-associated TF triggers thrombus formation and occurs in vivo.

Methods: Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC; n=3) were incubated with or without interleukin (IL)-1 α (5 ng/mL) for 0-72 hours and analysed by flow cytometry for TF exposure. sTF in the culture supernatants was assessed by ELISA. Association between sTF and EMP in culture supernatants was determined using flow cytometry and Western blotting. The coagulant activity of sTF was studied in a thrombin generation assay in vitro and in a rat venous thrombosis model in vivo. The occurrence of EMP-associated TF was also studied in plasma

samples from SLE patients (n=11) and healthy individuals (n=10).

Results: Activated HUVEC transiently exposed TF. sTF appeared in the culture supernatants, which was entirely EMP associated. On Western blot, TF from both HUVEC and EMP showed as a single 47 kDa band. EMP-associated TF induced factor VII-dependent thrombin generation in vitro and thrombus formation in a rat thrombosis model (thrombus weight 35.1 \pm 12.9 mg, n=6; control 0.5 \pm 0.7 mg, n=6), which was inhibited by anti-human TF (5.6 \pm 9.3 mg, P=0.013; n=6) but not by anti-human factor XII (26.9 \pm 9.2 mg, P>0.05; n=6). Plasma from one SLE patient clearly contained EMP exposing TF.

Conclusions: Endothelial cells release full-length TF which is EMP-associated, initiates thrombus formation and occurs in vivo.

09.15 – 09.30 uur

Hyper-IgD and periodic fever syndrome: a role for the mevalonate pathway in regulation of inflammation and fever

S.M. HOUTEN¹, J. FRENKEL³, R.J.A. WANDERS^{1,2}, H.R. WATERHAM¹

Departments of Pediatrics¹ and Clinical Chemistry², Academic Medical Center, Amsterdam; Dept. of General Pediatrics³, University Medical Center Utrecht

Introduction: Hyper-IgD and periodic fever syndrome (HIDS) and mevalonic aciduria (MA) are autosomal recessive disorders characterized by recurrent episodes of fever and generalized inflammation. Both syndromes are caused by specific mutations in the mevalonate kinase (MK) gene, resulting in a depressed MK activity mainly due to reduced protein levels. We report the mutational spectrum of HIDS and MA and the results of our studies towards the effect of temperature on the activity of wild type and mutant MKs in fibroblasts.

Methods: Sequence analysis of patient DNA was performed by PCR amplification of coding sequences of the MVK gene followed by big dye primer sequencing. The effect of temperature on the activity of wild type and mutant MKs was studied in fibroblasts cultured at different temperatures and in PBMCs of patients during and between fever episodes.

Results: All HIDS fibroblast cell lines, which harbour the V377I MVK allele, displayed substantially higher MK activities at 30 °C than at 37 °C. This resulted in

an MK protein nearly as stable as in control cell lines, indicating that primarily the maturation of the protein is affected by the V377I mutation. Accordingly, when HIDS cells were cultured at 40 °C, MK activity decreased further. This triggered a compensatory increase in HMG-CoA reductase activity indicating that MK becomes progressively rate limiting. A similar phenomenon occurs *in vivo*. MK activity in

PBMCs drops 2-6-fold when HIDS patients experience febrile attacks.

Conclusion: Temperature dependency of MK enzyme activity is a pathogenic factor in HIDS: minor elevations in temperature can set off a chain of events, with MK becoming progressively rate-limiting, leading to a temporary deficiency of isoprenoid end-products, followed by inflammation and fever.

09.30 – 09.45 uur

Hypocretin, a sensitive and specific marker for narcolepsy

M.H.M. THELEN¹, R.J.A.A. STEINMANN¹, J.H.M. de GROEN², J.W.P.H. SOONS¹

Department for Clinical Chemistry¹, St-Anna Hospital, Geldrop, Netherlands; Centre for Sleep and Wake Disorders Kempenhaeghe², Heeze, Netherlands

Introduction: Narcolepsy is a REM sleep disorder of unknown aetiology, marked by severe daytime sleepiness. It is diagnosed by polysomnography with multiple sleep latency test and cataplexy as a major differentiating symptom from other sleep disorders. As yet, a sensitive and specific biochemical marker for the disorder is still missing. The recently described association with HLA-DQB1*0602 provides a sensitive marker to exclude the disease, but lacks specificity for a definitive diagnosis. Analysis of CSF and post mortem brain tissue of patients suggests a role for the neuropeptide hypocretin in the pathophysiology of the disease. In the present study we have investigated whether hypocretin levels in CSF or serum can be used as a specific marker for narcolepsy.

Methods: Patients suffering from a sleep disorder and suspected for narcolepsy were analysed by poly-

somnography during 2 nights. The same patients were tested for HLA DQB1*0602, and hypocretin levels in serum and in CSF. Data in 13 suspected patients were compared.

Results: Using polysomnography as a reference, 7 of 13 suspected patients indeed had narcolepsy. HLA-DQB1*0602 was positive in all 7 narcolepsy patients and in 1 other patient (sensitivity 100%, specificity 87.5%). Hypocretin in CSF was 7 ± 8 pg/ml in narcolepsy patients compared to 110 ± 46 pg/ml in patients with an alternative diagnosis ($P < 0.01$). At cut-off levels between 15 and 29 pmol/l sensitivity and specificity were both 100%. Hypocretin levels in serum were below the limit of detection.

Discussion: Hypocretin in CSF seems to be the ideal discriminator between narcolepsy and other sleep disorders. Spinal taps can be confined to those patients with positive HLA-DQB1*0602 screening.

09.45 – 10.00 uur

NT-proBNP (Brain Natriuretic Peptide) als vroege diagnostische parameter voor het uitsluiten van hartfalen

R.H. TRIEPELS¹, S. BUSSCHER¹, P.H. van der BURGH², I. VERMES¹

Medisch Spectrum Twente, Afdelingen Laboratorium¹ en Cardiologie², Enschede

Inleiding: Ondanks de bestaande vroegdiagnostiek bij hartfalen is er nog steeds grote behoefte aan een accurate biochemische parameter voor hartfalen. ProBNP, het pro-hormoon van BNP, wordt na stimulatie van de cardiomyocyten, bijvoorbeeld door myocardiale stretch, proteolytisch gesplitst in het N-terminaal proBNP (NT-proBNP) en de actieve component BNP. Diverse studies hebben reeds aangetoond dat verhoogde concentraties NT-proBNP alsook BNP in plasma voorkomt bij patiënten met hartfalen. In dit onderzoek is gekeken naar de meerwaarde van de plasmaconcentratie NT-proBNP bij het stellen van de diagnose hartfalen.

Methoden: NT-proBNP is gemeten met behulp van elektrochemiluminescentie-immunoassay (Elecsys proBNP, Roche Diagnostics). Uit de totale opnamepopulatie van de EHH/CCU-afdeling (Eerste Hart Hulp/ Coronary Care Unit) werd sequentieel bij 200 patiën-

ten met specifieke of aspecifieke hartklachten de NT-proBNP-concentratie bepaald. De gemeten waarden zijn retrospectief gespiegeld aan de klinische gegevens (diagnose) in het ontslagbericht. De cut-offwaarde voor NT-proBNP is gesteld op 250 pg/ml.

Resultaten: Bij 61 patiënten waarbij de diagnose hartfalen gesteld werd, werden NT-proBNP-concentraties > 250 pg/ml gevonden (TP). Slechts bij 1 patiënt met de uiteindelijke diagnose hartfalen werd een concentratie van < 250 pg/ml gevonden (FN). Bij 51 patiënten waarbij de uiteindelijke diagnose anders was dan hartfalen werd een concentratie > 250 pg/ml gevonden (FP). Bij 87 patiënten met gelijke diagnose werd een lagere concentratie gevonden dan de gestelde cut-off-waarde (TN).

Hieruit kan een sensitiviteit van 98,4% en een specificiteit van 63,0% berekend worden.

De PVW bedraagt 54,5% en de NVW bedraagt 98,9%.

Conclusie: Vanwege de hoge negatieve voorspellende waarde van het voorkomen van NT-pro-BNP in relatie tot aanwezig hartfalen, kan geconcludeerd worden

dat NT-proBNP een accurate diagnostische parameter is voor het uitsluiten van linkerventrikeldisfunctie.

10.00 – 10.15 uur

Verworven Glanzmann: een stollingsstoornis veroorzaakt door autoantilichamen tegen glycoproteïne IIb-IIIa

R. MAATMAN¹, L. PORCELIJN², R. DE BOER¹, M. JOOSTEN¹, E. TER RIELE¹, H. VAN KASTEREN¹, G. CREEMERS³, J. HOFFMANN¹

Algemeen klinisch laboratorium¹ en Interne geneeskunde², Catharina ziekenhuis, Eindhoven; Centraal laboratorium van de bloedtransfusie³, Amsterdam

Inleiding: Glanzmann-thrombastenie is een zeer zeldzame erfelijke autosomaal recessieve stollingsstoornis waarbij het transmembraanglycoproteïne IIb-IIIa(GpIIb-IIIa) afwezig of niet functioneel is. Patiënten presenteren zich met ernstige bloedingsneigingen.

Resultaten: Wij presenteren gegevens van een 68-jarige vrouw met in haar voorgeschiedenis recidiverende ITP. Na splenectomie presenteerde zij zich met versterkte bloedingsneiging. Er werd een bloedingsstijd >15 min gevonden bij een normaal aantal trombocyten. In-vitro-aggregaties met archidonzuur, ADP, collageen en ristocetine waren afwezig/sterk verlaagd. Op de trombocyten van de patiënte werden antistoffen aangetoond van de IgG1-subklasse, welke tevens met donortrombocyten reageerden. Met behulp van FACs-analyse werden GpIIIa, GpIIIb en GpIb aangetoond, echter GpIIb was niet aantoonbaar. De monoklonale antistof-specifieke immobilisatie van trombocytantigenen-assay (MAIPA) toonde sterk positieve reacties met GpIIb-IIIa, GpIb, GpIIIa en GpIb zowel met trombocyten van de patiënt als met

donortrombocyten en het serum van de patiënt. De aanmaak van de trombocyten was niet gestoord en de expressie van de verschillende transmembraanglycoproteïnen, gemeten met behulp van monoklonale antilichamen, was niet gestoord met uitzondering van het Glanzmann-complex GpIIb-IIIa. De expressie leek verlaagd, meest waarschijnlijk als gevolg van verdringing door de aanwezige autoantilichamen. Behandeling met corticosteroiden lieten zowel klinisch als bij de diverse stollingsparameters een aanzienlijke verbetering zien. Alle trombocytanagregaties in vitro zijn aanzienlijk verbeterd, echter de verschillende analyses voor detectie van autoantilichamen op de trombocyten en in het serum van de patiënte waren nog duidelijk positief.

Conclusie: De aangetroffen stollingsstoornis bij onze patiënte werd veroorzaakt door autoantilichamen vooral gericht tegen GpIIb, welke de functionaliteit van het Glanzmann-transmembraanglycoproteïne IIb-IIIa verstoren. Onderdrukking van de aanmaak van deze autoantilichamen heeft klinisch tot een aanzienlijke verbetering geleid.

Sessie 1 Bedrijfsvoering

10.15 – 10.30 uur

Herinrichten van de bedrijfsprocessen van een trombosedienst: automatiseringsoplossing via het internet

J.J.H. HENS¹, H.O. AGRICOLA¹, H.W. de BRUIJN², E.J. HOIJTINK²

Klinisch Chemisch Laboratorium en Afdeling Bloedafname en Trombosedienst¹, Hofpoort Ziekenhuis, Woerden en Portavita B.V.², Amsterdam

Introductie: De bestaande logistieke bedrijfsprocessen van de trombosedienst van het Hofpoort Ziekenhuis zijn in kaart gebracht, waarbij knelpunten en mogelijke verbeterpunten zijn geïnventariseerd. Aan de hand van de resultaten is een beschrijving gemaakt van een potentieel efficiëntere en meer klantgerichte werkwijze en een eerste ruwe inventarisatie van de huidige en toekomstige benodigde (automatisering) hulpmiddelen. Doel is te komen tot een kwalitatieve verbetering van de bedrijfsprocessen voor zowel de patiënt/cliënt als voor de trombosedienst tegen gelijkblijvende kosten.

Methode: Uit interviews met medewerkers en leidinggevenden en naar aanleiding van de procesanalyse zijn knelpunten c.q. verbeterpunten in kaart ge-

bracht. Deze gegevens resulteerden in kwantitatieve en kwalitatieve uitspraken over i) voordelen voor de cliënt, ii) kosten van de bedrijfsvoering en iii) risico's in termen van positieve kansen en voorkomen bedreigingen.

Resultaten: Door automatisering kan op jaarbasis 55 uur bespaard worden bij het opvoeren nieuwe patiënt met 5% minder invoerfouten; 96-320 uur bij de registratie van gegevens bij bloedafname; 383 uur bij het beoordelen van de PT-INR en het doseren van de patiënt; 83 uur en € 2.000,- portokosten in de communicatie met de patiënt met een hogere klanttevredenheid -dit middels een html/internetapplicatie-; 127 uur door geautomatiseerde routeplanning; 13 uur met IT-beheer en 50 uur bij de einddagprocedure.

Conclusie: In totaal zal de afname van de tijdsbesteding voor de trombosedienst 1.031 uren per jaar bedragen (~ 0,64 FTE / 7 %) hetgeen bij een uurtarief van € 24,- leidt tot een vermindering van perso-

nele kosten van € 24.744,-. Daarnaast is er een additionele kostenverlaging van € 2.288,- voor porti en kilometervergoeding. Daarmee bedraagt de besparing bij 16.000 PT-INR-bepalingen € 1,69 per bepaling.

10.30 – 10.45 uur

Vergelijking van verschillende CDT-bepalingsmethoden

M. DOESBURG-van KLEFFENS¹, J. VELMANS¹, J. van PELT²
Viecuri Medisch Centrum voor N-Limburg¹, KCHL, Venlo en LUMC², CKCL, Leiden

Inleiding: CDT is een marker voor chronisch overmatig alcoholgebruik. Omdat de bepaling een rol speelt in de vorderingsprocedure van het CBR kan de uitslag vergaande consequenties hebben en er zelfs indirect toe leiden dat van een betrokkene het rijbewijs wordt ingetrokken. Aan de bepaling zullen eisen gesteld dienen te worden met betrekking tot juistheid en precisie en het resultaat mag uiteraard niet afhankelijk zijn van het laboratorium dat de bepaling uitvoert. Omdat er inmiddels ook andere bepalingmethoden voor CDT geïntroduceerd zijn hebben wij een indruk proberen te verkrijgen ten aanzien van de inter- en intralaboratorium- en -bepalingmethodenvariëaties.

Methoden: Er werden 2 gepoolde humane sera met verschillende concentraties aan CDT gemaakt. Deze werden naar verschillende laboratoria verzonden om het gehalte aan CDT te bepalen (in %) Hiervoor werden de volgende methodes toegepast: Axis CDT (microtiterplaat), capillaire elektroforese, Immuno elektroforese (IEF) en HPLC (methode Jeppson). Voor

iedere methode werden 2 verschillende laboratoria uitgezocht. Deze laboratoria bepaalden vervolgens een intra-assay-VC en een inter-assay-VC.

Resultaten en Conclusies:

- De uitslagen zijn zoals verwacht werd erg methodeafhankelijk en kunnen zeker niet door elkaar worden gebruikt.
- De Axis-methode en de capillaire elektroforese geven de grootste overeenkomst tussen de beide uitvoerende laboratoria.
- De VC van de Axis-methode en de capillaire elektroforese zijn het laagst.
- De VC lopen erg uiteen per methode, per bepaling en per laboratorium.
- Chromatografische bepalingmethoden zijn voornamelijk enkel geschikt voor kwalitatieve doeleinden en ter controle van Axis-CDT-uitkomsten.
- Goede kwaliteitscontroles zijn uiterst noodzakelijk. Om nog grotere verwarring bij gebruikers te voorkomen dient de bepalingmethode eventueel per vraagstelling gestandaardiseerd te zijn.

10.45 – 11.00 uur

Interferentie door “Extraneal” CAPD-spoelvoelstof op glucosebepaling m.b.v. AccuChek Inform POCT

B.A. DE BOER, C.B.H. de FIJTER, E.H. SLAATS
Hematologisch Klinisch Chemisch laboratorium, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam

Inleiding: Bij een onwel geworden patiënt werd met de AccuChek Inform[®] (ACI, Roche) POCT-glucosemeter ook na herhaling een normale glucoseconcentratie gemeten (5,2 mmol/l) Echter in het direct naar het laboratorium gestuurde bloedmonster werd een glucoseconcentratie van 1,6 mmol/l bepaald. Naast een systematische analyse illustreert deze casus het belang van een goede instructie en contactennetwerk met de eigenlijke gebruikers van POCT-apparatuur.

Methoden: De Accutrend Sensor glucoseteststrip van de ACI bevat glucosedehydrogenase. De glucoseconcentratie in het capillaire plasma wordt via de enzymreactie amperometrisch bepaald. De laboratoriummethode (EBIO, Eppendorf) werkt met hemolysaat. De glucoseconcentratie wordt m.b.v geïmmobiliseerd glucoseoxidase amperometrisch bepaald.

Resultaten: De logging en status van de ACI, de glucoseteststrips en de bekwaamheid van de medewerker werden achtereenvolgens gecontroleerd, waarbij geen

bijzonderheden gevonden werden. Een vergelijking tussen de ACI en de laboratoriummethode met patiëntenmonsters leverde geen significant verschil op. Bij verdere navraag bleek het te gaan om een continue-ambulante-peritoneaaldialysepatiënt met gebruik van Extraneal[®] (Baxter) als spoelvoelstof. Deze niet standaard spoelvoelstof bevat icodextrine (glucosepolymeer), welke in het lichaam langzaam wordt afgebroken tot maltoses. Vals verhoogde glucoseuitslagen werden gegenereerd door maltose, dat ook door glucosedehydrogenase wordt omgezet. In de bijsluiter werd alleen de naam van de stof icodextrine vermeld; het verband met de productnaam “Extraneal” werd niet direct gelegd.

Conclusie: Het is essentieel bij de instructie van verpleegkundigen, maar ook de artsen, te wijzen op de beperkingen van POCT-systemen. Het laboratorium heeft daarbij een belangrijke instruerende en bewakende rol.

Sessie 2 Klinische onderwerpen II

09.00 – 09.15 uur

Discovery of the molecular basis of autosomal recessive desmosterolosis

H.R. WATERHAM¹, J. KOSTER², G.J. ROMEIJN², P. VREKEN², R.C.M. HENNEKAM¹, H.C. ANDERSSON³, D. FITZPATRICK⁴, R.I. KELLEY⁵, R.J.A. WANDERS^{1,2}

Departments of Pediatrics¹ and Clinical Chemistry², Division Emma Children's Hospital, Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands; Tulane University School of Medicine³, New Orleans, USA; MRC Human Genetics Unit⁴, Western General Hospital, Edinburgh, UK; Kennedy Krieger Institute⁵, Baltimore, USA

Introduction: Recently, several inherited disorders characterized by multiple congenital anomalies have been linked to defects in cholesterol biosynthesis by the finding of elevated levels of intermediate sterol metabolites in patients followed by the demonstration of disease-causing mutations in genes encoding the implicated enzymes. We here report the molecular basis of autosomal recessive desmosterolosis (MIM 602398).

Methods: Sterols were analyzed by GC-MS. The candidate DHCR24 cDNA and corresponding gene were identified *in silico* by human (c)DNA database searching. Functional characterization of the encoded enzyme and the effect of mutations on the function was done by cDNA expression in baker's yeast. Sequence analysis of patient DNA was performed by PCR amplification of coding sequences followed by big dye primer sequencing.

Results: Sterol analysis in lymphoblasts of a patient suspected with desmosterolosis revealed elevated levels of desmosterol, indicating a deficiency of

3beta-hydroxysterol delta24-reductase (DHCR24), the enzyme catalysing the reduction of the C24-C25 double bond of desmosterol to produce cholesterol. The human DHCR24 cDNA was identified by sequence similarity with a the plant enzyme DWF1/DIM from *Arabidopsis thaliana*, catalyzing a different but partially similar reaction in plant steroid/sterol biosynthesis. Expression of the DHCR24 cDNA in yeast followed by enzyme activity measurements confirmed that it codes for DHCR24. The corresponding DHCR24 gene spans ~46.4 kb, is localized on chromosome 1p31.1-p33 and comprises 9 exons and 8 introns. Sequence analysis of the DHCR24 gene in two patients diagnosed with desmosterolosis revealed four different missense mutations, which were shown to be disease-causing by functional expression of the patient alleles in yeast.

Conclusions: We have identified the gene encoding human 3beta-hydroxysterol delta24-reductase and showed that mutations in this gene cause desmosterolosis.

09.15 – 09.30 uur

Genetic polymorphisms of the *CYP3A4*, *CYP3A5* and *MDR-1* genes in relation to the pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporin A and tacrolimus

R.H.N. van SCHAIK¹, D.A. HESSELINK², I.P. van der HEIDEN¹, M. van der WERF¹, P.J. SMAK GREGOOR², W. WEIMAR², J. LINDEMANS¹, T. van GELDER²

Departments Clinical Chemistry¹ and Internal Medicine², Erasmus MC, University Hospital Medical Center Rotterdam, The Netherlands

Introduction: The calcineurin inhibitors cyclosporin A (CsA) and tacrolimus (FK506) are standard immunosuppressive drugs in many transplant centers. However, both drugs have a narrow therapeutic index and show considerable interindividual variation in their pharmacokinetics (PK). Therefore, therapeutic drug monitoring is essential to avoid risks of over- and under immunosuppression.

Purpose: Determine the role of genetic polymorphisms in *CYP3A4*, *CYP3A5* and *MDR-1* with respect to interindividual variability in CsA and FK506 PK.

Methods: Kidney transplant patients receiving CsA (n=110) or FK506 (n=64) were genotyped for *CYP3A5**3 and *6, *CYP3A4**1B and *MDR-1* C3435T. CsA and FK506 concentrations were analysed in full blood using the EMIT2000 assay, at 3 and 12 months

after transplantation. Dose-adjusted pre-dose (C₀) concentrations were calculated and correlated with genotype.

Results: FK506 C₀-concentrations were significantly higher in *CYP3A5* *3/*3 patients (median=94 ng/ml per mg/kg) when compared with *1/*3 plus *1/*1 patients (median=61; p<0.0001, Mann-Whitney test). *CYP3A4**1B allele carriers showed a significant lower FK506 C₀-value (median 53 vs 91; p<0.01). No evidence was found supporting a role for the *MDR-1* genetic polymorphism. For CsA, neither of the 3 polymorphisms studied correlated with PK.

Conclusion: *CYP3A5* genotype is strongly correlated with FK506 PK, and might be clinically relevant. No evidence was found supporting a role for *MDR1* genotyping.

09.30 – 09.45 uur

3-methylglutaconic aciduria type I is caused by mutations in AUH

L. IJLST¹, F.J. LOUPATTY¹, J.P.N. RUITER¹, M. DURAN¹, W. LEHNERT², R.J.A. WANDERS¹

University of Amsterdam¹, Academic Medical Center, Laboratory Genetic Metabolic Diseases, Departments Clinical Chemistry and Pediatrics, Emma Children's Hospital, Amsterdam, The Netherlands and University Children's Hospital², Freiburg, Germany

Introduction: 3-Methylglutaconic aciduria type I due to 3-methylglutaconyl-CoA hydratase deficiency is an autosomal recessively inherited defect of leucine catabolism. Affected patients show various kinds of neurological involvement unlike the observations in the other leucine catabolic defect. The gene encoding the hydratase had not been identified thus far.

Methods: Cultured fibroblasts from two unrelated patients were studied. Their hydratase activity was tested using a novel enzyme assay, which was also used for expression studies in *E. coli*. Using the crotonase sequence we searched the database at NCBI using BLAST algorithm. Two possible candidates were identified: EST clone FLJ 10948 and *AUH* (AU-specific RNA binding protein). Both cDNA's were expressed in *E. coli* for enzymatic characteri-

sation. Thereafter both ORF's were subjected to sequence analysis in the two patients.

Results: Both EST clone FLJ 10948 and *AUH* were shown to have 3-methylglutaconyl-CoA hydratase activity. Mutation analysis in the patients revealed a nonsense mutations (R197X) and a splice-site mutation (IVS8-1g>a). No mutations were found in FLJ 10948.

Conclusions: Mutations in the *AUH* gene result in 3-methylglutaconyl-CoA hydratase deficiency. The clinical difference between this defect and the neighbouring 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency is not explained and will be the subject of further investigations. The physiological role of FLJ 10948 remains unclear.

09.45 – 10.00 uur

Disruption of a novel regulatory element in the erythroid-specific promoter of the human *PKLR* gene causes severe pyruvate kinase deficiency

R. van WIJK¹, F.C. NIELSEN², C. NERLOV³, E. BEUTLER⁴, K.M.K. de VOOGHT¹, G. RIJKSEN⁵, W.W. van SOLINGE¹

Department of Clinical Chemistry¹ and Department of Hematology⁵, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands; Department of Clinical Biochemistry², Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark; EMBL³ Mouse Biology Programme, Monterotondo-Scalo (RM), Italy; Department of Molecular & Experimental Medicine⁴, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA

Introduction: Pyruvate kinase (PK) deficiency is the most common cause of nonspherocytic hemolytic anemia due to defective glycolysis. More than 130 mutations in *PKLR* have been reported in association with this disease. Most (70%) of these mutations are missense mutations whereas only 1 mutation is known to be associated with transcriptional regulation.

Methods: RT-PCR, DNA sequence analysis, transient transfection analysis and Electrophoretic Mobility Shift Assay were performed to establish the molecular basis for PK deficiency in a 6-year old Danish boy who suffered from severe, transfusion-dependent hemolytic anemia since birth.

Results: The paternal allele exhibited the common *PKLR* c.1529G>A mutation, known to be associated with PK-deficiency. On the maternal allele, three *in cis* mutations were identified in the erythroid-specific promoter region of the gene - one deletion of thymine -248 and two single nucleotide substitutions nt

-324T>A and nt -83G>C. Analysis of the patient's RNA demonstrated the presence of only the 1529A allele, indicating severely reduced transcription from the allele linked to the mutated promoter region. Transfection of promoter constructs into erythroleukemic K562 cells showed that the most upstream -324T>A and -248delT mutations were non-functional polymorphisms. In contrast, the -83G>C mutation strongly reduced promoter activity. Site directed mutagenesis of the promoter region revealed the presence of a putative regulatory element (PKR-RE1) whose core binding motif CTCTG is located between nts -87 and -83. Electrophoretic mobility shift assay using K562 nuclear extracts indicated binding of an, as yet, unidentified *trans*-acting factor.

Conclusions: This novel element mediates the effects of factors necessary for regulation of pyruvate kinase gene expression during red cell differentiation and maturation.

10.00 – 10.15 uur

Molecular aspects and pharmacogenetic consequences of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency

A.B.P. van KUILENBURG¹, R. MEINSMA¹, A.H. van GENNIP²

Academic Medical Center¹, University of Amsterdam, Emma Children's Hospital and Department of Clinical Chemistry, Amsterdam; Academic Hospital Maastricht², Departments of Clinical Genetics and Clinical Chemistry, Maastricht, The Netherlands

Introduction: Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) is the initial and rate-limiting enzyme in the catabolism of the pyrimidine bases uracil and thymine. DPD is also responsible for the breakdown of the widely used antineoplastic agent 5-fluorouracil (5FU). In this light, a pharmacogenetic disorder has been described concerning cancer patients with a complete or partial deficiency of DPD suffering from severe toxicity, including death, following the administration of 5FU. Owing to the pharmacogenetic consequences associated with a DPD deficiency, we have performed an extensive study of the molecular aspects of patients with a DPD deficiency.

Methods: *DPYD*, the gene encoding DPD, was analyzed of pediatric patients with a complete deficiency and from tumor patients with 5FU toxicity.

Results: To date, 16 different mutations have been reported in 26 families presenting 32 patients with a complete deficiency, including 1 splice-site mutation,

3 deletions and 12 missense mutations. In patients suffering from severe 5FU-associated toxicity, 11 mutations have been identified in *DPYD* including one splice site mutation (IVS14+1G>A); one nonsense mutation (E386X); 4 missense mutations (M166V, V335L, I560S and D949V) and 5 polymorphisms (C29R, R21Q, S534N, I543V, V732I). The splice-site mutation IVS14+1G>A is by far the most common one. Furthermore, a high prevalence of the IVS14+1G>A mutation was demonstrated in the normal population, with 1.8% heterozygotes.

Conclusion: Considering the common use of 5FU in the treatment of cancer patients, the severe 5FU-related toxicities in patients with a low activity of DPD and the high prevalence of the IVS14+1G>A mutation, analysis of the DPD activity in PBM cells or screening for the IVS14+1G>A mutation should be routinely carried out prior to the start of the treatment with 5FU.

10.15 – 10.30 uur

Novel method to detect large deletions in the aspartoacylase gene (Canavan disease) and improved mutational analysis

G.S. SALOMONS¹, A. ERRAMI^{2,3}, S.J.M. van DOOREN¹, J.J.P. GILLE², G. PALS², J.P. SCHOUTEN³, O. ELPELEG⁴, C. JAKOBS¹

VU University Medical Center, Departments of Clinical Chemistry¹ and Clinical Genetics² and MRC-Holland³, Amsterdam, The Netherlands; Metabolic Disease Unit⁴, Shaare-Zedek Medical Center, Jerusalem, Israel

Introduction: Canavan disease, an autosomal recessive neurodegenerative disorder, affecting cerebral white matter, is caused by a deficiency of aspartoacylase (ASPA; MIM 271900). The biochemical hallmark is an increased level of N-acetylaspartic acid in body fluids. The identification of the molecular basis for this defect is of pivotal importance for prenatal diagnosis and carrier detection. We have set up the molecular analysis for Canavan disease not only by sequence analysis at the DNA and RNA level, but also developed a multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) test. This test allows the rapid identification of deletions or duplications of one or more exons of the *ASPA* gene. **Methods:** A BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/) search with the *ASPA* mRNA (Genbank: AC025125) against the htgs database identified a contig that contained the almost complete *ASPA* gene (Genbank: NM_000049). We

designed PCR primers for all 6 exons. Purified PCR products were directly sequenced and aligned with the *ASPA* gene. Furthermore, for the MLPA test we designed and synthesized probes specific for each of the exons. After ligation, which depends on the presence of target sequences in the DNA sample, the probes were amplified by PCR. The PCR fragments were analysed by capillary electrophoresis.

Results: In 11 unrelated patients we identified two mutant alleles per patient, including 3 deletions that comprises one or more exons of the *ASPA* gene and four other novel mutations.

Conclusions: DNA based sequence analysis of the *ASPA* gene allows the identification of mutations that remained undetected by RNA based sequence analysis. The MLPA test proved the presence of deletions. Furthermore homozygosity could be confirmed by this new method.

10.30 – 10.45 uur

Variation at the Paraoxonase (PON-1) gene is associated with carotid arterial wall thickness in subjects with Familial Hypercholesterolemia

H.A.M. VOORBIJ¹, A.C.M. JANSEN², A. BARENDRECHT¹, F.R. LEUS¹, M.W.T. TANCK³, J.C. DEFESCHE², J.J.P. KASTELEIN², M. ROEST¹

Research Laboratory Department Clinical Chemistry¹, University Medical Center Utrecht, The Netherlands and Department Vascular Medicine², Academic Medical Center Amsterdam, The Netherlands and Department Clinical Epidemiology and Biostatistics³, Academic Medical Center Amsterdam, The Netherlands

Introduction: Paraoxonase (PON-1) is a high-density lipoprotein (HDL) associated enzyme that hydrolyzes lipid peroxides *in vitro*. PON-1 inhibits oxidative modification of LDL and may therefore protect against atherosclerosis *in vivo*. PON-1 activity and PON-1 levels are highly dependent on genetic polymorphisms in the promotor region and coding region of the PON-1 gene. In this study we investigated the effect of PON-1 polymorphisms (L55M, Q192R, T-107C, C-126G, G-162A, G-824A and C-907G) contributing to both variations in PON-1 expression and PON-1 activity as well as on Intima Media Thickness (IMT) of the carotid arterial wall.

Methods: In subjects with Familial Hypercholesterolemia (FH) PON-1 levels were measured with an EIA using rabbit anti PON-1 polyclonal antibodies. Arylesterase activity was measured by a colorimetric method and IMT was measured by B-mode ultrasound measurements. Genetic polymorphisms were determined by PCR-RFLP and allele specific hy-

bridization techniques. Statistical data analyses were performed using X² test, ANOVA, t-test and linear regression analysis where it was appropriate.

Results: As expected the L55, -107C, -162A, -824A and -907G variants were associated with increased PON-1 levels and/or increased PON-1 activity, while this was not the case for the Q192R polymorphism. Remarkably, the -162A and the -824A variant were associated with an unexpected increased IMT. Homozygous individuals for the lowest PON-1 expression and activity haplotypes had also the lowest IMT-values, while homozygous individuals for haplotypes with the highest PON-1 levels and activity had the highest IMT-values.

Conclusions: Our findings suggest that genetic variation at the PON-1 locus may be associated with both increased PON-1 activity and more pronounced atherogenesis. These observations are unexpected and in conflict with the hypothesis that PON-1 would confer protection against atherosclerosis.

10.45 – 11.00 uur

HLA-DR/DQ typering in narcolepsie

J.W.P.H. SOONS¹, J. LEUVERMAN¹, P. van MIERLO², J.H.M. de GROEN²

St. Annaziekenhuis¹, klinisch chemisch laboratorium, Geldrop; Epilepsiecentrum Kempenhaeghe², Slaapwaakcentrum, Heeze

Introductie: Het antigeen HLA DR2 is geassocieerd met narcolepsie. De antigeenbepaling d.m.v. een microlymfocytotoxiciteitstest is arbeidsintensief. De komst van PCR maakt typering van HLA op DNA-niveau toegankelijk. In deze studie is de voorspellende waarde voor narcolepsie van de HLA-typering m.b.v. zowel de antigeen- als de allelbepaling bepaald.

Methoden: Van 66 opeenvolgende patiënten, verwezen naar het slaapwaakcentrum Kempenhaeghe, is een HLA-typering uitgevoerd. De diagnose narcolepsie is vastgesteld bij 27 (41%) van deze patiënten, gebruikmakend van polysomnografisch onderzoek en MSLT. De antigeenbepaling, d.m.v. een immunocytoxiciteitstest, is uitgevoerd in het CLB. De HLA-typering op DNA-niveau geschiedt met PCR en sequentiespecifieke primers. De prevalentie van de gemeten allelen is eveneens bepaald in een referentiegroep van 86 willekeurige poliklinische patiënten van het St. Annaziekenhuis.

Resultaten: De allelen HLA-DRB1*1501 en DRB5*0101 correleren volledig met respectievelijk de antigenen HLA-DR15 en HLA-DR51. De immunocytoxiciteitstest had in eerste instantie een tweetal fout-negatieve uitslagen voor het HLA-DR51-antigeen (DRB5*0101 positief), die bij herhaling positief bleken. De correlatie tussen HLA-DQB1*0602 en HLA-DQ1 is niet volledig. Alle patiënten negatief voor DQ1 zijn ook negatief voor HLA-DQB1*0602, maar 26% van de patiënten positief voor DQ1 is negatief voor DQB1*0602. De voorspellende waarde voor narcolepsie van de gemeten antigenen en allelen in deze patiëntenpopulatie staat vermeld in de tabel.

Conclusie: De negatief voorspellende waarde van zowel het antigeen HLA-DQ1 als het allel HLA-DQB1*0602 is 100% en de positief voorspellende waarde van het allel HLA-DQB1*0602 is het hoogst. Momenteel wordt standaard bij de verdenking narcolepsie het allel HLA-DQB1*0602 bepaald.

	DR15	antigenen DR51	DQ1	DRB1 *1501	allelen DRB5 *0101	DQB1 *0602
Positief voorspellende waarde (%)	65	65	41	65	65	66
Negatief voorspellende waarde (%)	96	96	100	96	96	100

Sessie 3 Analytische onderwerpen

09.00 – 09.15 uur

Sequence analysis based strategy for BCHE genotyping in families with prolonged susceptibility for succinylcholine used in surgical procedures

I.M. SMIT-WALRAVEN¹, A.L.M. STRUNK¹, A. PEPPING¹, F. van der LOGT², H. NABER³, T. NJO¹, L.D. DIKKESCHEI¹

Clinical laboratories¹, pediatric department² and anesthesia department³ of the Isala klinieken, Zwolle, The Netherlands

Introduction: Succinylcholine, an inhibitor of the acetylcholinesterase receptor, is used as a muscle relaxant during surgery. Succinylcholine is metabolised by circulating butyrylcholinesterase. Several phenotypes of the enzyme with different activities are known. Patients with low BCHE activity have prolonged muscle paralysis and apnea after narcoses on a standard doses of succinylcholine. Enzymatic test results are usually ambiguous. The 1722 b.p. long BCHE coding gene is located on the long arm of chromosome 3 at q26. At least 20 mutations, scattered over exons 2, 3 and 4 are known. RFLP testing is therefore time consuming. So far no mutations are found on exon 1.

Methods: Three patients with prolonged susceptibility for succinylcholine were tested for BCHE activity. BCHE phenotyping was based on enzyme activity and the dibucaine number. The coding BCHE gene of these patients and family members were

sequenced using PCR based direct sequence analysis. Subsequently an alignment program was adapted to compare the found sequences directly with the consensus sequence, thereby revealing all mutations present in the exons 2, 3 and 4.

Results: Mutations A209G(Asp70Gly) and G1615A(Ala539Thr) were detected in two families. In one of these families the patients were phenotyped as either AA or SS in the other family the patients were phenotyped as UA. The patient in the third family was, although the BCHE activity was reduced with 97%, phenotyped as UA, sequence analysis showed a G424A(Val142Met) mutation.

Conclusions: Although in two of the three cases genotypes correlate well with phenotypical enzyme activities, in the third case sequence analysis is required to establish the true genotype. For segregation of the mutations within the family, heterozygote testing based on sequence analysis is mandatory.

09.15 – 09.30 uur

Ontafeling van een nieuw moleculair mechanisme waarmee prostaglandine-E₂ het effect van erythropoëetine op erytroïde cellen versterkt

A.K. BOER^{1,3}, A. L. DRAYER^{1,2}, E. VELLENGA¹

Academisch Ziekenhuis Groningen¹, Afdeling Hematologie, Interne Geneeskunde, Sanquin Noord Nederland², Werkadres: Medisch Spectrum Twente³, Laboratorium, Enschede

Inleiding: Erythropoëetine (Epo) is van essentieel belang voor de erythropoëse, maar ook ander groeifactoren zijn vereist, zoals stamcelfactor en prostaglandines. Het synergistische effect van deze groeifactoren op de werking van Epo is zeer belangrijk, maar wordt op moleculair niveau slecht begrepen. Een belangrijke rol binnen de erythropoëse is weggelegd voor de transcriptiefactor STAT5. Deze transcriptiefactor reguleert de genexpressie van verschillende anti-apoptotische en celcyclus-regulerende eiwitten. In deze studie is de synergie tussen prostaglandine-E₂ (PGE₂) en Epo bestudeerd, waarbij met name het effect op STAT5 centraal stond.

Methoden: In verscheidene erytroïde cellijnen werd de activiteit van STAT5 bestudeerd als gevolg van stimulatie met Epo, PGE₂ of de combinatie van beiden. Bovendien werden stimulators en inhibitoren gebruikt om de betrokkenheid van additionele kinasen te kunnen vaststellen. De fosforylatie van STAT5 werd bestudeerd met behulp van Western blotting en fosfospecifieke antilichamen. De DNA-binding van STAT5 werd geanalyseerd met 'Electromobility shift-assays' (EMSA's) en de transcriptionele activiteit van STAT5 werd gemeten met transiënte transfecties met een STAT5-luciferase reporter construct.

Resultaten: In erytroïde cellen induceert Epo een

sterke toename van STAT5-activiteit (fosforylatie, DNA-binding en gentransactivatie). PGE₂ daarentegen geeft géén STAT5-activatie. Worden cellen gestimuleerd met zowel PGE₂ als STAT5, dan zien we een zesvoudige toename van STAT5-transactivatie ten opzichte van Epo-gestimuleerde cellen. De STAT5-fosforylatie en DNA-binding zijn echter niet verhoogd, wat duidt op een interventie op transcriptio-

neel niveau. Nader onderzoek wees uit welke additionele eiwitten door PGE₂ worden geactiveerd.

Conclusie: Dit onderzoek laat zien dat PGE₂ een wezenlijke bijdrage kan leveren aan de erythroïde genexpressie, mits Epo ook aanwezig is. Bovendien hebben we de eiwitten kunnen identificeren die verantwoordelijk zijn voor dit 'nieuwe' mechanisme.

09.30 – 09.45 uur

Consensus microscopische differentiatiecriteria ADVIA 120: Het instellen van een grens voor neutrofiële granulocyten (absoluut of percentueel) leidt niet tot een efficiëntere detectie van staafvormige granulocyten

J.G. BOONSTRA¹, W. GRAVELAND², G. BIKKER¹; namens de ADdIVIA werkgroep

Afd. Klinische Chemie¹, Afd. Trial en Statistiek², Erasmus MC Daniel den Hoed Oncologisch Centrum, Rotterdam

Introductie: De ADdIVIA werkgroep tracht te komen tot een landelijke consensus betreffende microscopische differentiatiecriteria voor de Advia 120. Onze eerder gepresenteerde nationale multicenterstudie liet zien dat de grens voor LUC aanzienlijk hoger kon worden vastgesteld zonder dat significante bevindingen in het uitstrijkje werden gemist. Vanwege echter de grote interanalist-variantie in de beoordeling van staafvormige granulocyten, kon de optimale grens voor neutrofielen nog niet worden vastgesteld. In de huidige studie werd onderzocht of deze grens hoger gezet kan worden dan 80% of 8x10E9/l.

Methode: Door 5 laboratoria werden 256 monsters verzameld welke voldeden aan volgende inclusiecriteria: differentiatie aangevraagd; neutrofielen >80% en/of >8x10E9/l; geen alarmvlag voor atypische cellen, blasten, onrijpe granulocyten, erytroblasten of trombocytengregagatie. Uitstrijkjes van ieder monster werden vervolgens centraal beoordeeld door 2 specialistisch analisten van het Erasmus MC Daniel den Hoed.

Resultaten: Bij 74/256 monsters gaf de analyzer een left-shift-alarm. In 13/256 uitstrijkjes werd meer dan 5% staven gezien (7-26%) en 12/13 hadden een left-shift-alarm. Wanneer de grens voor microscopische differentiatie zou worden vastgesteld op neutrofielen >90% of >15x10E9/l zouden respectievelijk 7/13 en 6/13 monsters met staven gemist worden. In 35/256 monsters werd 1, en in 4/256 werden 2 (meta-)myelocyten gezien. In 106/156 strijkjes werd hypersegmentatie waargenomen. Noch een grens voor neutrofielen, noch een alarmvlag leken deze bevindingen te kunnen voorspellen.

Conclusies: Op de Advia 120 is het left-shift-alarm een betere voorspeller voor de aanwezigheid van staven (PVN 99%, PVP 16%) dan het aantal of percentage neutrofiële granulocyten. Het achterwege laten van een neutrofielen grens als differentiatiecriteria is naar mening van de werkgroep veilig, en levert een aanzienlijke besparing op van het aantal uit te voeren microscopische differentiaties.

09.45 – 10.00 uur

Negatieve resultaten voor HDL-cholesterol: interferentie door M-proteïne of polyclonaal gammaglobuline

A.J. BAKKER¹, A. ZIJLSTRA¹, B. van der VEEN¹, M.P. LEEMHUIS²

St. Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Medisch Centrum Leeuwarden, afd. Interne Geneeskunde², Leeuwarden

Inleiding: Kort na de introductie van een nieuwe reagensformule voor de directe bepaling van HDL-cholesterol werd bij een patiënt een negatief resultaat gevonden. Omdat het om een patiënt met een M-proteïne in het bloed bleek te gaan, is nader onderzoek gedaan om te kijken of dit vaker voorkomt en of vals-verlaagde resultaten ook aannemelijk zijn.

Methoden: Voor de analyse van HDL-cholesterol is gebruik gemaakt van het Roche-reagens HDL-cholesterol plus 2nd generation dat wordt toegepast op een Modular analyzer (Roche). Tevens werd de analyse uitgevoerd met het voorgaande reagens (HDL-cholesterol plus) en met de wolframaatprecipitatie methode.

De monsters (Li-heparineplasma), die voor de analyses zijn gebruikt, waren afkomstig van patiënten waarvoor een eiwitspectrum was aangevraagd.

Resultaten: In een pilot study bleek dat bij twee patiënten met een M-proteïne en 1 patiënt met een polyclonale hypergammaglobulinemie een negatief resultaat voor HDL-cholesterol (2nd generation test) werd gevonden. In een vervolgstudie werden monsters op basis van de eiwitspectra ingedeeld in wel/geen M-proteïne. Vervolgens werd het reactiepatroon van beide HDL-cholesterolbepalingen beoordeeld en ingedeeld in afwijkend/normaal, waarbij onderstaande resultaten werden gevonden:

Indeling patiëntenmonsters	HDL-chol plus (negatief resultaat)	HDL-chol plus 2 nd generation (negatief resultaat)
Geen M-proteïne; normaal reactiepatroon	32 (0)	30 (0)
M-proteïne; normaal reactiepatroon	21 (0)	21 (0)
Geen M-proteïne; afwijkend reactiepatroon	0 (0)	2 (2)
M-proteïne; afwijkend reactiepatroon	4 (0)	4 (0)

Conclusie: Bij patiënten met een M-proteïne en bij patiënten met een polyclonaal verhoogd gammaglobuline kunnen incidenteel negatieve resultaten voor HDL-cholesterol worden gevonden. Deze interferen-

tie lijkt in eerste instantie afhankelijk van de concentratie immuunglobuline. Op basis van het reactiepatroon moet echter ook het optreden van fout-verlaagde resultaten niet worden uitgesloten.

10.00 – 10.15 uur

Prestaties van de Bayer cardiaal troponine I-bepaling op de Advia-Centaur

D. TELTING¹, Y. FOOLEN², R. MICHELS², A.P.M. SCHELLEKENS¹

Algemeen Klinisch Laboratorium¹ en Afdeling Cardiologie², Catharina-Ziekenhuis, Eindhoven

Introductie: De troponine I (cTnI)-bepaling op de Advia Centaur (Bayer) is een “sandwich” immunoassay voor de bepaling van cTnI in serum en heparineplasma (2). De analytische prestatie van deze test werd door ons bepaald.

Methoden: De bepaling werd vergeleken met de troponine T (cTnT)-bepaling van de firma Roche, hiervoor werden 120 monsters van zowel cardiologische patiënten (95 stuks) als controles (25 stuks) gebruikt. Bovendien werd de precisie bepaald conform NCCLS-evaluatieprotocollen.

Resultaten: Wanneer voor de cTnI-bepaling een afkappunt van 0,16 µg/l werd gehanteerd, dan was 98% van de cTnI-positieve monsters eveneens positief in de cTnT-assay. Verder liet 59% van de cTnI-negatieve monsters een eveneens negatieve cTnT zien. Er waren 11 patiënten met cardiale klachten waarbij een positieve cTnI-uitslag werd verkregen, terwijl de bijbehorende cTnT-uitslag negatief was. Lage concentraties cTnI (0,35-3,3 µg/l) gingen samen met een

precisie die in lijn lag met gegevens uit de recente literatuur en de opgaaf van de fabrikant. Bij het 99^{ste} percentiel voor cTnI werd een precisie van 22% gevonden.

Conclusie: De resultaten van deze studie suggereren dat de cTnI-assay van Bayer gevoeliger is dan de cTnT-assay van Roche. De precisie voldeed echter niet aan de aanbevelingen in het consensusdocument van de “European Society of Cardiology” en het “American College of Cardiology”: in dit document wordt een precisie van 10% bij het 99^{ste} percentiel aanbevolen (1).

Literatuur:

1. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined—a consensus document of The Joint ESC/ACC Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2000; 36: 959-969.
2. Advia Centaur Assay Manual. Bayer, Mijdrecht-Nederland, 2000.

10.15 – 10.30 uur

Flow cytometric measurements of cell-death kinetics by using fluorescent caspase inhibitors

F. WOLBERS, P. BUIJTENHUIJS, C. HAANEN, I. VERMES

Department of Clinical Chemistry, Medisch Spectrum Twente, Enschede

Introduction: The aim was to set up a quantitative, reproducible flow cytometric method to measure cell death kinetics. An essential part of apoptotic cell death includes the activation of cell death proteases, caspases. Exposure of cells to a fluorochrome labeled inhibitor of caspases (FLICA) labels cells during caspase activation and arrests apoptotic cell death. The arrested apoptotic cells can be identified and quantified by flow cytometry.

Method: HL60 cells were incubated for 6, 12, 18, 24, 36 and 48 hours with 0.15 µM camptothecin, to ini-

tiate apoptosis, in the continuous presence of the caspase inhibitor FAM-VAD-FMK (0.20 µM, FLICA). In some samples, HL60 cells were treated with FLICA only during the final hour of incubation. The samples were counterstained with 1 µg/ml Propidium Iodide (PI). Cell fluorescence was measured by flow cytometry.

Results: Four distinct subpopulations were distinguished, based on differences in fluorescence intensity. The subpopulations presented the sequential transitions from the stage when HL60 cells were both

FLICA and PI negative (viable cells), through the stage when their caspases become enzymatically activated (FLICA⁺/PI⁻; early apoptotic), followed by loss of their plasma membrane integrity (FLICA⁺/PI⁺; late apoptotic). Finally, HL60 cells lost their ability to bind FLICA (FLICA⁻/PI⁺; necrotic). In the continuous presence of FLICA, the transition from FLICA⁺/PI⁺ to FLICA⁻/PI⁺ was prevented. The arrested apoptotic

cells can be quantified in relation to time of induction of apoptosis.

Conclusion: This assay is suitable to measure apoptosis and follow the cell death kinetics over time in different cell types. We showed here that in the presence of camptothecin and FLICA the amount of viable cells decreased, whereas the amount of early and late apoptotic cells increased.

10.30 – 10.45 uur

Tissue transglutaminase mRNA expression: a novel technique to measure apoptotic cell death

E.B. VOLOKHINA, R. HULSHOF, I. VERMES

Department of Clinical Chemistry, Medisch Spectrum Twente, Enschede, The Netherlands

Introduction: Tissue transglutaminase (tTG) is a transamidating enzyme, which catalyses the cross-linking reactions of intracellular proteins. tTG is activated during late stages of the cell death cascade and plays a key role in the formation of apoptotic bodies. The aim of this study was to determine whether tTG mRNA expression level could be used for the detection and quantification of apoptosis.

Methods: Expression of tTG mRNA was determined using TAQMAN, a novel quantitative RT-PCR technique. The mRNA expression was measured in cultured cells (MCF-7, HL60) and in EDTA blood samples that were treated *in vitro* to induce apoptosis. To induce cell death ionising radiation (4Gy and 8Gy) and steroid treatment were used.

Results: The technique proved to be reliable, reproducible (inter-assay and intra-assay CV's of 2.5-6.0% measured at two levels), and specific (no effect of necrotic cell death). tTG mRNA expression increases in response to ionising radiation and steroid treatments. The expression changes in the dose dependent manner in the cultured cells as well as in the EDTA blood treated *in vitro*. The increase in detected mRNA expression level was up to 20 times, depending on the intensity of cell death induction.

Conclusion: tTG mRNA expression level increases significantly in response to apoptosis inducing treatment. The observed changes are dose and time dependent. This leads to the conclusion that tTG expression can be used as a novel parameter for detection and quantification of apoptosis.

10.45 – 11.00 uur

Gene-specific monitoring of T7-based RNA amplification by real-time quantitative PCR using molecular beacons

S.G. HEIL¹, L.A.J. KLUIJTMANS¹, O SPIEGELSTEIN², R.H. FINNELL², H.J. BLOM¹

Department of Pediatrics¹; Laboratory of Pediatrics & Neurology, UMC Nijmegen, The Netherlands; Center for Environmental and Genetic Medicine²; Institute of Biosciences and Technology, Texas A&M University System Health Science Center, Houston, Texas, USA

Introduction: T7-based amplification of RNA is a technique, which is readily adaptable to many downstream applications, when there is not sufficient RNA. Overall extent of amplification can be measured spectrophotometrically (i.e. quantifying RNA yields), but this measurement does not give specific information about RNA amplification of individual genes. We describe a method applying real-time quantitative PCR using molecular beacons (Q-PCR_{MB}), which enables monitoring of RNA amplification of individual genes.

Methods: RNA was amplified by T7-based RNA amplification, which was subsequently used in Q-PCR_{MB} for three housekeeping genes: β 2-microglobulin (B2M), porphobilinogen deaminase (PBGD),

and serine dehydratase (SDH).

Results: Q-PCR_{MB} appeared to be suitable to determine the extent of RNA amplification as was reflected by the intra- and interrun coefficients of variation of threshold cycle (CV_{CT}) of 1.1% to 2.1%. Application of Q-PCR_{MB} to monitor characteristics of RNA amplification showed that RNA amplification is reproducible but might introduce a sequence-specific bias, which was reflected by an amplification of 57.0 ± 25.1 times for B2M, 77.4 ± 32.6 times for PBGD, and 30.4 ± 15.8 times for SDH (ANOVA, $P = 0.002$).

Conclusions: Q-PCR_{MB} is a novel approach to monitor RNA amplification, and is particularly suited to study RNA amplifications of individual genes.