

centers participated in analyzing test samples of fetal and adult blood mixtures with 0.05-3.46% fetal cells. Five different methods are in use and three of these are available as commercial kits. The number of cells, examined according to the different protocols ranged between 300 and > 200.000. Furthermore, three different methods are used for the calculation of the fetomaternal transfusion or hemorrhage volume (FMT). The results of the test samples differ between the centers and methods. Occasionally, results differed over 200%. In cord

blood, the percentage of unstained, negative cells varied between 2 and 15 percent. The volumes of the FMT, calculated from the test samples results, were not corrected for this effect. Therefore, the FMH volume is often underestimated and this may result in inadequate anti-D immunoprophylaxis. Following the BCSH guidelines and using a quality assurance scheme may improve the quality of the Kleihauer test outcomes.

Keywords: Fetomaternal transfusion; Kleihauer-Betke test

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2005; 30: 249-254

Enzymdiagnostiek van lysosomale stapelingsziekten in gedroogde bloedspots

G.J.G. RUIJTER, N. EL BOUYAKOUBI, R. de VRIES en B.J.H.M. POORTHUIS

Enzymdiagnostiek van lysosomale stapelingsziekten wordt doorgaans uitgevoerd in leukocyten of plasma. Recent zijn methoden ontwikkeld voor activiteitsmeting van lysosomale enzymen in een nieuw type monster, gedroogde bloedspots (DBS). In dit artikel beschrijven we de invoering van DBS in de lysosomale enzymdiagnostiek in ons laboratorium. Van 15 lysosomale enzymen kon de activiteit betrouwbaar in 3 mm DBS-ponsjes gemeten worden en werden referentiewaarden vastgesteld. Inter-assay-CV's varieerden van 6 tot 14% voor de verschillende enzymen. Alle enzymen hadden tenminste 85% restactiviteit na 1 maand opslag bij 20-25 °C. Lysosomale enzymen zijn derhalve opvallend stabiel in DBS, hetgeen een groot voordeel kan zijn bij verzending. Niet alle lysosomale enzymen zijn meetbaar in DBS en dit type analyse kan daarom de bepaling in leukocyten nog niet vervangen. DBS zijn echter zeer geschikt voor gerichte onderzoeksvragen waarbij een beperkt aantal lysosomale enzymen bij een patiënt getest dient te worden.

Trefwoorden: lysosomale stapelingsziekten; gedroogde bloedspot; enzymdiagnostiek; 'Guthrie card'

Het gebruik van gedroogde bloedspots op filtreerpapier (dry blood spot; DBS) in de routine diagnostiek is met name bekend uit neonatale screening programma's. Met deze 'Guthrie-kaarten' worden in Nederland pasgeborenen getest op aanwezigheid van drie erfelijke aandoeningen, te weten fenylketonurie (PKU), congenitale hypothyreoïdie (CHT) en adrengenitaal syndroom (AGS). In sommige andere landen zijn meer uitgebreide screeningsprogramma's geïm-

plementeerd en wordt b.v. ook getest op erfelijke stoornissen in het aminozuurmetabolisme en/of de vetzuuroxidatie.

Voor alle bovenbeschreven aandoeningen wordt in de DBS gezocht naar afwijkende concentraties van metabolieten. Bepaling van enzymactiviteiten in DBS is minder gangbaar. Slechts enkele tests zijn beschreven zoals voor bepaling van glucose-6-fosfaatdehydrogenase (1) en biotinidase (2). Recent is duidelijk geworden dat DBS ook geschikt zijn als monster voor meting van een groot aantal lysosomale enzymen (3-5). Voor de diagnostiek van lysosomale stapelingsziekten is de meting van de activiteit van lysosomale enzymen noodzakelijk (6). De lysosomale stapelingsziekten vormen een heterogene groep van erfelijke aandoeningen, waarbij er als gevolg van de deficiëntie van een lysosomaal enzym een defect is in de afbraak van macromoleculen zoals glycosaminoglycanen, glycolipiden en oligosacchariden afkomstig van glycosyleerde eiwitten (6, 7).

Tot nu toe wordt enzymdiagnostiek van lysosomale stapelingsziekten uitgevoerd in leukocyten, plasma en in een enkel geval gekweekte huidfibroblasten. Vanwege de zeldzaamheid en het erfelijke karakter van lysosomale stapelingsziekten vindt enzymdiagnostiek slechts plaats in een klein aantal gespecialiseerde laboratoria verbonden aan de klinisch-genetische centra. Hierdoor is het over het algemeen noodzakelijk bloedmonsters te verzenden en om verlies van enzymactiviteit gedurende verzending te voorkomen wordt dit meestal per koerierdienst gedaan. Desondanks ondervinden wij regelmatig dat bloedmonsters bij ontvangst te oud zijn om nog leukocyten uit te kunnen isoleren. In de literatuur wordt beschreven dat lysosomale enzymen zeer stabiel zijn in DBS (3-5) en de bloedspot zou daarom een nuttig extra type monster kunnen zijn. In dit artikel beschrijven we de mogelijkheden en beperkingen van meting van lysosomale enzymen in gedroogde bloedspots en de implementatie van dit nieuwe type monster in ons laboratorium.

Laboratorium Metabole Ziekten, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden

Correspondentie: dr. G.J.G. Ruijter, Laboratorium Metabole Ziekten, LUMC, Gebouw 1, P3-P, Postbus 9600, 2300 RC Leiden
E-mail g.j.g.ruijter@lumc.nl

Materiaal en Methoden

Bloedspots

Na opbrengen van bloed (65 μ l per spot) op filterpapier (Schleicher & Schuell nr 903) werden de bloedspots overnacht gedroogd bij kamertemperatuur en vervolgens bewaard bij 4 °C in afgesloten plastic zakjes.

Monsters van patiënten met een lysosomale stapelingsziekte en controlemonsters werd verkregen door routinematig bloedspots te maken van bloedmonsters die voor lysosomale enzymdiagnostiek aan ons laboratorium werden aangeboden. Een controlemonster werd verkregen door een groot aantal spots te maken van bloed van een gezond controlepersoon en dit monster werd gedurende ongeveer 1 jaar in alle bepalingen gebruikt.

Enzymassays

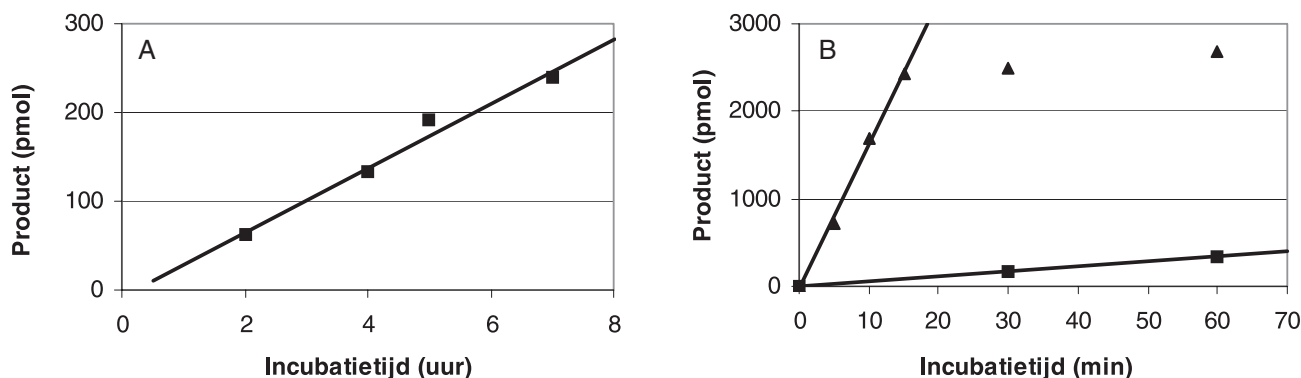
Enzymmetingen werden uitgevoerd met 3 mm ponsjes (hetgeen overeenkomt met 3,4 μ l bloed) gemaakt met een kniptang. Uit een goede bloedspot (geheel gevulde cirkel) kunnen ongeveer 10 ponsjes van 3 mm geponst worden. Bij alle enzymassays die in dit onderzoek getest zijn werd gebruik gemaakt van artificiële substraten die een 4-methylumbelliferyl (4MU)-groep bevatten (8). De volgende enzymen werden gemeten: α -L-iduronidase, β -D-glucuronidase, α -L-fucosidase, α -D-mannosidase, N-acetyl- β -D-glucosaminidase A + B, β -D-galactosidase, β -D-galactosidase en β -D-glucosidase, alle als beschreven in (8); N-acetyl- α -D-glucosaminidase (9); arylsulfatase B (10); β -D-mannosidase (11); N-acetyl- α -D-galactosaminidase (12); N-acetyl- β -D-glucosaminidase A (13), chitotriosidase (14) en palmitoyl-proteïne-thio-esterase (15). Incubaties werden uitgevoerd bij 37 °C in Eppendorf-reactievaatjes met een incubatievolume van 30-150 μ l afhankelijk van het te meten enzym. Reacties werden gestopt met 0,2 mol/l carbonaat-glycine pH 10,5, zodat een eindvolume van 1,5 ml werd verkregen. Vrij 4-methylumbelliferron, het product van de enzymreacties, werd gemeten met een fluorimeter met een 'sipper' opzet (Shimadzu RF-1501; excitatiegolflengte 366 nm, emissiegolflengte 442 nm) door vergelijking van monsters met een ijklijn van 0-1 nmol 4MU. Het was niet nodig het filterpapier te verwijderen voor fluorescentie-

meting. Alle metingen werden in duplo uitgevoerd met een duplo blanco meting (filterpapier zonder bloed), tenzij anders aangegeven. In alle bepalingen werd tevens de activiteit van een controlemonster gemeten.

Resultaten

Voor een groot aantal bepalingen van lysosomale enzymen wordt gebruik gemaakt van synthetische substraten die een 4-methylumbelliferyl(4MU)groep bevatten. Na hydrolyse van het substraat door het enzym wordt het vrijgemaakte 4-methylumbelliferron door middel van fluorometrie bepaald. Een potentieel probleem bij het gebruik van DBS is quenching van fluorescentie door hemoglobine. Door een reeks 4MU-concentraties te meten in aan- en afwezigheid van 3,4 μ l bloed, overeenkomend met de hoeveelheid in 1 DBS-ponsje met diameter 3 mm, werd vastgesteld dat quenching in de door ons gebruikte experimentele opzet 10-15 % bedroeg. Dit is relatief weinig en vormt geen belemmering voor het gebruik van DBS.

Standaard incubatiecondities (buffer, pH, substraatconcentratie en eventuele toevoegingen) zoals in gebruik in de routinediagnostiek, waarbij o.a. met leukocytenhomogenaten gewerkt wordt, voldeden in de bepalingen met DBS. De hoeveelheid monster kan echter niet gevarieerd worden en bedraagt 1 DBS-ponsje. Voor elke enzymbepaling werd daarom het gebied bepaald waarin er een lineaire relatie was tussen incubatietijd en productopbrengst. Figuur 1A geeft dit verband voor α -D-galactosidase. Hieruit werd een optimale incubatietijd gekozen. Criteria hierbij waren een hoeveelheid product dat betrouwbaar gemeten kon worden en een praktische incubatietijd. Voor α -D-galactosidase werd 6 uur gekozen. Voor de meeste lysosomale stapelingsziekten is er sprake van een enzymdeficiëntie en wordt er zeer lage activiteit gemeten voor het deficiënte enzym in vergelijking met met referentiewaarden. Er zijn echter enkele uitzonderingen, zoals sterk verhoogde activiteit van chitotriosidase in plasma van symptomatische Gaucherpatiënten (figuur 1B) en sterk verhoogde activiteit van N-acetyl- β -D-glucosaminidase A + B in plasma van patiënten met mucopolipidose type II of III. In dit geval dient met DBS korter dan gebruikelijk te worden geïncubeerd (5-10 min i.p.v. 1 uur) om een correcte activiteit te meten.



Figuur 1. Productvorming als functie van incubatietijd. Hoeveelheid product per DBS-ponsje voor (A) α -D-galactosidase bij een gezond controlepersoon en (B) chitotriosidase van een gezond controlepersoon (■) en een Gaucher-patiënt (▲).

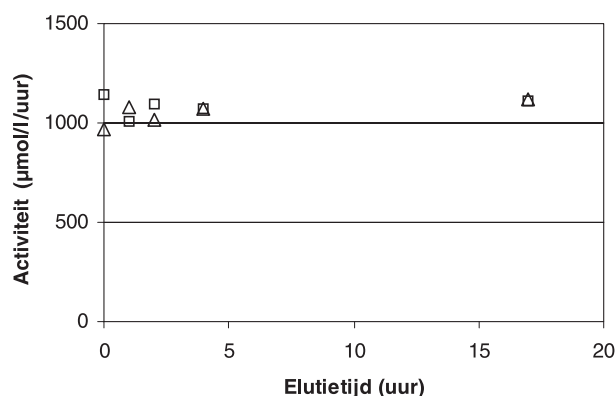
Preïncubatie van de DBS-ponsjes in water of buffer vóór het uitvoeren van de activiteitsmeting, met andere woorden elutie van de enzymen, resulteerde niet in verhoging van de gemeten activiteit (figuur 2). Preïncubatie was daarom niet nodig, zelfs niet voor enzymmetingen waarbij een relatief korte incubatietijd wordt toegepast, zoals bij N-acetyl- β -D-glucosaminidase A + B (figuur 2).

DBS verkregen door vingerprik of door pipetteren van EDTA-bloed (verkregen door een vena-punctie) gaven vergelijkbare enzymactiviteiten. In DBS van vingerprik en van EDTA-bloed was β -D-galactosidase activiteit respectievelijk 86 en 89 $\mu\text{mol l}^{-1} \text{uur}^{-1}$, terwijl de N-acetyl- β -D-glucosaminidase A + B activiteit in deze monsters respectievelijk 821 en 830 $\mu\text{mol l}^{-1} \text{uur}^{-1}$ bedroeg.

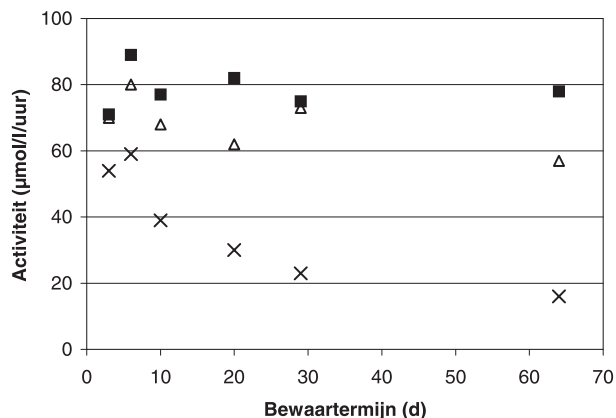
De stabiliteit van lysosomale enzymen in DBS werd uitgebreid getest voor α -L-iduronidase, β -D-galactosidase (Fig. 3) en N-acetyl- β -D-glucosaminidase A + B. Deze 3 enzymen behielden minstens 95 % van de oorspronkelijke activiteit gedurende 1 maand opslag bij 4 °C en minstens 85 % bij kamertemperatuur (20-25 °C). Hogere temperaturen zouden kunnen voorkomen bij verzending tijdens warme weersomstandigheden. Om het effect hiervan te testen werd een tamelijk extreme conditie gekozen en werden DBS bij 50 °C bewaard. Onder deze omstandigheden nam de hoeveelheid actief enzym sneller af, maar was in het geval van β -D-galactosidase en N-acetyl- β -D-glucosaminidase A + B na 2 weken toch nog 40-50 % van de oorspronkelijke hoeveelheid. α -L-iduronidase bleek bijzonder stabiel te zijn in DBS. Voor dit enzym was er na 2 weken opslag bij 50 °C nog 80 % restactiviteit. Voor alle andere lysosomale enzymen die gemeten kunnen worden in DBS werd minstens 90 % restactiviteit gemeten na opslag gedurende 1 maand bij kamertemperatuur.

Intra-assay ('within-run')variatie werd bepaald door van 4 of 5 monsters de activiteit in 5-voud te meten in één bepaling en bedroeg 5-10 % voor de enzymen genoemd in tabel 1. Interassay ('day-to-day')variatie werd bepaald door van 4 monsters de activiteit 5 maal te meten op verschillende dagen gedurende een periode van één maand en was 6-14 %. De hoogste interassayvariatie werd gevonden voor β -D-glucosidase (14 %). Referentiewaarden werden vastgesteld voor alle enzymen die in DBS gemeten konden worden (tabel 1). Er was geen goede correlatie tussen enzymactiviteiten gemeten in DBS enerzijds en leukocyten homogenaten of plasma anderzijds. Waar voor sommige bloedmonsters hoge enzymactiviteit gevonden werd in leukocyten en lage activiteit in DBS, was voor andere monsters het omgekeerde het geval. Dit hangt samen met de complexe samenstelling van DBS (zie ook discussie). Een belangrijk aspect van een enzymassay is dat hiermee patiënten onderscheiden kunnen worden van niet-patiënten. Voor de meeste enzymassays was dit het geval. Voor zover patiëntmonsters beschikbaar waren zijn de waarden die hiermee werden verkregen weergegeven in tabel 1. In de meeste gevallen lag de gemeten activiteit in patiëntmonsters buiten het gebied van de referentiewaarden, over het algemeen ver hieronder. Er waren echter enkele uit-

zonderingen. De α -D-galactosidaseactiviteit van vrouwelijke patiënten met de ziekte van Fabry, een X-gebonden aandoening, lag zowel onder als in het gebied van de referentiewaarden, terwijl mannelijke patiënten allen lage activiteit hadden (figuur 4). In onze metingen had 36 % (4/11) van de vrouwelijke M.-Fabry-patiënten 'normale' α -D-galactosidaseactiviteit, hetgeen goed overeenkomt met gegevens uit de literatuur (16). De β -D-glucosidaseactiviteit bij patiënten met de ziekte van Gaucher type I lag in een enkel geval maar net onder de referentiewaarden. De hoogst gemeten patiëntwaarde bedroeg meer dan 50 % van de laagst gemeten controlewaarde (tabel 1). De sensitiviteit en specificiteit zijn hier nog niet duidelijk en β -D-glucosidase meting alleen kan daarom niet gebruikt worden voor diagnostiek van M. Gaucher. Wel is het zo dat symptomatische M. Gaucher-patiënten verhoogde chitotriosidaseactiviteit hebben in plasma. De combinatie van verlaagde β -D-glucosidaseactiviteit en verhoogde chitotriosidaseactiviteit wijst dan op M. Gaucher. Bij twijfel is bevestiging van de bevindingen in leukocyten en plasma nodig.



Figuur 2. Het effect van preïncubatie van DBS-ponsjes (elutie van enzym) op de gemeten activiteit van N-acetyl- β -D-glucosaminidase A + B. DBS-ponsjes werden gedurende verschillende tijden (0-24 uur) bij 4 °C geïncubeerd in 50 μl water (\square) of citraat/fosfaatbuffer pH 4,4 (Δ). Vervolgens werd 100 μl substraatoplossing toegevoegd en werd de enzymincubatie uitgevoerd bij 37 °C.

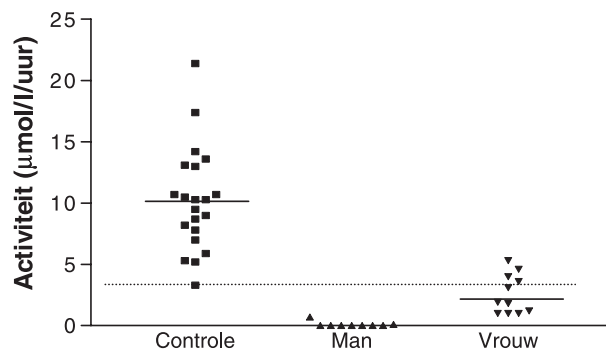


Figuur 3. Stabiliteit van β -D-galactosidase in DBS tijdens opslag bij verschillende temperaturen. Na het aanmaken en overnachten drogen bij kamertemperatuur werden DBS bij 4 °C (\blacksquare), kamertemperatuur (Δ) en 50 °C (X) opgeslagen en werd op een aantal momenten de β -D-galactosidaseactiviteit bepaald.

Discussie

Gedroogde bloedspots (DBS) zijn geschikt voor meting van de activiteit van een aanzienlijk aantal lysosomale enzymen. Van 15 enzymen kon de activiteit in DBS betrouwbaar gemeten worden met de gangbare 4-methylumbelliferyl(4MU)substraten (tabel 1). Deze 15 enzymen werden gekozen, omdat de bepaling hiervan relatief eenvoudig is. Voor N-acetyl- α -D-neuraminidase, N-acetylgalactosamine-6-sulfaatsulfatase en galactocerebrosidase werd geen activiteit gevonden. Mogelijke verklaringen hiervoor zijn onvoldoende stabiliteit van de enzymen, remming van enzymactiviteit door bloedcomponenten, of het membraangebonden karakter van de enzymen. Van een aantal andere enzymen werd de geschiktheid van DBS nog niet getest. Hier zijn uiteenlopende redenen voor, zoals onvoldoende enzymactiviteit en interferentie door hemoglobine bij gebruik van chromogene substraten. Voor zover monsters van patiënten met een lysosomale stapelingsziekte beschikbaar waren konden enzymdeficiënties of sterk verhoogde enzymactiviteiten goed onderscheiden worden van normale controles. Op dit moment kan in ons laboratorium ongeveer 40 % van de Nederlandse patiënten met een lysosomale stapelingsziekte met behulp van DBS gediagnosticeerd worden.

Er was geen goede correlatie tussen enzymactiviteiten gemeten in DBS enerzijds en leukocyten homogenaten of plasma anderzijds. Bovendien vonden wij voor DBS een grotere spreiding in referentiewaarden. Dit is niet verrassend en de oorzaak hiervan ligt in de aard van het materiaal. DBS is een mengsel van plasma en diverse typen bloedcellen die mogelijk



Figuur 4. α -D-Galactosidaseactiviteit in controlemonsters en in monsters van mannelijke en vrouwelijke patiënten met de ziekte van Fabry. Voor de controlemonsters en de vrouwelijke Fabry-patiënten is de mediaan waarde aangegeven door een korte lijn. De ondergrens van het referentiegebied is aangegeven met een stippellijn.

verschillende expressie vertonen van lysosomale enzymen. Bij verschillende personen kan er uiteenlopende mate van uitscheiding van een enzym in plasma zijn. Daarnaast kunnen er wisselende gehalten van bloedcellen zijn (bv. leukocytose). Hierdoor kunnen sterk uiteenlopende enzymactiviteiten gemeten worden. Het is daarom des te meer van belang één of meerdere controle-enzymen te meten bij het vaststellen van een deficiëntie in DBS.

Meting in DBS heeft een aantal duidelijke voordelen ten opzichte van het gebruik van leukocyten (en plasma) geïsoleerd uit volbloed. Voor de patiënt is de kleine hoeveelheid bloed die nodig is voor diagnostiek (~0.3 ml) gunstig. Een vingerprik voldoet in veel gevallen. Het laboratorium heeft met name profijt

Tabel 1. Activiteiten van lysosomale enzymen gemeten in DBS

Ziekte	Enzym ^a	Referentiewaarden ^b ($\mu\text{mol l}^{-1} \text{uur}^{-1}$)	Patientwaarden ^c ($\mu\text{mol l}^{-1} \text{uur}^{-1}$)
<i>Mucopolysaccharidosen</i>			
Hurler/Scheie (MPS I)	α -L-iduronidase	3,3 - 13,6	0,3; 0,7 (n=2)
Sanfilippo type B (MPS IIIB)	N-acetyl- α -D-glucosaminidase	3,1 - 15,5	0,1 (n=1)
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Arylsulfatase B	8,5 - 32	1,4 (n=1)
Sly (MPS VII)	β -D-glucuronidase	22 - 168	0 (n=1)
<i>Oligosaccharidosen</i>			
Fucosidose	α -L-fucosidase	36 - 205	2 (n=1)
α -mannosidose	α -D-mannosidase	40 - 126	-
β -mannosidose	β -D-mannosidase	44 - 131	-
Schindler	N-acetyl- α -D-galactosaminidase	2,5 - 7,8	-
<i>Mucolipidosen</i>			
Mucolipidose type II/III	N-acetyl- β -D-glucosaminidase A + B	565 - 1206	5925 (n=1)
<i>Sphingolipidosen</i>			
GM-1 gangliosidose	β -D-galactosidase	27 - 151	-
Tay-Sachs	N-acetyl- β -D-glucosaminidase A	57 - 147	7 (n=1)
Sandhoff	N-acetyl- β -D-glucosaminidase A + B	565 - 1206	-
Gaucher	β -D-glucosidase	1,3 - 6,2	0 - 0,7 (n=5)
Fabry	Chitotriosidase	14 - 291	162 - 3117 (n=5)
	α -D-galactosidase	3,3 - 21,4	M 0,0-0,6 (n=9) V 1,0-5,3 (n=11)
CLN1	Palmitoyl-proteïnethio-esterase	7,0 - 17,3	-

^a Enzymen zijn ingedeeld in groepen op basis van het belangrijkste stapelingsproduct

^b Referentiewaarden bepaald in minstens 20 monsters

^c Voor zover beschikbaar

van de minimale bewerking van monsters: slechts het vervaardigen van ponsjes uit een gedroogde bloedspot. Het isoleren van cellen of plasma en een eiwitbepaling zijn niet langer nodig. Indien volbloed wordt ingestuurd bestaat extra monstervoorbewerking uit het vloeien van bloed op filtreerpapier en het drogen hiervan. Bovendien maakt het overbodig worden van het isoleren van cellen en plasma automatisering van de bepalingen eenvoudiger (17).

Lysosomale enzymen zijn opvallend stabiel in DBS. De enzymen vertonen nagenoeg geen denaturatie of afbraak gedurende langere tijd (maanden) bij 20-25 °C en zelfs na wekenlange opslag bij 50 °C is nog activiteit meetbaar. Deze hoge stabiliteit maakt verzending van patiëntmonsters per reguliere post mogelijk. Snelle bezorging is niet noodzakelijk en de temperatuur tijdens verzending is niet heel kritisch. Het opsparen van monsters en batchgewijze verzending evenals verzending vanuit afgelegen gebieden behoort tot de mogelijkheden. Wel is het nodig bij verzending van een monster één of meerdere controlemonsters mee te zenden om verlies van enzymactiviteit tijdens transport uit sluiten. Verder is retrospectieve diagnose op bloedspots uit de neonatale screening mogelijk indien de patiënt is overleden en er naderhand verdenking op een lysosomale stapelingsziekte ontstaat (4). Als in de toekomst meer laboratoria ervaring opbouwen met diagnostiek van lysosomale stapelingsziekten in DBS zijn deze zeer geschikt als monster in programma's voor externe kwaliteitsborging (rondzendingen).

Een obstakel voor het breed toepassen van DBS als monster in de diagnostiek van lysosomale stapelingsziekten is dat niet alle lysosomale enzymen gemeten kunnen worden in DBS, zoals in de eerste paragraaf van de discussie reeds werd beschreven. Als in een onderzoek één van de gewenste enzympalingen niet mogelijk is op DBS, is toch volbloed nodig. Bijvoorbeeld metachromatische leukodystrofie en de ziekte van Krabbe, lysosomale stapelingsziekten die in Nederland relatief veel voorkomen (18), kunnen met de gangbare enzymassays nog niet in DBS onderzocht worden. Voor diagnostiek naar deze aandoeningen is het nodig nieuwe methoden te ontwikkelen of toe te passen. Recent zijn enkele alternatieve onderzoeksmethoden beschreven om deficiëntie van lysosomale enzymen vast te stellen. Zo zijn er immunochemische tests voor een aantal enzymen beschreven, waaronder α -D-galactosidase (19). Een potentieel krachtige methode is beschreven door Li et al. (20) en maakt gebruik van speciaal ontwikkelde substraten en detectie van de reactieproducten door middel van tandem massaspectrometrie. Een voordeel van een dergelijke aanpak is dat multiplexassays mogelijk zijn, waarin de activiteiten van een aantal enzymen tegelijkertijd gemeten kunnen worden.

Concluderend kunnen we stellen dat de gedroogde bloedspot prima bruikbaar is als extra monstertype in de diagnostiek van lysosomale stapelingsziekten, maar op dit moment niet geschikt als totale vervanging voor de gouden standaard, leukocyten. Voor lysosomale enzymdiagnostiek aan nieuwe patiënten zijn DBS met name geschikt voor gerichte onderzoeks-

vragen waarbij een beperkt aantal enzymen bij een patiënt getest dient te worden. Dit kan één enzym zijn, zoals α -D-galactosidase bij verdenking op de ziekte van Fabry, of een aantal enzymen zolang alle assays mogelijk zijn met DBS. Ook kan de DBS zeer waardevol zijn bij het screenen van bepaalde defecten in risicopopulaties (16) en bij het volgen van patiënten die behandeld worden.

Dankbetuiging

Wij willen dr. Gabor Linthorst, dr. Nestor Chamoles[†] en dr. Mariana Blanco bedanken voor schenking van gedroogde bloedspots van patiënten met een lysosomale stapelingsziekte.

Literatuur

1. Solem E, Pirzer C, Siege M, Kollmann F, Romero-Saravia O, Bartsch-Trefs O, Kornhuber B. Mass screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: improved fluorescent spot test. *Clin Chim Acta* 1985; 152: 135-142.
2. Pettit DA, Amador PS, Wolf B. The quantitation of biotinidase activity in dried blood spots using microtiter transfer plates: identification of biotinidase-deficient and heterozygous individuals. *Anal Biochem* 1989; 179: 371-374.
3. Chamoles NA, Blanco MB, Gaggioli D, Casentini C. Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chem* 2001; 47: 2098-2102.
4. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Tay-Sachs and Sandhoff diseases: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards. *Clin Chim Acta* 2002; 318: 133-137.
5. Lukacs Z, Santavuori P, Keil A, Steinfeld R, Kohlschutter A. Rapid and simple assay for the determination of tripeptidyl peptidase and palmitoyl protein thioesterase activities in dried blood spots. *Clin Chem* 2003; 49: 509-511.
6. Jong JGN de, Wevers RA, Berg CJM van den, Liebrand-van Sambeek MLF, Rens AAET van, Roelofs HGM. Diagnostiek van lysosomale stapelingsziekten. *Ned Tijdschr Klin Chem* 2000; 25: 13-27.
7. Themanummer 'Erfelijke metabole ziekten: casuïstiek'. *Ned Tijdschr Klin Chem Lab Geneesk* 2003; 28 (6).
8. Galjaard H. Genetic metabolic diseases. Early diagnosis and prenatal analysis. Elsevier/North-Holland, Amsterdam-New York-Oxford. 1980.
9. Marsh J, Fensom AH. 4-Methylumbelliferyl alpha-N-acetylglucosaminidase activity for diagnosis of Sanfilippo B disease. *Clin Genet* 1985; 27: 258-262.
10. Christomanou H, Sandhoff K. A sensitive fluorescence assay for the simultaneous and separate determination of arylsulphatases A and B. *Clin Chim Acta* 1977; 79: 527-531.
11. Jones MZ, Rathke EJ, Cavanagh K, Hancock LW. Beta-mannosidosis: prenatal biochemical and morphological characteristics. *J Inherit Metab Dis* 1984; 7: 80-85.
12. Keulemans JL, Reuser AJ, Kroos MA, Willemsen R, Hermans MM, Ouweland AM van den, Jong JG de, et al. Human alpha-N-acetylgalactosaminidase (alpha-NAGA) deficiency: new mutations and the paradox between genotype and phenotype. *J Med Genet* 1996; 33: 458-464.
13. Inui K, Wenger DA. Usefulness of 4-methylumbelliferyl-6-sulfo-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside for the diagnosis of GM2 gangliosidosis in leukocytes. *Clin Genet* 1984; 26: 318-321.
14. Hollak CE, Weely S van, Oers MH van, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest* 1994; 93: 1288-1292.

15. Diggelen OP van, Keulemans JL, Winchester B, Hofman IL, Vanhanen SL, Santavuori P, Voznyi YV. A rapid fluorogenic palmitoyl-protein thioesterase assay: pre- and post-natal diagnosis of INCL. *Mol Genet Metab* 1999; 66: 240-244.
16. Linthorst GE, Vedder AC, Aerts JM, Hollak CE. Screening for Fabry disease using whole blood spots fails to identify one-third of female carriers. *Clin Chim Acta* 2005; 353: 201-203.
17. Poepl AG, Murray GJ, Medin JA. Enhanced filter paper enzyme assay for high-throughput population screening for Fabry disease. *Anal Biochem* 2005; 337: 161-163.
18. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, Jong JG de, Weely S van, Niezen-Koning KE, et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* 1999; 105: 151-156.
19. Fuller M, Lovejoy M, Brooks DA, Harkin ML, Hopwood JJ, Meikle PJ. Immunoquantification of alpha-galactosidase: evaluation for the diagnosis of Fabry disease. *Clin Chem* 2004; 50: 1979-1985.
20. Li Y, Scott CR, Chamoles NA, Ghavami A, Pinto BM, Turecek F, Gelb MH. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem* 2004; 50: 1785-1796.

Summary

Enzymatic diagnosis of lysosomal storage diseases in dried blood spots. Ruijter G.J.G, El Bouyakoubi N, De Vries R, Poorthuis B.J.H.M. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2005; 30: 249-254

Enzymatic analysis of lysosomal storage diseases is commonly performed with leukocytes or plasma. Recently, methods have been developed to analyse lysosomal enzyme activities in a novel sample type, dried blood spots (DBS). In this paper we describe introduction of DBS for lysosomal enzyme testing in our laboratory. Enzyme activity could be reliably measured in 3 mm DBS punches for 15 lysosomal enzymes and for these enzymes reference values were established. Inter-assay CVs varied between 6 and 14 % for the different enzymes. All enzymes had at least 85 % residual activity after 1 month storage at 20-25 °C. Lysosomal enzymes are therefore markedly stable in DBS and this may be beneficial during shipment of samples. Not all lysosomal enzymes can be assayed in DBS prohibiting substitution of leukocytes by DBS as a sample. Nevertheless, DBS are suitable for focused diagnostic requests, i.e. when a limited number of lysosomal enzymes has to be tested in a patient.

Keywords: lysosomal storage disease; dried bloodspot; enzymatic diagnosis; Guthrie card