

## Verslagen

# Nieuwe ontwikkelingen in de moleculaire diagnostiek: op weg naar bruikbare alternatieven voor PCR

E.J.B.M MENSINK en A. van de LOCHT

Bijgaande tekst is een verslag van een door Cambridge's Healthtech Institute gehouden tweedaags congres te Amsterdam (18-19 September 1996). Deze jaarlijks georganiseerde conferentie beoogt een uitwisseling tot stand te brengen tussen de biomedische wetenschappen en het bedrijfsleven. De nadruk ligt op nieuwe producten en technische ontwikkelingen die nog in een evaluatie-fase verkeren, maar wanneer recente ontdekkingen in de basale research gevolgen lijken te hebben voor de ontwikkeling van nieuwe producten en technologieën, komen deze ook aan bod.

Er wordt voor de toekomst vooral veel verwacht van diagnostische testen die gebruik maken van immunoassays en nucleïnezuur amplificatie technologie. In de conferentie, getiteld "Advances in Nucleic Acid Amplification and Detection", kwam de laatste categorie aan bod en werden nieuwe ontwikkelingen op het gebied van de moleculaire diagnostiek gepresenteerd. Deze vorm van diagnostiek is in toenemende mate van belang in de microbiële diagnostiek, de (hemato)oncologische diagnostiek, de typeringsdiagnostiek (HLA) en last but not least, genetische diagnostiek. Als inleiding (door prof. Boucher, microbioloog, AZU, Utrecht) werden de ronduit slechte resultaten van de kwaliteitscontroles bij moleculaire virale diagnostiek gemeld: in een externe toetsing bleken slechts 20% van de uitslagen correct te zijn. Het ontwikkelen van nieuwe apparatuur zou kunnen helpen om deze kwaliteitsproblematiek te ondervangen. Mechanisering en automatisering was dan ook een belangrijk onderwerp op deze conferentie. Het is duidelijk dat het bedrijfsleven bij deze ontwikkelingen een bepalende rol heeft en de academische centra de tweede viool spelen. Ongeveer de helft van de presentaties op het congres werd door het bedrijfsleven verzorgd.

De verschillende, grotendeels recent ontwikkelde nucleïnezuur-amplificatie-methodieken werden in veel

gevallen gedemonstreerd aan de hand van toepassingen in de microbiële diagnostiek. Dat afzetgebied is groot en dus commercieel interessant (denk aan HIV-diagnostiek bij AIDS). Een vertaling naar andere terreinen binnen de gezondheidszorg is echter snel gemaakt. In de vaak behoedzaam gepresenteerde vergelijking tussen verschillende alternatieven werd de prijs vs. prestatie discussie zoveel mogelijk vermeden, of in algemeenheden verpakt, zoals "goede kwaliteitscontrole maakt de test duurder" en "grote afname drukt de prijs".

Als amplificatie en selectie techniek is de "Polymerase Chain Reaction" (PCR) nog steeds cruciaal voor veel onderzoek binnen en buiten de medische wereld. Alternatieve nucleïnezuur-amplificatie-technieken, die op slimme wijze gebruik maken van karakteristieke eigenschappen van de gebruikte enzymen, zijn reeds in een vergeand stadium van ontwikkeling. In sommige gevallen worden reeds diagnostische "kits" op de markt gebracht, inclusief de bijbehorende (semi-)automatische apparatuur.

In tabel 1 is een kort overzicht gegeven van de verschillende nucleïnezuur-amplificatie-technieken, die als acronyemen werden gepresenteerd. De belangrijkste ontwikkelingen zullen in onderstaande tekst kort worden besproken.

### Nieuwe ontwikkelingen op het terrein van de Polymerase Ketting Reactie

Dit cyclische biochemisch proces dat tot selectie en amplificatie van een DNA-targetmolecuul leidt, is genoegzaam bekend. De techniek die in 1984 haar intrede heeft gedaan selecteert een specifiek gedeelte van het aangeboden DNA (target). Dat gedeelte wordt vervolgens in een exponentiële reactie geamplificeerd. Voor de diagnostiek op RNA-niveau wordt PCR voorafgegaan door een vertaling van RNA in kopie DNA (cDNA) door het enzym Reverse Transcriptase (RT-PCR). Er werden een aantal nieuwe ontwikkelingen en verbeteringen gepresenteerd waarvan de meeste dit jaar op de markt zijn gekomen. De belangrijkste daarvan worden hieronder besproken.

#### De "Long PCR"

Principe: door een combinatie te gebruiken van verschillende DNA-polymerase-enzymen neemt de betrouwbaarheid van het DNA-polymerisatieproces enorm toe. Een "conventioneel" Taq-polymerase wordt gecombineerd met een polymerase (Pwo-polymerase) dat synthese-fouten kan registreren en ver-

---

Centraal Hematologisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis, St. Radboud Nijmegen

Voor deze tekst is oa. gebruik gemaakt van het tijdens het congres uitgereikte draaiboek, dat de dia's van de meeste lezingen bevatte.

Correspondentie: Dr. E. J. B. M. Mensink, Centraal Hematologisch Laboratorium, AZN St. Radboud, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.

Ingekomen: 08.10.96

**Tabel 1.** De verschillende technieken m.u.v. de Ligase Chain Reaction, zullen in de tekst worden behandeld

Amplificatieproces	commerciële bron	automaten	enzymen	template
<i>Thermo-cyclisch</i> Polymerase Chain Reaction (PCR)	Hoffman-La Roche	vanaf de isolatie: Roche ABI/PE	DNA polymerase	DNA target
Ligase Chain Reaction (LCR)	Abbott	–	DNA polymerase DNA-ligase	DNA probe
<i>Isotherm</i> Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA)	Organon-Teknika	isolatie en detectie: Organon Teknika	RNA polymerase reverse transcriptase RnaseH	RNA target
Transcription Mediated Amplification(TMA)	Gen-probe	–	RNA polymerase reverse transcriptase	RNA target
Strand Displacement Amplification(SDA)	Becton-Dickinson	vanaf de isolatie: Becton-Dickinson	DNA polymerase restriction endonuclease	DNA target
Isothermal Chain Reaction(ISO-CR)	–	–	DNA polymerase	DNA target

wijderen doordat het zgn. 3' naar 5' exo-activiteit bezit en tegen de synthese-richting in de fouten kan "afknabbelen". Hierdoor is een meer robuuste PCR mogelijk. Het is zelfs mogelijk om DNA-moleculen tot 50.000 basen te amplificeren (ter vergelijking: een conventionele PCR amplificeert doorgaans fragmenten kleiner dan 1Kb). De combinatie van enzymen blijkt erg geschikt voor het uitvoeren van een PCR onder lastige condities zoals bij DNA-gebieden die GC rijk zijn, bij aanwezigheid van verschillende primersets in een reactiemengsel of in aanwezigheid van merkstoffen als label ("Solutions for difficult PCR applications by employing enzyme blends". Dr. B. Frey, Department of Molecular Biology, Boehringer Mannheim GmbH).

#### *RT-PCR: Vertaling van RNA in cDNA en DNA amplificatie in e' en reactie*

Principe: de copy DNA(cDNA) synthese mbv. reverse transcriptase (RT) en DNA-synthese mbv. Taq-DNA-polymerase worden in een reactievaatje uitgevoerd. Na de aanvankelijke vertaling van RNA in cDNA (bij 37 tot 42°C), wordt het gemodificeerde Taq-polymerase enzym actief nadat het plm. 10 minuten aan 95°C is blootgesteld (Perkin Elmer: Amplitaq Gold™ Systeem). Een ander "one tube RT-PCR" systeem (TITAN™, Boehringer Mannheim) maakt gebruik van drie enzymen (het AMV-RT en de reeds genoemde combinatie van Taq-polymerase en Pwo-polymerase). De genoemde enzymcombinaties bieden het grote voordeel dat het hele RNA/DNA-amplificatieproces uit nog maar een pipetteer-

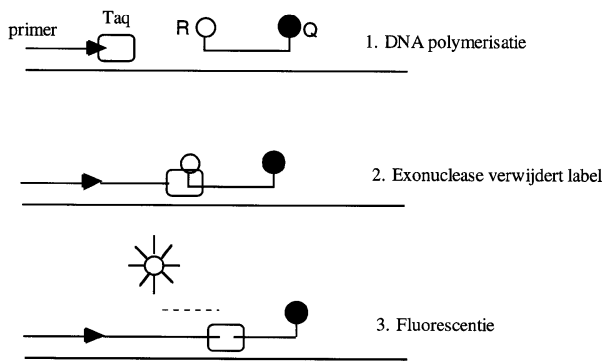
handeling bestaat en in een gesloten reactiemengsel kan plaatsvinden. Dat vermindert de contaminatieproblematiek.

#### *Automatisering van PCR*

Automatisering wordt van belang geacht om kwaliteitsredenen (voor het ondervangen van de contaminatieproblematiek) en om capaciteitsredenen (om een hoge "throughput" te bereiken). Er werden interessante nieuwe ontwikkelingen op het gebied van de PCR-apparatuur gepresenteerd die van (semi)automatische gesloten systemen gebruik maken.

De Cobas® Amplicor (Roche Diagnostic Systems) is een geïntegreerd systeem dat voor de microbiële diagnostiek van een viertal infectieuze organismen gebruikt kan worden, tw. Hepatitis-C virus, Mycobacterium tuberculosis, Chlamydia trachomatis en Neisseria gonorrhoeae. Andere toepassingen zijn voorlopig niet mogelijk. Het is een "lock in" systeem. Weinig flexibel, maar het hele amplificatie- en detectieproces is volledig geautomatiseerd.

Recent is door Perkin Elmer/Applied Biosystems International een 96-wells PCR-machine gecombineerd met ingenieuze biochemische technologie en een gesloten systeem waarin fluorescentie detectie plaatsvindt geïntroduceerd ("Quantitative real time PCR in a high throughput, in tube format", Perkin Elmer Cetus/Applied Biosystems International). Deze Prism 7700® is een veelbelovende nieuwe stap op weg naar contaminatie-vrije amplificatie, detectie, maar vooral ook kwantificering van in de PCR gegenereerde DNA-moleculen. In de Taqman™-technolo-



**Figuur 1.** Taqman-technologie. Primers zijn met pijlen aangegeven. Het Taq-polymerase is als vierkant afgebeeld. De DNA-probe draagt een Reporter (“R”) en Quencher (“Q”) molecuul. Fluorescentie is meetbaar wanneer R en Q ruimtelijk van elkaar gescheiden worden. Dat gebeurt alleen als de DNA-basenvolgorde klopt.

gie wordt gebruik gemaakt van een DNA-probe die tussen de PCR-primers is gelocaliseerd (zie figuur 1). Deze probe is uitgerust met twee extra groepen: aan de 5' kant een fluorescerende merkstof (reporter “R”) en aan de 3' kant een molecuul dat de uitgezonden fotonen opvangt en uitdooft (“quencher”, “Q”). Het fluorescerende label is alleen zichtbaar wanneer beide groepen ruimtelijk van elkaar worden gescheiden. Dit gebeurt tijdens de PCR doordat de exonuclease-activiteit van het Taq-polymerase het fluorescerende label losknijpt waardoor een fluorescentie-sigitaal gemeten kan worden (een signaal per DNA-streng). Het is daarmee tevens een confirmatie-test op de juistheid van de gegenereerde DNA-basenvolgorde en maakt daarmee een vervolgstap zoals “Southern blotting” overbodig. De meting wordt volledig uitgevoerd in het gesloten reactievatje, dat niet geopend hoeft te worden, wat de kans op overdrachtsbesmettingen minimaliseert.

Verschiedende labels kunnen (in één reactie) gebruikt worden. “Real time” monitoring van het amplificatieproces en nauwkeurige kwantificering is daarmee binnen handbereik gekomen<sup>2</sup>.

#### PCR als high throughput screeningstest

Als screeningsmethodieken werden “Line Probe Assay” (LIPA, Innogenetics) en “Multiplex Allele Specific Diagnostic Assay” (MASDA, Genzyme Genetics<sup>®</sup>) gepresenteerd. Beide methodieken maken gebruik van PCR. Het zijn relatief goedkope multiparameterassays. De LIPA- en MASDA-testen beogen een grote verscheidenheid aan mutaties of genetische variatie in een test te detecteren. Als toepassingsgebied werd Cysteuze Fibrose gepresenteerd waar inmiddels meer dan 500 verschillende mutaties zijn beschreven (een soortgelijke situatie geldt voor de meer dan 300 mutaties in de BRCA-genen die een rol spelen bij borst- en ovariumtumoren).

<sup>2</sup> Er is enorme belangstelling voor deze ontwikkeling. Een van de eerste apparaten wereldwijd is onlangs geplaatst in het Centraal Hematologisch Lab, AZN, Nijmegen.

LIPA is gebaseerd op zgn. “reverse hybridisation”: De techniek is in staat om een veelvoud van specifieke nucleotide-sequenties te detecteren. De PCR wordt gevolgd door hybridisatie van het DNA-reactieproduct aan strips waarop oligo’s met gekarakteriseerde DNA-volgordes zijn aangebracht als streep patroon (een soort slot-blot, vandaar “line probe”). Na een kleurreactie (op basis van een biotine merkstof aan het PCR-product), worden de bandpatronen door een computer systeem gelezen en geanalyseerd. Het hele post-PCR-proces is geautomatiseerd. Als voorbeeld werd de diagnostiek van CF gedemonstreerd: in een multiplex PCR (dwz. gebruik makend van verschillende primersets), werden 2 strips voor 8 verschillende mutaties en controles gebruikt. Er zijn inmiddels ook commerciële testen voor HLA-typing, ApoE-typing, Hepatitis C virus genotyping, en de detectie van rifampicine resistente *Mycobacterium tuberculosis*.

MASDA is gebaseerd op zgn. “forward hybridisation”: na verschillende multiplex PCR’s, die bijvoorbeeld het hele CF- of BRCA-gen in onderdelen amplificeren, worden de productmengsels aangebracht op een filter en met een mengsel van honderden gemerkte oligonucleotide probes getest. Dit mengsel bevat oligo’s, die alle verschillende mutaties herkennen. Positieve spots worden uitgeponst en de DNA-basevolgorde wordt bepaald om zo de betreffende mutatie te identificeren. Zo kunnen meer dan 500 monsters en meer dan 100 verschillende mutaties in een test verwerkt worden.

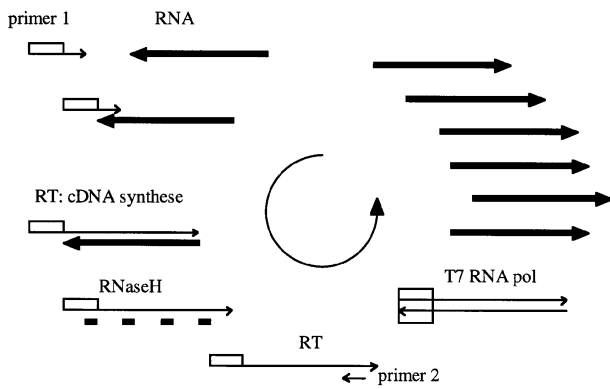
De MASDA-methode lijkt meer verschillende mutaties tegelijkertijd aan te kunnen dan LIPA, maar is daarnaast ook bewerklijker. Veel post-PCR sample handling doet, vooral bij MASDA, vrezes voor de contaminatie problematiek.

#### *In situ PCR en andere in situ amplificatie technieken*

Deze technieken combineren in theorie gevoelige detectie met cyto- of histomorfologische informatie (“In situ amplification techniques: Pitfalls and promise”. Dr. J.J. O’Leary, Dpt. of Pathology & Bacteriology, Univ. of Oxford, UK). De verschillende stappen bestaan uit fixatie, permeabilisatie, amplificatie, post-amplificatie-fixatie en een kleurreactie. Ofschoon de industrie al “dedicated” apparatuur op de markt heeft gebracht was er veel scepsis. Een vals positief resultaat is gauw bereikt. Het bewaken van het hele amplificatieproces is cruciaal. Vele, vele controles werden daarbij aanbevolen. Desondanks zijn er veel problemen. Het is nog lang geen standaardmethodiek en het is de vraag of het ooit zover komt.

#### **Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA)**

NASBA is een snel en isotherm proces waarin RNA wordt geamplificeerd (Dr. T. Kievits: “NASBA, a new tool in diagnosis”. Organon Teknika bv). Er wordt een cocktail van verschillende enzymen gebruikt. Principe (zie figuur 2): RNA wordt vertaald in cDNA. Hiervoor wordt een speciale primer gebruikt waaraan een promotersequentie is gehangen. Zo ontstaat een heteroduplex cDNA/RNA-molecuul. Rnase



**Figuur 2.** Nucleic Acid Sequence Based Amplification. RNA is weergegeven als vette lijn, RnaseH gedigesteerd RNA (onderbroken vette lijn). De DNA-primers zijn als dunne pijlen weergegeven en de T7 RNA-polymerase-promoter in een van de primers als rechthoek. Het RNA-eindproduct vormt uitgangspunt voor een omgekeerde reactie waarin eerst primer 2 en dan primer 1 is betrokken (niet afgebeeld).

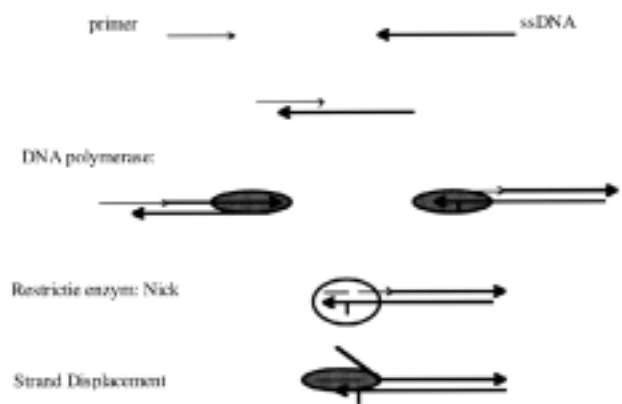
H is een enzym dat de RNA-component daarin herkent en afbreekt. Er resteert een enkelstrengs DNA-molecuul. Een tweede primer met een sequentie complementair aan het cDNA wordt na hechting door de DNA-polymerase-werking van Reverse Transcriptase verlengd. Zo ontstaat een dubbelstrengs cDNA-molecuul met een ingebouwde promotor. Dit vormt een aangrijpingspunt voor het enzym T7 RNA-polymerase, dat zeer efficiënt grote hoeveelheden RNA-moleculen kan genereren. Deze moleculen kunnen ook weer een startpunt vormen voor een vervolgreactie.

In de commercieel verkrijgbare test wordt als detectiemethodiek hybridisatie aan een probe, gevolgd door gel-elektroforese en kleuring gebruikt ("enzyme linked gel assay"). Daarnaast is er een systeem gebaseerd op elektrochemiluminiscentie. Zo kan respectievelijk kwalitatieve en kwantitatieve informatie worden verkregen. Verschillende controles zijn inmiddels ontwikkeld: een controle die de RNA-isolatie bewaakt, positieve controles voor de reactie en daarnaast verschillende interne standaarden voor kwantificering. Het is een gestandaardiseerde procedure, verschillende kits (voor virale en bacteriële diagnostiek, Factor V Leiden mutatie), zijn inmiddels op de markt en geautomatiseerde RNA-isolatie-apparatuur is ontwikkeld.

De Transcription Mediated Amplification (TMA, Gen-probe Incorporated) is een vergelijkbaar procedé. Hier ontbreekt de RNaseH als afzonderlijk enzym. Een van de andere twee enzymen (Reverse Transcriptase) heeft RNaseH-activiteit. Verschillende testen, vooral op het terrein van de microbiële diagnostiek (*Mycobacterium tuberculosis*) zijn inmiddels ontwikkeld. Andere producten (*Chlamidia*, HIV, en kwantitatieve bepaling van bcr-abl bij Chronische Myeloïde Leukemie) zijn in ontwikkeling.

### Strand displacement amplification (SDA)

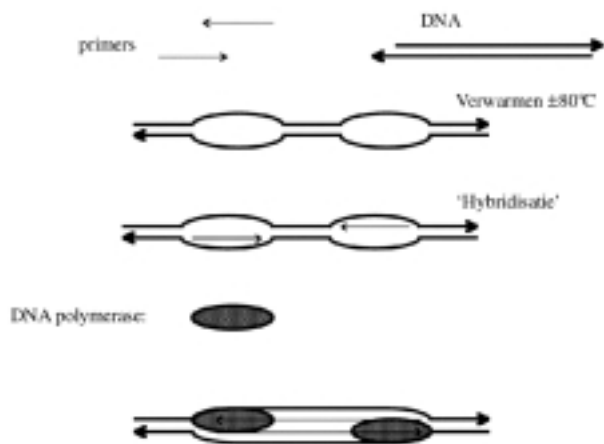
Deze isotherme amplificatiereactie kan zowel DNA als RNA amplificeren. Principe (figuur 3): er wordt gebruik gemaakt van een DNA-polymerase en een



**Figuur 3.** Strand Displacement Amplification. Slechts een van de twee primers is afgebeeld. Na hybridisatie van de amplificatie-primer (dunne pijl) aan het DNA wordt door DNA-polymerase (aangegeven als grijze ovaal) nieuw DNA gesynthetiseerd uit de aanwezige bouwstenen. Een van deze bouwstenen is gemodificeerd. Waar deze wordt geïncorporeerd in de basevolgorde die het restrictie enzym (witte ovaal) herkent, wordt deze niet geknipt (weergegeven met verticaal streepje). Zo wordt een enkelstrengs breuk ("nick") gegenereerd. Dit fungeert als "opstapplaats" voor het DNA-polymerase dat geen exonuclease-activiteit bezit en daardoor vervolgens de bestaande DNA-streng wegdrukt.

restrictie-enzym. Twee DNA-primers hechten op gesmolten (en daarmee enkelstrengs geworden) DNA dat tevoren is geknipt met een restrictie-enzym. Het enzym DNA-polymerase kan op de knipplaats "opstappen" waarna de synthese kan starten. De primers worden zo gekozen dat de base-samenstelling een herkenningsplaats voor een restrictie-enzym bevat. Als bouwstenen voor het te synthetiseren DNA worden drie normale nucleotiden en een thiolgemodificeerd nucleotide aangeboden. Op die manier wordt er door DNA-polymerase in de restrictie-enzym-herkenningssequentie een thiosulfaatbase ingebouwd. Wanneer het restrictie-enzym de knipplaats op het inmiddels dubbelstrengs DNA-molecuul herkent, wordt alleen het normale nucleotide geknipt. Daardoor ontstaat een enkelstrengs DNA-breuk ("nick"). Het DNA-polymerase heeft de mogelijkheid om bij dit "gat" in het DNA op te stappen. Het polymerisatieproces start opnieuw, nu vanaf de knipplaats. Het eerder gesynthetiseerde molecuul wordt daarbij losgeweekt (dat is de zgn. "strand displacement").

De reactie is erg snel, in 15 minuten worden maar liefst 10 kopieën gegenereerd. De twee gebruikte enzymen (een speciaal restrictie-enzym en een polymerase) zijn gewoon te koop. Rondom de techniek is inmiddels volledig gesloten en geautomatiseerde apparatuur ontwikkeld. Een elegante detectie methodiek, "Polarization Detection", maakt gebruik van het verschil in polarisatie tussen dubbel- en enkelstrengs DNA. De complementaire probe maakt, wanneer in de SDA-reactie de juiste sequentie is gegenereerd, na hybridisatie, een dubbelstrengs DNA-product en heeft een verandering van de polarisatierichting tot gevolg. Dit effect kan nog verder worden versterkt door de probe aan eiwit te binden ("protein-enhanced fluorescence polarization detection"). "Real time"-detectie is mogelijk. Vanwege het simpele concept is



**Figuur 4.** Isothermal Chain Reaction: De DNA-primers kunnen bij hoge temperatuur relatief gemakkelijk binnendringen in het DNA. De eerste ronde DNA-synthese speelt zich af aan het genomisch DNA en is inefficiënt. Wanneer eenmaal korte DNA-stukken zijn gevormd is het vervolg een zeer efficiënte amplificatie.

het mogelijk om in korte tijd veel monsters te bepalen. Het lijkt een veelbelovende techniek.

#### Isothermal Chain Reaction (Iso-CR)

Deze ontwikkeling is gloednieuw en nog niet gepubliceerd. De reactie lijkt een beetje op PCR maar ze is isotherm. Het principe is verbluffend simpel en er wordt slechts een enzym gebruikt, nl. een DNA-polymerase, dat geen exonuclease-activiteit heeft en daardoor, net als bij SDA, "strand displacement" kan bewerkstelligen (bijv. DeepVent<sup>®</sup> polymerase). Iso-CR wordt, enigszins provocerend, als goedkoop (en licentie vrij?) alternatief voor PCR gepresenteerd. Het principe van de reactie is gebaseerd op "strand invasion" van een DNA-oligonucleotide in het dubbelstrengs DNA, dat, om het proces te bevorderen, bij plm. 80 graden is gebracht. Op die manier ontstaan tijdelijk "open" gebieden in het DNA, waar een oligo kan binnendringen (zie figuur 4). Er worden twee primers gebruikt. Net als bij PCR wordt het gebied tussen de primers geamplificeerd. Het polymerase zorgt voor de "displacement" en genereert een nieuw stuk DNA. In het begin is de reactie erg inefficiënt, maar wanneer er eenmaal korte dubbelstrengs DNA-moleculen zijn gesynthetiseerd neemt de efficiëntie enorm toe. De reactiecondities (buffer, hoeveelheid primers, lengte van de primers, etc.) lijken erg op die van PCR. Het hele proces duurt ongeveer een uur, dan is voldoende materiaal gesynthetiseerd om op gel te kunnen zien. Na plm. anderhalf uur zijn de primers "op". Er kunnen minder dan 10 DNA-moleculen in het uitgangsmateriaal worden gedetecteerd. De reactie is door de hoge reactietemperatuur zeer specifiek, ten aanzien van de detectie van puntmutaties nog specifiekere dan PCR. In tegenstelling tot PCR kunnen vanwege de hoge temperatuur geen primer-dimeren

ontstaan. Net als de andere isotherme processen is deze reactie erg geschikt voor automatisering. De maximale fragmentlengte is op dit moment nog beperkt tot 100 basen. Er wordt gewerkt aan grote reactievolumina (1 tot 10 ml) om inhiberende factoren uit te verdunnen.

#### Conclusies

Verschillende nieuwe testsystemen naderen hun voltooiing. Ook vanuit het bedrijfsleven is grote belangstelling voor en betrokkenheid bij de problematiek van de kwaliteitszorg. Waar moleculaire diagnostiek zeer recent nog synoniem was met PCR, verschijnen inmiddels alternatieven op de markt. Ongetwijfeld heeft de starre houding van Hoffman-La Roche daaraan bijgedragen. In het licht van deze nieuwe ontwikkelingen is het nog maar de vraag of PCR haar primaat zal behouden. In ieder geval lijkt een concurrentieslag tussen de patenthouders van de verschillende amplificatie-systemen niet uit te kunnen blijven. Daar hoeven de klanten, i.c. de (klinisch-chemische) laboratoria die moleculaire diagnostiek gebruiken, noch in prijstechnisch opzicht, noch voor wat de kwaliteitsaspecten en gebruiksvriendelijkheid betreft, slechter van te worden. Verschillende technieken zullen robuust genoeg blijken te zijn om in geautomatiseerde vorm toegepast te gaan worden, ook in de klinisch-chemische laboratoria van de nabije toekomst. Er zal een goede afweging gemaakt moeten kunnen worden welk testsysteem en welke vervolgtesten of confirmatie-strategieën nodig zijn. Daarbij is het van belang dat men op de hoogte is van de kwaliteitszorgaspecten. Dat vergt gedegen kennis van zaken. Scholing op dat terrein is dan ook een "must".

#### Summary

*New developments in molecular diagnostics: towards useful alternatives for PCR. Mensink EJBM and Loch A van de. Ned Tijdschr Klin Chem 1997; 22: 29-33.*

This is a report of a recently held Cambridge Healthtech Institute meeting 'Advances in Nucleic Acid Amplification and Detection', Amsterdam 18-19 september. In these meetings heavy emphasis is placed on new products and technological advances. Although Polymerase Chain Reaction (PCR) is still crucial for molecular diagnostics, alternative strategies are appearing. These novel techniques make use of the typical characteristics of different enzymes. In some cases diagnostic kits were presented together with the necessary (semi-) automated hardware. Quality control of molecular tests is taken seriously. New technological developments in the PCR field like 'long PCR', in situ PCR, high throughput PCR strategies, automated PCR are briefly discussed. Alternative techniques like Nucleic Acid Sequence Based Amplification, Strand Displacement Amplification, isothermal Chain Reaction are presented and their advantages and disadvantages are briefly discussed. Whether or not PCR will hold its number one position in future, remains unknown. Competition between different systems in the market of molecular diagnostics will influence the quality and the costs of molecular diagnostic tests in a positive way.