

## Klinische studies

### *Maligniteiten*

#### **65. Detection of mixed chimerism in patients after bone marrow transplantation**

B.E.P.B. BALLIEUX, J. van DRIEL and H.E. van INGEN

*Laboratory for Clinical Chemistry AZR / Dr. Daniel den Hoed Cancer Centre, Rotterdam*

After bone marrow transplantation (BMT) incomplete engraftment and persistence of recipient hematopoietic cells (mixed chimerism) is believed to be associated with the reappearance of malignant cells in patients with leukemia. Furthermore, persistence of recipient cells, especially of T-lymphocytes, may also be associated with so called late graft failure. To determine mixed chimerism, a PCR assay has been developed, based on the amplification of so called VNTR or STR loci (variable number of tandem repeats or short tandem repeats). These loci contain variable numbers of a DNA repeat of 4 basepairs (or longer in VNTR loci). By amplifying 5 different VNTR/STR loci, i.e. 388II, D19S253, HUMTHO1, HUMVWF and ApoB, it is possible to determine (semi)quantitatively the donor or

recipient origin of a patient's leucocytes after BMT. We have used the P/ACE 5000 system with the LIFluor dsDNA 1000 kit to analyse the results of the PCR amplifications.

We isolated DNA from donor and recipient leucocytes before BMT and determined which loci displayed differences in PCR-fragment length. Then a series of mixtures of donor and recipient DNA was assayed, using the informative loci, to construct a calibration curve of the percentage peak area of the recipient alleles versus the percentage of recipient DNA.

After BMT the percentage recipient leucocytes can be determined by amplification of the informative loci and calculation of the percentage recipient DNA from the calibration curve.

### *Allergie*

#### **66. Deviations of eosinophil count, concentration of Eosinophil Cationic Protein and IgE in atopic patients during pollen season**

C.J. PRONK-ADMIRAAL and P.C.M. BARTELS

*Laboratory for Clinical Chemistry, Haematology and Immunology, Medical Centre, Alkmaar*

Involvement of eosinophil granulocytes in allergic diseases such as rhinitis, asthma and hay fever has been suggested by the results of several studies. Increased serum concentrations of the proteins secreted from eosinophils e.g. eosinophil cationic protein (ECP) are considered to reflect the severity of bronchial inflammation.

This study was carried out to determine whether serum ECP concentrations could be used as a marker for monitoring the disease activity in patients who are known to be allergic for grass-pollen.

Twenty five atopic children (15 male and 10 female) aged 4-18 year, gave their informed consent to participate in the study. All children had positive results for specific IgE to grass-pollen. Several children were also established to be allergic for birch-pollen. Occasionally, they used adequate medication, mainly during the pollen-season.

Venous blood samples were drawn from a cubital vein for

serum ECP, IgE and eosinophil counts. Concentrations for blood parameters were measured before, during and after pollen-season. Serum ECP concentrations, eosinophil counts and IgE concentrations showed no significant increase during pollen season. However, the increase of ECP levels correlated well with the intermediate deviations of eosinophil-counts. In fact the increase in serum ECP concentrations coincided with an increase in eosinophil number. IgE concentrations didn't yield a simultaneous significant trend.

In conclusion, our findings provide evidence that serum ECP concentrations and eosinophil counts are markers with comparable clinical significance in order to detect increased activity of inflammatory airways of hay fever patients during pollen season. The additional value of ECP concentration in comparison with eosinophil number for monitoring state of activity in hay fever patients isn't yet established.

### *Neurologie en psychiatrie*

#### **67. LS-PCR toegepast voor detectie van HLA-B27; 'Low Stringency' maar 'High Performance'**

J. DANNEBERG, J. GERRITS en A. MARTENS

*Klinisch Chemisch Laboratorium, Twenteborg Ziekenhuis, Almelo*

Seronegatieve spondylarthropathieën vertonen een hoge mate van associatie met het HLA-B27 antigeen. Met name spondylitis ankylopoëtica (ziekte van Bechterew) komt eigenlijk alleen voor bij patiënten positief voor dit HLA klasse I glycoproteïne ( het relatieve risico is ca. 87). Verschillende bepalingmethoden voor HLA-B27 zijn in de loop der jaren toegepast; microcytotoxiciteitstest, reacties met cytotoxische

T-cellen, iso-electric focussing, flowcytometrie. Een nadeel van bovengenoemde conventionele serologische technieken is de kruisreactiviteit van de antisera met andere HLA-klasse I antigenen, vanwege hun hoge mate van homologie. Sinds enkele jaren zijn bepalingstechnieken ontwikkeld met als basis PCR (Polymerase Chain Reaction). De meeste PCR-technieken geven voor HLA-B27 een zgn. 'all or none response'; de

reactie geeft wel of geen produkt. Dit houdt in dat een interne PCR-controle is vereist, teneinde vals negatieve resultaten uit te sluiten. Een dergelijke controle is niet volledig betrouwbaar. Als alternatieve controle hebben wij gekozen voor Low Stringency-PCR (LS-PCR). De additionele aspecifieke produkten, het zgn. Random Amplified Polymorphic DNA's (RAPD's) patroon, werd gebruikt als positieve controle op het verloop van de PCR. Bij 350 patiëntenmonsters werd zowel een LS-PCR

als een flowcytometrisch onderzoek verricht naar HLA-B27. Geen enkele discrepantie in resultaten werd gevonden. Uit dit onderzoek blijkt dat LS-PCR voor de detectie van HLA-B27 een snelle, relatief eenvoudige en goedkope methode is vergeleken met andere, eerder genoemde, PCR-gebaseerde technieken (duplex-PCR) en met flowcytometrie. LS-PCR kan wellicht ook een oplossing/alternatief zijn voor andere PCR-toepassingen met een 'all or none response'.

## 68. Genotypering van Cytochroom P450 2D6 bij ziekte van Parkinson

R.A.J. ESSELINK<sup>1</sup>, M.A.M. BON<sup>2</sup>, L.A.P. BALLERING<sup>2</sup>, E.N.H. JANSEN STEUR<sup>1</sup>, R.A.I. de VOS<sup>3</sup> en I. VERMES<sup>2</sup>  
*Afdeling Neurologie<sup>1</sup> en Laboratorium, Medisch Spectrum Twente<sup>2</sup>, Regionaal laboratorium voor Pathologie Oost Nederland<sup>3</sup>, Enschede*

Het Cytochroom P450 2D6 enzymstelsel is verantwoordelijk voor de metabole afbraak van o.a. anti-psychoptica en tricyclische antidepressiva. Van dit CYP 2D6 systeem zijn vijf mutaties beschreven. Deze genetische veranderingen gaan gepaard met een verlaging van het metabolisme. De betekenis van deze defecten bij de Cyp 2D6 hydroxylatie, in samenhang met een vergroot risico op de ontwikkeling van de ziekte van Parkinson is een punt van discussie.

De klinische diagnose Parkinson (CPD) wordt gesteld wanneer de patiënt drie of meer van de volgende symptomen vertoont; beven, spierstijfheid, bewegingstraagheid, gestoorde houdingsreflexen. In 20% van de CPD wordt bij obductie een andere oorzaak voor de extrapyramidale verschijnselen gevonden. Door dit hoge percentage misdiagnose is de rol van CYP 2D6 bij het ontstaan van PD moeilijk vast te stellen bij CPD. De definitieve diagnose: ziekte van Parkinson (PD) kan pas gesteld worden na postmortaal onderzoek.

We hebben in een populatie waar de ziekte van Parkinson bij postmortaal onderzoek werd bevestigd (MPD, n=51), een klinische populatie (CPD, n=137) en een controle groep (n=97) een studie gedaan naar twee genetische polymorfismen van het CYP 2D6 enzymstelsel respectievelijk het CYP 2D6A en het CYP 2D6B. De genotypering wordt vastgesteld m.b.v PCR gevolgd door restrictie.

De CYP 2D6B mutante allelfrequentie wordt significant verhoogd aangetroffen in de MPD groep (35,3%) vergeleken met de CPD (18,6%) en controle groep (20,6%). De MPD populatie is opgesplitst in twee groepen, een groep met een ziekte-duur korter respectievelijk langer dan 10 jaar. Hierin werd een significant verschil gevonden tussen de CYP 2D6B allelfrequentie in de groep die overleed binnen 10 jaar (44,8%) en de groep met een overleving langer dan 10 jaar (22,7%). Dit suggereert dat het CYP 2D6B mutante allel geassocieerd is met een snelle progressie van de ziekte van Parkinson.

## Hart- en vaatziekten

### 69. Apolipoproteïne E genotypering en lipidenparameters als risicofactoren in een populatie met bewezen oversterfte aan hart- en vaatziekten

L.D. DIKKESCHEI<sup>1</sup>, A. PEPPING<sup>1</sup>, J. KOLK<sup>1</sup>, P. LOGTERMAN<sup>1</sup>, W. de VISSER<sup>2</sup> en H.J.G. BILO<sup>3</sup>  
*Laboratorium<sup>1</sup> en Interne Afdeling<sup>3</sup>, Ziekenhuis De Weezenlanden, en Artsen Associatie Urk<sup>2</sup>*

Uit onderzoek is gebleken dat het mannelijk deel van een historisch geografisch geïsoleerde gemeenschap een 30% grotere kans op een fatale ischemische hartziekte heeft dan de gemiddelde Nederlandse man, terwijl het vrouwelijk deel geen verhoogd risico heeft (1,2).

*Doel.* Nagaan in hoeverre lipiden parameters en/of het apolipoproteïne E (apoE) genotype de geconstateerde oversterfte kan verklaren.

*Methode.* Tijdens een periodieke keuring zijn bij 140 mannen een aantal standaard lipiden parameters en het apolipoproteïne E genotype bepaald.

*Resultaten.* De gemiddelde leeftijd is 37 jaar, cholesterol (chol) 5,85 mmol/l, triglyceriden (Trig) 2,23 mmol/l, HDL-chol 1,30 mmol/l, LDL-chol 3,55 mmol/l. Er is een positieve correlatie (Pearson) van de leeftijd met chol ( $r=0,53$ ,  $p<0,001$ ), LDL-chol ( $r=0,45$ ,  $p<0,001$ ), en trig ( $r=0,21$ ,  $p<0,011$ ). De gevonden verdeling van de apoE genotypes (E3/E2 13%, E3/E3 59%, E4/E3 26%, E4/E4 1%, E4/E2 1%) is significant afwijkend ( $p<0,0001$ ) van de verdeling in een hoogrisico groep, (na cardiochirurgie) (resp 6,4%, 53,1%, 34,4%, 6,25%, 0%), maar wijkt niet af van de landelijke verdeling. De mannen met E3/E3 (wildtype) verschillen in geen van de parameters met de mannen met het E3/E4 genotype. De chol/HDL-chol ratio is in

de E3/E2 groep 1,11 lager ( $p=0,003$ ) dan in de E3/E3 groep evenals cholesterol (1,01 mmol/l lager ( $p=0,001$ )), en LDL (0,94 mmol/l lager ( $p=0,002$ )).

*Conclusie.* Er is een leeftijdsafhankelijke stijging van de risico parameters, (waarvan is aangetoond dat deze sterker is dan de landelijke toename), maar deze kan gelet op de absolute waarden de oversterfte niet verklaren. De genotype verdeling wijkt niet af van de landelijke verdeling en is dus geen verklaring voor de oversterfte. Het beschermende effect van het e2-allel is groter dan het risico verhogende effect van het e4-allel.

allel	onderzoeksgroep		risicogroep populatie	
	mannen	vrouwen(CABG)		
e2	7	11	3	10
e3	78	73	73	75
e4	15	16	24	15
n	280	318	128	¥

#### Literatuur

1. Om het Urkerhart, W. de Visser en H.J.G. Biló, De Weezenlanden Series no 7, 1995.
2. Hart voor Urker vissers, J.A. de Haan en J.G. Lutusan, RUG, 1996.

## 70. Meting van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in ademcondensaat bij patiënten die een open hart operatie ondergaan

W. B. M. GERRITSEN, F. E. ABARCHAN, L. P. H. J. AARTS<sup>1</sup>, D. van LOON, N. C. den BOER en F. J. L. M. HAAS  
*Klinisch Chemisch Laboratorium, Afdeling Anesthesiologie<sup>1</sup>, St Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein.*

Coronary Artery Bypass Grafting (CABG) is de meest voorkomende chirurgische ingreep aan het hart uitgevoerd in Nederland. Het hart verkeert in deze fase van de operatie in een ischemische toestand. Tijdens deze ischemische fase vinden in het myocardium vele reacties plaats waaronder de afbraak van adenosinetriphosfaat tot hypoxanthine. Hierdoor vindt een accumulatie plaats van hypoxanthine in het myocardium. De door Ca<sup>2+</sup> geactiveerde proteasen veroorzaken de omzetting van xanthine dehydrogenase in xanthineoxidase. Tijdens reperfusie wordt hypoxanthine door xanthineoxidase omgezet in xanthine en urinezuur waarbij het superoxyde radicaal wordt gevormd. Het superoxyde radicaal wordt vervolgens omgezet in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en andere zuurstofradicalen.

De monsterneming gebeurt met behulp van een speciaal voor deze bepaling ontwikkelde glazen spiraal met een totale lengte van 140 cm en een diameter van 1,5 cm. De H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentratie in ademcondensaat wordt bepaald m.b.v. de fotometrische bepaling beschreven door Gallati en Pracht. De reactie berust op de omzetting van het substraat 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

(TMB) door het enzym horse radish peroxidase in aanwezigheid van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De meting van het gekleurde product 3,3',5,5'-tetramethyl-1,1-diphenochinon-4,4-di-imoniumion gebeurt bij 450 nm.

67 Patiënten zijn bestudeerd die een CABG-operatie hebben ondergaan en 24 patiënten met een arterial valve replacement/mitral valve plastiek/mitral valve replacement (AVR/MVP/MVR) hartklepvervangings.

Daarnaast is bij 10 patiënten uit de groep van 67 patiënten die een CABG-operatie ondergingen op de volgende tijdstippen ademcondensaat opgevangen: na inleiding; reperfusie en post-operatief.

Er is geen correlatie gevonden tussen de aortaklemtijd en de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentratie in ademcondensaat binnen de patiëntengroepen.

De gemiddelde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentratie tijdens de CABG operaties (N=10) vertoont zoals verwacht een stijging tijdens de reperfusie, waarna ze weer daalt tot de uitgangswaarde.

## 71. A comparison of nurses and a laboratory technician performing a new rapid bedside test (CARDIAC STATus<sup>tm</sup>) for CK-MB and myoglobin

R. ADAMS, R.J. de WINTER, J.P.M. C. GORGELS, R.W. KOSTER, R.J. PETERS, Y. SCHOUTEN en G.T. SANDERS  
*Academic Medical Centre, University of Amsterdam*

**Background.** The CARDIAC STATus<sup>tm</sup> (Spectral Diagnostics, Canada) is an easy to perform, one step immunochromatographic assay using 150 µL of whole blood that gives a qualitative result within 20 minutes. The cartridge has two test areas that give a red colored band when CK-MB or myoglobin are above the upper limit of normal (ULN). This color change may be difficult to read when it is faint in samples with borderline elevated markers, and there may be a learning curve. Also, knowledge of the clinical condition of the patient may bias the reading of the test.

**Purpose.** To compare the results of the performance and reading of the CARDIAC STATus<sup>tm</sup> by a group of trained nurses and by one laboratory technician.

**Methods.** Blood samples from consecutive patients presented with chest pain, drawn on admission and at 5 and 7 hours after onset of symptoms, were used for a CARDIAC STATus<sup>tm</sup> test performed by a CCU nurse within 15 minutes. The color change was judged as positive or negative. The sample was then sent to the laboratory, and re-tested with the CARDIAC STATus<sup>tm</sup> by one technician as soon as possible. A quantitative CK-MB mass was performed with the Bayer IMMUNO-1 (ULN: 7µg/L), myoglobin with the Behring BNA Nephelometer (ULN: 50 µg/L).

**Results.** From 182 patients, 509 samples were tested by a group of 42 nurses, and 495 tests were performed by the technician. This resulted in a high percentage of 10% FN, and a higher FN rate in the group of trained nurses. On request of the manufacturer we decided to retest 328 samples which were kept at -20°C, using a different elution buffer and another lot of test packages. The results of this retest were:

	CCU-nurses		Technician	
	CK-MB	Myoglobin	CK-MB	Myoglobin
True positive	75	120	78	124
False positive	23	23	29	13
True negative	210	166	204	176
False negative	20	19	16	15

**Conclusion.** Trained nurses using the CARDIAC STATus<sup>tm</sup> read not significantly different than one laboratory technician both for CK-MB and myoglobin, provided the production lots and the buffer solutions used meet the manufacturer's specifications. In retesting the FN rate was about 5%.

## 72. Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase in Coronary Artery Disease (CAD)

L.A.J. KLUIJTMANS<sup>1</sup>, J.P. KASTELIJN<sup>2</sup>, J. LINDEMANS<sup>3</sup>, G.H.J. BOERS<sup>4</sup>, S.G. HEIL<sup>1</sup>, A.V.G. BRUSCHKE<sup>5</sup>, L.P.W.J. van den HEUVEL<sup>1</sup>, J.M.F. TRIJBELS<sup>1</sup>, G.J.M. BOERMA<sup>3</sup>, F. WILLEMS<sup>6</sup> en H.J. BLOM<sup>1</sup>

*Depts. of Pediatrics<sup>1</sup>, Internal Medicine<sup>4</sup>, and Cardiology<sup>6</sup>, University Hospital Nijmegen; Dept. of Hematology<sup>2</sup>, Academic Medical Centre, Amsterdam; Dept. of Clinical Chemistry<sup>3</sup>, University Hospital Rotterdam; Dept. of Cardiology<sup>5</sup>, University Hospital Leiden*

Mild hyperhomocysteinemia is an independent and graded risk factor for coronary artery disease (CAD), and may result from environmental and hereditary factors. A recently detected 677C→T transition in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene has been associated with elevated plasma homocysteine concentrations. We assessed the frequency of this common mutation in 735 male patients from the Dutch REGRESS (Regression Growth Evaluation Statin Study) study and in 1250 Dutch controls. The frequency of the homozygous (+/+) mutation was 9.5% among (CAD) patients versus 8.5% among controls (OR 1.21 [95% CI: 0.87-1.68]).

Plasma homocysteine concentrations were significantly elevated in both (+/+) and (+/-) individuals compared with (-/-) subjects. For a reliable estimation of the risk of the (+/+) genotype in CAD, we performed a meta-analysis on 8 case-control studies. In this analysis, the (+/+) genotype was present in 299 (12.1%) out of 2,476 patients and in 257 (10.4%) out of 2,481 controls. This resulted in a significant OR of 1.22 [95% CI: 1.01-1.47], demonstrating that the (+/+) genotype is a modest but significant genetic risk factor for CAD, which is likely modulated by folate status.

### 73. Evaluation of a new rapid bedside test (CARDIAC STATus™) for CK-MB and myoglobin measurement

R.J. de WINTER, J.P.M.C. GORGELS, R.W. KOSTER, R. ADAMS, Y. SCHOUTEN en G.T. SANDERS  
*Academic Medical Centre, Amsterdam*

**Purpose.** To study the performance of the CARDIAC STATus™ (Spectral Diagnostics, Canada), a new rapid wholeblood bedside test for CK-MB and Myoglobin for the detection of elevated cardiac markers, in the emergency room.

**Methods.** The CARDIAC STATus™ is an easy to perform, one step immunochromatographic assay using 150 µL of whole blood that gives a qualitative result within 20 minutes. The cartridge has two test areas that give a red color band when CK-MB or myoglobin is above the upper limit of normal (ULN). Blood samples from consecutive patients (pts) presented with chest pain at the emergency room were drawn at admission and at 5 and 7 hours after the onset of symptoms. The CARDIAC STATus™ tests were performed by the nurses within 15 minutes after blood drawing, and judged as positive or negative for color change. At the central laboratory, CK-MB mass was measured quantitatively with the Bayer IMMUNO-1 (ULN: 7 µg/L) and myoglobin with the Behring BNA Nephelometer (ULN: 50 µg/L). The results of the CARDIAC STATus™ were compared with the quantitative results for each sample.

**Results.** There were 182 pts included in the study, in which a total of 509 tests were performed by 42 different nurses.

The results were:

	True Pos	False Pos	True Neg	False Neg
CK-MB	70	6	381	52
Myoglobin	142	3	303	61

This results in a high percentage of FN about 10%. On request of the manufacturer we decided to retest 328 samples which were kept at -20°C, using a different elution buffer and another lot of test packages. The results of this retest were:

	True Pos	False Pos	True Neg	False Neg
CK-MB	75	23	210	20
Myoglobin	120	23	166	19

**Conclusion.** The CARDIAC STATus™ is a promising new rapid bedside test for the detection of elevated cardiac markers. It probably gives about 5% false negative results, half of which occur below the usual cut-off value for acute myocardial infarction. It appeared that it is important to use the buffer solution provided by the manufacturer with each test package, as the buffer properties are crucial to prevent spurious results.

### 74. Biochemische markers voor een acuut myocardinfarct

Y.M.C. HENSKENS<sup>1</sup>, A.J.A.M. WITHAGEN<sup>2</sup> en G.A.E. PONJEE<sup>1</sup>  
*Diagnostisch Centrum SSDZ Delft<sup>1</sup>, Reinier de Graaf Groep, Delft<sup>2</sup>*

Voor de diagnose acuut myocardinfarct (AMI) is het van belang dat de laboratoriumbepalingen snel en eenvoudig uitgevoerd kunnen worden en dat de uitslag goed correleert met de actuele toestand van de patiënt. Klassieke biochemische markers, zoals creatine kinase (CK), aspartaat aminotransferase (ASAT) en LDH isoenzym (LD1) zijn niet specifiek voor de hartspier en zijn pas uren na aanvang van de pijnklachten verhoogd. Dit laatste geldt ook voor de specifieke hartspiermarker creatine kinase isoenzym (CK-MB). Om deze redenen is veel onderzoek verricht naar alternatieve markers in serum voor AMI, zoals troponine T en I. Troponinen zijn specifiek voor de hartspier en reeds verhoogd bij minimale beschadigingen. Daarnaast is serum myoglobine een specifieke marker, die zeer snel stijgt na aanvang van de pijnklachten.

Het doel van deze studie was om bij patiënten met verdenking op een klein myocardinfarct de gebruikelijke serum markers CK en CK-MB voor de diagnostiek AMI in het Reinier de Graaf Gasthuis te vergelijken met alternatieve serummarkers troponine T en myoglobine. CK werd enzymatisch bepaald (Paramax), CK-MB massa werd bepaald m.b.v. een microparticle immunoassay (IMx, Abbott); de myoglobineconcentratie werd turbidimetrisch gekwantificeerd (Behring). De troponine T bepaling betrof een kwalitatieve dipstick test (TropT Rapid Assay, Boehringer Mannheim).

Bovenstaande markers werden bij 30 patiënten met pijn op de borst en een normaal ECG respectievelijk bij binnenkomst en na 4 en 24 uur gemeten. 20 patiënten werden opgenomen met de verdenking op AMI. Bij 4 van de 30 patiënten werd uiteindelijk de diagnose AMI gesteld aan de hand van het ECG en de uitslagen van de reguliere biochemische markers. Bij deze 4 patiënten was bij binnenkomst de CK, CK-MB en TropT Rapid Assay negatief. Na 4 uur waren bij alle patiënten zowel de concentraties CK als CK-MB verhoogd. Echter de kwalitatieve TropT Rapid Assay was nog steeds negatief en werd pas positief bij 2 van de 4 patiënten 24 uur later. Serum myoglobine concentraties waren verhoogd bij 2 patiënten op t=0 en bij alle patiënten na 4 uur. Bij 2 van de overige 16 opgenomen patiënten zonder AMI, waren zowel de serum CK als myoglobine concentraties bij binnenkomst specifiek verhoogd. De specifieke hartspiermarkers CK-MB en troponine T waren bij deze patiënten niet verhoogd.

Uit deze studie kan geconcludeerd worden dat voor de vroege diagnostiek van een klein AMI, de kwantitatieve serum myoglobine bepaling een belangrijke aanvulling kan zijn op het huidige protocol voor de diagnostiek van AMI. Dit in tegenstelling tot de kwalitatieve TropT Rapid Assay test die in alle gevallen van een klein AMI op een later tijdstip verhoogd was dan de huidige markers.

### 75. Parameters van oxidatieve stress in urine van patiënten die een bypass operatie ondergaan

W.B.M. GERRITSEN, H.D. van DAM, F.E. ABARCHAN, L.P.H.J. AARTS<sup>1</sup>, W.J. MORSHUIS<sup>2</sup>, D. van LOON, N.C. den BOER en F.J. L.M. HAAS  
*Klinisch Chemisch Laboratorium, Afdeling Anesthesiologie<sup>1</sup>, Afdeling Thoraxchirurgie<sup>2</sup>, Sint Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein*

Reactieve zuurstofmetabolieten spelen een belangrijke rol in de pathogenese van post-ischemisch myocard falen na een acuut myocard infarct, hartchirurgie en percutane transluminale coronaire angioplastiek.

Tijdens en na hypoxia of ischemie is, zowel in het hart als in spieren, overmatige afbraak van ATP aanwezig. De overmaat aan purine-afbraakproducten, die de celmembranen passeren komen vrij in het bloed. Purine-metabolieten worden gezien

als markers voor ischemie. Malondialdehyde (MDA) wordt gezien als een parameter voor lipide peroxydatie.

Potentiële en actuele schade veroorzaakt door zuurstofradicalen na een bypass operatie wordt bepaald aan de hand van de parameters hypoxanthine, xanthine, urinezuur en malondialdehyde. In veel studies worden de genoemde parameters bepaald in plasma. In deze studie is het accent verlegd naar metingen in urine. Een aantal technische problemen worden door de

keuze van het materiaal voorkomen. Door een verminderde nierfunctie is het verklaarbaar dat concentraties aan purines en malondialdehyde in het bloed stijgen.

De studie betreft 20 patiënten die een electieve bypass operatie hebben ondergaan (17 mannen en 3 vrouwen met een gemiddelde leeftijd van  $69 \pm 13$  respectievelijk  $73 \pm 4$  jaar). Bloed- en urinemonsters zijn genomen op de volgende tijdstippen; na inleiding, tijdens extra-corporale circulatie en voor aorta afklemming, na aorta afklemming tot reperfusie, tijdens reperfusie, na

aankomst op de Intensive Care Unit en de eerste dag na OK.

De gebruikte HPLC methode tijdens deze studie blijkt geschikt voor het tegelijkertijd meten van de purines en malondialdehyde. De reproduceerbaarheid van de methode is goed; een intra run variatiecoëfficiënt van 1,1% voor hypoxanthine, xanthine en urinezuur en 3,1% voor malondialdehyde. De detectielimiet bedraagt 0,6 mmol/l voor alle parameters. Het bepalen van purines en malondialdehyde in urine na correctie voor de nierfunctie is een goed alternatief voor de meting in bloed.

## 76. Idiopathisch verhoogde activiteit van angiotensine convertend enzyme gaat niet gepaard met verhogingen in bloeddruk

M.H. de KEIJZER<sup>1</sup>, F. BOOMSMA<sup>2</sup>, C. KRAMERS<sup>3</sup> en J.W.H. LENDERS<sup>3</sup>

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>1</sup> en Afdeling Interne Geneeskunde<sup>3</sup>, AZN St Radboud Nijmegen; Afdeling Interne Geneeskunde<sup>2</sup>, AZR Dijkzigt Rotterdam

Een toename van de activiteit van serum angiotensine convertend enzyme (S-ACE) is o.a. geassocieerd met actieve sarcoidose en wordt tevens in verband gebracht met hypertensie en cardiovasculaire afwijkingen. Recent hebben wij een vijftal personen geïdentificeerd met een zeer sterk verhoogde S-ACE activiteit en aan een nader onderzoek onderworpen.

De activiteit van S-ACE is meermalen colorimetrisch gemeten met p-hydroxybenzoyl-glycyl-L-histidyl-L-leucine als substraat (ACEcolor, Fujirebio Inc., Japan). De bloeddruk is in triplo in zittende positie gemeten na een rustperiode van 15 minuten. Tevens is een (familie)anamnese afgenomen.

De S-ACE activiteiten van de vijf individuen bleken 5 tot 8 maal hoger te zijn dan het referentieniveau (4-20 U/l, zie tabel). Macro-ACE kon niet aangetoond worden. Geen van de vijf had een ziekte die tot stijging van de activiteit van S-ACE kan leiden. Met uitzondering van één licht verhoogde diastolische bloeddruk waren de tensies normaal. Er werden geen cardiovasculaire afwijkingen gevonden en familiair bleken geen

cardiovasculaire ziekten aanwezig te zijn. S-ACE is ook bepaald bij familieleden van twee van de vijf individuen. In een aantal leden van beide families werden verhoogde ACE-activiteiten gemeten, waarbij het autosomaal dominante overervingspatroon opviel.

De suggestie dat hyperACEemie cardiovasculaire problemen veroorzaakt, kan niet met dit (pilot)onderzoek bevestigd worden. Vervolgonderzoek zal zich richten op het renine-angiotensine-aldosterone systeem.

sexe, leeftijd	bloeddruk (mm Hg)	ACE (U/l)
m, 42	134 / 100	129
m, 47	134 / 76	154
v, 51	110 / 65	131
v, 33	110 / 60	94
v, 61	154 / 82	103

## 77. The feasibility of biochemical markers for the detection of myocardial damage in patients with blunt trauma

J.C.J.M. SWAANENBURG<sup>1</sup>, J. KLAASE<sup>2</sup>, H.J. TENDUIS<sup>2</sup>, K.W. ZIMMERMAN<sup>2</sup> en M.J.L. DEJONGSTE<sup>3</sup>

Central Clinical Chemical Laboratory<sup>1</sup>, Department of Surgery<sup>2</sup>, Department of Cardiology<sup>3</sup>, University Hospital Groningen

Myocardial contusion is one form of non-penetrating injury of the heart, caused by blunt injury to the thorax. It is an infrequent, but important complication in patients experiencing deceleration trauma. However, the diagnosis is not always easy to confirm. For many years CKMB-activity was used as 'gold standard'. However, CKMB-activity measurements are interfered by artefacts as CK-macro-enzymes and CKBB.

We investigated the feasibility of CKMB-activity, CKMB-mass, Troponin I and Troponin T for the detection of myocardial damage in patients with blunt trauma.

From 89 patients with severe trauma blood was taken at admission (t1) and the day thereafter (t2). Patients were categorized in groups with (group A, n=38) or without (group B, n=51) thoracic involvement. Part of group B are patients with

injuries of the lower extremities only (group B', n=17).

Serum was used for the analysis of CKMB-activity (Ektachem, Johnson and Johnson), CKMB-mass (MAGIA, Merck), Troponin I (Access, Sanofi Diagnostics Pasteur) and Troponin T (Elecsys, Boehringer Mannheim).

Conclusion:

- Troponin I and Troponin T are equal accurate in the detection of myocardial contusion;
- CKMB-activity and CKMB-mass measurements are less reliable for the detection of myocardial contusion;
- When Troponin I and Troponin T are not above the cov's at admission a subsequent analysis is required after several hours.

	cov	% RESULTS		>	CUT OFF VALUE (cov)			
		group A	t2		group B	group B'		t2
		t1	t2		t1	t2	t1	t2
CKMB-activity	10 U/l	63	24*		53	6	35	6
CKMB-mass	5 ng/ml	46	63		36	49	31	59
Troponin I	0.1 ng/ml	8	24*		4	4	6	0
Troponin T	0.1 ng/ml	11	24*		4	4	0	0

\* The Troponin I and Troponin T results above the cov are from the same patients, these are different from those of whom the CKMB-activities are above the cov.

For all patients with Troponin I and Troponin T results above the cov the diagnosis myocardial damage is confirmed by other findings indicating myocardial injury (ECG, etc.). In contrast, this was not true for all patients with CKMB-activities or CKMB-mass results above the cov's.

## 78. Estimation of myocardial infarct size from plasma myoglobin or fatty acid-binding protein: influence of renal function

K.W.H. WODZIG<sup>1</sup>, J.A. KRAGTEN<sup>2</sup>, W.TH. HERMENS<sup>3</sup>, J.F.C. GLATZ<sup>3</sup> and M.P. van DIEIJEN-VISSER<sup>1</sup>

*Department of Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Academic Hospital, Maastricht, Department of Cardiology<sup>2</sup>, Ziekenhuis De Wever en Gregorius, Heerlen, and Cardiovascular Research Institute Maastricht<sup>3</sup>, Maastricht University*

Myoglobin, MYO (Mr 18000) and fatty acid-binding protein, FABP (Mr 15000) are low-molecular-mass cytoplasmic proteins that are considered useful biochemical markers for early detection or exclusion of acute myocardial infarction (AMI), and also for early estimation of infarct size. As each of these proteins shows renal clearance, we studied the influence of renal function on the estimation of infarct size from MYO or FABP plasma concentration curves and compared it with infarct size as estimated from the established infarct size marker hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH), which is not influenced by changes in renal function. The discordance between infarct size estimates was related to renal function.

*Methods.* Creatine kinase (CK), HBDH, MYO, FABP and creatinine were assayed in plasma samples obtained frequently and for at least 72 hours after the start of thrombolytic therapy in 20 patients with AMI. Cumulative release (Q), i.e. infarct size, of the different cardiac markers was calculated by using a two-compartment model for circulating proteins and were expressed in gram-equivalents of healthy myocardium per liter of plasma (g-eq/l). Mean plasma creatinine was obtained by

averaging the creatinine concentrations measured in all plasma samples taken during the first 24 hours after AMI.

*Results.* A relation was found between the mean plasma creatinine concentration during the first 24 hours after AMI and the discordance between infarct size estimated from cumulative HBDH release, compared to infarct size estimated from cumulative MYO or FABP release. For patients with mean normal plasma creatinine concentrations (n=15) a good agreement was found between infarct size estimated from MYO or FABP plasma curves and that estimated with either HBDH or CK. However, for patients with a mean creatinine concentration above the upper reference limit (> 120 µmol/l, n=5), infarct size calculated from plasma MYO or FABP release curves was markedly overestimated, especially for larger infarcts.

*Conclusion.* Estimation of infarct size from serial plasma MYO or FABP concentrations is possible already in the first 24 hours after the onset of symptoms, but only in patients with normal renal function, as estimated from plasma creatinine concentrations.

## Interne geneeskunde/kindergeneeskunde

### 79. Nieuwe methode ter bepaling van de pancreasfunctie

O. BEKERS<sup>1,2</sup>, C. POSTMA<sup>1</sup> en A.J.P.F. LOMBARTS<sup>1</sup>

*Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>1</sup>, Ziekenhuis Leyenburg, Den Haag en Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>2</sup>, Academisch Ziekenhuis Maastricht*

Bij de diagnostiek van maldigestie (pancreas-insufficiëntie) spelen biochemische bepalingsmethodieken een voornaam rol. Enkele voorkomende testen zijn: BT-PABA (Bentiromide-para-aminobenzoëzuur)-test en de bepaling van vet in faeces. Een nieuwe test die binnen afzienbare tijd op het Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium zal worden geïntroduceerd is de bepaling van humaan pancreas elastase 1 (elastase) in faeces. De huidige studie presenteert de diagnostische waarde van elastase in faeces in vergelijking met de BT-PABA-test.

Bij de PABA-test wordt BT-PABA, een synthetisch tripeptide, oraal bij de patiënt toegediend. BT-PABA wordt door chymotrypsine gesplitst en vervolgens wordt PABA in de dunne darm geresorbeerd, in de lever geconjugeerd en in de urine uitgescheiden. Bij onvoldoende chymotrypsine productie vindt minder splitsing van BT-PABA plaats en wordt dus minder PABA in de urine uitgescheiden (1). Elastase is een endopro-

tease dat door de pancreas wordt gesecreteerd, elastase komt voor in bloed, succus pancreaticus en ook in faeces. Aangenomen wordt dat de concentratie van dit enzym in faeces een weergave is van de pancreas functie (2).

De bepaling van elastase wordt verricht met behulp van een ELISA (enzym linked immunosorbent assay) en PABA wordt bepaald met een HPLC (high performance liquid chromatography) methode.

In een eerste oriënterende studie zijn PABA en elastase uitkomsten van een tiental patiënten monsters vergeleken. Het resultaat is dat de elastase uitkomsten redelijk correleren met de uitkomsten van de PABA-test.

1. Hoek FJ, Tytgat GNJ. *Neth J Med* 1988; 32: 118-129.

2. Stein J et al. *Clin Chem* 1996; 42: 222-226.

### 80. CDTest in een populatie-onderzoek bij matig drinkende vrouwen

J. van PELT<sup>1</sup>, E.W.C. POELMANS<sup>1</sup>, J.J. KEYZER<sup>2</sup>, C.G.C. GOEVAERS<sup>2</sup> en C.L. LEUSINK<sup>2</sup>

*KCHL, st. Maartens Gasthuis<sup>1</sup>, Venlo en Diagnostisch Centrum Eindhoven<sup>2</sup>*

De bepaling van Koolhydraat Deficiënt Transferrine is een waardevolle aanvulling bij de detectie van chronisch alcoholmisbruik. De sensitiviteit en specificiteit zijn bij mannen zeker zo goed en veelal beduidend beter dan die van bekende alcoholmarkers als MCV, gamma-GT en ALAT, zo blijkt uit talloze studies. Bij vrouwen is veel minder onderzoek verricht, maar de schaarse resultaten duiden erop dat de sensitiviteit en mogelijk ook de specificiteit lager zijn dan bij mannen. Opvallend is tevens dat de bovenste referentiewaarde voor vrouwen beduidend hoger ligt: 26 U/l versus 20 U/l voor mannen.

Bij de Eindhovense Perimenopausaal Osteoporose Studie werd bij 8503 vrouwen van 46-54 jaar een uitgebreide mondelinge enquête naar de levenssituatie, waaronder alcoholgebruik en menopausale status, afgenomen. Tevens werd bloed afgenomen voor nader onderzoek en werd door de deelnemende vrouwen thuis een vragenlijst ingevuld. Betrouwbare opgave van alcoholconsumpties is bij onderzoek naar de waarde van alcoholmarkers cruciaal, maar zeer moeilijk te verkrijgen. Op basis van het aangegeven alcoholgebruik werden alle vrouwen met gemiddeld minstens vier consumpties per dag geselecteerd.

teerd tezamen met een steekproef van minder alcohol gebruikende vrouwen. In de totaal 438 monsters werd CDTECT (Pharmacia & Upjohn) en gamma-GT bepaald. De resultaten zijn, ongeacht de menopausale status, weergegeven in de tabel. Sensitiviteit en specificiteit werden berekend met een grenswaarde van 35 consumpties per week en CDTECT-afkapwaarden afhankelijk van de menopausale status van de vrouwen. Geconcludeerd kan worden dat de sensitiviteit in dit screenend populatie-onderzoek lager is dan 50%.

## 81. Referentiewaarden van CDTECT bij vrouwen

J. van PELT<sup>1</sup>, M.H. VELMANS<sup>1</sup>, J.J. KEYZER<sup>2</sup>, C.G.C. GOEVAERS<sup>2</sup> en C.L. LEUSINK<sup>2</sup>  
*KCHL, st. Maartens Gasthuis<sup>1</sup>, Venlo en Diagnostisch Centrum Eindhoven<sup>2</sup>*

De bepaling van Koolhydraat Deficient Transferrine is een nieuwkomer bij de detectie van chronisch alcoholmisbruik. Velerlei onderzoeken hebben inmiddels laten zien dat bij mannen de sensitiviteit en specificiteit respectievelijk zeker zo goed en beter zijn als die van bijvoorbeeld gamma-GT. De uitkomsten van CDT bij vrouwen laten een lagere sensitiviteit zien dan bij mannen. Ook de referentiewaarden van mannen en vrouwen zijn verschillend: Bij de CDTECT-test (Pharmacia & Upjohn) wordt voor mannen < 20 U/l en voor vrouwen < 26 U/l gehanteerd. Een bevredigende verklaring voor dit verschil is tot dusverre niet gegeven. De hogere afkapgrens bij vrouwen is vrijwel zeker nadelig voor de sensitiviteitsberekeningen. Bij de Eindhovense Perimenopausale Osteoporose Studie (EPOS) werd een uitgebreide enquête naar de levensomstandigheden afgenomen bij vrouwen van 46-54 jaar. Tevens werd bloed afgenomen voor klinisch chemisch onderzoek. Uit het totale cohort van 8503 vrouwen werden 77 premenopausale,

**Tabel**

Alcoholconsumpties per week	n	CDTECT U/l (gem ± SD)	gamma-GT U/l (gem ± SD)
0-7	104	15,0 ± 8,3	21,9 ± 17,0
7-34	280	20,3 ± 10,4	26,8 ± 26,3
35-meer	48	22,5 ± 12,5	51,4 ± 49,2

86 perimenopausale en 82 postmenopausale vrouwen geselecteerd die allen geen alcohol en geen orale anticonceptiva gebruikten. Voor zover getoetst verschilden de groepen vrouwen alleen in menstruatiepatroon (respectievelijk regelmatig; onregelmatig gedurende het jaar voor het onderzoek; niet meer sinds tenminste 1 jaar voor het onderzoek). De gemiddelde CDTECT-uitkomsten (± SD) waren respectievelijk 15,5 ± 5,4, 14,2 ± 6,3 en 13,6 ± 4,2 voor pre-, peri- en postmenopausale vrouwen. Het verschil tussen pre- en postmenopausaal is statistisch significant.

*Geconcludeerd* kan worden dat voor postmenopausale vrouwen vrijwel dezelfde referentiewaarde als voor mannen (<22 U/l) gehanteerd kan worden, wat de sensitiviteit zal beïnvloeden. Voorts moet het verschil in CDTECT-referentiewaarde tussen mannen en premenopausale vrouwen waarschijnlijk gezocht worden in een toegenomen erythropoïese ten gevolge van de menses.

## 82. Meting van de glomerulusfiltratie bij kinderen aan de hand van de inuline plasmaverdijningscurve na "single injection"

D.W. SWINKELS<sup>1</sup>, J.C.M. HENDRIKS<sup>2</sup>, J. NAUTA<sup>3</sup> en M. de JONG<sup>4</sup>

*Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>1</sup>, Medisch Statistische Adviesdienst<sup>2</sup> en Kinderdialyse<sup>4</sup>, AZN St. Radboud Nijmegen en Kindernefrologie, Sophiakinderziekenhuis<sup>3</sup>, Rotterdam*

*Inleiding.* De glomerulusfiltratie (GFR) is een veelgebruikte parameter voor de evaluatie van de nierfunctie. De endogene creatinineklaring is als maat voor de GFR bij kinderen niet bruikbaar omdat het verzamelen van urine bij kinderen op praktische problemen stuit. Bovendien staat deze bepaling ter discussie vanwege tubulaire creatinine secretie die varieert met de nierfunctie. Doel van de studie is daarom de plasmaverdijningscurve van inuline na een eenmalige i.v. injectie te bestuderen en de GFR te berekenen. Uitgaande van een plasmaverdijningscurve bepaald met behulp van frequente plasma-inulinemetingen wordt onderzocht welke meettijdstippen voldoende zijn voor de bepaling van de GFR.

*Methoden.* In de periode van juni '94-aug '96 werden kinderen met verminderde nierfunctie, die de polikliniek van AZN of het AZR bezochten, geïncludeerd voor de studie. Van deze 89 kinderen (leeftijd 9,1±4,7 jaar, range 1,3-20,9 jaar) werd de inuline-plasmaconcentratie enzymatisch bepaald op de volgende tijdstippen: 10, 20,30,45,65,90,120,180 en 240 minuten na een eenmalige i.v. injectie van 5 gr inuline per 1,73m<sup>2</sup>. De verdijningscurven zijn gemodelleerd volgens zowel een één- als een twee compartimentenmodel en statistisch geëvalueerd met behulp van het Akaike Informatie Criterium (AIC).

*Resultaten.* Het één compartimentenmodel fit statistisch significant slechter aan de data dan het twee compartimentenmodel op het interval 0-240 minuten. Echter op het interval 90-240 minuten verdient het één compartimentenmodel de voorkeur; slechts voor 17% van de patiënten is het twee compartimentenmodel beter. Voor een goede fit van het tweecompartimentenmodel op het interval 0-240 minuten zijn zes punten voldoende, 10,20,30,65,120 en 240 minuten, waarvan de eerste drie noodzakelijk. Volgens dit tweecompartimentenmodel (interval 0-240 min.) berekende gemiddelde GFR is 29 ml/min (SD 23 ml/min, range 0,2-120 ml/min).

*Conclusie.* De voorkeur voor het één compartimentenmodel na 90 minuten duidt er mogelijk op dat de eerste fase bij de meeste kinderen na 90 minuten geen rol meer speelt.

Gezien het feit dat op het totale interval het twee compartimentenmodel veel beter is, is een puntenreductie tot < 4 punten niet wenselijk; een reductie tot 6 punten (zoals in resultaten) is voldoende in termen van modelfit. Echter bepaalde stukken van het verloop van de curve kunnen wel gerelateerd zijn aan de ernst van het nierlijden (GFR). Dit is nog onderwerp van studie.

### 83. Neurochemical and clinical phenotypes of MAO-A and MAO-B deficiencies

N.G.G.M. ABELING<sup>1</sup>, H.G. BRUNNER<sup>2</sup>, J.W.M. LENDERS<sup>3</sup> and A.H. van GENNIP<sup>1</sup>

*Academic Medical Centre, University of Amsterdam, Laboratory Genetic Metabolic Diseases, Dept of Clinical Chemistry and Div. Emma Children's Hospital, Amsterdam<sup>1</sup>, Depts of Human Genetics<sup>2</sup> and of Internal Medicine<sup>3</sup>, St.Radboud University Hospital, Nijmegen*

Monoamine oxidase (MAO, EC 1.4.3.4) plays an important role in the degradation and thereby inactivation of monoamine neurotransmitters. Two isoenzymes, i.e. MAO-A and MAO-B, exist, with different substrate specificities. The genes encoding for the isoenzymes are located on the X-chromosome in the same region as the Norrie disease gene. In 1993 we described the first patients with isolated MAO-A deficiency. Five patients with deficiencies of both isoenzymes combined with Norrie disease as a contiguous gene syndrome have been described earlier, and recently we have identified the first two cases of isolated MAO-B deficiency (in association with Norrie disease).

We studied the neurochemical phenotypes of various affected individuals and compared these with the clinical phenotypes. Strongly elevated plasma and urinary O-methylated catecholamine metabolites and serotonin, but very low deaminated (acid and neutral) catecholamine and serotonin metabolites were seen in MAO-A deficient patients as well as in the

Norrie +MAO-A/B deficiency patients. The Norrie + MAO-B deficiency patients only had increased excretion of the specific MAO-B substrate phenylethylamine.

The clinical phenotypes are: mild mental retardation with impulsive aggressive behaviour in MAO-A deficiency, severe mental retardation and blindness in the Norrie +MAO-A/B deficient patients, resp. no mental retardation or behaviour abnormalities in the Norrie + MAO-B deficient brothers.

*Conclusions.* The elevation of serotonin as the only amine, in MAO-A deficient patients, seems relevant in the light of the aggressive behavioural disturbances also seen in MAO-A deficient knockout mice.

The role of MAO-A in the metabolism of the biogenic amines seems to be of more physiological importance than the role of MAO-B.

The striking and consistent neurochemical abnormalities in urine and plasma of MAO-A deficient patients have provided a powerful diagnostic tool for this deficiency.

### 84. Unexpected laboratory and clinical findings in a new case of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency

N.G.G.M. ABELING, A.H. van GENNIP, P.G. BARTH, A. van CRUCHTEN, M. BLOM and F.A. WIJBURG

*Academic Medical Centre, University of Amsterdam, Laboratory Genetic Metabolic Diseases, Dept of Clinical Chemistry and Div. Emma Children's Hospital*

Aromatic L- Amino Acid Decarboxylase (AADC) deficiency is one of the genetic enzyme defects in the biogenic amine neurotransmitter metabolism detected in recent years. The only 2 patients described as yet were twins and presented at the age of two months with severe hypotonia, developmental delay and 'fits'. Both children also showed almost complete absence of spontaneous movements, oculogyric crises and sometimes choreathetoid movements of the extremities (Hyland et al. 1990).

The diagnosis was essentially based on the finding of elevated CSF levels of L-DOPA, 5-hydroxytryptophan and 3-methoxytyrosine, in combination with very low levels of homovanillic acid (HVA) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA). Measurement of the enzyme activity in plasma and liver confirmed the diagnosis.

Our patient, a girl, presented first at the age of one year with only mild motor retardation, and general screening for inborn errors of metabolism was negative.

One year later the patient was re-evaluated on urgent request

of the mother who had seen a patient with tyrosine hydroxylase deficiency presented in a television program and was convinced of her child having a similar disorder.

Surprisingly our examination of a CSF sample showed a strikingly abnormal pattern of biogenic amine metabolites indicating AADC deficiency, which also could be confirmed by enzyme analysis in plasma.

Clinically at that time the patient showed some of the typical abnormalities described in the twins, but without hypotonia, and clearly a much milder clinical picture.

Analysis of urines for biogenic amines and metabolites showed decreased levels of 5-HIAA, vanillylmandelic acid (VMA) and methoxyhydroxyphenylglycol (MHPG), but consistently normal or even elevated levels of dopamine and HVA.

This phenomenon could not fully be ascribed to dietary factors, such as bananas or other catecholamine-rich foodstuffs and remains to be explained.

Ref. Hyland K et al. *Neurology* 1992; 42: 1980-1988.

### 85. Transient hemolytic anemia in a newborn caused by glutathione peroxidase deficiency

C. BEIJER<sup>1</sup>, G.M.A. SWART<sup>2</sup>, J.TH. WIJNEN<sup>3</sup>, P MEERA KHAN<sup>3</sup>, P.C. GIORDANO<sup>3</sup> and L.F. BERNINI<sup>3</sup>

*Depts of Clin Chem<sup>1</sup> and Neonatology<sup>2</sup>, Het Diaconessenhuis, Leiden; MGC, Institute of Human Genetics<sup>3</sup>, State University of Leiden*

Isoimmunization due to a blood group incompatibility is probably the leading cause of neonatal hemolytic disease in most parts of the world. Other inherited, transient or acquired defects of the red cell are being recognized as a cause of neonatal anemia or jaundice.

Here we present a case of a rare enzyme deficiency in the erythrocytes of a newborn characterized by transient hemolysis, anemia and jaundice. After a caesarean section a premature apparent healthy male infant was born. Physical examination of the infant on the 3rd day revealed jaundice. Laboratory results: Hb, 8.7 mmol/l; bilirubin, 133 µmol/l; reticulocytes, 7.5%.

The blood smear showed no sferocytes or any other remarkable findings. On the 5th day the infant's bilirubin increased to 216 µmol/l -with a reticulocytosis of 14 % - upon which he received phototherapy. On the 7th day the bilirubin increased to a peak value of 260 µmol/l. A blood group incompatibility was excluded. Activities of PK and G6PD in the erythrocytes of the infant were within the reference interval. A thalassaemic disorder was excluded. A bacterial or viral infection could not be established. Further laboratory investigations for enzyme activities in the patient's erythrocytes revealed a reduced glutathione peroxidase (GSH-Px) activity. Additionally ery-



throcytes of the patient's mother also showed reduced GSH-Px activity. On the 16th day the infant was discharged from the hospital, laboratory results: Hb 7.1 mmol/l; bilirubin, 146  $\mu$ mol/l; 4.6 % reticulocytes.

GSH-Px reduces peroxides to water and oxygen in the presence of reduced glutathione protecting the cell from oxidative

damage. GSH-Px is a tetrameric selenoenzyme. The Se concentration in the mother's serum was within the reference interval however in the infant's serum below the reference interval. To date it is not clear however, if Se supplementation is favorable to a patient's clinical condition if GSH-Px deficiency is established.

### 86. Heterozygosity for a point mutation in an invariant splice donor site of dihydropyrimidine dehydrogenase and severe 5-fluorouracil related toxicity

A.B.P. van KUILENBURG<sup>1</sup>, P. VREKEN<sup>1</sup>, L.V.A.M. BEEEX<sup>2</sup>, R. MEINSMA<sup>1</sup>, H. van LENTHE<sup>1</sup>, R.A. de ABREU<sup>3</sup> and A.H. van GENNIP<sup>1</sup>

*Academic Medical Center, University of Amsterdam, Lab. Genetic Metabolic Diseases, Dept. of Clinical Chemistry and Div. Emma Children's Hospital<sup>1</sup>, Amsterdam; Academic Hospital Nijmegen, Dept. of Endocrine Diseases<sup>2</sup>, Nijmegen; Academic Hospital Nijmegen, Dept. of Pediatrics<sup>3</sup>, Nijmegen*

Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) is responsible for the breakdown of the widely used antineoplastic agent 5-fluorouracil (5FU), thereby limiting the efficacy of the therapy. It has been suggested that patients suffering from 5FU toxicities due to a low activity of DPD are genotypically heterozygous for a mutant allele of the gene encoding DPD. In this study we investigated the cDNA and a genomic region of the DPD gene of a cancer patient experiencing severe toxicity following 5FU treatment, for the presence of mutations.

Although a normal activity of DPD was observed in fibroblasts, the DPD activity in leukocytes of the cancer patient proved to be in the heterozygous range. Analysis of the DPD

cDNA showed heterozygosity for a 165 bp deletion that results from exon skipping. Sequence analysis of the genomic region encompassing the skipped exon showed that the tumour patient was heterozygous for a G->A point mutation in the invariant GT splice donor sequence in the intron downstream of the skipped exon. So far, the G->A point mutation has also been found in 8 out of 11 patients suffering from a complete deficiency of DPD. Considering the frequent use of 5FU in the treatment of cancer patients analysis of the DPD activity and screening for the G->A mutation should be routinely carried out prior to the start of the treatment with 5FU.

### 87. Two novel mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene and expression of missense mutations

P. VREKEN, A.B.P. van KUILENBURG, R. MEINSMA and A.H. van GENNIP

*Academic Medical Center, University of Amsterdam, Laboratory Genetic Metabolic Diseases, Dept. of Clinical Chemistry and Div. Emma Children's Hospital, Amsterdam*

Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency (McKusick 274270) is a, clinically heterogeneous, autosomal recessive disease. DPD (EC 1.3.1.2.) catalyses the first and rate-limiting step in the catabolism of uracil, thymine and the analogue 5-fluorouracil. Patients with a nearly complete enzyme defect show convulsive disorders in about 50% of cases whereas patients experiencing acute 5-fluorouracil toxicity usually show DPD enzymatic activities in the heterozygous range.

So far, four mutations in the DPD gene have been described. The first mutation is a G (A point mutation in an invariant GT splice donor sequence leading to skipping of an 165 bp exon. This mutation has been identified in 17/26 alleles from patients with complete DPD deficiency. In addition, heterozygosity for this mutation was shown in patients experiencing

acute 5-fluorouracil toxicity. Three other mutations, a frameshift DC1897) and two missense (C29R and R886H) mutations were identified in two patients from Turkey.

We now report a novel four base deletion (delTCAT 296-299) in a family with DPD deficiency and a novel missense mutation R235W. Both the latter and previously identified missense mutations were introduced into a wild-type DPD cDNA and subcloned in a pSE420 expression vector. Expression vectors containing either wild-type DPD cDNA or mutated alleles tested for DPD activity in order to establish whether C29R, R885H and R235W are responsible for the DPD deficient phenotype. The expression studies show that C29R and R235W lead to a mutant DPD protein without significant residual enzymatic activity, whereas the R886H mutation leads to a DPD protein with about 25% activity.

### 88. The synthesis of the neurotransmitter $\beta$ -alanine can be inhibited in propionic acidemia

A.H. van GENNIP, N.G.G.M. ABELING, P. VREKEN, H. van LENTHE, E.G. SCHOLTEN and A.B.P. van KUILENBURG  
*Academic Medical Center, Laboratory Genetic Metabolic Diseases, University of Amsterdam, Dept. of Clinical Chemistry and Div. Emma Children's Hospital, Amsterdam*

$\beta$ -Ureidopropionase (UP, EC 3.5.1.6) is the third enzyme in the catabolic pathways of uracil and thymine. It catalyses the degradation of both  $\beta$ -ureidopropionic acid and  $\beta$ -ureidoisobutyric acid to  $\beta$ -alanine and  $\beta$ -aminoisobutyric acid, respectively. A deficiency of UP leads to a diminished production of the neurotransmitter amino acid  $\beta$ -alanine. Propionic acidemia is due to a primary deficiency of the enzyme propionyl CoA carboxylase (EC 6.4.1.3). The clinical picture is characterised by repeated relapses and neurologic sequelae are common. Among the neurological complications focal and general seizures as well as EEG abnormalities are often observed. During relapse substantial accumulation of propionate in all body fluids occurs.

It has been reported that propionate inhibits UP of *Euglena Gracilis*. We found that UP activity of human liver was also inhibited by propionate at concentrations found in plasma of patients with propionic acidemia. UP activity was estimated in liver after incubation with [<sup>14</sup>C]-dihydrouracil by measurement of radioactivity in N-carbamyl- $\beta$ -alanine and carbon dioxide. Evidence for the "in vivo" inhibition of UP by propionate was obtained by the finding of elevated excretion of N-carbamyl- $\beta$ -alanine in patients with propionic acidemia during relapse. This finding may indicate reduced production of  $\beta$ -alanine, which could contribute to the neurologic manifestations.

## 89. Dihydropyrimidinase deficiency: clinical and biochemical aspects

A.H. van GENNIP<sup>1</sup>, R.A. de ABREU<sup>2</sup>, G.F. HOFFMANN<sup>3</sup>, P. VREKEN<sup>1</sup> and A.B.P. van KUILENBURG<sup>1</sup>  
*Academic Medical Center, University of Amsterdam, Laboratory Genetic Metabolic Diseases<sup>1</sup>, Dept. of Clinical Chemistry and Div. Emma Children's Hospital, Amsterdam; Depts. of Ped. and Neuro<sup>2</sup>., University Hospital Nijmegen and Universitäts Kinderklinik<sup>3</sup> Marburg, German*

Until now six individuals have been reported with dihydropyrimidinuria. Epileptic or convulsive attacks were mentioned in three and mental retardation in two of these individuals. Growth retardation, dysmorphic features, microcephaly and motor retardation were seen in one individual. One patient suffered from intractable diarrhoea due to congenital microvillous atrophy, but had no other symptoms. Two individuals detected by mass-screening are healthy. Dihydropyrimidinuria follows an autosomal pattern of inheritance. Patients can easily be detected by the huge amounts of dihydropyrimidines and slightly to moderately elevated amounts of uracil and thymine in their

urine. These compounds are also increased in plasma and CSF. Pyrimidine catabolites down to dihydropyrimidinase (DHP, EC 3.5.2.2.) are low or absent. Shortage of one of these catabolites i.e. the neurotransmitter amino acid  $\beta$ -alanine may contribute to the cerebral dysfunction of some of the patients. Severe neurotoxicity after 5-fluorouracil intake can be expected. We confirmed DHP deficiency in two patients by analysis of enzyme activity in liver tissue of these patients and comparison with the activities in eight control liver samples. Molecular defects underlying DHP deficiency have not yet been reported.

## 90. Allel-discriminating fluorescent probes for the semi-automated detection of the C677T mutation in the MTHFR gene

B.A.J. GIESENDORF<sup>1</sup>, J.A.M. VET<sup>2</sup>, E. MENSINK<sup>3</sup>, S. TYAGI<sup>2</sup>, J.M.F. TRIJBELS<sup>1</sup> and H.J. BLOM<sup>1</sup>  
*University Hospital Nijmegen, Department of Pediatrics<sup>1</sup>, Public Health Research Laboratory, New York University, Department of Molecular Genetics, New York, USA<sup>2</sup>; University Hospital Nijmegen, Department of Haematology<sup>3</sup>*

Hyperhomocysteinaemia has been identified as a risk factor for cerebro-, peripheral and coronary arterial disease. Elevated levels of plasma homocysteine can result from genetic or nutrient-related disturbances in the homocysteine metabolism. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) catalyzes the reduction of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, the methyl-group donor for re-methylation of homocysteine to methionine. A mutation (C677T) in the MTHFR gene has been identified which alters a highly-conserved amino acid. The mutation in the homozygous or heterozygous state correlates with reduced enzyme activity and increased homocysteine levels.

Current techniques to investigate the single base pair mutation at the DNA level are based on the polymerase chain reaction (PCR) and subsequent restriction enzyme digestion and agarose electrophoresis.

The method presented here consists of a PCR in which an

allele-specific fluorescent probe, a so-called molecular beacon, is included. The probes undergo a spontaneous fluorogenic conformational change by hybridisation to their targets and only under this condition emit a fluorescent signal. Beacons can discriminate between wildtype - and mutant targets which differ by only one basepair. These probes can be used in nucleic acid amplification assays. So, by monitoring the specific fluorescence using the ABI PRISM 7700, homogenous and sensitive gene detection is possible. The procedure is carried out in a sealed tube, avoiding cross-contamination.

With these techniques, we developed a PCR-probe assay for the detection of the C677T mutation in the MTHFR gene, resulting in a very fast, automated closed-tube procedure for the diagnosis of the MTHFR mutation with a high sample throughput.

This work is supported by the EU Commission Demonstration Project Contract no. BMH4-CT95-0505.

## 91. Measurement of cholesterol and 7-dehydrocholesterol biosynthesis in slo fibroblasts by gaschromatography mass spectrometry (GCMS)

J.G.N. de JONG<sup>1</sup>, P. JIRA<sup>2</sup>, J.A.J.M. BAKKEREN<sup>2</sup>, R. ZUIDERENT<sup>2</sup>, R.A. WEVERS<sup>1</sup>, R.A. WANDERS<sup>3,4</sup>, G.J. ROMEIJN<sup>4</sup> and J.A.M. SMEITINK<sup>2</sup>  
*University Hospital Nijmegen, Departments of Neurology<sup>1</sup> and Pediatrics<sup>2</sup>, Nijmegen, The Netherlands and University of Amsterdam, Academic Medical Centre, Departments of Pediatrics<sup>3</sup> and Clinical Chemistry<sup>4</sup>*

The Smith-Lemli-Opitz (SLO) syndrome is a recessive inherited disorder biochemically characterized by an increased concentration of 7-dehydrocholesterol (7DHC) and decreased concentration of cholesterol in plasma and tissues. The underlying enzyme defect is a deficiency of 7DHC-D7-reductase, the enzyme that catalyzes the penultimate reaction in the biosynthetic pathway of cholesterol. More than 20 enzymes are involved in the biosynthesis of cholesterol and only a few deficiencies have been described (mevalonate kinase deficiency, SLO syndrome, desmosterolosis). Deficiencies of one of the enzymes in the cholesterol synthetic pathway will as is the case with the known deficiencies give rise to an accumulation of characteristic intermediates together with a lower cholesterol biosynthesis rate. GCMS analysis of cell extracts after incorporation of <sup>13</sup>C-labelled acetate can be used as a general procedure to detect and measure an increase in incorporation of label into intermediates together with a decrease in the cholesterol biosynthesis rate. We tested this on fibroblasts from a normal control and two SLO patients, one with a

severe (SLO-1) and the other with less severe (SLO-2) clinical picture, preincubated for 48 hrs on lipoprotein deficient medium and labelled subsequently with 2-<sup>13</sup>C-acetate. On basis of label incorporated into the various isotopomers the biosynthesis rate of cholesterol and 7DHC in SLO and control cell lines could be compared with those in a control cell line. In SLO cells label was incorporated mainly in 7DHC while only minor incorporation was seen in cholesterol. In control cell lines labelling was highest in cholesterol but some labelling was also seen in the 7DHC. In two SLO cell lines and one control cell line the ratios of label incorporated into 7DHC to that into cholesterol were 88,6 (SLO-1), 22,2 (SLO-2) and 0,17 (control). Rates of incorporation of labelled acetate into cholesterol were 0,97 (SLO-1), 14,9 (SLO-2) and 125 (control) pmol/mg protein/hr. For 7DHC these figures were 86,2 (SLO-1), 329 (SLO-2) and 21,2 (control). Incorporation of label into other intermediates like 8-dehydrocholesterol could be recognized by isotopomer formation. Only minor incorporation of label was seen in this compound.

## 92. In vitro expression of mutations observed in patients with homocystinuria due to cystathionine $\beta$ -synthase deficiency

L.A.J. KLUIJTMANS<sup>1</sup>, M.C.H. DE VISSER<sup>1</sup>, G.H.J. BOERS<sup>2</sup>, S.G. HEIL<sup>1</sup>, J.P. KRAUS<sup>3</sup>, L.P.W.J. van den HEUVEL<sup>1</sup>, F.J.M. TRIJBELS<sup>1</sup> and H.J. BLOM<sup>1</sup>

*Departments of Pediatrics<sup>1</sup> and Internal Medicine<sup>2</sup>, University Hospital Nijmegen; Department of Pediatrics<sup>3</sup>, University of Colorado School of Medicine, Denver CO, USA*

Classic homocystinuria is caused by a homozygous deficiency in the first enzyme of the transsulfuration pathway: cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS). Diagnosis of patients was established by severe hyperhomocysteinemia, hypermethioninemia, decreased levels of cysteine in plasma, and decreased CBS activities in extracts of cultured fibroblasts. Total RNA was isolated from fibroblasts, reverse transcribed to cDNA and subsequently amplified by PCR for direct sequencing analysis. This resulted in the identification of nine mutations leading to the following amino acid substitutions: R125W, I152M, C165Y, V180A, T191M, I278T, R369C, V371M, T434N, D444N and R491C. The mutations were introduced

and expressed in an *E.coli* expression system to screen for functional significance. All mutated constructs, except for the one containing the D444N substitution, resulted in a low residual (< 20%) CBS activity compared with wild type constructs. The D444N mutation was found to interfere in the regulation of CBS activity by S-adenosylmethionine (AdoMet), demonstrating the importance of an adequate regulation of homocysteine metabolism. The continued identification and characterization of new mutations in the CBS gene will lead to increasing knowledge on genotype-phenotype correlations in patients with severe hyperhomocysteinemia due to CBS deficiency.

## 93. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinemia in neural-tube defects and vascular disease

N.M.J. van der PUT<sup>1</sup>, E.F. van de MOLEN<sup>1</sup>, L.A.J. KLUIJTMANS<sup>1</sup>, S.G. HEIL<sup>1</sup>, J.M.F. TRIJBELS<sup>1</sup>, T.K.A.B. ESKES<sup>2</sup>, D. van OPPENRAAIJ<sup>1</sup>, R. BANERJEE<sup>3</sup> and H.J. BLOM<sup>1</sup>

*Departments of Pediatrics<sup>1</sup> and Gynaecology & Obstetrics<sup>2</sup>, University Hospital Nijmegen; Department of Biochemistry<sup>3</sup>, University of Nebraska, Lincoln, USA*

Elevated homocysteine (Hcy) levels are observed in two apparently unrelated diseases like neural-tube defects (NTD) and premature vascular disease. Recently the human cDNA-sequence of MS has been cloned and mapped to chromosome 1q43. A defective MS could result in elevated Hcy levels. The coding region of MS of 8 hyperhomocysteinemic patients (4 NTD patients and 4 patients that had pregnancies complicated with placental infarcts (PI)) was examined for possible mutations related to hyperhomocysteinemia. We identified an A to G transition at bp 2756, converting an aspartic acid (D919) into a glycine (G). No other mutations were observed. This 2756A $\rightarrow$ G mutation creates a *Hae*III restriction site, which enables restriction site analysis on genomic DNA. To examine if the observed 2756A $\rightarrow$ G mutation is a risk factor for NTD or vascular disease we screened on genomic DNA for its prevalence among 56 NTD patients, 69 mothers of a child with NTD, 108 patients with PI and 364 controls. The GG-genotype was present in 1.8% of the NTD patients, 2.9% of their

mothers, 2.8% of PI patients and 3.3% of controls. The AG-genotype was present in 25% of the NTD patients, 27.5% of the mothers with a NTD child, 28.7% of PI patients and 25.8% of the controls. So, no increased prevalences of the GG- and AG-genotype were present in NTD patients, their mothers and patients with PI, indicating that the 2756A(G) mutation is not a major risk factor for NTD or PI. This is reflected by the non-significant odds ratios of 0.5-1.1 for the GG- and AG-genotypes in PI patients, NTD patients and their mothers. To study if the 2756A $\rightarrow$ G mutation in MS is associated with hyperhomocysteinemia we examined the mean Hcy levels per MS genotype. We observed no correlation between the presence of a GG- or AG-genotype and elevated Hcy levels. So, the 2756A (G) mutation is a fairly prevalent, but rather benign polymorphism. This study provides no evidence for a major involvement of mutations in the coding region of the human MS gene in the etiology of homocysteine-related diseases like NTD or vascular disease.

## 94. Molecular basis of rhizomelic chondrodysplasia punctata: discovery of the gene, PXR2, a peroxisome import receptor and identification of mutations in RCDP-patients

A. MOTLEY<sup>1,2</sup>, E. HETTEMA<sup>1,2</sup>, E. HOGENHOUT<sup>1</sup>, A. ten ASBROEK<sup>3</sup>, P. BRITES<sup>1,2</sup>, F. BAAS<sup>3</sup>, F. WIJBURG<sup>2</sup>, H.S.A. HEYMANS<sup>1</sup>, H.F. TABAK<sup>4</sup>, R.J.A. WANDERS<sup>1,2</sup> and B. DISTEL<sup>4</sup>

*Academic Medical Center, University of Amsterdam, Laboratory Genetic Metabolic Diseases, Dept. Clinical Chemistry<sup>1</sup>, Pediatrics<sup>2</sup>, Emma Children's Hospital, Neurology<sup>3</sup> and Biochemistry<sup>4</sup> Amsterdam*

Rhizomelic chondrodysplasia punctata (RCDP) is an autosomal recessive disease characterized by a disproportionate stature, typical facial appearance, congenital contractures, eye abnormalities and severe growth- and mental retardation. Our earlier studies have revealed biochemical and genetic homogeneity among the majority of RCDP-patients. Indeed, they show a tetrad of biochemical abnormalities including a deficiency of dihydroxyacetonephosphate acyltransferase, alkylidihydroxyacetonephosphate synthase, phytanoyl-CoA hydroxylase and peroxisomal thiolase. Furthermore, all the patients belong to one single complementation group. We have previously demonstrated that RCDP cells are unable to import a reporter protein carrying the type 2 (but not type 1) Peroxisome Targeting Signal (PTS2). This phenotype is similar to that found in a *S. cerevisiae* mutant (pex7). The *S. cerevisiae* PTS2-receptor is

a 375 AAs protein belonging to the  $\beta$ -transducin family. To learn which amino acid residues are important for PTS2 function, we first cloned a second yeast homologue (*K. lactis*) by functional complementation. This led to the identification of an EST showing high homology. An almost full-length human cDNA was constructed using RACE-PCR. The human ORF was screened for mutations by SSCP analysis after RT-PCR: three different alleles were found in 9 patients. Sequence analysis of SSCP fragments revealed a frequent L (STOP mutation at position 261 resulting in a 33 amino acid truncation of the protein. Expression studies showed that this truncated protein is indeed functionally inactive. In conclusion, we have resolved the molecular basis of RCDP which will be of great importance for pre- and postnatal diagnosis, carrier detection, etc.

## 95. Cerebrotendinous xanthomatosis (CTX): mutations in the Dutch population

A. VERRIPS<sup>1</sup>, G.C.H. STEENBERGEN<sup>2</sup>, J.A.F.M. LUYTEN<sup>2</sup>, L.P.W.J. van den HEUVEL<sup>2</sup>, A. KEYSER<sup>1</sup>, F.J.M. GABREELS<sup>1</sup> and R.A. WEVER<sup>2</sup>

*Department of Neurology<sup>1</sup>, Laboratory of Pediatrics and Neurology<sup>2</sup>, University Hospital Nijmegen*

Cerebrotendinous xanthomatosis (CTX) is a rare autosomal recessive lipid storage disease characterised by a disturbed bile acid metabolism caused by a deficiency of the mitochondrial enzyme sterol 27-hydroxylase (CYP 27). CYP 27 deficiency leads among others to an excessive production of cholestanol that accumulates in many tissues. The clinical onset of CTX is characterized by premature bilateral cataract, followed by neurologic and neuropsychiatric abnormalities and formation of tendon xanthomas. In children the combination of bilateral cataract and intractable diarrhoea is indicative of the diagnosis.

In 1991 Cali et al. cloned the cDNA for the human CYP 27 and localised its gene on chromosome 2 (q33-qter). The structure of the human CYP 27 gene was elucidated by Leitersdorf

et al. in 1993. Several mutations in the CYP 27 gene have been described. At this moment 28 patients out of 14 CTX families are known in the Netherlands. In these 28 patients we found six new mutations and five others already described in the literature: one splice donor site mutation (intron 4) resulting in the skipping of exon 4, three premature termination codons (two in exon 3, one in exon 4) and two missense mutations in the pivotal coding region of the exons 6 and 7. We found a considerable variability in the phenotype of each of the 11 different mutations in the 28 CTX patients and a phenotypic variation within families. When a new patient with CTX is diagnosed, it is indicated to examine the other sibs. The search for the relevant mutation, especially in still asymptomatic sibs is important as an adequate therapy is available.

## 96. Phytanoyl-CoA hydroxylase deficiency: discovery of the enzyme defect in Refsum disease. Purification and characterization of the enzyme from rat liver

G.A. JANSEN<sup>1</sup>, R. OFMAN<sup>1</sup>, C.J. de GROOT<sup>2</sup>, C. JAKOBS<sup>3</sup>, H.W. MOSER<sup>4</sup>, P.A. WATKINS<sup>4</sup>, S.J. MIHALIK<sup>4</sup> and R.J.A. WANDERS<sup>1,2</sup>

*Academic Medical Center, University of Amsterdam, Laboratory Genetic Metabolic Diseases, Depts. of Clinical Chemistry<sup>1</sup> and Pediatrics<sup>2</sup>, Emma Children's Hospital, Amsterdam; Free University Hospital, Dept. Clinical Chemistry, Amsterdam, The Netherlands<sup>3</sup>; Kennedy Krieger Institute, Baltimore, USA<sup>4</sup>*

Heredopathia atactica polyneuritiformis was first described as a new familial neurologic syndrome by Sigvald Refsum in the 1940's, and is characterized by a constellation of clinical features including retinitis pigmentosa, peripheral polyneuropathy, cerebellar ataxia and elevated CSF protein without pleocytosis. Studies in the 1960's showed the accumulation of phytanic acid, an unusual branched chain fatty acid, in tissues and body fluids from Refsum disease patients. Subsequent studies revealed that this accumulation is due to a defect in the oxidation of phytanic acid. However, until now, the nature of this defect was not elucidated, despite many studies in the last 30 years. Recently, we have identified a new enzyme activity in rat liver peroxisomes catalyzing the conversion of phytanoyl-CoA to 2-hydroxyphytanoyl-CoA. This

enzyme activity was one good candidate for the enzyme defect in Refsum disease, so we have now set up a method allowing phytanoyl-CoA hydroxylase activity measurement in human liver homogenates, using HPLC plus [1-<sup>14</sup>C]phytanoyl-CoA to measure the formation of 2-hydroxyphytanoyl-CoA. The enzyme belongs to the family of dioxygenases and requires Fe<sup>2+</sup>, ascorbate and 2-oxoglutarate for activity. We now report that phytanoyl-CoA hydroxylase activity is deficient in liver from a Refsum disease patient, thus showing that this is the enzymatic defect in Refsum disease. Furthermore we have purified and characterized phytanoyl-CoA hydroxylase from rat liver. We are now raising antibodies against the rat liver enzyme and will use these for further studies in Refsum disease.

## 97. Tyrosine hydroxylase deficiency: clinical presentation, bio-chemistry, DNA analysis and treatment in four Dutch cases

R.A. WEVER<sup>1</sup>, J.F. de RIJK-van ANDEL<sup>2</sup>, M.J.T. JANSEN<sup>1</sup>, F.J.M. GABREELS<sup>3</sup>, J.A.M. SMEITINK<sup>4</sup> and L.P. van den HEUVEL<sup>1</sup>

*Departments of Neurology<sup>1</sup>, Child Neurology<sup>3</sup> and Metabolic Diseases<sup>4</sup>, University Hospital Nijmegen and Department of Neurology<sup>2</sup>, Ignatius Hospital, Breda*

In 4 unrelated children (2 males; 2 females; age: 11-38 mo.) severe psychomotor retardation and an apparent hypertonic tetraparesis combined with hypokinesia and axial hypotonia became clear after the first months of life. No diurnal fluctuation in symptoms was observed. The electroencephalogram showed a monomorf background pattern in the 4 children. Brain MRI and CT scanning were normal. CSF concentrations of homovanillic acid (HVA) and 3-methoxy 4-hydroxy phenylethylene glycol (MHPG) were decreased (HVA 31-117 nM; reference range 400-700, MHPG 2-13 nM; reference range 28-64). 5-HIAA, neopterin, biopterin, phenylalanine and tyrosine in CSF were normal. Low CSF HVA and MHPG in combination with normal CSF 5-HIAA led to the working hypothesis tyrosine hydroxylase (TH) deficiency. TH, the initial and rate-limiting enzyme in dopamine synthesis, is expressed in human brain (substantia nigra and locus coeruleus) and adrenal medulla. So, tissue samples for enzymatic measurements are usually not available. More direct proof that TH deficiency is present can be obtained by L-Dopa supplementation. Following treatment with L-Dopa and

the decarboxylase inhibitor carbidopa, 3 mg/kg and 0.75 mg/kg divided in 3 daily doses, all children showed a rapid spectacular clinical improvement, thus supporting the putative enzyme deficiency. In urine of our 4 patients both HVA and VMA were low to low normal and could not be used as diagnostic parameters in individual cases. In 1994 Clayton et al. (1) described the first patient suggestive for TH deficiency. Recently, Lüdecke et al. (2) and Knappskog et al. (3) described a point mutation (Q 381 K) in the TH gene in 2 patients with autosomal recessive L-Dopa responsive dystonia (DRD). DNA analysis in our patients revealed a homozygous point mutation in the gene in 3 of the 4 patients. The mutation was not present in 50 healthy controls. Expression studies are in progress.

### References

1. Clayton PT et al. Abstract 32nd Annual Symposium SSIEM, Edinburgh 1994.
2. Lüdecke B et al. Hum Genet 1995; 95: 123-125.
3. Knappskog PM et al. Hum Mol Genet 1995; 4: 1209-1212.

## 98. Dimethylglycine dehydrogenase deficiency as putative defect in a new inborn error of metabolism: A H-NMR spectroscopy study

R.A. WEVERS<sup>1</sup>, J. POGGI-BACH<sup>2</sup>, U. ENGELKE<sup>1</sup>, A. HEERSCHAP<sup>1</sup> and J.G.N. de JONG<sup>1</sup>

*Institutes of Neurology and Radiology<sup>1</sup>, University Hospital Nijmegen and Laboratoire de Biochimie, Hôpital Bicêtre<sup>2</sup>, Paris*

A 38-year-old male complained about a persistent fish odour smell increasing under stress from the age of 5 years onwards. Serum CK is always increased. The parents, brothers and sister are healthy. Routine clinical chemistry determinations do not show any abnormalities. Haematological parameters are also unremarkable. Using high resolution H-NMR spectroscopy (1) we studied urine and serum of the patient. Trimethylaminuria, or fish odour syndrome, could be excluded with H-NMR spectroscopy as described earlier (2). Very high concentrations of N,N-dimethylglycine were observed in both body fluids (characteristic singlet resonances at 2.94 and 3.79 ppm). The identity of this compound was confirmed using GC-MS and

also with <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. N,N-dimethylglycine has a strong fish odour. Normal values were obtained for serum homocysteine, folate and cobalamin. Urinary betaine was slightly elevated and sarcosine was normal. Our data are indicative for a defect in dimethylglycine dehydrogenase. This is an as yet unknown inborn error of metabolism that is not diagnosed with standard metabolic screening techniques.

### References

1. Wevers RA et al. Clin Chem 1994; 40: 1245-1250.
2. Abeling NGGM et al. J Inher Metab Dis 1995; 18: 182-184.

## Gynecologie en Obstetrie

### 99. Richtlijnen diagnose en controle zwangerschapsdiabetes

P. FRANCK<sup>1</sup>, G. GERRETESSEN<sup>2</sup>, L. BEUMER<sup>3</sup>, A. PELLE<sup>4</sup>, P. WERNINK<sup>4</sup> en J. HOLM<sup>2</sup>

*Klinische Chemie<sup>1</sup>, Gynaecologie<sup>2</sup>, Diëtetiek<sup>3</sup> en Interne Geneeskunde<sup>4</sup>, Ziekenhuis Leyenburg, Den Haag*

Gezien de hoge prevalentie van zwangerschapsdiabetes (2-3%) is het raadzaam een goede procedure te ontwikkelen om iedere zwangere hierop te screenen. Tot voor kort gold binnen Ziekenhuis Leyenburg de Lunch Tolerantie Test (LTT) als maatstaf voor de diagnose zwangerschapsdiabetes. Onbevredigende analytische resultaten en het ontbreken van duidelijke richtlijnen hebben ertoe geleid dat na intensief overleg tussen de relevante afdelingen er een nieuwe procedure is opgesteld. Deze procedure houdt in:

1. Screening: Alle zwangeren (24e-28e week) een capillaire plasma glucosewaarde, twee uur na de lunch.
2. Definitieve diagnose: Indien de glucose screening afwijkend is (> 7,0 mmol/l), wordt een Orale Glucose Tolerantie Test (OGTT, 75 g glucose) uitgevoerd met speciale capillaire plasma glucose grenswaarden voor zwangeren (nuchter < 7,8 mmol/l, 1uur < 12,0 mmol/l en 2uur < 10,0 mmol/l). Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen Zwangerschaps

“Impaired Glucose Tolerance” (Zw IGT) en Zwangerschaps Diabetes Mellitus (Zw DM).

3. (Poli)-klinische behandeling en controle: Bij Zw IGT wordt als behandeling gestart met een koolhydraat gespreid dieet en pyridoxine (50 mg, 1 x daags). Controle vindt poliklinisch plaats m.b.v. het glucosegehalte twee uur na de lunch.

Bij Zw DM wordt eveneens gestart met een koolhydraat gespreid dieet en pyridoxine. Controle vindt poliklinisch plaats met behulp van glucose dagcurve.

Indien de glucosewaarden van de screening of OGTT hiertoe aanleiding geven of poliklinisch geen goede glucose regulatie tot stand komt, volgt klinische opname, al dan niet met toediening van insuline. Instelling vindt plaats op geleide van een klinische dag/nachtcurve.

Na twee jaar is de procedure geëvalueerd en voldoet aan de verwachtingen.

## Diversen

### 100. De bepaling van icodextrines en de daaraan gerelateerde afbraakproducten bij jonge CCPD patiënten

J.L. WILLEMS<sup>1</sup>, B.J.T. van HAREN<sup>1</sup>, A.W. de BOER<sup>2</sup>, C.H. SCHRODER<sup>2</sup> en L.A.H. MONNENS<sup>2</sup>

*Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>1</sup> en de Afdeling Kindergeneeskunde<sup>2</sup>, Academisch Ziekenhuis Nijmegen, St Radboud, Nijmegen*

Icodextrines worden als alternatief voor glucose in dialysevloeistof toegepast bij patiënten met een terminaal nierlijden, die behandeld worden met CCPD (continue cyclische peritoneaal dialyse). Deze glucosepolymeren hebben boven glucose het voordeel dat de osmotische werking langer is omdat ze alleen via lymfatische absorptie in de circulatie kunnen worden opgenomen. Door de verlengde osmotische werking van icodextrines kunnen de dweltijden worden verlengd. Ook de nadelige effecten van glucose in de klassieke peritoneaalvloeistof kunnen hierdoor worden voorkomen zoals hyperosmolariteit en een lage pH. Icodextrines, die in de circulatie worden opgenomen worden omgezet door “-amylase in di- en oligosacchariden. Bij kinderen is het niet bekend hoe het verloop is van de concentraties van deze stoffen bij opeenvolgende CCPD behandelingen. We ontwikkelden methoden in bloed om icodextrines en de afbraakproducten te analyseren. De icodextrineconcentratie werd bepaald door de meting van glucose na chemische hydrolyse terwijl de di- en oligosacchariden gehalten werden bepaald met behulp van HPLC gebruikmakend van een ionwisselaar met gepulste amperometrische detectie. De binnenrun-variantie bedroeg voor icodextrines en de sacchariden moleculen van maltose tot en met maltoheptose respectievelijk 2% en 2 tot 5%. De tussenrun-variantie was respectievelijk 5% en 4 tot 7% voor icodextrines en de sacchariden met oplopende aantal glucose eenheden. De detectiegrenzen bedraagt voor deze moleculen ongeveer 0,2 µmol/l. Deze analyses werden toegepast bij kinderen, die werden behandeld met CCPD. Uit de voorlopige experimenten bleek dat de concentraties van icodextrines en de metabolieten licht toenamen, waarna een stabiel nivo werd verkregen bij opeenvolgende behandelingen, hetgeen betekent dat icodextrines veilig kunnen worden gebruikt bij jonge patiënten, die behandeld worden met CCPD.

tratie werd bepaald door de meting van glucose na chemische hydrolyse terwijl de di- en oligosacchariden gehalten werden bepaald met behulp van HPLC gebruikmakend van een ionwisselaar met gepulste amperometrische detectie. De binnenrun-variantie bedroeg voor icodextrines en de sacchariden moleculen van maltose tot en met maltoheptose respectievelijk 2% en 2 tot 5%. De tussenrun-variantie was respectievelijk 5% en 4 tot 7% voor icodextrines en de sacchariden met oplopende aantal glucose eenheden. De detectiegrenzen bedraagt voor deze moleculen ongeveer 0,2 µmol/l. Deze analyses werden toegepast bij kinderen, die werden behandeld met CCPD. Uit de voorlopige experimenten bleek dat de concentraties van icodextrines en de metabolieten licht toenamen, waarna een stabiel nivo werd verkregen bij opeenvolgende behandelingen, hetgeen betekent dat icodextrines veilig kunnen worden gebruikt bij jonge patiënten, die behandeld worden met CCPD.