

acute porfyrie. De test gaf een enkele vals positieve uitslag als gevolg van excretie van rode bietensap in urine, maar de lichtverhoogde valse PBG-uitslag was geen indicatie voor acute porfyrie. De test is echter goed hanteerbaar voor het waarnemen van sterk verhoogde concentraties PBG zoals die gezien worden bij patiënten met acute porfyrie.

De praktische handelingen in deze test worden door de analisten van ons laboratorium tevens als eenvoudig ervaren. Aangezien de resultaten behaald met de snelst goed overeenkomen met de resultaten behaald met onze referentiemethode, gecombineerd met de positieve ervaringen van de analisten, kunnen we

concluderen dat de snelst een welkome aanvulling is voor de snelle diagnostiek van acute porfyrieën in elk klinisch chemisch laboratorium.

Literatuur

1. Deacon AC, Peters TJ. Identification of acute porphyria: evaluation of a commercial screening test for urinary porphobilinogen. *Ann Clin Biochem* 1998; 35: 726-732.
2. Watson CJ, Schwartz S. A simple test for urinary porphobilinogen. *Proc Soc Exp Biol* 1941; 47: 393-397.
3. Doss M, Schmidt A. Quantitative Bestimmung von delta-Aminolävulinesäure und Porfobilinogen im Urin mit Ioneaustauschchromatographie-Fertigssäulen. *Z Klin Chem u klin Biochem* 1971; 9: 99-102.

Ned Tijdschr Klin Chem 2001; 26: 192-193

Controle kwaliteit CoaguChek

M.J. BEINEMA¹, H.J. M.SALDEN², F.M.J. ZUIJDERHOUDT²

Binnen het Deventer Ziekenhuis is begin 2000 het CoaguChek-project gestart voor thuismonitoring van orale antistollingstherapie. Hierin werden 46 patiënten met een langdurige indicatie voor antistolling geïncludeerd. De patiënten werden opgeleid om zelf wekelijks de INR te bepalen. De trombosedienst doseerde voor een periode van telkens dertien weken, waarbij de patiënt tussentijds contact moest opnemen zodra de uitslag buiten de streefgrenzen zou vallen. Het doel van dit onderzoek was om te kijken of thuismonitoring een optie is voor een perifere ziekenhuistrombosedienst. Een van de subdoelen van dit onderzoek was om de betrouwbaarheid van de CoaguChek-meters (Roche) in de thuissituatie vast te stellen. Daarbij is het van belang om te weten wat de meest betrouwbare kwaliteitscontrole is wanneer een patiënt ter controle op het driemaandelijks spreekuur verschijnt. Een afwijking van 0,5 INR wordt als acceptabel beschouwd in de literatuur (1).

METHODEN en TECHNIEKEN

Tijdens de opleidingssessies en steeds na drie maanden werd de INR bepaald. Dit gebeurde op de CoaguChek van de patiënt, op een CoaguChek van de trombosedienst en aan de hand van een venapunctie (Beckton & Dickinson; pt-fib.recombinant; ACL Fu-

tura, IL). De INR van de CoaguChek van de patiënt en van de trombosedienst werden uitgezet tegen de veneuze INR en tegen elkaar. Wij gebruikten de teststrips batches 171 en 196. Per batch werd de onderlinge afwijking bepaald, zowel capillair als veneus. De venapunctie werd verricht door een medewerker van het klinisch-chemisch laboratorium, de patiënten bepaalden zelf de INR op de CoaguCheks. De resultaten voor de verschillende batches werden ingedeeld in klassen (interval 0,5 INR) en per klasse gemiddeld en uitgezet tegen de veneuze waarden. Bij 30 patiënten is er een INR bepaald met het controleplasma van Roche en vergeleken met de overige uitslagen.

RESULTATEN

Het blijkt dat er een verschil is in de INR-waarden tussen batch 171 en 196 (figuur 1). Batch 171 vertoont afwijkingen boven een INR van 4,0 terwijl batch 196 afwijkt met name onder een INR van 2,5. Bij een verschil van 0,5 INR als grens voor een acceptabel verschil tussen de veneuze INR en de CoaguChek-INR zijn de INR-gebieden waarbinnen dit optreedt per batch verschillend.

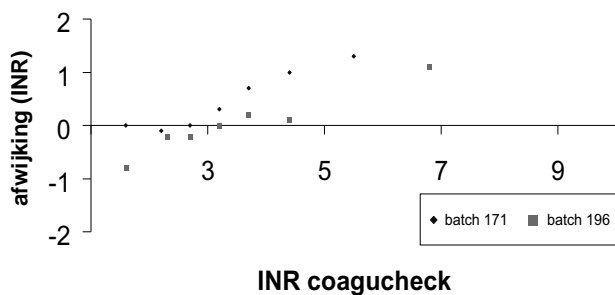
Het verschil in INR-waarden tussen de CoaguChek meters is kleiner. De correlatie tussen de verschillende CoaguCheks is redelijk ($r=0,91$). Desondanks kan er, ook binnen het streefgebied een INR-verschil optreden dat 1 INR is of groter.

De uitslagen van de INR met het controleplasma van Roche geven alleen aan dat het apparaat het nog redelijk doet, maar zeggen niets over de kwaliteit van de INR. De fabrikant geeft aan dat een INR binnen de range 2,8 tot 5,3 aantoont dat de het apparaat nog betrouwbaar is. Wij hebben bij 30 patiënten de INR gemeten met het controleplasma. Bij 3 patiënten (10%) gaf de meter een uitslag aan $> 5,3$ INR, terwijl

Klinisch Chemisch Laboratorium² en Trombosedienst¹, Deventer Ziekenhuis

Correspondentie: M.J. Beinema, Deventer Ziekenhuis, Postbus 5001, 7400 GC Deventer
e-mail: BeinemaM@dz.nl

Poster gepresenteerd op het 54^{ste} NVKC-Congres in Lunteren, op 11.04.01



Figuur 1. De afwijking van de INR gemeten op de CoaguChek ten opzichte van de INR na venapunctie, berekend voor intervallen van 0,5 INR.

de capillaire uitslagen op dezelfde meters goed correponderden met de veneuze INR. Het controleplasma is alleen geschikt voor patiënten die thuis twijfels hebben over een uitslag. Zij kunnen dan kijken of het apparaat het nog doet; in 10% van de gevallen is geeft deze test een fout negatieve uitslag. Daarbij moet opgemerkt worden dat de kosten van deze test hoog zijn.

CONCLUSIES

De behandeling met orale anticoagulantia, waarbij de patiënten zelf de INR op een CoaguChek meten, moet periodiek gecontroleerd worden. Een methode zou kunnen zijn om de INR te meten op de meter van de patiënt en een van de trombosedienst. Ook binnen het therapeutisch gebied treedt er echter tussen twee meters soms een afwijking op die groter is dan 1,0 INR. Wanneer je uitgaat van een acceptabel verschil van 0,5 INR, dan kun je in deze gevallen niet conclu-

deren dat de meter van de patiënt een betrouwbare uitslag geeft. Controle van de kwaliteit van de CoaguChek meter moet geschieden ten opzichte van een venapunctie en niet ten opzichte van een andere CoaguChek.

Het therapeutische gebied van de behandeling met orale anticoagulantia ligt tussen de INR 2,0 en 4,5 en verschilt per indicatie. Dit project heeft aangetoond dat de CoaguChek een acceptabele afwijking vertoont in het interval van INR 2,5 tot 4,0 ten opzichte van de venapunctie. Buiten dit interval kan de uitslag een afwijking hebben die groter is dan 0,5 INR. De mate van afwijking hangt af van de gebruikte batch van de teststrips. Buiten de genoemde grenzen mag gesteld worden dat de uitslag te hoog of te laag is, echter niet hoeveel de INR exact is. Verschillende batches van de CoaguChek geven een verschillende afwijking ten opzichte van de venapunctie. Binnen het therapeutisch gebied van INR 2,5 tot 4,0 zijn de uitslagen van de gezamenlijke batches nog redelijk betrouwbaar, daarbuiten nemen de afwijkingen strek toe. Voor het doseren heeft dit tot gevolg dat bij een afwijkende uitslag (buiten de streefgrenzen) wel gesteld kan worden dat de uitslag uitwijkt, maar niet in welke mate.

Het controleplasma van Roche is alleen geschikt om thuis te kijken of het apparaat nog redelijk functioneert. Indien er twijfels zijn over een thuis bepaalde INR, dan is het beter om de kwaliteit te laten controleren volgens bovenstaande aanwijzingen. De kosten van het controleplasma zijn hoog.

Het controleren van de meter met het controleplasma van Roche is duur en geeft in 10% van de gevallen een vals negatieve uitslag.

Ned Tijdschr Klin Chem 2001; 26: 193-194

Determination of the $\alpha 1$ -antitrypsin genotype by sequencing selected regions of the gene

J.P.M. WIELDERS¹, B.B. van der MEIJDEN¹, R. van WIJK² and R.J. KRAAIJENHAGEN¹

Deficiency of the protease inhibitor $\alpha 1$ -antitrypsin ($\alpha 1$ AT) leads to lung emphysema in adults or liver pathology at infancy. In 1996 the WHO has advised

Department of Clinical Chemistry, Eemland Hospital, Amersfoort¹ and Dept. of Clinical Chemistry, University Medical Centre², Utrecht

Correspondence to: Dr J.P.M. Wielders, Eemland Hospital, Dept. of Clinical Chemistry, PO Box 4150, 3800 ED Amersfoort.

Poster presented at the 54th NVKC Congress in Lunteren on 11.04.01

the set-up of screening methods and registration of patients with aberrant variants associated with strongly decreased concentrations. Up till now phenotyping by isoelectric focussing (IEF) is the method of choice for determination of the $\alpha 1$ AT-protein expression. However the information obtained by IEF may be incomplete in relation to the underlying genotype. From the literature it is known that > 99% of $\alpha 1$ AT mutations in Caucasians are located in specific regions of exons 2, 3 and 5 of the gene. The sites of two frequent and two rare mutations are shown in the figure below. We present a method for genotyping $\alpha 1$ AT-gene variants based on DNA-sequence analysis of these specific regions.

Table 1. Comparison of genotype and phenotype results

Patient	Antigen (g/l)	Phenotype	Genotype
Vu 51	1.2	M	M1ala / M1ala
Br 49	0.7	M	M1val / Mheerlen
Bu 60	0.64	M	M1ala / Mheerlen
De 70	0.8	M	M1ala / Q0bellingham
Ba 45	0.76	S	Mheerlen / S
Bu 91	0.34	Z	Mheerlen / Z
Ou 60	0.32	Z	Z / Z
Ou 64	0.41	Z	Z / Z
Wi 97	1.1	MZ	M2 / Z
Sp 42	0.81	MZ	M2 / Z
Vr 59	1.0	MZ	M1val / Z
Be 49	0.7	MZ	M1val / Z
Ru 59	1.2	MS	M1ala / S
Ke 68	1.1	MS	M1val / S

METHODS

We selected patients with antigen concentrations less than 1,3 g/l, measured by kinetic nephelometry. DNA was isolated from EDTA blood using the Puregene DNA-isolation kit. Primers were designed to amplify the specific regions at exon 2, 3 and 5. Primers were obtained from Applied Biosystems UK.

The PCR reactions were carried out with 50-100 ng DNA in 100 µl volumes containing a.o. 0.2 mmol/l of each dNTP, 0.3 µmol/l of each primer and 2.5 U of Amplitaq Gold DNA Polymerase. The samples were subjected to 35 cycles of amplification (30 s 94° / 30 s 56° / 30 s 72°C). After PCR the products were run on an ethidium-bromide stained agarose gel to check the quality and integrity of the amplified fragments.

The PCR-products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) and sequenced in forward and reverse direction using the ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit.

Samples were analysed on an ABI 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Foster City CA, USA).

RESULTS

A comparison of part of the results obtained by the classical IEF-phenotyping method and our genotyping method is presented in table 1. Phenotype results based on IEF were obtained from the immunochemistry laboratory of the CLB Amsterdam (head: mrs. H.G.M. Geertzen, MD).

DISCUSSION

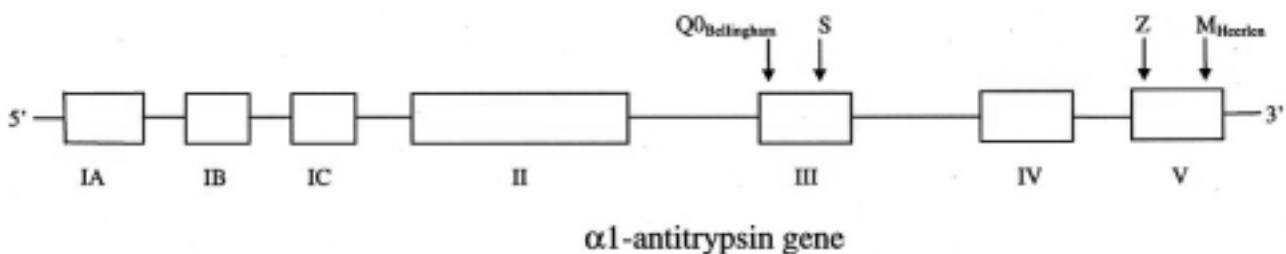
These results demonstrate the benefits of genotyping in comparison with IEF-phenotyping. Especially, the presence of null alleles is easily recognised. Furthermore, we found that the measured antigen concentrations correspond better with the genotype information than with the IEF-phenotype results. Examples are given by the unexpected low antigen concentrations measured for several M phenotypes, which were explained by the presence of Mheerlen or Q0bellingham alleles found by genotyping, see figure 1.

CONCLUSION

Amplification and subsequent DNA-sequence analysis of selected regions provides a rapid and reliable method for genotyping α1AT. The results obtained in our study are compatible with the usual IEF method for phenotyping. Moreover, genotyping α1AT provides more relevant information compared to IEF and thus allows a better detection of clinical significant α1AT variants.

Literature

1. Wilson Cox D. α1-Antitrypsin deficiency. In: Scriver Ch.R. et al. The metabolic and molecular basis of inherited disease. 1995; McGraw-Hill New York: 4125-58.



Figuur 1. α1-Antitrypsin gene