

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 α 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 α 1-antitrypsin (α 1AT) 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 α 1AT-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 α 1AT 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 α 1AT-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

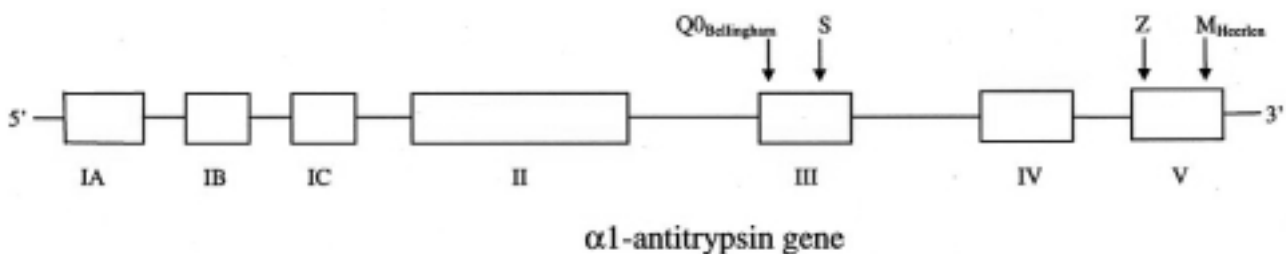
These results demonstrate the benefits of genotyping in comparison with IEF-phenotyping. Especially, the presence of null alleles is easily recognised. Furthermore, we found that the measured antigen concentrations correspond better with the genotype information than with the IEF-phenotype results. Examples 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