

Posterpresentaties

Aantonen van acute porfyrie: evaluatie van een porfobilinogeensneltest in urine

J.S. KAMPHUIS, J. DORRESTEIN-de BOK en F.M.J. ZUIJDERHOUDT

Voor de diagnostiek van porfyrieën kan gebruik worden gemaakt van analyse van porfyrienes in urine, faeces en/of bloed. Voor de groep van acute porfyrieën wordt eerst de bepaling van delta-ALA en PBG in urine uitgevoerd, metabolieten die bij dit ziektebeeld in de acute fase sterk verhoogde concentraties laten zien. In dit onderzoek is een semi-kwantitatieve sneltest geëvalueerd voor de bepaling van PBG in urine t.o.v. een referentiemethode (Bio-Rad). Gebleken is dat de PBG-sneltest goed correleert met de referentiemethode, daarbij aangetekend dat bij lage concentraties PBG (gemeten met referentiemethode), de sneltest iets hogere concentraties geeft, i.t.t. bij hogere concentraties PBG, waarbij de sneltest iets lager scoort. Zelfstandig uitvoeren van de test door een aantal dienstdoende analisten liet een handzame en gebruikersvriendelijke test zien, waardoor deze sneltest voor PBG een goede en handzame screentest is voor de snelle diagnostiek van acute porfyrie.

Acute porfyrieën zijn een groep van erfelijke zeldzame aandoeningen waarbij de synthese van haem gestoord is. Ze kunnen zich presenteren met symptomen als o.a. abdominale pijn en allerlei neuropsychiatrische aandoeningen. Voor het schatten van de concentratie van porfobilinogeen (PBG) worden vaak lastige en onnauwkeurige kwalitatieve methoden gehanteerd of tijdrovende kwantitatieve methoden. Voor de acute diagnostiek is er momenteel een sneltest op de markt die de concentratie PBG meet, een metaboliet dat sterk verhoogd aanwezig is in urine van patiënten met acute porfyrie. Uit onderzoek van een andere onderzoeksgroep is gebleken dat de PBG-sneltest een welkome aanvulling is binnen de snelle diagnostiek van acute porfyrieën (1). Het doel van ons onderzoek is het beoordelen of deze test in onze handen een handzame en valide screeningstest is voor de snelle diagnostiek van acute porfyrieën.

Klinisch Chemisch Laboratorium, Deventer Ziekenhuis, Deventer

Correspondentie: J.S. Kamphuis, Klinisch chemisch laboratorium, Deventer Ziekenhuis, Postbus 5001, 7400 GC Deventer e-mail: KamphuisS@dz.nl
Poster gepresenteerd op het 54^{ste} NVKC-Congres in Lunteren, op 11.04.01

MATERIAAL en METHODEN

Monsters

Verse urinemonsters zijn gebruikt van patiënten met bevestigde diagnose acute porfyrie. Urine is verzameld zonder toevoeging van additieven, en bewaard in het donker.

De monsters gebruikt in dit artikel, zijn ingevroren bewaard en vlak voor analyse ontdooid.

PBG-sneltest

De PBG-screeningstest is gebaseerd op de kleurreactie van Watson-Schwartz (2), waarbij PBG uit urine geabsorbeerd wordt aan hars dat zich in een spuit bevindt. Na een wasstap met water wordt het PBG geëluëerd van de hars en wordt PBG gecondenseerd met p-dimethylaminobenzaldehyde in zure oplossing (Ehrlichs reagens) tot een rose/violet gekleurd product. Middels een kleurkaart wordt de PBG-concentratie semikwantitatief afgelezen.

Afreesresultaten: ND: PBG < 25 µmol/l; +: PBG 25-50 µmol/l; ++: PBG 50-100 µmol/l; +++: PBG > 100 µmol/l. Leverancier test: CLINDIA Benelux B.V., postbus 274, 3839 AG Leusden, tel. nr. 033-4325610.

PBG met de Bio-Rad methode ('Referentiemethode')

Uit urine wordt PBG via anionhars geïsoleerd, gezuiverd en geëluëerd. Na elutie reageert PBG (als pyrol) met Ehrlichs reagens tot een rood kleurcomplex dat vervolgens wordt gemeten bij 553 nm. Met behulp van een standaardcurve worden omrekeningsfactoren bepaald, waarna PBG-concentraties in urine vastgesteld kunnen worden. Overigens is de analyse van delta-ALA ook mogelijk bij deze test (3). Referentiewaarden PBG: <10 µmol/l.

RESULTATEN

Correlatie kleurbeoordeling uitgezet tegen concentratie referentiemethode

Van een verse urine van een acute porfyriepatiënt is een verdunningscurve gemaakt. De verschillende concentraties (0, 25, 50, 100 en 200 µmol/l) zijn gebruikt voor analyse van PBG met zowel de sneltest als de referentiemethode. Uit dit onderzoek blijkt dat bij lage concentraties PBG (25-50 µmol/l), gemeten met de referentiemethode, de concentratie gemeten met de sneltest iets hoger scoort, terwijl bij hoge concentraties (>100 µmol/l) de concentratie gemeten met de sneltest iets achterblijft.

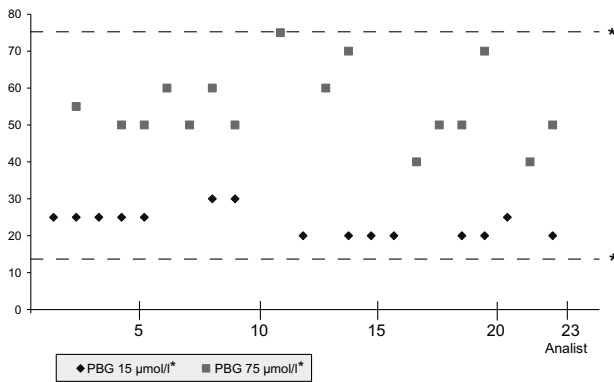
DISCUSSIE

Veelal presenteren patiënten met acute porfyrie zich met o.a. abdominale pijn en allerlei neuropsychiatrische aandoeningen. Aangezien abdominale pijn een specifiek symptoom is, in combinatie met het zelden voorkomen van acute porfyrie, is het een klinisch probleem om de weinige patiënten met acute porfyrie te onderscheiden van de patiënten met andere oorzaken van die klachten.

Voor de diagnose van acute porfyrie wordt als eerste bepaling delta-ALA en PBG of alleen PBG in urine bepaald. Dit gebeurt met een tijdrovende kwantitatieve bepaling die uitgevoerd wordt door hiervoor gespecialiseerde analisten. Aangezien deze aanvragen niet altijd tijdens 'kantooruren' worden gedaan is het wenselijk om een test in huis te hebben voor de snelle diagnostiek van acute porfyrieën die uitgevoerd kan worden door dienstdoende analisten op elk moment van de dag. De PBG-sneltest is een dergelijke test die door ons is geëvalueerd. Uit ons onderzoek is onder andere gebleken dat de test bij met name lage concentraties PBG een hogere uitslag geeft met de sneltest t.o.v. de referentiemethode. Dit heeft waarschijnlijk te maken met het feit dat er geen surrogaatkleurcode is voor een PBG-concentratie van 0 of 10 $\mu\text{mol/l}$. Visuele beoordeling t.o.v. de kleurkaart komt meestal hoger uit.

Het feit dat de beoordeling bij een dergelijke lage PBG-concentratie (15 $\mu\text{mol/l}$) iets hoger uitvalt heeft geen invloed op de diagnostiek van acute porfyrie, daar een acute buik gepaard gaat met aanzienlijk hogere concentraties aan PBG in urine, n.l. > 50 $\mu\text{mol/l}$. In tegenstelling tot deze bevinding blijkt dat bij hogere PBG-concentraties (75 $\mu\text{mol/l}$) een lagere uitslag wordt gescoord door de analisten. Een aanwijsbare reden hiervoor ligt niet direct voor handen. Een mogelijkheid zou kunnen zijn een niet geheel juiste kleurkaart. Bij de hoge PBG-concentraties blijkt eveneens enige interpersoonlijke variatie te bestaan voor de beoordeling van PBG middels de sneltest als gevolg van andere visuele waarneming.

Evaluatie van deze sneltest door een andere onderzoeksgroep resulteerde in de constatering dat de test een zeer waardevolle kwalitatieve screening is op verhoogde concentraties PBG in urine van patiënten met



Figuur 1 Individueel uitvoeren PBG-sneltest door analisten. Een aantal analisten ($n=23$) heeft bij een of twee monsters de PBG-concentratie bepaald met de sneltest. In deze figuur zijn de resultaten weergegeven van de analyses van maximaal twee monsters (15 en 75 $\mu\text{mol/l}$) uitgezet per analist.
* gemeten met referentiemethode

Beoordeling kleurintensiteit reeds uitgevoerde PBG-sneltest

Vijf dienstdoende analisten hebben een oordeel gegeven over de kleurintensiteit van de PBG-concentratie zoals gemeten met de sneltest van 6 verschillende urinemonsters. Uit tabel 1 blijkt dat voor de monsters met gemiddeld 15 $\mu\text{mol/l}$ (nrs 1-3) alle analisten < 25 $\mu\text{mol/l}$ scoorden, terwijl voor de monsters met gemiddeld 30 $\mu\text{mol/l}$ (nrs 4-6) een grotere variatie bestond, variërend van < 25 $\mu\text{mol/l}$ tot 25-50 $\mu\text{mol/l}$.

Zelfstandig uitvoeren PBG-sneltest

Een tweetal urinemonsters zijn door een aantal dienstdoende analisten ($n=23$) zelfstandig geanalyseerd voor de concentratie PBG m.b.v. de sneltest. Gekozen is voor een lage concentratie PBG (15 $\mu\text{mol/l}$) en een hogere concentratie PBG (75 $\mu\text{mol/l}$). De analisten hebben kwantitatief een schatting gemaakt van de concentratie aan PBG door de kleur van het eluaat te vergelijken met die op de kleurkaart. Deze PBG-concentraties zijn weergegeven in figuur 1, waaruit af te lezen valt dat de PBG-concentratie bepaald met de sneltest hoger uitkomt dan de PBG-concentratie bepaald met de referentiemethode. Dit i.t.t. de hoge concentratie PBG, waarbij de sneltest lager scoort dan de referentiemethode.

Tabel 1. Beoordeling kleurintensiteit PBG-analyse middels sneltest van 6 urinemonsters door 5 analisten (A-E)

Monster	PBG* ($\mu\text{mol/l}$)	Scores verkregen met de sneltest ($\mu\text{mol/l}$)				
		A	B	C	D	E
1	14	<25	<25	<25	<25	<25
2	15	<25	<25	<25	<25	<25
3	15	<25	<25	<25	<25	<25
4	28	25	25	25	25	25
5	30	25/50	25/50	25/50	50	25/50
6	30	<25	25	25	25/50	25/50

* gemeten met referentiemethode

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.

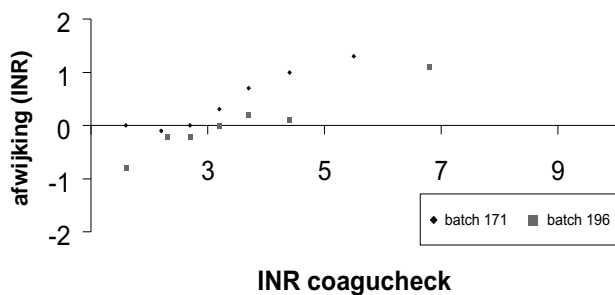
Het verschil in INR-waarden tussen de CoaguChek meters is kleiner. De correlatie tussen de verschillende CoaguCheks is redelijk ($r=0,91$). Desondanks kan er, ook binnen het streefgebied een INR-verschil optreden dat 1 INR is of groter.

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 μ l volumes containing a.o. 0.2 mmol/l of each dNTP, 0.3 μ mol/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

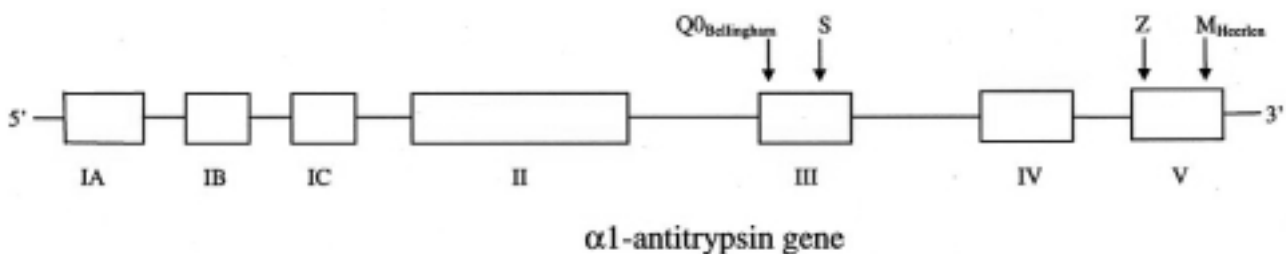
These results demonstrate the benefits of genotyping in comparison with IEF-phenotyping. Especially, the presence of null alleles is easily recognised. Furthermore, we found that the measured antigen concentrations correspond better with the genotype information than with the IEF-phenotype results. Examples 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 α 1AT. The results obtained in our study are compatible with the usual IEF method for phenotyping. Moreover, genotyping α 1AT provides more relevant information compared to IEF and thus allows a better detection of clinical significant α 1AT variants.

Literature

1. Wilson Cox D. α 1-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. α 1-Antitrypsin gene