

B-DNA vWF resekvensering med Big Dye DirectGäller för
Klinisk kemi

MA

B-DNA vWF sekvens, Big Dye Direct

Bakgrund, indikation och tolkning

von Willebrands sjukdom (VWD) orsakas av kvantitativ eller kvalitativ brist på von Willebrandfaktorn (VWF) och utgör en av de vanligaste orsakerna till ärftlig blödningsjukdom. Genom sin förmåga att binda trombocyter, subendotel och ligander i plasma är VWF involverad i hemostasen via flera mekanismer. Mutationer i VWF-genen kan påverka de olika funktionerna vilket resulterar i att VWD är en heterogen sjukdom.

Klassificering av VWD görs efter noggrann fenotypering på ett koagulationslaboratorium och delas in i tre huvudtyper. Typ 1 karakteriseras av partiell kvantitativ brist på VWF. Typ 2 är en kvalitativ defekt och indelas i subtyperna 2A, 2B, 2M och 2N. Typ 3 innebär total avsaknad av VWF. VWD typ 1 är vanligast med ungefär 70 % av alla fallen och de har ofta milda till moderata symptom. Patienter med typ 2 ses hos ca 20-30 % av fallen och har varierande blödningsproblem. Typ 3 är sällsynt och förenat med svåra symptom.

Genetiska undersökningar har visat att VWD typ 1 och typ 3 har mutationer spridda över hela genen. Däremot beror de olika varianterna av typ 2 på mutationer som är spridda över begränsade regioner av VWF-genen, vilket gör att genotypering med sekvensanalys är praktiskt och ekonomiskt genomförbart som rutindiagnostik.

Analysen används för att påvisa kända mutationer i VWF-genen eller vid utredning av VWD typ 2A, 2B, 2M och 2N.

Analysstrategin bygger på att patienten utretts på ett koagulationslaboratorium vilket resulterat i en misstänkt typ av VWD som sedan konfirmeras med genetisk analys. Gäller det utredning av tidigare känd mutation inom samma familj görs enbart en riktad mutationsanalys av den specifika mutationen. DNA extraheras från vita blodkroppar och utvalda exoner i VWF-genen analyseras med DNA-sekvensering.

Vid utredning av olika varianter av VWD typ 2 analyseras följande exoner av VWF-genen:

VWD typ 2A: exon 11, 12, 14, 15, 16, 28 och 52

VWD typ 2B: exon 28

VWD typ 2M: exon 27 och 28

VWD typ 2N: 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26 och 27

Typerna 2A, 2B och 2M är dominant nedärvda och beror i de flesta fallen på mutation i exon 28 (84-100 % beroende på subtyp). Därför sekvenseras exon 28 i ett första steg.

Om känd mutation identifieras så avslutas undersökningen (dominans). Om mutation inte hittas i exon 28 så sekvenseras resten av exonerna där man tidigare funnit mutationer för den aktuella subtypen.

VWD typ 2N är recessivt nedärvd och har ett annorlunda rapporterat mutationsspektra. Vid misstanke om typ 2N sekvenseras alltid exonerna 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26 och 27.

B-DNA vWF resekvensering med Big Dye DirectGäller för
Klinisk kemi

MA

Logiken är att identifiera samtliga kända mutationer för VWD typ 2 som omnämns i mutationsdatabasen

Analysprincip

Sekvensmetoden syftar till att sekvens bestämma samtliga exon och exon/intron gränser. Först görs den primära PCR-reaktionen, då delar av den specifika genen amplifieras med PCR-teknik ifrån isolerat genomiskt DNA med genspecifika, tailade (M13) primers. Därefter görs ytterligare en PCR med universella primers och efterföljande rening även av den sekundära PCR-produkten. Härfter görs analys med kapillärelektrofores. Sekvensdata produceras genom att "basecalling" utförs på rådata. Data jämförs sedan sinsemellan och mot en känd referenssekvens genom analys med SeqScape.

Referensintervall

Ej tillämbart på kvalitativ analys.

Metodkaraktistika**Interferenser och felkällor**

Om DNA provet innehåller kontamination som t.ex. inhibitorer så ser vi det som frånvaro av signal och ett omprov får göras. Principiellt kan andra homologa DNA-sekvenser hybridisera med primers och ge felaktig information. Detta har eliminerats i den initiala optimeringen av metoden och sedermera validerats. Alignment av provsekvens och referenssekvens visar detta i så fall. Eftersom sekvensdatabasen innehåller många sekvenser och vi normalt genererar mycket DNA-sekvens från varje individ erhålls en mycket god bild av polymorfimönstret för varje individ. Detta kan användas för att konfirmera korrektheten hos DNA-sekvensen.

Mätområde

Von Willebrand factor, NCBI RefSeq gene NG_009072.1

Detektionsgräns

DNA-koncentrationen normeras till 4 ng.

Mätosäkerhet

Ej tillämbart på kvalitativ analys.

Spårbarhet

Samtliga primers är spårbara till dessa sekvenser.

VWF	NG_009072.1
	NM_000552.3
	NP_000543.2

B-DNA vWF resekvensering med Big Dye Direct

Gäller för
Klinisk kemi

MA

Samtliga primers blastades med NCBI PRIMER BLAST, se valideringsrapport (pappersform och elektroniskt).

Imprecision

Se separat metodvalidering. Ackrediterings-CV är ej tillämbart på kvalitativ analys.

Riktighet

Metodens riktighet bedöms efter jämförelse med publicerade sekvenser och vanligt förekommande polymorfier och genom jämförelse med tidigare utförd sekvensering.

Ackreditering

Metoden är ej ackrediterad.

Referenser

1. Baronciani L och Mannuccii PM. The molecular basis of von Willebrand disease. I "Molecular Hematology" 2nd ed. (Provan D och Gribben J, red.). 2005 Blackwell Publishing Ltd, sid. 199-209.
2. OMIM-kod: <http://omim.org/entry/193400>
3. von Willebrand faktor mutationsdatabas: <http://www.vwf.group.shef.ac.uk/>