

DNA-F II c.20210 G-A, Taqman alleldiskriminering, LundGäller för
Klinisk kemi

LU

**B-DNA F II c.20210 G>A,
Taqman alleldiskriminering, 7900 HT, Lund****Bakgrund, indikation och tolkning**

Venösa trombosor uppstår ofta som ett resultat av en pågående obalans mellan pro- och anti-koagulerande krafter. Oftast finner man genetiska eller förvärvade defekter i naturliga anti-koagulatoriska mekanismer. Venös trombosjukdom drabbar ca 160 personer per 100 000 invånare per år, och ungefär hälften uppger genomgången trombos hos någon släkting.

Sedan tidigare kända ärftliga defekter med ökad trombosrisk är resistens mot aktiverat protein C (APC resistens) och brister av protein C, protein S och antitrombin. Av dessa defekter står APC resistens för cirka 30 % av trombosfallen medan de övriga tillsammans förklarar cirka 5-10 % av fallen. I vissa hårt drabbade familjer finner man flera samverkande genetiska defekter, t.ex. APC resistens tillsammans med brist på protein C, protein S eller antitrombin. Individer med två anlag, d.v.s.homozygoti för en defekt eller kombination av två olika defekter, får ofta svårare trombosepisoder med debut i ung ålder. Vid trombosutredningar måste närvaro av dubbla anlag alltid beaktas, speciellt om patienten uppvisar en svår klinisk bild tillsammans med ärftlighet för trombos.

Ytterligare en genetisk riskfaktor för trombosjukdom finns i protrombingenen, c.20210 G>A.

Protein	Gen	Nomenklatur	Refseq	Rs nummer
Faktor II, Protrombin	F2	c.20210G>A Ej HVGS!	Oklart vilken refseq denna numrering är baserad på	
		c.*97G>A	NM_000506.3	1799963
		g.25313G>A	NG_008953.1	
			NP_000497.1	

I normalbefolkningen förekommer c.20210G>A mutationen med en frekvens av 1-2 % medan frekvensen i ett oselekerat trombosmaterial är cirka 6-7 %. Bland selekterade trombospatienter med dokumenterad ärftlighet i tidigare okänd gen, var andelen bärare av 20210 G>A mutationen 18 %. Kliniska studier har visat att bärare av mutationen i heterozygot form har cirka 3-4 gångers ökad trombosrisk, vilket är i samma storleksordning som observerats för övriga kända genetiska riskfaktorer. Förändringen är belägen i 3'icke translaterad region.

DNA-F II c.20210 G-A, Taqman alleldiskriminering, LundGäller för
Klinisk kemi

LU

Analysprincip

Metoden bygger på en PCR-reaktion där en specifik del av det genomiska DNA:t amplifieras. Dessutom ingår en hybridisering med en TaqMan®-probe som är komplementär till det sekvensavschnitt där den aktuella punktmutationen finns. Två olika prober finns – en för WT-allelen och en för den muterade allelen. Proberna binder mellan inbindningsställena för forward- och revers-primer - på DNA-templet och är märkta med olika fluorescerande "reporter"- färg för respektive allel (ex. VIC™ eller FAM™) och en quencher som släcker fluorescensen hos en intakt probe. Under PCR-reaktionen i extensionssteget, degraderar Taq DNA- polymeraset proben, vilket gör att reporterfärgen frigörs och en ökad fluorescens kan mätas.

Referensintervall

Ej tillämpbar på kvalitativ analys.

Metodkaraktistika**Interferenser och felkällor**

Om DNA provet innehåller kontamination som t.ex. inhibitorer ger detta förändrad 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. I valideringen har potentiella primerinterferenser värderats med hjälp av bioinformatik. Ospecifik priming ger upphov till låg eller felaktig genotypclustring i mjukvaran.

Mätområde

Metoden påvisar homozygoti för wild type (wt) genotyp, heterozygoti, samt homozygoti för variant genotyp. Amplikonet begränsas av primers F och R samt detekteras med reporter 1 respektive 2 enligt nedan under rubrik Reagens.

Detektionsgräns

10 ng patient-DNA används i reaktionen. Nedre detektionsgräns har ej fastställts.

Mätosäkerhet

Ej tillämpbar på kvalitativ analys.

Spårbarhet

Samtliga primers och prober är spårbara till dessa sekvenser

Gen	NCBI RefSeq
F2	NM_000506.3
	NG_008953.1
	NP_000497.1

Imprecision

Se separat metodvalidering.

Ackrediterings-CV är ej tillämpbar på kvalitativ analys.

DNA-F II c.20210 G-A, Taqman alleldiskriminering, Lund

Gäller för
Klinisk kemi

LU

Riktighet

Metodens riktighet är säkerställd mot referenssekvens, genom jämförelse mot annan validerad metod samt genom deltagande i Equalis externa kontrollprogram.

Se separat metodvalidering. 132 prover analyserades parallellt med tidigare använd RFLP-metod under perioden juli – aug 2003 med samstämmiga resultat. Se pärm Validering av analyser på 7900 HT och mapp G:\Kemi-Malmö-DNA\Validering-Verifiering.

Ackreditering

Metoden är ackrediterad. Införd i rutin 2003-11-04.

Referenser

1. Poort, S. W., Rosendaal, F. R., Reitsma, P. H. and Bertina, R. M. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-3703.
2. Hillarp, A., Zöller, B., Svensson, P. J. and Dahlbäck, B. The 20210 A allele of the prothrombin gene is a common risk factor among Swedish outpatients with verified deep venous thrombosis. *Thromb. Haemos t.* 1997; 78: 990-992.
3. Genebank accession number M17262, FII 20210 G = base 26 784.