

DNA-F V c.1691G-A, Taqman alleldiskriminering, Lund

Gäller för
Klinisk kemi

LU

B-DNA F V, c.1691G>A, Taqman alleldiskriminering, 7900 HT, Lund

Bakgrund, indikation och tolkning

Venös tromboembolism drabbar ett stort antal människor varje år (incidens 1/1000). Venös trombos uppstår ofta i samband med förvärvade riskfaktorer som trauma, graviditet, kirurgi, malignitet och immobilisering. Under senare år har genetiska defekters betydelse blivit allt mer uppenbar och många mutationer har beskrivits i det antikoagulatoriska protein C-systemet. Kortfattat kan protein C-systemet beskrivas att trombin bundet till en receptor, trombomodulin, kan aktivera protein C som i sin tur inaktiverar de prokoagulatoriska faktorerna Va och VIIIa genom begränsad proteolys. Till sin hjälp har aktiverat protein C (APC) kofaktorerna protein S och intakt faktor V. Identifieringen av familjer med venös trombosjukdom som uppvisar resistens mot APC aktiviteten har snabbt resulterat i ett stort antal studier som entydigt visar att APC-resistens är den största enskilda faktorn av betydelse för uppkomst av venösa tromboser. APC-resistens förekommer hos 20 - 60% av patienter med venös trombos beroende på etnisk bakgrund och selektion av patienter. Från olika länder i Europa har en prevalens i befolkningen av 2 -15 % rapporterats. Däremot ser det ut som om ursprungsbefolkningen i Amerika, Afrika och Asien saknar förekomst av APC-resistens. APC-resistens kan bestämmas med en funktionell koagulationsmetod baserad på APT reaktionen (P-APC-resistens). Omkring 90 % av alla individer har APC-resistens beroende på en mutation i faktor V genens exon 10, position c.1691 G>A, vilket resulterar i en p.Arg506Gln substitution.

Protein	Gen	Nomenklatur	Refseq	Rs nummer
Faktor V	F5	c.1691G>A p.Arg506Gln Ej HGVS!	Oklart vilken refseq denna numrering är baserad på	
		c.1601G>A	NM_000130.4	rs6025
		g.41721G>A	NG_011806.1	
		p.Arg534Gln	NP_000121.2	

Faktor V är ett 2196 aminosyror långt protein som aktiveras av trombin till faktor Va. Aktiviteten av faktor Va regleras av APC som klyver faktor Va molekylen på tre specifika ställen. Aminosyrasubstitutionen leder till att ett av dessa klyvningsställen, arginin506, förändras och den aktiverade faktor Va molekylen kan då inte degraderas av APC på ett normalt sätt och detta medför en livslång hyperkoagulabilitet.

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-templatet 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.

Utarbetad av

Dokumentförvaltare
Athina Papadopoulou 161427

Dokument id
C-1618

DNA-F V c.1691G-A, Taqman alleldiskriminering, LundGäller för
Klinisk kemi

LU

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 genotypclustering 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	ID
F5	NM_000130.4	
	NG_011806.1	
	NP_000121.2	

Imprecision

Se separat metodvalidering.

Ackrediterings-CV är ej tillämpbar på kvalitativ analys.

DNA-F V c.1691G-A, Taqman alleldiskriminering, LundGäller 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. 75 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 2003-08-03.

Referenser

Dahlbäck, B., Carlsson, M. and Svensson, P. J. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 90, 1004-1008.

Bertina, R. M., Koelman, B. P. C., Koster, T., Rosendaal, F. R., Dirven, R. J., de Ronde, H., van der Velden, P. A. and Reitsma, P. H. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. 1994. *Nature.* 369, 64-67.

Zöller, B. and Dahlbäck, B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. 1994. *Lancet.* 343, 1536-1538.

Zöller, B., Svensson, P.J., He, X. and Dahlbäck, B. Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis prone families with inherited resistance to activated protein C. 1994. *J. Clin. Invest.* 94, 2521-2524.