

DNA-LCT -13910/MCM6 intron 13_ sekvens med Big Dye Direct

Gäller för
Klinisk kemi

LU

DNA-LCT -13910/MCM6 intron 13, sekvens med Big Dye Direct

Bakgrund, indikation och tolkning

Enzymet laktas finns i tunntarmens enterocyter och möjliggör digestionen av diasackariden laktos/mjölksocker till monosackariderna glukos och galaktos, som till skillnad från laktos kan tas upp i blodbanan och användas som energisubstrat.

Odigererat laktos fermenteras av bakterier i tarmen och leder framför allt till diarré, flatulens och buksmärtor. Orsaker till malabsorptionen eller maldigestionen av laktas kan vara följande:

Den primära adulta formen av laktosintolerans är mycket vanlig hos olika folkslag över hela världen. Produktionen av laktas avtar här successivt med patientens stigande ålder och debutåldern för laktosintolerans varierar mellan olika individer och populationer. I litteraturen beskrivs fenomenet som *lactase non-persistence* eller *adult-type hypolactasia*. Detta skall inte förväxlas med det ovanliga tillståndet primär kongenital laktasbrist (*congenital lactase deficiency*, CLD) där man har en i det närmaste medfödd brist på enzymaktivitet som ger sig till känna mycket tidigt i samband med de första laktosintagen. Sekundär laktosintolerans kan uppstå vid tarminfektion. En sekundär laktosintolerans kan vara reversibel om den bakomliggande orsaken elimineras (**tabell 1**).

Tabell 1: Olika typer av laktosintolerans

Olika typer av laktosintolerans		
	Förekomst	Symtom
Primär (Kongenital)	Extremt sällsynt	Allvarlig diarré som debuterar då barnet ammar bröstmjolk eller får laktos-innehållande ersättning
Primär adult	Cirka 80 % av jordens befolkning har denna form	Diarré, flatulens och buksmärtor. Debuterar efter amningsperioden.
Sekundär	Uppstår sekundärt vid exempelvis infektion, celiaki, inflammatorisk tarmsjukdom eller epitelskada p.g.a. andra orsaker. Den vanligaste formen hos barn före skolåldern.	Diarré, flatulens och buksmärtor. Även andra symtom kan förekomma såsom dålig viktuppgång. Symtomdebut kopplad till den primära orsaken.

Bibehållen produktion av laktas och förmåga att bryta ner mjölksocker, är ett autosomalt dominant ärftligt drag som överväger hos befolkningen i norra Europa. Denna förmåga att bryta ner laktos samvarierar till 100 % med en mutation av ett enstaka baspar (C>T). Mutationen betecknas LCT -13910 C>T eftersom den finns ca 14 kb uppströms i genomet från laktasgenens (LCT) startsekvens, i MCM6 (*minichromosome maintenance deficient 6*) genens 13:e intron (**bild 1**) [1]. Studier har visat att den aktuella gensekvensen ligger i ett reglerelement som styr laktasgenens uttryck. Denna mutation är en av de mest betydelsefulla för bibehållen laktasproduktion.

DNA-LCT -13910/MCM6 intron 13_ sekvens med Big Dye Direct

Gäller för
Klinisk kemi

LU

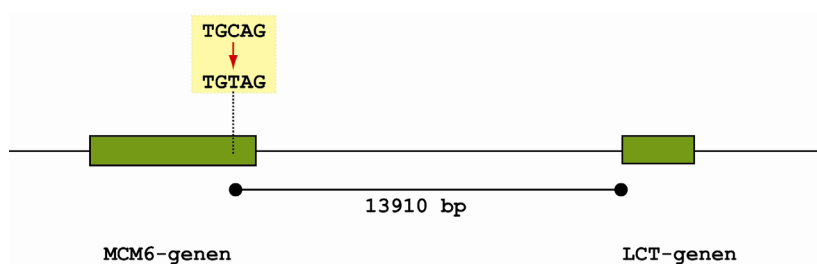


Bild 1. Schematisk bild över LCT-genen och positionen för LCT – 13910 C>T.

Genotyperna LCT -13910 C/T och T/T (d.v.s. närvaro av T-allel) räcker för att LCT-genen skall producera tillräckliga mängder laktas. Tolkning av analysresultaten görs enligt nedan (**Tabell 2**).

Det finns flera andra mutationer beskrivna i närheten av LCT – 13910 C>T*. Den mest kliniskt relevanta är LCT -13915 T>G** som leder till att individen kan bryta ner mjölksocker trots närvaro av den klassiska laktosintolerans-genotypen LCT -13910 C/C (**Tabell 2**) [2].

Tabell 2. Tolkning av mutationsanalyserna

Tolkning av mutationsanalyserna		
LCT – 13910 C>T*		<i>Kommentar</i>
C/C		Patienten kan inte bryta ner mjölksocker
C/T		Patienten kan oftast bryta ner mjölksocker
T/T		Patienten kan oftast bryta ner mjölksocker
Kombination av de olika mutationerna		
LCT – 13910 C>T*	LCT – 13915 T>G**	<i>Kommentar</i>
C/C	T/T	Patienten kan inte bryta ner mjölksocker
C/C	T/G	Patienten kan oftast bryta ner mjölksocker
C/C	G/G	Patienten kan oftast bryta ner mjölksocker

Tolkningen av genotypen måste alltid göras i relation till individens ålder. Anledningen är att barn med LCT -13910 C/C-genotyp ofta tål mjölk under de första åren. Vid vilken ålder nedregleringen av laktasaktiviteten börjar varierar mellan individer och olika etniska grupper (**Tabell 3**) [3].

DNA-LCT -13910/MCM6 intron 13_ sekvens med Big Dye Direct

Gäller för
Klinisk kemi

LU

Tabell 3: Ålder för debut av laktosintolerans. Genotyp hänvisar till position LCT -13910 C>T. Hypolaktasi innebär sänkt laktasaktivitet i tunntarmsbiopsi. Data hämtad från Rasinpera H et al. 2004.

Ålder för debut av laktosintolerans [3]			
	≤ 5 år	6-11 år	≥ 12 år
SENSITIVITET	80 %	95 %	93 %
C/C + hypolaktasi/alla med hypolaktasi			
SPECIFICITET	65 %	82 %	100 %
C/T eller T/T + normal laktasaktivitet/alla med normal laktasaktivitet			
POS prediktivt värde	10 %	65 %	100 %
C/C + hypolaktasi/alla C/C			
NEG prediktivt värde	99 %	98 %	98 %
C/T eller T/T + normal laktasaktivitet/alla C/T eller T/T			

Laktosintolerans kan misstänkas när intag av laktos ger upphov till gasbildning och diarré. Det enklaste sättet att verifiera diagnosen är att eliminera laktos ur kosten och sedan återinsätta det. Patienten skall då bli besvärfri vid utsättandet och symtomen skall sedan återkomma då laktos åter introduceras i kosten. För att ställa diagnosen på ett objektivt sätt kan enzymaktivitet mätas i biopsimaterial från tarmen. Denna invasiva teknik lämpar sig förstas inte för primär screening när patienter söker för magtarmsymtom utan oftast görs peroral laktosbelastning med efterföljande mätning av plasmaglukos och ibland även väteutandningstest. Idag används också ofta gentestet (DNA-LCT -13910C>T) i utredningen av olika magtarmsymtom.

Analysprincip

Sekvenseringsmetoden syftar till att sekvensbestämna ett promotorelement för LCT-genen, det vill säga en del av intron 13 i MCM6-genen. 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. Efter rening av den primära PCR-produkten görs en sekvens-PCR med universella primers och efterföljande rening av denna PCR-produkt. Härfter görs analys med kapillärelektrofores. Sekvensdata produceras genom att "basecalling" utförs på rådata. Data jämförs sedan mellan patienter och mot en känd referenssekvens (**Tabell 4**) genom analys med SeqScape.

Tabell 4. Referenssekvenser för LCT och MCM6.

Gen	Nomenklatur	dbSNP rs-nr	Refseq
LCT	-13910C>T	4988235	Enattah, N.S., et al., Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. Nature Genetics, 2002. 30(2): p. 233-237.
MCM6	c.1917+326C>T	4988235	NM_005915.5
	g.30366C>T	4988235	NG_008958.1

Referensintervall

Ej tillämbart på kvalitativ analys.

DNA-LCT -13910/MCM6 intron 13_ sekvens med Big Dye Direct

Gäller för
Klinisk kemi

LU

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.

Mätområde

Primers amplifierar området mellan positionerna g.29922 och g.30537 i NG_008958.1 *MCM6*. Detta motsvaras av positionerna c.1799 till c.1917+497 i NM_005915.5. Översiktsbild över *MCM6* tagen från Alamut 2017-12-08 (Bild 2).

Se Bilaga 1, primerplacering.

Se även under rubriken "Tekniskt/medicinsk godkännande" där rapporteringsgränserna anges.

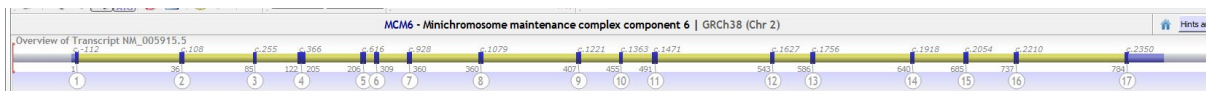


Bild 2. Översikt av *MCM6*-genen, kopierad från Alamut.

Detektionsgräns

DNA koncentrationen normeras till 4 ng.

Mätosäkerhet

Ej tillämplbart på kvalitativ analys

Spårbarhet

Gen	RefSeq
MCM6	NG_008958.1
	NM_005915.6
	NP_005906.2

Primers är designade så att produkten täcker såväl primers som probe för 7900 LCT genotypmetod, Assay id: LI-13910CT-LICT. Samtliga primers blastades med NCBI PRIMER BLAST, se valideringsrapport från 2009.

Imprecision

Akrediterings-CV är ej tillämplbart på kvalitativ analys.

Riktighet

Metodens riktighet är ställd mot referenssekvens *MCM6* NCBI RefSeqGene NG_008958.1. Initial validering gjordes mot en pyrosequensmetod, med 100 % samstämmiga resultat med avseende på mutationsstatus för LCT-13910C>T för 15 prover som var utvalda på grund av avvikande clustring vid

DNA-LCT -13910/MCM6 intron 13_ sekvens med Big Dye Direct

Gäller för
Klinisk kemi

LU

analys med Taqman-kemi på 7900-instrumentet. Således var inte genotypen initialt känd för dessa utvalda. Validering gjordes för att säkerställa samstämmiga resultat mellan vår Sanger-sekvensmetod versus Kalmars pyrosekvensmetod, se validering från 2009.

Sekvensmetoden används för att utröna vilken genotyp prover med avvikande clustring vid 7900-analysen har. Få prover med känd genotyp har därför sekvenserats. Tre kontroller med känd genotyp har dock sekvenserats med samstämmiga resultat jämfört med alleldiskrimineringsmetoden på 7900-instrumentet. Under perioden från 2011 till 2017 har cirka 800 prover som uppvisat olika grader av avvikande clustring sekvenserats, med i de flesta fall förutsägbara sekvensresultat beroende på cluster-placeringen, vilket styrker tron på metodens riktighet. Under 2014 byttes sekvensmetoden ut mot annan kemi, BigDye Direct. Sekvensering av fem patientprover utfördes med både befintlig och ny sekvensmetod med samstämmiga resultat. Se valideringsrapporter från 2009 och 2014 för initial och uppföljande validering. Analyserna fungerar väl som konfirmeringsmetod för verifiering av Taqman alleldiskriminering LCT-13910C>T, men också för förutsättningslös sekvensering av ovan nämnda region i MCM6-genens intron 13.

Ackreditering

Metoden är ackrediterad.

Referenser

1. Enattah, N.S., et al., *Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia*. Nature Genetics, 2002. **30**(2): p. 233-237.
2. Tishkoff, S.A., et al., *Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe*. Nat Genet, 2007. **39**(1): p. 31-40.
3. Rasinpera, H., et al., *A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children*. Gut, 2004. **53**(11): p. 1571-1576.