

DNA-alfa1-antitrypsin genotyp (variant S och Z), Taqman alleldiskriminering, 7900 HT,DNA**B-DNA-alfa1-antitrypsin genotyp (variant S och Z), Taqman alleldiskriminering, 7900 HT, Malmö****Bakgrund, indikation och tolkning**

Proteinet alfa-1-antitrypsin (A1AT, AAT) är en av kroppens viktigaste proteashämmare och tillhör proteinsuperfamiljen serpiner. Ärtlig alfa-1-antitrypsinbrist predisponerar för kronisk obstruktiv lungsjukdom och leversjukdom, främst cirrhos och hepatocellulärt carcinom, men alfa-1-antitrypsinbrist har också kopplats till ovanligare tillstånd som pannikulit och vaskulit [1, 2].

Olika fenotyper klassificeras oftast med ett PI-system (PI=proteasinhibitor), där namnet på den ärvda allelen beskrivs med en bokstav som beskriver migrationen av proteinvarianten vid isoelektrisk fokusering. Exempel på detta är PI*MM som motsvarar individer som är homozygota för den normala "M"-allelen och PI*ZZ som indikerar homozygoti för "Z"-allelen.

Runt en halv miljon svenskar har någon form av alfa-1-antitrypsinbrist. Den kliniska relevansen och den ungefärliga prevalensen av de vanligaste bristvarianterna ses i **tabell 1** nedan [3]. De två vanligaste genetiska varianterna som är kopplade till sänkt halt av AAT i plasma och ärtlig AAT-brist är Z-allelen respektive S-allelen. Båda har sitt ursprung i punktmutationer som ger upphov till ett aminosyraskifte men i olika delar av genen. Om man vill verifiera den specifika alleluppsättningen hos den enskilda patienten kan man utföra genetisk analys.

Genen *SERPINA1* som kodar för proteinet AAT ligger på kromosom 14 (14q31-32.3). *SERPINA1* har flera olika spliceformer men endast en isoform av proteinet har beskrivits. Genen är 13,9 Kb och den längsta spliceformen består av tre icke kodande (exon 0, 1 och 2) och fyra kodande (exon 3-6) exon. Olika exonnumreringar förekommer p.g.a. de olika spliceformerna. Flera genetiska varianter har beskrivits, där de vanligaste är "Z-allelen" (*SERPINA1*:c.1096G>A, p.Glu366Lys) och "S-allelen" (*SERPINA1*:c.863A>T, p.Glu288) [3]. Eftersom olika referenssekvenser och nomenklatur har använts genom åren kallas exempelvis Z-mutationen nu p.Glu366Lys istället för p.Glu342Lys. För valda referenssekvenser se **tabell 2**.

Alfa-1-antitrypsinvarianter kan grupperas enligt olika karakteristika där såväl kvantitativa som kvalitativa störningar kan identifieras. Den kliniska bilden påverkas av både variantens karaktär och om patienten är enkel eller dubbel anlagsbärare.

DNA-alfa1-antitrypsin genotyp (variant S och Z), Taqman alleldiskriminering, 7900 HT,DNAGäller för
Klinisk kemi

LU

Tabell 1. Klinisk signifikans och ungefärlig prevalens i Sverige av de vanligaste alfa-1-antitrypsin-varianterna [3].

PI-typ	Klinisk bild	Prevalens i Sverige
PI MM	Normal. Inga hållpunkter för hereditär alfa-1-antitrypsinbrist.	ca 91%.
PI MS	Patienten är heterozygot för alfa-1-antitrypsinbrist. MS är inte kopplad till ökad risk för lung- eller leversjukdom.	4-5%
PI FM	Patienten är heterozygot för en genetisk alfa-1-antitrypsinvariant utan känd klinisk signifikans.	
PI MZ	Lätt brist. Patienten är heterozygot för alfa-1-antitrypsinbrist.	4-5%.
PI FS	Patienten är dubbelheterozygot för alfa-1-antitrypsinbrist av typen S samt alfa-1-antitrypsinvarianten F. Ingen känd koppling föreligger mellan FS och ökad risk för lungsjukdom.	
PI SZ	Måttlig brist. Patienten är dubbelheterozygot för alfa-1-antitrypsinbrist. SZ är kopplad till ökad risk för emfysem.	ca 0,1%
PI FZ	Patienten är dubbelheterozygot för alfa-1-antitrypsinbrist av typen Z samt alfa-1-antitrypsinvarianten F. FZ kan vara kopplad till lätt ökad risk för emfysem	
PI ZZ	Svår brist. Patienten är homozygot för alfa-1-antitrypsinbrist. ZZ är bland annat kopplad till ökad risk för emfysem och leversjukdom	ca 0,05%
PI SS	Patienten är homozygot för alfa-1-antitrypsinbrist. SS är inte kopplad till ökad risk för lungsjukdom.	ca 0,06%
PI FF	Patienten är homozygot för en genetisk alfa-1-antitrypsinvariant utan känd klinisk signifikans.	

DNA-alfa1-antitrypsin genotyp (variant S och Z), Taqman alleldiskriminering, 7900 HT,DNAGäller för
Klinisk kemi

LU

Tabell 2. Valda referenssekvenser.

Gen	Allelbeteckning	dbSNP rs-nr	Nomenklatur	Refseq
SERPINA1	Z	rs28929474	c.1096G>A	NM_001002236.2
			p. Glu366Lys	NP_000286.3
			g.17083G>A	NG_008290.1
SERPINA1	S	rs17580	c.863A>T	NM_001002236.2
			p.Glu288Val	NP_000286.3
			g.14768A>T	NG_008290.1
SERPINA1	F	rs28929470	c.739C>T	NM_001002236.2
			p.Arg247Cys	NP_000286.3
			g.14644C>T	NG_008290.1

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 sekvensavsnitt 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 tillämbart 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 har sedermera validerats. I valideringen har potentiella primerinterferenser värderats med hjälp av bioinformatik. Ospecifik priming ger upphov till låg eller felaktig genotypclustering i mjukvaran. Uppgifter om primersekvens saknas.

Mätområde

Metoden påvisar homozygoti för vild typ (wt) genotyp, heterozygoti, samt homozygoti för variant genotyp. Amplikonet begränsas av primers F och R samt detekteras med reporter 1 respektive 2 enligt

DNA-alfa1-antitrypsin genotyp (variant S och Z), Taqman alleldiskriminering, 7900 HT,DNAGäller för
Klinisk kemi

LU

nedan under rubrik Reagens. För S-genotyp gäller att vildtypsvarianten detekteras av FAM och S-varianten av VIC. För Z-assayn gäller att vildtypsvarianten detekteras av VIC och Z-varianten av FAM.

Detektionsgräns

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

Mätosäkerhet

Ej tillämpbar på kvalitativ analys.

Spårbarhet

Samtliga primers och prober är spårbara till dessa sekvenser.

Gen	NCBI RefSeq
AAT	NM_001002236.2
	NG_008290.1
	NP_000286.3

Imprecision

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

Riktighet

Metodens riktighet är säkerställd mot referenssekvensen NG_008290.1

Ackreditering

Metoden är ej ackrediterad.

Referenser

1. Fregonese, L. and J. Stolk, Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. Orphanet J Rare Dis, 2008. **3**: p. 16.
2. Peter Nilsson-Ehle, M.B.S., Elvar Theodorsson, ed. Laurells klinisk kemi. 9th ed. 2012, Studentlitteratur.
3. Blanco, I., et al., Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries. Eur Respir J, 2006. **27**(1): p. 77-84.