

Uit de laboratoriumpraktijk

Detectie van de factor-V-Leiden- en factor-II-mutaties met behulp van een duplex-PCR

V. SCHARNHORST, N.J.F. GIJSELHART-NIVILLAC, A.D. GOORHUIS, T.W.S.F. BIERMANN en F. v.d. GRAAF

Het ontstaan van veneuze trombose wordt door erfelijke en niet-erfelijke risicofactoren bevorderd. Bekende risicofactoren voor familiale trombofilie zijn afwijkingen in de proteïne-C-, proteïne-S-, antitrombine-, factor-II- en factor-V-genen. Dit artikel beschrijft een moleculair-biologische methode die in één test, d.m.v. een PCR, mutaties in de factor-II- en factor-V-genen aantoonst.

Trefwoorden: factor-V-Leiden; factor II; duplex-PCR

Veneuze trombotische aandoeningen worden gekarakteriseerd door in-situ-trombusvorming en variabele aanwezigheid van embolieën. De incidentie van veneuze trombo-embolieën bedraagt ongeveer 1:1000. De klinische verschijnselen hangen grotendeels af van de lokalisatie en grootte van de trombus en de onderliggende oorzaak. In afwezigheid van risicofactoren treedt trombose vooral bij ouderen op. Risicofactoren worden onderscheiden in erfelijk en niet-erfelijk. Niet-erfelijke risicofactoren zijn bijvoorbeeld zwangerschap, operaties, immobilisatie, maligniteiten, antistoffen tegen fosfolipiden of lupus-anticoagulans. Als eerste erfelijke risicofactor werd midden jaren '60 van de vorige eeuw de antitrombinedeficiëntie ontdekt. In de jaren tachtig werden familiale deficiënties van twee andere stollingsremmende eiwitten, proteïne C en proteïne S, als risicofactoren voor veneuze trombo-embolie op jonge leeftijd beschreven. De deficiënties worden veroorzaakt door (verschillende) mutaties waardoor de genen worden geïnactiveerd en er geen remmende eiwitten worden aangemaakt.

Recent zijn mutaties in de genen voor de eiwitten factor V en factor II (protrombine) gevonden, die hun procoagulante functies bevorderen en daardoor een verhoogd risico vormen voor overmatige trombusvorming. Onder de blanke bevolking is ca. 5% drager van de factor-V-(1) en 2% drager van de factor-II-mutatie (2, 3).

Klinisch Laboratorium, Máxima Medisch Centrum, Veldhoven

Correspondentie: Dr. V. Scharnhorst, Klinisch Laboratorium, Máxima Medisch Centrum, Postbus 7777, 5500 MB Veldhoven
E-mail: V.Scharnhorst@mmc.nl

Bepaalde mutaties in het factor-V-gen gaan gepaard met de zogenaamde 'Activated protein C resistance' (APCR). De APCR is een door Dahlback ontwikkelde laboratoriumtest op trombofilie (4). In bijna alle gevallen is APCR aan de factor-V-Leiden-mutatie (Arginine 506 Glycine) te wijten (5). Enkele gevallen van APCR worden door de factor-V-Cambridge en -Hong-Kong-mutaties veroorzaakt (6, 7). Deze mutaties in factor V voorkomen de proteolytische inactivatie van factor V_a door proteïne C, waardoor de stollingscascade langer actief blijft. Dragere van de factor-V-Leiden-mutatie lopen een ongeveer 7-10 keer hoger risico op trombose (1). De mutatie in het factor-II-gen bevindt zich in het 3'-onvertaald-gebied van het factor-II-mRNA (8) en leidt tot een hoognormale tot verhoogde factor-II-concentratie. Omdat er overlap bestaat in de factor-II-concentraties tussen patiënten zonder en met de factor-II-mutatie, kan niet worden volstaan met een factor-II-bepaling, maar moet de factor-II-mutatie als oorzaak voor de hoge activiteit moleculair-biologisch aangetoond dan wel uitgesloten worden. Deze mutatie is met een ongeveer 3 keer verhoogd risico op veneuze tromboembolie geassocieerd (8).

De factor-V-Leiden- en de factor-II-mutatie zijn beide met een minder sterk verhoogd risico op trombose geassocieerd, maar hebben een veel hogere prevalentie dan de proteïne-C-, proteïne-S- en antitrombine-mutaties. Zowel voor de factor-V-Leiden- alsook voor de factor-II-mutatie geldt dat als deze mutaties samen of in combinatie met andere aangeboren of verworven risicofactoren aanwezig zijn, de kans op veneuze trombose synergistisch wordt verhoogd (9, 10). Sinds enkele jaren kunnen patiënten met behulp van de 'polymerase chain reaction' (PCR) op de factor-V-Leiden-mutatie worden onderzocht. De rol van gemuteerd factor II bij het ontstaan van veneuze trombose is pas sinds kort bekend, zodat PCR's voor de detectie van de factor-II-mutatie in mindere mate worden uitgevoerd.

Recent zijn wij erin geslaagd een multiplex-PCR op te zetten, waarin beide mutaties in één assay kunnen worden aangetoond.

Materialen en methoden

Per patiënt wordt uit 200 µl EDTA-bloed het genomisch DNA met behulp van de 'QIamp DNA Blood

mini kit' (Qiagen) geïsoleerd en in een volume van 200 µl opgenomen. De voor deze PCR gebruikte primers staan in tabel 1 weergegeven. Per patiënt worden 2 PCR-reacties uitgevoerd. De ene reactie bevat de factor-II-wildtype (wt), factor-V-wt en consensusprimers, de andere de factor-II-mutated (mt), factor-V-mt en consensusprimers. De wt- en mt-primers verschillen alleen in een, de laatste, base van elkaar (vetgedrukt in tabel 1). Dit weerspiegelt het feit, dat zowel het gemuteerde factor-II- als ook het factor-V-Leiden-gen alleen in deze ene base van de wildtypegenen verschillen. De bindingsplaatsen van de primers in de factor-V- en -II-genen zijn al eerder beschreven (11). Beide reacties bevatten tevens een primerpaar voor de amplificatie van het β-globinegen, dat als controle op een goed verloop van de procedure dient. Per PCR-reactie van 25 µl worden bij elkaar gevoegd: 2 µl patiënten-DNA, 5 pmol primer β-globine-1, 5 pmol primer β-globine-2, 5 pmol primer factor-II-consensus, 5 pmol primer factor-II-wt of -mt, 10 pmol primer factor-V-consensus, 10 pmol primer factor-V-wt of -mt, 200 µmol/l dNTP's, 1,75 mmol/l MgCl₂, 50 mmol/l KCl, 2,5 U Super Taq polymerase (HT Biotechnology) in een 10 mmol/l Tris-HCl-buffer, pH 9,0. De touchdown-PCR wordt uitgevoerd in een 'DNA ENGINE thermal cycler' (Peltier). Het dubbelstrengs-DNA wordt eerst 1 minuut bij 95 °C gesmolten. Dan volgen twee PCR-cycli met een annealingtemperatuur van 60 °C. Vervolgens loopt de annealingtemperatuur elke twee cycli 1 °C terug tot 54 °C. Daarna volgt 21 keer de cyclus 1 minuut 95 °C, 1 minuut 54 °C, 1 minuut 72 °C. Het programma eindigt met 10 minuten bij 72 °C. 10 µl van iedere PCR-reactie worden op een 3%-agarosegel in een 1xTAE-buffer elektroforetisch gescheiden en het bandenpatroon beoordeeld.

Tabel 1. Overzicht van alle primers die in de factor-II- en -V-duplexassay gebruikt worden. De wildtype- en mutated primers verschillen alleen in de laatste base. Deze basen komen overeen met de puntmutaties in de factor-II- en -V-genen. De primers voor β-globine dienen ter amplificatie van het β-globinegen, dat als interne controle op een goed beloop van de hele procedure wordt gebruikt.

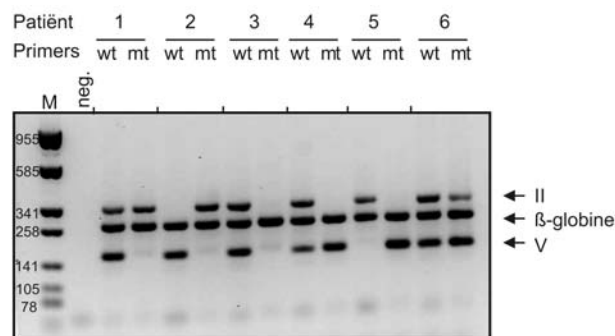
Gen	Primer
β-globine-1:	5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'
β-globine-2:	5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'
Factor II consensus:	5'-TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC-3'
Factor II wild type:	5'-CAC TGG GAG CAT TGA GGA TC-3'
Factor II mutated:	5'-CAC TGG GAG CAT TGA GGA TT-3'
Factor V consensus:	5'-AAT GTT ATC ACA CTG GTG CTA AA-3'
Factor V wild type:	5'-CA GAT CCC TGG ACA GAC G-3'
Factor V mutated:	5'-GCA GAT CCC TGG ACA GAC A-3'

Resultaten

Figuur 1 toont het resultaat van een factor-II- en -V-duplex-PCR. De PCR met DNA van patiënt 3 geeft alleen reactieproducten (te zien als bandjes op de gel) in de reactie met wt-primers. Dat betekent dat deze homozygoot wt voor de factoren II en V is. Patiënt 1 heeft een heterozygote mutatie in factor II en een normale factor-V-status, te zien aan de reactie met de factor-II-wt- en -mt-primers en de factor-V-wt-primer. Patiënt 2 is homozygoot voor de factor-II-mutatie en homozygoot wt voor factor V. Het DNA van patiënt 4 daarentegen reageert met de factor-V-wt als ook de factor-V-mt-primer. Deze patiënt is dus heterozygoot voor de factor-V-Leiden-mutatie (en homozygoot wt voor factor II). Patiënt 5 is (homozygoot) wt voor factor II in combinatie met een homozygote mutatie in factor V en patiënt 6 is heterozygoot voor beide mutaties. Zoals eerder al gezegd dient het β-globinegen als controle op een goed beloop van de hele procedure en moet dus in alle reactiemengsels aantoonbaar zijn. De negatieve controle is een reactiemengsel zonder patiënten-DNA maar met alle primers en mag geen reactieproducten bevatten. De factor-II- en -V-status van 50 patiënten is met twee afzonderlijke PCR's voor de factoren V en II en met de duplex-PCR bepaald. In deze patiëntenpopulatie bevonden zich patiënten met alle mogelijke combinaties van mutaties in de factor-II- en -V-genen. De PCR's leverden voor alle patiënten identieke resultaten zodat de duplex-PCR de afzonderlijke PCR's voor de factoren V en II kan vervangen.

Conclusie

De duplexassay heeft, ten opzichte van de twee afzonderlijke PCR's, meerdere voordelen. Met de duplex-PCR kan in één bepaling de genotype van twee procoagulante genen vastgesteld worden. Twee afzonderlijke PCR's vereisen twee keer zoveel analysetijd en verbruiksartikelen. Bovendien verschillen de reactieproducten van de duplex-PCR dermate in



Figuur 1. Resultaat van een duplex-PCR met het DNA van 6 patiënten (1-6). Een deel van de reactiemengsels wordt na de PCR op een agarosegel gebracht en gescheiden. wt, patiënten-DNA geamplificeerd in aanwezigheid van primers specifiek voor de wildtypesequenties van de factoren II en V; mt, patiënten-DNA geamplificeerd in aanwezigheid van primers specifiek voor de sequenties van de factor-II-mutatie G20210A en factor-V-Leiden. De pijlen wijzen op de bandjes afkomstig van het opgegeven gen; M, DNA-ladder, de lengte in basenparen staat naast de bandjes vermeld; neg., negatieve controle. Voor details zie tekst.

grootte dat digestie van de reactieproducten niet noodzakelijk is. Dit alles verkort de procedure, vermindert de kans op fouten en verlaagt de kosten. De duplex-PCR voor de detectie van mutaties in de factoren II en V is dus een snelle en goedkope manier om twee vaak voorkomende risicofactoren voor veneuze trombose aan te tonen dan wel uit te sluiten.

Literatuur

1. Koster T, Rosendaal FR, Ronde H de, Briet E, Broucke JP van den, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993; 342: 1503-1506.
2. Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM, et al. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998; 79: 706-708.
3. Ferraresi P, Marchetti G, Legnani C, Cavallari E, Castoldi E, Mascoli F, Ardissino D, Palareti G, Bernardi F. The heterozygous 20210 G/A prothrombin genotype is associated with early venous thrombosis in inherited thrombophilias and is not increased in frequency in artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2418-2422.
4. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 1004-1008.
5. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, Velden PA van der, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-67.
6. Chan WP, Lee CK, Kwong YL, Lam CK, Liang R. A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood* 1998; 91: 1135-1139.
7. Williamson D, Brown K, Luddington R, Baglin C, Baglin T. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306→Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood* 1998; 91: 1140-1144.
8. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. 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.
9. De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Chiusolo P, Casorelli I, Rossi E, Leone G. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med* 1999; 341: 801-806.
10. Martinelli I, Bucciarelli P, Margaglione M, De Stefano V, Castaman G, Mannucci PM. The risk of venous thromboembolism in family members with mutations in the genes of factor V or prothrombin or both. *Br J Haematol* 2000; 111: 1223-1229.
11. Hezard N, Cornillet-Lefebvre P, Gillot L, Potron G, Nguyen P. Multiplex ASA PCR for a simultaneous determination of factor V Leiden gene, G→A 20210 prothrombin gene and C→T 677 MTHFR gene mutations. *Thromb Haemost* 1998; 79: 1054-1055.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2004; 29: 35-37

Interferentie van acetaminophen (paracetamol) bij de bepaling van glucose en lactaat in volbloed

M.H. de KEIJZER¹, R.W. BRANDTS¹ en S. van DIJK²

Elektrodes voor de meting van glucose en lactaat in volbloed blijken steeds meer in de dagelijkse praktijk gebruikt te worden. Echter de aanwezigheid van verschillende endogene en/of exogene stoffen in bloed, zoals bijvoorbeeld geneesmiddelen, kan interfereren met de bepaling en kan leiden tot foutief verhoogde of foutief verlaagde uitslagen. Naar aanleiding van een dergelijke bevinding met als interfererende stof acetaminophen is dit nader onderzocht.

Geconcludeerd wordt dat elektrodes met compensatiemogelijkheden de juiste glucoseuitslag produceren, ook bij toxische acetaminophenconcentraties tot 300 mg/l; de lactaatuitslag kan in dat geval tot 0,6 mmol/l afwijken.

Afdeling Klinische Chemie, Universitair Medisch Centrum St Radboud, Nijmegen¹ en Bayer BV, afdeling Diagnostica, Mijdrecht²

Correspondentie: Dr. M.H. de Keijzer, Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Rivierenland, Postbus 6024, 4000 HA Tiel. E-mail: r.de.keijzer@zrt.nl

Trefwoorden: biosensoren; acetaminophen; glucosemeting; lactaatmeting; interferentie

Een prematuur jongetje met een geboortegewicht van 1600 gram werd vanwege sepsis opgenomen op de afdeling Neonatale Intensieve Zorg. Naast een aantal verschillende antibiotica werd ook acetaminophen (Paracetamol) toegediend. Serieel werden capillairen bloed afgenomen en werden bloedgasparameters, elektrolyten en metabolieten bepaald m.b.v. een bloedgasanalyzer. Tijdens deze metingen werd op een bepaald moment door de bloedgasanalyzer een verhoogde concentratie lactaat gemeten, waarbij tevens de boodschap "interference substance detected" gegeneerd werd. Nader onderzoek bracht aan het licht dat het bewuste monster een (toxische) hoeveelheid van 550 mg/l acetaminophen bevatte (de therapeutische concentratie bedraagt ongeveer 20 mg/l). Dit kan leiden tot leverbeschadigingen en methemoglobinemie en zelfs tot irreversibele levernecrose met trombocytopenie en anemie (1).