

verbetering en het bewerkstelligen van meer eenheid in interpretatie en becommentariëring van testresultaten. De werkgroep Klinische Chemometrie wil deze rondzending in 2008 voortzetten. Hiermee kan een bijdrage worden geleverd om de consultatieve functie van de klinische chemie te versterken.

Referenties

1. Oosterhuis WP, Ulenkate HJLM, Goldschmidt HMJ. Evaluation of LabRespond, a new automated validation system for clinical laboratory test results. *Clin Chem* 2000, 46: 1811-1817.
2. Oosterhuis WP, Ulenkate HJLM. Structured validation of laboratory test results. *Ned Tijdschr Klin Chem* 2001; 26: 245-248.
3. Oosterhuis WP, Ulenkate HJLM, Dongen K van, Horst M van der, Punt J, Volmer M, Wulkan RW. Richtlijn voor de procedure van het goedkeuren van laboratoriumuitslagen. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2007; 32: 243-249.
4. Vasikaran SD, Penberthy L, Gill J, Scott S, Sikaris KA. Review of a pilot quality-assessment program for interpretative comments. *Ann Clin Biochem* 2002; 39: 250-260.
5. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA et al. American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005; 112: 2735-2752.
6. Jansen PLM. Niet-alcoholische steatohepatitis: diagnostiek, pathogenese, behandeling en prognose. *Ned Tijdschr Geneesk* 2005; 149: 289-294.
7. Guyatt GH, Oxman AD, Ali M, Willan A, McIlroy W, Patterson C. Laboratory diagnosis of iron-deficiency anemia: an overview. *J Gen Intern Med* 1992; 7: 145-153.
8. Anonimous. Clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for anemia in chronic kidney disease. CPR 1.1. Identifying patients and initiating evaluation. *Am J Kidney Dis* 2006; S17-27.
9. Diagnostiek en behandeling van hereditaire hemochromatose. <http://www.nvkc.nl/kwaliteitsborging/documents/richtlijnhemochromatosedefinitief2007.pdf>
10. Melis MA, Cau M, Deidda F, Barella S, Cao A, Galanello R. H63D mutation in the HFE gene increases iron overload in beta-thalassemia carriers. *Haematologica* 2002; 87: 242-245.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2008; 33: 194-196

Jak2-diagnostiek: zeventien maanden later

J. PRINS¹, M.A. FOURAUX¹, H. KOIJMAN¹ en M.D. LEVIN²

Inleiding

In de diagnostiek van klonale myeloproliferatieve ziekten als polycythaemia vera (PV) en essentiële trombocytose (ET) neemt het vaststellen van de aanwezigheid van een verworven mutatie in het Jak2-gen (Janus-kinase-2, een tyrosinekinase) een belangrijke plaats in (1-4). Myeloproliferatieve ziekten worden gekenmerkt door een overgevoeligheid of onafhankelijkheid van de hematologische voorlopercellen voor cytokines, leidend tot een ongebreidelde proliferatie met een relatief normale maturatie van met name rode bloedcellen en trombocyten in respectievelijk PV en ET. Het klinische beeld van myeloproliferatieve ziekten wordt gekenmerkt door het optreden van zowel trombo-embolische als hemorragische complicaties, hepatosplenomegalie, klonale beenmerghyperplasie en een predispositie voor transformatie naar acute leukemie (5).

Jak2 is een tyrosinekinase dat betrokken is bij de signaaltransductie van diverse cytokinereceptoren in de hematopoëtische voorlopercellen (1-3). De bedoelde mutatie in het Jak2-gen is een G→T-mutatie in

het JH2-pseudokinasedomein (nucleotide 1849, exon 14) van het Jak2-gen, leidend tot een valine-naar-fenylalaninesubstitutie op aminozuurpositie 617 (Jak2-V617F). Deze mutatie geeft aanleiding tot een continue tyrosinekinaseactiviteit van Jak2 wat resulteert in een proliferatievoordeel voor de betreffende cellijn. De Jak2-V617F-mutatie kon niet worden aangetoond in DNA geïsoleerd uit niet-hematopoëtische weefsels, wat suggereert dat het om een somatische mutatie in de hematopoëtische voorlopercellen gaat (1).

Uit onderzoek is gebleken dat de diagnostische meerwaarde van het bepalen van de aan- of afwezigheid van de Jak2-V617F-mutatie ligt in het onderscheiden van myeloproliferatieve aandoeningen als PV (>95% Jak2-V617F mutatie positief) en ET (~50% Jak2-V617F mutatie positief) van andere oorzaken van erythrocytose of trombocytose (1-6). Tussen november 2006 en maart 2008 heeft ons laboratorium in 121 monsters de aan- of afwezigheid van de Jak2-V617F-mutatie vastgesteld bij patiënten verdacht van PV of ET. Geanalyseerd is of de aan- of afwezigheid van deze Jak2-mutatie effect heeft op meer dan één hematologische parameter in het perifere bloed van deze patiënten.

Methoden

Van patiënten met een klinische verdenking op PV of ET werd genomisch DNA geïsoleerd uit EDTA-vol-

Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Albert Schweitzer ziekenhuis Dordrecht & RIVAS Beatrix ziekenhuis Gorinchem; Afdeling Interne Geneeskunde², Albert Schweitzer ziekenhuis Dordrecht

bloed middels de Qiagen-kolommethode (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA). De monsters waren afkomstig van patiënten met de verdenking PV (o.a. hemoglobine(Hb-)concentratie > 10,6 mmol/l voor mannen of > 9,9 mmol/l voor vrouwen) of ET (o.a. trombocytenaantal > 450 x 10⁹/l). Van deze patiënten werden de bloedbeeldwaarden opgezocht welke aanleiding hadden gegeven tot de verdenking PV of ET, met name de Hb-concentratie, het hematocriet (Ht), het MCV en het aantal trombocyten en leukocyten, allen gemeten op een Sysmex XE-2100 hemocytometer (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

De aan- of afwezigheid van de Jak2-V617F-mutatie werd vastgesteld middels een allel-specifieke PCR beschreven door Baxter et al. (2) waarbij gebruik werd gemaakt van twee forward-primers (één specifiek voor de mutatie en één interne controle) en één reverse primer. Na agarosegelelektroforese dient de interne controle (364-baseparenfragment) altijd positief te zijn. De aanwezigheid van een additioneel 203-baseparenfragment wijst op de aanwezigheid van de Jak2-V617F-mutatie. De minimale detectiegrens van deze assay is 1 - 3% (indien 1 - 3% van de leukocyten de Jak2-mutatie bezit dan resulteert dit in een Jak2-mutatie-positieve uitslag) (2).

Geanalyseerd werd of de bloedbeeldwaarden gemeten bij het ontstaan van de verdenking PV of ET significant verschillend waren voor de Jak2-V617F-mutatie-negatieve versus mutatie-positieve patiënten.

Resultaten

In de afgelopen 17 maanden werd in 121 monsters de aan- of afwezigheid van de Jak2-V617F-mutatie vastgesteld. De monsters waren afkomstig van 56 patiënten met de verdenking PV (erythrocytose) en 65 patiënten met de verdenking ET (trombocytose). Bij patiënten met een verdenking op PV werd een Hb-concentratie van 11,3 ± 0,8 mmol/l aangetroffen (laagste waarde 10,0 mmol/l; hoogste waarde 14,3 mmol/l). Van deze patiënten werd in 29% (16/56) van de gevallen de aanwezigheid van de Jak2-mutatie aangetoond. Bij patiënten met een verdenking op ET werd een trombocytenaantal van 774 ± 276x10⁹/l aangetroffen (laagste waarde 443x10⁹/l; hoogste waarde 1596x10⁹/l). Van deze patiënten werd in 52% (34/65) van de gevallen de aanwezigheid van de Jak2-mutatie aangetoond.

Zowel de van PV als van ET verdachte patiëntengroepen werden op basis van de vastgestelde Jak2-mutatiestatus in twee groepen verdeeld. Vervolgens werden de bij het ontstaan van de verdenking op PV of ET gemeten Hb-, Ht-, MCV-, trombocyten- en leukocytenwaarden per subgroep vergeleken (zie tabel). In de PV-verdachte patiëntengroep werd geen verschil gezien in de Hb-concentratie tussen de Jak2-mutatie-positieve en -negatieve subgroep (p = 0,17). Wel werden in de Jak2-mutatie-positieve subgroep significant hogere waarden voor het Ht en de trombocyten- en leukocytenaantallen gevonden (respectievelijk p = 0,002, p < 0,001 en p = 0,002), terwijl het MCV in de Jak2-mutatie-positieve subgroep juist weer significant lagere waarden liet zien (p = 0,002). In de ET-verdachte patiëntengroep werd geen verschil gezien in de trombocytenaantallen tussen

de Jak2-mutatie-positieve en -negatieve subgroep (p = 0,32). Wel werd in de Jak2-mutatie-positieve subgroep significant hogere waarden voor de Hb-concentratie, het Ht en het leukocytenaantal gevonden (respectievelijk p < 0,001, p < 0,001 en p = 0,05).

Conclusies

Ook binnen ons laboratorium heeft het vaststellen van de aan- of afwezigheid van de Jak2-V617F-mutatie een prominente plaats ingenomen in de diagnostiek van klonale myeloproliferatieve ziekten als PV en ET. De diagnostische meerwaarde van het vaststellen van de Jak2-mutatiestatus ligt in het onderscheiden van aandoeningen als PV (primaire erythrocytose) en ET van andere oorzaken van erythrocytose of trombocytose (1-6). Erythrocytose, gepaard gaande met een verhoogd Ht, is een afwijking met soms levensbedreigende complicaties en een uitgebreide differentiaaldiagnose (6). Meestal is erythrocytose secundair aan een cardiopulmonale aandoening die tot een lage arteriële zuurstofspanning leidt. Bij PV wordt de erythrocytose veroorzaakt door een verworven klonale beenmergaandoening waarbij met name het aantal rode bloedcellen autonoom groeit. Bij erythrocytose op basis van PV is verlaging van het Ht door aderlating en behandeling met acetylsalicylzuur geïndiceerd (6).

Het aantonen van een in 2005 beschreven mutatie in het Jak2-gen (1-3), die bij meer dan 95% van alle patiënten met PV voorkomt, is een veelbelovende test om de diagnostiek van erythrocytose te vereenvoudigen en is ook voorgesteld als nieuw diagnostisch ('major') criterium binnen de WHO (4). Bij patiënten met erythrocytose heeft het vinden van deze Jak2-V617F-mutatie een positief-voorspellende waarde van 100 % voor de diagnose PV (4, 5). In het hier beschreven onderzoek kon slechts bij 16 van de 56 patiënten, verdacht van PV, de Jak2-V617F-mutatie aangetoond worden in een perifeer bloedmonster. Dit maakt duidelijk dat de 'in huis'-beschikbaarheid van deze test maakt dat vanuit de kliniek de Jak2-mutatiestatus één van de eerste

Tabel 1. Verschillen tussen Jak2-V617F-negatieve en -positieve patiënten bij verdenking op polycythaemia vera en essentiële trombocytose

	Eenheid	Jak2-V617F negatief (gem. ± SD)	Jak2-V617 positief (gem. ± SD)	p*
<i>Verdenking polycythaemia vera (PV)</i>				
Hemoglobine	mmol/l	11,2 ± 0,6	11,5 ± 1,1	0,17
Hematocriet	l/l	0,53 ± 0,03	0,57 ± 0,05	0,002
MCV	fl	92 ± 5	86 ± 7	0,002
Trombocyten	10 ⁹ /l	217 ± 50	389 ± 158	< 0,001
Leukocyten	10 ⁹ /l	9,1 ± 5,0	14,1 ± 5,2	0,002
Aantal patiënten		40	16	
<i>Verdenking essentiële trombocytose (ET)</i>				
Hemoglobine	mmol/l	7,7 ± 1,1	8,8 ± 1,1	< 0,001
Hematocriet	l/l	0,38 ± 0,05	0,44 ± 0,05	< 0,001
MCV	fl	92 ± 10	89 ± 16	0,39
Trombocyten	10 ⁹ /l	738 ± 293	807 ± 260	0,32
Leukocyten	10 ⁹ /l	10,6 ± 3,6	13,7 ± 8,1	0,05
Aantal patiënten		31	34	

*Berekend middels Student's t-Test

markers is die aangevraagd wordt in de differentiaal-diagnostiek van patiënten met erythrocytose. Dit verklaart ook waarom er geen significant verschil werd gezien in de Hb-concentratie van de Jak2-mutatie-negatieve versus positieve subgroep (respectievelijk $11,2 \pm 0,6$ mmol/l en $11,5 \pm 1,1$ mmol/l). Wel werd bij de Jak2-mutatie-positieve subgroep een significant hogere Ht-waarde en lagere MCV-waarde aangetroffen ($p = 0,002$ voor beide), passend bij primaire erythrocytose (PV). Ook werd in de Jak2-mutatie-positieve subgroep de frequent bij PV-patiënten geobserveerde verhoogde trombocyten- en leukocytenaantallen significant meer gezien ten opzichte van de Jak2-mutatie-negatieve subgroep (respectievelijk $p < 0,001$ en $p = 0,002$) (8). Dit bevestigt het klonale karakter van PV, waarbij de Jak2-mutatie in de multipotente hematopoëtische stamcel aanwezig is.

Naast het feit dat de Jak2-V617F-mutatie wordt gezien in vrijwel alle patiënten met PV, wordt deze mutatie ook in ongeveer de helft van de patiënten met ET aangetroffen (1, 2, 7). Binnen ons laboratorium werd bij 52% (34/65) van de patiënten waarbij de Jak2-mutatiestatus werd aangevraagd op basis van de aanwezigheid van een trombocytose, de Jak2-mutatie aangetoond in het perifere bloed. Net als beschreven door o.a. Campbell et al. (7) werden ook binnen ons onderzoek verschillen zichtbaar in perifere hematologische parameters tussen Jak2-V617F-mutatie-negatieve en -positieve patiënten (zie tabel). Ten opzichte van de Jak2-mutatie-negatieve subgroep werden in de Jak2-mutatie-positieve groep significant hogere Hb-, Ht- en leukocytenwaarden gezien (respectievelijk $p < 0,001$, $p < 0,001$ en $p = 0,005$), terwijl geen verschil in trombocytenaantallen werd aangetroffen tussen de twee subgroepen. Dit duidt op een aantal PV-achtige kenmerken in Jak2-mutatie-positieve ET-patiënten (5, 7). Uit de literatuur blijkt daarbij dat een transformatie van ET naar PV significant vaker plaatsvindt bij Jak2-V617F-mutatie-positieve patiënten

en dat zij gevoeliger zijn voor de behandeling met hydroxyureum ten opzichte van Jak2-mutatie-negatieve patiënten (7). Hoewel de Jak2-mutatiestatus ET duidelijk in twee groepen scheidt, blijft het moeilijk de Jak2-mutatiestatus van een persoon te voorspellen op basis van routinematig beschikbare klinische en laboratoriumbevindingen (5, 7).

Referenties

1. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal Jak2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434: 1144-1148.
2. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase Jak2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054-1061.
3. Tefferi A. Jak2 mutations in polycythemia vera - Molecular mechanism and clinical applications. *N Engl J Med* 2007; 356: 444-445.
4. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007; 110: 1092-1097.
5. Koene, HR, Biemond BJ, Schoot CE van der. Van gen naar ziekte; Jak2 en polycythaemia vera. *Ned Tijdschr Geneesk* 2007; 151: 1784-1787.
6. Heer K de, Silbermann MH, Koene HR, Biemond BJ, Muller HP, Oers MHJ van. Systematische diagnostiek van erythrocytose. *Ned Tijdschr Geneesk* 2007; 151: 1770-1776.
7. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on Jak2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005; 366: 1945-1953.
8. McMullin MF, Bareford D, Campbell P, Green AR, Harrison C, Hunt B, et al. Guidelines for the diagnosis, investigation and management of polycythaemia/erythrocytosis. *Br J Haem* 2005; 130: 174-195.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2008; 33: 196-198

Proteomic profiling of cerebrospinal fluid to detect potential biomarkers for multiple sclerosis

B. PULINX¹, A-C. DUBBELMAN², J.A.P. BONNS¹, M.P. van DIEIJEN-VISSER¹, R.M.M. HUPPERTS³
and W.K.W.H. WODZIG¹

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory, demyelinating disease of the central nervous system of unknown aetiology. Pathological manifestations are perivascu-

lar infiltration of lymphocytes and macrophages in the brain stem, optic nerves and spinal cord, followed by myelin loss, resulting in inflammatory plaques in the white and gray matter (1). The extended criteria indicate that the diagnosis of MS is not straightforward. The most important reason is a lack of reliable serological or cerebrospinal fluid (CSF) tests for the diagnosis of MS (2). Effective immunomodulatory therapy is available but a large range of conditions can mimic MS. This is exactly the reason why it is important to identify biological markers that reliably distinguish

Department of Clinical Chemistry¹, University Hospital Maastricht; Department of Biomedical Engineering², Technical University Eindhoven and Department of Neurology³, Maaslandziekenhuis Sittard

E-mail: Wodzig.K@klinchem.azm.nl