

Hovedforfattere: **CELINE GERIN**, bioingeniør, Laboratorium for medisinsk biokjemi, Haugesund sjukehus, Helse Fonna og **ASTRID MØLLERSEN BELL**, bioingeniør, Enhet for immunologi og transfusjonsmedisin ved samme sykehus.
E-post: celine.monique.yvette.gerin@helse-fonna.com

Medforfattere: **MONA KVITLAND**, fagansvarlig bioingeniør, Avdeling for medisinsk biokjemi, St. Olavs hospital HF
KETIL THORSTENSEN, sjefsingeniør, Avdeling for medisinsk biokjemi, St. Olavs hospital HF.
REIDUN MECSEI, førstelektor, Avdeling for mat- og medisinsk teknologi, Bioingeniørutdanningen, Høgskolen i Sør-Trøndelag.

Genotypespesifikke referanseområder for serum-ACE

SARKOIDOSE er en kronisk betennelsessykdom uten kjent årsak. Den kan ramme ulike organer/systemer, ofte lunge og hud, der vevet blir infiltrert av granulom. Typiske trekk ved sarkoidose er epiteloide granulomer og endret immunitet. Årsaken til granulomdannelse ved sarkoidose er ukjent, men histologisk sett likner sykdommen på tuberkulose.

Angiotensin Converting Enzyme (ACE, også kalt peptidyl-dipeptidase A eller kininase II) er et enzym som spiller en sentral rolle i Renin-Angiotensin-Systemet (RAS) hvor blodtrykket og elektrolyttbalansen reguleres. I RAS spaltes renin angiotensinogen til inaktivt angiotensin I, som igjen spaltes av ACE til aktivt angiotensin II. På denne måten økes vasokonstriktor-aktiviteten (1). ACE finnes hovedsaklig som membranbundet enzym i endotelceller og i ulike typer epitelvev, som for eksempel epitelceller av proksimale tubuli, tarm og testikler. Frigjøring av ACE til blod skjer ved at ACE spaltes fra cellemembranen til sirkulasjonen. Ved sarkoidose spaltes ACE fra granulomenes epiteloide celler og gjenspeiler dermed granulom-massen (2) og sarkoidoseaktivitet. Serum-ACE (s-ACE) er forhøyet hos 40-80 prosent av personer med sarkoidose og kan benyttes som en markør for sarkoidoseaktivitet, samt ved diagnose og kontroll av sykdommen (2). Høy s-ACE-aktivitet ses også ved andre sykdommer, blant annet cirrhose, diabetes, hypertyroidisme, lungefibrose og tuberkulose (3).

Genet for ACE finnes på kromosom 17. Det inneholder en polymorfisme som består av en nukleotidsekvens på 287 basepar (bp) som enten er innskutt (insersjon, I), eller fraværende (delesjon, D) (4). Polymorfismen befinner seg i intron 16 av genet og gir opphav til tre ulike genotyper; DD (cirka 25 prosent), DI

(cirka 50 prosent) og II (cirka 25 prosent). I tillegg til at nivået av ACE i serum påvirkes av sarkoidoseaktiviteten, avhenger s-ACE-nivået av genotypen (4). Genotypen DD gir høyere s-ACE-nivå enn DI- og II-genotypene (2, 4).

Et referanseområde bestemmes på grunnlag av en kvantitativ undersøkelse fra en definert gruppe friske eller syke individer etter bestemte regler. På den måten kan en pasients målte verdi vurderes i forhold til det aktuelle referanseområdet. De fleste referanseindivider er valgt ut ved en ikke-tilfeldig prosess og er ofte blodgivere eller sykehusansatte. Referanseområdet defineres oftest som det intervallet hvor verdiene til 95 prosent av en frisk befolkning ligger, det vil si mellom 2,5 og 97,5 persentilen. International Federation of Clinical Chemistry and laboratory medicine (IFCC) anbefaler bruk av interpersentil intervall som referanseområde.

Referanseområde kan bestemmes både ved hjelp av parametriske og ikke-parametriske statistiske metoder. Parametriske metoder antar at referanseverdiene er

Sammendrag

Hensikten med studien var å undersøke om det var grunnlag for å etablere genotypespesifikke referanseområder for serum-ACE ved Avdeling for medisinsk biokjemi, St. Olavs hospital i Trondheim.

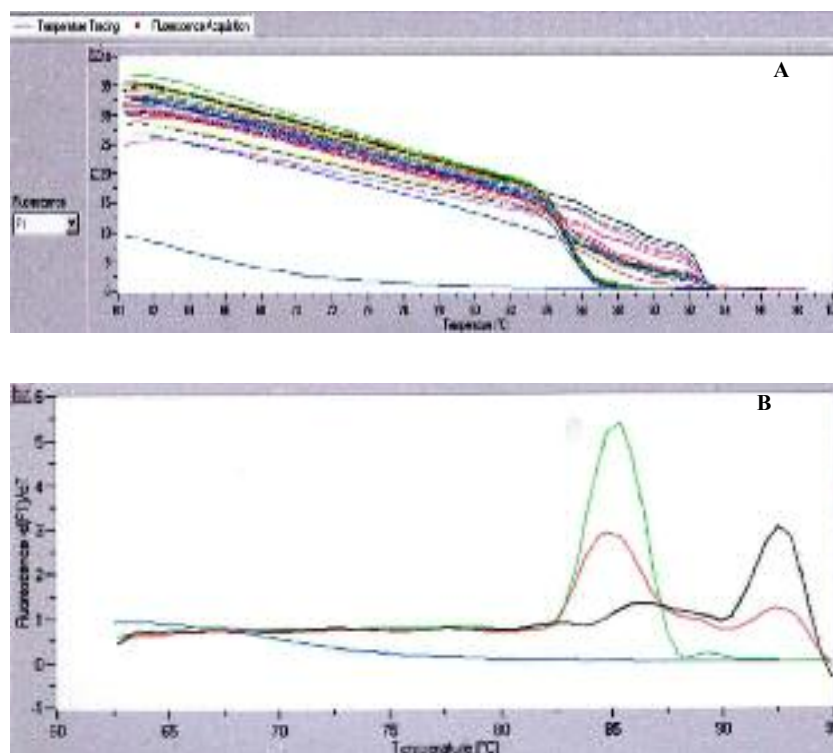
Serum-ACE benyttes som en biokjemisk markør for sarkoidose, en betennelsessykdom som oftest rammer lungene. En polymorfisme i ACE-genet gir opphav til tre genotyper med ulike serum-ACE-nivåer. Genotypespesifikke referanseområder kan derfor potensielt gi mer nøyaktig diagnostisering, behandling og kontroll av sykdommen sarkoidose.

I studien ble 300 blodprøver fra blodgivere analysert for serum-ACE. I tillegg ble det isolert DNA til bestemmelse av ACE-genotype. Analyseresultatene ble benyttet til å bestemme referanseområder for hver av de tre ACE-genotypene.

Det ble ikke funnet statistisk signifikant forskjell mellom serum-ACE verdiers median hos kvinner og menn. I tillegg ble det vist at serum-ACE ikke endres med alder.

Statistiske tester som ble benyttet, viste at det var signifikante forskjeller i medianverdier for serum-ACE mellom genotypene. Resultatene av studien gir grunnlag for å etablere genotypespesifikke referanseområder for serum-ACE, men klinisk relevans av resultatene må undersøkes videre i utvidede studier.

Bioingeniøren er godkjent som vitenskapelig tidsskrift. Denne artikkelen er fagfellevurdert og godkjent etter Bioingeniørens retningslinjer.



Figur 1.

Smeltekurve LightCycler® 1,5 System (9).

A): Endring i fluorescens vises ved temperaturstigning i smeltekurven. Med økende temperatur, smelter dobbeltrådig DNA (dsDNA) til enkeltrådig-DNA (ssDNA). Når dsDNA denatureres slik at det dannes ssDNA, løsner SYBR Green I og målt fluorescens avtar (URL 1). Siden smeltetemperaturen (T_m) avhenger av PCR-produktenes lengde og antall GC-bp i sekvensen, vil produktet som inneholder insersjonen smelte ved en høyere temperatur enn produktet som ikke inneholder insersjonen.

B): Smeltetoppene for genotypene hvor fluorescensavtapping ses i forhold til økende temperatur. Omgjøring av smeltekurve til smeltetopp gjøres ved å derivere fluorescens (F) med hensyn på temperatur (T), ($-dF/dT$). Her framkommer T_m for PCR-produktene som topper, med ulikt mønster for de tre ACE-genotypene.

—DD-genotype

—DI-genotype

—II-genotype

normalfordelt, og er basert på median og standardavvik (SD). Referanseområde og referansegrenser bestemmes ved å beregne ± 2 SD fra medianen. Ikke-parametrisk metode antar ikke at referanseverdiene er normalfordelt. Referansegrenser bestemmes ved å fjerne 2,5 prosent av verdiene på hver ende av referansefordelingen. Når man sammenligner resultater fra de to metodene, er det liten forskjell på persentilene (3). Parametrisk metode er noe mer presis enn ikke-parametrisk metode. Ikke-parametrisk metode er enklere og

foretrekkes ved bruk av "bootstrap" metode (3).

"Bootstrap" er en ikke-parametrisk metode som kan benyttes når fordelingen av referanseverdiene er usikker, og ved få referanseverdier. Ved å tilfeldig trekke en referanseverdi fra innsamlede data, registrere dens verdi og legge den tilbake, kan en sikrere fordeling oppnås. Behovet for innsamlede prøver blir mindre fordi trekking og tilbakelegging av prøver kan gjentas opptil tusen ganger (5).

I 2001 ble referanseområder for s-ACE delt på kjønn bestemt ved St. Olavs hospital i Trondheim ut fra analyse av blodgivere (122 menn og 85 kvinner). Det ble den gang ikke tatt hensyn til genotype. Målet med den studien som presenteres i denne artikkelen var å undersøke om det er grunnlag for å etablere genotypespesifikke referanseområder for s-ACE, som eventuelt kan benyttes til å gi mer nøyaktig diagnostisering, behandling og kontroll av sarkoidose. For å oppnå dette ble s-ACE målt hos 150 blodgivere av hvert kjønn, og DNA fra prøvene ble isolert og genotypet. Genotypespesifikke referanseområder ble beregnet ut fra innsamlede data.

Materiale og metode

Referansegruppe og prøveinnsamling

Serum til ACE-analyse og EDTA-blod til genotyping ble samlet fra 300 blodgivere (150 menn, 150 kvinner) ved

Abstract

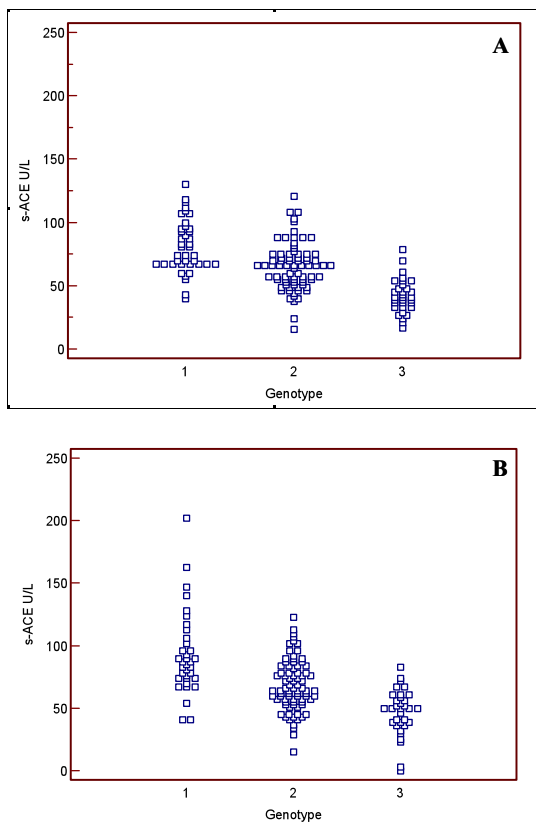
The purpose of this study was to investigate if there was a basis for establishing genotype-specific reference intervals for serum ACE at the Department of Medical Biochemistry, St. Olavs Hospital in Trondheim.

Serum ACE is used as a biochemical marker for sarcoidosis, an inflammatory disease that usually affects the lungs. A polymorphism in the ACE gene gives three genotypes with different serum ACE levels. Genotype-specific reference intervals may therefore potentially give more accurate diagnosis, treatment and control of the disease.

In this study 300 blood samples were drawn from blood donors and analysed for serum ACE.

In addition, DNA was isolated for the determination of ACE genotype. The analytical results were used to define reference intervals for ACE genotypes.

No statistical significant difference between the medians of serum ACE for women and men was found. In addition, the results showed that serum ACE does not change with age. Statistical tests used showed that there were differences in median serum ACE levels between the ACE genotypes. The results give grounds for establishing genotype-specific reference intervals for serum ACE. However, the clinical relevance of the results should be studied further.



Figur 2. Serum-ACE-verdier hos kvinner (A) og menn (B) i forhold til genotype. Genotype DD, DI og II er her representert med henholdsvis nr.1, 2 og 3 på x-aksen.

Blodbanken på St. Olavs hospital. Prøvene ble anonymisert slik at bare kjønn, fødselsår og et løpenummer identifiserte prøvene. Blodgiverskjema ble benyttet for å innhente samtykke fra blodgiver.

Serum-ACE-analyse

Serum-prøvene ble analysert med hensyn til ACE aktivitetsnivå på ABX Pentra 400 (HORIBA ABX, Montpellier, Frankrike). Metoden baserer seg på spektrofotometrisk bestemmelse av hydrolyseringen av 3-(2-furylacryloyl)-L-phenylalanyl-glycyl-glycin (FAPGG) (6).

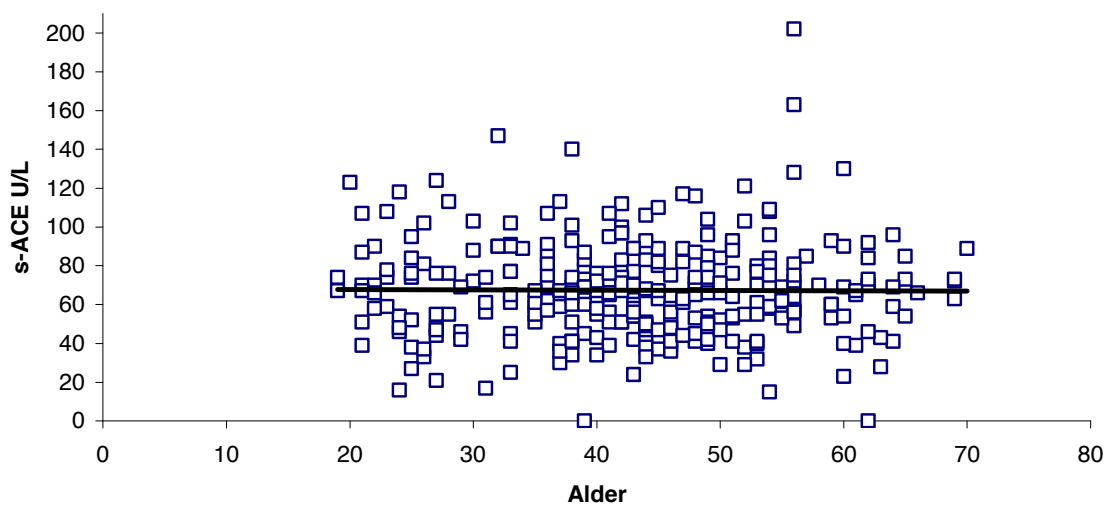
DNA-isolering

DNA ble isolert fra EDTA-blod ved hjelp av Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal (DYNAL®, Invitrogen).

Genotyping

Genotyping av prøvene ble utført ved hjelp av PCR på LightCycler® 1.5, med LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche). Primere var DI-Int 16 (5'-CTG-GAG-ACC-ACT-CCC-ATC-CTT-TCT-3') og DI-Ex 16 (5'-GAT-GTG-GCC-ATC-ACA-TTC-GTC-AGA-T-3') (Invitrogen Custom Primers). PCR-programmet bestod av en innledende denaturering ved 95 °C i 10 minutter, etterfulgt av 35 sykler med denaturering i 95 °C i 15 sekunder; annealing 50 °C i 15 sekunder; extension 72 °C i 10 sekunder.

LightCycler lager til slutt en smeltekurve ved å øke temperaturen fra 60 °C til 95 °C (figur 1).



Figur 3. Serum-ACE-verdier i referansegruppen i forhold til alder. ($R^2=5E-05$).

Tabell 1. Fordeling av genotyper						
	DD		DI		II	
	N	%	N	%	N	%
Kvinner	40	27	78	52	32	21
Menn	36	24	81	54	33	22
Alle	76	25	159	53	65	22

Tabell 2. Referanseområder for ACE-genotypene hos kvinner og menn					
Kvinner	Referanseområde s-ACE (U/L)	Median	Menn	Referanseområde s-ACE (U/L)	Median
DD	42 – 124	77,5	DD	41 – 187	87,0
DI	30 – 108	66,0	DI	32 – 111	65,0
II	18 – 76	41,0	II	1 – 80	51,0

Tabell 3. Nedre og øvre referansegrenser for ACE-genotyper		
Gruppe	Nedre referansegrense (U/L) (90% konfidensintervall)	Øvre referansegrense (U/L) (90% konfidensintervall)
Genotype DD	41 (40 – 53)	163 (131 – 202)
Genotype DI	29 (16 – 40)	110 (104 – 121)
Genotype II	3 (0 – 22)	79 (71 – 83)

Statistiske metoder

Referanseområder ble beregnet med ikke-parametrisk metode ved bruk av MedCalc® (Mariakerke, Belgia), mens 90 prosent konfidensintervall for hver referansegrense, som anbefalt av IFCC (7), ble beregnet med bootstrap-metodikk ved hjelp av RefVal 4.10 (8).

Mann-Whitney test ble benyttet for å undersøke om det var statistisk signifikant forskjell mellom medianene til kvinner og menn, og mellom de ulike ACE-genotypene.

Resultater og diskusjon

Vellykket genotyping ble gjennomført for alle 300 prøvene. Som vist i Tabell 1 var genotypene fordelt slik at DD-genotypen utgjør cirka 25 prosent, DI-genotypen utgjør cirka 50 prosent og II-genotypen utgjør cirka 25 prosent. Det var ingen forskjell mellom kvinner og menn i distribusjon av genotyper, noe som først ble antatt (St. Olavs hospital bruker et kjønnsdelt referanseområde). Disse resultatene tilsvarer det som er funnet i andre studier (2, 4).

Som vist i Figur 2 gir genotypen DD høyere s-ACE-verdier enn DI- og II-genotypene hos både kvinner og menn. II-genotypens s-ACE-verdier ligger lavest, mens

s-ACE-verdiene til genotypen DI ligger mellom verdiene til DD og II-genotypene. Dette er i tråd med tidligere undersøkelser (2, 4). Referanseområdet for s-ACE ved St. Olavs hospital, er i dag kjønnsdelt. Det ble derfor antatt at det ville være forskjell på kvinner og menns ACE-verdier også etter inndeling i de ulike genotypene. Ved Mann-Whitney test ble det ikke funnet statistisk signifikant forskjell mellom kvinners og menns medianverdier i serum-ACE nivå for hver av de ulike genotypene (Tabell 2). Det bør derfor vurderes å ta i bruk et felles genotypespesifikt referanseområde for kvinner og menn. Imidlertid var det statistisk signifikant forskjell mellom genotypenes medianverdier (Mann-Whitney test, $p < 0,05$) for både kvinner og menn. Tabell 3 viser nedre og øvre referansegrenser for ACE-genotypene med 90 prosent konfidensintervall.

Det ble også undersøkt om s-ACE endrer seg med alderen. Figur 3 viser at s-ACE ikke forandres med alder i referansegruppen. Mangel på verdier før fylte 20 år skyldes at det i Norge er 18 års aldersgrense for å bli blodgiver.

Når et referanseområde skal bestemmes, kan det benyttes statistiske metoder for å detektere slengere ("outliers"), verdier som viser stort avvik fra median.

Slike verdier ble påvist ved hjelp av RefVal 4.10. Man kan derfor spekulere i om slengene påvirker fordelingen av verdiene slik at andre referanseområder ville framkommet om slengene var fjernet. Sammenligning av referanseområdene med og uten slengene viste imidlertid liten forskjell. I tillegg ble det undersøkt om det fortsatt var forskjell mellom genotypenes medianer etter fjerning av slengene. Mann-Whitney test viser at det fortsatt er statistisk signifikant forskjell. Etter anbefaling fra IFCC om ikke å fjerne slengene automatisk, og mangel på biologiske og biokjemiske grunner for å fjerne verdiene fra data-settet, ble alle verdiene beholdt.

Ideelt sett bør en referansegruppe bestå av en større gruppe individer som ikke er forhåndsselektert, og bør velges uten å ta hensyn til helsetilstand slik at referanseområdet best mulig kan representere befolkningen. Blodgivere representerer den friskeste delen av befolkningen med veldefinert helsetilstand, og er lett tilgjengelig. Pasienters målte verdier blir dermed sammenlignet med verdier fra de friskeste, når diagnose og behandlingseffekt skal vurderes. Nyten av denne sammenligningen er ukjent, men det antas at de ideelle kliniske beslutningsgrensene for å avgjøre sykdomsbildet til en pasient, ikke vil være lik referansegrensene. Ut fra en samlet vurdering synes det imidlertid riktig å definere egne referanseområder for de tre ACE-genotypene.

Konklusjon

Det kan i denne studien konkluderes med at det er statistisk grunnlag for å etablere genotypespesifikke referanseområder for s-ACE uavhengig av kjønn og alder. Flere punkter kan studeres nærmere med tanke på størrelse og valg av referansegruppe, samt betydningen av slengene på referanseområdene. Det bør også undersøkes om etablering av genotypespesifikke

referanseområder for s-ACE vil ha positiv effekt for diagnostisering, behandling og kontroll av pasienter med sarkoidose. ■

Referanser

1. Baughman RP (ed.). Sarcoidosis (I serien: Lung biology in Health and disease. Lenfant C. ed.) 2006; vol. 210, Taylor and Frances group, New York. USA.
2. Alia P, Mana J, Capdevila O, Alvarez A, Navarro MA. Association between ACE gene I/D polymorphism and clinical presentation and prognosis of sarcoidosis. , 2005; 65: 691-698.
3. Burtis CA, Ashwood ER (ed). Tietz Fundamentals of clinical chemistry. 2001; 5. utgave, kap. 14 og kap. 20, W. B Saunders Company, Philadelphia, USA.
4. Rigat BC, Hubert FA, Gelas F, Cambien P, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. J Clin Invest 1990; 86:1343-1346.
5. Hesterberg T, Monaghan S, Moore D, Clipson A, Epstein R. The Practice of Business Statistics Companion. Chapter 18: Bootstrap Methods and Permutation Tests, 2003, W. H. Freeman and company, New York, USA.
6. Johansen KB, Marstein S, Aas P. Automated method for the determination of angiotensin-converting enzyme in serum. Scand J Clin Lab Invest 1987; 47:411-414).
7. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 2006; 4. utgave, kap. 16, Elsevier Saunders, St. Louis, USA.
8. Solberg HE., RefVal: a program implementing the recommendations of the International Federation of Clinical Chemistry on the statistical treatment of reference values. Comput Meth Progr Biomed 1995; 48: 247-256.
9. Roche Applied Science, *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green 1, Version September 2005*, Roche. Tilgjengelig fra: [19.05.2008]



 Nolato

Din leverandør av forbruksvarer til laboratorie

AS Cerbo Norge
Vestvollveien 10
2021 Skedsmokorset
Tlf.: 6387 8220
Fax: 6387 4120
cerbo.norge@nolato.com
www.nolato.se/nolatocerbo



CERBO