

Evaluering av gentest for laktasemangel

Sammendrag

Bakgrunn. Laktosemalabsorpsjon forekommer hos 2–8 % av befolkningen i Vest-Europa, mens tilstanden er svært vanlig (opptil over 90 %) på den sørlige halvkule. Tradisjonelle analysemetoder baserer seg på inntak av laktose (laktosebelastning) med påfølgende måling av enten H₂ og CH₄ i utpust, eller blodsukker i kapillært blod. Analyse på den genetiske enkeltbasevariasjonen C/T-13910 blir imidlertid i økende grad innført som erstatningsmetode for belastning. Vi har gjennomført en sammenliknende studie av vår rutinetest (glukosemåling etter inntak av laktose) og gentesten for C/T-13910.

Materiale og metode. 137 voksne personer deltok etter skriftlig samtykke. Glukosemåling etter laktoseinntak ble foretatt og den maksimale differansen til fastende blodsukker ble sammenliknet med sanntids (real-time)-PCR-analyse av C/T-13910.

Resultater. Andelen positive var 20,4 % og 17,5 % for henholdsvis laktosebelastningen og genanalysen. Sammenlikningen mellom de to metodene ga et samsvar på 90 % og en kappastatistikkindeks på 0,67.

Fortolkning. Vår studie viste sviktende samsvar mellom den vanligste laktosemalabsorpsjonstesten (glukosemåling etter laktoseinntak) og gentesten. Våre resultater og tidligere studier av andre, viser imidlertid at gentesten av C/T-13910 kan fungere som et verdifullt supplement til de tradisjonelle fenotypiske laboratoriemålingene.

Oppgitte interessekonflikter: Ingen

> Se også side 3056

Nils Reinton
Marie Buchmann
Amir Moghaddam
amoghaddam@furst.no
 Først Medisinsk Laboratorium
 Søren Bulls vei 25
 1051 Oslo

Melk inneholder verdifulle næringsstoffer og har vært en integrert del av dietten i Nord-Europa helt siden husdyrhold tok til for 7 000–10 000 år siden (1). Melk inneholder disakkaridet laktose som brytes ned i kroppen av enzymet laktaseflorizinhydrolase (laktase). Laktase kodes for av genet laktaseflorizinhydrolase (LPH). Genet og proteinet er aktivt frem til 8–12 års alder hvorpå laktosemalabsorpsjon kan inntreffe dersom aktiviteten avtar (1). Et sterkt positivt seleksjonspress for livslang laktosetoleranse, det vil si evnen til å bryte ned laktose ved hjelp av et kontinuerlig aktivt laktaseprotein, har funnet sted i landbruksbaserte populasjoner i Nord-Europa (2) og bonde/gjeterstammer i Afrika (3). Rundt 90–95 % av den voksne befolkningen i Finland, Danmark, Sverige og Norge er således laktosetolerante. Andelen av voksne individer som ikke kan bryte ned laktose (laktasemangel/laktosemalabsorpsjon) følger en nedadgående gradient fra nord i Europa til Sør-Europa til Asia og videre til størsteparten av Afrika (4–6). I denne delen av verden er derfor forbruket av melk tilsvarende mindre. Personer med lav eller ingen laktaseaktivitet, kan få et spenn av symptomer ved inntak av større mengder (mer enn 1–2 melkeglasskvivalenter) laktose. Vanligvis er symptomene umerkelige til lite plagsomme (romling, følelse av oppblåsthet og liknende), mens enkelte individer kan oppleve til dels sterk flatulens, kraftige magesmerter eller diaré. Symptomene kan opptre en stund (15 min til 6 t) etter inntak av melk, slik at laktosemalabsorpsjon ikke mistenkes som årsak. I tillegg har man indikasjoner på at genetisk laktasemangel kan opptre med en tolerant fenotype pga. bakteriell nedbrytning av laktose i tarmen (7), og sekundær laktosemalabsorpsjon uavhengig av laktaseaktivitet, kan inntreffe som følge av andre sykdomstilstander (for eksempel cøliaki). Siden melk og andre laktoseholdige matvarer er svært vanlige i Europa, er korrekt diagnose av laktosemalabsorpsjon av stor helse-/ernæringsmessig verdi for stadig flere ettersom vår nordeuropeiske populasjon har en voksende andel av

mennesker fra deler av verden hvor melkeintoleranse er vanlig.

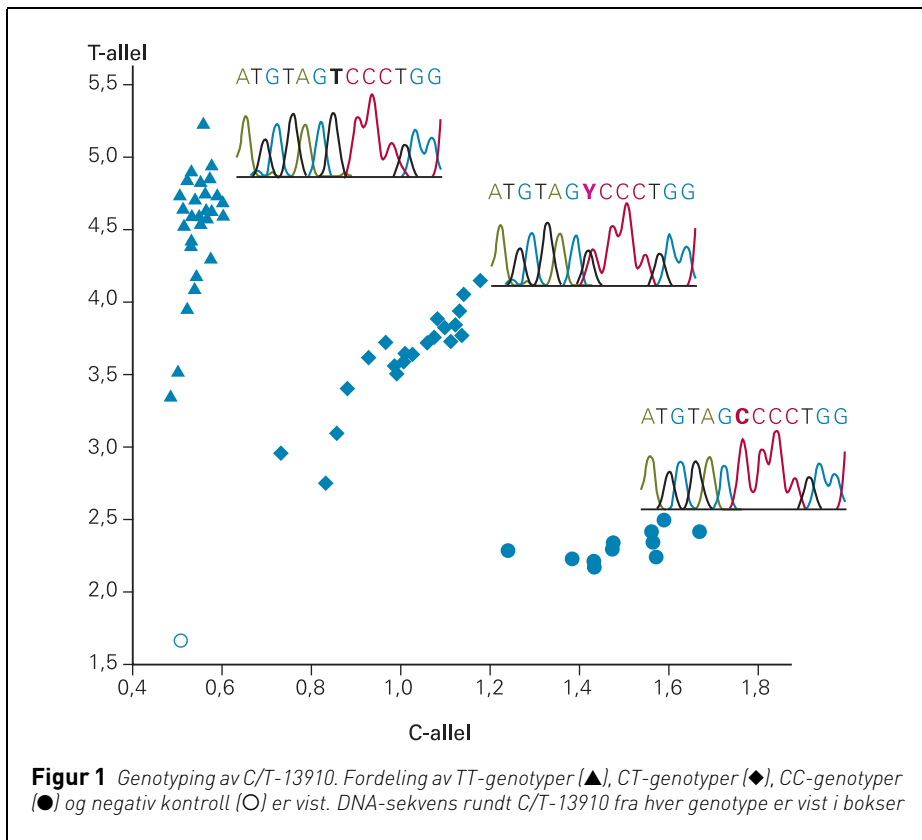
Laktasemangel hos voksne er en recessivt autosomal genetisk egenskap (8). I 2002 ble en enkeltbasevariasjon eller enkeltnukleotidpolymorfisme (single nucleotide polymorphism; SNP), fra C til T, identifisert 13 910 basepar (bp) oppstrøms for 5'enden av LPH-genet. Denne enkeltbasevariasjonen er assosiert med laktasemangel i europeiske populasjoner. Den homozygote C/C-13910 genotypen er 100 % assosiert med lav eller ingen laktaseaktivitet i tarmen, mens den heterozygote C/T-13910 genotypen og den homozygote T/T-13910 genotypen, er assosiert med normal laktaseaktivitet. Fravær av laktaseaktivitet er antakeligvis forårsaket av at CC-genotypen fører til nedsatt transkripsjon av mRNA fra LPH-genet (8–10). Tradisjonelle analysemetoder baserer seg på inntak av laktose med påfølgende måling av enten H₂ og CH₄ i utpust (pusteprobe) eller måling av enten galaktose- eller glukosekonsentrasjonen i kapillært blod (11). Sammenlikninger med referansemetoden (påvisning av laktaseaktivitet i tarmbiopsier) har vist at måling av H₂ er den mest pålitelige metoden (12). Den mest utbredte analysemetoden er imidlertid måling av blodsukkernivå. Som erstatning for laktosebelastning er analyse på C/T-13910 innført som rutinemetode ved flere laboratorier både i Norge og i resten av Europa. Vi har gjennomført en sammenliknende studie av vår rutinetest (glukosemåling etter inntak av laktose) og gentesten for C/T-13910.

Materiale og metode

137 voksne personer var henvist til laboratoriet for laktosebelastningstest. Ikke-myndige personer ble ekskludert, andre eksklusjonskriterier ble ikke definert. Alle informanter ga skriftlig samtykke og fylte ut et spørreskjema om symptomer under belastningen. Studien har tilrådning fra regional komité for medisinsk forskningsetikk.

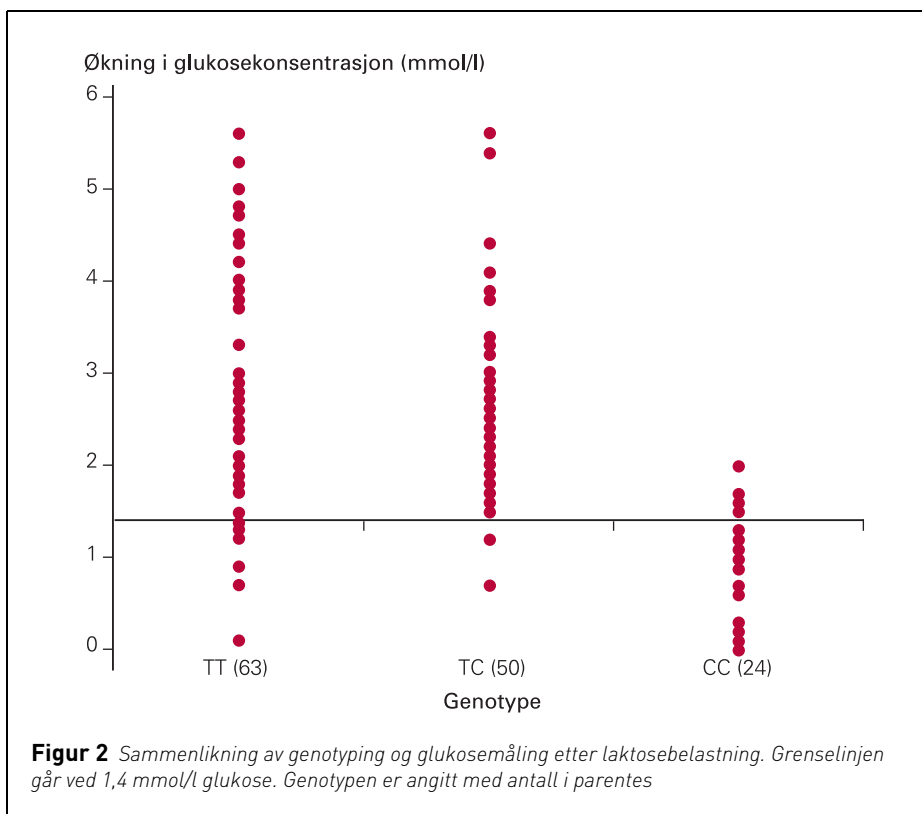
Hovedbudskap

- Ved mistanke om laktasemangel utføres rutinemessig måling av glukosekonsentrasjon i blod etter inntak av laktose
- En PCR-basert gentest kan være et verdifullt supplement til tradisjonelle metoder



Forut for laktosebelastning ble det målt fastende blodsukkernivå. Pasienten fikk så 50 g laktose i 400 ml vann. Det ble tatt blodprøver etter 1/2, 1, 1 1/2 og 2 timer som ble analysert med henblikk på glukose (Hemocue AB Ängelholm, Sverige). Differansen til fastende blodsukker regnes ut for hvert prøvetidspunkt.

Den maksimale differansen var endelig analyseresultat. Referanseverdi var satt til 1,4 mmol/log tolkingen var at det var holdepunkter for å anta laktasemangel/laktosemalabsorpsjon dersom analyseresultatet var ≤ 1,1 mmol/l. Analyseresultater i området 1,2–1,3 mmol/l ble regnet som usikre (gråsoner).



Genetisk analyse

En blodprøve ble samlet inn fra hver deltaker for genetisk analyse. Analyse av C/T-13910 (dbSNP rs4988235) ble utført med sanntids-PCR på Applied Biosystems (Foster City, California, USA) 7900 PCR-instrument. Genotypingassay ble gjort med fremoverprimer (forward primer): 5'-CTACAATGTACTAGTAGGCCTCTGC-3', bakoverprimer (reverse primer): 5'-AAATGCAACCTAAGGAGGAGAGTTC-3' og taqmanprober: VIC-ATAAGATAATGTAGCCCCTGGC-NFQ (C-allel) og FAM-ATAAGATAATGTAGTCCCTGGC-NFQ (T-allel). Data ble analysert med instrumentets programvare: SDS2.2. Validering av SNP-analysen ble utført ved å sekvensere PCR-produkter fra 24 personer. PCR-amplifisering for sekvensering ble utført på genomisk DNA med primerne: 5'-GGATGCACTGCTGTGATGAG-3' (fremover) og 5'-CCCCTGACCTATCCTCGTG-3' (bakover). PCR-produkter ble renset med Qiagen PCR-purification Kit (Qiagen B.V., Venlo, Nederland), presipitert med alkohol og sekvensert av ekstern kommersiell sekvenseringstjeneste (MWG-biotech AG, Ebersberg, Tyskland) med sekvenseringsprimer: 5'-TGCAGGGCTCAAAGAACAATCTA-3'.

Resultater

Validering av genotyping-assay

Bruk av to Minor Groove Binding (MGB) prober i taqmangenotyping brukes til spesifikt å indentifisere individuelle enkeltbasevariasjoner (13, 14). For å validere primere og prober genotypet vi DNA renset fra 24 anonymiserte blodprøver. Resultatet var 7 CT-genotyper, 1 CC-genotype og 16 TT-genotyper. Et 449 basepar langt fragment, inneholdende begge primersekvenser, ble amplifisert fra disse 24 prøvene med genomisk DNA og deretter sekvensert med en intern (nested) sekvenseringsprimer. 21 av disse prøvene ga lesbare DNA-sekvenser, og alle disse bekreftet riktigheten av SNP-genotypingen av C/T-13910. Som konsekvens ble SNP-genotypingsmetoden ansett som validert og godkjent. Eksempelsekvens rundt C/T-13910 fra hver genotype er vist i figur 1 (i bokser).

Informanter

Pasientmaterialet besto av 98 kvinner og 39 menn med en gjennomsnittsalder på 35,3 år (19–82 år), som var henvist til laboratoriet for laktosebelastningstest. Hos de informantene hvor det ikke var samsvar mellom de to analysene, ble følgende utført: Spørreskjema ble analysert for egenrapportering av kraftige symptomer og en gjennomgang av tidligere analyseresultater ble foretatt der dette var tilgjengelig på vårt laboratorium. Ingen av disse pasientene rapporterte kraftig kvalme/oppkast eller diaré og cøliaki eller melkeallergi som årsaker til sekundær laktoseintoleranse ble ikke funnet hos noen av dem.

Sammenlikning mellom analyse på C/T-13910 og laktosebelastning

Studien inkluderte til sammen 137 personer. Resultatet av genotypingen ses i figur 1. Figur 2 og tabell 1 viser resultatene fra sammenlikning av genotyping og laktosebelastning. Sammenlikning av positive og negative svar fra de to metodene ga manglende samsvar for så mange som 14 pasienter (9,2%). Til sammen ni prøver var positive på belastningen med negativ genotype (homozygote TT eller heterozygote TC) og ses under grenselinjen i de to venstre kolonnene i figur 2. Til sammen fem prøver hadde positiv genotype (homozygot CC), men var negative med henblikk på laktosebelastning, og ses over grenselinjen i høyre kolonne i figur 2. Samsvarsanalyse ga en kappa-statistikkindeks på 0,67 (0,51–0,83 gitt 95% konfidensintervall). Samlet samsvar var på 0,9 (standardavvik 0,08).

Diskusjon

Vi analyserte samsvar mellom C/T-13910 polymorfismen og laktosetoleranse bestemt ved laktosebelastning, blant voksne pasienter i vårt laboratorium. De to metodene ga avvikende analysesvar for en del av pasientene, særlig i de tilfellene der pasienten hadde en TT- eller CT-genotype og samtidig ble diagnostisert med laktasemangel ved laktosebelastning.

Genotypen samsvarte ikke med belastningen for 14 av de 137 pasientene. Avvikene kan ikke forklares med sekundær laktoseintoleranse forårsaket av for eksempel cøliaki. Ingen av pasientene som var positive på laktosebelastning og negative på gentesten hadde påvist cøliaki, eller melkeallergi, selv om åtte av ni også var blitt testet for disse tilstandene ved vårt laboratorium. Av disse ni pasientene var det heller ingen som rapporterte om alvorlige symptomer som kraftig kvalme/oppkast eller diaré. Slike symptomer kunne man anta at pasienter med laktosemalabsorpsjon ville oppleve ved inntak av laktosemengder tilsvarende så mye som en liter melk. Studier fra andre laboratorier indikerer at gentesten ikke nødvendigvis fanger opp alle de som tolererer melk, da melketolerante populasjoner er beskrevet som negative på C/T-13910 (15). Nylig ble også alternative enkeltbasevariasjoner som gir melketoleranse publisert (16), og disse nye enkeltbasevariasjonene ikke blitt undersøkt i dette studiet. Av disse ni pasientene som var positive på laktosebelastningen og negative på gentesten, var det imidlertid ingen med utenlandske navn. Og i den grad navn kan benyttes som mål på etnisitet, virker det som om annen genetisk bakgrunn ikke kan være årsak til falskt negative SNP-analyser i vår studie. Fem personer hadde positiv gentest, men negativt belastningsresultat. Det kan spekuleres i om annen genetisk bakgrunn kan være årsak til falskt negative laktosebelastninger i vår studie, da to av disse fem hadde utenlandske navn. Det er viktig å leg-

ge merke til at gentesten nødvendigvis vil være positiv for en andel asymptomatiske personer, av enhver etnisitet, dersom disse testes. I forbindelse med en asymptomatisk persons reaksjon på analysesvaret, kan en positiv gentest sammenliknes med tradisjonelle falskt positive analysesvar, da positive analysesvar kan resultere i (ubegrunnede) endringer i eget og familiens kosthold. Asymptomatiske pasienter skal derfor testes på godkjent genetisk laboratorieavdeling og få genetisk veiledning. Korrelasjonen mellom analyse på C/T-13910 polymorfismen og tradisjonelle belastningsmetoder er blitt studert også av andre. Det er generelt godt samsvar mellom CT- eller TT-genotypen og glukosemåling etter belastningsassayet, mens resultatet for CC-genotypen og laktosemalabsorpsjon har gitt noe mer variert resultat i noen studier (17, 18) og i vår studie. Samsvar med CC-genotype og laktosemalabsorpsjon er imidlertid bedre når man sammenlikner med måling av H₂ i utpust (10, 19). Her var også samsvaret godt med CT- og TT-genotypen og laktosetoleranse (10, 19). I en britisk studie hvor tre forskjellige målemetoder etter laktosebelastning ble sammenliknet med genotyping, var korrelasjonen fullstendig for personer av nordeuropeisk etnisitet (20). I to andre studier av befolkningen i Sardinia og en populasjon i Østerrike, ble genotypiske variasjoner sammenliknet med H₂ pusteprobe og glukosemåling. Her var det nærmest fullstendig samsvar med *en kombinasjon* av de indirekte målingene og genotypingen (21, 22). Spesifisiteten og sensitiviteten for glukosemåling alene, er tidligere blitt estimert til 77–96%. I et studie av Krasilnikoff (23), ble det konkludert med at diagnosen laktoseintoleranse var feil for 30% av barna som ble testet med glukosemåling. Ventrikkretensjon er blitt lansert som årsaken til såpass mange falskt positive svar (24). Også opptil 24% falskt negative svar er blitt rapportert for glukosemålingsmetoden (12). Som glukosemåling er også måling av H₂ i utpust en indirekte målemetode der nedbrytning av laktose gjennom tarmens bakterieflora gir grunnlag for H₂ målingene. Den eneste direkte målemetoden som finnes for laktasemangel, er påvisning av laktaseenzymaktivitet i tarmbiopsier. Denne metoden er generelt akseptert som gullstandarden, men ofte er det ikke praktisk mulig (eller ønskelig) å innhente slike pasientprøver. Sammenlikningsstudier som har vist utmerket samsvar mellom gentesten og laktaseaktivitet i biopsier er blitt publisert (25). Disse studiene er blitt gjennomført i finske og afrikanske populasjoner (25) og indikerer at gentesten kan fungere som fullgod erstatning for de tradisjonelle metodene i vår del av verden. Dette inntrykket forsterkes av *kombinasjoner* av fenotypiske tester også gir utmerket samsvar med genotyping. Gentesten på C/T-13910 er enkel å utføre i de laboratorier der det finnes utstyr for genetisk analyse, og analysen krever

Tabell 1 Fordeling av genotyper og differanse i glukosekonsentrasjon (mmol/l) etter inntak av laktose

	Glukose < 1,4	Glukose > 1,4
CC-genotype	19	5
TC/TT-genotype	9	104

bare en biologisk prøve som inneholder celler med cellekjerne. Analysen er også mer pasientvennlig enn laktosebelastning da inntak av store mengder laktose unngås. Den er heller ikke påvirket av andre sykdomstilstander som cøliaki eller biologiske variasjoner som ventrikkretensjon. Likevel, siden både tolerante populasjoner uten tilsvarende C/T-13910 genotype, og alternative enkeltbasevariasjoner er beskrevet, er det grunn til å tro at genotypingens største verdi, i første omgang, vil være i kombinasjon med tradisjonelle belastningstester eller enzymmålinger. Diagnostikken for de pasienter som havner i gråsonen ved genotyping, kan bedres gjennom analyse på C/T-13910. I tillegg kan pasienter med fenotypisk intoleranse og CT- eller TT-genotype vurderes for analyse med henblikk på cøliaki, eller andre sekundære årsaker til laktoseintoleransen. Likeledes kan pasienter som har milde til neglisjerbare symptomer (fenotypisk intoleranse), men CC-genotype oppmuntres til økt årvåkenhet i forhold til fremtidig forverring av mage- og tarmsymptomene og eventuelt påfølgende kostholdstilpasning.

Litteratur

1. Beja-N Pereira A, Luikart G, England PR et al. Gene-culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes. *Nat Genet* 2003; 35: 311–3.
2. Bersaglieri T, Sabeti PC, Patterson N et al. Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 1111–20.
3. Check E. Human evolution: how Africa learned to love the cow. *Nature* 2006; 444: 994–6.
4. Gudmand-Hoyer E, Dahlqvist A, Jarnum S. Specific small-intestinal lactase deficiency in adults. *Scand J Gastroenterol* 1969; 4: 377–86.
5. Sahi T, Launiala K, Laitinen H. Hypolactasia in a fixed cohort of young Finnish adults. A follow-up study. *Scand J Gastroenterol* 1983; 18: 865–70.
6. Swallow DM. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu Rev Genet* 2003; 37: 197–219.
7. Campbell AK, Waud JP, Matthews SB. The molecular basis of lactose intolerance. *Sci Prog* 2005; 88: 157–202.
8. Enattah NS, Sahi T, Savilahti E et al. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet* 2002; 30: 233–7.
9. Kuokkanen M, Enattah NS, Oksanen A et al. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *Gut* 2003; 52: 647–52.
10. Buning C, Genschel J, Jurga J et al. Introducing genetic testing for adult-type hypolactasia. *Digestion* 2005; 71: 245–50.
11. Arola H. Diagnosis of hypolactasia and lactose malabsorption. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1994; 202: 26–35.

>>>

12. Newcomer AD, McGill DB, Thomas PJ et al. Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency. *N Engl J Med* 1975; 293: 1232–6.
13. Afonina I, Zivarts M, Kutyavin I et al. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 2657–60.
14. Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 655–61.
15. Mulcare CA, Weale ME, Jones AL et al. The T allele of a single-nucleotide polymorphism 13.9 kb upstream of the lactase gene [LCT] [C-13.9kbT] does not predict or cause the lactase-persistence phenotype in Africans. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 1102–10.
16. Tishkoff SA, Reed FA, Ranciaro A et al. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nat Genet* 2007; 39: 31–40.
17. Nilsson TK, Johansson CA. A novel method for diagnosis of adult hypolactasia by genotyping of the -13910 C/T polymorphism with Pyrosequencing technology. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 287–90.
18. Ridefelt P, Hakansson LD. Lactose intolerance: lactose tolerance test versus genotyping. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 822–6.
19. Hogenauer C, Hammer HF, Mellitzer K et al. Evaluation of a new DNA test compared with the lactose hydrogen breath test for the diagnosis of lactase non-persistence. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 371–6.
20. Poulter M, Hollox E, Harvey CB et al. The causal element for the lactase persistence/non-persistence polymorphism is located in a 1 Mb region of linkage disequilibrium in Europeans. *Ann Hum Genet* 2003; 67: 298–311.
21. Schirru E, Corona V, Usai-Satta P et al. Genetic testing improves the diagnosis of adult type hypolactasia in the Mediterranean population of Sardinia. *Eur J Clin Nutr* 2007. Publisert først på nett 21.2.2007.
22. Obermayer-Pietsch BM, Gugatschka M, Reitter S et al. Adult-type hypolactasia and calcium availability: decreased calcium intake or impaired calcium absorption? *Osteoporos Int* 2007; 18: 445–51.
23. Krasilnikoff PA, Gudman-Hoyer E, Moltke HH. Diagnostic value of disaccharide tolerance tests in children. *Acta Paediatr Scand* 1975; 64: 693–8.
24. Newcomer AD, McGill DB. Distribution of disaccharidase activity in the small bowel of normal and lactase-deficient subjects. *Gastroenterology* 1966; 51: 481–8.
25. Rasinpera H, Savilahti E, Enattah NS et al. A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut* 2004; 53: 1571–6.

Manuskriptet ble mottatt 28.3. 2007 og godkjent 22.7. 2007. Medisinsk redaktør Åslaug Helland.