

Diagnostiek en genotypering van lactose-intolerantie: kunnen we de waterstofademtest afschaffen?



***Dr. H.J. VERMEER^{1,2}, Dr. K. STOUTEN^{1,2}, M. van de
WERKEN², Dr. F.M. VERHEIJEN^{1,2}, Dr. R.CASTEL^{1,2}***

¹Albert Schweitzer Hospital, Dordrecht, The Netherlands,

²Result Laboratory, Dordrecht, The Netherlands

Patiënt 1

Vrouw, 20 jaar, coeliakie. Vader geen coeliakie, wel lactose-intolerant

Dieet advies:

- meer groente en fruit
- meer brood (glutenvrij) of broodvervanger
- meer zuivel

Blijft buikklachten houden...

Twijfel aan naleving glutenvrij dieet? Lactose-intolerant? Iets anders?

Patiënt 2

Jonge vrouw volgt een gluten- en lactose-vrij dieet, heeft buikklachten en dingen gelezen op internet

'Do you know what gluten is'? Jimmy Kimmel asks four dieters why they have gone 'gluten-free'... and they can't explain it

- Talkshow host Jimmy Kimmel asked series of dieters what gluten is
- None of them had an answer, yet they still say they are intolerant
- He says in LA eating gluten is considered worse than Satanism

By LEON WATSON

PUBLISHED: 14:34 GMT, 9 May 2014 | UPDATED: 18:23 GMT, 9 May 2014

'I miss butter!' Jennifer Lopez follows in Beyonce's footsteps as she cuts out dairy and meat for new vegan diet

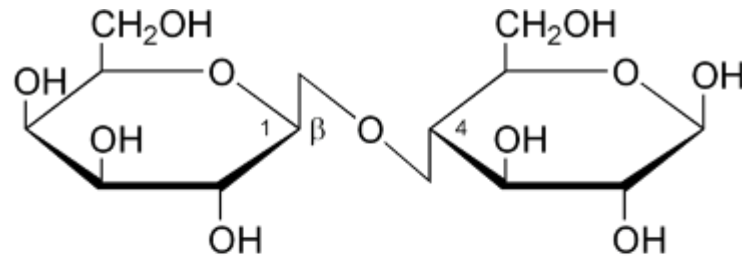
By DAILY MAIL REPORTER

PUBLISHED: 18:29 GMT, 13 May 2014 | UPDATED: 21:03 GMT, 13 May 2014

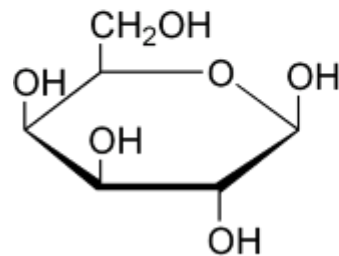
Diagnostiek om deze zelfdiagnose uit te sluiten of bevestigen?

Lactose (melksuiker) is een suiker dat in de meeste zuivelproducten zit (royaal in melk, roomijs en yoghurt).

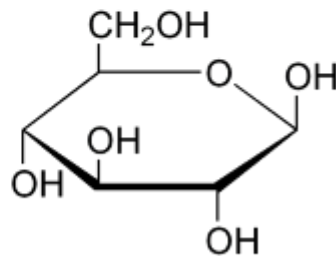
Disacharide *Galactosyl- β (1-4)-glucopyranoside*



Lactose



D-galactose



D-glucose

Niet-allergische overgevoeligheid voor lactose

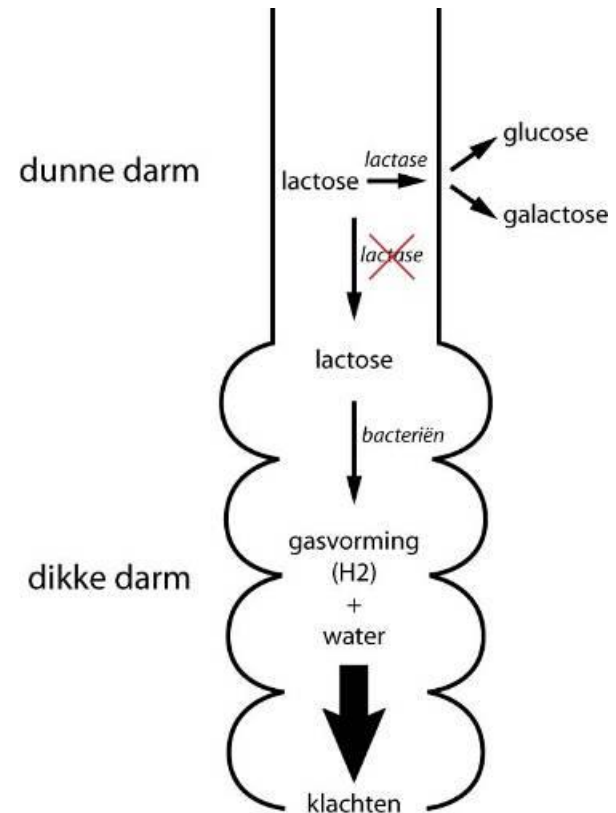
Typische klachten:

flatulentie

buikkramp

diarree

misselijkheid



Oorzaak: deficiëntie lactase-enzym

Verskil malabsorptie versus lactose-intolerantie

Meestal *primaire* lactose intolerantie:

Tot het 5^{de} levensjaar hebben de meeste mensen voldoende lactase activiteit, daarna neemt de lactase activiteit af met de leeftijd...of niet...

Chinese en Japanse afkomst: verliest 80-90% lactase activiteit binnen 5 jaar.

Noord-Europese afkomst: bereikt laagste lactase activiteit pas na 18-20 jaar.

Secundaire lactose intolerantie

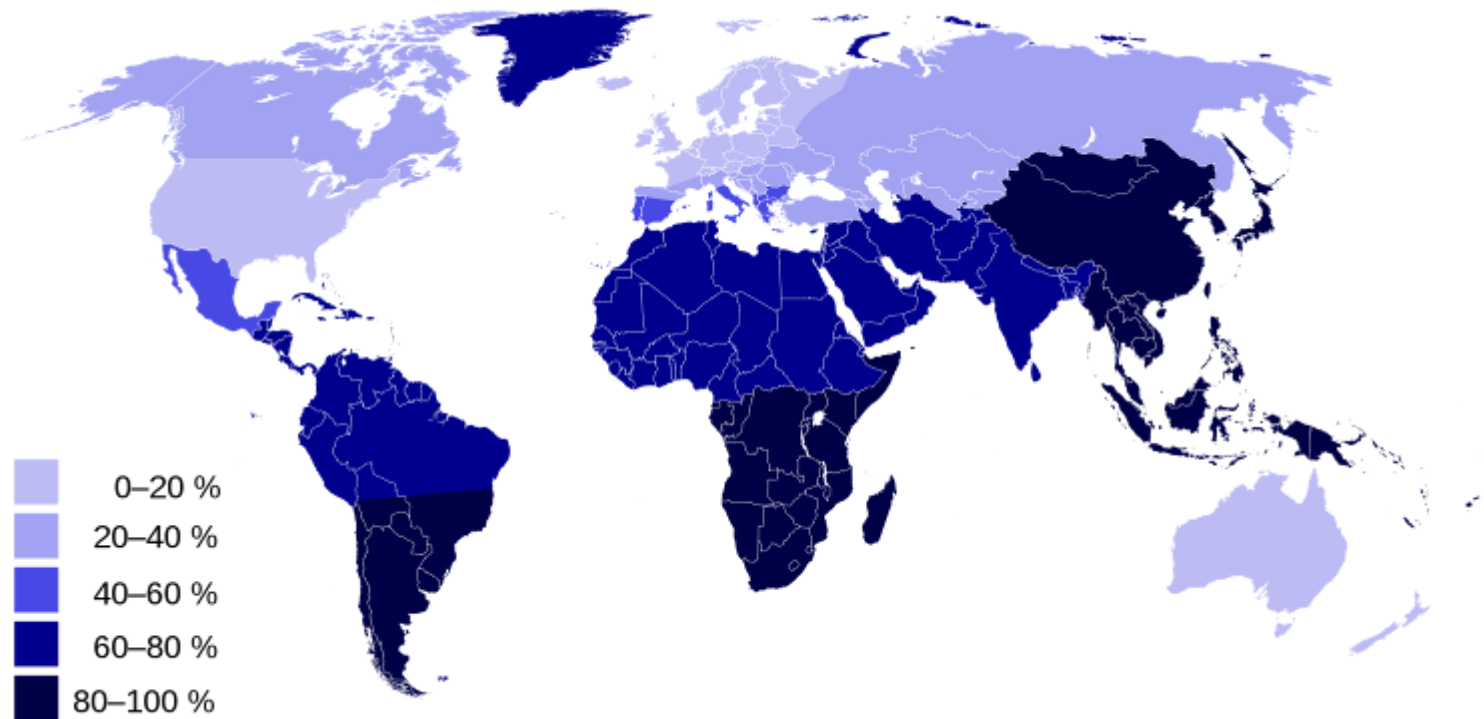
- Beschadiging van de dunne darm (parasieten, ziekte van Crohn, coeliakie, gastroenteritis, na bestraling).

Aangeboren lactose intolerantie

- Uiterst zeldzaam: ~40 case reports.

Primary lactose intolerance is 'normal'

~70% of the world population suffers from LTT



DAIRY DIASPORA

Dairying practices spread from the Middle East to Europe as part of the Neolithic transition from hunting and gathering to agriculture.



Piece of a roughly 7,000-year-old sieve used to make cheese.

6,500 YEARS AGO

Well-developed dairy economy established in central Europe.

7,500 YEARS AGO

Lactase persistence, the ability to drink milk in adulthood, emerges in central Europe.

8,000 YEARS AGO

Neolithic reaches the Balkans.

8,400 YEARS AGO

Neolithic spreads to Greece.

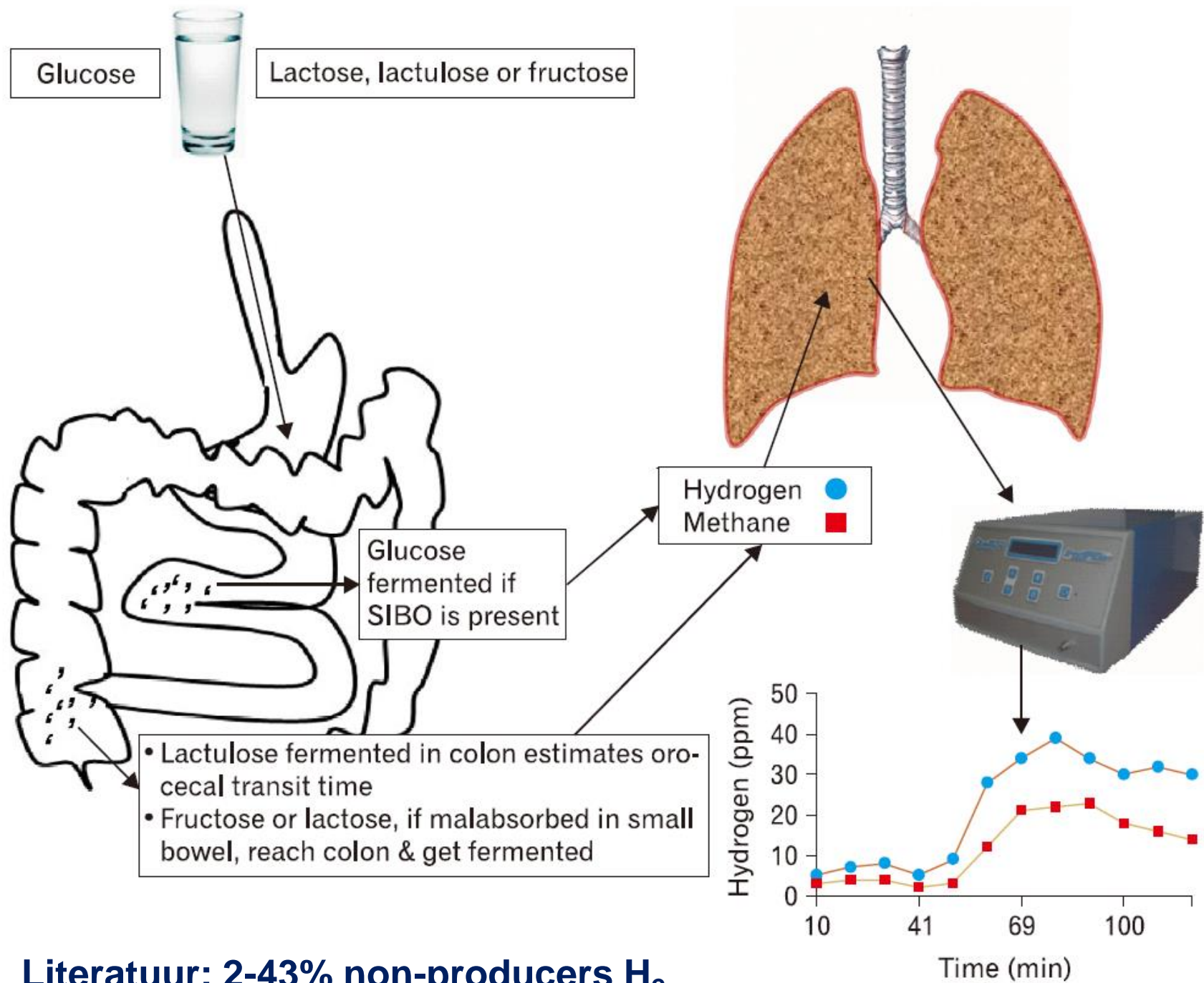
11,000–10,000 YEARS AGO

Neolithic culture develops in the Middle East. This is the start of agriculture and possibly the domestication of dairy animals.

Diagnostiek

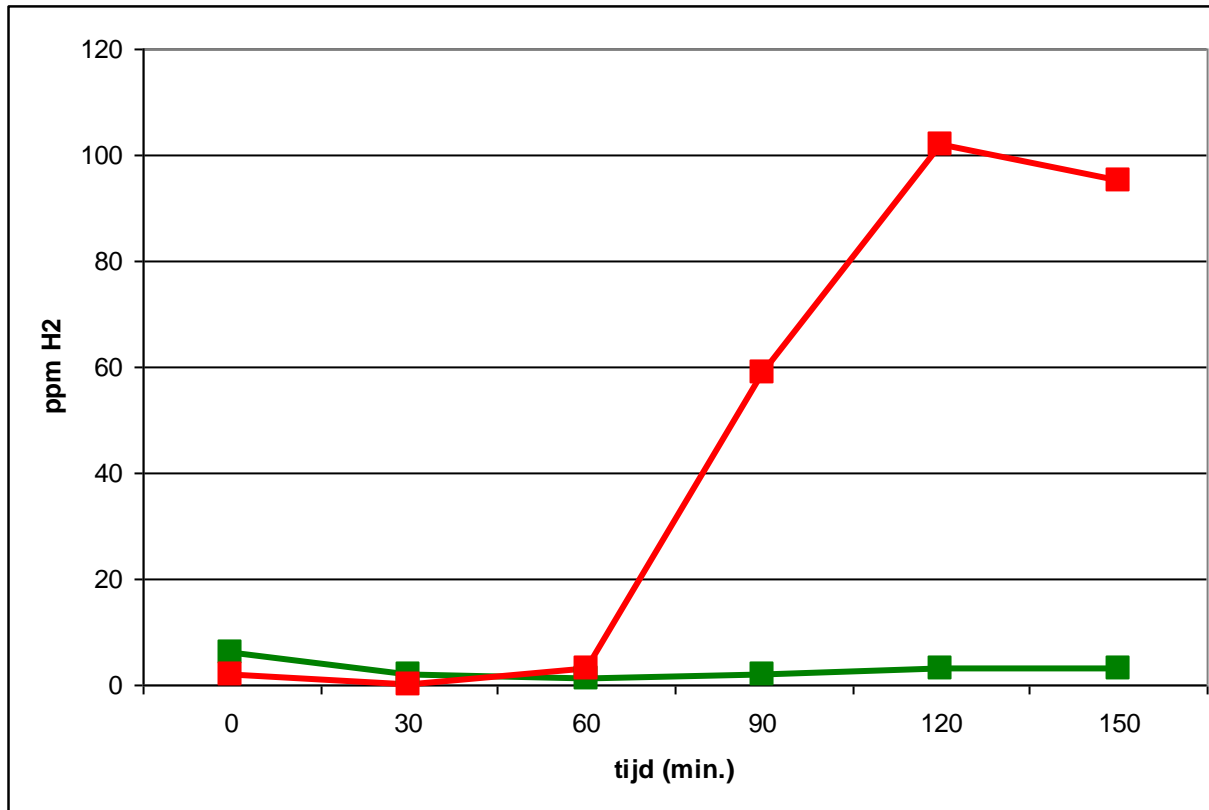
- Klachtenpatroon...
- Mucosabiopt jejunum, duodenum (gouden standaard)
- Lactose tolerantie test (LTT)
 - Testprincipe: stijging plasmaglucose na challenge met 50 g lactose
 - < 1,1 mmol/l binnen 3 uur
- Challenge met ^{13}C -lactose en ^2H -glucose: ratio
- Waterstofademtest
 - Testprincipe: stijging H_2 in ademlucht na challenge met 25 of 50 g lactose
 - > 20 ppm binnen 3 uur





Literatuur: 2-43% non-producers H₂

- Gouden standaard ontbreekt. De H₂-ademtest is de 'beste test'.
- H₂-ademtest
 - Patiënt drinkt lactose oplossing (50 gram lactose komt overeen met circa 1 liter melk)
 - Metingen van waterstofgas in uitgeademde lucht op tijdstip 0, 30, 60, 90, 120 en 150 minuten.
- H₂ stijging van 20 ppm boven laagst gemeten waarde: positieve ademtest.
- Klachten registreren (misselijkheid/flatulentie/buikkramp/diarree).



Groen: geen klachten, normale LTT

Rood: misselijk en diarree, passend bij lactose-intolerantie

Belastend voor de patiënt

- Patiënt kan klinische klachten krijgen
- Test duurt lang

Analytische beperkingen

- Geen onderscheid mogelijk tussen primaire en secundaire lactose intolerantie
- Voorspelt niet de mate van lactose intolerantie
- Vals-negatief bij antibiotica-gebruik < 1 maand, zure pH colon, etc
- 10-20% van de bevolking is een 'waterstof non-producer'.
Met de H₂-ademtest worden dus lactose intoleranties gemist



Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia

Nabil Sabri Enattah¹, Timo Sahi², Erkki Savilahti³, Joseph D. Terwilliger⁴, Leena Peltonen^{1,5*} & Irma Järvelä^{1,6}

Nat. Genet., 2002 Feb;30(2):233-7. Epub 2002 Jan 14.

Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia.

[Enattah NS¹](#), [Sahi T](#), [Savilahti E](#), [Terwilliger JD](#), [Peltonen L](#), [Järvelä I](#).

⊕ Author information

Abstract

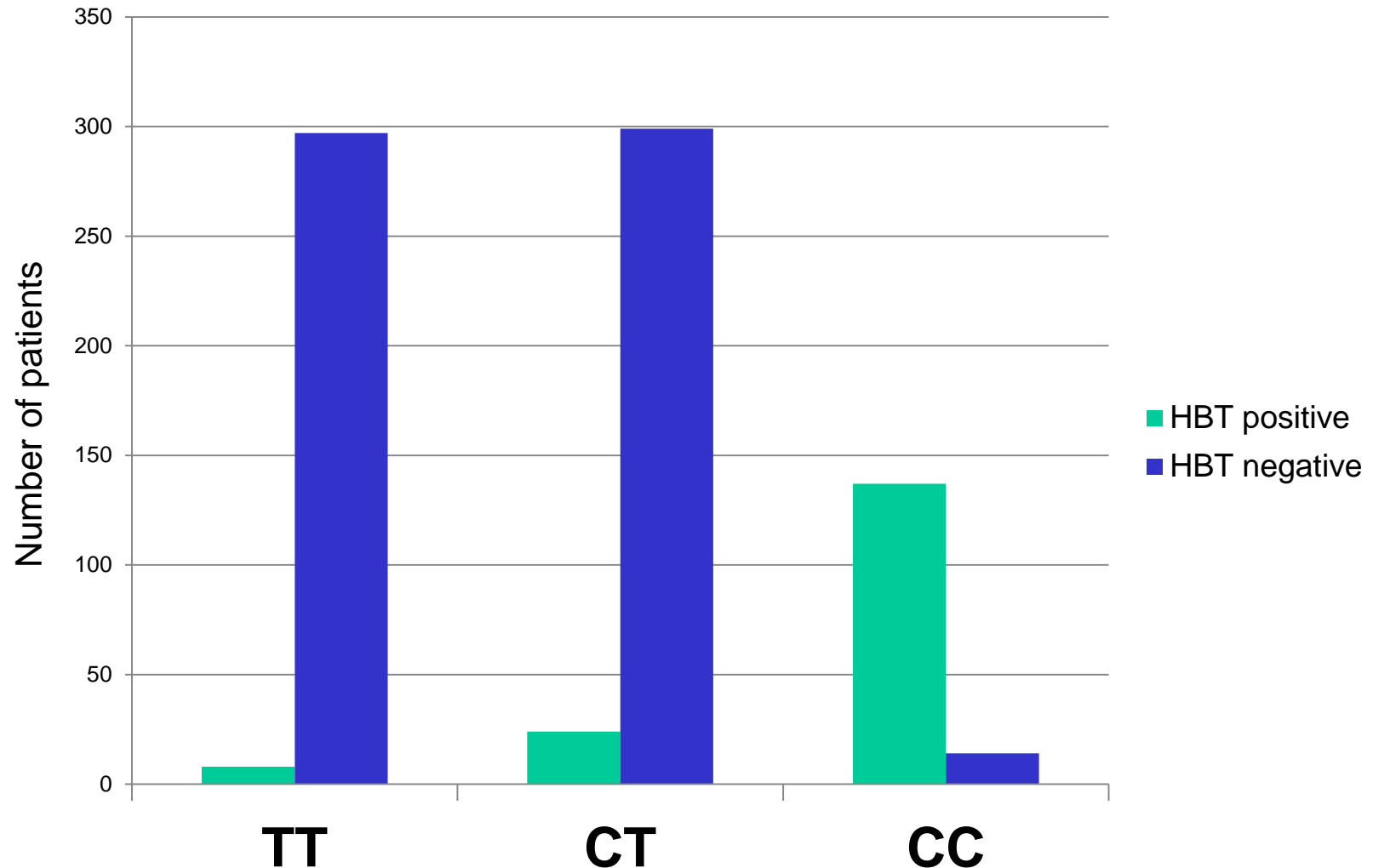
Adult-type hypolactasia, also known as lactase non-persistence (lactose intolerance), is a common autosomal recessive condition resulting from the physiological decline in activity of the lactase-phlorizin hydrolase (LPH) in intestinal cells after weaning. LPH hydrolyzes lactose into glucose and galactose. Sequence analyses of the coding and promoter regions of LCT, the gene encoding LPH, has revealed no DNA variations correlating with lactase non-persistence. An associated haplotype spanning LCT, as well as a distinct difference in the transcript levels of 'non-persistence' and 'persistence' alleles in heterozygotes, suggest that a cis-acting element contributes to the lactase non-persistence phenotype. Using linkage disequilibrium (LD) and haplotype analysis of nine extended Finnish families, we restricted the locus to a 47-kb interval on 2q21. Sequence analysis of the complete region and subsequent association analyses revealed that a DNA variant, C/T-13910, roughly 14 kb upstream from the LCT locus, completely associates with biochemically verified lactase non-persistence in Finnish families and a sample set of 236 individuals from four different populations. A second variant, G/A-22018, 8 kb telomeric to C/T-13910, is also associated with the trait in 229 of 236 cases. Prevalence of the C/T-13910 variant in 1,047 DNA samples is consistent with the reported prevalence of adult-type hypolactasia in four different populations. That the variant (C/T-13910) occurs in distantly related populations indicates that it is very old.

LCT -13910 C>T en LCT -22018 G>A
LCT-gen op chromosoom 2
Intron 13 van MCM6 gen

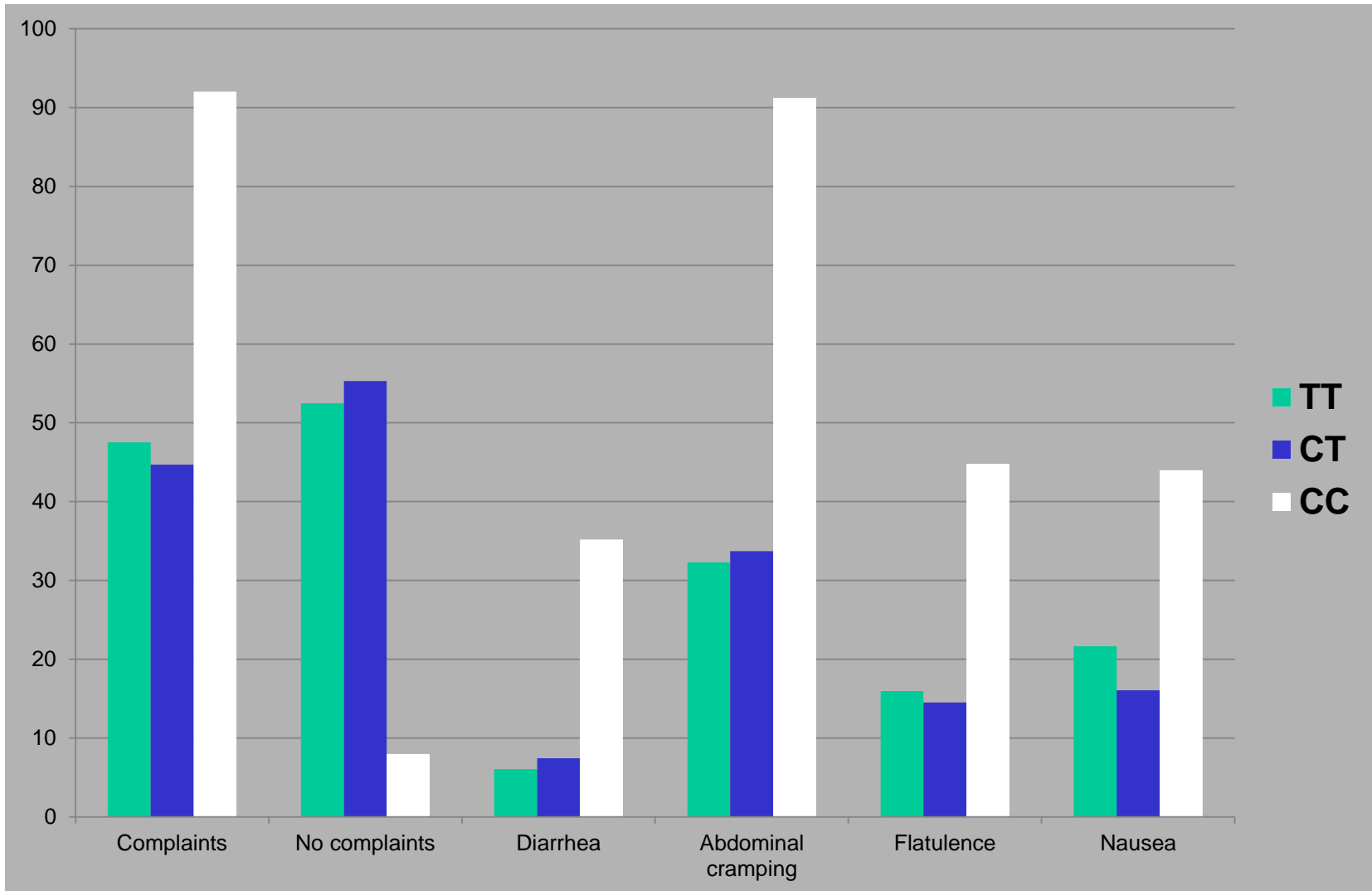
- DNA-polymorphisms near lactase gene:
 - Homozygote TT → **No** primary lactose intolerance
 - Heterozygote CT → **No** primary lactose intolerance
 - Homozygote CC → Primary lactose intolerance



HBT versus genotyping (N ~ 800)



HBT: self-reported complaints

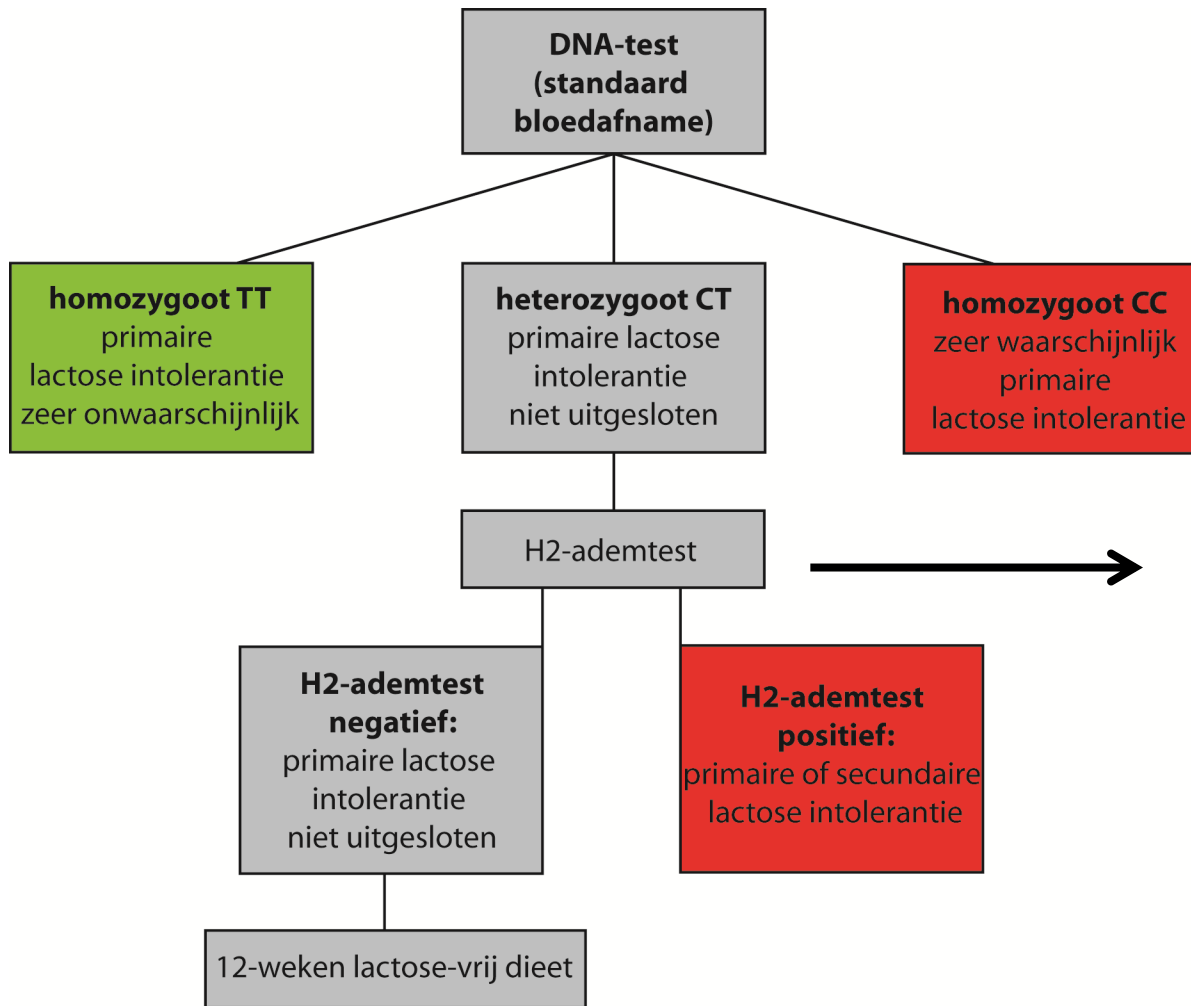


Voordelen:

- Een standaard bloedafname; ‘routine bloedtest’
- Geen lactose belasting voor patiënten
- Meestal wel onderscheid mogelijk tussen primaire en secundaire lactose intolerantie

Beperkingen:

- Voorspelt niet de mate van lactose intolerantie (net als de ademtest)
- Kan klachten op zeer jonge leeftijd niet helpen verklaren (<2 jaar, afhankelijk van ethniciteit)



‘Normale’ labuitslagen (heterozygoot CT en niet-afwijkende H2-ademtest) sluiten primaire lactose intolerantie niet 100% uit: overweeg lactose-arm proefdieet of adviseer kleine porties

IgA-weefseltransglutaminase antistoffen (anti-TTG) en totaal IgA.

Negatieve anti-TTG? Dan coeliakie onwaarschijnlijk tenzij:

- Leeftijd <2 jaar
- IgA-deficiëntie
- Gluten-vrij dieet

Bij gluten-vrij dieet is een negatieve uitslag van de coeliakie-specifieke antistoffen niet betrouwbaar (mogelijk fout-negatief).

Alternatief? DNA-test

Bij bijna 100% van de coeliakie patiënten is HLA DQ2 en/of DQ8 aanwezig.

Bij ongeveer 40% van de bevolking is HLA DQ2 en/of DQ8 aanwezig.

Prevalentie van coeliakie is ~1%.

Conclusie:

- *afwezigheid* van HLA DQ2/DQ8 sluit coeliakie vrijwel uit.
- *aanwezigheid* van HLA DQ2/DQ8 niet bruikbaar om coeliakie aan te tonen.

NB: uitslag niet afhankelijk van glutengebruik door de patiënt.

Patiënt 1 (vervolg)

Vrouw, 20 jaar, coeliakie. Vader geen coeliakie, wel lactose-intolerant.

Dieet advies:

- meer groente en fruit
- meer brood (glutenvrij) of broodvervanger
- meer zuivel

Blijft buikklachten houden...

**Twijfel aan naleven glutenvrij dieet? Lactose-intolerant?
Iets anders?**

Patiënt 1 (slot)

Anti-TTG: <10 U/mL

DNA-LTT: homozygoot CC

Nieuw dieetadvies:

Lactose-arm dieet.

Coeliakieforum januari 06, 2014, 08:28:07

Hoi allemaal,

het heeft me bijna twee jaar gekost maar ik weet nu zeker dat ik echt een permanente lactose-intolerantie heb en dat het niet alleen kwam vanwege m'n beschadigde darmen in het begin.

Patiënt 2

Jonge vrouw volgt een gluten- en lactose-vrij dieet, heeft buikklachten en dingen gelezen op internet

'Do you know what gluten is'? Jimmy Kimmel asks four dieters why they have gone 'gluten-free'... and they can't explain it

- Talkshow host Jimmy Kimmel asked series of dieters what gluten is
- None of them had an answer, yet they still say they are intolerant
- He says in LA eating gluten is considered worse than Satanism

By LEON WATSON

PUBLISHED: 14:34 GMT, 9 May 2014 | UPDATED: 18:23 GMT, 9 May 2014

'I miss butter!' Jennifer Lopez follows in Beyonce's footsteps as she cuts out dairy and meat for new vegan diet

By DAILY MAIL REPORTER

PUBLISHED: 18:29 GMT, 13 May 2014 | UPDATED: 21:03 GMT, 13 May 2014

Diagnostiek om deze zelfdiagnose uit te sluiten of bevestigen?

Patiënt 2 (slot)

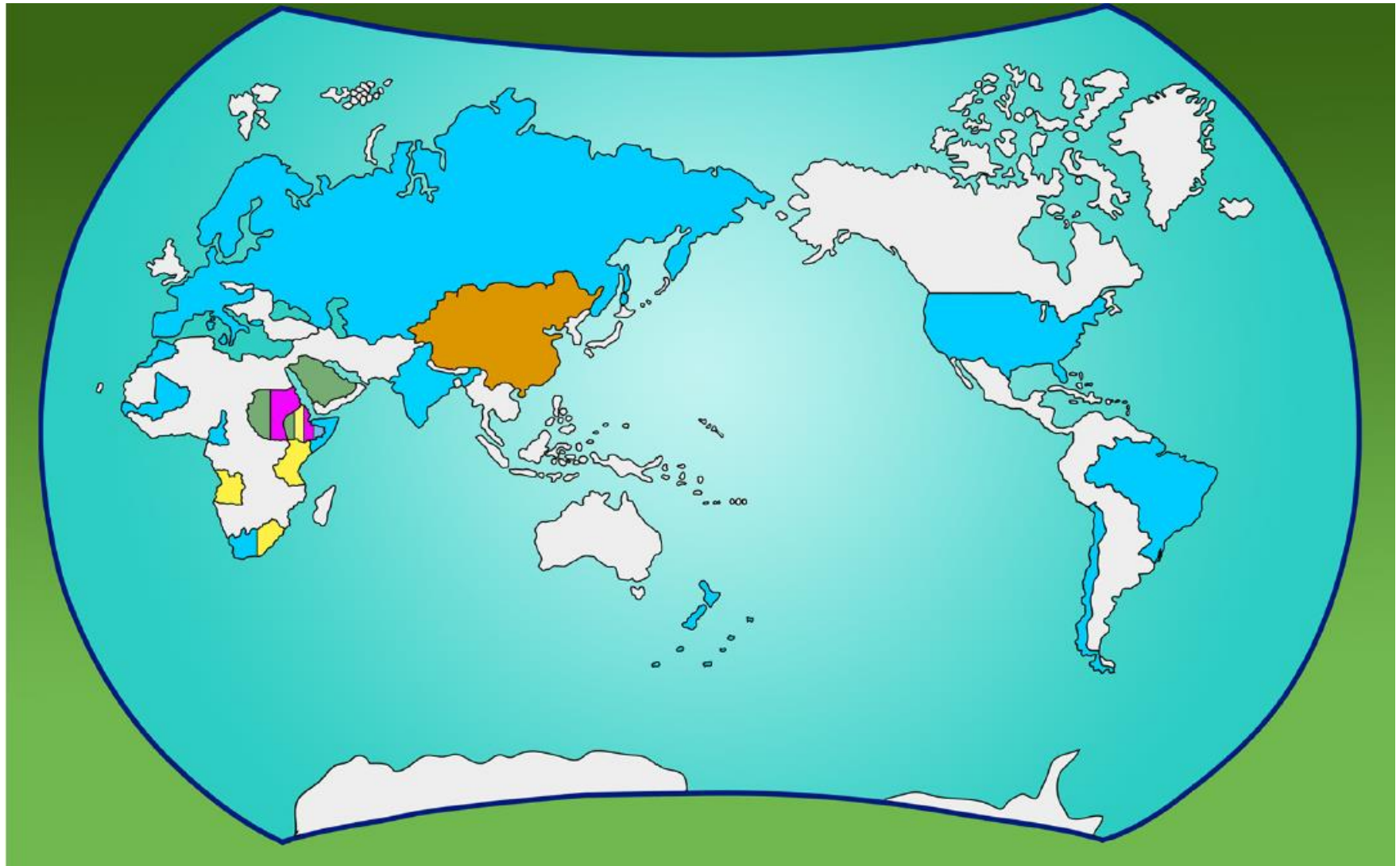
Anti-TTG: <10 U/mL: bij strikt gluten-vrij dieet mogelijk fout-negatief.

HLA DQ2/DQ8: afwezig. Krijgen van coeliakie zeer onwaarschijnlijk.

DNA-LTT: homozygoot TT. Primaire lactose-intolerantie zeer onwaarschijnlijk.

Iets anders?

Lactase persistent alleles



Notes: In places where there was more than one variant, the most frequent variant was considered. ● $LCT-13910C>T$; ● $LCT-22018G>A/-13910CC$; ● $LCT-13915T>G$; ● $LCT-14010G>C$; ● $LCT-13907C>G$.



Table 3 Frequencies of other lactase persistence alleles in the *MCM6* gene

Country or population	Alleles	Frequency (%)
Saudi Arabia	<i>LCT</i> -13915T>G	48.9; 59.4
Jordan		39.1
Sudan (Beni Amir)		24.4
Ethiopia (Afar)		15
Sudan (Jaali)		14.2
Ethiopia (Amharic)		13.2
Ethiopia (Somali camel herders)		5.1
Tanzania	<i>LCT</i> -14010G>C	31.9
Kenya		27.6
Xhosa (South Africa)		12.8
Xhosa (mixed ancestry)		8.1
Angola		<7
Mozambique		No LP allele
Ethiopia (Somali camel herders)		0.5
Sudan (Afro-Asiatic Beja)	<i>LCT</i> -13907C>G	20.6
Ethiopia (Afar)		20
Ethiopia (Somali camel herders)		5.6
Northern Russia	<i>LCT</i> -13914G>A	Rare variant
Austria		Two individuals
China (Kazak)	<i>LCT</i> -22018G>A/	18
China (Northern)	<i>LCT</i> -13910CC	6.8
Japanese Brazilians		5.3
Tanzania (Akie)		One individual
Sudan (Jaali)	<i>LCT</i> -14009T>G	6.6
Ethiopia (Somali camel herders)		1.4

Abbreviation: LP, lactase persistence.

Mattar et al. Clin Exp Gastroenterol 2012;5:113-121

Other lactase persistence alleles are relevant!

LCT-14009T>G
LCT-14010G>C
LCT-14011C>T

LCT-13913T>C
LCT-13914G>A
LCT-13915T>G

taaagagcctt ggtaagcatt tgagtgtagt tgtagacgg agacgatcac gtc agttt
 atagagtga taaagacgt agttaccatt taatacctt cattcaggaa aaagtactt
 agaccctaca atgtactagt aggcctctgc gctggcaata cagataagat aatgtarcc
 cggcctcaa aggaactctc ctcttaggt tgcatttga taatgtttga ttttt gatt

LCT-13907C>G

~1-2%

LCT-13909C>A
LCT-13910C>T

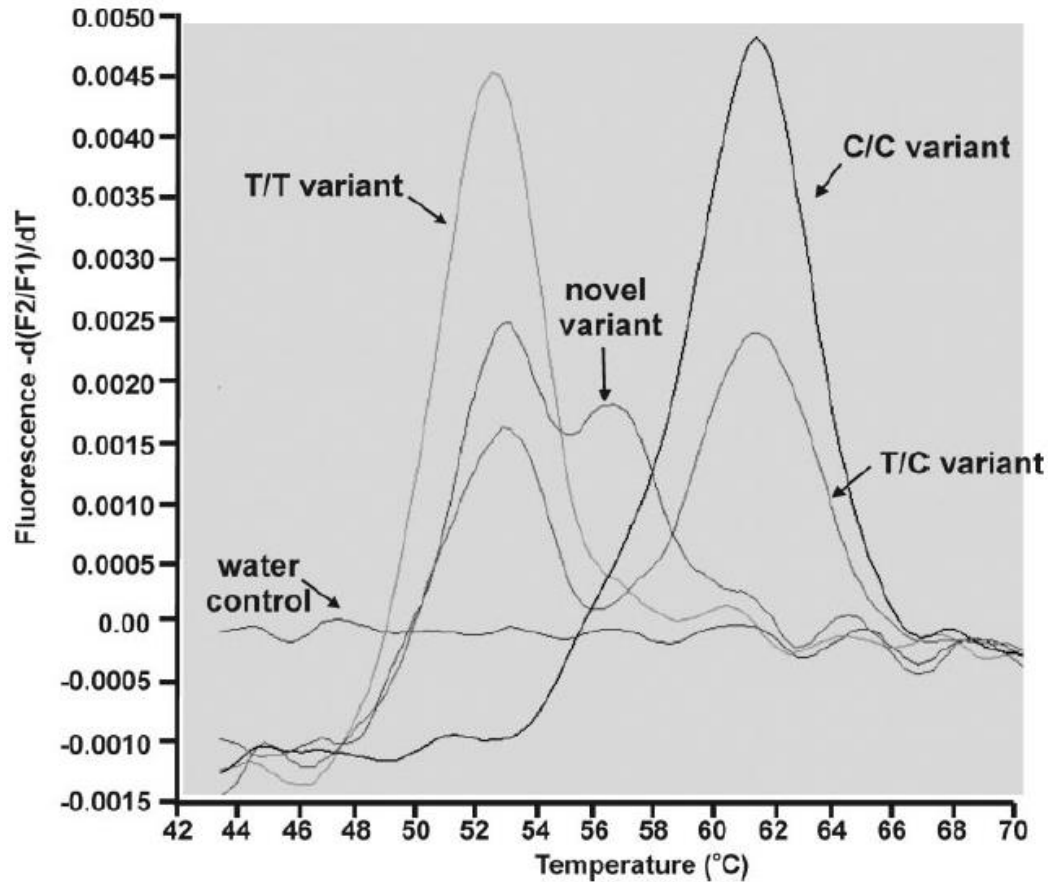
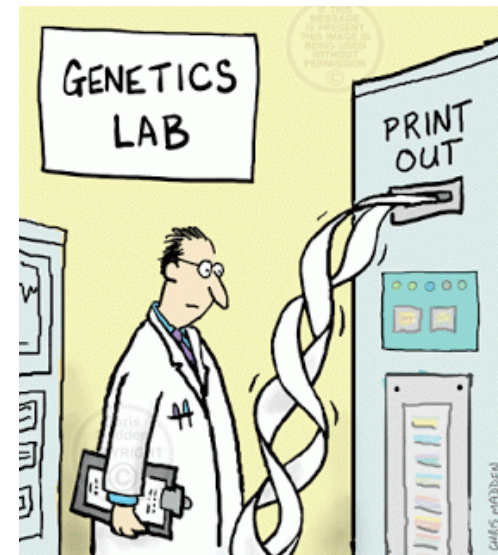


Fig. 1. Identification of a novel gene variation in the regulatory region of the lactase gene. The DNA melting curves resulting from the use of the MutaReal Lactase test to genotype the T/T, C/T, and C/C variants at the -13910T/C polymorphic sites in the lactase gene are shown. A novel variant leading to an arbitrary, biphasic melting curve with T_m s at 52 °C and 57 °C was found in 1 patient.

ISO 15189 en rapportage van MCM6 genotypering



Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006; 31: 171-175

Uit de laboratoriumpraktijk

Toepassing van DNA-rapportagerichtlijnen binnen het klinisch-chemisch en hematologisch lab: een haalbare zaak?

A. KOEKEN, J. BOUCHERIE en C. COBBAERT

De introductie van een nieuw laboratoriuminformatiesysteem binnen het Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium werd aangegrepen om aanbevolen richtlijnen voor DNA-rapportage te implementeren.

Beschikbare internationale aanbevelingen definiëren een DNA-rapport als een specifiek formeel document van het laboratorium aan de aanvragend arts waarin het resultaat van een (moleculair-genetisch) onder-

NEN-EN-ISO 15189:2012

- **Inhoud van het rapport**
- Datum, tijdstip vrijgave, paginanummering
- Duidelijk, ondubbelzinnige identificatie onderzoek & lab
 - NB: ook verwijzingslabs
 - Onderzoeksprocedure
- Identificatie & locatie patiënt op iedere pagina
- Identificatie aanvrager
- Aard monster, afnamedatum, SI-eenheden, referentie-interval, medische besliswaarde
- Interpretatie resultaten (voor zover van toepassing)
- Relevant commentaar (e.g. nuchter)
- Naam autorisator die resultaat beoordeelt en vrijgeeft

SGMG ('veldnorm')

- Begrijpelijk voor medische professional met weinig achtergrond in de genetica → geen wetenschappelijk artikel
- Interpretatie resultaten hangen volledig af van context
- Conclusie **bold**/*cursief*
- Kijk uit met 'kopie aanvrager' → beleid op maken
- Consequenties voor patiënt maar ook voor familie
- Schrijfwijzer:
 - HUGO nomenclatuur
 - geen + en – gebruiken om mutaties te rapporteren
 - vermijd vreemde symbolen: F508del i.p.v. Δ
 - *C282Y-mutatie, homozygoot of p.[Cys282Tyr] + [Cys282Tyr] ?*

Stellingen

- *Ieder DNA-rapport wordt voorzien van zowel de handtekening van de medisch verantwoordelijke laboratoriumspecialist als een 2^e persoon verantwoordelijk voor de technische validatie*
- *In het DNA-rapport kan de opmerking ‘**Het is raadzaam het DNA-onderzoek te herhalen met een 2^e bloedafname**’ vervallen*
- *Een DNA-rapport dient eeuwig bewaard te worden*

SGMG: checklist

- Laboratory identifiers
- Title, date
- **Name of patient (at least 2 identifiers)**
- Indication for testing or question to be answered
- Test performed, mutation tested, sensitivity
- Methods used (in Brief)
- **Result (formal genotype)**
- **Interpretation of result in simple language**
- Remarks on sensitivity, specificity, context
- Requirement for counselling and/or further testing
- Signature of lab director, visa/signature of second person
- Laboratory's Standard phrase concerning reproduction of reports and scope of results

Naam patiënt: |
Geboortedatum/geslacht: 01-01-1965 M
Patiëntnummer: 123456789
Burgerservicenummer: 987654321

Uitgevoerd onderzoek: Lactose intolerantie
Aan: Dr Dokter
Ziekenhuisplein 1
1122 AB Dordrecht

Afnamedatum: 07-08-2015
Datum uitslag: 21-08-2015

Methode: mutatieanalyse van het -13910 C/T-polymorfisme van het MCM6 helicase gen.
 H2-ademtest

Materiaal: EDTA-volbloed

Indicatie: Verdinking lactose intolerantie / Onbegrepen buikklachten.

Biochemie: Conclusie H2-ademtest: Geen respons, passend bij een normale H2-ademtest.

Uitslag: Uitslag mutatieanalyse: patiënt heeft het genotype heterozygoot C/T.

Interpretatie: **Geen aanwijzingen voor lactose intolerantie.**

Toelichting: Het verrichten van een H2-ademtest om lactose intolerantie aan te tonen is bij de uitslag heterozygoot C/T van toegevoegde waarde, aangezien de H2-ademtest bij 5-10% van deze patiënten positief is.

Meer informatie en referenties: www.gkcl.nl/laboratoriumtesten of scan de onderstaande QR code.

Deze uitslag is elektronisch geaccordeerd en daarom niet ondertekend.

dr. F.M. Verheijen



Betreft:
Naam:
Geboortedatum:
Geslacht: M/V
Patiëntnummer:
BSN:

Uitgevoerd onderzoek: Genotypering lactase-gen (*LCT*).

Uitslag: Het volgende genotype is aangetoond:
Positie *LCT-13910*: C/C
Positie *LCT-13907*: C/C
Positie *LCT-13909*: C/C
Positie *LCT-13913*: T/T
Positie *LCT-13914*: G/G
Positie *LCT-13915*: T/T
Positie *LCT-14009*: T/T
Positie *LCT-14010*: G/G
Positie *LCT-14011*: C/C

Interpretatie: Dit genotype past bij primaire lactose-intolerantie.

Datum bloedafname: 06-03-2017

Datum uitslag: 14-03-2017

Materiaal: DNA geïsoleerd uit EDTA-volbloed

Methode: Sanger sequentie van een deel van het MCM6 helicase gen (upstream van het lactase gen).

Referenties: Mattar et al. Clin. Exp. Gastroenterol. 2012;5:113-121.
Baffour-Awuah et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2015 Feb; 60(2): 182–191.

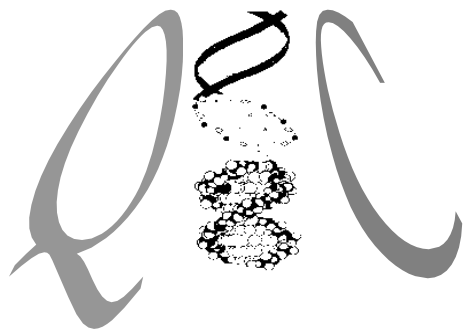
Result Laboratorium, Albert Schweitzerplaats 25, 3318 AT Dordrecht
<http://www.resultlaboratorium.nl>

E-mailadres voor meer informatie:
DNA@resultlaboratorium.nl

Telefoonnummer voor overleg met de dienstdoende specialist:
078-6541529

Externe rondzending genotypering MCM6 gen





Aantal deelnemers 2017

Rondzending 2014-1

Trombofilie:

- 30 FVL
- 30 Fact II

Pharmacogenetica:

- 15/14 CYP 2D6/2C19
- 19 DPYD

Overige testen:

- 29 HHC C282Y
- 29 HHC H63D
- 25 HLA-B27
- 20 alfa-thalassemie (*tripl 3 en 8*)
- 7 *CF delta F508*
- 19 HLA DQ2/DQ8
- 9 Lactase



Samp le	Overige testen						
	■DNA [~5ng/µl] HFE C282 Y [29]	HFE H63 D [29]	HLA B*27 [25]	Hb- typ. α-thal [20]	HLA DQ2 / DQ8 [19]	CF- δ508 [7]	Lactase [7]
■A	■HO M						
■B		■WT					
■C			■PO S				
■D				■-20.5 HET			
■E					■PO S/ NEG		
■F						■HO M	
■G							■CC
Afwijk ende result aten:	—	—	NE G 10x	SEA HET 1x	NE G/P OS 1x_	—	CT 1x
■WT = wild type (geen mutatie) / HET/HOM = Heterozygoot/ Homozygoot mutatie aanwezig / GR = geen resultaat							


Rondzending 2011-2
18-11-2011























Rondzending
Periode

Mol.Biologie Overige testen 2016.2
20 september 2016 - 27 oktober 2016

Herzien rapport : De scores voor LCT -13910C>T en a thal. --Triplicatie zijn toegevoegd.

Scores	uw score	MAP	gerapporteerd
Kwalitatief	24	28	93%
	Negatieve scores		

MCM6 (lactose intolerant)	Expertwaarden	Uw uitslagen	Score
LCT -13910C>T	^E CT	CT	
	E = Expertwaarde		Totaal 24

HLA-DQ2	1	0	1		2	0	2	
HLA-DQ8	1	0	1		2	0	2	
<u>Alfa Thalassemie</u>								
α thal. - α3.7	0	1	1		1	1	2	
α thal. - α4.2	1	0	1		2	0	2	
α thal. --SEA	1	0	1		2	0	2	
α thal. --20.5	1	0	1		2	0	2	
α thal. --MED	1	0	1		2	0	2	
α thal. --FIL	1	0	1		2	0	2	
α thal. --THAI	1	0	1		2	0	2	
α thal. --Triplicatie	1	0	1		2	0	2	
<u>CF</u>								
CF-5 508	0	0	0		0	0	0	
MCM6 (lactose intolerant)								
LCT -13910C>T	1	0	1		2	0	2	

Other lactase persistence alleles are relevant!

LCT-14009T>G
LCT-14010G>C
LCT-14011C>T

LCT-13913T>C
LCT-13914G>A
LCT-13915T>G

taaagagcctt ggtaagcatt tgagtgtagt tgtagacgg agacgatcac gtcagttt
 atagagtga taaagacgta agttaccatt taataccttt cattcaggaa aaagtactt
 agaccctaca atgtactagt aggcctctgc gctggcaata cagataagat aatgtarcc
 cggcctcaa aggaactctc ctcttaggt tgcatttga taatgtttga tttttgatt

LCT-13907C>G

~1-2%

LCT-13909C>A
LCT-13910C>T

Conclusies

- Genotypering van het MCM6 gen zou de waterstofademtest volledig mogen vervangen, dus ook voor -13910 CT
- Diagnostiek dient andere mutaties geassocieerd met lactase persistentie te omvatten
- De rapportage dient conform vigerende richtlijnen te gebeuren
- Er is behoefte aan een (NVKC)-veldnorm voor de moleculaire diagnostiek betreffende het preanalytische, analytische en postanalytische traject