

DNA-HFE genotyp, Taqman alleldiskriminering, LundGäller för
Klinisk kemi

LU

DNA HFE genotyp, Taqman alleldiskriminering, Lund**Bakgrund, indikation och tolkning**

Sjukdomstillstånd på grund av järnöverskott kan ses vid primära eller sekundära störningar i järnomsättningen. Hereditär (primär) hemokromatos (HH) är en genetisk sjukdom som orsakas av ökad upplagring av järn. HH manifesterar sig oftare hos män där den naturliga järnförlusten är mindre än hos kvinnor. Vid obehandlad HH deponeras järnöverskottet i levern, men även i pankreas, leder, hud, hjärta och hypofys. Sjukdomspanoramata inkluderar leverfibros/cirros med en kraftigt ökad risk för hepatocellulärt carcinom, diabetes mellitus, artropati, ökad pigmentering, kardiomyopati, arytmier samt hypogonadism. Behandlingen består i regelbunden flebotomi samt i förekommande fall behandling av de sekundära organskadorna. Sekundär hemokromatos kan ses vid till exempel järnöverskott på grund av hemolytiska anemier, thalassemier, kronisk leversjukdom, porfyria cutanea tarda eller blodtransfusioner.

Ärftlighetsmönstret för HH noterades tidigt och bedömdes vara autosomt recessivt. Associationen till vissa HLA-typer kartlades under 1980-talet men först 1996 upptäcktes genen *HFE* på kromosom 6p21.3 (H för HLA och FE för järn). *HFE* kodar för ett protein som påverkar transferrinreceptorernas affinitet för transferrin. Analys av *HFE* är hörnstenen vid genetisk diagnos av HH, men även andra ovanliga mutationer i till exempel generna för transferrinreceptor 2, ferroportin eller hemojuvelin har associerats till ovanliga tillstånd med ökad järnupplagring. Avsaknad av *HFE*-mutationer utesluter således inte den kliniska diagnosen primär (hereditär) hemokromatos. De två vanligaste mutationerna i *HFE* är C282Y (c.845G>A) och H63D (c.187C>G). I det första fallet ändras aminosyran i position 282 i *HFE*-proteinet från cystein till tyrosin och i det andra fallet sker ett byte från histidin till asparaginsyra på aminosyraposition 63. Referenssekvenser för spårbarhet ses i tabell 1. Mutationer i *HFE* har också påvisats med hög frekvens hos patienter med porfyria cutanea tarda.

Allelfrekvenser

Allelfrekvensen för C282Y ligger mellan 4–8% i Europa och frekvensen i Skandinavien ligger i den övre delen av intervallet. Det innebär att cirka 92-96% av europeer har normal genotyp och <1% är homozygota för den klassiska HH mutationen. Motsvarande allelfrekvens för H63D är cirka 14-18%. Prevalensen för diagnosen HH är dock endast cirka 0,01%.

Homozygoti för C282Y (C282Y/C282Y) orsakar majoriteten (60-100% beroende på genetiskt ursprung) av de fall som uppvisar en typisk HH-fenotyp. Förekomst av dubbel heterozygoti, så kallade

DNA-HFE genotyp, Taqman alleldiskriminering, Lund

Gäller för
Klinisk kemi

LU

”compound” heterozygoti (H63D/C282Y), är också förenlig med diagnosen hemokromatos, medan endast en eller ett par procent av patienterna med klinisk HH har genotyp H63D/ H63D eller ovanligare mutationer. Ingen av de ovan nämnda HFE-genotyperna har full penetrans. Av C282Y-homozygoterna har dock majoriteten förhöjda värden för transferrin-järnmättnad och ferritin, men alla dessa patienter har inte påvisbara organskador. Anlagsbärare (C282Y-heterozygoter) har ofta högre transferrin-järnmättnad och något högre ferritinnivåer än syskon utan något anlag men anses inte löpa någon signifikant ökad risk för sjukdomsmanifestationer om inga andra riskfaktorer föreligger. Dubbelheterozygoterna (H63D/C282Y) har oftare en lägre grad av järnöverskott än C282Y-homozygoterna. Generellt är den kliniska bilden beroende av kön, ålder eller snarast livstidsexponeringen för järn samt kostsammansättningen och alkoholintaget. Ibland kan en leverbiopsi vara nödvändig för att få en uppfattning om den histologiska bilden och omfattningen av järninlagringen. Behandlingsindikationen styrs utifrån en bedömning av järndepåerna. Om diagnosen ställs sent kan progressen av organskadorna dämpas men inte botas av behandlingen. Därför rekommenderas screening av familjemedlemmar som profylaktiskt kan bli blodgivare för att minska sina järndepåer.

Indikation

Utredning av hepatopati, diabetes, artropati, eller hypogonadism hos patient med förhöjd transferrin-järnmättnad eller vid utredning av ärftlighet för HH hos såväl proband som familjemedlemmar. Led i utredning av patient med porphyria cutanea tarda.

Tabell 1. Referenssekvenser för spårbarhet.

Gen	SNP-nomenklatur	dbSNP rs-nr	SNP-nomenklatur	dbSNP rs-nr	RefSeq, LRG_748
HFE	c.187C>G	1799945	c.845G>A	1800562	NM_000410.3
	g.8671C>G		g.10633G>A		NG_008720.2
	p.His63Asp		p.Cys282Tyr		NP_000401.1

DNA-HFE genotyp, Taqman alleldiskriminering, LundGäller för
Klinisk kemi

LU

Analysprincip

Metoden bygger på en PCR-reaktion där en specifik del av det genomiska DNA:t amplifieras. Dessutom ingår en hybridisering med en TaqMan- probe som är komplementär till det sekvensavsnitt där den aktuella punktmutationen finns. Två olika prober finns – en för WT-allelen och en för den muterade allelen. Proberna binder mellan inbindningsställena för forward- och revers-primers på DNA-templet och är märkta med olika fluorescerande "reporter"- färg (VIC™ eller FAM™) för respektive allel samt en quencher som släcker fluorescensen hos en intakt probe. Under PCR-reaktionen i extensionssteget, degraderar TaqDNA-polymeraset proben, vilket gör att reporterfärgen frigörs och fluorescens kan mätas.

Referensintervall

Ej tillämpbar på kvalitativ analys.

Metodkaraktistika**Interferenser och felkällor**

Om DNA provet innehåller kontamination som t.ex. inhibitorer kan detta ge en förändrad signal och ett omprov får göras. Principiellt kan andra homologa DNA sekvenser hybridisera med primers och ge felaktig information. Detta har eliminerats i den initiala optimeringen av metoden och sedermera validerats. I valideringen har potentiella primerinterferenser värderats med hjälp av bioinformatik. Ospecifik priming ger upphov till låg eller felaktig genotypclustering i mjukvaran.

Mätområde

Metoden påvisar homozygoti för wild type (wt) genotyp, heterozygoti, samt homozygoti för variant genotyp. Amplikonet begränsas av primers F och R samt detekteras med reporter 1 respektive 2 enligt nedan under rubrik Reagens.

Detektionsgräns

10 ng patient-DNA används i reaktionen. Nedre detektionsgräns har ej fastställts.

Mätosäkerhet

Ej tillämpbar på kvalitativ analys.

Spårbarhet

Samtliga primers och prober är spårbara till dessa sekvenser.

Gen	NCBI RefSeq
HFE	NM_000410.3
	NG_008720.1
	NP_000401.1

Imprecision

Se separat metodvalidering.

Ackrediterings-CV är ej tillämpbar på kvalitativ analys.

DNA-HFE genotyp, Taqman alleldiskriminering, Lund

Gäller för
Klinisk kemi

LU

Riktighet

Metodens riktighet är säkerställd mot referenssekvens, genom jämförelse mot annan validerad metod samt genom deltagande i Equalis externa kontrollprogram.

HFE 187 C>G

24 prover analyserades parallellt med tidigare använd RFLP-metod under perioden juli – aug 2003 med samstämmiga resultat. 96 tidigare körda prover plockades och analyserades på 7900HT. Se pärm Validering av analyser på 7900 HT.

HFE 845 G>A

24 prover analyserades parallellt med tidigare använd RFLP-metod under perioden juli – aug 2003 med samstämmiga resultat. 96 tidigare körda prover plockades och analyserades på 7900HT. Se pärm Validering av analyser på 7900 HT.

Ackreditering

Metoden är ackrediterad. Införd i rutin 2003-11-04.

Referenser

1. Feder, J.N., et al., *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis*. Nat Genet, 1996. **13**(4): p. 399-408.
2. Adams, P., P. Brissot, and L.W. Powell, *EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis*. J Hepatol, 2000. **33**(3): p. 485-504.
3. Griffiths, W.J., *Review article: the genetic basis of haemochromatosis*. Aliment Pharmacol Ther, 2007. **26**(3): p. 331-42.