

matisch afgehandeld. Daar de resultaten binnen Labosys-Vlissingen de normale procedure doorlopen wordt voor poliklinische en huisartspatiënten een rekening tezamen met overig onderzoek gegenereerd, terwijl in Velp automatisch een verzamelrekening voor het ziekenhuis Vlissingen wordt aangemaakt.

Tenslotte

De beschreven procedure van elektronische interlabo-

ratoriumcommunicatie is een voorbeeld van samenwerking die zowel de efficiëntie als de effectiviteit van laboratoriumonderzoek dient.

Sedert begin 1999 is deze functionaliteit volledig operationeel tussen de laboratoria van de ziekenhuizen in Velp en Vlissingen.

A.J. van Erven en H. Huetink, Ziekenhuis Velp

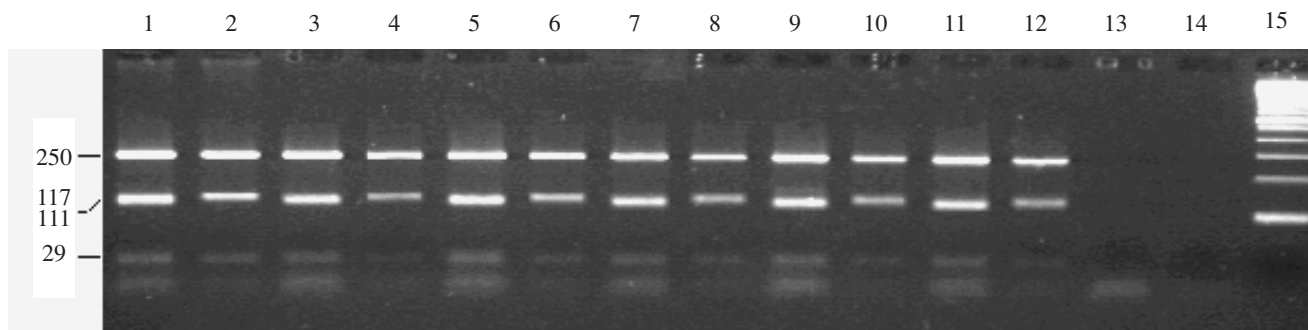
J.L. den Boeft en H.H. Kamp, Ziekenhuis Walcheren

Overschatting van de Cys282Tyr-mutatiefrequentie door een HFE-polymorfisme?

Tijdens het "World Congress on Iron Metabolism BIOIRON '99" dat van 23-28 mei 1999 plaatsvond in Sorrento, Italië, werd het abstract "HFE-polymorphism causes overestimation of C282Y homozygote frequency in hemochromatosis" van G.P. Jeffrey, S. Chakrabarti en P.C. Adams gepresenteerd. Dit abstract beschrijft dat als er homozygotie voor de 6722GÆA-mutatie (genbank Z92910, in abstract onjuist als 5474GÆA geduid; Cys282Tyr-mutatie) gevonden wordt met gebruik van de oorspronkelijk ontworpen primers (1), er toch nog sprake kan zijn van heterozygotie. Fout positieve homozygotie ontstaat als in het niet-gemuteerde allel een polymorfisme aanwezig is (6817GÆA, in abstract onjuist als 5569GÆA geduid) dat binding van de oorspronkelijke Feder reverse primer (1) bemoeilijkt en daardoor amplificatie van dit allel in de PCR verhindert (2).

In hun studie selecteerden zij 27 patiënten die oorspronkelijk homozygoot voor de 6722A-mutatie waren geanalyseerd m.b.v. *RsaI*-genotypering (PCR gevolgd door knippen met het restrictie-enzym *RsaI*). Na sequencen van het DNA van deze patiënten bleken slechts 9 patiënten werkelijk homozygoot. De overige 18 waren heterozygoot voor zowel de 6722A-mutatie als het 6817A-polymorfisme. Het polymorfisme werd niet gevonden bij de 9 homozygo-

ten. Door de oorspronkelijke reverse primer te vervangen door een nieuwe primer die hybridiseert buiten de 6817 positie konden alle 18 6722A-heterozygoten met *RsaI*-genotypering worden bevestigd. Deze gegevens waren voor ons een reden onze detectiemethodiek van de 6722G→A mutatie aan een kritische analyse te onderwerpen. Ook wij gebruikten de oorspronkelijke primers (1) voor *RsaI*-genotypering. Daarom hebben we het DNA van 15 6722A-homozygoten, uit 13 verschillende families, opnieuw geanalyseerd met *RsaI*-genotypering met een aangepaste reverse primer, die buiten de oorspronkelijke primer ligt. Wij vonden echter geen enkele aanwijzing voor een fout positieve homozygote uitslag. In tegenstelling tot de bevindingen uit het bovengenoemde abstract kwamen onze resultaten voor beide reverse primers overeen (figuur 1). Daarnaast hebben we 46 als 6722A-heterozygoot gerapporteerde patiënten opnieuw geanalyseerd bij een annealingstemperatuur van 60 °C in plaats de op ons laboratorium tot dan toe altijd gebruikte 55 °C. Hierdoor kan theoretisch bij een 6817A-polymorfisme de hybridisatie van de Feder reverse primer afnemen, amplificatie worden verhindert en fout positieve homozygotie ontstaan. De resultaten bleven echter onveranderd. Dit impliceert dat de in het bovengenoemde abstract beschreven fout gerapporteerde homozygotie niet eenvoudig toegeschreven lijkt te kunnen worden aan een hogere annealingstemperatuur.



Figuur 1. DNA-fragmenten na digestie door *RsaI* van 5 gepaarde amplicons van 6722A-homozygoot DNA verkregen na DNA-amplificatie met respectievelijk de oorspronkelijke en aangepaste reverse primer. DNA-amplificatie met de oorspronkelijke (5'CTCAG-GCACTCCTCAACC) en de aangepaste reverse primer (5'TACCTCCTCAGGCACTCCTC) vonden plaats bij een annealingstemperatuur van respectievelijk 55 °C en 60 °C. De lanen 1 tot 12: DNA fragmenten na *RsaI*-digestie van met oorspronkelijke (oneven lanen, fragmenten van 250bp, 111bp en 29bp) en aangepaste (even lanen, fragmenten 250 bp, 117 bp en 29bp) reverse primers verkregen amplicons.

Lanen 13 en 14: PCR-blanco met respectievelijk oorspronkelijke en aangepaste reverse primer. Laan 15: 100 bp DNA-ladder (marker).

Wij concluderen dan ook voorzichtig dat met onze *RsaI*-genotypering en bij onze (Nederlandse) patiënten, gebruik van de Feder reverse primer er niet toe leidt dat 6722A-heterozygote patiënten ten onrechte als homozygoot voor deze mutatie worden afgegeven. Absolute zekerheid hierover hebben we niet, die kan alleen worden verkregen door van grotere aantallen patiënten het amplicon te sequencen.

Foute toekenning van 6722A-homozygotie kan op grond van de ons beschikbare gegevens worden voorkomen door de reverse primer van Feder te vervangen door een primer die hybridiseert buiten de originele primer.

Literatuur

1. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13: 399-408.
2. Swinkels DW, Marx JJM. Diagnostiek en behandeling van primaire hemochromatose. *Ned Tijdschr Geneesk* 1999; 143: 1404-1408 (naschrift).

Bij het ter perse gaan van dit nummer verscheen het abstract van Jeffrey et al. in een aangepaste vorm in: Jeffrey GP et al. *Nature Genet* 1999; 22: 325-326.

D.W. Swinkels
CKCL, AZN St. Radboud, Nijmegen