



JÖNKÖPING UNIVERSITY
School of Health and Welfare

Genotypning av *HFE* c.845G>A, *HFE* c.187C>G och *HFE* c.193A>T för hemokromatos med hjälp av Realtids- Polymerase Chain Reaction

En kvalitetsutvecklande studie i Jönköpings län

Huvudområde: Biomedicinsk laboratorievetenskap

Författare: Stephanie Chamoun, Medina Sarajlic

Metodhandledare: Maysae Quttineh Legitimerad Biomedicinsk analytiker

Vetenskaplig handledare: Sofie Haglund, Biokemist, PhD

Examinator: Maria Faresjö, Professor

Jönköping 2016 Juni

Sammanfattning

Hereditär hemokromatos (HH) är en vanlig multigenetisk defekt som leder till ett onormalt förhöjt järnupptag i tarmen och ses framförallt hos kaukasisk befolkning. Sjukdomen har på senare år visats orsakats av mutationen c.845G>A men även mer ovanliga varianter som c.187C>G och c.193A>T, vilka alla finns belägna i genen *HFE*. *HFE* som finns lokaliserad intill Human Leukocyte Antigen (*HLA*)-genen på kromosom sex korta arm kodar för ett HFE-protein som har till uppgift att reglera kroppens järnmetabolism i interaktion med hormonet hepcidin. Vid HH avtar proteinets järnregulatoriska funktion och järnackumulation uppstår. Idag diagnostiseras HH främst via genotypning där ovanstående genvarianter påvisas. Beroende på genvariant löper individer olika hög risk för sjukdomsutveckling. I studien var syftet att verifiera det kommersiella kitet LightMix[®] *in-vitro* diagnostics kit HFE H63D S65C C282Y diagnostics kit för kvalitativ diagnostik av HFE-genotyper via Realtids-Polymerase Chain Reaction (PCR) via smältkurveanalys för eventuell införsel i rutindiagnostik. I studien kunde samtliga patientprover (n=49) ifrån Halmstad med misstänkt hemokromatos genotypas för genvarianterna i *HFE*-genen. Utifrån godkända resultat i prov-till-prov variation tillsammans med icke-frekventa skillnader i imprecisionstest samt 100 % samstämmighet gentemot referensmetoder på externa laboratorier, kunde slutsatsen dras att metoden är relevant för rutinverksamheten på Länssjukhuset Ryhov, Region Jönköpings Län.

Nyckelord: hemokromatos, LightCycler, *HFE*-mutationer, järnmetabolismen, hepcidin, molekylärbiologi

Summary

Genotyping of *HFE* c.845G>A, *HFE* c.187C>G and *HFE* c.193A>T for hemochromatosis by Real Time-Polymerase Chain Reaction

A quality improvement study in the Region Jönköping County.

Hereditary hemochromatosis (HH) is a common multi-genetic defect that results in abnormally elevated iron uptake mainly in Caucasian populations. The disease has recently been found to be caused by mutation c.845G>A, in addition to the unusual variants c.187C>G and c.193A>T, all of which are detected in the gene *HFE*. *HFE* is located adjacent to the Human Leukocyte Antigen (*HLA*)-gene on chromosome six's short arm and encodes for a *HFE*-protein, responsible for the body's iron metabolism regulation in interaction with the hormone hepcidin. As HH decreases the protein's iron-regulatory function, the iron accumulation increases. Today HH is diagnosed primarily through genotyping where variants in the *HFE*-gene are detected. Depending on the variant, individuals are put at varying high risk of disease development. The aim of this study was to verify the commercial LightMix[®] *in-vitro* diagnostics kit *HFE* H63D S65C C282Y for qualitative diagnosis of *HFE*-genotypes through Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) and melting-curve analysis for possible introduction in routine diagnostics. In the study, all samples (n=49) from patients with suspicious hemochromatosis were genotyped for the gene variants in *HFE*-gene. Based on all accepted results with non-frequent differences in imprecision test and 100 % consistency against the reference methods at external laboratories conclusions could be drawn that the method is applicable for routine diagnostics at the County Hospital Ryhov in Region Jönköping.

Keywords: hemochromatosis, LightCycler, *HFE*-mutations, iron metabolism, hepcidin, molecular biology

Innehållsförteckning

Sammanfattning	3
Summary	4
Innehållsförteckning	5
1. Inledning	1
2. Bakgrund	2
2.1 Hemokromatos	2
2.1.1 HFEs roll i järnmetabolismen	2
2.2 HFE-genen	4
2.2.1 Proteinets HFE	5
2.3 Kliniska fynd	6
2.3.1 Symtom och sjukdomstecken	6
2.3.2 Diagnostik	7
2.3.3 Behandling	8
2.4 Principiella steg för extraktion av deoxiribonukleinsyra (DNA) och Polymerase Chain Reaction (PCR)	8
2.4.1 DNA extraktion	8
2.4.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)	8
2.4.2.1 PCR Mastermix	9
2.4.2.2 PCR-amplifiering	9
2.4.3 Realtids PCR	10
2.4.4 Smältkurveanalys	12
2.4.5 Multiplex analys	12
3. Syfte	14
4. Material och metod	15
4.1 Urval och provmaterial	15
4.1.1 Extraktion	15
4.1.2 Förvaring av prover och reagens	15
4.2 Analys med Realtids-PCR och smältkurveanalys	16
4.2.1 Mastermix preparation	16
4.2.2 Kontroller och externa standarder	16
4.2.3 Provapplicering, kalibrering och analys	17
4.2.4 Bedömning	17
4.3 Optimering av reaktionsbetingelser	17
4.3.1 Optimering av termoprofil	17
4.3.2 Optimering av ingångsmängd DNA	18

4.4 Imprecision	18
4.4.1 Inomserievariation	18
4.4.2 Mellanserievariation	18
4.5 Samstämmighet mot externa laboratorier samt gentemot annan metod	18
4.6 Statistik bearbetning	19
5. Etiska överväganden	20
6. Resultat	21
6.1 Prov-till-prov variation	21
6.2 Optimering av reaktionsbetingelser	21
6.2.1 Optimering av termoprofil.....	22
6.2.2 Optimering av ingångsmängd DNA	23
6.3 Imprecision	23
6.3.1 Inomserievariation	23
6.3.2 Mellanserievariation	24
6.4 Sammanstämmighet mot externt laboratorium samt gentemot annan metod ...	25
6.5 Förslag till bedömningsmall	25
7. Diskussion	26
7.1 Avvikande ifrån kit-rekommendationer	26
7.2 Optimering av reaktionsbetingelser.....	27
7.3 Imprecision.....	28
7.4 Prov-till-prov variation	30
7.5 Förslag till bedömningsmall	31
7.6 Samstämmighet gentemot externa laboratorier	31
7.7 Övriga synpunkter.....	31
8. Slutsats	33
9. Omnämningen	33
10. Referenser	34

Bilaga 1. Sammanställning av rådata av samtliga *HFE* genotypade patientprover i Jönköping

Bilaga 2. Sammanställning av rådata för inomserievariation i Jönköping för prov HFE 135 (c.845G/A) och prov HFE 137 (c.193A/T c.187C/G)

Bilaga 3. Sammanställning av rådata för mellanserievariation i Jönköping för prov HFE 135 (c.845G/A), prov HFE 137 (c.193A/T c.187C/G), prov HFE 142 (c.845A/A) och prov HFE 145 (c.187G/G)

1. Inledning

Hereditär (primär) hemokromatos (HH) är en relativt vanlig multigenetisk defekt som leder till ett förhöjt järnupptag i tarmen. Sjukdomen beskrevs första gången av franska vetenskapsmannen Armand Trousseau år 1865. Trousseau redogjorde för ökad intestinal absorption i samband med bronsdiabetes där bruna hudpigmenteringar identifierades, vilket därmed blev första benämningen för HH. Patologen von Recklinghausen namngav tillståndet efter 30 år till *hämochromatose* och därpå utfördes en monografistudie av gerontologisten Joseph Sheldon som fastställde HH som en ärftlig autosomal recessiv sjukdom år 1935 (1-5). Idag ses HH hos cirka 0,5 % av Sveriges befolkning, där majoriteten av fallen bär en homozygot uppsättning av en genetisk variant i genen *HFE* (1, 3, 6, 7-11).

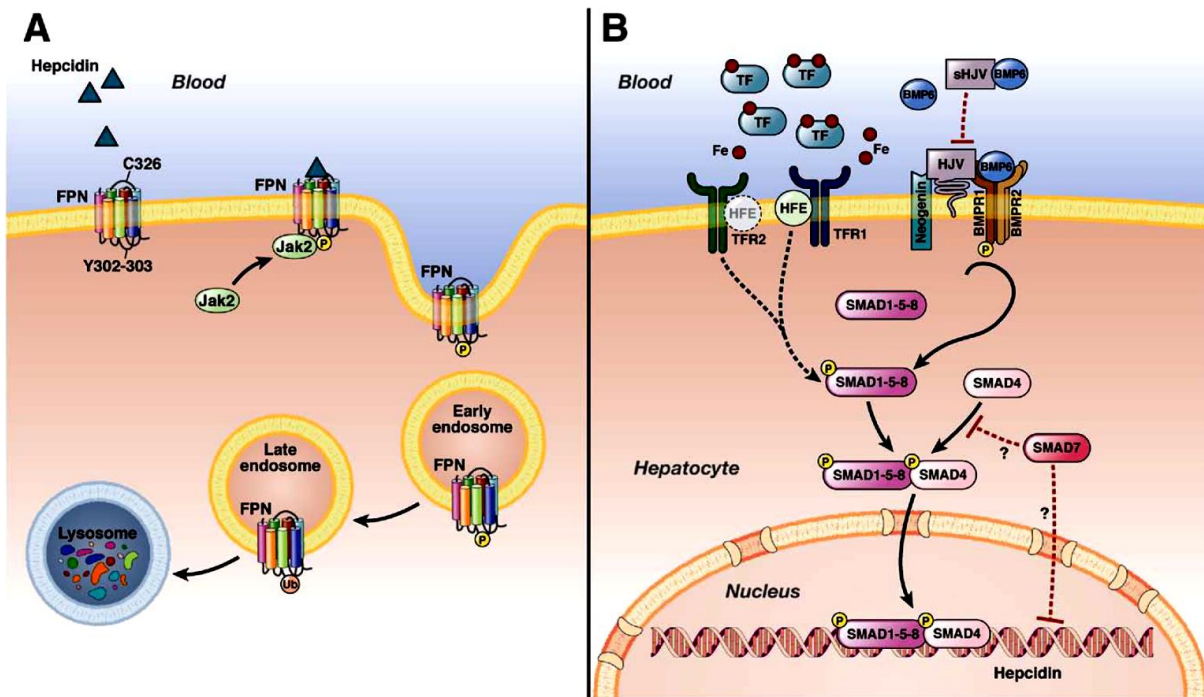
År 2015 beställdes cirka 80 prover för genotypning hos misstänkta HH-patienter på Länssjukhuset Ryhov i Jönköping, vilka skickades till enheten klinisk kemi på Universitetssjukhuset i Linköping för genanalys. Detta skulle idag kunna effektiviseras genom införelse av genotypningsanalys på Länssjukhuset Ryhov i Region Jönköpings län (Personlig kommunikation med Haglund S, biokemist PhD, Länssjukhuset Ryhov, maj 2016). I studien verifierades det kommersiella kitet LightMix[®] *in-vitro* diagnostics kit HFE H63D S65C C282Y för kvalitativ diagnostik av hemokromatos med avseende på HFE genotyper c.845G>A c.187C>G c.193A>T via Realtids-PCR för eventuell införelse i rutindiagnostik.

2. Bakgrund

2.1 Hemokromatos

2.1.1 HFEs roll i järnmetabolismen

Järn förekommer i två former, hemform och icke-hemform och ingår i flera mekanismer i kroppen. Ett normalt dagligt intag av järn ligger mellan 10-30 mg/dag för vuxna individer men kan variera något beroende på kön och ålder. Vid vissa tillstånd som exempelvis graviditet kan behovet öka ytterligare (3, 12-16). Järn har en viktig roll i bland annat syre- och koldioxidtransporten, cellernas energigenererande mekanismer samt i många enzymatiska reaktioner (3, 6, 13). Upptaget av järn sker framförallt i enterocyterna i duodenummukosans villi. Sjukdomstillståndet HH karaktäriseras av en ackumulation av järn i parenkymatösa och vitala organ, på grund av en ökad absorption i kroppen. Åkomman uppstår till följd av mutationer i genen *HFE* på kromosom sex, vilken kodar för proteinet hereditärt hemokromatos protein (HFE) som normalt reglerar kroppens järnmetabolism tillsammans med hormonet hepcidin. Vid förändring i *HFE*-genen ses en avtagande funktion i HFE och därmed ett reducerat samspel med hepcidin. Hormonet styrs även av kroppens järnreglerande proteiner såsom transferrinreceptor 2 (Tfr2), hemojuvelin (Hjv), Divalent Metal Transporter 1 (DMT-1) samt ferroportin (Fpn), där alla proteiner också resulterar i ett minskat samspel med HFE vid förändringar i *HFE*-genen. Normalt recirkulerar dietärt järn mellan blodbanan och olika organ där nivån kontrolleras strikt för att upprätthålla kroppens behov. Hormonet hepcidin syntetiseras i levern och utsöndras som respons på järnöverskott för att nedreglera järnnivåerna i serum och därmed undvika inlagringar i olika organ. Hormonet ses även vid inflammation och oxidativ stress. Mekanismen sker genom att hepcidin bildar komplex med järnmembrantransportörens, Fpn:s, extracellulära regioner. Hela komplexet tas sedan upp av cellen och degraderas. Detta leder till att uttransporten av järn, från kroppens olika celler till blodbanan, hindras (Figur 1) (3, 5, 7, 10, 17-21).



Figur 1. (A) Schematisk bild över hepcidin- och Fpn-regleringen i järnmetabolismen: Hepcidinsyntesen ökar och hepcidin utsöndras ifrån levern vid järnöverskott i kroppen. Hormonets funktion är att bland annat komplexbinda järntransportören ferroportein (Fpn), vilket utlöser en intracellulär kaskadreaktion varpå Fpn till slut fosforyleras och bryts ned. Detta resulterar i att järn inte transporteras ut i blodbanan från kroppens olika celler. **(B) Reglering av uttrycket av hepcidin:** Vid järnöverskott sker samtidigt en samverkan med transmembranproteinet hereditärt hemokromatos protein (HFE) som inte binder järnet direkt utan interagerar med transferrinreceptor 1 (Tfr1), transferrinreceptor 2 (Tfr2) och β 2-mikroglobulin. Tfr1 och Tfr2 binder transferrin i blodet. Detta utlöser en HFE-medierad intracellulär reaktionskaskad till cellkärnan vilken slutligen aktiverar transkription av hepcidin. Detta resulterar i minskat järnupptag till cirkulationen. (10, 16, 20-22).

HFE interagerar normalt med Tfr1 i basolaterala delen av enterocyterna, där proteinet tillsammans med järnmättat transferrin konkurrerar om inbindning till Tfr1. Då järntransferrinmättnaden är hög dissocieras HFE ifrån Tfr1 och transferrin ersätter bindningen mot receptorn. HFE med mindre affinitet mot Tfr1, komplexbinder istället Tfr2 samtidigt som en intracellulär reaktionskaskad triggas. Mekanismen signalerar alltså en hög järnhalt i blodet och aktiverar transkript av hepcidin för att minska uttransport av järn till cirkulationen (1, 3, 5, 7, 10, 17-21). Då transferrinmättnaden är låg sker ingen dissociation av HFE ifrån Tfr1, vilket resulterar i fortsatt järnabsorption till blodet (10, 20-21).

HFE har detekterats i flera av kroppens olika celler, däribland makrofager, gastrointestinala celler samt i leverns endotel och Kuppferceller. Normalt ses låga mängder Tfr1 i levern där receptorn har en järninlagringspåverkande funktion. Tfr2 uttrycks i höga nivåer i levern och olika

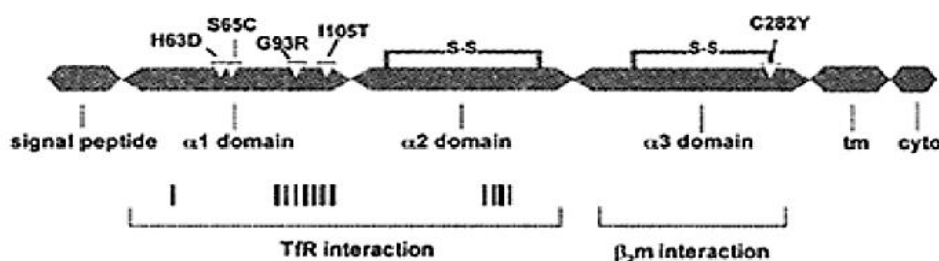
Tfr1 påverkas inte Tfr2 av intracellulära järnnivåer samtidigt som receptorn jämfört med Tfr1 har en lägre affinitet för transferrin (10, 16, 20-22).

Defekter i järnmetabolismen, som exempelvis HH kodar för ett defekt HFE-protein och leder till att lägre hepcidinnivåer utsöndras. Detta ökar även järnutsöndringen i cirkulationen och leder till en successivt ökad järnackumulering i vitala organ. Inlagringarna kan ses framförallt i lever, hjärta, pankreas och gonader (3, 5, 7, 10, 14, 16-18, 23).

Majoriteten av järnpoolen i blodet härstammar från det retikuloendoteliala systemets makrofager vars huvuduppgift är att avlägsna funktionsodugliga erythrocyter från cirkulationen tillsammans med mjälten. Hemoglobinet järn reabsorberas för återanvändning i benmärgens erythropoes. Vid HH ses däremot ett större järnutsläpp hos makrofager än normalt och dessa bidrar till stigande nivåer järn i plasma. Detta överskott kompenseras inte naturligt hos människan utan kan enbart reduceras via blödning (3, 10, 16). På senare år har defekter identifierats i fler järnregulatoriska proteiner utöver HFE-proteinet, där bland annat Tfr2, Hju, DMT-1 samt Fpn visats vara relevanta för HH (10).

2.2 HFE-genen

HFE-genen är lokaliserad till kromosom sex korta arm, 6p21.3 (Figur 2), och ligger intill Human Leukocyte Antigen (*HLA*)-genen där *HFE* utgör en del av histokompatibilitetskomplexet klass I (MHC I)-familjen. Genen mäter 12 kb och består av sju exoner omfattande 9609 kodande baspar med ett transkript på sex exoner. År 1976 benämndes *HFE*-genen *HLA-H* då sekvensen upptäcktes ligga intill *HLA-A3* regionen. Två decennier senare ändrades namnet till *HFE* eftersom *HLA-H* ansågs vara missvisande på grund av *HFE*s oförmåga att presentera antigen. Detta har visats bero på att translationen av $\alpha 1$ - till $\alpha 2$ -domänerna i *HFE*-dubbelhelixen saknar två tyrosin-peptidbindande regioner. Vid genetiska varianter c.845G>A, c.187C>G samt c.193A>T i *HFE* orsakas sjukdomstillståndet HH, vilka resulterar i förändringar i proteinnivå som består av ett 343 aminosyror baspar långt järnregulatoriskt protein (1, 17, 19, 21-22, 24-25).

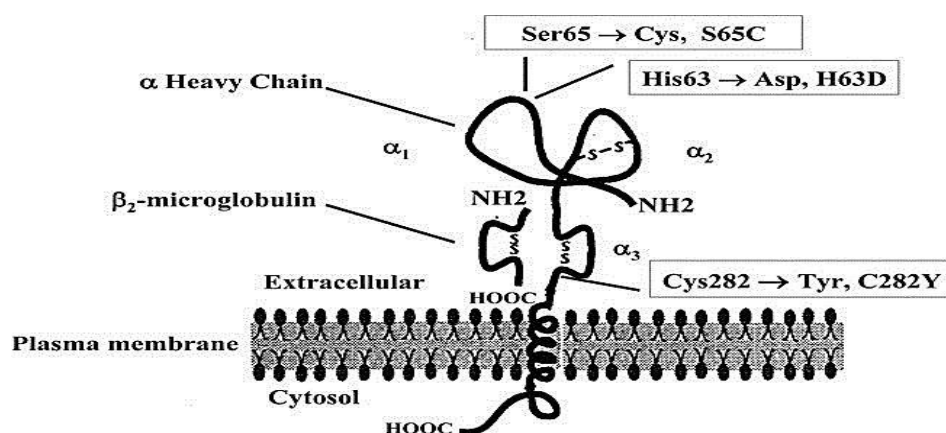


Figur 2. *HFE*-genstruktur uppbyggd i olika domäner. Genen är uppbyggd i tre olika kodande domäner vilka utgör en interagerande funktion med transferrinreceptor 1 (Tfr1) och transferrinreceptor 2 (Tfr2) samt β_2 -mikroglubulin. Exon 1 korresponderar signalpeptiden medan exon 2-4 resulterar i $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, och $\alpha 3$ -domänerna där

mutationerna c.845G>A, c.187C>G c.193A>T identifieras, vilka i figuren anges som C282Y, H63D och S65C. Exon 5 kodar för transmembran regionen och exon 6 inkluderar ett stop kodon. *HFEs* cytogenetiska lokation är 6p21.3. (1, 17).

2.2.1 Proteinet HFE

Likt MHC-klass I och andra immunglobulinliknande proteiner har även HFE-proteinet en transmembranregion, en intracellulär cytoplasmisk svans, en signalpeptid och tre extracellulära domäner som utgörs av en α_1 -, α_2 - och α_3 -loop (Figur 3) (1, 17, 19, 21, 22, 24). Domänerna interagerar med varandra genom fyra cysteinrester vilka formar disulfidbryggor (17, 19). β_2 -mikroglobulin interagerar med HFE-proteinet på cellytan där ett komplex bildas med Tfr1 (1, 19).



Figur 3. Schematisk bild över HFE-proteinet. Uppbyggnaden av α_1 -, α_2 - samt α_3 looparna vilka övergår i en dubbelhelix över transmembranet och avslutas med en kort cytoplasmisk svans i cytosolen för intracellulär signalering. I figuren anges även konsekvensen av genvarianterna i hereditärt hemokromatos protein (HFE) associerade med hereditär hemokromatos (HH) på proteinnivå (se text för detaljer) (17).

Mutationerna kopplade till HH är bland annat lokaliserade i fjärde exonet av *HFE*-genen. Genvariationen c.845G>A där guanin ersatt adenin på nukleotidposition 845 i den kodande sekvensen, resulterar i att tyrosin ersätter cystein vid aminosyraposition 282 (p.C282Y). Detta påverkar proteinets α_3 -domän, vilken visades vara essentiell för interaktionen med β_2 -mikroglobulin (1, 7, 17, 25-26). I det muterade tillståndet utvecklas en inhibering av komplexbindningen till β_2 -mikroglobulin via en disulfidbrygga. Defekten leder till att HFE-proteinets transport mot cellytan hämmas och resulterar i ett minskat samspel med transferrinreceptorerna. HFE-funktionen nedregleras och järnackumuleringen tar fart då intracellulära reaktionskaskaden, som normalt utlöses av interaktionen mellan Tfr2 och HFE, inte sker. Därmed aktiveras inte hepcidin-transkriptionen (10, 21).

Utöver c.845G>A har ytterligare två mutationer c.187C>G och c.193A>T med ett basparsutbyte identifierats i exon 2. I mutation c.187C>G har guanin ersatt cystein i

nukleotidposition 187, vilket medfört att aspartat ersatt histidin i proteinets aminosyraposition 63 (p.H63D) i α_1 -domänen. Normalt har en saltbrygga identifierats tillsammans med α_2 -loopen vilken korsbinder transferrin och samspelar med transferrinreceptorerna. Samspelet avtar dock vid närvaro av *HFE*-mutationen c.187C>G och har visats ha en större prevalens hos individer ifrån mellanöstern, Indien samt kring medelhavsområdet jämfört med c.845G>A. *HFE*-mutationen c.193A>T har identifierats på senare år i nukleotidssekvens 193 där adenin har ersatts av tymin och ses i enstaka fall vid HH. Detta leder till en serin- cysteinsubstitution i aminosyraposition 65 (p.S65C) i *HFE*-proteinet. Mutationen resulterar i minskat samspel med Tfr1 och Tfr2. Både c.187C>G och c.193A>T påverkar α_1 -domänens bindningsförmåga mot transferrinreceptorerna, men olikt c.845G>A, hindras inte proteinets förmåga att uttryckas på cellytan (1, 7, 10, 17, 21-22, 25-26).

2.3 Kliniska fynd

2.3.1 Symtom och sjukdomstecken

Vid HH inlagras järn i kroppens olika parenkymatösa vävnader (5, 6, 8). Processen är relativt långsam och symtom uppträder diffust eller symtomfritt hos framförallt män först i 30-40 års ålder. Symtomen är bland annat trötthet, ledbesvär samt svullnad i händer och fötter. Frekvensen hos kvinnor är något lägre eftersom blodförlust vid menstruation resulterar i ändrade järnnivåer i blodet. Detta är också orsaken till att kvinnor oftast insjuknar i postmenopaus (3, 8, 11). HH-patienter upptäcks oftast i samband med hälsokontroller där provresultat visar oförklarligt förhöjda levertransaminas- och ferritinkoncentrationer i serum (3, 8-9, 11, 20). Alaninaminotransferas (ALAT)-värden omkring 1500 mg/L tillsammans med en ferritinmättnad upp mot 1000 μ g/L kan indikera primära organmanifestationer tillsammans med höga transferrinnivåer. Hemoglobinnivån är ofta normal eller lätt reducerad (6, 20). Koncentrationen av serumferritin tolkas försiktigt tillsammans med övriga kliniska fynd och provresultat. Detta beror på att analytens specificitet är låg och många gånger kan normala nivåer noteras i tidig fas av HH (20).

Förloppets kliniska manifestationer har identifieras i framförallt leverns hepatocyter med en ökad risk för levercirros och hepatocellulärt carcinom. Diabetes mellitus, arytmier och hypogonadism samt ökad hudpigmentering är andra följder av obehandlad HH (3, 7-9, 11, 20, 27-28). Symtom som artropati i metakarpofalangeallederna ses hos cirka 30-% av alla insjuknande individer. Hos flertalet patienter upplevs ytterligare stelhet i knä och höfter med en osteoporosprevalens (benskörhet) på 25.3–34.2 % (20). Sekundär hemokromatos är ytterligare en form av åkomman och orsakas av bakomliggande sjukdomar såsom hemolytiska anemier,

kronisk leversjukdom, porfyria cutanea tarda, thalasemier och blodtransfusioner (3, 6, 8-9, 11, 27-29).

2.3.2 Diagnostik

Vid misstanke om HH utförs genanalys med hjälp av Polymerase Chain Reaction (PCR)-baserad teknik där påvisning av mutationsgenerna c.845G>A, c.187C>G samt c.193A>T sker (24). Beroende på om patienten är homozygot eller heterozygot för mutationerna löper individen olika stora risker för att utveckla sjukdom (6). Då anlaget för HH är autosomt recessivt utvecklas inte HH hos individer som ärvt anlaget från en förälder, det vill säga om anlaget bärs i heterozygot form. Barn som övertar mutationsgenen från heterozygota föräldrar löper därmed 25 % risk att utveckla sjukdom (3, 6, 8). Individer som är homozygota för c.845G>A löper störst risk att utveckla sjukdom, medan heterozygota individer för c.845G>A inte visar risk för HH (3, 8, 24). Detsamma gäller om patienten är heterozygot c.187C>G eller c.193A>T (24, 27). Ungefär 5-7 % av patienterna är sammansatt heterozygota där c.845G>A ses i kombination med c.187C>G (7, 24, 27). Kombinationen är också kopplad till HH, däremot är det extremt ovanligt att vara heterozygot för c.187C>G och c.845G>A på samma allel. I ovanliga fall förekommer homozygoti för c.187C>G, vilket är associerat med en mildare form av HH samtidigt som kombinerad heterozygoti 187/193 i frånvaro av variation c.845G>A inte visar ökad risk för HH (3, 6-8, 24-25, 27). Förekomsten av c.845G>A är störst i nordvästra Europa där cirka 18-% bär varianten i heterozygot form (1, 30). Däremot är genvarianten ovanlig bland latinamerikaner, asiater och populationer kring stillahavsområdet. Den homozygota formen c.187C>G utgör en mildare form av HH och är främst identifierad i västra delar av Europa där genvarianten tillsammans med heterozygot uppsättning förekommer i 10-29 % hos befolkningen. Varianten är också relativt vanlig hos nordamerikansk befolkning där 14-15% är bärare (1, 10, 31). Genvarianten c.193A>T är generellt lägre och förekommer i ungefär 1,6–2,9 % i olika populationer (1, 31).

Järninlagringar vid hemokromatos kan även påvisas histologiskt med hjälp av leverbiopsier där järnmängden koncentrationsbestäms via specifika färgningsmetoder som exempelvis Pearl's blue järnfärgning. Analys av biopsier har däremot minskat sedan genanalyserna infördes och utförs enbart i specifika fall, till exempel vid viral hepatit, patienter med oförklarligt höga ferritin nivåer som är negativa för genetisk analys och levertransplanterade patienter (5, 8, 28).

2.3.3 Behandling

Vid HH genomförs normalt upprepade flebotomier som huvudbehandling, venesection eller åderlåtning. Flebotomierna utförs med ett variationsintervall från 4-6 veckor, för att minimera järnhalterna med målsättning att uppnå ferritinnivåer under 50 mg/L. Efter avslutad första behandling utförs livslång underhållsbehandling var tredje månad där 400-500 mL blod tappas respektive gång. Därmed reduceras också inlagringar i lever samt hjärta. Effekten verkar dock sämre på endokrina organ beroende på det ökade antalet mitokondrier tillsammans med färre antioxidanter än i levern. En reducerad behandlingseffekt ses också vid ledbesvär, vilka oftast behandlas tillsammans med eventuella endokrina besvär, utöver flebotomin. Hos patienter med känd hemokromatos kontrolleras även ferritinnivåerna regelbundet för att minimera risker för järninlagring (3, 6, 8, 11, 28).

2.4 Principiella steg för extraktion av deoxiribonukleinsyra (DNA) och Polymerase Chain Reaction (PCR)

Konventionell PCR är en mycket känslig teknik som har använts i diagnostiska och kliniska undersökningar sedan 1983 då vetenskapsmannen Kary Mullis uppfann teknologin. Mullis fick 10 år senare nobelpriset i kemi tillsammans med kemisten Mikael Smith (2, 32-33). Tack vare metodens snabba och sensitiva DNA-amplifikation, samt breda urval av provmaterial, kan till och med enstaka DNA-templat identifieras i provmaterial. (2, 33-38).

2.4.1 DNA extraktion

För att analysera prover med PCR-teknik krävs i många fall ett extraktionssteg där DNA renas fram från vita blodkroppar i provmaterialet, som exempelvis blod. Det sker vanligtvis via ett frigörande lyseringssteg antingen manuellt eller med extraktionsrobot (33). Manuell extraktion är kompetenskrävande och tar längre tid än automatiserad extraktion. (39). I dag finns det olika extraktionsmetoder för isolering av DNA som bygger på organisk-, oorganisk- samt fast fas isolering där proteinernas biokemiska egenskaper utnyttjas (33).

2.4.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR-metoden baseras på termocykling, det vill säga olika temperaturssteg som delar in tekniken i tre olika stadier; denaturering, hybridisering och extension vilka tillsammans utgör en cykel i amplifieringsreaktionen (33-37, 40).

2.4.2.1 PCR Mastermix

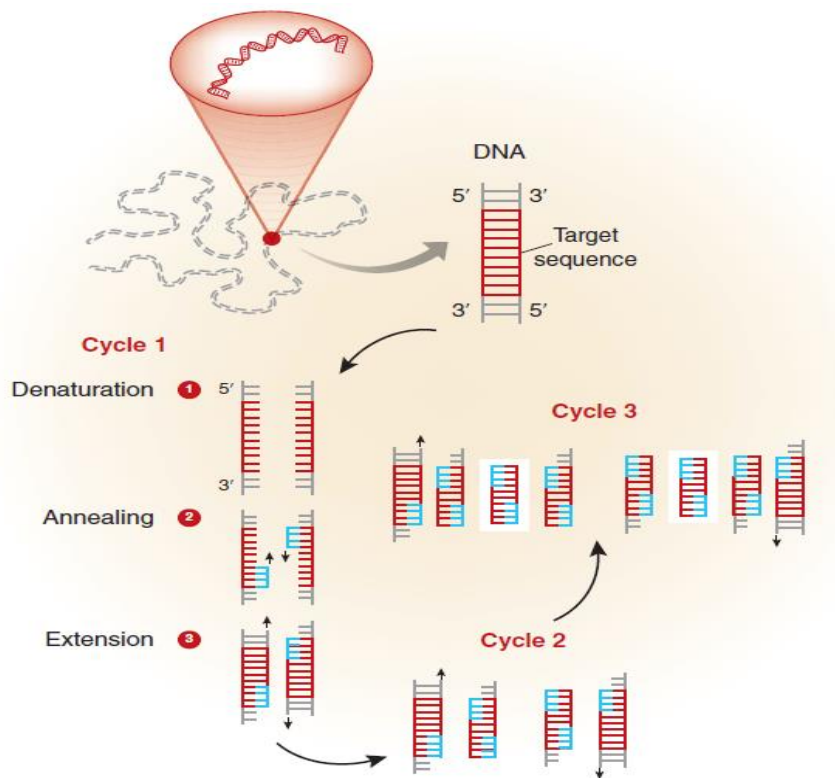
För fullständig transkription krävs, utöver templat, en förberedande mastermix som innehåller nödvändiga komponenter för en specifik amplifiering av en DNA-sekvens (35, 40). I mastermixen ingår 20-30 bp långa primers som är komplementära till målgenen som ska amplifieras. Primrarna utgör reaktionens specificitet och indikerar startpunkten för enzymet, det så kallade DNA-polymeraset. DNA-polymeraset, utvunnet från bland annat termofila patogenen *Thermus aquaticus*, producerar sedan miljontals kopior av önskad gensekvens. Dioxinukleotidtrifosfaterna (dNTPs); adenin, guanin, tymin och cytosin polymeriseras gentemot templatet och nya amplifierade komplementära DNA-kopior, amplikon, erhålls för varje cykel (33-37, 40). För miljöoptimering och bästa möjliga nukleotid- och primerinbindning ingår Tris-HCl baserad PCR-buffert i mastermixen, med ett pH på 8-9,5. Bufferten innehåller saltreglerande natriumklorid och ammoniumsulfat tillsammans med hybridiseringsreglerande magnesiumklorid ($MgCl_2$). $MgCl_2$ utgör en stor del av metodens effektivitet genom att påverka dNTPs inbindning mot DNA-templatet. Ytterligare en huvudroll för $MgCl_2$ ses i aktiveringen av DNA-polymeraset. Vid etylenediamintetraättiksyra (EDTA)-baserat provmaterial bör $MgCl_2$ -koncentrationen ökas då en reducerande effekt ses (33, 35-37).

2.4.2.2 PCR-amplifiering

PCR-amplifiering initialiseras med ett denatureringssteg, övergår i en primerhybridisering och avslutas med extension, varpå miljontals DNA-kopior byggs upp (Figur 4) (33-37, 40).

I denatureringsfasen luckras dubbelhelixen upp och dubbelsträngat (ds) DNA denatureras till två enkelsträngade (ss) DNA-fragment vid upphettning till 94-96°C (Figur 4). I nästa steg sänks temperaturen till 50-70°C och primrarna hybridiseras till den komplementära sekvensen på målgenen. Primerparet, en forward och en reversed primer, kräver alltså en närliggande temperatur, smältpunkt (T_m), som oftast behöver optimeras för en korrelerande inbindning mot templatets 3'- och 5'-ände. Detta relateras till metodens specificitet (2, 32-37, 40-41).

I cykelns tredje och sista steg, extensionen, stabiliseras temperaturen omkring 68-72°C där DNA-polymeraset aktiveras och extension inleds via primrarna, från 3' till 5' på DNA-templatet (Figur 4). Efter en cykel har kopiering av ett dsDNA duplicerats och i slutet av en konventionell PCR vid cirka 45 cykler detekteras kopiorna via Endpoint (2, 33-37, 40-41).

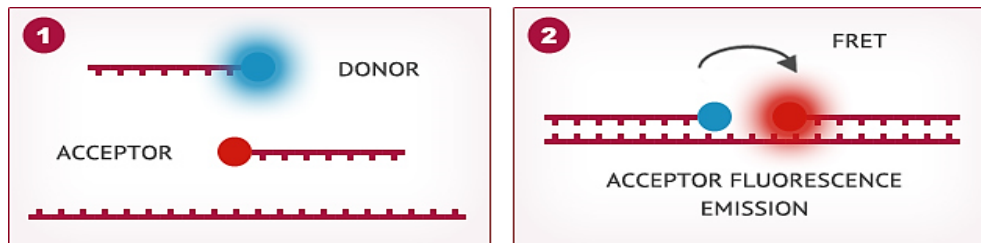


Figur 4. Schematisk bild över PCR-amplifiering. I en cykel ingår denaturering, hybridisering och extension i olika temperaturssteg (2, 40-41).

2.4.3 Realtids PCR

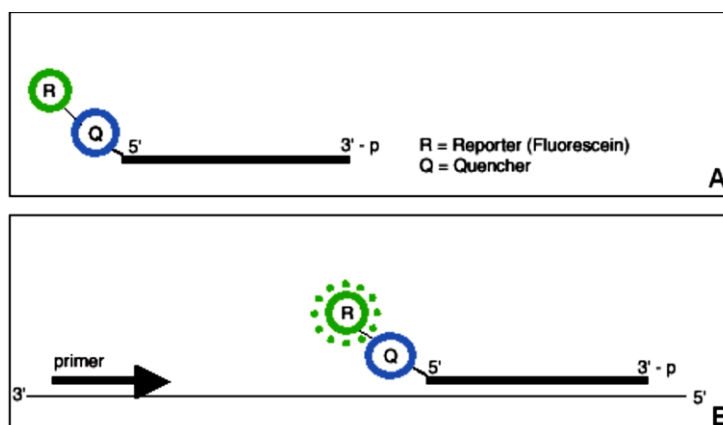
Realtids-PCR är ett detektionsbaserat replikeringsystem som ger möjlighet för direkt detektion av amplifierade gensekvenser vid varje cykel i realtid. Det finns flera olika detektionsformat för detta ändamål. Via exempelvis "LightCycler Instrument" kan specifikt designade hybridiseringsprober märkta med fluorokromer nyttjas för detektion av exempelvis genmutationer i realtid. Metoden är därmed snabbare än vanlig konventionell PCR som kräver ett post-amplifieringssteg för att synliggöra amplifierade produkter (33, 38, 40-44). Hybridiseringsproberna består av två oligonukleotider inmärkta med en donatorfluorokrom i 3'-änden och en mottagarfluorokrom i 5'-änden, kallad acceptormolekyl. Fluorokromerna har olika excitation- och emissionspektra där båda proberna är riktade mot närliggande sekvenser på målgenen. Inbindning sker i PCR-stegets hybridiseringsfas (Figur 5). Acceptormolekylen, exempelvis LightCyclerRed640, exciterar rött ljus via genererad energi ifrån donatormolekylen i 3'-änden, såsom Fluorescein (FAM) vilken exciteras av blått ljus till grön emission. Komplexbindningen utsänder fluorescerande emission vid 640 nm och är proportionell mot mängden DNA i provet som mäts vid varje cykel. Mekanismen där önskad gensekvens detekteras benämns för Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET). Vid för stort avstånd mellan acceptor- och donatormolekyl inhiberas FRET-mekanismen. Då hybridiseringsprober

utgörs av oligonukleotider är det också viktigt att hämma ospecifik amplifikation av fragmenten. Därför designas proben i 5'-ändan med en 3'-fosfat (PO₄)-molekyl. Proben i 3'-änden amplifieras inte då nukleotidsekvensen förblir motsatt gentemot enzymets transkription (33, 35-38, 40-46).



Figur 5. Schematisk bild över hybridiseringsprober i realtids-PCR. (1) Inbindning av acceptormolekyl mot denaturerat DNA exciterar ljus via genererad energi från intilliggande donatormolekyl (För detaljer se text ovan). **(2)** Komplexbindningen detekteras via FRET vid 640 nm (33, 35-38, 40-46).

Detektionsformatet SimpleProbe 519 bygger också på detektion med en enkelprob märkt med en reportertermolekyl så kallad FAM, och en quenchertermolekyl som reducerar signalen från FAM när proben är i lösning. Vid inbindning till templatet, i antingen 3'- eller 5'-änden, sjunker quencheraktiviteten samtidigt som FAM exciteras av blått ljus i instrumentet. Därpå alstras grön emission som detekteras vid 530 nm (38, 42-44).



Figur 6. Illustrerande bild för SimpleProbe 519 detektionsformat. (A) Enkelprob märkt med reportertermolekyl reducerar ljussignalen i lösning. **(B)** Quencheraktiviteten sjunker vid inbindning till DNA:t och reportern fluoresceras (För detaljer se text) (40-44).

Resultatet för realtids-PCR ger ett threshold cycle (CT)-värde, det vill säga det värde som motsvarar en exponentiell stegring av amplikonens fluorescens i den så kallade Lag-fasen. CT-värdet uppträder då fluorescensen överskrider ett tröskelvärde för bakgrundsbrus och genererar slutligen en kurva. Ju tidigare CT-värdet uppträder desto mer mängd DNA finns i provet.

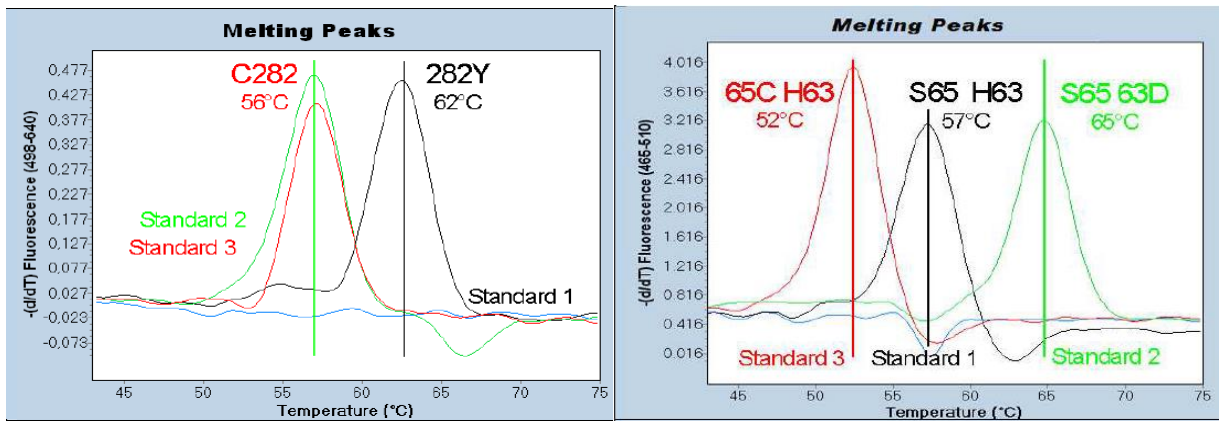
Kurvan rätas därefter linjärt upp till slutlig Plateau-fas där mättnad sker. Kurvorna bedöms sedan automatiserat via exempelvis LightCycler Instrument Software eller visuellt (33, 35-37).

2.4.4 Smältkurveanalys

För att bedöma och urskilja amplifierad produkt från eventuella biprodukter i provet kan smältkurveanalys användas som en påbyggd post-amplifieringsteknik efter Realtids-PCR, där exempelvis genotypning för homozygoti, heterozygoti och vildtyp utförs (33, 38, 40-44, 48). Smältkurveanalys baseras på en gradvis temperatursökning i ett intervall på ungefär 0,3 °C/sekund samtidigt som en kontinuerlig mätning av fluorescens sker. Fluorescenssignalen för respektive prob sjunker succesivt ju närmre temperaturen når probernas specifika T_m , det vill säga temperaturen då 50-% av proberna släpper bindningen mot templatet. Samtidigt avtar även fluorescensen och temperaturerna plottas upp i ett derivat av fluorescens mot temperatur (d/dT) där topparna motsvarar produktens T_m (Figur 7). Beroende på DNA-uppsättningen samt graden av homologi binder hybridiseringsproberna olika. Baserna A-T, vilka består av två vätebindningar, har ett lägre T_m gentemot G-C komplexen, som innehåller tre starkare vätebindningar och är svårare att bryta. Fler vätebindningar medför ett högre T_m (33, 36, 40-44, 48).

2.4.5 Multiplex analys

Med sekvensspecifika primers och hybridiseringsprober märkta med olika fluorokromer, är det möjligt att detektera multipla amplifierade genvarianter i en simultan reaktion där flera produkter erhålls samtidigt. Via olika färgspektra skiljs produkterna åt i olika emissionskanaler där mätningen av T_m vanligtvis sker vid två skilda våglängder i respektive kanal, såsom 530 nm och 640 nm (Figur 7). Analysen sker exempelvis med mjukvaran LightCycler Software Multi-Color Detection. En avgörande och påverkande faktor på T_m ses dock i probernas design samt inmatchning mot DNA-templatet. En mest perfekt och stark passform utformas vid mutation medan vildtyp matchas mindre mot proben, vilka därmed erhåller lägre T_m och kan skiljas (38, 40-44, 48). Tekniken kräver däremot högre optimering för att utesluta fluorescensöverlappning av emissionstopparna som kan uppstå då fler fluorokromer deltar simultant i analysen för respektive genvariant. Detta kan resultera i svårtolkad data och bör kompenseras. Kompensering, som expanderar möjligheten för detektion av flera färgspektra samtidigt, utförs via color compensation innehållande kalibrering och matematiska logaritmer (33, 39, 43, 47).



Figur 7. Illustrativ bild över smältkurvor för Standard 1-3 i LightMix® *in-vitro* diagnostics kit HFE H63D S65C C282Y i kanal 640 nm och kanal 530 nm. I kanal 640 nm uppträder smältpunkter för *HFE* c.845G>A. Positiva kontrollen Standard 1 (svart linje) mäter en smältpunkt på 62°C, vilket resulterar i homozygot muterad c.845A/A. Standard 2 (grön linje) uppträder vid 56°C och motsvarar c.845G/G vildtyp. Likaså för Standard 3 (röd linje) som resulterar i 56°C, alltså c.845G/G vildtyp. I kanal 530 nm uppträder smältpunkter för *HFE* c.187C>G och c.193A>T. Standard 1 (svart linje) medför en smältpunkt på 57°C vilket motsvarar c.193A/A c.187C/C vildtyp. Standard 2 (grön linje) resulterar i smältpunkt vid 65°C alltså homozygot muterad c.187G/G och Standard 3 (röd linje) uppträder vid 52°C, vilket motsvarar homozygot muterad c.193T/T. Vid heterozygoti ses två smältpunkter i respektive kanal. I båda kanalerna ses NTC (blå linje) utan smältpunkt, alltså negativ (24, 38, 40-44).

3. Syfte

Syftet med studien var att verifiera det kommersiella kitet LightMix[®] *in-vitro* diagnostics kit HFE H63D S65C C282Y för kvalitativ diagnostik av hemokromatos med avseende på HFE genotyper c.845G>A c.187C>G c.193A>T med Realtids-PCR på instrumentet LightCycler Cobas[®] Z x 480 för eventuell införsel i rutindiagnostik.

4. Material och metod

Studien utfördes vid laboriemedicin, Medicinsk diagnostik, Länssjukhuset Ryhov i Region Jönköpings Län, Sverige, under perioden 4 april till 6 maj 2016 och baserades på en kvalitativ allel-specifik oligonukleotid hybridisering med realtid-PCR samt smältkurveanalys för *HFE* genotypning.

4.1 Urval och provmaterial

Provmaterialet bestod av 49 stycken avidentifierade engångsfrysta etylenediamintetraättiksyra (EDTA) blodprover insamlade 2008 och 2016, tagna på patienter med misstänkt HH. Proverna representerade vanligare genotyper för respektive genvariant. Materialet var insamlat vid det klinisk kemiska laboratoriet vid Hallands sjukhus.

4.1.1 Extraktion

Blodproverna extraherades med instrumentet Bullet Pro (DiaSorin, Dublin, Irland) med magnetkuleextraktionskitet Bullet Blood DNA 50® (DiaSorin) enligt tillverkarens instruktioner. Extraktionsvolymen bestod av 50 µL helblod och extraherat DNA eluerades i 50 µL elueringsbuffert. DNA-koncentrationen mättes därefter med NanoDrop ND1000 Spectrophotometer version 3.3.0 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) enligt lokala laboratorieanvisningar.

4.1.2 Förvaring av prover och reagens

Eluaten överfördes automatiskt till 96 PCR plate Half-Skirted Standard Profile (VWR European, Leuven, Tyskland) och förseglades manuellt med 4titude Piercable Adhesive Seal (4titude, Wotton, England). Plattan förvarades i kyla vid 4-5°C om analys inte utfördes inom 30 dagar från extraktion. Vid längre uppehåll frystes extraktionsproverna vid < -18°C. Ingående reagenser erhöles ifrån kit LightMix® *in-vitro* diagnostics kit HFE H63D S65C C282Y (Cat.-No.: 40-0340-32, TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Tyskland) (LightMix-kitet) bereddades och förvarades enligt tillverkarens rekommendationer. Frystorkade Parameter Specific Reagents (PSR) samt standarder (Plasmid DNA), förvarades i rumstemperatur mellan 18-25°C skyddat från ljus. Polymerasmix LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe förvarades fryst i -15--20°C tillsammans med magnesiumklorid (MgCl₂) och PCR H₂O. Överbliven spädd PSR, standarder och MgCl₂ kylförvarades i 4-8°C under maximalt 30 dagar. Blandad LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe förvarades i 4-8°C under maximalt 7 dagar.

4.2 Analys med Realtids-PCR och smältkurveanalys

4.2.1 Mastermix preparation

Ingående primer och prober för LightMix-kitet är både Conformité Européenne (CE)- samt *in vitro*-diagnostik (IVD)-märkt, och därmed validerat för rutindiagnostik. Primrarna och proberna var riktade mot c.845G>A, c.187G>C och c.193T>A, samt internkontroller i form av plasmid-DNA. Hybridiseringsproberna var märkta med LightCyclerRed640 för acceptormolekylen och FAM för donatormolekylen där båda matchade varianten c.845G>A vars fluorescens detekterades vid 640 nm (Figur 5). Den enkla proben Simple Probe[®] 519, vilken utgjorde quencher-molekylen bunden till reporter-molekylen FAM, var designad för perfekt match mot G-varianten av c.187C>G och detekterades vid 530 nm (Figur 6). Med samma prob detekterades även varianten c.193A>T som finns beläget endast sex nukleotider ifrån c.187C>G och påvisas också vid 530 nm (Figur 6). Målsekvenserna för primers och prober framgick inte i kitbeskrivningen. Reagenser, enzym och mastermix bereddades enligt tillverkarens instruktioner (Tabell 1).

Tabell 1. Mastermixrecept för preparering beroende på önskat antal reaktioner (n) enligt tillverkarens instruktioner (24).

LightCycler [®] Reaction Mix Komponenter	1 reaktion	n reaktioner
PCR H ₂ O	9.4 µl	9.4 µl x n
Parameter Specific Reagent (PSR)	2.0 µl	2.0 µl x n
Mg ²⁺ -lösning 25 mM	1.6 µl	1.6 µl x n
LightCycler [®] FastStart DNA Master HybProbe (1a+1b)	2.0 µl	2.0 µl x n
Totalvolym	15.0 µl	15.0 µl x n

4.2.2 Kontroller och externa standarder

I respektive analys nyttjades tre positiva kontroller (Standard 1-3). Kontrollerna bestod av Standard 1 som var homozygot muterad för A-varianten av HFE c.845G>A, Standard 2 var homozygot för G-varianten HFE c.187C>G och Standard 3 homozygot muterad för T-varianten HFE c.193A>T. Standard 2 och 3 representerade även vildtyp för HFE c.845G>C medan Standard 1 representerade vildtyp för resterande två genvarianter (Figur 7). Ytterligare tre genotypsstandarder bereddades enligt tillverkarens anvisningar utifrån Standard 1-3 för att erhålla exempel på heterozygota prover. Dessa totalt 6 standarder analyserades separat och sparades som en extern mall, vilken tillämpades vid genotypning av okända prover i syfte att underlätta tolkningen av respektive provs genotyp. För varje analys användes negativ templat kontroll (NTC) bestående av PCR-vatten för att kontrollera eventuella kontaminationer.

4.2.3 Provapplicering, kalibrering och analys

För varje prov pipetterades 15 µL mastermix i brunnar på en LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 well, white (Roche Diagnostics, GmbH, Berlin, Tyskland). Därefter tillsattes 5 µL extraherat DNA-templat från respektive prov, NTC och Standard 1- 3 i varsin brunn. En totalvolym på 20 µL erhöles i alla brunnar. Plattan förslöts därefter med vidhäftande LightCycler 480 Sealing Foil (Roche Diagnostics) och centrifugerades vid 3610 g under 2 minuter för vidare analys i LightCycler Cobas® Z480 Instrument (Roche Diagnostics) med rekommenderad termoprofil (Tabell 2).

Tabell 2. Termoprofil för Realtids-PCR. För respektive analys exklusive optimering vid 50 cykler, nyttjades följande termoprofil med 45 cykler.

Steg	1	2			3			4
Parameter	Analys							
	Ingen Initiering	Kvantifiering			Smältkurvor			Ingen
		Denaturering	Annealing	Extension				
Cyklar	1	45			1			1
Temperatur	95	95	60	72	95	43	75	40
Tid	10 min	5 sek	10 sek	15 sek	30 sek	2 min	0 sek	30 sek
Hastighet (96 prover)	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	0.29	1.5

4.2.4 Bedömning

Standarderna och patientprovernas T_m bedömdes enligt kitbeskrivningen tillsammans med vetenskaplig- och metodhandledare (Figur 7). Analysen utfördes med mjukvaran LightCycler® 480 SW 1.5.0 (Roche Diagnostics) i instrumentet där externa mallen för genotypsstandarder importerades tillsammans med topparnas exakta T_m för tolkning. Vid bedömning tillämpades color compensation för att kunna urskilja signaler från kanal 530 nm respektive kanal 640 nm.

4.3 Optimering av reaktionsbetingelser

Metoden optimerades via justering av termoprofilens antal cykler och ingångsmängden DNA.

4.3.1 Optimering av termoprofil

Termoprofilens antal cykler justerades från 45 till 50 cykler med syftet att utvärdera ifall signalstyrkan i kanal 530 nm kunde höjas. Tre slumpmässigt utvalda blodprover från urvalet användes för optimeringen. Icke-manipulerat analysresultat, där 45 cykler nyttjades, jämfördes gentemot analysresultat för 50 cykler. Utseendet på kurvorna och fluorescensen bedömdes visuellt och rådata överfördes till en Excel-fil (se rubrik 4.3.2, 4.3.3 och 4.3.4) (Tabell 2).

4.3.2 Optimering av ingångsmängd DNA

Standardisering av DNA-koncentrationen till 6 ng/μL justerades i syfte om att utvärdera ifall lägre koncentrationer kunde höja signalstyrkan. Ingångsvolymer 6 ng/μL testades för tre slumpmässigt utvalda patientprover från Halmstad och jämfördes gentemot icke-justerade extraktionskoncentrationer från samma prover. Utseendet på kurvorna och fluorescensen bedömdes visuellt och rådata överfördes till en Excel-fil (se rubrik 4.3.2, 4.3.3 och 4.3.4) (Tabell 2).

4.4 Imprecision

För metodverifiering utfördes inomserie- samt mellanserievariationstest.

4.4.1 Inomserievariation

För inomserievariation analyserades två olika patientprover från urvalet. Ett prov var heterozygot för c.845G>A och ett prov heterozygot för c.187G>C. Proverna analyserades i 10 replikat vardera på en och samma 96-hålsplatta (se rubrik 4.2.1). Utseendet på kurvorna, T_m och fluorescensen bedömdes visuellt och rådata överfördes till en Excel-fil (se rubrik 4.3.2, 4.3.3 och 4.3.4) (Tabell 2).

4.4.2 Mellanserievariation

För bestämning av mellanserievariationen inkluderades fyra patientprover från urvalet. Två prover bestod av heterozygot genuppsättning, ett prov bestående av c.845G>A och ett prov med varianten c.193A/T c.187C/G. Resterande två prover utgjorde homozygot uppsättning, ett prov muterat för c.845G>A och ett prov för c.187G>C. Alla prover extraherades i replikat om åtta i en och samma extraktionsomgång. Dessa analyserades i åtta separata körningar med åtta olika mastermixar. Första mellanserievariationstestet inkluderade NTC och Standard 1-3, resterande sju test analyserades exklusive kontroller. Utseendet på kurvorna, T_m och fluorescens bedömdes visuellt där rådata överfördes till en Excel-fil (se rubrik 4.3.2, 4.3.3 och 4.3.4) (Tabell 2).

4.5 Samstämmighet mot externa laboratorier samt gentemot annan metod

För utvärdering av samstämmighet gentemot externa laboratorier användes resultat från klinisk kemiska laboratoriet vid Hallands sjukhus där samma metod använts. Det var totalt 49 prover som representerade genotyperna som metoden detekterar. Tjugo av proverna skickades för ytterligare samstämmighet mot externt laboratorium på laboratoriemedicin vid Universitetssjukhuset Örebro, där en typningsmetod baserad på pyrosekvensering nyttjades.

4.6 Statistik bearbetning

Beräkning utfördes av medelvärde, median, standardavvikelse (SD), variationskoefficient (CV%) samt minimum- och maximumvärde för genotypernas T_m i respektive kanal samt för resultaten av mellanserie- och inomserievariationstesten. Provresultaten beräknades via deskriptiv statistik i frekvenstabeller där all erhållen rådata bearbetades via IBM SPSS® Statistics version 21 (IBM Svenska AB, Stockholm, Sverige). Utifrån erhållen data gavs förslag till bedömningsmall.

5. Etiska överväganden

Provmaterialet bestod av avkodade blodprover med kända genotyper märkta med laborationsnummer. Proverna erhöles från rutinverksamheten vid klinisk kemiska laboratoriet, Hallands sjukhus och studerades inte för enskilda prover utan i grupp där materialet inte var kopplingsbart till individerna. Inget godkännande krävdes då studien byggde på en kvalitetsutveckling.

6. Resultat

I studien har samtliga 49 prover genotypats för *HFE*-mutationerna med det diagnostiska LightMix-kitet (Bilaga 1). Cirka 39 % av patientproverna utföll i total vildtyp för båda kanalerna. Tolv av 49 prover (~24 %) utföll i genotyp c.845G>A varav ~42 % resulterade i homozygot uppsättning och ~58 % i heterozygoti. Sexton prover (~33 %) genotypades till c.187G>C med en prevalens på ~19 % för homozygoti och ~81 % i heterozygot uppsättning. Resterande 4 prover (~8%) bedömdes vara heterozygota för genotypen c.193T>A varav ett av proverna resulterade i kombinerad heterozygoti för c.187C>G c.193A>T. Ytterligare ett prov genotypades till en kombinerad form där c.845G/A c.187C/G identifierades. Frekvensen för kombinerad form kalkylerades till ~4 %. Heterozygot uppsättning av genotypen c.187C>G dominerade med 13 positiva utfall.

6.1 Prov-till-prov variation

Vid analys med LightCycler Cobas® Z480 Instrument kunde T_m -värden för alla smälttoppar från både kanal 640 nm och 530 nm erhållas. PTC och NTC gav förväntat resultat och analysen bedömdes vara godkänd för vidare databearbetning. Medelvärde (Mv), median (Med), standardavvikelse (SD), variationskoefficient (CV%) samt minimum- och maximumvärde för respektive T_m presenteras i Tabell 3.

Tabell 3. Statistisk sammanställning av samtliga provresultat från urvalet (Bilaga 1). I tabellen framkommer statistiska variabler gentemot T_m för respektive kanal där genotyperna c.845G>A, c.187C>G och c.193A>T yttras.

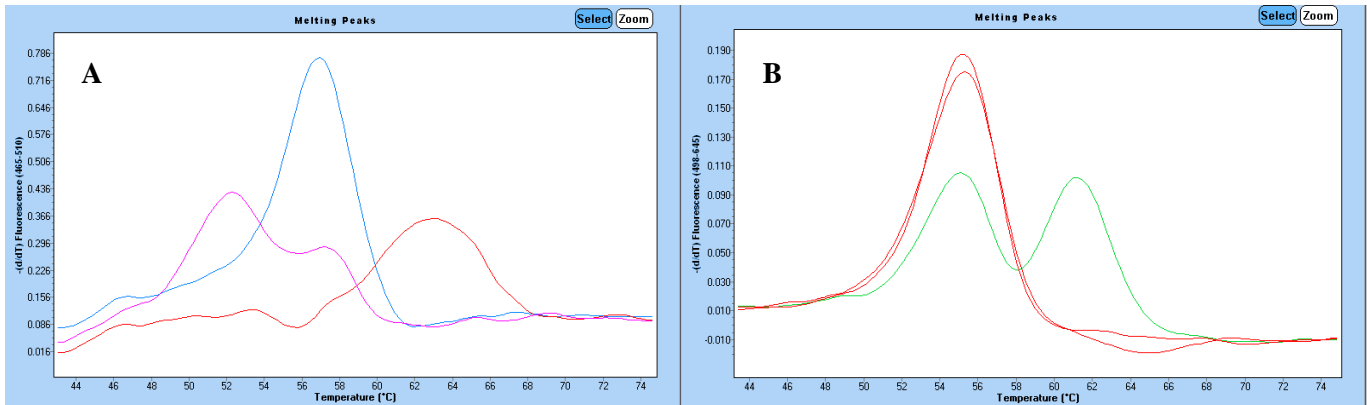
	Kanal 640		Kanal 530		
	T_m 56 (845G)	T_m 62 (845A)	T_m 52 (193T)	T_m 57 (193A/187C)	T_m 65 (187G)
N	44	12	4	45	16
Mv	55,07	61,32	51,99	56,83	64,27
Med	55,08	61,35	51,98	56,82	64,4
SD	0,19	0,11	0,21	0,25	0,47
CV%	0,04	0,01	0,04	0,06	0,22
Min	54,24	61,11	51,77	56,37	62,8
Max	55,6	61,48	52,22	57,47	64,81

*Antal (N), Medelvärde (Mv), Minimumvärde (Min), Maximumvärde (Max), Standardavvikelse (SD), Variationskoefficient (CV%), Smältpunkt °C (T_m)

6.2 Optimering av reaktionsbetingelser

Vid optimering av metod för genotypning av *HFE* i LightCycler Cobas® Z480 Instrument med LightMix-kitet följdes rekommendationerna i kitet för termoprofil och ingångsmängd extraherat DNA. En låg fluorescens visualiserades vid analys med 45 cykler för patientproverna HFE 103,

HFE 109 och HFE 112. Provresultaten gentemot Standard 1-3 bedömdes ligga lågt i kanal 530 nm (Figur 8).



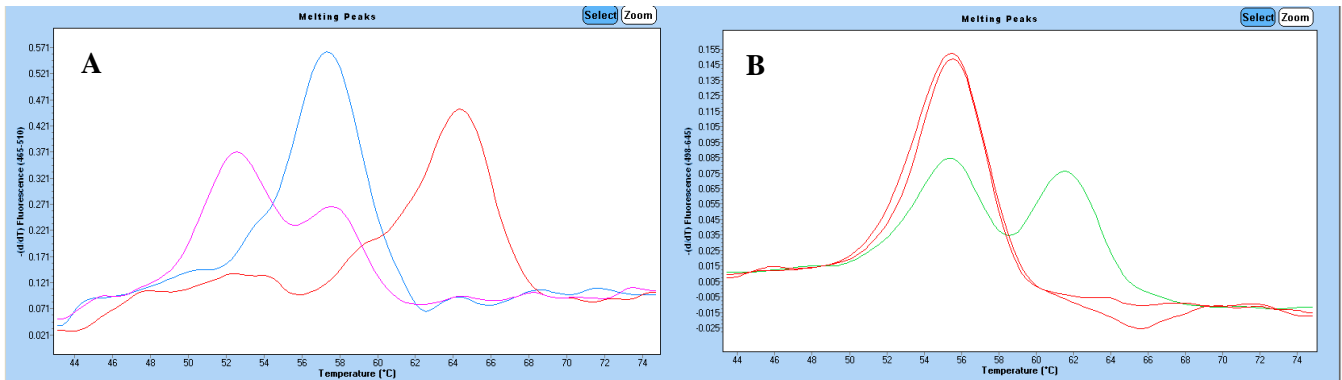
Figur 8. Smältkurvor för 45 cykler. (A) Representerat fluorescens för prov HFE 103, HFE 109 och HFE 112 i både kanal 530 nm samt 640 nm. I kanal 530 nm framträder HFE 103 (blå linje) med fluorescens på 0,780 d/dT, HFE 109 (röd linje) med 0,360 d/dT och HFE 112 (rosa linje) med två fluorescenser på 0,430 d/dT och 0,290 d/dT. (B) I kanal 640 nm framträder HFE 103 (grön linje) med två fluorescenser på 0,100 d/dT och 0,097 d/dT, HFE 109 (röd linje) med fluorescens på 0,173 d/dT och HFE 112 (rosa linje) med 0,185 d/dT.

6.2.1 Optimering av termoprofil

Att öka cykelantalet från 45 cykler till 50 cykler gav ingen större effekt på provernas fluorescensintensitet för smälttopparna vid en visuell bedömning av kurvorna (Figur 8, Figur 9). Standard 1-3 utföll med något högre fluorescensintensitet vid 50 cykler gentemot 45 cykler (Tabell 4).

Tabell 4. Fluorescensintensitet för respektive standard i kanal 640 nm och 530 nm vid analys med 45 cykler respektive 50 cykler.

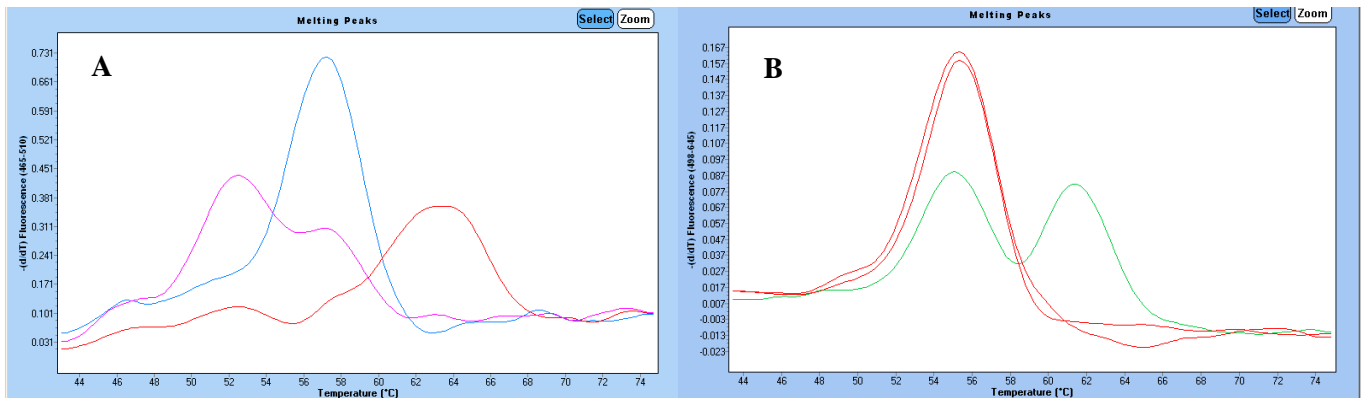
	Fluorescens (d/dT)			
	Kanal 640 nm		Kanal 530 nm	
	45 cykler	50 cykler	45 cykler	50 cykler
Standard 1	0,27	0,45	1,25	3,4
Standard 2	0,22	0,27	1,29	1,58
Standard 3	0,21	0,23	1,4	1,72



Figur 9. Smältkurvor för 50 cykler. (A) Representerat fluorescens för prov HFE 103, HFE 109 och HFE 112 i både kanal 530 nm samt 640 nm. I kanal 530 nm framträder HFE 103 (blå linje) med fluorescens på 0,560 d/dT, HFE 109 (röd linje) med 0,450 d/dT och HFE 112 (rosa linje) med två fluorescenser på 0,370 d/dT och 0,260 d/dT. (B) I kanal 640 nm framträder HFE 103 (grön linje) med två fluorescenser på 0,084 d/dT och 0,076 d/dT, HFE 109 (röd linje) med fluorescens på 0,150 d/dT och HFE 112 (röd linje) med 0,149 d/dT.

6.2.2 Optimering av ingångsmängd DNA

Att reducera mängden DNA till en standardiserad ingångsmängd på 6 ng/μl för respektive prov, det vill säga en ingångsmängd på 30 ng/μl för PCR-reaktion, påverkade inte fluorescensintensiteten för smälttopparna nämnvärt (Figur 8, Figur 10, Bilaga 1).



Figur 10. Smältkurvor för ingångsmängden DNA 6 ng/μl. (A) Representerat fluorescens för prov HFE 103, HFE 109 och HFE 112 i både kanal 530 nm samt 640 nm. I kanal 530 nm framträder HFE 103 (blå linje) med fluorescens på 0,710 d/dT, HFE 109 (röd linje) med 0,350 d/dT och HFE 112 (rosa linje) med två fluorescenser på 0,430 d/dT och 0,300 d/dT. (B) I kanal 640 framträder HFE 103 (grön linje) med två fluorescenser på 0,087 d/dT och 0,081 d/dT, HFE 109 (röd linje) med fluorescens på 0,160 d/dT och HFE 112 (röd linje) med 0,155 d/dT i kanal 640 nm.

6.3 Imprecision

Imprecisionstest omfattade inomserievariation samt mellanserievariation.

6.3.1 Inomserievariation

Resultaten från inomserievariationstest för respektive två heterozygota patientprover resulterade i närliggande T_m -värden för proverna HFE 135 med genotyp c.845G/A och HFE 137 med genotyp c.193A/T c.187C/G (Tabell 5, Bilaga 2).

Tabell 5. Statistisk sammanställning av inomserievariation (Bilaga 2). I tabellen framkommer statistiska variabler gentemot T_m för respektive kanal där genotyperna var c.845G/A, c.187C/G och c.193A/T för proverna HFE 135 och HFE 137.

	HFE 135 (845G/A)					HFE 137 (193A/T 187C/G)				
	Kanal 640 nm		Kanal 530 nm			Kanal 640 nm		Kanal 530 nm		
	T _m 56 (845G)	T _m 62 (845A)	T _m 52 (193T)	T _m 57 (193A/ 187C)	T _m 65 (187G)	T _m 56 (845G)	T _m 62 (845A)	T _m 52 (193T)	T _m 57 (193A/ 187C)	T _m 65 (187G)
Mv	54,76	61,39	-	56,82	-	55,26	-	51,72	-	64,30
Min	54,66	61,27	-	56,77	-	55,22	-	51,60	-	64,01
Max	54,87	61,52	-	56,90	-	55,37	-	51,83	-	64,49
SD	0,06	0,06	-	0,05	-	0,04	-	0,09	-	0,15
CV%	0,11	0,10	-	0,08	-	0,08	-	0,17	-	0,23

* Medelvärde (Mv), Minimumvärde (Min), Maximumvärde (Max), Standardavvikelse (SD), Variationskoefficient (CV), Smältpunkt °C (T_m)

6.3.2 Mellanserievariation

Resultaten som erhöles för mellanserievariationstesten för respektive fyra prover, vilka omfattade två heterozygota med genotyperna c.845G/A och c.193A/T c.187C/G och två homozygota prover med genotyperna c.845A/A och c.187G/G från urvalet, resulterade också i närliggande T_m-värden för båda kanalerna (Bilaga 3, Tabell 6, Tabell 7).

Tabell 6. Statistisk sammanställning av mellanserievariation (Bilaga 3). I tabellen framkommer statistiska variabler gentemot T_m för respektive kanal där genotyperna var c.845G/A, c.187C/G och c.193A/T för proverna HFE 135 och HFE 137.

	HFE 135 (845G/A)					HFE 137 (193A/T 187C/G)				
	Kanal 640 nm		Kanal 530 nm			Kanal 640 nm		Kanal 530 nm		
	T _m 56 (845G)	T _m 62 (845A)	T _m 52 (193T)	T _m 57 (193A/ 187C)	T _m 65 (187G)	T _m 56 (845G)	T _m 62 (845A)	T _m 52 (193T)	T _m 57 (193A /187C)	T _m 65 (187G)
Mv	54,74	61,32	-	56,85	-	55,29	-	51,70	-	64,37
Min	54,53	61,12	-	56,62	-	55,21	-	51,57	-	64,28
Max	54,82	61,53	-	56,97	-	55,37	-	51,83	-	64,45
SD	0,10	0,14	-	0,11	-	0,05	-	0,09	-	0,05
CV%	0,18	0,23	-	0,20	-	0,09	-	0,17	-	0,08

* Medelvärde (Mv), Minimumvärde (Min), Maximumvärde (Max), Standardavvikelse (SD), Variationskoefficient (CV), Smältpunkt °C (T_m)

Tabell 7. Statistisk sammanställning av mellanserievariation (Bilaga 3). I tabellen framkommer statistiska variabler gentemot T_m för respektive kanal där genotyperna var c.845G/A, c.187C/G och c.193A/T för proverna HFE 142 och HFE 145.

	HFE 142 (845A/A)					HFE 145 (187G/G)				
	Kanal 640 nm		Kanal 530 nm			Kanal 640 nm		Kanal 530 nm		
	T_m 56 (845G)	T_m 62 (845A)	T_m 52 (193T)	T_m 57 (193A/ 187C)	T_m 65 (187G)	T_m 56 (845G)	T_m 62 (845A)	T_m 52 (193T)	T_m 57 (193A/ 187C)	T_m 65 (187G)
Mv	-	61,28	-	57,03	-	55,04	-	-	-	64,32
Min	-	61,14	-	56,90	-	55,00	-	-	-	64,22
Max	-	61,35	-	57,12	-	55,24	-	-	-	64,53
SD	-	0,08	-	0,09	-	0,08	-	-	-	0,10
CV%	-	0,14	-	0,15	-	0,14	-	-	-	0,15

* Medelvärde (Mv), Minimumvärde (Min), Maximumvärde (Max), Standardavvikelse (SD), Variationskoefficient (CV), Smältpunkt °C (T_m)

6.4 Sammanstämmighet mot externt laboratorium samt gentemot annan metod

Alla 49 prover, vilka jämfördes kvalitativt gentemot det externa klinisk kemiska laboratoriet Hallands sjukhus med referensmetod DNA hemokromatos (HFE) genotyp LightCycler System, rådde 100 % samstämmighet gentemot denna studies genotypning (Bilaga 1). Tjugo prover, vilka jämfördes kvalitativt gentemot annan referensmetod på laboratoriemedicin vid Universitetssjukhuset Örebro där pyrosekvensering nyttjades, rådde också 100 %-ig överensstämmelse (Bilaga 1).

6.5 Förslag till bedömningsmall

Andra genotypningsmetoder baserade på Realtids-PCR och smältkurveanalys vid laboratoriet använder en acceptabel spridning på ± 1 °C gällande T_m , motsvarande ± 2 SD. Baserat på spridningen i T_m från prov-till-prov och imprecisionstest kan dessa gränser anses vara lämpliga även i detta fall och förslag till bedömningsmall redovisas (Tabell 8, Bilaga 1, Bilaga 2, Bilaga 3).

Tabell 8. Sammanställning av bedömningsmall (Bilaga 1). I tabellen framkommer medelvärdet gentemot T_m för respektive prov i båda kanalerna. Ett förslag till nytt SD på ± 2 SD gjordes, detta medför ett temperaturintervall på ± 1 °C.

	Kanal 640		Kanal 530		
	c.845G/G	c.845A/A	c.193T/T	c.193A/A c.187C/C	c.187G/G
Mv	55,07	61,32	51,99	56,83	64,27
± 2 SD	54,07-56,07	60,32-62,32	50,99-52,99	55,83-57,83	63,27-65,27

7. Diskussion

I denna studie var syftet att verifiera kitet LightMix[®] *in-vitro* diagnostics kit HFE H63D S65C C282Y för genotypning av HH. LightMix-kitet detekterade nukleotidförändringarna c.845G>A, c.187G>C och c.193T>A med hjälp av Realtids-PCR med efterföljande smältkurveanalys. Alla 49 inkluderade patientprover kunde genotypas där största andelen av patientproverna utföll i total vildtyp för båda kanalerna, likt förväntat (Bilaga 1). I vår studie framkom en högre frekvens av genotypen c.187C>G där heterozygot uppsättning dominerade med 13 positiva utfall. Enligt en observationsstudie där 9650 vuxna individer genotypades för laborativ jämförelse med kliniska fynd framkom en högre frekvens av mutationen c.845G>A i homozygot uppsättning bland kaukasier, vilket avvek ifrån våra utfall med en lägre frekvens på ~24 % resulterade i genotyp c.845G>A (30). Däremot redovisar observationsstudien också en högre prevalens för c.187C>G i andra etniska grupper, däribland asiater och latinamerikaner, vilket i vår studie resulterat i totalt ~33 % (30). Orsaken till avvikandet i vår studie tros bero på ett riktat urval där insamlingen baserats täcka respektive mutationssekvens och flertal mer ovanliga mutationer identifierades för HH. En annan trolig bakomliggande orsak i detta fall antas bero på slumpen eftersom utomstående etniska grupper dominerat i urvalet där *HFE*-genotypen c.187C>G har en högre prevalens (1, 10, 31). Den ovanliga heterozygota mutationsformen c.193A>T sågs, likt tidigare studie, i lägst frekvens även här då 4 prover utföll i c.193T>A (1, 31). I ytterligare jämförelse med tidigare nämnd studie, kan prevalensen uppfattas något förhöjt, där ett större icke-riktat urval vilket generellt medför en lägre siffra (30). I en annan kohort-studie där *HFE*-genotyp undersöktes hos 156 högrisk löpande individer, redovisas en prevalens på cirka sju procent bärande på homozygot c.845G>A. Tio procent visade heterozygoti för genvarianten. Sex procent av urvalet var homozygota för c.187C>G medan 23 % utföll heterozygot. Ytterligare fyra procent visade kombinerad heterozygot anlag för båda generna, vilket visade samstämmighet gentemot vår studie där frekvensen för kombinerad form kalkylerades till totalt ~4 % (Bilaga 1) (38). Resterande 51-% i tidigare nämnda kohort-studie bedömdes till vildtyp, alltså ingen genetisk defekt (38). Ytterligare en samstämmighet observerades här gentemot vår studie.

7.1 Avvikande ifrån kit-rekommendationer

Enligt kittillverkarens rekommendationer för extraktion anges specifikt utvalda extraktionsmetoder för användning, där bland annat High Pure PCR Template Preparation Kit eller extraktionsrobot MagNA Pure med tillhörande extraktionskit benämns. I studien gjordes ett avvikande från rekommendationerna. Istället nyttjades extraktionskitet Bullet Blood DNA 50[®] som endast fanns tillgängligt på laboratoriet och bedömdes vara likvärdigt. Respektive

extraherat prov erhöj en DNA-koncentration över 5 ng/ μ L (6-43,2 ng/ μ L), vilket utgjorde ett minimumkriterie för LightMix-kitet, bedömdes extraktionen ge tillräckligt hög mängd DNA. Ytterligare godkännande av utbytt extraktionskit, kunde fastställas då prover med låg DNA-koncentration också kunde genotypas. Exempelvis prov HFE 109 med extraktionskoncentration på 7,8 ng/ μ L resulterade i homozygot c.187C>G. I en tidigare kvalitetsutvecklande studie där 11 olika extraktionsmetoder utvärderades med hjälp av genomiskt DNA och blodprover, framfördes att mängden DNA förknippas med olika Ct-värden där en hög DNA-koncentration medför låga Ct-värden (49). Detta kan i sin tur inhibera mätningen i smältkurveanalysen. I vår studie bedömdes dock inte genotyperna efter Ct-värden utan från erhållna T_m då kitets prober designades för att binda perfekt mot den muterade sekvensen jämfört med motsvarande vildtyp under termoprofilens hybridiseringssteg. Därmed kunde inte alla amplifierade kopior detekteras via kitets detektionsformat då prober binder sämre för prover utan mutationer (24, 38, 40-44, 48). För att utesluta felkällan i vår studie analyserades även extraktionsprover med höga DNA-koncentrationer. Två prover med högst DNA-koncentration på 43,2 ng/ μ L vardera, analyserades i normal termoprofil utan anmärkningar då T_m bedömdes vara godkänt eftersom båda proverna resulterade i en detekterad genotyp, i det här fallet var det en vildtyp.

7.2 Optimering av reaktionsbetingelser

Optimering av reaktionsbetingelser utfördes stegvis enligt LightMix-kitet, i syfte om att höja fluorescensintensiteten för smälttopparna där optimala förutsättningar för analys ville åstadkommas. Samtliga analyser bedömdes godkända om NTC och Standard 1-3 erhöj förväntat resultat. För att få uppfattning kring resultatens utgångsläge analyserades tolv prover tillsammans med standarder och genotypsstandarder. Resultaten som erhöj i ursprungsfallet visade något låga fluorescensintensiteter för smälttopparna, i framförallt kanal 530 nm. Dock erhöj genotyperna automatiskt.

För att optimera fluorescensintensiteten för smälttopparna rekommenderade tillverkaren en cykelökning från 45 cykler, det vill säga ursprunglig termoprofil, till 50 cykler. Ingen markant skillnad detekterades i fluorescensintensiteten i smälttopparna för 45 cykler och 50 cykler vid en visuell bedömning där enbart små intensitetssänkningar observerades (Tabell 4, Figur 8, Figur 9). Resultaten är svåra att förklara, men tros bero på att den större mängden inbundna fluorescerande prober vid 50 cykler inte gav större signal som förväntat, i jämförelse med tidigare fall med 45 cykler trots fler amplifierade DNA-fragment vilka bör binda fler prober. En trolig bakomliggande orsak till fluorescenssänkningarna för smälttopparna kan bero på det

ökande antalet DNA-kopior som medför en anemisk reaktion, vilket framgår i en tidigare litteraturstudie kring optimering och felsökning av PCR (50).

Ytterligare en uteslutande faktor för termoprofilsändring till 50 cykler berodde på standardernas påtagliga ökade fluorescensintensitet vilka förblev markanta i jämförelse med proverna. Detta medförde att externa genotypningsstandarder inte klarade av att klassa okända provers genotyper, vilka sedermera behövde bedömas manuellt. Därför beslutades ökningen i cykeltal inte vara relevant för användning.

De ospädda DNA-proverna som användes vid analys genererade 30-216 ng DNA som ingångsmängd per PCR-reaktion. Ytterligare försök till att förstärka fluorescensintensiteten utfördes genom att standardisera mängden DNA som togs in i varje PCR-reaktion till 30 ng, efter diskussion med leverantören. Resultatet som framkom erhöll ingen skillnad gentemot ospädda prover, vid en visuell bedömning. Majoriteten av proverna gav en försumbar fluorescenssänkning i både kanal 640 nm och 530 nm trots kitets rekommendationer med en total ingångsmängd DNA på 25-500 ng (Tabell 4, Figur 7, Figur 9). Den försumbara sänkningen i detta fall kunde möjligen bero på en lägre ingångsmängd DNA, vilket medför ett färre antal DNA-kopior och därmed även mindre antal inbundna prober.

7.3 Imprecision

Imprecisionstester utfördes via analys av inomserie- och mellanserievariation för båda kanalerna. Enligt kitets rekommendationer för kanal 640 nm bör proverna utfalla omkring 56 °C för genotyp c.845G/G och 62 °C för c.845A/A. Kanal 530 nm bör erhålla T_m på 52 °C vilket motsvarar c.193T/T, 57 °C som ger genotypen c.187C/C och c.193A/A, samt 65 °C vilken erhåller c.187G/G. Kitet instruerar kring ett maximalt avvikande på $\pm 2,5$ °C från förväntade smälttoppar.

Inomserievariationstestet vilket gjordes för två olika heterozygota patientprover, erhöll resultat med närliggande T_m för båda proverna (Tabell 5, Bilaga 2). Prov HFE 135 med heterozygot uppsättning i c.845G>A samt HFE 137 med kombinerad heterozygoti för c.187C>G och c.193A>T, förväntades utfalla i totalt tre T_m var. HFE 135 som gav T_m omkring det förväntade för respektive genvariant, erhöll små skillnader på -1,24 °C, -0,61 °C och -0,18 °C gentemot acceptansnivån i LightMix-kitet (Tabell 5, Bilaga 2). Vid deskriptiv beräkning av statistiska variabler för respektive T_m hos HFE 135 i båda kanalerna observerades SD utfalla i låg varians mellan reaktionerna (Tabell 5, Bilaga 2). Prov HFE 137 som förväntades utfalla i ett T_m i kanal 640 nm och ytterligare två T_m i kanal 530nm, gav vid analys medelvärdeskillnader på -0,74 °C, -0,28 °C och -0,70 °C. Detta kunde urskiljas utifrån temperaturmedelvärdena som framkom vid analys i de olika kanalerna gentemot kitets rekommenderade temperaturer. Vid beräkning av SD

sågs även här en låg variation i båda kanalerna (Tabell 5, Bilaga 2). Hela inomserievariationen ansågs vara liten, det vill säga med en hög validitet och reproducerbarhet mellan proverna, utifrån reaktionerna för proverna HFE 135 samt HFE 137 med ett medelvärde av totala CV på 0,13 % samt totala SD på 0,08 °C.

Mellanserievariationstest, vilket gjordes för fyra olika prover som omfattade två heterozygota och två homozygota prover, erhöll resultat med närliggande T_m för varje prov i båda kanalerna (Bilaga 3, Tabell 6, Tabell 7). Då prov HFE 135 och HFE 137 utgjorde de heterozygota proverna i mellanserien, förväntades T_m utfalla likt inomserievariationen för respektive kanal. Däremot skiljde ingångsmängden DNA mellan varje analys och reaktion. Detta förväntades kunna påverka T_m något i jämförelse mot inomserievariationstesterna, dock förväntades genotypen vara lika i båda fallen. Medelvärdena utifrån prov HFE 135 gav en variation på -1,26 °C och -0,68 °C i kanal 640 nm, samt -0,15 °C i kanal 530 nm gentemot kitets angivna temperaturer. Utifrån anhängna temperaturer kunde det beräknade SD:t ses med låg varians för båda kanalerna (Bilaga 3, Tabell 6). Prov HFE 137, vilket utgjorde andra mellanserievariationsprovet, erhöll ett avvikande på -0,71 °C för kitets angivna T_m 56 i kanal 640 nm. I motsvarande kanal, kanal 530 nm, framkom skillnader på -0,28 °C och -0,70 °C gentemot angivna T_m i kitet för kanalen. Vid kalkylering av SD framkom en minimal varians mellan provet (Bilaga 3, Tabell 6). För både prov HFE 135 och HFE 137 ställdes inomserievariationsresultaten i jämförelse med mellanserievariationsresultaten där respektive resultat också kunde bedömas likvärdigt eftersom skillnaden i variation var liten.

Mellanserievariationens homozygota prover bestod av prov HFE 142 och prov HFE 145 där respektive prov förväntades utfalla i totalt två T_m var för båda kanalerna. Detta beror på att homozygot muterade genotyper erhåller enbart en smälttopp tillskillnad ifrån heterozygoti. Prov HFE 142 vilken var muterad i c.845A/A förväntades erhålla T_m runt 62 °C för kanal 640 nm då homozygot muterade prover normalt ger ett högre T_m där inbunden prob matchar mutationssekvensen mer perfekt än i övriga fall och ger en stabilare bindning. Vid analys av mellanserievariation erhölls ett medelvärde med ett avvikande på -0,72 °C gentemot kitets rekommendationer för kanal 640 nm. I andra kanalen, 530 nm, förväntades provet erhålla T_m omkring 57 °C vilket bekräftas vid analys där temperaturmedelvärdet medförde ett avvikande på +0,03 °C. Vid beräkning av variansen bedömdes prov HFE 142 variera lite mellan reaktionerna (Bilaga 3, Tabell 7). Det sista provet i mellanserievariationen utgjordes av HFE 145 vilket var homozygot muterad för c.187C>G och förväntades resultera i ett förhöjt T_m , omkring 65 °C, dock i kanal 530 nm. Vid analys erhölls medelvärdet med en skillnad på -0,68 °C gentemot kitets T_m . För kanal 640 nm förväntades HFE 145 ge T_m vid 56 °C vilket observerades vid analys

då endast ett avvikande på $-0,96\text{ }^{\circ}\text{C}$ kunde observeras utifrån kitets angivningar. Vid kalkylering av SD erhöll även prov HFE 145 en liten varians (Bilaga 3, Tabell 7). Hela mellanserievariationen ansågs vara liten med hög reliabilitet det vill säga hög reproducerbarhet vilket mellan proverna, likt inomserievariationen, då beräkningar utifrån reaktionerna för proverna HFE 135, HFE 137, HFE 142 och HFE 145 gav ett medelvärde av totala CV på 0,15 % samt totala SD på $0,09\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.4 Prov-till-prov variation

Efter metooptimering och imprecisionsanalys genotypades resterande 37 prover. Resultatet som framkom under studiens gång visade en lyckad genotypning då prov-till-prov variationen var låg och som mest $2,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ för genvarianten c.187G/G. I förhållande till inomserie- och mellanserievariationen utföll prov-till-provvariationen också med en låg varians. Inget prov föll utanför LightMix-kitets angivna T_m med gränser på $\pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. I kanal 640 nm förväntades ett T_m vid $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ för G-varianten av c.845G>A och T_m vid $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ för A-varianten av c.845G>A. Vid beräkning av medelvärdet för respektive provresultat i kanalen sågs en skillnad på $-0,93\text{ }^{\circ}\text{C}$ för G-varianten och för $-0,68\text{ }^{\circ}\text{C}$ A-varianten gentemot det kitet rekommenderar. I hela kanalen visualiserades stabila T_m med en låg varians mellan proverna (Tabell 3). Liknande utfall rådde i kanal 530 nm där genvarianterna c.187C>G och c.193A>T detekterades med förväntade T_m beroende på genvariant. För T-varianten c.193A>T där förväntad T_m var $52\text{ }^{\circ}\text{C}$, sågs medelvärdesskillnad på $-0,01\text{ }^{\circ}\text{C}$ gentemot LightMix-kitets anvisningar. För A-varianten av c.193A>T och C-varianten av c.187C>G (det vill säga vildtyp) var förväntat T_m $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ där en liten skillnad identifierades med $-0,17\text{ }^{\circ}\text{C}$, och indikerade prover vilka var vildtyp för 193/187. För G-varianten av c.187C>G vid förväntat T_m kring $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, framkom ett istället ett avvikande på $-0,73\text{ }^{\circ}\text{C}$. Respektive prov-till-prov variation för genvarianternas T_m i kanal 530 nm utföll fint med liten variationsvidd, dock kunde störst varians ses runt T_m 65 i kanalen 530 nm med högst SD och CV för genvarianten c.187G/G (Tabell 3). Här observerades flest prover utfalla omkring $64\text{ }^{\circ}\text{C}$, dock utföll prov HFE 109 i en temperatur på $62,80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Detta antogs bero på skillnaden i ingångsmängden DNA vid analys, då prov HFE 109 erhöll en lägre mängd DNA gentemot övriga prover (Bilaga 1). Dock visades detta inte vara märkvärdt eftersom prov HFE 126 med en lägre DNA-ingångskoncentration, kunde genotypas med ett lägre SD än prov HFE 109. En annan spekulation kring utfallet för HFE 109 anses bero på variationsvidden för antalet prover då genotypen c.187C>G hade en högre prevalens i vår studie gentemot övriga genotyper. Detta medför en större normalfördelning men även fler extremvärden (51).

En annan synpunkt som bör lyftas i studien är varför standarderna utföll i högre fluorescenssignaler för smälttopparna till skillnad ifrån HH-proverna, kan möjligen bero på renheten i provmaterialet. Då respektive standard bestod av plasmid-DNA förväntas mängden inhiberande faktorer vara reducerad till skillnad från proverna vilka också förväntas innehålla en mindre renhet.

7.5 Förslag till bedömningsmall

Baserat på resultaten för prov-till-prov variation, den höga reliabiliteten i imprecisionstest och optimeringen av reaktionsbetingelserna, sågs inga avvikelser med hänsyn till LightMix-kitets rekommendationer då alla reaktioner utföll inom $\pm 2,5$ °C med väl goda marginaler. Eftersom marginalerna utföll långt innanför referensintervallen för T_m med låg varians i SD för respektive kanal, bör dessa eventuellt avgränsas med hänsyn till överlappning av emissioner. Andra rutinmetoder nyttjar vanligen en acceptansnivå på ± 2 SD, vilket i detta fall motsvarar ± 1 °C, anses det att nytt relevant SD för genotypning av HH bör omfatta ± 2 SD även i denna analys för rutinverksamhet.

7.6 Samstämmighet gentemot externa laboratorier

Utifrån analysresultatet som erhöles tillsammans med 100-% samstämmighet gentemot externa laboratorier, både med samma analysmetod samt annan analysmetod, bedömdes LightMix-kitet ha en hög validitet och vara relevant för rutindiagnostik på Länssjukhuset Ryhov tillsammans med den höga reliabiliteten. Enligt en tidigare metodutvärderingsstudie av LightCycler System där snabbcykel-PCR kombineras med smältkurveanalys drogs också slutsatsen om att metoden bedömdes vara snabb och effektiv med en minimerad risk för felkällor. Systemet beslutades därför passa molekylärbiologiska rutinlaboratorier, var stora mängder prover analyseras dagligen (52).

7.7 Övriga synpunkter

I studien kunde styrkor och svagheter ses. En stark aspekt som kunde relateras till studien var antalet prover som ingick för verifiering av LightMix-kitet. De selekterade genotyperna förekom även flertalet gånger. Metoden skulle behöva kompletteras med en mindre hållbarhetsstudie av blodprover i kyla eftersom proverna förvaras på det sättet rutinmässigt. Blodprover som förvarats i frysdåsar sedan 2008 erhöles dock ungefär samma DNA-koncentration liksom prover som frusits in under 2016 (Bilaga 1). Här identifierades heller inga problem vid tolkning av genotyperna från dessa prover. Istället observerades differenser i andra extraktionen gentemot första extraktionen där

bland annat HFE 134, som erhöll högre koncentration i första extraktionen gentemot andra extraktionsomgången, resulterade i en reducering av DNA-koncentrationen (Bilaga 2). Detta tros bero på antalet frysningar och upptiningar av proverna, vilket påverkar DNA:ts stabilitet, då HFE 134 frystes och tinades två gånger mellan de olika extraktionerna (53). En aspekt är att erhålla färska blodprover ifrån misstänkta HH-patienter. Metoden skulle kunna utvecklas ytterligare genom att utvärdera analys direkt på helblod, detta beskrivs fungera väl i litteraturen (54).

8. Slutsats

Analysresultatet som erhöles från prov-till-prov variation, imprecisionstest samt optimering av reaktionsbetingelser ansågs vara lägre än spridningen som accepteras enligt kitbeskrivningen. Det rådde även hundraprocentig samstämmighet gentemot externa laboratorier, både med samma analysmetod samt annan analysmetod. Med bedömningskriterier skapade utifrån resultaten i arbetet är slutsatsen att metoden är relevant och kan införas i rutinverksamheten på Länssjukhuset Ryhov i Jönköping, då den anses ha en hög reliabilitet och validitet. Innan införel i rutinverksamhet bör dock en mindre hållbarhetsstudie utföras för prover i kyla.

9. Omnämmanden

Ett stort tack önskas tillägnas handledare för studien, Maysae Quttineh och Sofie Haglund, för personligt engagemang, stort stöd och assistans vid både praktiskt arbete samt skriftlig sammanställning av studien.

Tack önskas även riktas till Annica Pontén och hennes medarbetare vid Laboratoriemedicin, Hallands sjukhus Halmstad för support av prover samt resultatsammanställning med samma metod. Vi vill även tacka Carolin Martinsson, Lovisa Olsson och Isabelle Nilsson med medarbetare vid Laboratoriemedicinska länskliniken, molekylärlaboratoriet, Universitetssjukhuset i Örebro för resultatsammanställning av prover via pyrosekvensering.

Ett stort tack dediceras också till personalen på molekylärbiologiska enheten, Laboratoriemedicin, Länssjukhuset Ryhov i Jönköping, för gott bemötande samt hjälpsam stöttning vid analys. Slutligen önskas tack riktas till Emma Carlsson för att engagerat ingripit vid beräkning av statistik.

10. Referenser

1. Barton, James C, Edwards, Corwin Q, Acton, Ronald T. HFE gene: Structure, function, mutations, and associated iron abnormalities. *Gene*, 2015; 574(2): 79-92.
2. Lilit Garibyan, Nidhi Avashia. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 2013; 133(3): p.e6.
3. Nilsson-Ehle P, Berggren Söderlund M, Theodorsson E, Becker C, Laurell C, editors. *Laurells Klinisk kemi i praktisk medicin*. 9:2 uppl. Lund: Studentlitteratur; 2012. s.223, 228-239, 623-625.
4. Leone P, Giménez P, Collantes J, Paz-y-Miño C. Analysis of HFE gene mutations (C282Y, H63D, and S65C) in the Ecuadorian population. *Annals of Hematology*, 2005; 84(2): 103-105.
5. Stål P, Gåfvells M, Eggertsen G, Holmström P. Upptäckt av järnreglerande hormonet hepcidin ger nya förklaringar. *Läkartidningen*, 2007; 104(22): 1696-700.
6. Gahrton G, Juliusson G, editors. *Blodets sjukdomar: lärobok i hematologi*. 1. uppl. Lund: Studentlitteratur; 2012. s.209-212.
7. Mura C, Raguenes O, Férec C. HFE Mutations Analysis in 711 Hemochromatosis Proband: Evidence for S65C Implication in Mild Form of Hemochromatosis. *Blood*, 1999; 93(8): 2502-5.
8. Stål P, Hultcrantz R. Hereditär hemokromatos – en vanlig genetisk sjukdom. *Läkartidningen*, 2012; 109(46): 2097-9.
9. Karolinska Universitetssjukhuset. Hereditär hemokromatos - Ärftlig hemokromatos. <http://www.karolinska.se/for-patienter/alla-mottagningar-och-avdelningar-a-o/levercentrum/levercentrum/diagnoser/hereditar-hemokromatos/>, 2015. [2016-03-30]
10. Pietrangelo A, Lynch JP, Metz D C. Hereditary Hemochromatosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Reviews in basic and clinical gastroenterology and hepatology*, 2010; 139(2):393-408.
11. Gahrton G, Lundh B, editors. *Blodsjukdomar: lärobok i hematologi*. 3., Stockholm: Natur och kultur; 1997. s. 90-91.
12. Region Jönköping Medicinsk Diagnostik fS-Järn. <http://plus.rjl.se/index.jsf?childId=1086&nodeId=25084&nodeType=12> , 2015. [2016-03-30]
13. Kopáni M, Migliorini M, Lančok A, Dekan J, Čaplovicová M, Jakubovský J, et al. Iron

- oxides in human spleen. *BioMetals*, 2015; 28(5): 913-928.
14. Pietrangelo A. Iron and the liver. *Liver International*, 2016; 36(S1): 116-123(8).
 15. Mascitelli L, Goldstein MR. Hereditary hemochromatosis, iron, hepcidin and coronary heart disease. *Medical Hypotheses*, 2014; 82(3): 402-403.
 16. Eisenstein RS. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 2000; 20: 627-662.
 17. Templeton DM, editor. *Molecular and cellular iron transport [Elektronisk resurs] /*. New York: Marcel Dekker; 2002. s. 1, 145, 195-199, 202-203, 213-227.
 18. Urrutia P, Aguirre P, Esparza A, Tapia V, Mena N.P, Arredondo M, et al. Inflammation alters the expression of DMT 1, FPN 1 and hepcidin, and it causes iron accumulation in central nervous system cells. *Journal of Neurochemistry*, 2013; 126(4): 541-549.
 19. Nandar W, Connor JR. HFE gene variants effect iron in the brain. *The Journal of nutrition*, 2011; 141(4): 729-739.
 20. Powell LW, Seckington RC, Deugnier Y. Haemochromatosis. *Lancet*, 2016; s0140-6736(15)01315-X.
 21. Muckenthaler MU. How mutant HFE causes hereditary hemochromatosis. *Blood*, 2014; 124(8): 1212-3.
 22. Martins R, Silva B, Proenca D, Faustino P, Valcarcel J, ed. Differential *HFE* Gene Expression Is Regulated by Alternative Splicing in Human Tissues. *PLoS One*, 2011; 6(3): e17542.
 23. McElroy V, BHS, RDMS. Hemochromatosis A Literature Review. *Journal of Diagnostic Medical Sonography*, 2009; 25(6): 325-328. DOI: 10.1177/8756479309344625.
 24. TIB MOLBIOL LightMix® *in-vitro* diagnostics kit HFE H63D S65C C282Y, Cat.-No.:40-0340-32, [http://www.roche-as.es/logs/LightMix®_40-0340-32_CE_HFE63-65-282_V131211%20\(3\).pdf](http://www.roche-as.es/logs/LightMix®_40-0340-32_CE_HFE63-65-282_V131211%20(3).pdf) , 2015. [2016-03-30]
 25. Popp J, Bauer M, editors. *Modern techniques for pathogen detection*. 2015. s. 55-80.
 26. Buckingham L. *Molecular diagnostics: fundamentals, methods and clinical applications*. 2. ed. Philadelphia: F.A. Davis; 2012. s. 69-76, 111-118, 131-151, 198-199.
 27. Holmström P, Marmur J, Eggertsen G, Gåfväls M, Stål P. Mild iron overload in patients carrying the HFE S65C gene mutation: a retrospective study in patients with suspected iron overload and healthy controls. *Gut*, 2002; 51(5): 723-730.

28. Adams P. Role of Genetic Testing and Liver Biopsy in the Diagnosis of Hemochromatosis. *Current Gastroenterology Reports*, 1999; 1(1): 27-29.
29. Fracanzani AL, Piperno A, Valenti L, Fraquelli M, Coletti S, et.al. Hemochromatosis in Italy in the last 30 years: Role of genetic and acquired factors. *Hepatology*, 2010; 51(2): 501-510.
30. Beutler E, Felitti V, Gelbart T, Ho N. The Effect of HFE Genotypes on Measurements of Iron Overload in Patients Attending a Health Appraisal Clinic. *Annals of internal medicine*, 2000; 133(5): 329-337.
31. EASL The Home of Hepatology. What is the prevalence of C282Y homozygosity? <http://www.easl.eu/research/our-contributions/clinical-practice-guidelines/detail/management-of-hfe-hemochromatosis/report/3%20-%20section-3.1>, 2016. [2016-05-10]
32. Erlich H. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Immunology*, 1989; 9(6): 437-447.
33. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 7. ed., International ed. Basingstoke: Palgrave Macmillan; 2012. s. 124-125, 151-154.
34. Mackay I M, Arden K E, Nitsche A. Real-time PCR in virology. Oxford University Press *Nucleic acids research*, 2002; 30(6): 1292-305.
35. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 2006; 27(2): 95-125.
36. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical microbiology reviews*, 2006; 19(1): 165-256.
37. Roche Applied Science. Technical Note No. LC 19/2004. http://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/lc_ApplicationNote19.pdf, 2004. [2016-03-30]
38. Tag CG, Gressner AM, Weiskirchen R. An unusual melting curve profile in LightCycler multiplex genotyping of the hemochromatosis H63D/C282Y gene mutations. *Clinical Biochemistry*, 2001; 34(6): 511-515.
39. Wallace DF, Walker AP, Pietrangelo A, Clare M, Bomford AB, Dixon JL, et al. Frequency of the S65C mutation of HFE and iron overload in 309 subjects heterozygous for C282Y. *Journal of Hepatology*, 2002; 36(4): 474-479.

40. Roche Molecular Diagnostics. Advances in PCR: Roche Innovations. <http://molecular.roche.com/pcr/Pages/Innovations.aspx>, 2016. [2016-05-10]
41. Roche Molecular Diagnostics. PCR: How We Copy DNA. <http://molecular.roche.com/pcr/Pages/Process.aspx>, 2016. [2016-05-10]
42. Roche Molecular Diagnostics. Roche Applied Science, Technical Note. <https://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/Assay%20Formats%20for%20use%20in%20Real-Time%20PCR.pdf> No. LC 18/2004. [2016-05-10]
43. Reiser A, Geyer M, van Miltenburg R, Nauck M, Tabiti K. Biochemica, Roche Molecular Biochemicals. Mutation Detection Using Multi-color Detection on the LightCycler System, 1999; No.2: 12-15.
44. Roche Molecular Diagnostics. LightCycler® 480 Detection Formats. <https://lifescience.roche.com/shop/products/lightcycler-480-detection-formats#HybProbe%20Probes>, 2016. [2016-05-10]
45. Generi Biotech. Mono labelled hybridization probes. <http://www.generi-biotech.com/hybridization-probes/>, 2016. [2016-05-10]
46. Lyon E. Mutation detection using fluorescent hybridization probes and melting curve analysis. Expert Review of Molecular Diagnostics, Future Science Group, 2001; 1(1): 92-101.
47. Bollhalder M, Mura C, Landt O, Maly FE. LightCycler PCR Assay for Simultaneous Detection of the H63D and S65C Mutations in the HFE Hemochromatosis Gene Based on Opposite Melting Temperature Shifts. Clinical chemistry, December 1999; 45(12): 2275-8.
48. Roche Molecular Diagnostics. LightCycler® 480 Instrument Operator's Manual. http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/bio-chem/Core%20Facilities/Data/R401-core/LightCycler480%20II_Manual_V1.5.pdf, 2008. [2016-05-10]
49. Psifidi A, Dovas CI, Bramis G, Lazou T, Russel CL, et al. Comparison of Eleven Methods for Genomic DNA Extraction Suitable for Large-Scale Whole-Genome Genotyping and Long-Term DNA Banking Using Blood Samples. PLoS One, Januari 2016; 10(1): 1-18.
50. Roux KH. Optimization and troubleshooting in PCR. Genome Research, Januari 1995; 4(5): 185-194.
51. Ejlertsson G. Grundläggande statistik: med tillämpningar inom sjukvården. 2., omarb. uppl. Lund: Studentlitteratur; 1992.

52. Bach V, Barceló MJ, Altés A, Remacha A, Félez J, Baiget M. Genotyping the HFE gene by melting point analysis with the LightCycler system: Pros and cons. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 2006; 36(2): 288-291.
53. Anchordoquy TJ, Girourad LG, Carpenter JF, Kroll DJ. Stability of lipid/DNA complexes during agitation and freeze-thawing. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1998; 87(9): 1046-1051.
54. Martinez-Serra J, Robles J, Nicolàs A, Gutierrez A, Ros T, et al. Fluorescence resonance energy transfer-based real-time polymerase chain reaction method without DNA extraction for the genotyping of F5, F2, F12, MTHFR, and HFE. *Journal of blood medicine*, 2014; 5: 99-106.

Bilaga 1.

Sammanställning av rådata av samtliga *HFE* genotypade patientprover i Jönköping

ProvID	Genotyp Halmstad			Genotyp Örebro			Extraktions-koncentration	Kanal 640			Kanal 530			Tolkad genotyp totalt för provet
	Förväntad Tm c.845G>A			Förväntad Tm c.187C>G och c.193A>T										
	845	187	193	845	187	193		56 (845G)	62 (845A)	Tolkad genotyp kanal 640 nm	52 (193 T)	57 (193A/187C)	65 (187 G)	
HFE 101	G/G	C/G		G/G	C/G	A/A	30,1	55,2	845G/G		56,64	64,57	187 C/G	187C/G
HFE 102	G/G	C/C		G/G	C/C	A/A	43,2	55,6	845G/G		57,42		187C/C 193A/A	WT
HFE 103	G/A	C/C		G/A	C/C	A/A	25	54,97	61,34	845 G/A	56,88		187C/C 193A/A	845G/A
HFE 104	G/G	C/G		G/G	C/G	A/A	23	55,13	845G/G		56,62	64,31	187C/G	187C/G
HFE 105	G/A	C/C					23,4	54,92	61,33	845 G/A	56,86		187C/C 193A/A	845G/A
HFE 106	G/G	C/C					37	55,01	845G/G		56,75		187C/C 193A/A	WT
HFE 107	G/G	C/C		G/G	C/C	A/A	11,2	55,13	845G/G		56,73		187C/C 193A/A	WT
HFE 108	G/G	C/G					27,9	55,08	845G/G		56,51	64,39	187C/G	187C/G
HFE 109	G/G	G/G					7,8	55,2	845G/G			62,8	187G/G	187G/G
HFE 110	G/G	C/C					43,2	55,24	845G/G		56,8		187C/C 193A/A	WT
HFE 111	G/A	C/C					29,1	54,93	61,42	845 G/A	56,89		187C/C 193A/A	845G/A
HFE 112	G/G	C/C	A/T	G/G	C/C	A/T	15,5	55,17	845G/G	52,22	57,47		193 A/T	193A/T
HFE 113	G/G	G/G		G/G	G/G	A/A	10,6	55,16	845G/G			63,58	187G/G	187G/G
HFE 114	G/G	C/C					15,7	55,07	845G/G		56,77		187C/C 193A/A	WT
HFE 115	G/G	C/G					16,7	55,07	845G/G		56,43	64,17	187 C/G	187C/G
HFE 116	A/A	C/C		A/A	C/C	A/A	20,8		61,48	845A/A	57		187C/C 193A/A	845A/A
HFE 117	G/G	C/C					21,9	55,17	845G/G		56,85		187C/C 193A/A	WT
HFE 118	G/A	C/C		G/A	C/C	A/A	28,5	54,85	61,43	845 G/A	56,74		187C/C 193A/A	845G/A
HFE 119	G/G	C/C					23,9	55,09	845G/G		56,63		187C/C 193A/A	WT
HFE 120	G/G	C/G					25,8	54,99	845G/G		56,4	64,32	187 C/G	187C/G
HFE 121	G/G	C/C					40,3	55,04	845G/G		56,68		187C/C 193A/A	WT
HFE 122	A/A	C/C					24,5		61,19	845A/A	56,75		187C/C 193A/A	845A/A
HFE 123	G/G	C/G		G/G	C/G	A/A	30	55,08	845G/G		56,37	64,22	187 C/G	187C/G
HFE 124	G/G	C/C					15,4	55,04	845G/G		56,97		187C/C 193A/A	WT
HFE 125	G/A	C/C		G/A	C/C	A/A	34,9	54,73	61,37	845 G/A	57,01		187C/C 193A/A	845G/A
HFE 126	G/G	C/C					6	55,04	845G/G		56,82		187C/C 193A/A	WT
HFE 127	G/G	C/G					29,6	55,23	845G/G		56,67	64,61	187 C/G	187C/G
HFE 128	G/G	C/C					34,9	55,05	845G/G		56,82		187C/C 193A/A	WT
HFE 129	A/A	C/C		A/A	CC	A/A	21,3		61,23	845A/A	57,02		187C/C 193A/A	845A/A
HFE 130	G/G	C/C	A/T	G/G	CC	A/T	11,3	55,29	845G/G	52,09	57,38		193 A/T	193A/T
HFE 131	G/G	C/G	A/A	G/G	C/G	A/A	21,8	55,16	845G/G		56,45	64,4	187 C/G	187C/G
HFE 132	G/G	C/C	A/A				18,9	54,96	845G/G		56,79		187C/C 193A/A	WT
HFE 133	G/G	C/C	A/A				29,5	54,97	845G/G		56,85		187C/C 193A/A	WT
HFE 134	G/G	C/G	A/A				21,2	55,15	845G/G		56,6	64,51	187 C/G	187C/G
HFE 135	G/A	C/C	A/A				24,6	54,82	61,27	845 G/A	56,94		187C/C 193A/A	845G/A
HFE 136	G/G	C/C	A/A				29,1	55,09	845G/G		57,01		187C/C 193A/A	WT
HFE 137	G/G	C/G	A/T	G/G	C/G	A/T	29,5	55,32	845G/G	51,77		64,4	193A/T 187C/G/	193A/T 187C/G
HFE 138	G/G	C/C	A/A				25,5	54,99	845G/G		56,87		187C/C 193A/A	WT
HFE 139	G/G	C/C	A/A				34,5	54,99	845G/G		56,77		187C/C 193A/A	WT
HFE 140	G/G	C/G	A/A				26,8	55,11	845G/G		56,49	64,43	187 C/G	187C/G
HFE 141	G/G	C/C	A/A				27	55,03	845G/G		56,88		187C/C 193A/A	WT
HFE 142	A/A	C/C	A/A	A/A	C/C	A/A	36,5		61,35	845A/A	57,11		187C/C 193A/A	845A/A
HFE 143	G/G	C/G	A/A				22,6	55,15	845G/G		56,52	64,52	187 C/G	187C/G
HFE 144	G/G	C/C	A/A				31,9	55,11	845G/G		57,08		187C/C 193A/A	WT
HFE 145	G/G	G/G	A/A	G/G	G/G	A/A	27,2	55,24	845G/G			64,31	187C/C	187G/G
HFE 146	A/A	C/C	A/A				11,5		61,11	845A/A	56,93		187C/C 193A/A	845A/A
HFE 147	G/G	C/C	A/A	G/G	C/C	A/A	33,8	55,16	845G/G		57,01		187C/C 193A/A	WT
HFE 148	G/A	C/G	A/A	G/A	C/G	A/A	33,3	55,08	61,37	845 G/A	56,8	64,81	187 C/G	845G/A 187C/G
HFE 149	G/G	C/C	A/T	G/G	C/C	A/T	18,8	55,13	845G/G	51,86	57,15		193 A/T	193A/T

Första extraktionen utfördes 160412 för prov HFE 101-HFE 112 och andra extraktionen tog plats 160503 för prov HFE 113-HFE 149.

Bilaga 2.

Sammanställning av rådata för inomserievariation i Jönköping för prov HFE 135 (c.845G/A) och prov HFE 137 (c.193A/T c.187C/G)

ProvID	Extraktions-koncentration	Kanal 640			Kanal 530				Tolkad genotyp totalt för provet
		Förväntad Tm c.845G>A		Tolkad genotyp kanal 640 nm	Förväntad Tm c.187C>G och c.193A>T			Tolkad genotyp kanal 530 nm	
		56 (845G)	62 (845A)		52 (193 T)	57 (193A/187C)	65 (187 G)		
HFE 135:1	12,1	54,72	61,38	845 G/A		56,77		187C/C 193A/A	845G/A
HFE 135:2	12,1	54,75	61,38	845 G/A		56,81		187C/C 193A/A	845G/A
HFE 135:3	12,1	54,8	61,27	845 G/A		56,8		187C/C 193A/A	845G/A
HFE 135:4	12,1	54,76	61,45	845 G/A		56,85		187C/C 193A/A	845G/A
HFE 135:5	12,1	54,87	61,52	845 G/A		56,9		187C/C 193A/A	845G/A
HFE 135:6	12,1	54,79	61,39	845 G/A		56,78		187C/C 193A/A	845G/A
HFE 135:7	12,1	54,78	61,4	845 G/A		56,78		187C/C 193A/A	845G/A
HFE 135:8	12,1	54,72	61,4	845 G/A		56,82		187C/C 193A/A	845G/A
HFE 135:9	6,8	54,71	61,37	845 G/A		56,87		187C/C 193A/A	845G/A
HFE 135:10	6,8	54,66	61,36	845 G/A		56,77		187C/C 193A/A	845G/A
HFE 137:1	14,6	55,22		845G/G	51,62		64,32	193A/T 187C/G	193A/T 187C/G
HFE 137:2	14,6	55,28		845G/G	51,79		64,49	193A/T 187C/G	193A/T 187C/G
HFE 137:3	14,6	55,37		845G/G	51,75		64,48	193A/T 187C/G	193A/T 187C/G
HFE 137:4	14,6	55,24		845G/G	51,66		64,27	193A/T 187C/G	193A/T 187C/G
HFE 137:5	14,6	55,22		845G/G	51,6		64,29	193A/T 187C/G	193A/T 187C/G
HFE 137:6	14,6	55,23		845G/G	51,63		64,25	193A/T 187C/G	193A/T 187C/G
HFE 137:7	14,6	55,25		845G/G	51,75		64,44	193A/T 187C/G	193A/T 187C/G
HFE 137:8	14,6	55,24		845G/G	51,8		64,01	193A/T 187C/G	193A/T 187C/G
HFE 137:9	15,6	55,24		845G/G	51,83		64,16	193A/T 187C/G	193A/T 187C/G
HFE 137:10	15,6	55,28		845G/G	51,79		64,31	193A/T 187C/G	193A/T 187C/G

Bilaga 3.

Sammanställning av rådata förmellanserievariation i Jönköping för prov HFE 135(c.845G/A), prov HFE 137 (c.193A/T c.187C/G), prov HFE 142 (c.845A/A) och prov HFE 145 (c.187G/G)

ProvID	Extraktions-koncentration	Kanal 640			Kanal 530			Tolkad genotyp totalt för provet
		Förväntad Tm c.845G>A		Tolkad genotyp kanal 640 nm	Förväntad Tm c.187C>G och c.193A>T			
		56 (845G)	62 (845A)		52 (193 T)	57 (193A/187C)	65 (187 G)	
HFE 135:1	9,10	54,78	61,53	845 G/A		56,87	187C/C 193A/A	845G/A
HFE 137:1	14,00	55,26		845 G/G	51,72		64,37 193A/T 187C/G	193A/T 187C/G
HFE 142:1	19,10		61,17	845 A/A		56,9	187C/C 193A/A	845A/A
HFE 145:1	13,70	55,05		845 G/G			64,28 187 G/G	187G/G
HFE 135:2	9,60	54,81	61,49	845 G/A		56,97	187C/C 193A/A	845G/A
HFE 137:2	13,10	55,27		845 G/G	51,70		64,40 193A/T 187C/G	193A/T 187C/G
HFE 142:2	23,00		61,34	845 A/A		57,09	187C/C 193A/A	845A/A
HFE 145:2	12,90	55,12		845 G/G			64,53 187 G/G	187G/G
HFE 135:3	12,80	54,66	61,31	845 G/A		56,77	187C/C 193A/A	845G/A
HFE 137:3	12,90	55,30		845 G/G	51,68		64,41 193A/T 187C/G	193A/T 187C/G
HFE 142:3	21,20		61,34	845 A/A		57,08	187C/C 193A/A	845A/A
HFE 145:3	11,90	55,11		845 G/G			64,32 187 G/G	187G/G
HFE 135:4	8,40	54,77	61,31	845 G/A		56,87	187C/C 193A/A	845G/A
HFE 137:4	14,40	55,31		845 G/G	51,75		64,45 193A/T 187C/G	193A/T 187C/G
HFE 142:4	16,50		61,34	845 A/A		57,12	187C/C 193A/A	845A/A
HFE 145:4	10,00	55,10		845 G/G			64,31 187 G/G	187G/G
HFE 135:5	7,30	54,81	61,36	845 G/A		56,92	187C/C 193A/A	845G/A
HFE 137:5	12,30	55,37		845 G/G	51,83		64,45 193A/T 187C/G	193A/T 187C/G
HFE 142:5	15,10		61,29	845 A/A		57,04	187C/C 193A/A	845A/A
HFE 145:5	11,90	55,14		845 G/G			64,36 187G/G	187G/G
HFE 135:6	24,60	54,53	61,12	845 G/A		56,62	187C/C 193A/A	845G/A
HFE 137:6	29,50	55,21		845 G/G	51,57		64,42 193A/T 187C/G	193A/T 187C/G
HFE 142:6	36,50		61,25	845 A/A		56,92	187C/C 193A/A	845A/A
HFE 145:6	27,20	55,00		845 G/G			64,22 187 G/G	187G/G
HFE 135:7	7,60	54,75	61,17	845 G/A		56,83	187C/C 193A/A	845G/A
HFE 137:7	10,60	55,24		845 G/G	51,59		64,28 193A/T 187C/G	193A/T 187C/G
HFE 142:7	12,70		61,14	845 A/A		56,96	187C/C 193A/A	845A/A
HFE 145:7	12,00	55,02		845 G/G			64,23 187 G/G	187G/G
HFE 135:8	6,80	54,82	61,27	845 G/A		56,94	187C/C 193A/A	845G/A
HFE 137:8	15,60	55,32		845 G/G	51,77		64,40 193A/T 187C/G	193A/T 187C/G
HFE 142:8	15,60		61,35	845 A/A		57,11	187C/C 193A/A	845A/A
HFE 145:8	10,60	55,24		845 G/G			64,31 187 G/G	187G/G