

gedrukt in genormaliseerde ratio is lager dan het percentage positieve resultaten uitgedrukt in PS. Dit geldt voor alle reagentia. Het percentage positieve resultaten is voor de reagenscombinatie Actin® FSL/Actin® FS lager dan voor de andere reagenscombinaties.

Conclusie

In deze studie kunnen geen uitspraken gedaan worden over juistheid vanwege het ontbreken van klinisch goed gedefinieerde patiëntenmonsters en vanwege het gebrek aan standaardisatie van LAC-testen. Echter, minstens net zo interessant, is de onderlinge vergelijkbaarheid van de LAC-testen. De dPT-test wordt in de richtlijn ontraden. Als screening- en mengtest presenteert de dPT test echter vergelijkbaar met de andere dRVVT- en LAC-gevoelige APTT-testen. Een onoverkomelijk nadeel van de dPT-test is het ontbreken van een confirmatietest. Ter vervanging van de dPT test werden de LAC-gevoelige APTT testen Actin® FSL en Pathromtin® SL onderzocht. De reproduceerbaarheid van beide testen is goed. Gezien het hogere percentage positieve resultaten in de confirmatietest en omdat de richtlijn silica als activator adviseert, hebben wij gekozen voor het Pathromtin® SL-reagens.

Er kunnen statistisch significante verschillen in af-

Tabel 5. Resultaten van de LAC-mengtesten uitgevoerd op patiëntenmonsters welke eerder (zie tabel 4) positief bevonden werden met de screeningtest ongeacht gehanteerde eenheid

Reagens	Eenheid	Negatief (%)	Positief (%)
Actin® FSL	s	43	57
Actin® FSL	genorm. ratio	43	57
Actin® FSL	ICA	71	29
Pathromtin® SL	s	29	71
Pathromtin® SL	genorm. ratio	35	65
Pathromtin® SL	ICA	71	29
LA1	s	19	81
LA1	genorm. ratio	56	44
LA1	ICA	75	25
dPT	s	17	83
dPT	genorm. ratio	33	67
dPT	ICA	44	56

ICA: 'index of circulating anticoagulant'

Tabel 6. Resultaten van de LAC-confirmatietesten uitgevoerd op patiëntenmonsters welke eerder (zie tabel 5) positief bevonden werden met de mengtest uitgedrukt in seconde en/of genormaliseerde ratio.

Reagens	Eenheid	Negatief (%)	Positief (%)
Actin® FSL/Actin® FS	genorm. ratio	100	0
Actin® FSL/Actin® FS	PS	50	50
Pathromtin® SL/Actin® FS	genorm. ratio	64	36
Pathromtin® SL/Actin® FS	PS	27	73
LA1/LA2	genorm. ratio	43	57
LA1/LA2	PS	0	100

PS: 'percentage of shortening'

kapgrenzen, uitgedrukt in genormaliseerde ratio, per reagens bestaan. Tevens kunnen de afkapgrenzen van screening - en mengtesten onderling significant verschillen. De afkapgrens voor de confirmatietest uitgedrukt in genormaliseerde ratio is niet per definitie gelijk aan 1,2. De conclusie is dat afkapgrenzen te allen tijden zelf vastgesteld dienen te worden. De diverse eenheden waarin screening-, meng - en confirmatietesten uitgedrukt kunnen worden zijn in deze studie met elkaar vergeleken. Er worden met name verschillen gezien bij de meng - en confirmatietesten. Een opvallende bevinding bij de mengtest is dat het percentage positieve resultaten uitgedrukt in ICA beduidend lager is dan het percentage positieve resultaten uitgedrukt in seconde en/of genormaliseerde ratio. De verschillen tussen de overige eenheden zijn minder groot. Wij hebben gekozen om de resultaten van zowel screening-, meng - als confirmatietesten uit te drukken in genormaliseerde ratio. Een groot logistiek voordeel hierbij is dat afkapgrenzen dan onafhankelijk zijn van het gebruikte lotnummer reagens.

Referenties

1. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, de Groot PG. Update of the guidelines for lupus-anticoagulant detection - Official communication of the SSC. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 1737-40.

Summary

Janssen MJW, Heuvelmans CTM, Melssen MMA, van Enckevort CMW. New guidelines for Lupus Anticoagulans detection: practical applications. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2011; 36: 2-5.

Various reagents (Actin® FS(L), Pathromtin® SL, LA1/LA2, dPT-Innovin®) for the detection of lupus-anticoagulant (LAC) on the Sysmex® CA-1500 coagulation analyser (Siemens) were compared. Reason for this comparison was the recently published update of the guidelines for LAC detection (Pengo et al. *J Thromb Haemost* 2009). The 99.0^e percentile cut-off values were established separately for the screening, mixing as well as the confirmation tests from the result distributions of 41 healthy donors. Screening and mixing tests were expressed as seconds and normalised ratios. Mixing tests were also expressed as 'index of circulating anticoagulant' (ICA). Confirmation tests were expressed as normalised ratio and 'percentage of shortening'.

Statistically significant differences can exist between the cut-off values for the various reagents. The cut-off values for normalised screening and mixing tests are not equal per definition. Also the cut-off value for confirmation tests expressed in normalised ratio is not 1.2 per se. It can be concluded that cut-off values in any case have to be determined in-house. The percentage of positive results in a selected group of 55 patient samples was similar for all screening tests and for all mixing tests expressed in seconds and/or normalised ratios. This percentage was considerably lower for the mixing tests when expressed in ICA. The results of the confirmation tests were different between the various reagents and expression units. For routine LAC detection, we prefer to use the reagent combinations LA1/LA2 en Pathromtin® SL/Actin® FS and to express results in normalised ratios for screening, mixing as well as confirmation tests.

Keywords: APTT; cut-off values; dRVVT; guidelines; lupus-anticoagulant (LAC); Sysmex coagulation analyser

Casuïstiek

Primaire hemochromatose door ferroportinegenmutaties: is er een plaats voor hepcidine in de diagnostiek?

P. van WIJNGAARDEN¹, J. HOSKAM¹, A. KOEKEN², J.M.A. BOER³, D.W. SWINKELS⁴, A.A.M. ERMENS² en C.M. COBBAERT⁵

Hereditaire hemochromatose wordt doorgaans veroorzaakt door HFE-genmutaties en soms door weinig voorkomende mutaties in genen die het ijzermetabolisme reguleren. Tot deze zeldzamer mutaties behoren de ferroportinegenmutaties. Deze zijn onder te verdelen in 2 groepen, de 'loss of function' groep en de 'gain of function'-groep. Wij beschrijven twee jonge mannen en daarnaast één bejaarde man met hereditaire hemochromatose ten gevolge van een 'gain of function'-ferroportinegenmutatie. We beschrijven verder: 1) de opsporing van deze ferroportinemutatie aan de hand van de richtlijn 'Diagnostiek en behandeling van hereditaire hemochromatose' (2007); 2) het pathofysiologisch mechanisme van ijzerstapeling; 3) de behandeling en 4) de plaats van serumhepcidine in de diagnostiek.

De drie patiënten, allen uit de regio Breda, worden in de praktijk adequaat opgespoord met de vigerende hemochromatoserichtlijn. Bij alle drie was de ratio serumhepcidine/ferritine normaal. Dit bevestigt dat de ijzerstapeling niet tot de klassieke HFE-gerelateerde vorm van hemochromatose behoort waarbij deze ratio juist verlaagd zou zijn. Bij gerichte klinische verdenking op ijzerstapeling en het ontbreken van bekende HFE-gerelateerde mutaties kan een serumhepcidine-ferritineratio bepaling helpen om gericht DNA-diagnostiek naar andere genmutaties in te zetten, zoals de hier beschreven ferroportine 'gain of function'-mutatie.

Trefwoorden: ferroportine-N144H-genmutaties; richtlijn; hemochromatose; serumhepcidine

Amphia ziekenhuis, Afdeling Interne Geneeskunde, Breda¹; Amphia Ziekenhuis, Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Breda²; Rijksinstituut voor Volksgezondheid en het Milieu (RIVM), Bilthoven³; UMC St. Radboud, Afdeling Laboratoriumgeneeskunde, laboratorium voor Klinische Chemie, Nijmegen⁴; LUMC, Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Leiden⁵

Correspondentie: drs. P. van Wijngaarden, Afdeling Interne Geneeskunde, Amphia ziekenhuis, Locatie Molengracht, Molengracht 21, 4800 RK Breda
E-mail: Pvanwijngaarden@amphia.nl

Primaire hemochromatose of hereditaire hemochromatose (HH) is een relatief veel voorkomende autosomaal recessief overervende vorm van ijzerstapeling bij personen van Noordepouese afkomst. De frequentie is ongeveer 0,5-2,0%. De ziekte wordt gekenmerkt door ijzerstapeling in het lichaam veroorzaakt door een te hoge ijzerabsorptie vanuit de darm. In de meeste gevallen wordt HH veroorzaakt door een mutatie in het zogenaamde HFE-gen. Van de personen met primaire hemochromatose is 80 tot 90 procent homozygoot voor de C282Y-mutatie in het HFE-gen of heeft het samengestelde C282Y/H63D-genotype. Afwezigheid van deze genotypen sluit dus een primaire hemochromatose niet uit. Naast deze bekende mutaties zijn een aantal andere, veel minder voorkomende, mutaties beschreven. Een daarvan is een mutatie in het ferroportinegen (1).

Wij beschrijven hier drie patiënten met primaire hemochromatose op basis van een mutatie in het ferroportinegen, de zogenaamde N144H-mutatie. Aan de hand van deze 'cases' wordt de validiteit van de recent gepubliceerde richtlijn voor de diagnose van hereditaire hemochromatose (2) besproken. Tevens beschrijven we het effect van aderlatingen op klinische symptomen en op het beloop van de serumferritineconcentratie en de transferrineverzadiging.

Meetmethoden

IJzer en transferrine werden gemeten met een ferrozinemethode respectievelijk een immunoturbidimetrische Tina-Quant transferrinemethode, waarbij de laatste CRM470-gestandaardiseerd is (Roche-bijsluiters). De metingen vonden plaats op een Cobas 6000. Ferritine werd gemeten met een chemoluminescente immunoassay op Immulite 2000 (Siemens-bijsluiter) (3). Leverenzymen werden bepaald met IFCC-gestandaardiseerde methoden van Roche Diagnostics op Cobas-6000-analyseapparatuur (4). C282Y en H63D mutaties werden simultaan gedetecteerd in een multiplex PCR-RFLP volgens Stott et al. (5). De N144H-mutatie werd opgespoord met behulp van een zelf ontwikkelde PCR-RFLP (6). De hepcidineconcentratie werd gemeten in serum met een combinatie van zwak-kationuitwisselingschromatografie en 'time-of-flight'-massaspectrometrie (7).

Patiënten

Patiënt A is een 22-jarige man die zich presenteert met specifieke klachten bestaande uit hoofdpijn en duizeligheid. Zijn medische voorgeschiedenis is blanco. Hij gebruikt geen medicatie. Hij gebruikt gemiddeld 3 eenheden alcohol per dag. De familieanamnese vermeldt ijzerstapeling bij zijn moeder. Bij lichamelijk onderzoek zien we een slanke jongeman met een body mass index (BMI) van 21,2 kg/m² en zonder lichamelijke afwijkingen.

Bij laboratoriumonderzoek wordt een ferritineconcentratie gevonden van 437 µg/l (referentiewaarden: 20 - 280 µg/l) bij een transferrineverzadiging van 58% (ref. range: < 45%). Genetisch onderzoek levert een heterozygote C282Y-mutatie op. De leverenzymen zijn alle normaal. Een aanvullende MRI-abdomen toont op zowel de T1- als de T2-gewogen opname een verlaging van het signaal in de lever ten opzichte van de omgevende structuren, wat typisch is voor ijzerstapeling. Aanvullend genetisch onderzoek toont een heterozygote ferroportine mutatie, de N144H-mutatie.

Serumhepcidine, op later tijdstip bepaald, bedraagt 6,4 nmol/l (ref. range bij de man: 1,1 - 13,9 nmol/l) bij een ferritineconcentratie van: 373 µg/l waaruit een serumhepcidin-ferritineratio volgt van 17,2 pmol /µg (ref. range 10,8 - 216 pmol /µg). Na 8 aderlatingen, 300 ml per keer, is het ferritine gedaald naar 336 µg /l en de transferrineverzadiging naar 38%. De invloed van de aderlatingen op de klachten is gering. Patiënt is na de achtste aderlating niet meer verschenen voor poliklinische controle.

Patiënt B is een 33-jarige man die wordt verwezen wegens spierpijnklachten. Zijn voorgeschiedenis is blanco. Hij gebruikt geen medicatie en slechts incidenteel alcohol. De familieanamnese vermeldt een erfelijke vorm van ijzerstapeling. Bij het lichamelijk onderzoek worden geen afwijkingen gevonden. Zijn BMI bedraagt 31,2 kg/m². Het laboratoriumonderzoek toont een ferritineconcentratie van 1628 µg/l met een transferrineverzadiging van 91%. Patiënt blijkt op grond van genetisch onderzoek heterozygoot te zijn voor de C282Y-mutatie. Van de leverenzymen is alleen het ALAT licht verhoogd met een waarde van 81 IU/l (ref. range: 3-40 IU/l). Een leverbiopt toont geen afwijkingen in de architectuur maar wel een grote hoeveelheid ijzerpigment dat zich in de hepatocyten bevindt.

De kwantitatieve ijzerbepaling is 334 µmol/g leverweefsel (ref. range: < 30 µmol/g). Aanvullend genetisch onderzoek toont een heterozygote N144H-mutatie. Serumhepcidine wordt in een later stadium bepaald. Deze bedraagt 11,0 nmol/l (ref. range bij de man: 1,1 - 13,9 nmol/l). De ferritineconcentratie is dan 263 µg/l waaruit een serumhepcidin-ferritineratio volgt van 41,8 pmol /µg (ref. range 10,8 - 216 pmol /µg). Er wordt gestart met intensieve aderlatingen waardoor zowel het ferritine als de transferrineverzadiging en het ALAT normaliseren. De spierpijnen verdwijnen eveneens.

Patiënt C is een 73-jarige man die zich presenteert met een geringe normocytaire anemie. De patiënt heeft geen klachten. De voorgeschiedenis is, behalve een

olecranonfractuur, blanco. Hij gebruikt geen medicatie en slechts een geringe hoeveelheid alcohol. De familieanamnese is negatief. Bij lichamelijk onderzoek worden geen afwijkingen vastgesteld. De BMI bedraagt 25,9 kg/m². Het laboratorium onderzoek toont een normocytaire anemie (Hb 7,4 mmol/l, MCV 94 fl). Leukocyten- en trombocytentellingen laten normale waarden zien, evenals de differentiatie van het witte bloedbeeld. De ferritineconcentratie bedraagt 1571 µg/l met een transferrineverzadiging van 88%. De transaminasen ALAT en ASAT zijn nauwelijks verhoogd. Beenmergonderzoek laat een beeld zien dat past bij een myelodysplastisch syndroom type RA (refractaire anemie). Genetisch onderzoek levert geen mutatie op in het HFE-gen. Aanvullend genetisch onderzoek toont een heterozygote N144H-mutatie. Serumhepcidine wordt in een later stadium bepaald. Deze bedraagt 17,6 nmol/l (ref. range bij de man: 1,1 - 13,9 nmol/l). De ferritineconcentratie is dan 964 µg/l waaruit een serumhepcidin-ferritineratio volgt van 18,3 pmol/µg (ref. range 10,8 - 216 pmol/µg). Aderlatingen leiden tot verergering van de anemie en worden spoedig gestaakt, mede gezien de leeftijd van patiënt en het ontbreken van klachten.

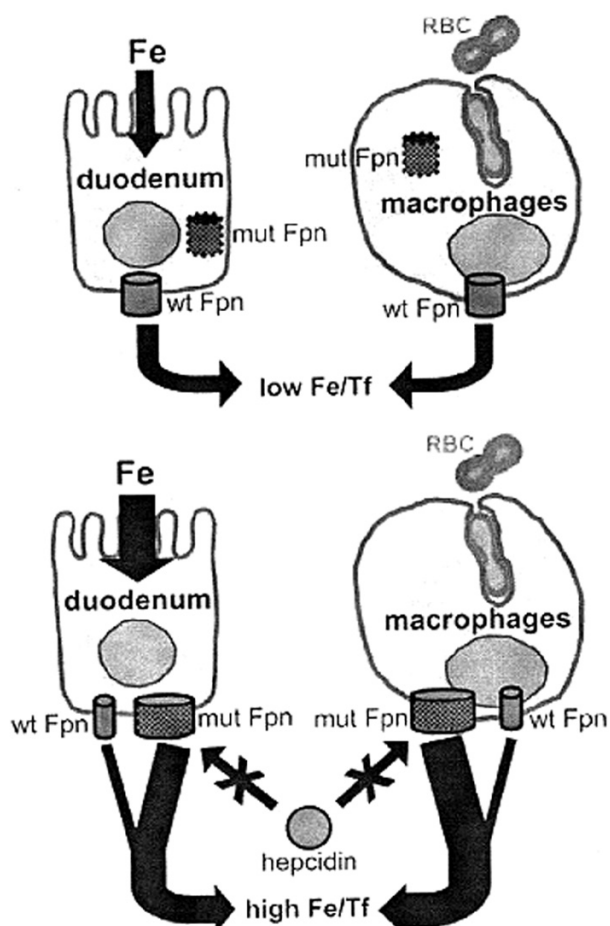
Het stellen van de diagnose primaire hemochromatose aan de hand van de recente richtlijnen

In mei 2007 is een nieuwe richtlijn verschenen voor het vaststellen van de diagnose HH (2, 8). Daar waar in de vorige richtlijn de (nuchtere) transferrineverzadiging bij herhaling verhoogd diende te zijn, verschaft nu de gecombineerde bepaling van transferrineverzadiging en ferritine in de eerste fase een betrouwbare vaststelling van de hoeveelheid ijzer in het lichaam (2). Voor de eenvoud is in de recente richtlijn gekozen voor één (niet noodzakelijk nuchtere) transferrineverzadiging afkapwaarde van 45% voor beide geslachten. De transferrineverzadiging is een goede maat voor detectie van de aanleg voor hemochromatose. De ferritineconcentratie is een goede maat voor de ijzervoorraad in het lichaam. Voor het vaststellen van verhoogde ferritinewaarden kan worden uitgegaan van de lokale, laboratorium gebonden, referentiewaarden voor mannen en vrouwen. In de tweede fase vindt onderzoek naar erfelijke oorzaken van hemochromatose plaats. Er is sprake van HFE-gerelateerde hemochromatose bij de C282Y-mutatie in homozygote vorm of bij een samengesteld C282Y/H63D-genotype (9). Indien de verhoogde ijzervoorraad niet verklaard kan worden door de aanwezigheid van een homozygoot C282Y-genotype of een samengesteld C282Y/H63D-genotype kan volgens de richtlijn met behulp van MRI een semi-kwantitatieve bepaling van het ijzer in de lever plaatsvinden. Een met MRI bevestigde ijzerstapeling kan vervolgens een indicatie vormen voor onderzoek naar non-HFE-gerelateerde vormen van HH (8).

Ferroportinegenmutaties

Naast de HFE-gerelateerde vorm zijn ook meer zeldzame vormen van hereditaire hemochromatose beschreven in Nederland (10). In 2001 werden verschillende mutaties in het ferroportine gen ontdekt als oorzaak van ijzerstapelingsziekte door zowel een onderzoeks-

groep in Nederland als Italië (11, 12). De aandoening erft autosomaal dominant over en heeft een hoge penetrantie (13). Een heterozygote mutatie kan voldoende zijn voor fenotypische expressie van HH, hetgeen de drie cases in dit case report illustreren. In Nederland is met name de N144H-ferroportinegenmutatie beschreven (11). Over de prevalentie van de ferroportinemutaties in de kaukasische of Nederlandse bevolking is weinig tot niets bekend (10, 13).



Figuur 1. De pathogenese van ijzerstapeling ten gevolge van ferroportinegenmutaties.

Bovenste afbeelding betreft 'loss of function'-mutatie. Het gemuteerde ferroportine blijft in het cytoplasma van de cel waardoor er geen ijzerexport uit de cel kan plaatsvinden via dit ferroportine. Het aanwezige 'wild type' ferroportine zorgt voor ongeveer de helft van de normale ijzerexport. Dit is onvoldoende voor de macrofaag die grote hoeveelheden ijzer moeten verwerken in het recyclingproces van ijzer. Hierdoor accumuleert het ijzer in de macrofagen wat leidt tot hoge ferritineconcentraties en een lage transferrineverzadiging.

De onderste afbeelding laat de pathogenese zien van de 'gain of function'-mutaties. Het gemuteerde ferroportine is hepcidineresistent waardoor ferroportine niet geïnternaliseerd kan worden en afgebroken. Daardoor is het ferroportine-eiwit op het celoppervlak verhoogd. De ijzerexport uit de cel neemt daardoor toe, in zo wel de enterocyten als de macrofagen. Met als gevolg dat ook de ijzerresorptie in het duodenum toeneemt. Zowel het ferritine als de transferrineverzadiging nemen toe en het overschot aan ijzer stapelt in het leverparenchym en andere weefsels. (RBC: red blood cell, Fe: ijzer, mutFpn: gemuteerd ferroportine, wtFpn: wild type ferroportine, Tf: transferrine) *Overgenomen uit Blood 2005; 105 (10): 3763, met permissie.*

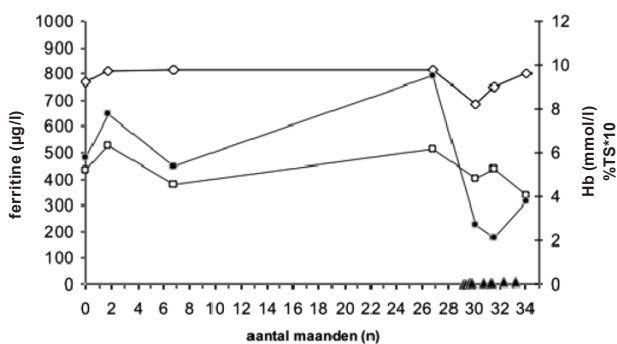
Ferroportine is een transmembraan eiwit dat betrokken is bij het transport van ijzer uit de cel en wordt gevonden in duodenale cellen, placenta, macrofagen en in mindere mate hepatocyten (14). Ferroportine staat onder invloed van het hormoneiwit hepcidine. Indien dit eiwit bindt aan ferroportine wordt ferroportine geïnternaliseerd en afgebroken. Hierdoor wordt het transport van ijzer uit de cel geblokkeerd. Bij een voldoende of een te grote ijzervoorraad is er een verhoogde afgifte van hepcidine door de lever waardoor ferroportine minder beschikbaar is en de dunne darmcel minder ijzer opneemt. Daarentegen leidt verminderde afgifte van hepcidine tot een verhoogde activiteit van ferroportine en daardoor tot een verhoogde ijzeropname. Hepcidinedeficienties zijn het pathofysiologisch mechanisme van de HFE-gengerelateerde vormen van HH waarbij het serumhepcidine te laag is ten opzichte van het serumferritine hetgeen leidt tot een verlaagde serumhepcidine-ferritineratio (15).

Er zijn in de loop van de tijd een toenemend aantal tot 25 mutaties in het ferroportinegen beschreven (13, 16-18). Ferroportinegenmutaties vormen een heterogene groep van mutaties die we fenotypisch kunnen onderverdelen in 2 groepen. Tot de ene groep behoren de mutaties die leiden tot ferroportine dat zich niet bindt aan het celoppervlak en dus geen ijzer kan exporteren, de zogenaamde 'loss of function'. De andere groep wordt de 'gain of function' genoemd. Hiertoe behoren de mutaties die leiden tot een ferroportine-eiwit dat massaal aan het celoppervlak gebonden is maar ongevoelig of resistent is voor hepcidine. Dit leidt tot een enorme toename van ijzerexport uit de cel, met als gevolg een ongeremde ijzeropname uit de darm, resulterend in eenzelfde beeld als de bekende HFE-gerelateerde HH. Deze 2 groepen onderscheiden zich ook in de transferrinesaturatie waarbij de 'loss of function'-groep naast een hoog ferritine een lage transferrinesaturatie heeft, terwijl de 'gain of function'-groep een verhoogde transferrinesaturatie heeft (figuur 1) (19, 20). Gegevens over de serumhepcidineconcentraties bij ferroportinemutaties zijn schaars en ook inconsistent door de beperkte beschikbaarheid van centra met betrouwbare meettechnieken. In twee patiënten met een mutatie leidend tot 'loss of function' werd een verhoogde waarde van hepcidine gevonden in de urine (21). In de 'gain of function'-groep werd een normale (22) of verhoogde serumhepcidineconcentratie gevonden in urine (23, 24). Deze verschillen in de gemeten hepcidine concentratie in de urine in de 'gain of function'-groep worden waarschijnlijk veroorzaakt door het heterogene karakter van de verschillende mutaties. Ook moet rekening gehouden worden met de invloed van de verhoogde erythropoëse in de eerste weken na aderlating op de uitslag van hepcidine (ongepubliceerde observaties van B. van Dijk en D. Swinkels). In 2001 werd de N144H-mutatie in het ferroportinegen ontdekt bij een familie in West-Brabant (11). De N144H-mutatie behoort bij de 'gain of function'-groep. Omdat de prevalentie van de N144H-mutatie in Nederland niet bekend is werd samenwerking gezocht met het RIVM. In de periode 1987 - 1991 werd door het RIVM een grootschalig bevolkingsonderzoek naar cardiovasculaire risicofactoren uitgevoerd onder meer

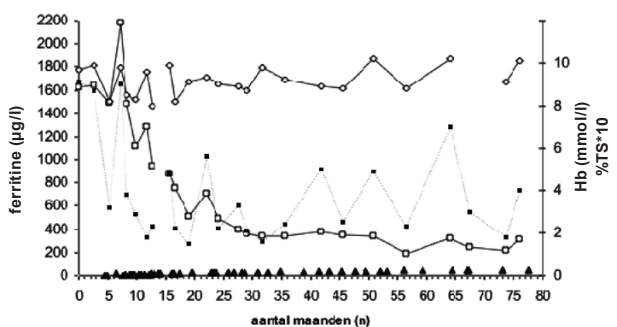
dan 35.000 Nederlandse mannen en vrouwen in de leeftijd van 20-59 jaar vanuit drie Nederlandse gemeenteregisters (Amsterdam, Doetinchem en Maastricht), het zogenaamde 'Monitoring Project on Cardiovascular Disease Risk Factors'. Uit de DNA-bank van dit project werd door het RIVM een random cohort van 1155 deelnemers geselecteerd waarin de N144H-mutatie werd bepaald. De N144H-mutatie werd in het geheel niet teruggevonden in deze Nederlandse steekproef. In de regio Breda is tot nu toe de N144H-mutatie gevonden bij 5 patiënten onder wie de 3 hier beschreven patiënten, die bekend zijn in onze kliniek. Voor zover ons bekend zijn deze patiënten geen familie van elkaar. Dit sluit een 'founder'effect niet uit aangezien er nog geen stamboomonderzoek heeft plaatsgevonden. Gezien het voorkomen van de N144H-mutatie in de Bredase regio hebben we dit DNA-onderzoek toegevoegd aan ons analyse pakket.

Effect van aderlating bij patiënten met N144H-mutatie

De behandeling van hemochromatose bij de N144H-mutatie bestaat uit aderlaten conform de richtlijn van HFE-gerelateerde hemochromatose. Mits tijdig ingesteld kan zo progressie van weefselschade worden



Figuur 2. De ijzerstatus tijdens aderlatingen bij patiënt A. Referentiewaarden: ferritine: 20-280 µg/l, Hb: 8,5 - 11,0 mmol/l. ▲ = 300 mL aderlating. In een periode van 6 maanden vinden 8 aderlatingen plaats. Transferrineverzadiging bij aanvang = 58%, na 6 maanden = 38%. □ = transferrine; ◇ = Hb; ■ = % TS.



Figuur 3. De ijzerstatus tijdens aderlatingen bij patiënt B. Referentiewaarden: ferritine: 20-280 µg/l, Hb: 8,5 - 11,0 mmol/l. ▲ = 500 ml aderlating. In een periode van 80 maanden vinden 49 aderlatingen plaats. Transferrineverzadiging bij aanvang = 91%, na 80 maanden = 40%. □ = transferrine; ◇ = Hb; ■ = % TS.

voorkomen (8). Zowel patiënt A als B verdragen de aderlatingen goed, hoewel bij patiënt A de frequentie van wekelijkse aderlating een lichte Hb-daling gaf die weer verdween nadat de frequentie werd verminderd.. De ferritineconcentratie daalt bij een stabiel Hb. De transferrineverzadiging normaliseert of blijft licht verhoogd (zie figuur 2 en 3). Patiënt C verdraagt de aderlatingen niet goed als gevolg van een myelodysplastisch syndroom. Gezien het geringe aantal aderlatingen is dit niet in figuurvorm weergegeven.

Patiënten A en B hadden beiden ook een heterozygote C282Y-mutatie. Patiënt C was geen drager van een klassieke HFE-mutatie. De invloed van de C282Y-heterozygotie op de mate van ijzerstapeling en het effect van de aderlatingen hierop zijn niet te bepalen op grond van de huidige bevindingen maar waarschijnlijk te verwaarlozen.

Bespreking casuïstiek

Bij patiënt A werd diagnostiek ingezet naar hemochromatose in verband met de aanwezigheid van HH bij zijn moeder. Er was sprake van slechts een gering verhoogde ferritineconcentratie en transferrineverzadiging. Daarom werd aanvullend genetisch onderzoek verricht. Hierbij bleek sprake van een heterozygote C282Y-mutatie. Dus was HFE-gerelateerde HH onwaarschijnlijk. In eerste instantie werden de afwijkingen in de ijzerstatus toegeschreven aan het alcoholgebruik. Echter het staken hiervan leverde geen verbetering op van de ferritineconcentratie en de transferrineverzadiging. Aansluitend werd, mede door het aanwezig blijven van de klachten, een MRI-opname van het abdomen gemaakt. Deze toonde evidente ijzerstapeling. Omdat de patiënt in de regio Breda woont werd aanvullend onderzoek gedaan naar de N144H-mutatie. Deze was aanwezig. Hiermee was de diagnose HH bevestigd. Aderlatingen werden gestart waarbij eenzelfde patroon van daling van het ferritine werd gezien als bij patiënten met een HH veroorzaakt door een HFE-mutatie (zie figuur 2).

Bij patiënt B werd een soortgelijk traject doorlopen als bij patiënt A. Alleen werd bij deze patiënt een leverbiops genomen in plaats van een MRI-abdomen omdat ten tijde van de diagnostische fase ijzerstapelingsmeting in het abdomen m.b.v. MRI nog niet beschikbaar was. Het ferritine > 1000 µg/l, in geval van bevestigde HH adviseert de CBO-richtlijn dan een leverbiopsie te doen. Ook deze patiënt startte met aderlatingen waarbij ferritine en de transferrineverzadiging daalden zoals verwacht na aderlatingen voor de klassieke vorm van HH (zie figuur 3).

Bij patiënt C werd, in het kader van onderzoek naar een anemie, eveneens een sterk verhoogde ferritineconcentratie en transferrineverzadiging gevonden. Het aanvullend genetisch onderzoek leverde geen mutatie op. Daarom werd gedacht aan secundaire ijzerstapeling, in dit geval in het kader van het vastgestelde myelodysplastisch syndroom. In verband met de aanwezige lichte verhoging van de transaminasen werd toch besloten om de patiënt aanvullend te onderzoeken op de N144H-mutatie. Deze was positief waarmee de diagnose HH werd bevestigd. Volgens de recente richtlijn voor HH had eerst een MRI van de

lever gemaakt moeten worden. Omdat patiënt in de regio Breda woont werd ervoor gekozen om eerst de N144H-bepaling te doen, mede in het kader van het onderzoek door ons ziekenhuis naar N144H-mutaties in onze regio. Er werd aansluitend gestart met aderlatingen wat de anemie deed verergeren, zodat hiervan verder werd afgezien.

Bij de hier beschreven patiënten werd het serumhepcidine in een later stadium bepaald. Omdat de erythroïese invloed kan hebben op deze bepaling werd er een tijdsperiode van tenminste 8 weken aangehouden tussen de laatste aderlating en de serumhepcidine-bepaling. In twee patiënten was de serumhepcidine-concentratie normaal en bij de derde patiënt was deze verhoogd. Echter een serumhepcidineconcentratie op zich heeft onvoldoende onderscheidend vermogen. De serumhepcidineconcentratie kan het beste gerelateerd worden aan de ferritineconcentratie uitgedrukt in de serumhepcidine-ferritineratio. Bij HFE-gerelateerde hemochromatose is deze ratio duidelijk verlaagd (15). Bij de hier beschreven patiënten werd een normale serumhepcidine-ferritineratio gevonden. Dit suggereert dat bij een klinisch vermoeden op ijzerstapeling op grond van een verhoogde transferrineverzadiging en een verhoogde ferritineconcentratie maar een afwezige HFE-mutatie, een hepcidine-ferritineratio kan helpen om richting te geven aan verder onderzoek. Een normale hepcidine-ferritineratio wijst op een ferroportine mutatie uit de 'gain of function'-groep. HFE en ook de meer zeldzame andere vormen van hemochromatose hebben juist een lage hepcidine-ferritineratio.

Conclusie

Indien er een verdenking bestaat op primaire hemochromatose is aanvullend genetisch onderzoek op de C282Y-mutatie en de H63D-mutatie geïndiceerd. Alle drie hier beschreven patiënten hebben een transferrinesaturatie >45% en een ferritineconcentratie boven de referentiewaarden van het laboratorium. Op basis van de herziene CBO-richtlijn hebben ze dus ijzerstapeling. Er worden evenwel geen klassieke HFE-genotypes gevonden. Dit sluit HH echter niet uit. Aanvullend onderzoek bestaat dan volgens de richtlijn uit een MRI-opname van het abdomen om ijzerstapeling vast te stellen. Gezien het voorkomen van de N144H-mutatie in het ferroportinegen in de regio Breda werd deze mutatie bij bovengenoemde patiënten gericht onderzocht. Deze bepaling heeft mogelijk in de rest van Nederland weinig zin omdat deze mutatie niet werd aangetoond in de Nederlandse steekproef (Amsterdam, Doetinchem en Maastricht) en alleen in de regio Breda werd gevonden. Echter gezien de omvang van de steekproef is hierover uiteraard geen harde uitspraak te doen. Het belang van het opsporen van het N144H-genotype ligt hierin dat de diagnose HH ondersteund wordt en verder familieonderzoek raadzaam maakt. Bij het ontbreken van de klassieke HFE-mutaties kan een normale serumhepcidine-ferritineratio aanleiding zijn om onderzoek te doen naar andere mutaties die leiden tot ijzerstapeling zoals de ferroportinegen-mutaties. Verder onderzoek naar deze ratio in diverse afwijkingen van het ijzermetabolisme zal mogelijk in de

toekomst leiden tot een nog verfijndere diagnostiek. Aderlatingen werden door twee van de drie patiënten goed verdragen. Het effect was gelijkwaardig aan de aderlatingen bij de klassieke HFE-gerelateerde hemochromatose. Dit was ook de verwachting omdat de N144H-mutatie een zogenaamde 'gain of function'-mutatie is.

Referenties

1. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis - a new look at an old disease. *N Engl J Med.* 2004; 350: 2383-97.
2. <http://www.nvkc.nl/kwaliteitsborging/documents/richtlijnhemochromatosedefinitief2007.pdf>
3. Elmlinger MW et al. Reference ranges for serum concentrations of LH, FSH, E2, prolactin, progesterone, SHBG, DHEAS, cortisol and ferritin in neonates, children and young adults. *Clin Chem Lab Med.* 2002; 40: 1151-60.
4. IFCC, Schumann G et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of the catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. *Clin Chem Lab Med.* 2006; 44 (9): 1146-55.
5. Stott MK, Fellowes AP, Upton JD, Burt MJ, George PM. Simple multiplex PCR for the simultaneous detection of the C282Y and H63D hemochromatosis (HFE) gene mutations. *Clin Chem.* 1999; 45: 426-8.
6. Koeken A, Schrauwen L, de Baar E, Cobbaert C. Hemochromatosis detection in the Breda region - an updated diagnostic strategy. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk.* 2004; 29: 58 (Abstract).
7. Kroot JJ, Laarakkers CM, Geurts-Moespot AJ, Grebentchikov N, Pickkers P, van Ede AE, Peters HP, et al. Immunochemical and mass-spectrometry-based serum hepcidin assays for iron metabolism disorders. *Clin Chem.* 2010; 56 (10): 1570-9.
8. Swinkels DW, Jorna AT, Raymakers RA. Synopsis of the Dutch multidisciplinary guideline for the diagnosis and treatment of hereditary haemochromatosis. *Neth J Med.* 2007; 65: 452-5.
9. Swinkels DW, Marx JJM. Diagnostiek en behandeling van primaire hemochromatose. *Ned Tijdschr Geneesk.* 1999; 143: 1404-8.
10. Bergmans JPH, Stalenhoef AFH, Marx JJM, Janssen MCH, Swinkels DW, Jacobs EMG, Kemna EHJM. Hereditaire hemochromatose: nieuwe genen, nieuwe ziekten en hepcidine. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2007; 151: 1121-7.
11. Njajou OT, Vaessen N, Joosse M, Berghuis B, van Dongen JW, Breuning MH, et al. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet.* 2001; 28: 213-4.
12. Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S, Trenor CC, Gasparini P, Andrews NC, Pietrangelo A. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest.* 2001; 108: 619-23.
13. Mayr R, Janecke AR, Schranz M, Griffiths WJH, Vogel W, Pietrangelo A, Zoller H. Ferroportin disease: a systematic meta-analysis of clinical and molecular findings. *J Hepatology* 2010; 53 (5): 941-9.
14. De Domenico I, Ward DM, Musci G, Kaplan J. Iron overload due to mutations in ferroportin. *Haematologica* 2006; 91: 92-5.
15. Dijk BAC van, Laarakkers CMM, Klaver SM, Jacobs EMG, Tits LJH van, Janssen MCH, Swinkels DW. Serum hepcidin levels are innately low in HFE-related haemochromatosis but differ between C282Y-homozygotes with elevated and normal ferritin levels. *Br J Haematol.* 2008; 142: 979-85.
16. Pietrangelo A. The ferroportin disease. *Blood Cells Mol Dis.* 2004; 32: 131-8.

17. Drakesmith H, Schimanski LM, Ormerod E, Merryweather-Clarke AT, Viprakasit V, Edwards JP, Sweetland E, Bastin JM, Cowley D, Chinthammitr Y, Robson KJ, Townsend AR. Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood*. 2005; 106: 1092-7.
18. Lee PL, Beutler E. Regulation of hepcidin and iron-overload disease. *Annu Rev Pathol*. 2009; 4: 489-515. Review.
19. Oates PS. The role of hepcidin and ferroportin in iron absorption. *Histol Histopathol*. 2007; 22: 791-804.
20. Nemeth E. Ferroportin mutations: a tale of two phenotypes. *Blood*. 2005; 105: 3763-4.
21. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J et al. Hepcidin in iron overload disorders. *Blood*. 2005; 105: 4103-5.
22. Camaschella C. Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders. *Blood*. 2005; 106: 3710-7.
23. Sham RL, Phatak PD, Nemeth E, Ganz T. Hereditary hemochromatosis due to resistance to hepcidin: high hepcidin concentrations in a family with C326S ferroportin mutation. *Blood*. 2009; 114: 493-4.
24. Sham RL, Phatak PD, West C, Lee P, Andrews C, Beutler E. Autosomal dominant hereditary hemochromatosis associated with a novel ferroportin mutation and unique clinical features. *Blood Cells Mol Dis*. 2005; 34: 157-61.

Summary

Wijngaarden P van, Hoskam J, Koeken A, Boer JMA, Swinkels DW, Ermens AAM, Cobbaert CM. Hereditary hemochromatosis due to ferroportin-gene mutations; significance for hepcidin measurement as screening tool? Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk. 2011, 36: 6-11.

Hereditary hemochromatosis (HH) refers to several inherited disorders of iron metabolism leading to tissue iron overload. Several of these are caused by rare mutations like the N144H ferroportin-gene mutations. The ferroportin-gene mutations can be subdivided in 2 groups, the so called 'loss of function' and the 'gain of function' group. We describe two young men and one aged man with hereditary hemochromatosis due to a 'gain of function' ferroportin-gene mutation. The detection of the N144H ferroportin-gene mutation with the current hereditary hemochromatosis guideline in The Netherlands is discussed, as well as the pathophysiology of iron overload and the role of hepcidin as a possible diagnostic screening tool. The patients were diagnosed according to the Dutch guideline concerning hereditary hemochromatosis. In all patients the ratio serum hepcidin concentration/ferritin was normal. In case of hereditary hemochromatosis due to HFE gene mutations this ratio will be decreased. When iron overload has been diagnosed and testing for HFE gene mutation appears negative, the serum hepcidin/ferritin ratio prompts examining other gene mutations like the 'gain of function' ferroportin gene mutation.

Keywords: ferroportin N144H gene mutation; hemochromatosis; hepcidin

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2011; 36: 11-15

Het gebrek aan sensitiviteit en specificiteit van de totaaleiwitbepaling voor de detectie van monoklonale vrije lichte ketens in urine

J.W. BRINKMAN¹, D.H.T. IJPELAAR², A.M. SCHRANDER-van der MEER², G.J.P.M. JONKERS² en C. BEIJER^{1,3}

Laboratoriumonderzoek naar monoklonale gammopathie speelt een essentiële rol in de diagnostiek van hematologische maligniteiten en auto-immuunaandoeningen. Vanwege de complexiteit van de diagnostiek naar M-proteïnen wordt in veel ziekenhuislaboratoria gebruik gemaakt van richtlijnen met daarin adviezen omtrent uitvoering en interpretatie van het laboratoriumonderzoek hiernaar. Een veel gebruikte richtlijn is de CBO-richtlijn 'Monoklonale Gammopathie' uit 2001 waarin aanbevelingen gedaan worden omtrent zowel screenend als vervolgonderzoek naar M-proteïne in bloed en urine. Hoewel in een groot deel van de patiënten deze richtlijn in de praktijk

zeer bruikbaar is gebleken, blijkt deze in onze casus niet zonder meer toepasbaar. Zo beschrijft de CBO-richtlijn dat bij een totaaleiwitconcentratie in de urine van boven 200 mg/l aanvullend onderzoek naar monoklonale vrije lichte ketens geïndiceerd is. De huidige gebruikte totaaleiwitassays zijn echter niet sensitief en specifiek genoeg waardoor de diagnose van M-proteïne gemist kan worden. Dit, in overeenstemming met de publicatie van Brigden et al. (1). Naar aanleiding van deze casus wordt een overzicht gegeven van de analysemethoden van totaaleiwit en monoklonale vrije lichte ketens in urine en de valkuilen die zich daarbij voor kunnen doen.

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Diaconessenhuis, Leiden; Interne Geneeskunde² en Klinisch Chemisch Laboratorium³, Rijnland Ziekenhuis, Leiderdorp

Correspondentie: dr. J.W. Brinkman, LUMC, CKCL, Postzone E2-P, Kamer E2-21, Postbus 9600, 2300 RC Leiden
E-mail: j.w.brinkman@lumc.nl

Laboratoriumonderzoek naar monoklonale gammopathie speelt een essentiële rol in de diagnostiek van hematologische maligniteiten en auto-immuunaandoeningen (2). Vanwege de complexiteit van de interpretatie van deze diagnostiek is in 1990 de eerste CBO-richtlijn 'Onderzoek bij paraproteïnemie' ver-