

## Real-time PCR per la determinazione delle varianti HLA II DQ2/DQ8 nella diagnosi della malattia celiaca

### AMPLI-HLA-II-DQ2/DQ8 Cat. n.1.701RT

La malattia celiaca (MC) è una delle patologie autoimmuni più comuni nei paesi occidentali (prevalenza in Europa 0.3% - 1%) caratterizzata da atrofia dei villi intestinali, iperplasia delle cripte ed aumento dei linfociti intraepiteliali conseguente alla assunzione di glutine con gli alimenti. La MC è una patologia genetica ad eredità multifattoriale con produzione di un autoanticorpo contro la Transglutaminasi Tissutale (tTG). L'enzima tTG agisce deaminando la gliadina che, associata agli antigeni HLA (Human Leucocyte Antigen) di classe II DQ2 o DQ8, viene presentata ai linfociti T della lamina propria; la cronica stimolazione di queste cellule porta ad una attivazione immunologica persistente e ad atrofia della mucosa intestinale. La MC è strettamente associata alla presenza dell'antigene HLA di classe II DQ2/DQ8. Infatti, il 90-95% dei celiaci hanno il DQ2 e il 5-10% il DQ8. Il solo HLA non è specifico per la celiachia in quanto gli stessi aplotipi DQ2 e DQ8 sono presenti nel 20-30% della popolazione normale non celiaca. La determinazione degli aplotipi DQ2 e DQ8 in un soggetto a rischio è utile solo nel caso sia negativo: in questo caso si può escludere una enteropatia da glutine.

La determinazione degli aplotipi DQ2 e DQ8 può costituire un test di screening di primo livello per escludere la MC in alcuni gruppi di soggetti a rischio, quali: familiari di primo grado di celiaci, soggetti con deficit di IgA, diabetici tipo 1, e soggetti con sindrome di Down. Nei casi positivi per HLA DQ2 o DQ8 si procederà alle indagini sierologiche e all'esame istologico della mucosa duodenale. Il test può essere utile anche in quei casi in cui l'esame istologico della mucosa intestinale non consente di giungere ad una diagnosi conclusiva: a) lesioni mucosali "minime"; b) marcatori sierologici positivi, in mancanza di evidente atrofia dei villi intestinali; c) mucosa normale in soggetti già in dieta priva di glutine, prima di essere sottoposti a indagine sierologica e valutazione istologica.

Il kit **AMPLI HLA II-DQ2/DQ8** permette di identificare mediante l'uso della Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) gli alleli HLA-DQA1\*05/DQB1\*02 e DQB1\*0302 codificanti rispettivamente per gli aplotipi DQ2 e DQ8. In particolare, sono utilizzate 11 Mix HLA contenenti primers/probe-FAM, specifici per gli alleli DQA1 e DQB1, e primers/probe-JOE specifici per il gene albumina (ALB) come controllo interno di PCR.

La determinazione degli alleli HLA-DQA1\*05/DQB1\*02 (codificanti per DQ2) e DQB1\*0302 (codificante per DQ8) nella diagnosi di MC ha un elevato valore predittivo negativo (esclusione della MC) ma un basso valore predittivo positivo (conferma della MC).

**Principio del metodo:** a) estrazione del DNA genomico; b) amplificazione Real-time; c) rivelazione con un sistema Real Time PCR.

**Applicabilità:** Su DNA estratto e purificato da campioni di sangue intero.

**Numero di Test:** 16 (considerando errori di pipettaggio, i volume sono forniti in eccesso)

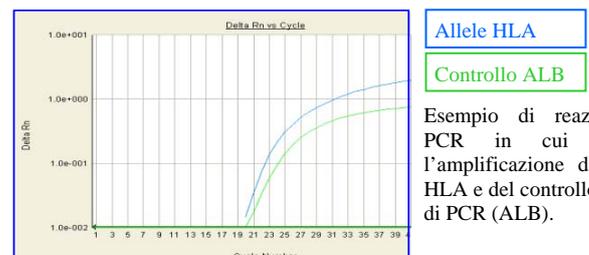
Sollid, L.M. et al. Clin. Gastroenterol. Hepatol. 3, 843 (2005).  
Sollid, L.M. et al. J. Exp. Med. 169, 345 (1989).

#### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

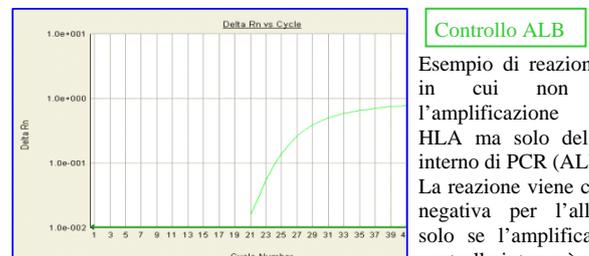
I prodotti di amplificazione, per gli alleli HLA-DQA1/DQB1 e ALB, sono rilevati direttamente monitorando l'aumento di fluorescenza dei fluorocromi FAM e JOE.

#### CONTENUTO DEL KIT E SUA CONSERVAZIONE

REAL-TIME PCR	
10X HLA MIX-1 (Primers/ probe-FAM)	-20°C
10X HLA MIX-2 (Primers/ probe-FAM)	-20°C
10X HLA MIX-3 (Primers/ probe-FAM)	-20°C
10X HLA MIX-4 (Primers/ probe-FAM)	-20°C
10X HLA MIX-5 (Primers/ probe-FAM)	-20°C
10X HLA MIX-6 (Primers/ probe-FAM)	-20°C
10X HLA MIX-7 (Primers/ probe-FAM)	-20°C
10X HLA MIX-8 (Primers/ probe-FAM)	-20°C
10X HLA MIX-9 (Primers/ probe-FAM)	-20°C
10X HLA MIX-10 (Primers/ probe-FAM)	-20°C
10X HLA MIX-11 (Primers/ probe-FAM)	-20°C
10X Albumina (Primers/ probe-JOE)	-20°C
Master Mix 2X	+4°C
H <sub>2</sub> O RNase/DNase-free	-20°C
Controllo DNA	-20°C



Esempio di reazione di PCR in cui si ha l'amplificazione dell'allele HLA e del controllo interno di PCR (ALB).



Esempio di reazione di PCR in cui non si ha l'amplificazione dell'allele HLA ma solo del controllo interno di PCR (ALB). La reazione viene considerata negativa per l'allele HLA solo se l'amplificazione del controllo interno è positiva.

**Stabilità:** oltre 18 mesi se correttamente conservato.

#### Bibliografia:

- Dube, C. et al. Gastroenterology 128, S57 (2005).
- Hill, I.D. et al. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 40, 1 (2005).
- Kaukinen, K. et al. Am. J. Gastroenterol. 97, 695 (2002).
- Hoffenberg, E.J. et al. J. Pediatr. 143, 308 (2003).
- Mazzilli, M.C. et al. Hum.Immunol. 33, 133 (1992).
- Olerup, O. et al. Tissue Antigens 39, 225 (1992).
- Reinton, N. et al. J. of Immunol. Methods 316, 125 (2006).
- Sollid, L.M. et al. Nat. Rev. Immunol. 2, 647 (2002).

**PRESENZA eterodimero HLA-DQ2** se tra le Mix HLA risultate positive è presente la combinazione **1-2-4**  
**PRESENZA eterodimero HLA-DQ8** se tra le Mix HLA risultate positive è presente la combinazione **4-5-11**  
**ASSENZA eterodimero HLA-DQ2 o DQ8** se tra le Mix HLA risultate positive non sono presenti le combinazioni 1-2-4 o 4-5-11.