

Úloha č. 5

RealTime PCR diagnostika celiakie

Diagnostika bude prováděna komerční soupravou, která slouží ke genotypizaci HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02), HLA-DQ8 (DQA1*03/DQB1*0302) a HLA-DR4 (DRB1*04) genů z izolované DNA. Diagnostická souprava je založena na principu RealTime PCR. Pro detekci alel DQ2, DQ8 a DRB1 a interní kontroly jsou použity primery a značené sondy (FAM a JOE).

Celiakie patří mezi jedno z nejčastějších entero-patogenních onemocnění a je charakterizovaná celoživotní přecitlivělostí k lepku, proteinu obsaženém v pšenici, žitě, ovsu a ječmeni. Celiakie nepatří mezi alergická onemocnění, ale je charakterizovaná intolerancí ke gliadinu tvořícím část lepku. Imunologická nesnášenlivost k lepku vede v raném dětství ke chronické zánětlivé odpovědi u sliznice tenkého střeva s následnou špatnou absorpcí vyznačující se chronickým průjmem, tukovitou stolicí a špatným růstem. Celá řada dospělých pacientů poté může pociťovat jiné atypické příznaky jako nadýmání, hubnutí, únavu, problémy s pokožkou a klouby nebo migrény. Naopak celá řada lidí nemusí pociťovat vůbec žádné příznaky. Neléčená celiakie poté zvyšuje riziko NHL (non-Hodgkinovského lymfomu) a zřejmě i riziko rakoviny tenkého střeva.

Do dnešní doby byla celiakie vnímána jako relativně vzácné onemocnění s mírou prevalence 1:1000 až 1:4000. Avšak nově dostupnost sérologických testů vedla k pozorování, že celiakie je daleko častější onemocnění, než bylo dříve předpokládáno, postihující v Evropě zhruba 1 ze 100-400 osob. Většina diagnostikovaných pacientů vykazovala minimální klinické příznaky. Poslední výsledky navíc ukazují na silnou genetickou vazbu ve spojení s rozvojem celiakie.

Celiakie je multi-faktoriální onemocnění asociované s alelami HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02) nebo DQ8 (DQA1*03/DQB1*0302) nebo HLA-DRB1*04. HLA DQ2 alela je exprimována u většiny osob trpících celiakií (>90%), DQ8 alela poté asi u 8%. Expresí zmíněných alel je nezbytná, ale ne však dostatečná k propuknutí celiakie, v současné době se předpokládá pouze asi 50% vliv genetické složky na vznik celiakie. U osob trpících celiakií je výskyt HLA-DQ2 alely asi 95%, zatímco u běžné populace je výskyt této alely pouze 20%. Z malé skupiny osob trpících celiakií a negativních pro HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02) alelu, je drtivá většina pozitivní na HLA-DRB1*04 alelu. Z tohoto pohledu je absence zmíněných alel velmi dobře využitelná pro vyloučení celiakie.

Souprava detekuje geny pro alely DQA1*05, DQB1*02 (HLA DQ2), DQB1*0302 a DRB1*04. Jako vnitřní kontrola je použit gen SYPL2 (synaptophysin-like 2).

- Pro detekci DQA1*05, DRB1*04 a DQB1*0302 alel je použita sonda značená FAM barvou (exc. 494 nm – em. 518 nm)
- Pro detekci DQA1*03, DQB1*02 a SYPL2 (interní kontrola) je použita sonda značená JOE barvou (exc. 520 nm – emise 548 nm)
- Reakční Mix obsahuje pasivní referenční barvu ROX pro normalizaci signálu

Příprava reakčního Mixu (MasterMixu):

Upozornění: Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování MasterMixu, odlišnou mikropipetu pro pipetování vzorků a odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol. Dodržujte veškerá doporučení pro laboratoře provádějící DNA analýzy.

1. Detekce: Vezměte jednu zkumavku s CELI-DQ2 Mixem, jednu zkumavku s CELI-DQ8 Mixem a jednu zkumavku s CELI-DR4 Mixem. Po rozmrazení, promíchání a krátkém stočení pipetujte do tří sad amplifikačních zkumavek po 17,5 µl každého Mixu a přidejte 2,5 µl izolované DNA. Pokud nevyužijete veškerý obsah zkumavky s MasterMixem, zamrazte ho a uchovejte při -20 °C v temnu. Nezamrazujte mikrozkušavky s MasterMixem opakovaně. Za těchto podmínek je MasterMix stabilní nejméně 14 dní.

2. Pozitivní kontrola: Vezměte jednu zkumavku s CELI-DQ2 Mixem, jednu zkumavku s CELI-DQ8 Mixem a jednu zkumavku s CELI-DR4 Mixem. Po rozmrazení, promíchání a krátkém stočení pipetujte do tří sad amplifikačních zkumavek po 17,5 µl každého Mixu a přidejte 2,5 µl pozitivní kontroly PC CELI.

LightCycler® 480 (Roche):

Pro reakci používejte pouze bílé destičky. Použití průhledných destiček může vést k poklesu citlivosti kitu. Nepoužívejte destičky opakovaně; při manipulaci s destičkou může dojít ke kontaminaci laboratoře PCR produkty.

V možnosti Detection format zvolte "Dual Color Hydrolysis probe".

Nastavte následující teplotní profil:

Step 1 - Analysis mode "None", 1 Cycle

95°C 3 min Ramp rate (4.4°C/s) Acquisition mode "None"

Step 2 - Analysis mode "Quantification", 40 Cycles

95°C 15 s Ramp rate (4.4°C/s) Acquisition mode "None"

58°C 40 s Ramp rate (2.2°C/s) Acquisition mode "Single"

Step 3 - Analysis mode "None", 1 Cycle

40°C 1 min Ramp rate (2.2°C/s) Acquisition mode "None"

Odečet výsledků:

LightCycler® 480 (Roche):

V nabídce "Analysis" zvolte možnost "Abs Quant/2nd Derivative Max".

V okně "Analysis" klikněte na ikonu "Color Comp" a zvolte Universal CC FAM (510)-HEX (580) kalibraci. Analyzujte výsledky kliknutím na ikonu "Calculate".

Pozitivní výsledek: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM (465-510) a JOE (533-580) kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Hodnoty "Concentration" u vzorků poté odpovídají kvantitě pozitivního výsledku, "Negative" znamená negativní výsledek. Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v daném kanálu.

Interpretace výsledků:

HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02) pozitivní

Pokud je pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELI-DQ2 Mixu v obou kanálech FAM (DQA1*05) a JOE (DQB1*02).

HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02) negativní

Pokud není pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELI-DQ2 Mixu v obou kanálech FAM (DQA1*05) a JOE (DQB1*02). Signál pro vnitřní kontrolu (SYPL2) v JOE kanálu u CELI-DR4 Mixu však musí být pozitivní.

Důležitá poznámka: Pro HLA-DQ2 pozitivní výsledek je nutné mít pozitivní výsledek pro obě alely, DQA1*05 a DQB1*02. Pokud je pozitivní pouze jedna z alel, pacient není HLA-DQ2 pozitivní)

HLA-DQ8 (DQA1*03/DQB1*0302) pozitivní

Pokud je pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELI-DQ8 Mixu v obou kanálech FAM (DQB1*0302) a JOE (DQA1*03) a zároveň rozdíl Ct hodnot mezi signálem v kanálu FAM (DQB1*0302) a kanálu JOE (DQA1*03) není vyšší než 4.

HLA-DQ8 (DQA1*03/DQB1*0302) negativní

Pokud není pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELI-DQ8 Mixu v obou kanálech FAM (DQB1*0302) a JOE (DQA1*03) nebo rozdíl Ct hodnot mezi signálem v kanálu FAM (DQB1*0302) a kanálu JOE (DQA1*03) je vyšší než 4. Signál pro vnitřní kontrolu (SYPL2) v JOE kanálu u CELI-DR4 Mixu však musí být pozitivní.

Důležitá poznámka: Pro HLA-DQ8 pozitivní výsledek je nutné mít pozitivní výsledek pro obě alely, DQA1*03 a DQB1*0302. Pokud je pozitivní pouze jedna z alel, pacient není HLA-DQ8 pozitivní)

HLA-DR4 pozitivní

Pokud je pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELI-DR4 Mixu v kanálu FAM (DRB1*04) je vzorek HLA-DR4 pozitivní.

Důležitá poznámka: Vzhledem k tomu, že se DR4 alela vyskytuje v haplotypu s DQ8 alelou, je při detekované pozitivitě DQ8 alely detekována i pozitivita v DR4 alele.

HLA-DR4 negativní

Pokud není pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELI-DR4 Mixu v kanálu FAM (DRB1*04) je vzorek HLA-DRB1*04 negativní. Signál pro vnitřní kontrolu (SYPL2) v JOE kanálu u CELI-DR4 Mixu však musí být pozitivní.

Následující tabulka shrnuje výsledky popisující genetickou predispozici pro celiakii:

Genotyp	CELI-DQ2 Mix		CELI-DQ8 Mix		CELI-DR4 Mix	
	FAM DQA1*05	JOE DQB1*02	FAM DQB1*0302	JOE DQA1*03	FAM DRB1*04	JOE IC
DQ2	+	+	-	+	-	+
DQ2	+	+	-	+	+	+
DQ2	+	+	+	-	+	+
DQ2	+	+	+	-	-	+
DQ8/DR4	+	-	+	+	+	+
DQ8/DR4	-	+	+	+	+	+
DQ8/DR4	-	-	+	+	+	+
DQ2/DQ8/DR4	+	+	+	+	+	+
DR4	+	-	-	-	+	+
DR4	-	+	-	-	+	+
DR4	-	-	-	-	+	+
DR4	+	-	-	+	+	+
DR4	-	+	-	+	+	+
DR4	-	-	-	+	+	+

Pozitivní výsledek:

DQ2, DQ8 a/nebo DRB1 alela byly zjištěny ve vzorku.

Inhibovaný vzorek:

V případě, že nedojde k nárůstu amplifikačního signálu u CELI-DQ2 a CELI-DR4 Mixu v obou kanálech FAM, JOE a ani k nárůstu amplifikačního signálu u CELI-DQ8 Mixu v kanálu FAM, je nutné analýzu zopakovat nejlépe s nově izolovanými vzorky DNA.

Kontrolní postup:

Kit využívá jako vnitřní izolační kontrolu detekci lidského genu SYPL2 (synaptophysin-like 2) v CELI-DR4 Mixu v kanálu JOE. Gen pro SYPL2 je přítomen v každém vzorku lidské DNA, tudíž není nutné přidávat ke vzorku Vnitřní kontrolu. Inhibiční izolační kontrola sleduje kvalitu izolace DNA a detekuje případné chyby v procesu izolace DNA. Detekuje také případné inhibice amplifikačního procesu. V případě že vzorek je DQA1*05/DQB1*02, DQB1*0302 a DRB1*04 DNA negativní, Ct vnitřní kontroly musí mít hodnotu 40 nebo méně.