

# Úloha č. 6

## RealTime PCR diagnostika celiakie

### ÚVOD

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 DR4 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 multifaktoriální onemocnění asociované s alelami HLA-DQ2 (DQA1\*05/DQB1\*02) nebo DQ8 (DQA1\*0301/DQB1\*0302), která je asociována v haplotypu s alelou HLA-DR4 (DRB1\*04). HLA DQ2 alela je exprimována u většiny osob trpících celiakií (> 90 %), DQ8 alela poté asi u 8 %. Expresie zmíněných alel je nezbytná, ne však dostatečná, k propuknutí celiakie. V současné době se předpokládá 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-DQ8 alelu. Z tohoto pohledu je absence zmíněných alel velmi dobře využitelná pro vyloučení celiakie.

Souprava detekuje alely HLA-DQ2 (DQA1\*05, DQB1\*02), HLA-DQ8 (DQA1\*03, DQB1\*0302) a HLA-DR4 (DRB1\*04). Jako vnitřní kontrola je použit lidský 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) alel je použita sonda značená JOE barvou (exc. 520 nm – emise 548 nm)
- Reakční Mix obsahuje pasivní referenční barvu High-ROX pro normalizaci signálu

## PRACOVNÍ POSTUP

### Upozornění:

Při práci vždy používejte rukavice. Veškerý materiál v laboratoři je nutno považovat za potenciálně infekční. Vyhněte se kontaktu reagensů s kůží. V případě kontaktu, potřísněné místo omyjte důkladně vodou. Vyvarujte se požití součástí kitu. Reagencie označené jako hořlavé musejí být drženy v dostatečné vzdálenosti od otevřeného plamene nebo ohně.

### I. Příprava reakčního Mixu (MasterMixu):

**Materiál:** pipety, špičky, PCR destičky, izolát DNA z 1. úlohy, voda pro molekulární biologii, kit EliGene® Coeliac RT

- 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.
- 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 DNA (PC CELI).

### II. Spuštění RealTime PCR - 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:

	95°C	3 min
40x	95°C	15 sek (denaturace)
	58°C	40 sek (annealing)
	40°C	1 min

### III. 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) a zároveň rozdíl Ct hodnot mezi signálem v kanálu FAM (DQA1\*05) a kanálu JOE (DQB1\*02) není vyšší než 4.

#### **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) nebo rozdíl Ct hodnot mezi signálem v kanálu FAM (DQA1\*05) a kanálu JOE (DQB1\*02) je vyšší než 4. 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 CELIDQ8 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 CELIDQ8 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

#### **Pozitivní výsledek**

DQ2, DQ8 a/nebo DR4 alela byly zjištěny ve vzorku

### Inhibovaný vzorek

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

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	-	-	-	+	+	+