

PCR en tiempo real para el diagnóstico de los desórdenes asociados al glúten

García-Menéndez G¹, González-García N¹, Casanueva-Calero K¹, Martínez-Echevarría MT¹, Rangel-Velázquez S¹, Chang-Monteagudo A², Ortega-Carballosa A¹

¹Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”; ² Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba.

Email: gisselgarcia@infomed.sld.cu

RESUMEN

En los últimos años se ha incrementado a nivel mundial el espectro de desórdenes asociados al gluten (DRG), por lo que ha ganado cada vez más valor la detección por métodos de biología molecular de los alelos HLA-DQA1*05, HLA-DQB1*02 y HLA-DQB1*03:02. Se realizó una investigación en el Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras” durante el año 2016 con el objetivo de implementar un método de PCR en Tiempo Real para el diagnóstico de los desórdenes asociados al gluten. Se utilizaron como controles cuatro muestras de ADN cuyos alelos para la molécula HLA-DQ fueron tipificadas estuches de baja y alta resolución Olerup SSP® y se evaluaron además 14 muestras con HLA desconocido. Se empleó el estuche comercial GenVinSet HLA CELIAC (Blackhills Diagnostic Resources, S.L) y un equipo Cobas Z480 (Roche Diagnostic) para la detección de los alelos HLA-DQB1*02, DQB1*03:02 y DQA1*05. En todos los controles y muestras se obtuvieron curvas de amplificación en el canal correspondiente al control interno. Existió un 100 % de concordancia entre los dos métodos en la detección de todos los alelos en los controles. El control 4, heterocigótico con dos alelos HLA-DQB1*03 diferentes de DQB1*03:02 resultó identificado correctamente como negativo. Se encontró además, que el control 2: HLA-DQB1*02, DQB1*03:02 era también DQA1*05, lo cual no se había podido determinar a través del método de referencia. De las 14 muestras que no habían sido tipificadas previamente por SSP, ninguna resultó heterocigótica a HLA-DQB1*02 DQB1*03:02; y el 14,3% (n=2) mostró el heterodímero HLA-DQB1*02 DQA1*05. El 28 % (n=4) presentó solo DQA1*05, el 64,3 % (n=9), solo DQB1*02 y el 7,1 % (n=1), solo DQ

B1*03:02 (DQ8). El método de PCR-TR implementado permitió detectar los alelos HLA-DQB1*02, DQB1*03:02 y DQA1*05, y el estuche comercial GenVinSet HLA CELIAC fue compatible con el equipo de PCR-RT Cobas Z480.

Palabras clave: enfermedad celíaca, HLA, PCR en tiempo real.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado a nivel mundial el espectro de desórdenes asociados al gluten (DRG): enfermedad celíaca (EC), dermatitis herpetiforme, ataxia al gluten, alergia al trigo y sensibilidad al gluten. Esto ha conllevado al perfeccionamiento de los métodos y los algoritmos diagnósticos para estas enfermedades, dentro de los que ha ganado cada vez más el valor a la detección de los alelos HLA-DQA1*05, HLA-DQB1*02 y HLA-DQB1*03:02.¹

Aunque estos alelos HLA se relacionan con una mayor susceptibilidad a los DRG, las pruebas genéticas que los determinan tienen un valor predictivo negativo cercano al 100 %, pero un bajo valor predictivo positivo. Es decir, que el resultado de laboratorio de mayor importancia es justamente la ausencia de los mismos, ya que la intolerancia al gluten raramente ocurre si no están presentes estos alelos HLA predisponentes; sin embargo, su sola presencia no conlleva a la inmunopatogenia de la enfermedad.²

El desarrollo de los métodos de biología molecular, entre ellos la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (PCR-TR), han permitido aumentar la detección de combinaciones de alelos HLA-DQA1 y HLA-DQB1 (2), lo cual brinda una mayor fortaleza para la solución del puzzle diagnóstico de los DRG. Es por ello que, en las nuevas guías para el diagnóstico de la EC se le ha dado un alto valor a la detección de la predisposición genética y se ha establecido que las biopsias duodenales pueden ser omitidas en caso de detectarse elevados títulos de anticuerpos anti-trasglutaminasa 2 (TG2) y la presencia de alto riesgo genético.³

En Cuba no están generalizadas las pruebas genéticas para el diagnóstico de la EC y otros DRG. Es por ello que se hace necesaria la implementación de métodos de biología molecular avanzados y precisos que permitan brindar un mejor diagnóstico.

OBJETIVOS

General: Implementar un método de PCR en Tiempo Real para el diagnóstico de los desórdenes asociados al gluten.

Específicos:

- 1) Determinar la compatibilidad entre el analizador LightCycler® cobas z480 y el estuche comercial GenVinSet HLA CELIAC en la determinación de los alelos DQA1*05, DQB1*02 y DQB1*03:02.
- 2) Establecer el análisis e interpretación de la determinación de los alelos HLA DQA1*05, DQB1*02 y DQB1*03:02 mediante PCR en Tiempo Real.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron como controles cuatro muestras de ADN cuyos alelos para la molécula HLA-DQ fueron tipificadas con el estuche de baja resolución Olerup SSP® HLA-A-B-DR-DQ y de alta resolución, Olerup SSP® DQB1*03.⁴ Incluyeron, Control 1: HLA-DQB1*02, DQB1*04, Control 2: HLA-DQB1*02, DQB1*03:02 Control 3: HLA-DQB1*03:02, DQB1*03:02, Control 4 (negativo): HLA-DQB1*03:01, DQB1*03:03.

Se incluyeron además 14 muestras de ADN de individuos con diagnósticos presuntivos de enfermedad celíaca (13) y dermatitis herpetiforme (1), recibidas en el Laboratorio de Genética Molecular del Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras” en el período junio-diciembre del 2016.

La extracción de ADN se realizó empleando el estuche comercial High Pure Template Preparation Kit (Roche) según las normas del fabricante. La concentración y pureza de las muestras debió ser mayor que 3,0 ng/μL y 1,7, respectivamente y se determinó por el método espectrofotométrico empleando un monocromador de microgotas Nano-Drop (Thermo Scientific).

Para la reacción de PCR-TR se empleó el estuche comercial GenVinSet HLA CELIAC (Blackhills Diagnostic Resources, S.L), el cual emplea sondas Taqman para la detección de los alelos HLA-DQB1*02, DQB1*03:02 y DQA1*05.⁵

Las reacciones se realizaron en un equipo Cobas Z480 (Roche Diagnostic) en formato de placas y tres reacciones por muestra que permite el análisis de las mencionadas variantes alélicas. La fluorescencia emitida se leyó en los canales de FAM (465-510 nm) para las sondas alelo específico y HEX (540-580 nm) para las sondas del control interno de β globina.

Para ambos canales de lectura se consideraron positivos los valores de ciclo umbral Cp (del inglés *Crossing Point*) menor de 35 para cada variante alélica y las pruebas se consideraron válidas cuando al menos mostraron curvas de amplificación en el canal HEX (540-580 nm) correspondiente al control interno.

RESULTADOS

En todos los controles y muestras se obtuvieron curvas de amplificación en el canal HEX (540-580 nm) correspondiente al control interno, independientemente de que resultadas positivas o negativas a los alelos en estudio.

Existió 100% de concordancia entre los dos métodos (SSP OLERUP y PCR-RT GenVinSet HLA CELIAC), en la detección de todos los alelos en los controles (Tabla 1). El control 4, que presentaba dos alelos HLA-DQB1*03 diferentes de DQB1*03:02 resultó identificado correctamente como negativo. Se encontró además, que el control 2: HLA-DQB1*02,

DQB1*03:02 era también DQA1*05, lo cual no se había podido determinar a través del método de referencia.



Tabla. Resultados de la detección de los alelos HLA-DQB1*02, DQB1*03:02 y DQA1*05 en los controles y muestras

Muestras		DQB1*02		DQA1*05		DQB1*03:02	
		Muestras=14 Controles=4		Muestras =14 Controles=4		Muestras =14 Controles=4	
		Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Controles tipificados por SSP	Positivos	2	0	-	-	2	0
	Negativos	0	2	-	-	0	2
	No tipificados	-	-	1*	3*	-	-
Muestras no tipificadas por SSP		11	3	6	8	1	13

* Los estuches SSP de referencia no permitieron la evaluación del HLA-DQA1*05

De las 14 muestras que no habían sido tipificadas previamente por SSP, ninguna resultó heterocigótica a HLA-DQB1*02 DQB1*03:02; y el 14,3 % (n=2) mostró el heterodímero HLA-DQB1*02 DQA1*05. Además, el 28 % (n=4) presentó solo DQA1*05, el 64,3 % (n=9), solo DQB1*02 y el 7,1 % (n=1), solo DQ B1*03:02 (DQ8).

CONCLUSIONES

- 1) El método de PCR-TR implementado permite detectar los alelos HLA-DQB1*02, DQB1*03:02 y DQA1*05.
- 2) El estuche comercial GenVinSet HLA CELIAC es compatible con el equipo de PCR-RT Cobas Z480.

RECOMENDACIONES

Incorporar este método diagnóstico en el sistema nacional de salud, dada la disponibilidad de la tecnología Roche en el país y la necesidad creciente del conocimiento y mejor diagnóstico de los DRG.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tovoli F, Masi C, Guidetti E, Negrini G, Paterini P, Bolondi L. Clinical and diagnostic aspects of gluten related disorders. *World journal of clinical cases*. 2015;3(3):275-84.
2. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2012;54(1):136-60.
3. Ontiveros N, Hardy MY, Cabrera-Chavez F. Assessing of Celiac Disease and Nonceliac Gluten Sensitivity. *Gastroenterology research and practice*. 2015;2015:723954.
4. Olerup. HLA-A-B-DR-DQ SSP Combi Tray Product Insert. Stockholm; 2013.
5. BDR. GENVINSET® HLA CELIAC. GSV-DQ-48. Molecular determination of HLA alleles associated with Celiac Disease. Product Insert.2017. Available from: http://www.bdrdiagnostics.com/pdf/prod/genvinset/PRODGenvinset_Celiac.pdf.