

Comunicación breve

Empleo del estuche GENVINSET HLA Celiac, en el equipo Cobas z 480 para la detección de las moléculas HLA DQ

Use of the GENVINSET HLA Celiac Kit in Cobas z480 Analyzer for HLA DQ Molecules Detection

Gissel García Menéndez^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-9851-2041>

Mayrene Horta Remedios¹ <https://orcid.org/0000-0002-5502-032X>

Nadezhda González García¹ <https://orcid.org/0000-0002-2380-7953>

Alexander Ortega Carballosa¹ <https://orcid.org/0000-0002-2973-058X>

Bisleydis Hernández Acea¹ <https://orcid.org/0000-0003-4064-4276>

Arturo Chang Monteagudo² <https://orcid.org/0000-0002-0843-372X>

¹Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras.” La Habana, Cuba.

²Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: gisselgarcia@infomed.sld.cu

RESUMEN

Objetivo: Definir un procedimiento de uso para el estuche GENVINSET HLA CELIAC (*Blackhills Diagnostic Resources*) en el equipo Cobas z 480 (Roche), para la determinación de los alelos del HLA clase II HLA-DQ2 (DQB1*02 y DQA1*05) y/o HLA-DQ8 (DQB1*03:02), importante herramienta para el diagnóstico de celiaquía.

Métodos: Se identificaron tres muestras de ADN como controles, las cuales se tipificaron previamente con el sistema de baja resolución Olerup SSP® HLA-A-B-DR-DQ y de alta resolución Olerup SSP® DQB1*03. Se analizaron 33 muestras de ADN de individuos con diagnóstico probable de celiaquía, basado en resultados histológicos obtenidos a partir de una biopsia de intestino delgado.

Resultados: De las 33 muestras analizadas, 23 resultaron positivas para algún alelo HLA-DQ y 10 fueron negativas. El análisis de la frecuencia de los alelos HLA-DQ mostró un predominio de los alelos HLA-DQB1*02 (52 %), seguido de la combinación HLA-DQB1*02/DQA1*05 (9 %) y HLA-DQB1*03:02 (9 %).

Conclusión: El estuche comercial GENVINSET HLA CELIAC (BDR) es compatible con el equipo Cobas z 480 (Roche).

Palabras claves: GENVINSET HLA CELIAC (BDR); enfermedad celíaca; celiacía; HLA-DQ; PCR en tiempo real; Roche.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the compatibility of the GENVINSET HLA CELIAC (Blackhills Diagnostic Resources, BDR) system for the determination of HLA class II alleles: HLA-DQ2 (DQB1*02 and DQA1*05) and / or HLA-DQ8 (DQB1*03:02), an important tool for the diagnosis of celiac disease, with the Cobas z 480 (Roche) equipment.

Methods: Three DNA samples were identified as controls, which were previously typed with low resolution Olerup SSP® HLA-A-B-DR-DQ system and high resolution Olerup SSP® DQB1 * 03 system. Thirty-three DNA samples from individuals with a probable diagnosis of celiac disease were analyzed, based on histological results obtained from a small bowel biopsy.

Results: The analysis of 33 samples showed that 23 were positive for at least one HLA-DQ allele and 10 were negative. The predominant frequency of HLA-DQ was associated to HLA-DQB1*02 (52%), followed by the combination of HLA-DQB1*02/DQA1*05 (9%) and HLA-DQB1*03:02 (9%).

Conclusion: The commercial kit GENVINSET HLA CELIAC (BDR) can be used in Cobas z 480 Real Time PCR platform (Roche).

Keywords: GENVINSET HLA CELIAC (BDR); Celiac Disease; HLA-DQ; Real Time PCR; Roche.

Recibido: 18/02/2021

Aprobado: 15/04/2021

Introducción

La celiacía o enfermedad celíaca (EC), es un desorden autoinmune de curso crónico asociada a la ingestión de gluten.⁽¹⁾ Se presenta fundamentalmente en individuos predispuestos genéticamente que, condición necesaria aunque no suficiente, deben expresar los antígenos del sistema HLA (HLA, del inglés *Human Leukocyte Antigen*) clase II: HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8.⁽²⁾ La EC afecta a habitantes de todo el mundo, con aproximadamente 1 % de prevalencia global.^(3,4)

Las herramientas disponibles para el diagnóstico de la EC incluyen la biopsia de intestino delgado, pruebas serológicas y marcadores genéticos. La gran mayoría de los pacientes con EC (90 - 95 %), portan la molécula HLA-DQ2 (DQA1*05 y

DQB1*02), mientras que el resto de los pacientes (5 - 10 %), portan el HLA-DQ8 (DQB1*03:02).⁽⁵⁾ Desde una perspectiva diagnóstica, un resultado negativo en una tipificación de los genes que codifican para las mencionadas moléculas es lo más definitorio. Ese resultado excluiría completamente el diagnóstico de EC. Los marcadores genéticos constituyen un indicador cuando el diagnóstico de EC es controversial debido a discrepancias entre los resultados serológicos e histológicos.^(6,7)

El creciente empleo de la tipificación basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés *Polimerase Chain Reaction*) ha tenido como resultado el desarrollo de estuches comerciales para la detección de los genes HLA-DQ asociados a la EC.⁽⁸⁾ Un ejemplo de ello, es el estuche comercial GENVINSET HLA CELIAC, el cual permite la detección de los alelos DQB1*02, DQB1*03:02 y DQA1*05. GENVINSET HLA CELIAC. Se basa en tres reacciones de amplificación de PCR en tiempo real con cebadores específicos monitorizadas con sondas TaqMan^{®(9)}

Cuba no cuenta con laboratorios especializados que realicen la tipificación del HLA-DQ para complementar el diagnóstico de EC. En el Laboratorio de Genética Molecular del Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras” (HHA), se implementó la plataforma Roche para el diagnóstico por PCR en tiempo real de disímiles patologías. Sin embargo, esta plataforma no comercializa estuches para la determinación de los alelos HLA-DQ asociados a la EC.

En la literatura revisada no se encuentra registrado hasta la fecha el uso del estuche comercial GENVINSET HLA CELIAC en equipos de PCR en tiempo real de la plataforma Roche, la cual ha sido implementada en diferentes laboratorios de nuestro país.

Teniendo en cuenta que las especificaciones dadas por el fabricante del estuche para el equipo de PCR Rotor gene Q (Qiagen) y la importancia que reviste para Cuba contar con este diagnóstico, el presente trabajo pretende definir un procedimiento de uso para el estuche GENVINSET HLA Celiac (BDR) en el equipo Cobas z 480.

Métodos

Muestras

Se analizaron tres muestras controles de ADN, previamente caracterizadas con los estuches de baja resolución Olerup SSP[®] HLA-A-B-DR-DQ y de alta resolución Olerup SSP[®] DQB1*03: Control 1: HLA-DQB1*02, DQB1*04. Control 2: HLA-DQB1*02, DQB1*03:02. Control 3: HLA-DQB1*03:01, DQB1*03:03. Se analizaron

33 muestras de pacientes con presunto diagnóstico histológico de EC. Estas se colectaron en el Laboratorio de Genética Molecular del Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras” durante el período septiembre de 2016 - abril de 2018. Las muestras de ADN se obtuvieron a partir de 200µL de sangre periférica con el empleo del estuche comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), según las normas del fabricante.⁽¹⁰⁾ La determinación de la concentración y pureza se determinó con el empleo de un monocromador de microgotas *NanoDropOne* (ThermoScientific).

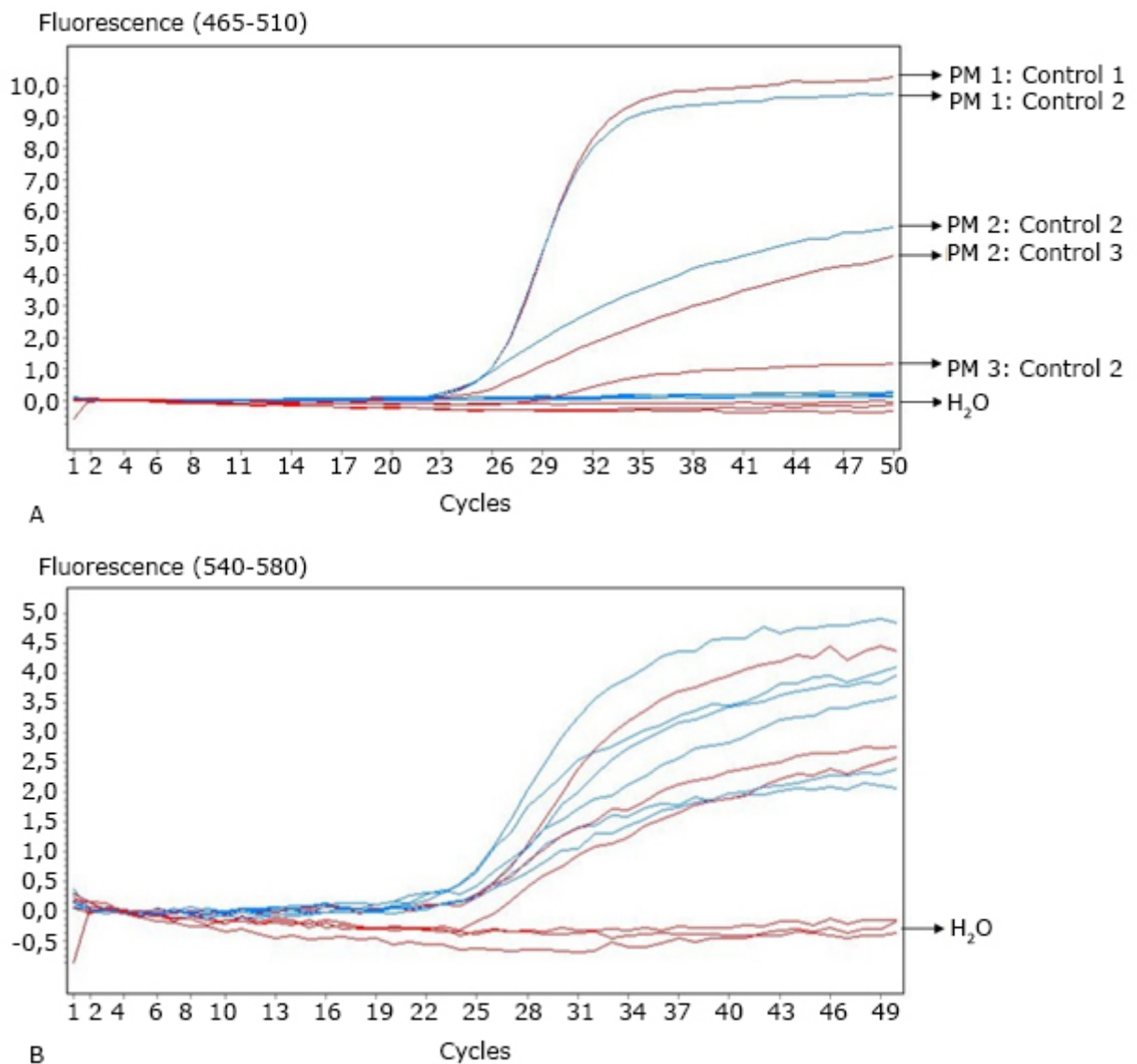
Amplificación de ADN

La detección de los alelos DQB1*02, DQB1*03:02 y DQA1*05 del sistema HLA-DQ, asociados a la EC, tanto de las muestras como de los controles, se realizó con el empleo del estuche comercial GENVINSET HLA CELIAC según las normas del fabricante. El termociclador Cobas z 480 (Roche) se programó según lo referido en el manual del fabricante de estuche comercial GENVINSET.⁽⁹⁾ Los resultados de amplificación se leyeron y se analizaron seleccionando la opción Endpoint Genotipe en el termociclador Cobas z 480 (Roche). Los patrones de fluorescencia y los valores de Cp (del inglés, *Crossing Point*) obtenidos se compararon con los descritos en el manual del fabricante del estuche comercial.

Con el objetivo de comprobar la concordancia del método de PCR en tiempo real con el método de referencia Olerup SSP® de alta y baja resolución, se evaluaron por ambos métodos, 10 de las 33 muestras de ADN pertenecientes a los pacientes. Los análisis estadísticos descriptivos de frecuencia se realizaron con el programa SPSS Versión 20.

Resultados

Para la evaluación de la compatibilidad del estuche GENVINSET HLA CELIAC y la plataforma Roche se evaluaron muestras controles cuyos alelos para la molécula HLA-DQ se tipificaron con el estuche de baja resolución Olerup SSP® HLA-AB-DR-DQ, y de alta resolución Olerup SSP® DQB1*03. La figura 1 muestra el patrón de fluorescencia obtenido al evaluar estas muestras controles en el equipo Cobas z 480 (Roche).



A: Fluorescencia en el canal FAM (465-510 nm) correspondiente a los alelos HLA-DQ.

B: Fluorescencia en el canal HEX (540-580 nm) correspondiente al control interno (β -globina). PM: Mezcla de sondas alelo específicas (del inglés *Primer Mix*). PM1, PM2 y PM3 corresponden a las mezclas de reacción para detectar los alelos HLA. PM1= HLA-DQB1*02, PM2=HLA-DQA1*05, PM3= HLA-DQB1*03:01.

Fig. Patrón de fluorescencia de las muestras controles

El análisis de las muestras empleadas como controles por los métodos Olerup SSP[®] mostró que las mismas eran: Control 1: HLA-DQB1*02, DQB1*04; Control 2: HLA-DQB1*02, DQB1*03:02; Control 3: HLA-DQB1*03:01, DQB1*03:03.

Las muestras analizadas empleando el estuche GENVINSET HLA CELIAC en la plataforma Roche -Cobas z 480 corroboraron los resultados obtenidos previamente en la tipificación realizada con el empleo del método Olerup SSP[®]. El sistema Cobas z 480 detectó, además, que las muestras empleadas como controles 2 y 3, portaban la cadena alfa del HLA-DQ2 (HLA-DQA1*05) (Fig. 1A). Todos los controles revelaron curvas de fluorescencia en el canal HEX (540-580 nm) correspondiente al control interno (Fig. 1B).

En posteriores experimentos donde se analizaron las 33 muestras con presunto diagnóstico de EC, se empleó el Control 2 (HLA-DQB1*02, DQB1*03:02, DQA1*05) como control positivo, y como control negativo H₂O, según las recomendaciones del fabricante del estuche comercial.⁽⁹⁾

El fabricante refiere como muestras positivas aquellas que exhiben una curva de fluorescencia cuyo valor de Cp sea menor de 35.⁽⁹⁾ En la tabla 1, se muestran los valores máximos de Cp obtenidos en cada una de las corridas. Cada corrida contó como mínimo de tres muestras (dos muestras controles y la muestra problema) y se analizaron un total de 33 muestras las cuales tenían diagnóstico clínico presuntivo de EC.

Tabla. Valores máximos de Cp detectados en cada una de las corridas

Canales/ Corridas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
FAM	32	32	30	26	28	26	29	29	29	29	29	32	29	25
HEX	32	28	30	26	28	26	29	29	29	29	29	30	29	25

Los valores de Cp obtenidos en cada caso fueron menores que 35, lo cual está en concordancia con lo indicado por el fabricante del estuche comercial.

Del total de muestras analizadas (33), con el uso del estuche comercial GENVINSET HLA CELIAC en el termociclador Cobas z 480 (Roche), 23 resultaron positivas para algún alelo HLA-DQ. El análisis de la frecuencia de los alelos HLA-DQ mostró un predominio de HLA-DQB1*02 (52 %), seguido de la combinación de alelos HLA-DQB1*02-DQA1*05 (9%) y HLA-DQB1*03:02 (9 %).

Debido a la disponibilidad de reactivos, de las 33 muestras estudiadas se seleccionaron 10 al azar con el objetivo de comprobar su genotipificación para los alelos HLA-DQ2 y HLA-DQ8 mediante el método estándar Olerup SSP[®]. Se pudo comprobar que los resultados encontrados coincidieron entre ambos métodos.

Discusión

En Cuba, desde hace algunos años, se viene implementando la plataforma Roche para diagnósticos que emplean como herramienta el PCR en tiempo real. Estas plataformas suplementan los estuches comerciales para detectar cambios a nivel genético, ya sean mutaciones, polimorfismos, translocaciones entre otras, las cuales se asocian a diferentes patologías. También proveen pruebas

que permiten el diagnóstico de diferentes enfermedades infecciosas.⁽¹⁰⁾ Sin embargo, no poseen en sus catálogos todo el espectro diagnóstico y la EC está incluida en este caso. Por lo tanto, resulta de importancia vital evaluar estuches comerciales producidos para utilizar en otras plataformas⁽⁹⁾ y que pudieran, teniendo en cuenta sus principios de funcionamiento, ser compatibles con la plataforma de Roche. Esto permitiría ampliar el espectro diagnóstico de la misma y mejorar el mismo en nuestras condiciones.

El método que emplea el estuche comercial GENVINSET se basa en el uso de sondas TaqMan[®] o sondas de hidrólisis.⁽⁹⁾ Estas sondas son diseñadas para incrementar la especificidad del PCR en tiempo real y se basan en la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa para escindir una sonda marcada, ya hibridada a la secuencia diana, que permite la emisión de fluorescencia.^(11,12)

El equipo Cobas z 480 posee un sistema óptico de alto rendimiento con un conjunto de cinco filtros de excitación (440-618 nm) y seis filtros de emisión (488-660 nm). Cuenta con varios formatos de análisis y puede usar un amplio rango de sondas y fluoróforos. El mismo es capaz de detectar sondas de hidrólisis marcadas con los fluoróforos: LightCycler[®]Cyan 500, FAM, HEX, LightCycler[®] Red 610, LightCycler[®] Red 640, o Cy5, los cuales pueden usarse de manera individual o combinada. De esta forma, con el empleo de la combinación de canales de lectura FAM y HEX, se puede generar y, en consecuencia, detectar una señal de fluorescencia por la unidad óptica del instrumento de PCR en tiempo real empleado.⁽¹³⁾ Sin embargo, un estudio de mayor precisión requerirá una evaluación de un número mayor de muestras por el método de PCR en Tiempo Real GENVINSET HLA Celiac y los métodos de referencia Olerup SSP[®] de alta y baja resolución que permita aseverar la concordancia entre ambos métodos.^(6,8)

Estudios realizados en Cuba sobre los genes que codifican para el HLA y que han evaluado la distribución de los alelos de clase I y II en la población cubana,^(14,15,16,17) evidenciaron que en ella están presentes las moléculas DQB1*02 y DQB1*03 como los más frecuentes dentro de los alelos HLA-DQB1.⁽¹⁸⁾ A esto se agrega que la población cubana es el resultado de una mezcla con fuerte ascendencia española y africana.⁽¹⁴⁾ Según describe la literatura, el dímero HLA-DQ2 (DQB1*02 y DQA1*05) es el más frecuentes en la población celíaca (90 - 95 %), fundamentalmente en pacientes del centro y norte de Europa y en los países del Mediterráneo.⁽¹⁸⁾ Se han reportado además con una frecuencia relativamente alta en el norte y oeste de África.⁽¹⁹⁾ Teniendo en cuenta lo anterior, se pudiera explicar, al menos en parte, las frecuencias encontradas en el presente trabajo.

El hecho de encontrar 10 muestras negativas a las moléculas HLA estudiadas y, por consiguiente, individuos que no padecen la enfermedad demuestra la necesidad de tener en cuenta los cuatro criterios para el diagnóstico de la EC: la clínica, la histología, los anticuerpos anti-transglutaminasa y las pruebas genéticas. Estas últimas poseen un doble valor, ya que un resultado positivo respalda el diagnóstico de EC y un resultado negativo, en cambio, descarta el diagnóstico de la enfermedad.^(6, 20)

Finalmente, nuestros resultados evidencian que los parámetros seleccionados en el equipo Cobas z 480 (Roche), permiten el análisis de las moléculas HLA-DQ con el empleo del estuche comercial GENVINSET HLA CELIAC y que pudiera emplearse para el diagnóstico genético de la enfermedad celíaca.

Referencias bibliográficas

1. Dickson BC, Streutker CJ, Chetty R. Coeliac disease: an update for pathologists. *J Clin Pathol.* 2006;59:1008-16. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2005.035345>.
2. Tovoli F, Masi C, Guidetti E, Negrini G, Paterini P, Bolondi L. Clinical and diagnostic aspects of gluten related disorders. *World J Clin Cases.* 2015;3(3):275-84. DOI: <http://dx.doi.org/10.12998/wjcc.v3.i3.275>
3. Ludvigsson JF, Rubio-Tapia A, van Dyke CT, Melton LJ 3rd, Zinsmeister AR, Lahr BD, Murray JA. Increasing incidence of celiac disease in a North American population. *Am J Gastroenterol.* 2013;108(5):818-24. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2013.60>
4. Tye-Din JA, Galipeau HJ, Agardh D. Celiac Disease: A Review of Current Concepts in Pathogenesis, Prevention, and Novel Therapies. *Front Pediatr.* 2018;6:350. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fped.2018.00350>
5. Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C, *et al.* Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Medicine.* 2019;17(1):142. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-019-1380-z>
6. Kaukinen K, Partanen J, Mäki M, Collin P. HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(3):695-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05471.x>
7. Sharma N, Bhatia S, Chunduri V, Kaur S, Sharma S, Kapoor P, *et al.* Pathogenesis of Celiac Disease and Other Gluten Related Disorders in Wheat

and Strategies for Mitigating Them. *Front Nutr.* 2020;7:6. DOI:
<http://dx.doi.org/10.3389/fnut.2020.00006>

8. Selleski N, Almeida LM, Almeida FC, Gandolfi L, Pratesi R, Nóbrega YK. Simplifying Celiac Disease Predisposing HLA-DQ Alleles Determination by the Real Time PCR Method. *Arq Gastroenterol.* 2015;52(2):143-6. DOI:
<http://dx.doi.org/10.1590/S0004-28032015000200013>

9. Molecular Diagnostic of Celiac Disease. GENVINSET LINE. GENVINSET HLA CELIAC. Real Time PCR assay, Product Code GSV-DQ-48 ,GSV-DQ-24. CE-IVD, No of test 48. [acceso:25/3/2018]. Disponible en:
www.blackhilldiagnostic.com

10. RMD/Cobas ® 4800 System, SBN-RMD-2020-002 version 1. FT 19 FSN Template V2: 01, 2014. cobas z 480 analyzer.GMMI: 0500881001- Roche Diagnostics. [acceso:25/3/2018]. Disponible en:
<https://diagnostics.roche.com>

11. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(16):7276-80. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.16.7276>

12. Farina F, Picascia S, Pisapia L, Barba P, Vitale S, Franzese A, Mozzillo E, Gianfrani C, Del Pozzo GG. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 Alleles, Conferring Susceptibility to Celiac Disease and Type 1 Diabetes, are More Expressed Than Non-Predisposing Alleles and are Coordinately Regulated. *Cells.* 2019 Jul 19;8(7):751. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells8070751>

13. Mashayekhi K, Rostami-Nejad M, Amani D, Rezaei-Tavirani M, Mohaghegh-Shalmani H, Zali MR. A rapid and sensitive assay to identify HLA-DQ2/8 risk alleles for celiac disease using real-time PCR method. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2018[acceso:25/3/2018];11(3):250-8. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6040037/>

14. Paradoa M, Middleton D, Acosta A, Sarmiento ME, Leyva J. Genes HLA en una muestra de la población cubana. *Vaccimonitor.* 2000[acceso:25/3/2018];9(3):1-5. Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2000000300001&lng=es&nrm=iso.

15. Morera Barrios LM, Ustáriz García C, García García MA, Hernández Hernández A, Lam Díaz RM, Guerreiro Hernández AM, *et al.* Frecuencia de antígenos HLA en la población cubana, según características étnicas. *Rev*

Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2005[acceso:25/3/2018];21(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892005000200004&lng=es

16. Alegre R, Moscoso J, Martínez J, Martín M, Suárez J, Moreno A. HLA genes in Cubans and the detection of Amerindian alleles. *Mol Immunol*. 2007;44(9):2426-35. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2006.10.017>

17. Morera-Barrios LM, Chang-Monteagudo A, García-García MA, De la Guardia O, Ustariz-García C, Marcell-Rodríguez L, *et al*. Frecuencia de genes HLA en pacientes con insuficiencia renal crónica procedentes del occidente y centro de Cuba. *Revista Cubana de Hematol, Inmunol y Hemoter*. 2015[acceso:25/3/2018];31(1):32-40. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892015000100004&nrm=iso

18. Catassi C. El mapa mundial de la enfermedad celíaca. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*. 2005[acceso:25/3/2018];35(1):46-55. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=19317328008>

19. Gujral N, Freeman HJ, Thomson AB. Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol*. 2012 Nov 14;18(42):6036-59. DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v18.i42.6036>

20. Lau MS, Sanders DS. Optimizing the diagnosis of celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2017;33(3):173-80. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MOG.0000000000000343>

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses

Contribución de los autores

Gissel García Menéndez: Concepción de la idea, diseño del estudio, realización del trabajo, análisis de los resultados, escritura de la publicación.

Mayrene Horta Remedios: Realización del trabajo, análisis de los resultados y escritura de la publicación. Constituyó su tesis de grado de Licenciatura en Bioquímica y Biología Molecular.

Nadezhda González García: Diseño del estudio, realización del trabajo, análisis de resultados.

Alexander Ortega Carballosa: Concepción de la idea, análisis de los resultados.

Bisleydis Hernández Acea: Extracción de las muestras de ADN utilizadas en el trabajo.

Arturo Chang Monteagudo: Caracterización de las muestras empleadas como controles, análisis de resultados.