

## HLA-DQ2/8 typering met de EUROArray

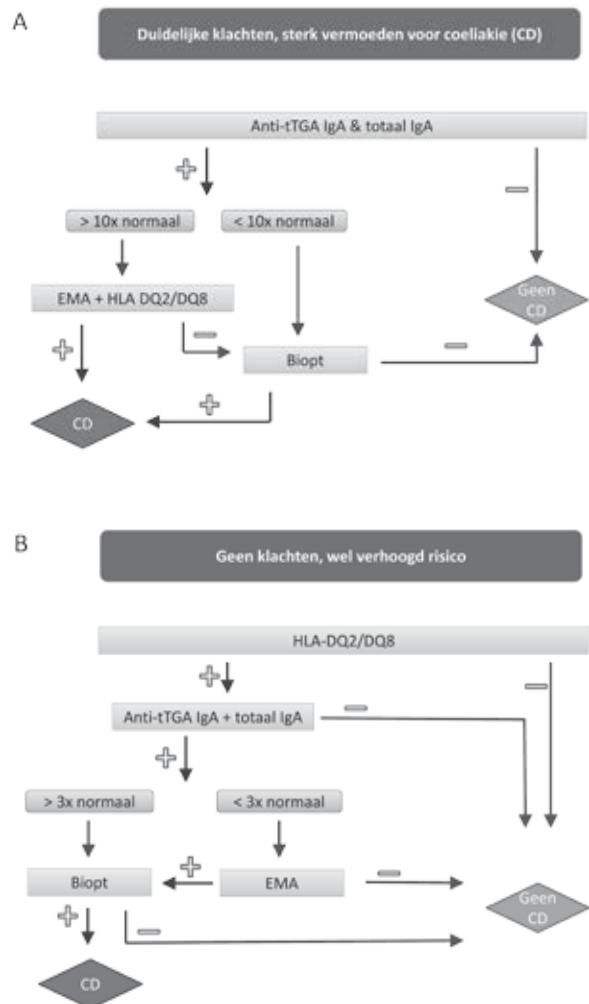
K. van der WEIDE en J. van der WEIDE

Coeliakie heeft een prevalentie van 0,5-1% en heeft een sterke genetische component die met name is gerelateerd aan humaan leukocyt antigen (HLA) klasse II genen. In eerdere studies zijn 2 specifieke HLA moleculen, HLA-DQ2.5 en HLA-DQ8 in verband gebracht met het optreden van coeliakie (1-5). Wanneer deze moleculen aanwezig zijn op antigeen presenterende cellen, binden ze gedeamioneerde gliadine peptiden die gevormd zijn uit gluten. Deze peptiden worden gepresenteerd aan T helper cellen, wat een immuunreactie veroorzaakt die verantwoordelijk is voor de darmschade in coeliakiepatiënten. Hoewel 20-40% van de gezonde populatie HLA-DQ2 of HLA-DQ8 heeft, heeft meer dan 95% van de coeliakiepatiënten deze antigenen. Door te testen op aanwezigheid van DQ2 en DQ8 is het dus mogelijk om coeliakie (vrijwel) uit te sluiten.

Coeliakie wordt veelal vastgesteld aan de hand van bipten van de dunne darm. Dit is echter een dure en belastende ingreep. Daarnaast kunnen laesies worden gemist doordat ze zich verspreid door de dunne darm bevinden, is de interpretatie van de histologie afhankelijk van de bewerking van het weefsel en de interobserver-variabiliteit, en kan de uitslag misleidend zijn vanwege negatieve uitslagen wanneer de patiënt al op eigen initiatief gluteninname beperkt. Ook het bepalen van antistoffen tegen endomysium (EMA), tissue transglutaminase (tTGA), en gedeamioneerde gliadinepeptiden (DGPA) kan onterecht negatieve uitslagen opleveren als de patiënt zijn of haar gluteninname al enkele weken heeft beperkt.

In 2012 zijn de nieuwe ESPGHAN-richtlijnen voor coeliakie bij kinderen gepubliceerd (6). In deze richtlijnen speelt de HLA-DQ2/8 typering een belangrijke rol: bij kinderen met symptomen met een sterk verhoogd TG2A (>10x bovengrens van normaal) kan verdere steun voor de diagnose verkregen worden met een EMA en HLA-DQ2/8 typering; bij een positieve uitslag van beide is geen biopt noodzakelijk (Figuur 1A). Bij kinderen zonder klachten maar met coeliakie geassocieerde aandoeningen, zoals diabetes type I (of autoimmuunziekten in algemene zin) en het syndroom van Down, kan de HLA-DQ2/8 typering gebruikt worden om coeliakie uit te sluiten (Figuur 1B). Pas na het verschijnen van de richtlijnen is bekend

geworden dat naast HLA-DQ2.5 en HLA-DQ8 ook HLA-DQ2.2 geassocieerd is met coeliakie: in een studie in 155 kinderen met coeliakie bleken de 9 patiëntjes die niet drager waren van DQ2.5 of DQ8 allen positief te zijn voor DQ2.2 (7). De auteurs concludeerden dan ook dat HLA-DQ2.2 geïncludeerd moet worden als een coeliakie-gerelateerd HLA-type. Hoewel HLA-DQ2.2 dus niet in de ESPGHAN-richtlijnen vermeld staat als geassocieerd met coeliakie, menen wij dat het belangrijk is om ook dit haplotype vast te stellen in de typering van HLA-DQ. Dit wordt nu echter door slechts enkele laboratoria gedaan.



**Figuur 1.** Schematische weergaven van de ESPGHAN-richtlijnen voor patiënten voor wie sterke verdenking is op coeliakie (A) en voor patiënten met een verhoogd risico op coeliakie (B).

Tot recent werd de HLA-DQ-analyse door ons uitbesteed, maar omdat als gevolg van de nieuwe richtlijnen het aantal HLA-DQ2/8 aanvragen sterk is toegenomen, is besloten de analyse zelf uit te voeren met de EUROArray (Euroimmun AG).

### Methodie

We hebben uitslagen verkregen met de EUROArray vergeleken met bekende uitslagen gegenereerd door middel van een PCR-sequence specific priming (PCR-SSP), PCR-sequence specific oligo hybridization (PCR-SSO) en/of PCR-sequence based typing (PCR-SBT) (Sanquin). De EUROArray methode stelt de aanwezigheid van de haplotypen DQ2.2 en DQ2.5 en het antigeen DQ8 vast door middel van een microarray. Van 21 patiënten werden twee buizen EDTA-bloed afgenomen, waarvan er één werd opgestuurd voor bepaling. Uit de andere buis werd genomisch DNA geïsoleerd uit 200 µl EDTA-bloed met behulp van de QIAamp DNA Blood MiniKit (Qiagen, Venlo) en opgenomen in een volume van 200 µl, 20-60 ng/µl. Aanwezigheid van haplotypen DQ2.2 en DQ2.5 en antigeen DQ8 werd vastgesteld met de EUROArray (EUROIMMUN AG, Lübeck, Duitsland). De analyse werd uitgevoerd overeenkomstig de instructies van de leverancier. Hierbij werden, in twee parallelle reacties, stukken van de HLA-DQA1 en HLA-DQB1 genen geamplificeerd door middel van een multiplex polymerase ketting reactie (PCR), waarbij de producten fluorescent werden gelabeld. Bij beide reacties werd als positieve controle een fragment van het N-acetyltransferase 2 (NAT2) gen geamplificeerd. Vervolgens werden de PCR producten gehybridiseerd op een microarray met daarop probespots specifiek voor verschillende HLA-DQ varianten (HLA-DQA1: \*02, \*02/\*0302, \*03, \*0302/03 en \*05; HLA-DQB1: \*02, \*02/\*0302), waarna detectie plaatsvond met een scanner. Bijgeleverde software bepaalde aan de hand van de positieve spots het aanwezige antigeen/haplo-type. De verkregen uitslagen zijn vergeleken met de uitslagen gegenereerd door Sanquin door middel van PCR-SSP, -SSO en/of -SBT.

### Resultaat

Bij elke serie waren alle controles (negatieve controle, PCR controle, kruisbesmettingscontrole en hybridisatiecontrole) goed bevonden. Van alle 21 patiënten kwamen de uitslagen overeen met reeds gerapporteerde uitslagen: zes patiënten waren negatief voor DQ2 en DQ8, vijf patiënten hadden DQ2.5, één had DQ2.2, vijf patiënten waren positief voor DQ8, drie waren positief voor zowel DQ2.5 als DQ2.2 en één patiënt had DQ2.2 en DQ8. Gebaseerd op de 21 geteste

patiënten kunnen we stellen dat de assay dus ook in onze handen voldoet aan de claim van de leverancier en dat de assay wat betreft specificiteit en selectiviteit niet onderdoet aan de PCR-SSP, -SSO en/of -SBT methoden van Sanquin.

Hands-on time voor de assay is -exclusief DNA isolatie- maximaal 45 minuten. Resultaten zijn binnen 3 uur gegenereerd. Uitslagen kunnen worden geëxporteerd als tekst-bestand en zo naar het middleware systeem of het LIS worden verzonden.

### Conclusie

De PCR-SSP, -SSO en/of -SBT methoden (Sanquin) en de EUROArray methode zijn verschillende manieren om tot hetzelfde antwoord te komen, namelijk aanwezigheid van A1\*05xx en B1\*02xx om DQ2.5 positiviteit vast te stellen, aanwezigheid van A1\*02xx en B1\*02xx om DQ 2.2 vast te stellen en A1\*03(01) en B1\*0302 om DQ8 vast te stellen, waarbij de EUROArray methode wel onderscheid maakt tussen A1\*0301 en A1\*0302/0303 (volgens de ESPGHAN-richtlijn). De EUROArray HLA-DQ2/8 is een makkelijke en snelle methode waarmee voor een concurrerende prijs getest kan worden op aanwezigheid van DQ2.2, DQ2.5 en DQ8, en geeft resultaten die identiek zijn aan uitslagen verkregen met PCR-SSP, -SSO en/of -SBT (Sanquin).

### Literatuur

1. Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med.* 1989;169:345-50.
2. Djilali-Saiah I, Caillat-Zucman S, Schmitz J, Chaves-Vieira ML, Bach JF. Polymorphism of antigen processing (TAP, LMP) and HLA class II genes in celiac disease. *Hum Immunol.* 1994;40:8-16.
3. Spurkland A, Sollid LM, Polanco I, Vartdal F, Thorsby E. HLA-DR and -DQ genotypes of celiac disease patients serologically typed to be non-DR3 or non-DR5/7. *Hum Immunol.* 1992;35:188-92.
4. Balas A, Vicario JL, Zambrano A, Acuna D, Garcia-Novo D. Absolute linkage of celiac disease and dermatitis herpetiformis to HLA-DQ. *Tissue Antigens.* 1997;50:52-6.
5. Ploski R, Ascher H, Sollid LM. HLA genotypes and the increased incidence of coeliac disease in Sweden. *Scand J Gastroenterol.* 1996;31:1092-7.
6. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54:136-60.
7. Mubarak A, Spierings E, Wolters V, van H, I, Kneepkens CM, Houwen R. Human leukocyte antigen DQ2.2 and celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013;56:428-30.