

CELIACHIA E TEST HLA RACCOMANDAZIONI

a cura di

Maria Cristina Mazzilli¹
Antonio Calabrò²
Carlo Catassi²
Luigi Greco²
Riccardo Troncone²
Umberto Volta²
Valerio Misefari³
Antonio Amoroso⁴
Ettore Cardì²

¹ Dipartimento di Medicina
Molecolare, Sapienza
Università di Roma

² Associazione Italiana Celiachia
(AIC) - Comitato Scientifico

³ Associazione Italiana
Immunogenetica e Biologia dei
Trapianti (AIBT)

⁴ Società Italiana di Genetica Umana
(SIGU)



Associazione
Italiana
Celiachia

IL TEST HLA PER LA CELIACHIA

LE MALATTIE GENETICHE SI DISTINGUONO TRA MONOGENICHE E MULTIFATTORIALI

Tra le malattie genetiche si distinguono quelle dovute alla mutazione di un singolo gene (monogeniche) e quelle la cui comparsa dipende dalla presenza di più geni e di fattori ambientali (malattie multifattoriali o complesse).

Le prime sono malattie rare (es. rene policistico, fibrosi cistica, talassemie...) che si trasmettono di generazione in generazione secondo semplici regole mendeliane, con alti rischi di ricorrenza nei familiari degli affetti; le seconde sono per lo più malattie comuni (ipertensione, diabete, tumori...) che pur non presentando chiare modalità di trasmissione mostrano una certa concentrazione familiare e rischi per i consanguinei dei malati più elevati di quelli della popolazione generale.

Nelle **monogeniche** la malattia è dovuta alla presenza di un gene mutato, in singola o doppia dose a seconda che si tratti di dominante o recessiva. In questi casi, test genetici molecolari che accertino la presenza di una mutazione associata alla malattia consentono di formulare o confermare la diagnosi (test diagnostici), di identificare soggetti che svilupperanno la malattia in futuro (test presintomatici) o di individuare portatori sani della mutazione.

LA CELIACHIA È MULTIFATTORIALE

Nelle malattie **multifattoriali** invece, nelle quali nessuna mutazione genica è di per sé causa di malattia, i test genetici non portano a

diagnosi certa ma consentono l'individuazione di caratteristiche genetiche che comportano un aumento di rischio a sviluppare una determinata patologia (test di suscettibilità).

La celiachia è una malattia multifattoriale nella quale variazioni (o alleli) in alcuni geni HLA costituiscono i principali fattori genetici di rischio, spiegando da soli almeno il 40% dell'aumento della prevalenza nei fratelli (10% circa rispetto all'1% della popolazione generale).

Anche nei genitori e nei figli dei pazienti c'è un aumento della prevalenza rispetto alla popolazione generale pur se in misura minore, come risulta dai pochi studi nei quali è stato quantificato separatamente da quello dei fratelli.

La tipizzazione HLA nella celiachia è un test di suscettibilità che valuta la maggiore o minore predisposizione di un individuo a sviluppare la malattia in base alla presenza/assenza di fattori di rischio (DQ2, DQ8 o *DQB1*02*).

La presenza di una delle combinazioni HLA di predisposizione determina un aumento del rischio di celiachia, mentre l'assenza delle stesse rende del tutto improbabile lo sviluppo della malattia. Si tratta di un test genetico che pur non avendo un significato diagnostico assoluto può contribuire a risolvere casi dubbi; viene soprattutto utilizzato per il suo significato predittivo negativo in quanto soggetti negativi per DQ2, DQ8 e *DQB1*02* ammalano molto raramente.

L'assenza dei marcatori HLA permette ad esempio di tranquillizzare i familiari degli affetti riconducendo il loro rischio di malattia a valori uguali o addirittura inferiori a quelli della popolazione generale.

Infatti, nella nostra casistica pediatrica è celiaco circa 1 su 4 dei fratelli DQ2/DQ8 positivi ma nessuno tra quelli DQ2/DQ8 negativi. In questo caso la tipizzazione HLA ha soprattutto il significato di evitare successivi inutili controlli in soggetti non geneticamente predisposti alla malattia, con il doppio risultato di tranquillizzare coloro che risultino negativi e di alleggerire impegno e costi del follow-up.

La legge 123/2005 richiede interventi operativi più idonei a “facilitare l’individuazione di celiaci sintomatici o appartenenti a categorie a rischio, a prevenire le complicanze e monitorare le patologie associate, nonché a definire i test diagnostici e di controllo per i pazienti affetti da malattia celiaca”.

Le linee guida ministeriali del 2008 per la diagnosi e il monitoraggio della celiachia prevedono la tipizzazione HLA come saggio di II livello in caso di anticorpi e/o biopsia dubbi o discrepanti e in categorie a rischio, per esempio familiari di I° grado ivi inclusi i fratelli.

La tipizzazione HLA ha quindi, nell’iter diagnostico della celiachia, un ben definito

ruolo. Il corretto impiego di questa analisi sembra essere di grande rilievo anche per le implicazioni economiche che la diagnosi di celiachia comporta e per il fatto che i familiari geneticamente suscettibili devono essere periodicamente controllati.

Con il documento qui allegato, abbiamo voluto sottolineare le indicazioni al test, definirne le modalità di esecuzione e possibilmente facilitare l’interpretazione dei risultati.

A causa della complessità del sistema HLA e della varietà delle metodiche e dei kit disponibili per la sua tipizzazione, i referti hanno oggi forma molto variabile e a volte di difficile interpretazione.

Si è sentita quindi l’esigenza di tentare di standardizzare il test, proponendo un fac-simile di referto che, se adottato da tutti i laboratori, potrebbe rendere più facile l’interpretazione dei risultati.

Terminologia

Gene: regione di DNA che codifica una specifica catena polipeptidica o che produce RNA non codificante per proteine

Locus (pl loci): la posizione occupata dal gene sul cromosoma. Può essere utilizzato come sinonimo di gene

Mutazione: cambiamento della sequenza del DNA

Alleli: forme alternative di un gene nello stesso locus. In un individuo diploide, possono essere presenti al massimo due alleli diversi, uno ereditato dal padre e uno dalla madre

Dominante: carattere che si esprime anche nell’eterozigote. In caso di malattia, è sufficiente una sola copia del gene difettoso per esprimere il fenotipo affetto

Recessivo: carattere che si esprime soltanto nell’omozigote. In caso di malattia, entrambe le copie del gene difettoso devono essere presenti per esprimere un fenotipo affetto

Omozigote: alleli identici nello stesso locus su cromosomi omologhi (es. AA)

Eterozigote: alleli diversi nello stesso locus su cromosomi omologhi (es.Aa)

Genotipo: costituzione genetica di un individuo

Fenotipo: insieme delle caratteristiche visibili di un individuo

Eterodimero: molecola formata da due subunità diverse (es catena alfa e catena beta)

Punti essenziali

- La celiachia è conseguenza di una alterata risposta al glutine in soggetti con determinate varianti geniche. Tra queste, le più importanti sono rappresentate da particolari alleli HLA.
- L’analisi dei geni HLA non ha valore diagnostico assoluto ma è un test di suscettibilità che valuta la probabilità di ammalare relativamente a quella della popolazione generale. La malattia colpisce 1 su 40 circa degli individui positivi al test ma quasi nessuno dei negativi.
- La tipizzazione HLA è indicata in casi di diagnosi dubbia e in categorie a rischio, cioè familiari di celiaci (per escludere soggetti che risultino negativi da successivi ripetuti controlli) e pazienti affetti da malattie associate alla celiachia.
- I geni HLA sono marcatori immutabili lungo tutta la vita; la loro tipizzazione può discriminare soggetti geneticamente suscettibili o non-suscettibili alla malattia molto prima della eventuale comparsa di segni sierologici o clinici.

RACCOMANDAZIONI PER L'ESECUZIONE DEL TEST HLA PER LA CELIACHIA INDICAZIONI, MODALITÀ E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Testo a cura degli autori di questa nota e approvato da:
 Associazione Italiana Celiachia (AIC)
 Associazione Italiana Immunogenetica e Biologia dei Trapianti (AIBT)
 Società Italiana di Genetica Umana (SIGU)

Test genetico di suscettibilità

La tipizzazione HLA nella celiachia è un test genetico di suscettibilità che valuta la maggiore o minore predisposizione di un individuo a sviluppare la malattia; ha un valore diagnostico limitato, in quanto le molecole HLA a rischio non sono da sole sufficienti a determinare la malattia che compare soltanto in seguito all'esposizione a fattori ambientali scatenanti e in presenza di altri fattori genetici.

L'analisi dei geni HLA di suscettibilità ha soprattutto valore predittivo negativo, in quanto l'assenza di alleli a rischio rende altamente improbabile lo sviluppo della malattia.

Quando e a chi fare l'indagine

L'indagine HLA è indicata come test di II livello in caso di incertezza diagnostica (p.e. anticorpi e/o biopsia dubbi o discrepanti) o in soggetti appartenenti a categorie a rischio, cioè familiari di celiaci (genitori, figli e fratelli) e pazienti affetti da malattie associate alla celiachia (diabete mellito tipo 1, deficienza selettiva di IgA, tiroidite autoimmune, epatite autoimmune, Sindrome di Down, Sindrome di Turner, Sindrome di Williams).

Lo scopo è decidere se continuare il follow-up in caso di sierologia negativa¹.

In quali laboratori eseguire l'indagine

Si raccomanda di eseguire il test presso laboratori accreditati dalla Federazione Europea di Immunogenetica (EFI), o presso laboratori di Genetica Medica che rispondano ai requisiti di accreditamento SIGU, o comunque presso laboratori con documentata esperienza nel campo della biologia molecolare.

Associazione HLA-DQ

La presenza di DQ2 (eterodimero completo o solo allele *DQB1*02*) e/o di DQ8 determina un aumento del rischio di celiachia, a seconda delle diverse combinazioni, fino a circa 14 volte quello della popolazione generale, mentre l'assenza degli stessi fattori rende del tutto improbabile lo sviluppo della malattia.

DQ2 e DQ8 sono glicoproteine presenti sulla superficie di alcune cellule del sistema immunitario, formate da due catene diverse, alfa e beta, e perciò dette eterodimeri. Le catene alfa e beta sono codificate dai geni *DQA1* e *DQB1* rispettivamente.

Gli alleli *DQA1*05* e *DQB1*02* codificano per l'eterodimero DQ2 a rischio maggiore di celiachia e gli alleli *DQA1*03* e *DQB1*03:02* per l'eterodimero DQ8 a rischio minore di celiachia.

Dei celiaci, più dell'80% è DQ2 (*DQA1*05* e *DQB1*02*), 10% è DQ8, 5% è *DQB1*02* positivo ma *DQA1*05* negativo portando soltanto la metà beta della molecola DQ2 a rischio. Rari casi non hanno alcuna delle precedenti combinazioni, dando un importante significato predittivo negativo al test.

¹ Recentemente l'European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN, 2012) ha proposto nell'età pediatrica un'altra indicazione: nei casi con segni e sintomi suggestivi di malattia celiaca e con presenza di anticorpi anti-TG2 (o anti-DGP, in particolare nei primi due anni di vita) superiori a 10 volte il limite normale. La positività del test HLA (accompagnata alla positività degli EMA) servirebbe per conferma diagnostica allo scopo di evitare la biopsia intestinale. Inoltre, nei bambini asintomatici ad alto rischio di celiachia il test HLA viene consigliato come indagine di I livello.

Per la determinazione del DQ2 è quindi necessario analizzare sia *DQA1*05* che *DQB1*02* perché la presenza di entrambi gli alleli porta a un rischio molto più alto della presenza del solo allele *DQB1*02*.

La determinazione del DQ8 prevede la ricerca degli alleli *DQA1*03* e *DQB1*03:02*. È da notare che se è vero che praticamente tutti i *DQB1*03:02* sono anche *DQA1*03*, non vale il reciproco.

Lo stato *DQB1*02/*02* omozigote determina il rischio più elevato di celiachia ed è stato riportato in associazione a forme più gravi con complicanze come refrattarietà alla dieta e sviluppo di linfomi. Tale condizione è presente nel 25-30% dei celiaci e nel 10% dei controlli DQ2 positivi.

HLA-DR

Dei celiaci dell'Italia continentale positivi per DQ2, approssimativamente: 65% è DR3 (*DRB1*03*), 30% è eterozigote DR5/7 (*DRB1*11-12/*07*) e soltanto il 5% ha altri alleli *DRB1*. La maggior parte dei DQ8 è DR4 (*DRB1*04*). Coloro che hanno soltanto la catena beta del dimero DQ2 sono quasi sempre DR7 (*DRB1*07*).

Gli alleli *DRB1* non modificano i rischi di malattia che dipendono esclusivamente dai loci *DQA1* e *DQB1*, ma la loro determinazione può essere di aiuto come convalida dei risultati, a causa dello stretto disequilibrio di associazione tra DR e DQ.

Quali alleli HLA esaminare

La tipizzazione - eseguita con tecniche di biologia molecolare - deve includere:

- **gli alleli *DQA1*03*, *DQA1*05*, *DQB1*02* e *DQB1*03:02*.**

Per i primi tre è sufficiente considerare il primo campo (vale a dire il primo gruppo di cifre dopo l'asterisco) in quanto tutti gli alleli del gruppo sono ugualmente a rischio (es. *DQA1*05:01* e **05:05* o *DQB1*02:01* e **02:02*), mentre per *DQB1*03:02* sono importanti i primi 2 campi (vale a dire i primi 2

gruppi di cifre, separati dal segno “:”) perché ad es. le varianti *DQB1*03:01* e **03:03* non sono a rischio.

- **controlli negativi e positivi.**

La tipizzazione, per maggiore completezza, può anche prendere in esame:

- **gli alleli *DRB1*03*, **04*, **07*, **11*, **12*.**

È raccomandata la determinazione dello stato *DQB1*02* omozigote.

Referto

La risposta oltre a riportare i dati anagrafici del paziente, il tipo di prelievo effettuato e la data relativa, deve specificare gli alleli testati e la metodica utilizzata.

Il referto deve riportare i dati identificativi del laboratorio, il nome e la firma dell'operatore che ha eseguito l'indagine e il nome e la firma del responsabile della struttura.

La risposta dovrebbe essere standardizzata, seguendo il modello accluso.

Interpretazione dei risultati

La complessità del sistema HLA, la varietà dei risultati possibili e l'esistenza di un gradiente di rischio (stato *DQB1*02* omozigote > eterodimero DQ2 > DQ8 > presenza della sola catena beta DQ2) rendono a volte difficile l'interpretazione dei risultati e la comunicazione degli stessi agli interessati.

Il risultato deve essere valutato assieme al rischio a priori di malattia (diverso in maschi e femmine, casi singoli o familiari etc.).

Si raccomanda quindi una stretta interazione tra il medico che richiede il test e un genetista medico o il Centro di riferimento per la diagnosi di Celiachia.

Se il test, come raccomandato, viene eseguito da un laboratorio certificato, è indicato contattare il laboratorio che ha eseguito il test.

Contabilizzazione dell'indagine

La prestazione di tipizzazione HLA per la valutazione della suscettibilità alla celiachia dovrebbe essere tariffata – a seconda della prestazione eseguita - con le seguenti voci:

- **90.80.1** TIPIZZAZIONE GENOMICA HLA-*DQA1* A BASSA RISOLUZIONE
- **90.80.3** TIPIZZAZIONE GENOMICA HLA-*DQB1* A BASSA RISOLUZIONE
- **90.80.4** TIPIZZAZIONE GENOMICA HLA-*DQB1* AD ALTA RISOLUZIONE (qualora presente *DQB1*03*)
- **90.81.1** TIPIZZAZIONE GENOMICA HLA-*DRB* (*DRB1* e *DRB3*, *DRB4*, *DRB5*) A BASSA RISOLUZIONE – se viene eseguita anche la tipizzazione HLA-*DRB1*
- **91.36.5** ESTRAZIONE DI DNA O DI RNA (nucleare o mitocondriale) - Da sangue periferico, tessuti, colture cellulari, villi coriali.

DATI IDENTIFICATIVI DEL LABORATORIO

Cognome e Nome.....

Data di nascita...../...../.....

No. di accettazione.....

Reparto di provenienza..... dott.....

Tipo di campione (sangue periferico, saliva...).....

Data del prelievo/...../.....

Data accettazione del campione, se diversa dalla data del prelievo...../...../.....

Indicazione

Indagine eseguita (tipizzazione molecolare HLA).....

Metodica utilizzata

Alleli testati.....

RISULTATI

Alleli HLA: *DQA1**,.....*DQB1**,..... *DRB1**

- Presenza dell'eterodimero DQ2 (*DQA1*05, DQB1*02*)
 Stato *DQB1*02* omozigote: presente, assente, non determinato
- Presenza della sola catena beta del dimero DQ2 (*DQB1*02*)
- Presenza dell'eterodimero DQ8 (*DQA1*03, DQB1*03:02*)

La presenza di almeno una di tali condizioni è indicativa di suscettibilità alla celiachia e non implica lo sviluppo della malattia, la cui diagnosi deve essere verificata con test sierologici e biopsia intestinale

- Assenza di HLA a rischio di celiachia
Tale condizione rende altamente improbabile la comparsa della celiachia

Per ogni ulteriore chiarimento in merito alla interpretazione dei risultati contattare il laboratorio che ha effettuato il test o il Centro di Riferimento regionale per la diagnosi di Celiachia.

Data refertazione

...../...../.....

Operatore
che ha eseguito l'indagine

Direttore della
Struttura



X-EDUP

Via Caffaro, 10/7 - 16124 Genova (GE)
Tel. 010 2510016 - Fax 010 2721615
segreteria@celiachia.it - www.celiachia.it

