

CELIACHIA **E TEST GENETICO HLA**

RACCOMANDAZIONI

PER IL CLINICO SUL TEST GENETICO HLA

PER LA MALATTIA CELIACA

CELIACHIA E TEST HLA

A cura di
Dottor Mauro Congia*

*Clinica Pediatrica e Malattie Rare
Università degli Studi di Cagliari

UOS di Gastroenterologia Pediatrica
Ospedale Pediatrico Microcitemico
Antonio Cao

Azienda Ospedaliera Brotzu Cagliari

Vietata la riproduzione, anche parziale e con qualsiasi mezzo, se non espressamente autorizzata da AIC. Qualunque traduzione in altra lingua diversa dall'italiano deve essere autorizzata da AIC e in ogni caso AIC è manlevata da qualunque responsabilità sulla fedeltà e l'appropriatezza della traduzione.

Copyright © 2022, Associazione Italiana Celiachia Onlus.

Tutti i diritti riservati. All rights reserved.

Ogni diritto sul presente lavoro è riservato ai sensi della normativa vigente.

Tutte le informazioni contenute nel presente lavoro non hanno valenza di parere o consulto medico. La lettura di contenuti di carattere scientifico sulla patologia e sul suo trattamento non può sostituire alcuna specifica valutazione medica o, tanto meno, parere e diagnosi che possono conseguire esclusivamente all'esito di visita alla presenza personale del paziente e, ove occorra, all'esito di colloquio ed esame della documentazione da parte di personale medico a ciò abilitato come per legge.

RACCOMANDAZIONI PER IL CLINICO SUL TEST GENETICO HLA PER LA MALATTIA CELIACA

Introduzione

La malattia celiaca (MC) è una patologia autoimmune sistemica caratterizzata da un profilo anticorpale sierologico specifico e da un danno istologico peculiare scatenata e mantenuta dall'ingestione di glutine e prolamine correlate in individui geneticamente predisposti (1).

In questa breve guida ci occuperemo di dare delle indicazioni pratiche al clinico nella richiesta e interpretazione del test genetico HLA di suscettibilità per MC che sempre più frequentemente e talvolta impropriamente, è richiesto per ricercare alcuni geni HLA dei loci DQA1 e DQB1 associati alla MC.

La MC ha una forte componente ereditaria. Infatti, dal 75 al 15% dei familiari in primo grado e dei gemelli dizigotici sono affetti da MC, mentre la concordanza di malattia va dal 50 all'80% nei gemelli monozigotici (2). La MC è poligenica e multifattoriale, dovuta cioè all'interazione di multipli geni con una serie di fattori ambientali e stili di vita che possono modificarsi assai rapidamente a seconda delle epoche storiche in cui queste interazioni accadono. In effetti, una serie di dati indicano che la prevalenza della MC è in incremento (3-5) e che questa non sembra essere influenzata né dall'età alla quale il glutine viene introdotto né dalla durata

dell'allattamento al seno materno (6, 7). È probabile che la causa di un tale incremento in prevalenza sia da attribuire non ad un singolo fattore ma a una combinatoria di elementi tra i quali l'aumento costante, a partire dalla metà del secolo scorso, nel consumo di alimenti contenenti glutine (8) e una modifica del microbiota intestinale per un uso diffuso di antibiotici e per uno stile di vita occidentale nell'alimentazione (9). Probabilmente nei prossimi anni le reali stime di prevalenza della MC saranno rese più complicate da stabilire per via del sempre più elevato numero di individui che per motivi salutistici intraprendono una dieta "gluten free" (GFD) senza prima aver escluso la MC (10). In questa categoria d'individui un aiuto per il clinico, come vedremo più avanti, può venire dal test genetico HLA di suscettibilità per MC.

L'ereditabilità della MC sarebbe dovuta per circa il 56% da geni al di fuori del sistema maggiore di istocompatibilità (MHC), e per ben il 44% da geni nell'MHC. Infatti, i numerosi studi di GWAS che hanno identificato 57 geni non-HLA di suscettibilità per la MC spiegherebbero solo il 6% circa della ereditabilità, mentre il 50% sarebbe costituito da molteplici varianti comuni, come osservato anche in altre malattie poligeniche (11). Recentemente, sono state identificate 5 varianti di suscettibilità nell'MHC che agiscono indipendentemente dai loci HLA -DQA1 e DQB1 e che spiegano il 18% di ereditabilità (12). Infine, il 26% di ereditabilità è costituito dalla fortissima associazione con alcuni alleli ai loci HLA -DQA1 e DQB1 che codificano per le molecole HLA-DQ2 e -DQ8 (13). Quindi a tutt'oggi la più forte associazione

genetica riscontrabile nella MC è con le molecole HLA-DQ2 e -DQ8.

Va subito detto che sommando le frequenze di HLA-DQ2 e -DQ8 nelle popolazioni di origine Caucasica si arriva ad una loro positività nel 30-40% o addirittura a circa il 50% nei Sardi (14, 15) e nei Saharawi (16), ma che la malattia si manifesta solo in una frazione di esse. Inoltre, la prevalenza di malattia non correla in modo statisticamente significativo con la frequenza di tali molecole HLA nelle differenti popolazioni (17).

Complessivamente, anche queste evidenze confermano la natura poligenica e la necessità di vari fattori ambientali per lo sviluppo della MC.

Cenni di Genetica dell'HLA

Per consentire a tutti la più ampia comprensione dell'HLA e della terminologia utilizzata in questa guida vedasi la **Tab. 1**.

Il complesso dell'HLA è localizzato sul braccio corto del cromosoma 6 (occupa circa 3 Mbp in 6p21.3). La regione contiene più 220 geni; la maggior parte a funzione immunologica. I loci che lo compongono in direzione telocentrica sono A, B, C (appartenenti alla classe I) e DR, DQ, DP (appartenenti alla classe II). La classe III, comprendente alcuni geni che codificano per frazioni del complemento, si trova tra la classe I e la classe II. Il sistema ha un elevato grado di polimorfismo e per questa ragione sono presenti numerosissime varianti allo stesso locus (alleli), per es. a settembre del 2019 si riportano 7053 alleli al locus B di classe I e 1771 al locus DQB1 di classe II (18). L'MHC è caratterizzato dalla presenza

di un forte linkage disequilibrium (LD). Due o più loci sono in LD quando la frequenza di associazione dei loro differenti alleli è più alta o più bassa di quella che ci si aspetterebbe se i loci fossero indipendenti e associati quindi in modo casuale. La presenza del LD e di geni a funzione immunologica interdipendente suggerisce un possibile vantaggio selettivo di particolari configurazioni di alleli disposti talvolta in aplotipi estesi dal locus A della classe I al locus DQB1 della classe II (19).

Numerosi studi, inclusi i nostri sulla popolazione Sarda e sul suo particolare assetto genetico, hanno dimostrato che i geni HLA coinvolti nella MC sono localizzati ai loci DQA1 e DQB1 della classe II (20, 21, 22). Tra i tanti alleli codificati da questi loci, quelli più frequentemente associati alla MC sono il DQA1*05:01, e il DQB1*02:01. Questi due alleli sono in forte LD e codificano la catena alfa e la catena beta dell'eterodimero DQ (α 1*0501, β 1*0201) denominato HLA -DQ2. Questo eterodimero può essere codificato in *cis* quando i due geni DQA1*05:01, e DQB1*02:01 si trovano lungo lo stesso cromosoma (quasi sempre in LD con l'allele DRB1*03:01 del locus DRB1 a costituire l'aplotipo DRB1*03:01, DQA1*05:01, DQB1*02:01) oppure in *trans* nel genotipo HLA -DQA1*05:05, -DQB1*03:01/-DQA1*02:01, -DQB1*02:02 (20). Anche i geni DQA1*02:01, -DQB1*02:02 codificano per una molecola che è stata denominata HLA -DQ2 anche se costituita da una differente catena alfa (il polimorfismo che differenzia le catene β 1*0201 e β 1*0202 è trascurabile dal punto di vista funzionale). Per differenziare a livello proteico questi due HLA -DQ2, la molecola DQ2

codificata dagli alleli DQA1*05:01, DQB1*02:01 è stata denominata HLA-DQ2.5 mentre il DQ2 codificato dagli alleli DQA1*02:01, -DQB1*02:02 è stato denominato HLA-DQ2.2 (Fig. 1).

Circa il 90-95% dei pazienti celiaci è positivo per alleli che codificano per l'HLA-DQ2 e più

specificatamente per HLA-DQ2.5 in *cis* o in *trans* (Fig. 1).

L'altra molecola HLA associata alla MC per circa il 5-7% è l'HLA -DQ8 codificato dall'aplotipo HLA-DQA1*03:01-DQB1*03:02, mentre il rimanente 3-5% è costituito dall'HLA -DQ2.2 (23) o assai

raramente da metà eterodimero come ad esempio nella molecola HLA-DQ2.3 (24) o nell'HLA-DQ75 (25).

Eterodimeri HLA -DQ permissivi per la malattia celiaca

I genotipi permissivi per la MC sono elencati nella Tab. 2. Sono stati disposti per OR decrescente utilizzando la casistica di pazienti celiaci del nostro centro (dati personali non pubblicati) che non si discosta da quanto osservato da altri autori (26) e metanalisi (27). Una breve discussione per alcuni di questi eterodimeri ad elevata frequenza e OR più elevato ci consentirà di comprendere meglio l'associazione HLA e come interpretare i risultati forniti dal laboratorio di tipizzazione.

HLA-DQ2.5

L'eterodimero HLA -DQ2.5, una variante dell'HLA -DQ2, può essere definito come il più permissivo per la MC essendo presente in più del 90% dei pazienti celiaci (20).

Può essere codificato in *cis* nell'aplotipo HLA -DRB1*03:01, DQA1*05:01, DQB1*02:01 oppure in *trans* nel genotipo HLA -DQA1*05:05, DQB1*03:01/DQA1*02:01, DQB1*02:02, conferendo un rischio di malattia molto simile (Fig. 1). Le catene beta DQB1*02:01 e DQB1*02:02 differiscono per un residuo amminoacidico in posizione 135, distante dalla regione di legame con il peptide e quindi funzionalmente ininfluente. Invece, lo status di omozigosità per HLA -DQ2.5 conferisce un rischio molto elevato sia per la comparsa di autoimmunità celiaca con positivizzazione

per l'anti-transglutaminasi tipo 2 di classe IgA (t-TG2-IgA) che per la malattia celiaca (3, 28). Secondo alcuni autori, questa "doppia dose" di HLA -DQ2.5 consentirebbe la presentazione alle T cellule di un repertorio di peptidi del glutine più ampio rispetto ad altre molecole associate a MC (HLA -DQ2.2 e HLA -DQ8) e in maggiore quantità (29). Questo modello quantitativo di geni del danno intestinale nella MC, dove l'espressione dell'HLA -DQ2.5 e il numero disponibile di T cellule glutine specifiche rappresenterebbero i principali fattori limitanti, è stato indirettamente rafforzato da diversi studi condotti sui pazienti celiaci (30, 31, 32) e da una recente meta-analisi (33).

HLA-DQ8

L'HLA-DQ8 è codificato dagli alleli DQA1*03 e DQB1*03:02. Quando il DQA*03 si associa con il DQB1*03:01 la molecola viene denominata DQ7.3, mentre quando si associa con il DQB1*03:03 viene denominata DQ9. Solo l'HLA-DQ8 si associa alla MC conferendo un OR per MC moderato rispetto all'omozigosità per HLA -DQ2.5 (Fig. 1, Tab. 2). Quando presente in eterozigosi con l'HLA-DQ2.5 costituisce un fattore di rischio aggiuntivo per lo sviluppo del diabete mellito tipo 1 autoimmune (T1D). Nella nostra popolazione di pazienti celiaci il genotipo HLA -DQ2.5/DQ8 conferisce un OR di 18 (95% CI: 6.5 to 51.6) per il T1D ad insorgenza contemporanea o futura (dati personali non pubblicati). Una possibile spiegazione può essere ricondotta alla formazione di transdimeri HLA tra la catena alfa codificata dallo DQA1*05:01 e la catena beta codificata dallo DQB1*03:02 (34, 35, 36).

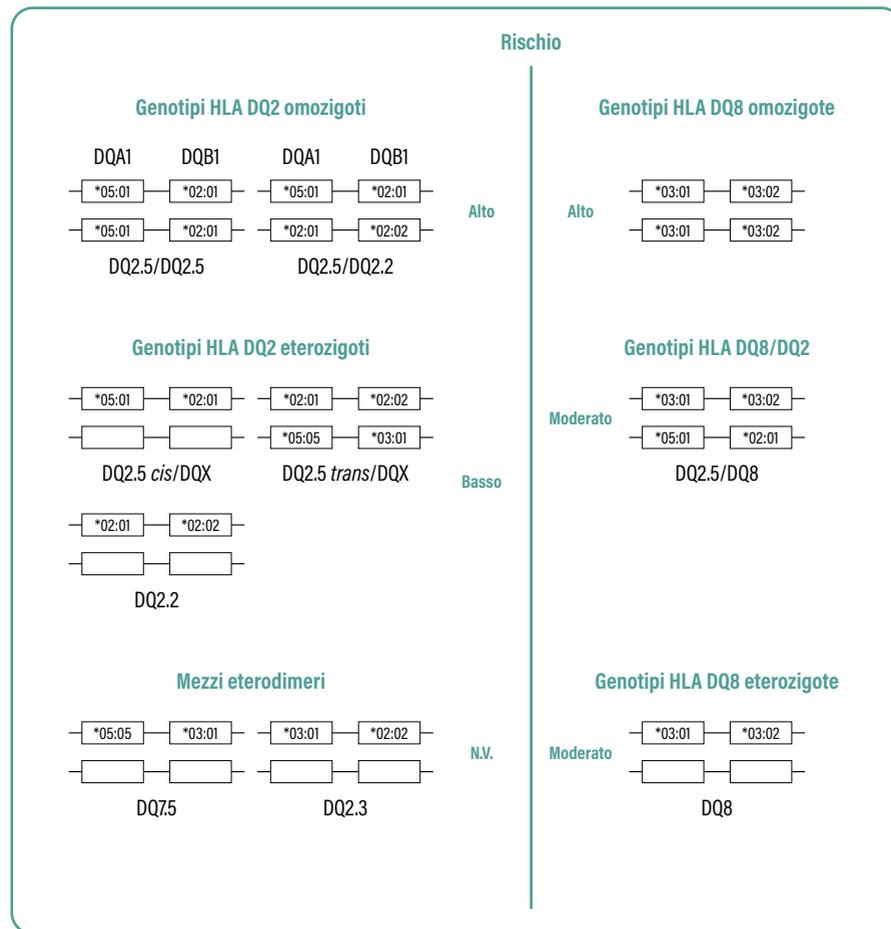


Fig. 1. Genotipi HLA associati a MC, eterodimeri DQ codificati da questi geni e suddivisione semplificata del loro rischio in alto, moderato e basso. Il rischio è non valutabile (N.V.) per i mezzi eterodimeri la cui associazione con la MC è assai dibattuta.

HLA-DQ2.2

L'eterodimero HLA-DQ2.2 differisce funzionalmente dal -DQ2.5 per la catena alfa codificata dall'allele HLA -DQA1*02:01. Le differenze tra le due catene alfa fanno sì che la molecola HLA -DQ2.2 è meno adatta della -DQ2.5 a presentare peptidi derivati dal glutine a cellule T CD4 positive (37, 38). Essa è comunque permissiva per la MC: ma mentre quando presente da sola conferisce un rischio molto basso per CD (1.5% dei nostri CD sono HLA-DQ2.2 positivi), quando in associazione con HLA-DQ2.5 presenta un OR di 5.2 sovrapponibile a quello osservato negli HLA-DQ2.5 omozigoti (**Fig. 1, Tab. 2**); un dato in accordo con quello di altre casistiche (26). Quando in associazione con l'HLA -DQA1*05:05, DQB1*03:01 a costituire la formazione dell'eterodimero HLA-DQ2.5 in *trans*, conferisce un rischio di MC basso comparabile a quello dell'HLA-DQ2.5 in *cis*. Quindi, in entrambi i casi l'HLA-DQ2.2, grazie al meccanismo genetico della codominanza, si comporta come un donatore di catene beta per la costituzione dell'eterodimero HLA -DQ2.5.

Infine, entrambe i genotipi HLA -DQA1*05:05, DQB1*03:01/DQA1*02:01, DQB1*02:02 e DQA1*05:01, DQB1*02:01/DQA1*02:01, DQB1*02:02 sono associati negativamente con il T1D (OR rispettivamente di 0.1 e 0.5, dati personali non pubblicati).

Altre molecole HLA non -DQ2, non -DQ8 nella malattia celiaca

Seppure molto raramente sono stati riportati nella malattia celiaca dei genotipi HLA non -DQ2, non -DQ8. In uno studio multicentrico

europeo tali pazienti sono stati rilevati nel 2% dei casi (24). In un altro studio americano la frequenza di individui EMA positivi ma negativi per HLA -DQ2 e -DQ8 era ancora più ridotta (0.16%) (26). Nella nostra casistica 10 pazienti su 673 risultano non -DQ2, non -DQ8 con una frequenza di 1.5%. Di questi, 2 erano affetti da S. di Down, uno da malattia infiammatoria cronica intestinale e un altro da deficit totale di IgA. Tutti e 10 questi pazienti avevano ricevuto diagnosi di MC alla fine degli anni 80 quando ancora le determinazioni della t-TG2-IgA e della t-TG2-IgG non erano disponibili e purtroppo non siamo stati in grado di riverificare tali diagnosi per escludere che il danno di mucosa fosse da attribuirsi ad altre patologie. Al contrario su 127 pazienti, che ricevettero diagnosi di MC dopo il 2000 quando la determinazione dell'antitransglutaminasi era disponibile, nessuno risultava negativo per HLA -DQ2, o HLA -DQ8. Crediamo pertanto che oggi la diagnosi di MC in pazienti con genotipi HLA non -DQ2, non -DQ8 o con mezzi eterodimeri come nelle molecole HLA-DQ2.3 (24) o DQ7.5 (25) sia da affidare a centri di riferimento e che debba basarsi sulla dimostrazione inequivocabile che il danno di mucosa sia glutine dipendente.

Utilità clinica del test genetico HLA per la malattia celiaca

Nelle pagine seguenti cercheremo di delineare le situazioni cliniche per le quali il test genetico HLA per celiachia può essere proposto al paziente o alla famiglia. Questa guida pratica dovrebbe ridurre l'utilizzo del test ai casi appropriati aiutando il medico a prendere decisioni utili per la diagnosi della malattia o il follow-up di individui a rischio. Vedi anche la **Tab. 3**.

Per effettuare le nuove diagnosi di malattia celiaca

Dalla pubblicazione delle linee guida ESPGHAN del 2012 per la diagnosi di malattia celiaca e sino ai giorni nostri il principale utilizzo della determinazione dei genotipi HLA è stato indirizzato alla formulazione delle nuove diagnosi di MC nel bambino e nell'adolescente senza esecuzione della biopsia intestinale (39). Infatti, in tali linee guida è contemplata l'opzione di non eseguire la biopsia intestinale nel caso il paziente presenti: *i)* sintomi suggestivi di MC, *ii)* un valore della t-TG2-IgA maggiore a 10 volte i valori normali e in un secondo prelievo una positività degli EMA che confermi la positività della t-TG2-IgA, *iii)* una genetica HLA compatibile per MC ovvero positiva per HLA -DQ2, o HLA -DQ8 (39).

Tali raccomandazioni sono state riviste recentemente nelle nuove linee guida ESPGHAN 2020 dove né la tipizzazione HLA per i loci DQA1 e DQB1, né la presenza di sintomi associabili a MC sono obbligatori per formulare la diagnosi di MC di fronte ad un paziente pediatrico con titolo elevato della t-TG2-IgA maggiore di 10 volte i valori normali confermato dalla positività degli EMA in un secondo prelievo (40). Le ragioni addotte nelle nuove linee guida per tale cambiamento sono legate al fatto che il test HLA non è disponibile in modo diffuso, è costoso e non migliorerebbe la capacità della sierologia all'approccio alla diagnosi senza biopsia (40). Anche in uno studio retrospettivo condotto sulla popolazione Sarda abbiamo rilevato che tutti i pazienti celiaci sintomatici e con valori della t-TG2-IgA maggiori di 10 volte i valori normali risultavano positivi per HLA -DQ2, o HLA -DQ8, confermando quindi le raccomandazioni

ESPGHAN 2020 (41) almeno per i pazienti sintomatici.

Con tutta probabilità quindi, attenendosi alle linee guida ESPGHAN 2020 (40), il test genetico HLA per la malattia celiaca non verrà più utilizzato, se non in casi selezionati, per formulare nel bambino e nell'adolescente le diagnosi di MC senza biopsia intestinale.

Per escludere la malattia celiaca nell'iter diagnostico

In **Tab. 3** sono elencate alcune situazioni per le quali è possibile proporre al paziente oppure ai genitori del paziente la tipizzazione HLA come esame utile nell'iter diagnostico della MC. La richiesta del test è stata suddivisa in situazioni dove può essere utile prima oppure dopo aver eseguito la biopsia intestinale. Occorre spiegare sempre e in modo rigoroso che il test ha valore solo quando risultante negativo per HLA -DQ2, o HLA -DQ8 mentre la sua positività è di scarsa utilità clinica. La negatività infatti ha un altissimo valore predittivo negativo ovviando la necessità per i pazienti negativi di intraprendere ulteriori test sierologici, endoscopici o eventuali reintroduzioni di glutine (42).

■ Familiari di primo grado di un probando celiaco

I familiari dei pazienti con diagnosi di malattia celiaca hanno un rischio più elevato di sviluppare MC nel corso del tempo. Un recente studio retrospettivo della Mayo Clinic ha rilevato una frequenza del 44.4% di MC nei familiari di primo grado di pazienti con MC (43). Tale frequenza decisamente più elevata di quanto riscontrato in

precedenti studi (44, 45) e la consapevolezza che la MC può insorgere in qualsiasi momento della vita di un individuo, spesso in modo silente (nello studio della Mayo Clinic il 28% era asintomatico) (43), sembrano indicare come scelta razionale di escludere da uno screening sierologico a lungo termine quei familiari di primo grado negativi per HLA -DQ2, o HLA -DQ8.

■ **Individui a GFD che non hanno eseguito la determinazione della t-TG2-IgA prima di intraprendere la dieta**

Questa categoria di individui è destinata probabilmente ad aumentare nei prossimi anni per una crescente popolarità della GFD perché ritenuta più salutistica e capace di alleviare fastidiosi sintomi gastroenterici cronici (46). Inoltre, i prodotti privi di glutine sono oggi molto più abbondanti, più facili da acquistare e meno costosi rispetto al passato (47). Infine un numero crescente di individui viene diagnosticato o fa autodiagnosi di ipersensibilità al glutine (o meglio al grano) non celiaca senza seguire un rigoroso percorso clinico (48, 49). A questi individui a GFD nei quali non è stata esclusa precedentemente la MC può essere offerta l'opportunità del test genetico HLA per la malattia celiaca che - se negativo per HLA -DQ2, o HLA -DQ8 - consente di escludere come causa dei sintomi gastroenterici la MC.

■ **Positività a basso titolo della TtG-IgA**

Non è infrequente nella pratica clinica, inclusi centri di riferimento, osservare pazienti adulti

e pediatrici con positività a basso titolo per la TtG-IgA che possono essere affetti da MC oppure essere dei falsi positivi. Sono infatti note una serie di condizioni cliniche che possono associarsi alla produzione non specifica di anticorpi anti- TtG-IgA come le malattie infiammatorie croniche intestinali (50), malattie autoimmuni (51), banali infezioni respiratorie (52) e gastroenteriche (53), malattie croniche del fegato (54), infezione da HIV (55), altre condizioni (56) e persino la produzione intestinale della t-TG2-IgA non sembra essere completamente specifica per la MC (57). A tutte queste situazioni particolari aggiungiamo anche i familiari del probando celiaco che spesso per empatia praticano la GFD a livello familiare riducendo quindi l'apporto globale di glutine giornaliero e alterando i valori della t-TG2-IgA.

In tutte queste condizioni sembra razionale proporre la tipizzazione HLA per individuare quei pazienti negativi per HLA -DQ2, o HLA -DQ8 prima di intraprendere esami invasivi come l'esofagostruodenoscopia (EGDS) in età pediatrica o in pazienti affetti da malattie croniche nei quali l'EGDS potrebbe essere controindicata.

■ **Deficit selettivo delle IgA**

Il deficit selettivo delle IgA (IgAD) rappresenta una condizione clinica predisponente per altre manifestazioni autoimmuni; tra le quali quella più frequentemente associata è proprio la MC (58). Anche l'IgAD ha una forte componente genetica che mappa nell'MHC (59) e sebbene tenda ad associarsi ad aplotipi HLA -DQ2 positivi (60, 61), un certo numero di

aplotipi risultano invece HLA -DQ2 negativi. In uno studio di pazienti Svedesi ed Iranian con deficit di IgA circa il 38% risultava infatti negativo per HLA -DQ2, o HLA -DQ8 (62). Nelle linee guida ESPGHAN 2020 nei pazienti con IgAD e positività della t-TG2-IgG la biopsia intestinale è considerata obbligatoria (40). Non è stato infatti possibile derivare dalla letteratura un valore sicuro di cut-off degli anticorpi t-TG2-IgG capace di predire la MC nella IgAD (40). In tali linee guida non viene fatta alcuna menzione sulla possibile utilità della tipizzazione HLA. Riteniamo invece utile proporre nei pazienti con IgAD e positività della t-TG2-IgG la tipizzazione HLA in modo da risparmiare la biopsia agli individui negativi per HLA -DQ2, o HLA -DQ8.

■ **Pazienti affetti da patologie cromosomiche a rischio per MC (S. di Down, S. di Turner, S. Williams)**

Le linee guida per la diagnosi della MC 2012 indicavano chiaramente in tali gruppi a rischio per MC la tipizzazione HLA come test iniziale di screening (39). Solo negli individui positivi per HLA -DQ2, o HLA -DQ8 si raccomandava lo screening sierologico periodico mediante la t-TG2-IgA. Nelle linee guida 2020 tali raccomandazioni hanno subito una modifica e anche per tali condizioni la diagnosi nei sintomatici o asintomatici senza eseguire la biopsia duodenale può essere formulata con la sola sierologia (40). Comunque in questi pazienti i sintomi gastroenterici possono essere frequenti ma non necessariamente

legati alla MC (63). Inoltre è noto che la MC può decorrere negli stessi pazienti in maniera silente (63), che alcuni sintomi comunemente riscontrabili nella MC possono essere erroneamente attribuiti per anni alla stessa sindrome (64) e che la MC possa insorgere anche in età adulta (65). Quanto evidenziato presuppone che tali pazienti, siano essi sintomatici o asintomatici, debbano essere sottoposti ad un follow-up sierologico indefinito nel tempo, perché appartenenti a gruppi a rischio, nella loro globalità inclusi coloro che non ne avrebbero alcuna necessità. Sembra pertanto più razionale attenersi in questi gruppi a rischio alle linee guida ESPGHAN 2012 (39).

■ **Pazienti affetti da tiroiditi autoimmuni**

Recenti studi di metanalisi hanno confermato una aumentata prevalenza di MC in pazienti affetti da tiroidite di Hashimoto (HT) raccomandando di conseguenza uno screening per MC in tali pazienti (66). Poiché l'associazione con HLA -DQ2, o HLA -DQ8 nella HT non è così forte come nella MC (67, 68) (l'HLA -DQ2.2 sembra conferire protezione, l'HLA DQ2.5 avere una associazione debole ai limiti della significatività e l'aplotipo HLA -DRB1*04 fortemente associato è in LD con l'HLA DQ7.3 e non con il DQ8) (67, 68) riveste importanza cruciale il poter escludere i pazienti negativi per HLA -DQ2, o HLA -DQ8 da uno screening sierologico a lungo termine. Riteniamo pertanto razionale offrire questa opzione a pazienti pediatrici ed adulti in follow-up per HT come indicato nelle linee guida 2012 (39).

Anche nella malattia di Graves si rileva una aumentata prevalenza di MC (69) per cui anche in questa tireopatia autoimmune lo screening sierologico per la MC è raccomandato (69). Per quanto riguarda l'eventuale utilizzo del test genetico per MC si rileva che tra gli alleli maggiormente associati alla malattia di Graves ritroviamo gli stessi presenti nella MC in particolare l'HLA -DRB1*03:01 (in LD con l'HLA -DQ2) e l'HLA -DQA1*05 (70) pertanto la tipizzazione HLA in pazienti affetti da malattia di Graves sarà di scarsa utilità clinica nell'escludere la MC.

Quindi, non si raccomanda la sua determinazione per stabilire il rischio di MC nei pazienti affetti da malattia di Graves.

■ Pazienti con diagnosi di MC non responsivi alla GFD

Circa il 7-30% dei pazienti celiaci adulti e il 25% di quelli pediatrici sembrano avere una risposta non soddisfacente alla GFD (71, 72, 73). In un altro studio, circa il 20% di tali pazienti con diagnosi di MC e a GFD risultavano negativi per HLA -DQ2, o HLA -DQ8 (42). Poiché nelle linee guida ESPGHAN 2020 ne la tipizzazione per HLA -DQ2, o HLA -DQ8, ne la presenza di sintomi associabili a MC sono obbligatori per formulare la diagnosi di MC (40), è probabile che in futuro si ricorrerà al test genetico per MC in questi pazienti scarsamente responsivi alla GFD per identificare diagnosi errate legate a false positività della t-TG2-IgA e indicare un disturbo gastrointestinale funzionale o altra patologia intestinale come responsabili della sintomatologia.

■ Pazienti con biopsia dubbia eseguita per altre ragioni

Talvolta in pazienti che eseguono indagini endoscopiche e biopsie del tratto intestinale superiore per ragioni non legate alla diagnostica della MC si possono evidenziare delle lesioni istologiche che possono far parte del quadro anatomo-patologico iniziale della MC, come ad esempio l'aumento dei linfociti T intraepiteliali (T-IELs). Poiché tali lesioni possono comparire anche in un numeroso gruppo di altre patologie inclusi casi di atrofia dei villi e sierologia negativa per MC legati a danno di mucosa indotto da farmaci (74, 75, 76) una negatività per HLA -DQ2, o HLA -DQ8 consente di escludere la MC dalla diagnosi differenziale di tali patologie.

Possibile utilità del test di tipizzazione HLA per MC per future terapie di immunomodulazione

Di recente, la company ImmusanT ha sospeso il trial clinico in Fase 2 di Nexvax2® in pazienti con MC perché, nonostante la somministrazione del "vaccino" sia stata ritenuta sicura, la sua efficacia nei confronti del danno della mucosa duodenale non si discostava rispetto al placebo (<https://www.fiercebiotech.com/biotech/immusan-cans-phase-2-celiac-trial-after-interim-efficacy-review>). La terapia consisteva nella somministrazione sottocute di molecole HLA - DQ2.5 caricate con differenti peptidi provenienti dalle prolamine tossiche per il paziente celiaco (77). Più di recente, tra le varie terapie possibili per le malattie autoimmuni inclusa la MC si sta disegnando una terapia basata sulla creazione di molecole costituite da

nanoparticelle rivestite di complessi MHC-peptide dove sia l'MHC che il peptide sono malattia-specifici (78, 79). Tali nanoparticelle sarebbero capaci di legarsi in modo specifico al recettore T di cellule CD4 positive inducendo la trasformazione di T cellule effettrici (Teff) in cellule T regolatorie (Treg). Le Treg a loro volta sarebbero capaci di indurre immunotolleranza specifica per quel determinato autoantigene mantenendo l'integrità generale del sistema immune (80, 81).

Segnaliamo che tali terapie innovative immunomodulanti prima di essere sperimentate negli esseri umani potranno finalmente avvalersi di un modello murino della MC che dopo tanti anni di ricerche è stato finalmente creato (<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2003-8>).

È evidente che i futuri pazienti affetti da MC o da altre malattie autoimmuni (sclerosi multipla, diabete mellito insulino-dipendente) sui quali impiegare questo tipo di terapie immunomodulanti personalizzate dovranno essere genotipizzati per HLA -DRB1 - DQA1 e DQB1.

Raccomandazioni per la metodologia di determinazione HLA e la refertazione

La genotipizzazione deve determinare gli alleli presenti ai loci DQA1 e DQB1 preferibilmente con una risoluzione a 4 cifre. Nel referto (vedi una serie di esempi di referto in Appendice) la tipizzazione deve essere riportata in modo aggiornato e chiaro (vedi la **Tab. 1** per la nomenclatura), e deve consentire, se si rileva un genotipo positivamente associato alla MC, di attribuire un rischio (vedi **Fig. 1** e **Tab. 2**).

Se invece la genotipizzazione non rileva alleli associati alla MC il referto potrà riportare che tale condizione esclude la MC e suggerisce indagini per altre patologie. In altri termini perché l'informazione genetica sia utilizzabile dal clinico, anche se deve riportare la complicata nomenclatura del sistema HLA, il referto deve anche contenere una semplice informazione dicotomica: il genotipo rilevato è associato o non è associato alla MC e se è associato quale è il rischio. Siamo consapevoli che l'attribuzione del rischio varia in funzione della popolazione in esame e che è sufficiente la positività per HLA DQ2 o DQ8 in un solo cromosoma perché si sviluppi la MC, tuttavia lo status di omozigosità per HLA -DQ2 (DQ2.5 o DQ2.5/DQ2.2) merita di essere conosciuto perché tali pazienti probabilmente meritano un programma di screening più intensivo (28) anche per l'insorgenza di altre patologie autoimmuni (82).

Considerazioni sul costo del test genetico HLA per MC

Il costo del test è relativamente elevato e per la tipizzazione dei loci DQA1 e DQB1 ad alta risoluzione si arriva a circa 300-350 € a seconda della regione, un costo enormemente più elevato rispetto alla determinazione delle IgA totali e della t-TG2-IgA corrispondente a circa 20-25 euro a seconda della regione. Comunque il costo della tipizzazione HLA per MC è decisamente inferiore alla endoscopia con biopsie che, se eseguita nel bambino, richiede anche il supporto anestesiológico per un costo totale di circa 400-500 euro. All'esame occorre aggiungere la valutazione anatomo-patologica su più biopsie (4 dal duodeno distale e almeno una dal bulbo) (40)

che a seconda delle colorazioni utilizzate può costare circa 100-150 euro. Ai costi sanitari occorre aggiungere quelli sociali in giornate di lavoro non svolte sia del paziente adulto che del genitore o più spesso di entrambe i genitori, l'invasività dell'esame, in particolare per il paziente pediatrico e i rischi connessi sia dell'esame che all'anestesia.

Il possibile utilizzo del test genetico per MC va tenuto in considerazione dal clinico nell'iter diagnostico della MC (**Tab. 3**), informando il paziente e/o i genitori della sua utilità come test di esclusione della MC e quindi

proponendolo non in modo indiscriminato ma in casi selezionati.

In altri termini, significa condurre da parte del medico di medicina generale o del pediatra di libera scelta una vera e propria consulenza genetica per una malattia poligenica polifattoriale ad alta frequenza. Se il medico per una serie di ragioni non si sentisse in grado di effettuare tale consulenza genetica si suggerisce l'invio del paziente ad un centro di più alto livello dotato di personale medico e/o biologico capace di effettuare tale prestazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Caio, G. *et al.* Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med* **17**, 142 (2019).
2. Lundin, K. E. A. & Wijmenga, C. Coeliac disease and autoimmune disease - Genetic overlap and screening. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (2015) doi:10.1038/nrgastro.2015.136.
3. Liu, E. *et al.* High Incidence of Celiac Disease in a Long-term Study of Adolescents With Susceptibility Genotypes. *Gastroenterology* **152**, 1329-1336 e1 (2017).
4. Myleus, A. *et al.* Celiac disease revealed in 3% of Swedish 12-year-olds born during an epidemic. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **49**, 170-176 (2009).
5. Rubio-Tapia, A. *et al.* Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology* **137**, 88-93 (2009).
6. Lionetti, E. *et al.* Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. *N Engl J Med* **371**, 1295-1303 (2014).
7. Vriezinga, S. L. *et al.* Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease. *N Engl J Med* **371**, 1304-1315 (2014).
8. Andren Aronsson, C. *et al.* Effects of Gluten Intake on Risk of Celiac Disease: A Case-Control Study on a Swedish Birth Cohort. *Clin Gastroenterol Hepatol* **14**, 403-409 e3 (2016).
9. Verdu, E. F., Galipeau, H. J. & Jabri, B. Novel players in coeliac disease pathogenesis: Role of the gut microbiota. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (2015) doi:10.1038/nrgastro.2015.90.
10. Kim, H. S. *et al.* Time Trends in the Prevalence of Celiac Disease and Gluten-Free Diet in the US Population: Results From the National Health and Nutrition Examination Surveys 2009-2014. *JAMA Intern Med* **176**, 1716-1717 (2016).
11. Coleman, C. *et al.* Common polygenic variation in coeliac disease and confirmation of ZNF335 and NIFA as disease susceptibility loci. *Eur J Hum Genet* **24**, 291-297 (2016).
12. Gutierrez-Achury, J. *et al.* Fine mapping in the MHC region accounts for 18% additional genetic risk for celiac disease. *Nat. Genet.* (2015) doi:10.1038/ng.3268.
13. Dieli-Crimi, R., Cenit, M. C. & Nunez, C. The genetics of celiac disease: A comprehensive review of clinical implications. *J Autoimmun* **64**, 26-41 (2015).
14. Cucca, F. *et al.* The distribution of DR4 haplotypes in sardinia suggests a primary association of type I diabetes with DRB1 and DQB1 loci. *Hum. Immunol.* **43**, (1995).
15. Cucca, F. *et al.* Combinations of specific DRB1, DQA1, DQB1 haplotypes are associated with insulin-dependent diabetes mellitus in sardinia. *Hum. Immunol.* **37**, (1993).
16. Catassi, C., Doloretta Macis, M., Ratsch, I. M., De Virgiliis, S. & Cucca, F. The distribution of DQ genes in the Saharawi population provides only a partial explanation for the high celiac disease prevalence. *Tissue Antigens* **58**, 402-406 (2001).
17. Lionetti, E. & Catassi, C. Co-localization of gluten consumption and HLA-DQ2 and -DQ8 genotypes, a clue to the history of celiac disease. *Dig Liver Dis* **46**, 1057-1063 (2014).
18. Robinson, J. *et al.* The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res* **43**, D423-31 (2015).
19. Alter, I., Gragert, L., Fingerson, S., Maiers, M. & Louzoun, Y. HLA class I haplotype diversity is consistent with selection for frequent existing haplotypes. *PLoS Comput Biol* **13**, e1005693 (2017).
20. Louka, A. S. & Sollid, L. M. HLA in coeliac disease: Unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens* (2003) doi:10.1034/j.1399-0039.2003.00017.x.
21. Sollid, L. M. Coeliac disease: Dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Reviews Immunology* (2002) doi:10.1038/nri885.
22. Congia, M. *et al.* A high frequency of the A30, B18, DR3, DRw52, DQw2 extended haplotype in Sardinian celiac disease patients: Further evidence that disease susceptibility is conferred by DQ A1*0501, B1*0201. *Tissue Antigens* (1992) doi:10.1111/j.1399-0039.1992.tb01911.x.
23. Spurkland, A., Sollid, L. M., 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) doi:10.1016/0198-8859(92)90104-U.
24. Karell, K. *et al.* HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1 *05-DQB1 *02 (DQ2) heterodimer: Results from the European genetics cluster on celiac disease. *Hum. Immunol.* (2003) doi:10.1016/S0198-8859(03)00027-2.
25. Tinto, N. *et al.* High frequency of haplotype HLA-DQ7 in celiac disease patients from south Italy: Retrospective evaluation of 5,535 subjects at risk of celiac disease. *PLoS One* (2015) doi:10.1371/journal.pone.0138324.
26. Pietzak, M. M., Schofield, T. C., McGinniss, M. J. & Nakamura, R. M. Stratifying Risk for Celiac Disease in a Large At-Risk United States Population by Using HLA Alleles. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* (2009) doi:10.1016/j.cgh.2009.05.028.
27. De Silvestri, A. *et al.* HLA-DQ genetics in children with celiac disease: A meta-analysis suggesting a two-step genetic screening procedure starting with HLA-DQ β chains. *Pediatr. Res.* (2018) doi:10.1038/pr.2017.307.
28. Liu, E. *et al.* Risk of pediatric celiac disease according to HLA haplotype and country. *N. Engl. J. Med.* (2014) doi:10.1056/NEJMoa1313977.
29. Vader, W. *et al.* The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2003) doi:10.1073/pnas.2135229100.
30. Jores, R.-D. *et al.* HLA-DQB1*0201

- homozygosis predisposes to severe intestinal damage in celiac disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **42**, (2007).
31. Karinen, H. *et al.* Gene dose effect of the DQB1*0201 allele contributes to severity of coeliac disease. *Scand. J. Gastroenterol.* (2006) doi:10.1080/00365520500206277.
 32. Congia, M. *et al.* A gene dosage effect of the DQA1*0501/DQB1*0201 allelic combination influences the clinical heterogeneity of celiac disease. *Hum. Immunol.* **40**, (1994).
 33. Bajor, J. *et al.* Classical celiac disease is more frequent with a double dose of HLA-DQB102: A systematic review with meta-analysis. *PLoS ONE* (2019) doi:10.1371/journal.pone.0212329.
 34. Van Lummel, M. *et al.* Type 1 diabetes-associated HLA-DQ8 transdimer accommodates a unique peptide repertoire. *J. Biol. Chem.* (2012) doi:10.1074/jbc.M111.313940.
 35. Gioia, L. *et al.* Position β 57 of I-Ag7 controls early anti-insulin responses in NOD mice, linking an MHC susceptibility allele to type 1 diabetes onset. *Sci. Immunol.* (2019) doi:10.1126/sciimmunol.aaw6329.
 36. Chow, I. T. *et al.* Discriminative T cell recognition of cross-reactive islet-antigens is associated with HLA-DQ8 transdimer-mediated autoimmune diabetes. *Sci. Adv.* (2019) doi:10.1126/sciadv.aaw9336.
 37. Fallang, L. E. *et al.* Differences in the risk of celiac disease associated with HLA-DQ2.5 or HLA-DQ2.2 are related to sustained gluten antigen presentation. *Nat. Immunol.* (2009) doi:10.1038/ni.1780.
 38. Bodd, M., Kim, C., Lundin, K. E. A. & Sollid, L. M. T-cell response to gluten in patients with HLA-DQ2.2 reveals requirement of peptide-MHC stability in celiac disease. *Gastroenterology* (2012) doi:10.1053/j.gastro.2011.11.021.
 39. Husby, S. *et al.* European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (2012) doi:10.1097/MPG.0b013e31821a23d0.
 40. Husby, S. *et al.* European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* (2019) doi:10.1097/mpg.0000000000002497.
 41. Schirru, E. *et al.* Anti-actin IgA antibodies identify celiac disease patients with a marsh 3 intestinal damage among subjects with moderate anti-TG2 levels. *Biomed Res. Int.* **2013**, (2013).
 42. Pallav, K. *et al.* Clinical Utility of Celiac Disease-Associated HLA Testing. *Dig. Dis. Sci.* (2014) doi:10.1007/s10620-014-3143-1.
 43. Nellikkal, S. S., Hafed, Y., Larson, J. J., Murray, J. A. & Absah, I. High Prevalence of Celiac Disease Among Screened First-Degree Relatives. *Mayo Clin. Proc.* (2019) doi:10.1016/j.mayocp.2019.03.027.
 44. Rubio-Tapia, A. *et al.* Predictors of Family Risk for Celiac Disease: A Population-Based Study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* (2008) doi:10.1016/j.cgh.2008.04.008.
 45. Karinen, H. *et al.* HLA genotyping is useful in the evaluation of the risk for coeliac disease in the 1st-degree relatives of patients with coeliac disease. *Scand. J. Gastroenterol.* (2006) doi:10.1080/00365520600684548.
 46. Niland, B. & Cash, B. D. Health benefits and adverse effects of a gluten-free diet in non-celiac disease patients. *Gastroenterol. Hepatol.* (2018).
 47. Lee, A. R., Wolf, R. L., Lebwohl, B., Ciaccio, E. J. & Green, P. H. R. Persistent economic burden of the Gluten free diet. *Nutrients* (2019) doi:10.3390/nu11020399.
 48. Catassi, C. *et al.* Diagnosis of non-celiac gluten sensitivity (NCGS): The salerno experts' criteria. *Nutrients* (2015) doi:10.3390/nu7064966.
 49. Reese, I. *et al.* Non-celiac gluten/wheat sensitivity (NCGS)—a currently undefined disorder without validated diagnostic criteria and of unknown prevalence: Position statement of the task force on food allergy of the German Society of Allergology and Clinical Immunology (D. *Allergo J. Int.* (2018) doi:10.1007/s40629-018-0070-2.
 50. Di Tola, M. *et al.* Anti-tissue transglutaminase antibodies in inflammatory bowel disease: New evidence. *Clin. Chem. Lab. Med.* (2004) doi:10.1515/CCLM.2004.225.
 51. Lerner, A., Jeremias, P. & Matthias, T. Outside of normal limits: False positive/negative anti TG2 autoantibodies. *Int. J. Celiac Dis.* (2015) doi:10.12691/ijcd-3-3-4.
 52. Ferrara, F. *et al.* Anti-transglutaminase antibodies in non-coeliac children suffering from infectious diseases. *Clin. Exp. Immunol.* (2010) doi:10.1111/j.1365-2249.2009.04054.x.
 53. Schirru, E., Jores, R.-D. & Congia, M. Prudence is necessary in the application of the new ESPGHAN criteria for celiac disease omitting duodenal biopsy: A case report. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **26**, (2014).
 54. Villalta, D. *et al.* False positive reactions for IgA and IgG anti-tissue transglutaminase antibodies in liver cirrhosis are common and method-dependent. *Clin. Chim. Acta* (2005) doi:10.1016/j.cccn.2005.01.015.
 55. Kurien, M., Chalkiadakis, I., Evans, K. & Sanders, D. S. False-positive tissue transglutaminase antibody levels occur in HIV-positive patients: HLA typing is essential. *Journal of Clinical Gastroenterology* (2012) doi:10.1097/MCG.0b013e31823b3baf.
 56. Freeman, H. J. Strongly positive tissue transglutaminase antibody assays without celiac disease. *Can. J. Gastroenterol.* (2004) doi:10.1155/2004/912053.
 57. Maglio, M. *et al.* Intestinal production of anti-tissue transglutaminase 2 antibodies in patients with diagnosis other than celiac disease. *Nutrients* (2017) doi:10.3390/nu9101050.
 58. Ludvigsson, J. F., Neovius, M. & Hammarström, L. Association between IgA deficiency & other autoimmune conditions: A population-based matched cohort study. *J. Clin. Immunol.* (2014) doi:10.1007/s10875-014-0009-4.

59. Ferreira, R. C. *et al.* High-density SNP mapping of the HLA region identifies multiple independent susceptibility loci associated with selective IgA deficiency. *PLoS Genet.* (2012) doi:10.1371/journal.pgen.1002476.
60. Olerup, O., Smith, C. I. E. & Hammarström, L. Different amino acids at position 57 of the HLA-DQB1 chain associated with susceptibility and resistance to IgA deficiency. *Nature* (1990) doi:10.1038/347289a0.
61. Olerup, O., Smith, C. I. E., Bjorkander, J. & Hammarstrom, L. Shared HLA class II-associated genetic susceptibility and resistance, related to the HLA-DQB1 gene, in IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1992) doi:10.1073/pnas.89.22.10653.
62. Mohammadi, J. *et al.* Human Leukocyte Antigens (HLA) associated with selective IgA deficiency in Iran and Sweden. *Iran. J. Allergy, Asthma Immunol.* (2008).
63. Pavlovic, M., Berenji, K. & Bukurov, M. Screening of celiac disease in Down syndrome - Old and new dilemmas. *World J. Clin. Cases* (2017) doi:10.12998/wjcc.v5.i7.264.
64. Marild, K., Størdal, K., Hagman, A. & Ludvigsson, J. F. Turner syndrome and celiac disease: A case-control study. *Pediatrics* (2016) doi:10.1542/peds.2015-2232.
65. Henderson, A., Lynch, S. A., Wilkinson, S. & Hunter, M. Adults with Down's syndrome: The prevalence of complications and health care in the community. *Br. J. Gen. Pract.* (2007).
66. Roy, A. *et al.* Prevalence of Celiac Disease in Patients with Autoimmune Thyroid Disease: A Meta-Analysis. *Thyroid* (2016) doi:10.1089/thy.2016.0108.
67. Jacobson, E. M., Huber, A. & Tomer, Y. The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: From epidemiology to etiology. *Journal of Autoimmunity* (2008) doi:10.1016/j.jaut.2007.11.010.
68. Zeitlin, A. A. *et al.* Analysis of HLA class II genes in Hashimoto's thyroiditis reveals differences compared to Graves' disease. *Genes Immun.* (2008) doi:10.1038/gene.2008.26.
69. Ch'ng, C. L., Biswas, M., Benton, A., Jones, M. K. & Kingham, J. G. C. Prospective screening for coeliac disease in patients with Graves' hyperthyroidism using anti-gliadin and tissue transglutaminase antibodies. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. (2005) doi:10.1111/j.1365-2265.2005.02214.x.
70. Maciel, L. M. Z., Rodrigues, S. S., Dibbern, R. S., Navarro, P. A. A. & Donadi, E. A. Association of the HLA-DRB1*0301 and HLA-DQA1* 0501 alleles with Graves' disease in a population representing the gene contribution from several ethnic backgrounds. *Thyroid* (2001) doi:10.1089/10507250150500630.
71. Leffler, D. A., Dennis, M., Hyett, B., Schuppan, D. & Kelly, C. P. Etiologies and Predictors of Diagnosis in Non-Responsive Celiac Disease. *Am. J. Gastroenterol.* (2006) doi:10.14309/00000434-200609001-00276.
72. Veeraraghavan, G. *et al.* Etiologies and Clinical Features of Nonresponsive Celiac Disease in Children Under the Age of 18 Years: ACG Fellows-In-Training Award. *Am. J. Gastroenterol.* (2015) doi:10.14309/00000434-201510001-02430.
73. Yadav, A. *et al.* Causes and Outcomes of Non-responsive Celiac Disease. *Am. J. Gastroenterol.* (2016) doi:10.14309/00000434-201610001-01050.
74. Martins, C. *et al.* Seronegative Intestinal Villous Atrophy: A Diagnostic Challenge. *Case Rep. Gastrointest. Med.* (2016) doi:10.1155/2016/6392028.
75. Brown, I., Mino-Kenudson, M., Deshpande, V. & Lauwers, G. Y. Intraepithelial lymphocytosis in architecturally preserved proximal small intestinal mucosa: An increasing diagnostic problem with a wide differential diagnosis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* (2006) doi:10.1043/1543-2165(2006)130[1020:ILIAIP]2.0.CO;2.
76. Oberhuber, G. Histopathology of celiac disease. *Biomed. Pharmacother.* (2000) doi:10.1016/S0753-3322(01)80003-2.
77. Pearson, R. M. *et al.* Overcoming challenges in treating autoimmunity: Development of tolerogenic immunomodifying nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* (2019) doi:10.1016/j.nano.2018.10.001.
78. Singha, S. *et al.* Peptide-MHC-based nanomedicines for autoimmunity function as T-cell receptor microclustering devices. *Nat. Nanotechnol.* (2017) doi:10.1038/nnano.2017.56.
79. Serra, P. & Santamaria, P. Nanoparticle-based approaches to immune tolerance for the treatment of autoimmune diseases. *European Journal of Immunology* (2018) doi:10.1002/eji.201747059.
80. Carballido, J. M. & Santamaria, P. Taming autoimmunity: Translating antigen-specific approaches to induce immune tolerance. *J. Exp. Med.* (2019) doi:10.1084/jem.20182287.
81. Serra, P. & Santamaria, P. Antigen-specific therapeutic approaches for autoimmunity. *Nature Biotechnology* (2019) doi:10.1038/s41587-019-0015-4.
82. Smigoc Schweiger, D. *et al.* High-risk genotypes HLA-DR3-DQ2/DR3-DQ2 and DR3-DQ2/DR4-DQ8 in co-occurrence of type 1 diabetes and celiac disease. *Autoimmunity* (2016) doi:10.3109/08916934.2016.1164144.

Tab. 1 - Terminologia utilizzata

Gene	Una particolare sequenza nucleotidica ad un determinato locus
Locus (plurale: loci)	La posizione occupata dal gene sul cromosoma
Allele	Polimorfismi nella sequenza di un gene allo stesso locus. In un individuo diploide, possono essere presenti al massimo due alleli diversi
Polimorfismo	Variazioni nella sequenza nucleotidica di un determinato locus tra gli individui (determina più di un allele a quel locus)
Omozigote	Presenza di alleli con la stessa sequenza nucleotidica allo stesso locus su cromosomi omologhi (Es. HLA -DQB1*02:01/DQB1*02:01)
Eterozigote	Presenza di alleli con differente sequenza nucleotidica allo stesso locus su cromosomi omologhi (Es. HLA -DQB1*02:01/DQB1*03:02)
Aplotipo	Geni ereditati insieme su un determinato segmento cromosomico (Es. HLA -DQA1*05:01/DQB1*02:01). Nell'MHC si riscontrano con una certa frequenza per un forte linkage disequilibrium aplotipi estesi talvolta dal locus A sino al locus DQB1. Es. A1, Cw7, B8, DR3, DQ2 presente in Nord Europa oppure A30, Cw5, B18, DR3, DQ2 presente nella popolazione Sarda
Genotipo	Costituzione genetica di un individuo. Es. di un genotipo HLA - A1, Cw7, B8, DR3, DQ2/ -A30, Cw5, B18, DR3, DQ2
Cis	Geni localizzati sullo stesso cromosoma (Es. HLA -DQA1*03:01 -DQB1*03:02, codificante per la molecola HLA -DQ8)
Trans	Geni localizzati su cromosomi opposti (Es. HLA -DQA1*05:05-DQB1*03:01/ -DQA1*02:01-DQB1*02:02. In neretto sono indicati i geni che consentono la formazione dell'eterodimero HLA -DQ2 in <i>trans</i> , vedi anche Fig. 1)
Eterodimero	Complesso proteico costituito da due differenti subunità (Es. catena α e catena β dell'HLA -DQ2)

Codominanza	Sia i geni materni che quelli paterni sono espressi. Questo consente ad es. la formazione dell'eterodimero HLA -DQ2 in <i>trans</i>
Linkage disequilibrium	Associazione non casuale di alleli a loci differenti in una data popolazione
Nomenclatura HLA-figura esplicativa	<p>Trattino usato per separare il prefisso HLA dal nome del gene</p> <p>Separatore</p> <p>Separatori dei campi</p> <p>HLA-DQB1*03:02:09:03N</p> <p>Prefisso HLA</p> <p>Gene/locus</p> <p>Campo 1 Gruppo di alleli</p> <p>Campo 2 Specifica proteina HLA</p> <p>Campo 3 utilizzato per indicare una sostituzione del DNA sinonima all'interno della regione di codifica</p> <p>Campo 4 utilizzato per indicare differenze nucleotidiche in regioni non-codificanti</p> <p>Suffisso utilizzato per indicare differenze in espressione</p>

Tab. 2 - Genotipi HLA DQ permissivi per la MC

HLA (genotipo)	HLA (eterodimero)	CD (673)	Controlli (627)	OR	C.I.	P	Rischio
DQA1*05-DQB1*02:01/ DQA1*05-DQB1*02:01	DQ2.5/DQ2.5	143	31	5.2	3.7-7.7	0.0001	Alto
DQA1*05-DQB1*02:01/ DQA1*0201-DQB1*02:02	DQ2.5/DQ2.2	97	19	5.2	3.4-8.9	0.0001	Alto
DQA1*03:01-DQB1*03:02/ DQA1*03:01-DQB1*03:02	DQ8/DQ8	9	2	4.2	0.9-19.6	0.06	Alto
DQA1*05-DQB1*02:01/ DQA1*03:01-DQB1*03:02	DQ2.5/DQ8	59	21	2.7	1.6-4.6	0.0001	Moderato
DQA1*03:01-DQB1*03:02/DQA1*X-DQB1*X	DQ8/X	56	23	2.3	1.4-3.9	0.0006	Moderato
DQA1*05-DQB1*03:01/ DQA1*0201-DQB1*02:02	DQ2.5 <i>trans</i>	37	20	1.7	1-3	0.0448	Basso
DQA1*05-DQB1*03:01/ DQA1*X-DQB1*X	DQ2.5 <i>cis</i>	235	160	1.5	1.2-2	0.0002	Basso
DQA1*0201-DQB1*02:02/ DQA1*X-DQB1*X	DQ2.2/X	21	41	0.46	0.2-0.7	0.004	Basso

Tab. 3 - Situazioni cliniche per le quali proporre il test genetico HLA per celiachia

	Condizione	Negatività per HLA -DQ2, o HLA -DQ8
Prima della Biopsia	Familiari di primo grado di un probando celiaco	Consente di limitare il follow-up sierologico periodico ai soli positivi
	Individui a GFD che non hanno eseguito la determinazione della TtG-IgA prima di intraprendere la dieta	Consente di escludere la MC come causa dei sintomi gastroenterici indipendentemente dalla risposta clinica alla GFD
	Individui con persistente positività a basso titolo della TtG-IgA	Consente di definire inequivocabilmente i falsi positivi anche nei familiari di primo grado di un probando celiaco con ridotto apporto di glutine
	Individui con deficit totale di IgA	Consente di escludere la MC
	Pazienti affetti da patologie cromosomiche e a rischio per MC (S. di Down, S. di Turner, S. Williams)	Consente di limitare il follow-up sierologico periodico ai soli positivi
	Tiroidite autoimmune di Hashimoto	Consente di limitare il follow-up sierologico periodico ai soli positivi
Dopo la biopsia	Pazienti con diagnosi di MC non responsivi alla GFD	Consente di escludere la MC e indirizzare la diagnosi verso altre patologie
	Nei pazienti con biopsia dubbia eseguita per altre ragioni	Consente di indirizzare la diagnosi verso patologie differenti dalla MC

Appendice

FAC-SIMILE REFERTO

Test di tipizzazione molecolare HLA di Classe II per valutazione del rischio malattia celiaca

Cognome e Nome

Data e luogo di nascita

Sesso

CF

Medico richiedente

Struttura richiedente

Richiesta

Tipo di Campione: Sangue Periferico

Provenienza Campione: esempio: SSN – Struttura interna

Indicazione al test: Sospetta celiachia

Metodi utilizzati: PCR-SSP bassa risoluzione

Loci HLA testati: DQA1-DQB1

Sensibilità e specificità analitica del test: 99%

Risultato: L'indagine molecolare ha evidenziato la presenza del seguente genotipo: **XXX** (vedi **Tab. 4**).

Interpretazione del risultato: Genotipo HLA associato a rischio genetico **XXX** (alto/moderato/basso, vedi **Tab. 4**) per Celiachia. La presenza di un genotipo a rischio ha un basso valore predittivo positivo e non permette la diagnosi di celiachia che deve invece essere formulata con esami immunologici e/o clinici.

Luogo e data

Il responsabile del test

Il responsabile del Laboratorio

Tab. 4: Casi di Risultati e di loro Interpretazione
(riferirsi alla Tab. 2 per i genotipi e il rischio)

Risultato del Genotipo	Interpretazione del risultato
HLA -DQA1*05:01- DQB1*02:01/DQA1*05:01- DQB1*02:01	HLA DQ2.5 omozigote. Genotipo HLA associato a rischio genetico alto per Celiachia.
HLA -DQA1*05:01- DQB1*02:01/DQA1*01:02- DQB1*05:02	HLA DQ2.5 cis (eterozigote). Genotipo HLA associato a rischio genetico basso per Celiachia.
HLA -DQA1*02:01- DQB1*02:02/DQA1*05:05- DQB1*03:01	HLA DQ2.5 trans (eterozigote). Genotipo HLA associato a rischio genetico basso per Celiachia.
HLA -DQA1*05:01- DQB1*02:01/DQA1*02:01- DQB1*02:02	HLA DQ2.5/DQ2.2 (DQ2 omozigote). Genotipo HLA associato a rischio genetico alto per Celiachia.
HLA -DQA1*03:01- DQB1*03:02/DQA1*03:01- DQB1*03:02	HLA DQ8 omozigote. Genotipo HLA associato a rischio genetico alto per Celiachia.
HLA -DQA1*01:01- DQB1*01:02/DQA1*01:02- DQB1*05:02	HLA DQ2.5, DQ2.2 e DQ8 negativi. Genotipo HLA non associato a rischio genetico per Celiachia. Tale condizione esclude la malattia celiaca e suggerisce indagini per altre patologie.

Risultato del Genotipo	Interpretazione del risultato
HLA -DQA1*05:05- DQB1*03:01/DQA1*01:02- DQB1*05:02	HLA DQ2.5, DQ2.2 e DQ8 negativi ma con presenza di HLA DQ7.5 (mezzo eterodimero). Genotipo HLA associato molto raramente alla malattia celiaca con un rischio e un valore predittivo positivo bassissimi che non permette la diagnosi di celiachia che deve invece essere formulata con esami immunologici e/o clinici e la dimostrazione inequivocabile della glutine dipendenza del danno intestinale.
HLA -DQA1*03:01- DQB1*02:02/DQA1*01:02- DQB1*05:02	HLA DQ2.5, DQ2.2 e DQ8 negativi ma con presenza di HLA DQ2.3 (mezzo eterodimero). Genotipo HLA associato molto raramente alla malattia celiaca con un rischio e un valore predittivo positivo bassissimi che non permette la diagnosi di celiachia che deve invece essere formulata con esami immunologici e/o clinici e la dimostrazione inequivocabile della glutine dipendenza del danno intestinale.



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