

Estudio coste-efectividad de la aplicación del diagnóstico genético en la valoración de la enfermedad celíaca

Cost-effectiveness study of using genetic diagnosis in evaluation of celiac disease

Cilleruelo M. L. ¹

Jiménez J. ²

Román E. ¹

Bornstein B. ²

Arranz E. ³

Garrote J. A. ³

H. Larramendi C. ²

¹ Servicio de Pediatría. Hospital Severo Ochoa

² Servicio de Análisis Clínicos.

Hospital Severo Ochoa

Laboratorio de Inmunogenética.

Facultad de Medicina de Valladolid (3)

RESUMEN

La enfermedad celíaca (EC) se desarrolla exclusivamente en individuos genéticamente predispuestos. El objetivo de este estudio es valorar la utilidad de la determinación del HLA-DQ2 en el despistaje de la EC en población de riesgo. Se han estudiado un total de 682 individuos: 174 niños celíacos, 191 familiares de primer grado de pacientes celíacos, 83 niños con diabetes mellitus tipo I, 64 niños con diagnóstico dudoso de EC y 164 controles. El HLA-DQ2 positivo lo presentan el 34,7% de los controles, el 96% de la población de celíacos, el 66% de sus familiares de primer grado y el 72,2% de los niños diabéticos. El 51,5% de los pacientes con sospecha de enfermedad celíaca y diagnóstico no concluyente eran HLA-DQ2 positivos y, en este grupo, todos los niños con anticuerpos antiendomiso positivos portaban el HLA-DQ2 aunque en ellos no se confirmara la EC. La caracterización genética de los familiares de los niños celíacos descarta la enfermedad en un 34%, no siendo necesario en ellos seguimiento serológico a largo plazo. La elevada prevalencia del HLA-DQ2 en los niños diabéticos y en pacientes con serología positiva de EC y diagnóstico dudoso hace que el estudio genético sea de escasa utilidad en el despistaje de la EC.

Palabras clave:

Enfermedad celíaca, despistaje, HLA-DQ2

ABSTRACT

Celiac Disease (CD) is developed in only genetically susceptible individuals. The aim of this study is to investigate whether HLA-DQ2 typing is helpful in exclusion of CD in patients at risk of developing CD. 682 individuals have been tested: 174 children with CD, 191 of first degree relatives of celiac children, 83 children with type 1 diabetes, 64 with CD uncertain diagnosis and 164 controls. HLA-DQ2 haplotype was present in 34,7% of controls, 96% of celiac children, 66% of relatives, 72,2% of diabetic children and 51,5% of children with uncertain diagnosis of CD. In this group, all endomysial antibodies positive patients with non confirmed CD were HLA-DQ2 positive. HLA-DQ2 typing in first-degree relatives of celiac patients could eliminate 34% of the population from needing serial autoantibody testing. HLA-DQ2 typing in children with type 1 diabetes and children with positive serology and uncertain diagnosis of CD is not useful because of the high prevalence of HLA-DQ2 positivity in these study groups.

Key words:

Celiac disease, screening, HLA-DQ2

MAPFRE MEDICINA, 2006; 17 (4): 266-272

Correspondencia

M. L. Cilleruelo Pascual

lcillepas10@yahoo.es

J. Jiménez Jiménez

m.jimenez.016@recol.es

INTRODUCCIÓN

La enfermedad celíaca (EC) es una intolerancia permanente al gluten del trigo, cebada y centeno que se desarrolla en individuos genéticamente predisuestos dando lugar a una lesión de la mucosa del intestino delgado mediada inmunológicamente (1). Dicha lesión condiciona una mala utilización de los nutrientes cuyas consecuencias varían desde el cuadro clásico de diarrea crónica y malnutrición hasta formas asintomáticas o silentes (2). Al retirar el gluten de la dieta la mucosa intestinal se normaliza y el cuadro clínico desaparece (3).

La enfermedad es considerada, en la actualidad, el resultado de una compleja interrelación entre factores intrínsecos (genéticos) y extrínsecos (ambientales), lo que justificaría la gran variabilidad de su espectro clínico.

La principal relación genética se observa con los genes y sus productos de la región HLA de clase II (4), en concreto el HLA DQ2, codificado por los alelos DQA1*0501 y DQB1*0201, y el HLA DQ8, codificado por los alelos DQA1*0301 y DQB1*0302 y asociado normalmente al HLA-DR4 (5,6). En un estudio colaborativo europeo reciente se han valorado los fenotipos HLA característicos de la EC en 1008 celíacos. El 88% fueron DQ2 positivos, el 5,95% fueron DQ8 positivos y el 6,05% eran negativos para el DQ2 y DQ8; de estos, el 93% portaban la mitad del haplotipo DQ2. Estos resultados subrayan la importancia primaria de los HLA-DQ en la susceptibilidad a la EC y la extrema rareza de pacientes celíacos que no son portadores ni del HLA DQ2 ni DQ8 ni de un haplotipo del DQ2 (7). Aunque el HLA-DQ2 se encuentra en el 25-30% de la población general, sólo aproximadamente el 2% de los portadores desarrollarán la enfermedad.

Otro hecho que apoya la fuerte influencia genética en el desarrollo de la EC es la mayor frecuencia de esta enfermedad en los familiares de primer grado de pacientes celíacos, muy superior a la observada en la población general. Los estudios de prevalencia de EC en familiares de celíacos demuestran que la enfermedad oscila entre el 2 al 18%, presentado un mayor riesgo los hermanos que los padres (8-11). Asimismo, es llamativa la elevada concordancia de la enfermedad en gemelos monozigotos tratándose de enfermedad multifactorial (12).

Un elevado número de enfermedades se asocian de forma significativa a la EC. Algunas son posiblemente dependientes del gluten como la diabetes mellitus tipo 1, la tiroiditis autoinmune, la hepatitis autoinmune, el síndrome de Sjögren, y la enfermedad de Addison y otras son independientes del gluten como el síndrome de Down, el síndrome de Turner, el síndrome de Williams y el déficit de IgA (3).

Tanto los familiares de primer grado como los pacientes con enfermedades autoinmunes asociadas a la EC tienden a presentar una forma de enfermedad caracterizada por su escasa o nula sintomatología y que, por tanto, sólo puede detectarse mediante estudios de despistaje serológico. Debido al carácter evolutivo de esta enfermedad es necesario repetir dicho estudio a lo largo del tiempo. Por ello, la determinación de los fenotipos HLA característicos de la EC sería de especial utilidad puesto que permitiría eliminar del despistaje a los individuos que no los porten dado su elevado valor predictivo negativo. De esta manera se centrarían los esfuerzos de seguimiento sólo en la población genéticamente susceptible de padecer la enfermedad.

El objetivo de este estudio es valorar la utilidad de la determinación del HLA-DQ2 en el despistaje de la EC en poblaciones de riesgo. La población de estudio es: familiares de primer grado de pacientes celíacos, niños con diabetes mellitus tipo I, niños con diagnóstico dudoso de EC y enfermos celíacos.

MÉTODOS

Se ha estudiado una muestra de 682 individuos distribuidos en: 174 niños celíacos, y 191 familiares de primer grado de estos pacientes, 83 niños afectados de diabetes mellitus tipo 1 y 64 niños con sospecha clínica de enfermedad celíaca y diagnóstico dudoso. Los niños con sospecha de enfermedad celíaca y diagnóstico dudoso eran pacientes con síntomas característicos de EC, serología positiva y biopsia intestinal normal o niños con síntomas típicos de EC y serología negativa. El grupo control estuvo constituido por 60 adultos sanos y por 104 recién nacidos en los que se ha realizado la determinación en sangre de cordón umbilical, todos ellos de la misma zona sanitaria. La enfermedad celíaca fue diagnosticada siguiendo los criterios de la ESPGHAN (13, 14). Para realizar el diagnóstico de enfermedad celíaca se determinaron: inmunoglo-

Cilleruelo M^a L., Jiménez J.,
Román E., et al.

Estudio coste-efectividad de la aplicación
del diagnóstico genético en la valoración de
la enfermedad celíaca

bulina A mediante nefelometría laser (Behring Nephelometer Analyzer. Dade Behring) y los anticuerpos antiendomiso de tipo IgA mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) en muestras diluidas a 1/5, utilizando como sustrato secciones de cordón umbilical humano preparadas en nuestro hospital. Se consideraban resultados positivos cuando los títulos eran mayores o iguales a 1/20. Los resultados positivos mostraban un patrón de fluorescencia en "nido de abeja" alrededor de las fibras musculares en la muscularis de los vasos del cordón umbilical. En casos de deficiencia de IgA se realizó anticuerpos antiendomiso IgG utilizando como sustrato la porción distal de esófago de mono verde, ya que apreciábamos mejor la fluorescencia positiva que en cordón umbilical, anticuerpos antigliadina IgG y anticuerpos antitransglutaminasa IgG. Los anticuerpos antigliadina IgG fueron medidos mediante método ELISA utilizando como antígeno gliadina, y los anticuerpos antitransglutaminasa IgG utilizaron transglutaminasa humana recombinante, ambos métodos de Pharmacia Diagnostics. En todos los pacientes con clínica sugestiva de EC y/o serología positiva se efectuó biopsia intestinal mediante cápsula de Crosby o endoscopia, extrayendo muestras de mucosa intestinal próximas al ángulo de Treitz o de la segunda porción del duodeno respectivamente.

En todos los individuos estudiados se ha determinado el HLA-DQ2 mediante técnicas de amplificación utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (15). Se aisló DNA en muestras de sangre periférica mediante separación de leucocitos de los eritrocitos lisados, solubilizados con detergente y tratados con fenol. La extracción de DNA se realizó mediante extracción con fenol – cloroformo – alcohol isoamílico y posterior precipitación con etanol. La tipificación de los alelos DQA1*0501 y DQB1*0201 se realizó mediante amplificación en un termociclador GeneAmp PCR 2700 (Applied Biosystems) con secuencias de cebadores específicos (PCR-SSP). Los productos obtenidos fueron estudiados mediante electroforesis en gel de agarosa 2%, y posteriormente visualizados mediante luz ultravioleta y fotografiados. El método detectaba la presencia o ausencia de al menos una copia de los alelos DQA1*0501 y DQB1*0201 no pudiendo diferenciar entre homocigotos y heterocigotos. A los pacientes celíacos que sólo portaban uno de los dos alelos se les realizó

DRB1*04 (HLA-DQ8) mediante hibridación reversa (GenID distribuida por Laboratorios Vitro).

Se obtuvo consentimiento informado de todos los individuos que participaron en el estudio. El protocolo fue aprobado por el Comité Ético y de Investigación de nuestro hospital.

RESULTADOS

Controles

La frecuencia de HLA-DQ2 en población general de nuestro medio es del 34,7% (57 positivos sobre un total de 164 individuos estudiados) (Tabla I).

Celíacos

De los 174 pacientes estudiados (68 niños y 106 niñas) 167 son HLA-DQ2 positivos (96%) y 7 HLA-DQ2 negativos (4%) (Tabla I). Estos 7 pacientes portan la mitad del heterodímero DQ2 (5 el DQB1*02 y 2 el DQA1*0501) (Tabla II). Dos de estos 7 niños HLA-DQ2 negativos eran HLA-DQ8 positivos por lo que quedan sólo 5 pacientes HLA-DQ2 y DQ8 negativos, lo que corresponde al 2,8% del total (Tabla II).

Familiares de primer grado de enfermos celíacos

De los 191 familiares estudiados, 68 son madres, 55 padres y 68 hermanos. 126 son HLA-DQ2 positivos (66%) y 65 HLA-DQ2 negativos (34%) (Tabla I). De los pacientes negativos 50 (26%) portan la mitad del HLA-DQ2 (33 el alelo DQB1*02 y 17 el

TABLA I. Resultados del HLA-DQ2 en los diversos grupos de estudio y en el grupo control

	Número	HLA-DQ2 (+)	HLA-DQ2 (-)
Celíacos	174	167 (96%)	7 (4%)
Familiares	191	126 (66%)	65 (34%)
Diabéticos	89	63 (70,7%)	26 (29,2%)
Diagnóstico dudoso	64	33 (51,5%)	31 (48,4%)
Controles	164	57 (34,7%)	107 (65,2%)

TABLA II. Distribución del HLA-DQ8 y de los alelos HLA-DQA1*0501 y HLA-DQB1*02 en los casos de HLA-DQ2 negativo

	DQA1*0501 (+)	DQA1*0501 (-) y DQB1*02 (-)	DQA1*0501 (-) y DQB1*02 (+)	HLA-DQ8 (+) y DQB1*02 (-)
Celíacos	2	0	5	2
Familiares	17	15	33	Nr
Diabéticos	5	16	5	Nr
Diagnóstico dudoso	7	15	9	Nr

Nr: No realizado.

DQA1*0501) y en 15 familiares (7,8%) los dos alelos son negativos (Tabla 2).

Fueron HLA-DQ2 positivos, el 60,2% de las madres, el 61,8% de los padres y el 75% de los hermanos. Estos datos y la distribución de los familiares HLA-DQ2 negativos se muestra en la Tabla III.

Del total de pacientes, 17 (9,4%) presentaron marcadores serológicos positivos de EC y en todos ellos se confirmó la enfermedad por biopsia intestinal. Todos eran HLA-DQ2 positivos.

Niños con Diabetes Mellitus tipo 1

De los 89 pacientes estudiados (57 niños y 32 niñas), 63 son HLA-DQ2 positivos (70,7%) y 26 HLA-DQ2 negativos (29,2%) (Tabla I). En este grupo, 10 (11,2%) portan la mitad del DQ2 (5 el alelo DQB1*02 y 5 el DQA1*0501). En 16 niños (17,9%) son negativos ambos alelos (Tabla II).

Del total de pacientes, 9 (10,1%) presentan marcadores serológicos positivos de EC y en ellos se ha confirmado la enfermedad por biopsia intestinal. Todos menos dos eran HLA-DQ2 positivos. Por

tanto, el HLA de susceptibilidad lo presentaban el 70% de los niños diabéticos no celíacos y el 77,7% de los niños diabéticos y celíacos.

Pacientes con sospecha de enfermedad celíaca y diagnóstico dudoso

Se ha estudiado un total de 64 pacientes (40 niños y 24 niñas). Los diagnósticos de estos pacientes se pueden observar en la Tabla IV. 33 son HLA-DQ2 positivos (51,5%) y 31 HLA-DQ2 negativos (48,4%) (Tabla I). De los negativos, 16 portan la mitad del HLA-DQ2 y 15 son negativos para ambos alelos (Tabla II).

Veintitres pacientes presentaban marcadores serológicos positivos de EC (17 anticuerpos antiendomiso positivos y, en 6 niños con déficit de IgA, anticuerpos antigliadina positivos). En 8 niños se realizó biopsia intestinal que fue normal. En 5 no se efectuó por negativización de la serología y desaparición de los síntomas durante el seguimiento. Todos los niños con anticuerpos antiendomiso positivos eran, asimismo, HLA-DQ2 positivos. De los 6 niños con

TABLA III. Distribución del HLA-DQ2 y de los alelos HLA-DQA1*0501 y HLA-DQB1*02 en los padres, madres y hermanos de enfermos celíacos

	Nº	HLA-DQ2 (+)	DQA1*0501 (+) y DQB1*02 (-)	DQA1*0501 (-) y DQB1*02 (+)	DQA1*05 (-) y DQB1*02 (-)
Madres	68	41	5	15	7
Padres	55	34	7	10	4
Hermanos	68	51	5	8	4

**TABLA IV. Distribución del HLA-DQ2 en niños
con diagnóstico dudoso de enfermedad celíaca**

	Número	HLA-DQ2 (+)	HLA-DQ2 (-)
Serología + de EC	23	17	6
Retraso ponderal	16	7	9
Diarrea crónica	12	3	9
Ferropenia	4	2	2
Elevación transaminasas	1	0	1
Vómitos	4	3	1
Anorexia	2	0	2
Dolor abdominal	2	1	1

anticuerpos antigliadina IgG positivos y anticuerpos antiendomiso IgG negativos 2 eran HLA-DQ2 positivos y 3 negativos.

DISCUSIÓN

La frecuencia del HLA-DQ2 en la población de enfermos celíacos, familiares de primer grado de enfermos celíacos, diabetes mellitus tipo 1 y diagnóstico dudoso de enfermedad celíaca es del 96%, 66%, 70,7% y 57% respectivamente, mientras que en la población general de nuestro medio la frecuencia es del 34,7%.

Enfermos celíacos

Los estudios de HLA-DQ2 realizados en diversas poblaciones de celíacos han demostrado que el porcentaje de pacientes con HLA-DQ2 positivo se sitúa en torno al 90% y en un estudio colaborativo reciente que incluye diversos países europeos dicho porcentaje se encuentra en un 88% (7). En el presente estudio los celíacos presentan un HLA-DQ2 positivo en el 96% de los casos. Estos resultados están en línea con los hallazgos de la mayoría de los autores estando nuestras cifras en el límite más alto y similar a los niños de Castilla y León (16).

De los pacientes HLA-DQ2 negativos, sólo 2 presentaban el heterodímero de riesgo HLA-DQ8. Esta baja frecuencia está en total correspondencia con lo encontrado en población de nuestro país,

situándose en una cifra media entre el porcentaje más alto encontrado en niños del país vasco, un 3% (17), y ningún paciente en la serie de niños canarios (18). Parece que la frecuencia del HLA-DQ8 es menor en nuestro país que en otras poblaciones europeas, no sólo del norte sino también del sur, ya que la frecuencia en estas zonas se encuentran en torno al 6% (7).

En el estudio colaborativo anteriormente mencionado, cuyo objetivo más importante era la caracterización de los celíacos HLA-DQ2 negativos, se observó que hasta un 5,6% de los pacientes sólo presentaban como marcador genético la mitad del heterodímero DQ2. Los autores dan relevancia a este hecho, que además es más frecuente en las poblaciones europeas del sur, indicando que debe considerarse la presencia de la mitad del heterodímero DQ2 compatible con el diagnóstico de enfermedad celíaca. En nuestra serie se observa también que todos los niños DQ2 negativos, independientemente de portar el HLA-DQ8, presentaban la mitad del HLA-DQ2 y, en concreto, 5 de ellos sólo presentaban la mitad de heterodímero. Por todo ello, debemos replantearnos la necesidad de la determinación del HLA-DQ8 debido a su bajo rendimiento en nuestra población.

Familiares de primer grado de enfermos celíacos

De los familiares de celíacos estudiados el 66% son HLA-DQ2 positivos. Estas cifras son claramente superiores a las observadas en la población general y similares a las descritas en la literatura. De los negativos, la mayoría portan la mitad del HLA heterodímero, sobre todo el alelo DQB1*02 que es el más fuertemente ligado al desarrollo de la enfermedad celíaca. Sólo el 7,7% del total son negativos para los dos alelos del HLA-DQ2 lo que indica la fuerte expresión del mismo en estas familias. El HLA-DQ2 positivo lo presentan en mayor porcentaje los hermanos.

El 8,8% de los familiares tenían marcadores serológicos positivos para la EC y en todos ellos se confirmó la lesión histológica mediante biopsia intestinal, lo que corresponde al 14% de los familiares DQ2 positivos. Los estudios de despistaje de EC en familiares en nuestro país clásicamente han mostrado cifras algo inferiores que las descritas en la literatu-

Cilleruelo M^a L., Jiménez J.,
Román E., et al.

Estudio coste-efectividad de la aplicación
del diagnóstico genético en la valoración de
la enfermedad celíaca

ra. Sin embargo, el porcentaje de celíacos entre los familiares de primer grado de nuestra serie es al menos el doble que lo descrito en nuestro medio. Lo más llamativo es el elevado porcentaje de hermanos entre los nuevos celíacos que coincide con lo descrito en una serie italiana que hasta el momento es la más elevada de la literatura (11). Habrá que valorar si esta cifra se mantiene al aumentar el número de familiares estudiados. No obstante, en el estudio realizado por Farré y cols (10) la frecuencia de hermanos celíacos, para un número similar de individuos estudiados, es del 12%.

Todos los nuevos celíacos encontrados en el estudio de despistaje muestran el heterodímero HLA-DQ2 completo. Dada la baja frecuencia del HLA-DQ8 en los probandos es lógico pensar que en sus familiares será similar, por lo que tiene un escaso interés el efectuar su determinación.

Diabéticos

Cerca de las tres cuartas partes de los niños diabéticos portan el HLA característico de la enfermedad celíaca. Esta cifra se encuentra en el rango más elevado de la literatura y contrasta llamativamente con su frecuencia en la población general.

En nuestra serie el 10,1% de los diabéticos presentaron serología positiva y biopsia intestinal compatible con EC, por lo que la frecuencia de EC en nuestros niños diabéticos está por encima de lo habitualmente descrito en la literatura. Todos los niños con ambas enfermedades, excepto dos, portaban el heterodímero HLA-DQ2 completo.

Es sabido que la importancia clínica de la tipificación del HLA como instrumento en el despistaje de la EC depende de la frecuencia de la EC y de la frecuencia de los haplotipos de susceptibilidad en la población a estudio y del porcentaje de celíacos que no tienen estas moléculas específicas del HLA. Dos estudios recientes valoran la determinación de los HLA-DQ2 y DQ8 en niños diabéticos como primer paso en el despistaje de EC llegando a resultados

opuestos (19, 20). En el estudio de Sumnik y cols el porcentaje de los haplotipos de riesgo era significativamente superior en los diabéticos con enfermedad celíaca que en los niños diabéticos no celíacos mientras que en el de Contreas y cols no encontraban esta diferencia. Por tanto estos últimos autores concluyen que la tipificación de los HLA de riesgo en esta población es de limitada utilidad y de mayor costo que si se utilizan exclusivamente los métodos serológicos seriados como método de despistaje.

En el caso de nuestros niños diabéticos, aunque es indiscutible el elevado valor predictivo negativo de la determinación del HLA-DQ2, la elevada frecuencia global de este HLA en esta población hace que no exista diferencia significativa en los porcentajes de los haplotipos de riesgo entre diabéticos con y sin enfermedad celíaca. Al igual que en el estudio de Contreas y cols, se pondría en entredicho la eficacia de la tipificación del HLA como primer paso en el despistaje de EC en niños diabéticos pues sólo en una cuarta parte podría descartarse el desarrollo de la EC. En el resto de los diabéticos debe continuarse con el despistaje serológico periódico.

Pacientes con sospecha de enfermedad celíaca pero con diagnóstico dudoso

En este grupo se consideran pacientes con diversos síntomas que pueden ser expresión de una EC. Todos aquellos capaces de producir anticuerpos antiendomiso, con o sin negativización posterior en el seguimiento, eran HLA-DQ2 positivos. Por tanto, resulta de poca utilidad su determinación en pacientes con dicho tipo de anticuerpos. Sin embargo, en los casos de déficit de IgA, en los que es necesaria la utilización de otros anticuerpos, como los antigliadina y antitransglutaminasa IgG, pueden ser de utilidad pues no todos los pacientes son HLA-DQ2 positivos.

En el resto de niños, la negatividad del HLA-DQ2 fue de utilidad clínica pues dio peso al diagnóstico de exclusión de la EC, no siendo necesaria la repetición periódica del estudio serológico.

Cilleruelo M^a L., Jiménez J.,
Román E., et al.

Estudio coste-efectividad de la aplicación
del diagnóstico genético en la valoración de
la enfermedad celíaca

Bibliografía/References

BIBLIOGRAFÍA

1. Sollid L, Lundin K. Coeliac disease: An inappropriate immune response. *Lancet*. 2001; 358: S13.
2. Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease-active, silent, latent, potential. *Gut*. 1993; 34: 150-151.
3. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*. 2001; 120: 636-651.
4. Marsh M N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('Celiac Sprue'). *Gastroenterology*. 1992; 102: 330-354.
5. Sollid L M, Markusen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ a/b heterodimer. *J Exp Med*. 1989; 169: 345-350.
6. Sollid L M, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology*. 1993; 105: 910-912.
7. Karell K, Louka A S, Moodie S J, Ascher H, Clot F, Greco L 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; 64: 469-477.
8. Mäki M, Holm K, Lisanen V, Hällström O, Viander M, Collin P et al. Serological markers and HLA genes among healthy first-degree relatives of patients with coeliac disease. *The Lancet*. 1991; 338: 1350-1353.
9. Vitoria J C, Arrieta A, Astigarraga I, Diaz-Masdevall D, Rodríguez-Soriano J. Use of serological markers as a screening test in family members of patients with celiac disease. *J Ped Gastroenterol Nutr*. 2004; 39: 304-309.
10. Farré C, Humbert P, Vilar P, Varea V, Aldeguer X, Carnicer J et al. Serological markers and HLA-DQ2 haplotype among first-degree relatives of celiac patients. *Dig Dis Sci*. 1999; 2344-2349.
11. Bonamico M, Mariano P, Mazzilli M C, Triglione P, Lionetti P, Ferrante P et al. Frequency and clinical pattern of celiac disease among siblings of celiac children. *J Ped Gastroenterol Nutr*. 1996; 23: 159-163.
12. Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M et al. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*. 2002; 50: 624-628.
13. Meeuwisse G W. Diagnostic criteria in coeliac disease. *Acta Paediatr Scand*. 1970; 59: 461-3.
14. Walker-Smith J A, Guandalini S, Schmitz J, Shmerling D H, Visakorpi J K. Revised criteria for the diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of ESPGAN. *Arch Dis J*. 1990; 65: 909-11.
15. Olerup O, Aldener A, Fogdell A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens*. 1993; 41: 119-134.
16. Polvi A, Arranz E, Fernández-Arquero M, Collin P, Maki M, Sanz A et al. HLA-DQ2-Negative celiac disease in Finland and Spain. *Hum Immunol*. 1998; 59: 169-175.
17. Zubillaga P, Vidales M C, Zubillaga I, Ormaechea V, García-Urkía N, Vitoria J C. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genetic markers and clinical presentation in celiac disease. *J Ped Gastroenterol Nutr*. 2002; 34: 548-554.
18. Peña-Quintana L, Torres-Galván M J, Déniz-Naranjo M C, Ortigosa-Castillo L, Ramos-Varela J C, Calvo-Hernández F et al. Assessment of the heterodimer test in the diagnosis of celiac disease in Canary Islands (Spain). *J Ped Gastroenterol Nutr*. 2003; 37: 604-608.
19. Sumník Z, Kolouskova S, Cinek O, Kotalova R, Vavrinec J, Snajderová M. HLA-DQA1*05-DQB1*0201 positivity predisposes to coeliac disease in Czech diabetic children. *Acta Paediatr*. 2000; 89: 1426-1430.
20. Contreas G, Valletta E, ULMS D, Cantón S, Pinelli L. Screening of coeliac disease in north Italian children with type 1 diabetes: limited usefulness of HLA_DQ typing. *Acta Paediatr*. 2004; 93: 628-632.