

# Haplotipos HLA de dos loci en niños celíacos. Desequilibrio de *linkage* y frecuencias haplotípicas. Estudio comparativo con una población control

M.<sup>a</sup>Y. Ruiz del Prado<sup>a</sup>, J.L. Olivares López<sup>a</sup>, A. Lázaro Almarza<sup>a</sup> y M.<sup>a</sup>P. Lasierra Díaz<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Pediatría. <sup>b</sup>Departamento de Microbiología.  
Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Zaragoza.

(An Esp Pediatr 2001; 54: 7-12)

## Objetivo

La enfermedad celíaca está estrechamente relacionada con ciertos antígenos HLA. El objetivo de este estudio es valorar el desequilibrio de *linkage* existente entre los diferentes antígenos y las frecuencias de los haplotipos de dos loci: *HLA A/B, A/C, A/DR, A/DQ; HLA B/C, B/DR, B/DQ; HLA C/DR, C/DQ* y *HLA DR/DQ*, en niños con enfermedad celíaca y en población control de la misma zona geográfica.

## Pacientes y métodos

Se han determinado y comparado el valor del desequilibrio de *linkage* y frecuencias de los haplotipos de dos loci en 38 niños celíacos, de edades comprendidas al diagnóstico entre 5 meses y 18 años y en la población control de la misma región geográfica (Aragón, región del noreste de España). Para su estudio se ha utilizado la técnica de microlinfocitotoxicidad. La frecuencia de cada haplotipo de dos loci ( $H_{ij}$ ) depende de la frecuencia génica de cada alelo ( $p_i$  y  $p_j$ ) y de un factor de corrección  $\Delta$ , según la fórmula:  $H_{ij} = \Delta_{ij} + (p_i \times p_j)$ .

La estimación de la asociación entre gametos se ha determinado mediante tablas de contingencia  $2 \times 2$ , realizadas independientemente para cada una de las combinaciones fenotípicas entre especificidades de dos loci diferentes.

## Resultados

En los enfermos celíacos, los haplotipos más frecuentes y significativos son: *A1/B8, A9/B5, A19/B12, A28/B22, A28/Cw1, A9/DQ3, B8/Cw7, B18/Cw5, B22/Cw1, B5/DR5, B8/DR3, B12/DR7, B5/DQ3, DR3/DQ2, DR4/DQ8 (3) y DR5/DQ3*. Entre los haplotipos *A/DR* no se ha encontrado ninguno significativo. Los haplotipos *B18/Cw7, B12/DR3, Cw4/DR3* y *DR3/DQ3* tienen un desequilibrio de *linkage* negativo estadísticamente significativo.

## Conclusiones

Del estudio comparativo entre niños celíacos y población se concluye que las asociaciones de los haplotipos *A1/B8, A19/B12, B8/DR3, B12/DR7* y *DR3/DQ2* son significativamente más frecuentes en los celíacos que en la población control y su presencia puede predisponer al padecimiento de dicha enfermedad.

## Palabras clave:

*Enfermedad celíaca. Sistema HLA. Desequilibrio de linkage. Frecuencia haplotípica.*

## TWO LOCI HLA HAPLOTYPES IN CELIAC CHILDREN AND HEALTHY SUBJECTS. ESTIMATE OF LINKAGE DISEQUILIBRIUM PARAMETERS AND HAPLOTYPE FREQUENCIES

### Objective

Celiac disease is closely correlated with certain human lymphocyte antigen (HLA) alleles. The aim of this study was to compare linkage disequilibrium parameters and the frequencies of the two loci haplotypes: *HLA A/B, A/C, A/DR, A/DQ; HLA B/C, B/DR, B/DQ; HLA C/DR, C/DQ* and *HLA DR/DQ* in children with celiac disease and in a control population within the same geographical area.

### Methods

Thirty-eight children with celiac disease, aged 5 months to 18 years at diagnosis, were HLA typed by microlymphocytotoxicity assay using T- and B-cells separated by monoclonal antibody-labeled immunomagnetic particles. The frequency of each haplotype of two loci ( $H_{ij}$ ) depends on the frequency of each allele ( $p_i$  and  $p_j$ ) and on a correction factor delta, according to the formula:  $H_{ij} = \Delta_{ij} + (p_i \times p_j)$ .

**Correspondencia:** Dra. M.<sup>a</sup>Y. Ruiz del Prado.  
Jorge Vigón, 42, 4.º dcha. 26003 Logroño.  
Correo electrónico: med024347@nacom.es

Recibido en octubre de 2000.  
Aceptado para su publicación en noviembre de 2000.

sequilibrium, was assessed by a chi-square test using 2 × 2 contingency tables for gametic association.

## Results

Among children with celiac disease the most frequent and significant haplotypes were *A1/B8*, *A9/B5*, *A19/B12*, *A28/B22*, *A28/Cw1*, *A9/DQ3*, *B8/Cw7*, *B18/Cw5*, *B22/Cw1*, *B5/DR5*, *B8/DR3*, *B12/DR7*, *B5/DQ3*, *DR3/DQ2*, *DR4/DQ8* (3) and *DR5/DQ3*, showing a positive linkage disequilibrium. Negative linkage disequilibrium was found between *B18/Cw7*, *B12/DR3*, *Cw4/DR3* and *DR3/DQ3*.

## Conclusions

Our findings show that the frequency of *A1/B8*, *A19/B12*, *B8/DR3*, *B12/DR7* and *DR3/DQ2* haplotypes is higher in children with celiac disease than in the control population and suggest that these two *loci* haplotypes confer susceptibility to celiac disease.

## Key words:

*Celiac disease. Human lymphocyte antigen system. Haplotype frequency. Linkage disequilibrium.*

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad celíaca es un claro ejemplo de interacción entre factores genéticos y ambientales. Se acepta que la susceptibilidad a presentarla está asociada a los genes de clase II del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC), en particular con los *HLA DR3*, *DR7* y *DQ2*<sup>1-3</sup>. En las poblaciones estudiadas, cerca del 95%, presentan la especificidad *DQ2*<sup>4-8</sup>. El *DR3* y *DR7* se asocian, en desequilibrio de *linkage* con *DQ2*<sup>9-11</sup>. Un incremento de los *HLA DR5* y *DR7* en heterocigosis, *DR5/DR7*, se observa en los celíacos de la zona mediterránea, pero no en otras poblaciones caucásicas<sup>6,7,12-15</sup>. La alta susceptibilidad a padecer la enfermedad celíaca, viene dada por los genes *DQA1\*0501* y *DQB1\*0201* presentes en *DQ2*<sup>11,16,17</sup>.

Para caracterizar los alelos de clase II en una población celíaca española, se han estudiado las frecuencias y desequilibrio de *linkage* en los haplotipos HLA de dos *loci*, y comparado con la población normal de la misma zona geográfica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han estudiado 38 niños con enfermedad celíaca en el departamento de pediatría del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza (Aragón). Las edades

estaban comprendidas entre 5 meses y 18 años. El grupo control está constituido por 895 individuos sanos pertenecientes a la población aragonesa, estudiados genéticamente en el Laboratorio de Inmunología del mismo hospital y referenciadas por Vallés et al<sup>18</sup> en 1995.

La técnica utilizada para la tipificación de estos antígenos ha sido la de microlinfocitotoxicidad de Lea et al<sup>19</sup>, descrita en 1985 a partir de las técnicas de Gorer y O'Gorman<sup>20</sup> y Terasaki y Mc Clelland<sup>21</sup>. Consiste en la separación de células T y B utilizando partículas inmunomagnéticas (IMB) marcadas con anticuerpos monoclonales específicos que permiten obtener el tipaje de los antígenos de clase I y II. En todos los pacientes se han determinado los antígenos pertenecientes a los *loci HLA A, B, C, DR* y *DQ*. Las especificidades se han tipificado según la nomenclatura actual<sup>22</sup>.

En ambas poblaciones se han determinado y comparado los haplotipos de dos *loci* en desequilibrio de *linkage* (delta) y las frecuencias haplotípicas. Se acepta que cuando dos o más genes se sitúan en el mismo cromosoma, si existe una relación de proximidad entre sus *loci*, se muestra entre ellos un ligamiento o *linkage*, realizándose su transmisión de forma conjunta. La frecuencia del haplotipo formado depende de ese parámetro de desequilibrio de *linkage* llamado delta ( $\Delta$ ).

La estimación de la asociación entre gametos se ha determinado mediante tablas de contingencia 2 × 2, realizadas independientemente para cada una de las combinaciones fenotípicas entre especificidades de dos *loci* diferentes. Considerando un sistema genético compuesto por dos *loci* y dos alelos i y j, cuya frecuencia es respectivamente  $p_i$  y  $p_j$ , la frecuencia del haplotipo, resultante del *linkage* en el mismo cromosoma de un alelo i de un primer *locus* y de un alelo j de un segundo *locus*, es  $X_{ij}$ .

La tabla de contingencia para probar la asociación gamética, según Mattiuz et al<sup>23</sup> toma la forma expresada en la tabla 1. En ella se indica la presencia o ausencia de especificidades y las posibles combinaciones. Las frecuencias génicas se determinan según la fórmula de Bernstein<sup>24</sup>:

$$p = 1 - \sqrt{1 - f}$$

Donde  $f$  es la frecuencia fenotípica de cada antígeno y depende del número de pacientes que lo poseen ( $n$ ) y del número total de individuos estudiados ( $N$ ):

$$f = n/N$$

Según Svejgaard<sup>25</sup>, si no existe asociación alguna entre los genes i y j, la frecuencia ( $H_{ij}$ ) de que aparezcan unidos en el mismo cromosoma será equivalente al producto de sus respectivas frecuencias génicas, es decir:

$$H_{ij} = p_i \times p_j$$

TABLA 1. Asociación gamética (tabla 2 × 2)

	Primera serie		Frecuencia
	i +	i -	
Segunda serie			
j +	$X_{ij}$	$p_i - X_{ij}$	$p_i$
j -	$p_i - X_{ij}$	$1 - p_i - p_j + X_{ij}$	$1 - p_j$
Frecuencia	$p_i$	$1 - p_i$	1

tencia de un desequilibrio de *linkage* entre ambos genes, desviándose la frecuencia del haplotipo, del producto  $p_i \times p_j$  esperado. Esta desviación viene expresada por el parámetro de desequilibrio de *linkage*, conocido como valor delta ( $\Delta$ ), de tal modo que:

$$H_{ij} = \Delta_{ij} + (p_i \times p_j)$$

La cuantificación de este parámetro se ha obtenido mediante la fórmula de Ceppellini<sup>26</sup>:

$$\Delta = \sqrt{d/n} - \sqrt{(b+d)/n \times (c+d)/n}$$

partiendo de la misma tabla 2 x 2 utilizada para determinar la asociación entre genes i y j, correspondiendo por tanto, los valores a, b, c, y d, a las respectivas frecuencias de los fenotipos (+ +), (- +), (+ -) y (- -) (tabla 2).

El contraste de hipótesis, determinado entre la hipótesis nula ( $H_0: H_{ij} = p_i \times p_j$ ) contra la hipótesis alternativa de la existencia de desequilibrio de *linkage* ( $H_1: \Delta \neq 0$ ) ha sido examinado a partir de un test de ji cuadrado ( $\chi^2$ ). El valor del estadístico  $\chi^2$  se ha modificado mediante la corrección de Yates. Con valores esperados inferiores a cinco se ha utilizado el test de Fisher. La probabilidad de rechazo de la hipótesis nula ha sido fijada en un nivel de significación estadística de  $p < 0,05$ , que para un grado de libertad de uno corresponde a un valor crítico en la distribución  $\chi^2$  de 3,841. El parámetro de desequilibrio de *linkage* o valor delta ( $\Delta$ ) se ha calculado en todas

Locus	Locus 1 (+)	Locus 1 (-)	n
Locus 2 (+)	a (+ +)	b (- +)	a + b
Locus 2 (-)	c (+ -)	d (- -)	c + d
	a + c	b + d	N

n = número total de casos.

aquellas asociaciones entre alelos de dos *loci* que han obtenido un nivel de significación inferior a 0,05.

El estudio de las distintas asociaciones gaméticas entre los *loci* HLA se ha realizado sobre los siguientes haplotipos compuestos por fenotipos de dos *loci*: HLA A/B, A/C, A/DR, A/DQ; HLA B/C, B/DR, B/DQ; HLA C/DR, C/DQ y HLA DR/DQ.

## RESULTADOS

En la tabla 3 se detallan los haplotipos de dos *loci* más frecuentes, desequilibrio de *linkage*  $\Delta$ , frecuencias haplotípicas y significación (p). Las frecuencias de los haplotipos muestran la incidencia con que éstos aparecen en la muestra y el grado de significación del desequilibrio en la población celíaca.

En los enfermos celíacos, los haplotipos más frecuentes y significativos son: A1/B8, A9/B5, A19/B12, A28/B22, A28/Cw1, A9/DQ3, B8/Cw7, B18/Cw5, B22/Cw1, B5/DR5, B8/DR3, B12/DR7, B5/DQ3, DR3/DQ2, DR4/DQ8(3) y

TABLA 3. Haplotipos de dos *loci* en niños con enfermedad celíaca. Frecuencia de los fenotipos (+ +), (- +), (+ -) y (- -), desequilibrio de *linkage* ( $\Delta$ ) y frecuencia haplotípica

Haplotipos de dos <i>loci</i>	(a) (+ +)	(b) (- +)	(c) (+ -)	(d) (- -)	$\Delta$	Frecuencia haplotípica	P
A1/B8	9	5	4	20	0,080873686	0,119649730	0,00478*
A9/B5	3	3	3	29	0,031483825	0,038263217	0,03870*
A19/B12	12	4	8	14	0,083299380	0,157843867	0,02497*
A28/B22	2	2	2	32	0,022926093	0,025852330	0,04746*
A28/Cw1	2	1	2	33	0,024091732	0,026270943	0,02466*
A9/DQ3	6	9	0	23	0,064057133	0,082337065	0,00181*
B8/Cw7	12	8	2	16	0,101922272	0,165919069	0,00252*
B18/Cw5	7	2	3	26	0,077285621	0,095186029	0,00029*
B18/Cw7	2	18	8	10	-0,07779883	-0,033653101	0,02652*
B22/Cw1	2	1	2	33	0,024091732	0,026270943	0,02466*
B5/DR5	4	4	2	28	0,043030160	0,052208823	0,01165*
B8/DR3	14	15	0	9	0,099902720	0,205280586	0,01429*
B12/DR3	9	20	7	2	-0,14088025	-0,01813444	0,02017*
B12/DR7	14	3	2	19	0,141470327	0,202828929	0,00001*
B5/DQ3	5	10	1	22	0,046956438	0,065236370	0,02683*
Cw4/DR3	1	28	3	6	-0,06297860	-0,035209859	0,03471*
DR3/DQ2	29	7	0	2	0,117767295	0,513357370	0,04900*
DR4/DQ3	6	9	0	23	0,064056133	0,082337065	0,00181*
DR3/DQ3	7	8	22	1	-0,21639686	-0,102429447	0,00094*

\*El test de Fisher se ha utilizado cuando las frecuencias estimadas eran menos de 5. Se consideran diferencias significativas un valor de  $p < 0,05$ .

significativo. Los haplotipos *B18/Cw7*, *B12/DR3*, *Cw4/DR3* y *DR3/DQ3* tienen un desequilibrio de *linkage* negativo, estadísticamente significativo.

Para el haplotipo *DR3/DQ2* se ha encontrado un desequilibrio de *linkage* y una frecuencia haplotípica (0,5133) positiva significativa ( $p = 0,049$ ). El haplotipo *DR4/DQ8(3)* presenta también un desequilibrio altamente significativo ( $p = 0,0002$ ). Otros haplotipos en desequilibrio positivo son *DR4/DQ3* y *DR5/DQ3*.

En la figura 1 se detallan las frecuencias de los haplotipos de dos *loci* en desequilibrio de *linkage* de los niños celíacos y controles. Los haplotipos que han mostrado diferencias significativas, entre ambas poblaciones, han sido: *A1/B8*, *A19/B12*, *B8/DR3*, *B12/DR7* y *DR3/DQ2*.

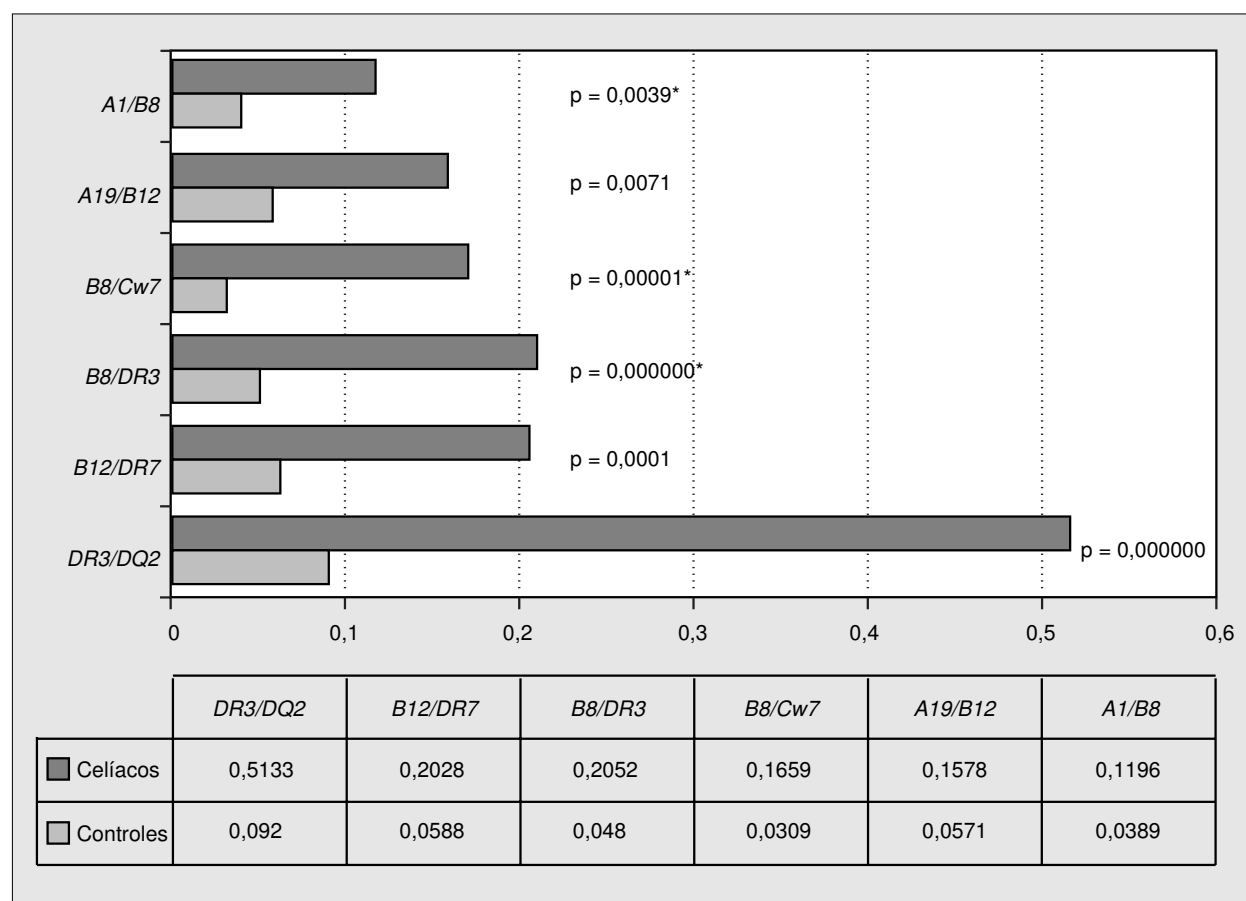
## DISCUSIÓN

Los haplotipos de dos *loci* de una población están determinados por la significación de su desequilibrio (valor de  $p$ ) y por la incidencia con que aparecen en la muestra analizada, determinada por la frecuencia haplotípica. Estas

cionan más información que las frecuencias individuales. La población control de la zona geográfica estudiada por Vallés et al<sup>18</sup> en 1995, confirman la elevada incidencia de las especificidades características de la raza caucásica. Las asociaciones más frecuentes han sido: *A1/B8*, *A1/B17*, *A2/B12*, *A25/B18*, *A26/B38*, *A29/B12*, *B35/Cw4*, *B27/Cw1*, *B40/Cw3*, *B7/DR2*, *A1/DR1*, *B35/DR1*, *B8/DR3* y *Cw7/DR2*. Así mismo, los haplotipos *A9/B35*, *A9/B21*, *A1/DR3* y *B13/DR7*, confirman el carácter mediterráneo de esta población.

En los enfermos celíacos, los haplotipos más frecuentes y significativos son: *A1/B8*, *A9/B5*, *A19/B12*, *A28/B22*, *A28/Cw1*, *A9/DQ3*, *B8/Cw7*, *B18/Cw5*, *B22/Cw1*, *B5/DR5*, *B8/DR3*, *B12/DR7*, *B5/DQ3*, *DR3/DQ2*, *DR4/DQ8(3)* y *DR5/DQ3*. Entre los *A/DR* no se ha encontrado ninguno significativo. Los haplotipos *B18/Cw7*, *B12/DR3*, *Cw4/DR3* y *DR3/DQ3* tienen un desequilibrio de *linkage* negativo, estadísticamente significativo.

El desequilibrio entre los antígenos que forman los haplotipos *A1/B8*, *A19/B12*, *B8/Cw7*, *B8/DR3*, *B12/DR7* y



**Figura 1.** Frecuencia de los haplotipos de dos loci ( $p < 0,05$ ) en niños con enfermedad celíaca y pacientes control. El desequilibrio de acoplamiento se ha comparado usando del test de ji cuadrado ( $\chi^2$ ) usando la corrección de Yates. \*El test de Fisher se ha utilizado cuando las frecuencias estimadas eran menos de 5. Se considera diferencia significativa un valor de  $p < 0,05$ .

niños con enfermedad celíaca estudiados en este trabajo, al compararlos con los controles de la misma población.

Los HLA A28/Cw1, A9/DQ3, B18/Cw5, B22/Cw1, B5/DQ3, DR5/DQ3, DR4/DQ3, DR4/DQ8 son otros haplotipos de dos *loci* identificados pero cuyas frecuencias no presentan diferencias significativas entre ambos grupos, así como tampoco las presentan los haplotipos B18Cw7, B12/DR3 y Cw4/DR3 en desequilibrio de *linkage* negativo.

La elevada incidencia del antígeno HLA A1 en la población celíaca se ha descrito previamente y puede explicarse por la existencia de desequilibrio de *linkage* con el HLA B8<sup>27</sup>, como confirman nuestros datos.

Entre los niños celíacos de este trabajo se comprueba también la asociación entre B8/DR3 como ya se ha descrito en otros trabajos<sup>2,27,28</sup>.

Algunos haplotipos como A30/DR3, B18/DR3, B12/DR7 y B13/DR7<sup>28</sup> se han relacionado también con la enfermedad celíaca pero nuestros hallazgos no pueden confirmar estos datos en los pacientes celíacos aragoneses.

Por otro lado, algunos haplotipos como B18/DR3 se han observado con frecuencia en algunas poblaciones de celíacos, como en Cerdeña<sup>29</sup> y, sin embargo, una asociación negativa con este haplotipo se ha descrito en otros trabajos<sup>2</sup>. De Marchi et al<sup>28</sup> hacen referencia a un *linkage* positivo entre Cw6 y DR7 en celíacos italianos, pero tampoco se ha confirmado este hecho entre celíacos aragoneses.

En los celíacos de este estudio, la asociación DR3/DQ2 presenta diferencias altamente significativas ( $p = 0,000000$ ) con respecto a la población control. Hechos similares han sido descritos en población celíaca italiana<sup>3,28,30</sup>, de Cerdeña<sup>29</sup> y en otros grupos de España<sup>31,32</sup> e Irlanda<sup>33</sup>. Casi un 91 % de los enfermos celíacos pueden presentar este haplotipo DR3/DQ2<sup>27-31</sup>, también es muy común encontrarlo entre familiares de primer grado de enfermos celíacos<sup>34</sup>.

Michalski et al<sup>33</sup> observaron una elevada frecuencia de DR7/DQ2 en la población celíaca, que podría deberse a un desequilibrio de *linkage* entre DQ2 y DR3 o DR7<sup>28,32</sup>. En nuestro estudio no se ha encontrado esta asociación entre DR7 y DQ2.

La existencia de un desequilibrio de *linkage* entre DR4 y DQ8 se ha observado en pacientes DQ2 negativos. La asociación entre DR4 y los genes DQA1 0301, DQB1 0302 que codifican para DQ8<sup>35,36</sup> había sido demostrada. De Marchi et al en 1979<sup>37</sup>, ya describieron este haplotipo, así como otros investigadores posteriores<sup>6,14,29,38-40</sup>.

Un hecho llamativo en la distribución de las frecuencias de los diferentes antígenos HLA, es la existencia de un sustancial desequilibrio de *linkage* entre DQ5 ( $\alpha 1$  0101,  $\beta 1$  0501) y DR1 o DR10 en la enfermedad celíaca, ya sugerida en 1996 por Grillo et al<sup>40</sup>. Pettersson et al<sup>41</sup> han confirmado la alta frecuencia de DR3/DQ2 y la

DR5/DQ7 con la enfermedad celíaca. Nuestros datos no confirman tales asociaciones.

Del estudio comparativo entre celíacos y población control de la misma región geográfica, puede concluirse afirmando que las asociaciones de los haplotipos A1/B8, A19/B12, B8/Cw7, B8/DR3, B12/DR7 y DR3/DQ2 son significativamente más frecuentes en los enfermos celíacos que en la población control y su presencia puede predisponer al presentar dicha enfermedad.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Keuning JJ, Peña AS, Van Leeuwen A, Van Hoff JP, Van Rood JJ. HLA Dw3 associated with coeliac disease. Lancet 1976; 1: 506-508.
2. Alper CA, Fleischnick E, Awdeh Z, Katz AJ, Yunis EJ. Extended major histocompatibility complex haplotypes in patients with gluten sensitive enteropathy. J Clin Invest 1987; 79: 251-256.
3. Tosi R, Vismatra D, Tanagaki N, Ferrara GB, Cicimarra F, Buffolano W et al. Evidence that coeliac disease is primarily associated with a DC *locus* allelic specificity. Clin Immunol Immunopathol 1983; 28: 395-404.
4. Sachs JA, Awad J, Mc Closkey D, Navarrete C, Festenstein H, Elliot E et al. Different HLA associated gene combinations contribute to susceptibility for coeliac disease and dermatitis herpetiformis. Gut 1986; 27: 515-520.
5. Colonna M, Mantovani V, Corazza GR, Barboni P, Gasbarrini G, Ferrara GB et al. Reassessment of HLA association with coeliac disease in special reference to the DP association. Hum Immunol 1990; 26: 263-274.
6. Morellini MS, Trabace MC, Mazzilli P, Lulli P, Capellacci S, Bonamico M et al. A study of HLA class II antigen in an italian paediatric population with coeliac disease. Dis Markers 1988; 6: 23-28.
7. Palavecino EA, Mota AH, Awad J, Derosa S, Herrera M, Chertkoff L et al. HLA and celiac disease in Argentina: Involvement of the DQ subregion. Dis Markers 1990; 8: 5-10.
8. Herrera M, Theiler G, Augustovski F, Chertkoff L, Fainboim S, De Rosa S et al. Molecular characterisation of HLA class II genes in celiac disease patients of Latin American caucasian origin. Tissue Antigens 1994; 43: 83-87.
9. Mäki M, Holm K, Lipsanen V, Hällström O, Viander M, Collin P et al. Serological markers and HLA genes among healthy first degree relatives of patients with coeliac disease. Lancet 1991; 338: 1350-1353.
10. Corazza GR, Tabacchi P, Frisoni M, Prati C, Gasbarrini G. DR and non DR Ia allotypes are associated with susceptibility to coeliac disease. Gut 1985; 26: 1210-1213.
11. Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde HG, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of coeliac disease to a particular HLA-DQ  $\alpha/\beta$  heterodimer. J Exp Med 1989; 169: 345-350.
12. Kolek A, Bartova A, Lenhart K, Albert E. HLA antigens in patient with celiac disease. Cesk Pediatr 1993; 48: 5-8.
13. Mazzilli MC, Ferrante P, Mariani P, Martone E, Petroncelli F, Triglione P et al. A study of italian paediatric celiac disease patients confirms that the primary HLA association is to the DQ ( $\alpha 1^*0501$ ,  $\beta 1^*0201$ ) heterodimer. Hum Immunol 1992; 33: 133-139.
14. Tighe MR, Hall MA, Ashkenazi A, Siegler E, Lanchbury JS, Ciclitira PJ. Celiac disease among ashkenazi jews from Israel. A study of the HLA class II alleles and their association with disease susceptibility. Hum Immunol 1993; 38: 270-276.

- Mirri P et al. Molecular analysis of HLA DQ A alleles in coeliac disease lack of unique disease associated sequence. *Clin Exp Immunol* 1991; 83: 74-78.
16. Sollid LM, Thorsby E. The primary association of celiac disease to a given HLA DQ  $\alpha/\beta$  heterodimer explain the divergent HLA DR associations observed in various caucasian population. *Tissue Antigens* 1990; 36: 136-138.
  17. Lundin KEA, Sollid LM, Qvistsstad E, Markussen G, Gjertsen HA, Ek J et al. T lymphocyte recognition of a coeliac disease associated cis or trans encoded HLA DQ  $\alpha/\beta$  heterodimer. *J Immunol* 1990; 145: 136-139.
  18. Vallés JA, Vallés V, Nieto JL, Larrad L. Antropología del sistema HLA en la población aragonesa actual: frecuencias fenotípicas, génicas y haplotipos de moléculas de clase I y II (*loci* HLA DR y HLA DQ). En: Nieto JL, Moreno L, eds. *Avances en antropología ecológica y genética*. Zaragoza: Departamento de Ciencias Morfológicas Universidad de Zaragoza, 1995; 397-404.
  19. Lea T, Vartdal F, Davies C, Ugelstad J. Magnetic monosized polymer particles for fast and specific fractionation of human mononuclear cells. *Scan J Immunol* 1985; 22: 207-216.
  20. Gorer P, O'Gorman. Citado por J. Dausset. En: Rose JB, Friedman D, eds. *Manual of clinical immunology*. Washington D.C: American Society for Microbiology, 1985; 787-789.
  21. Terasaki PI, Mc Clelland J. Microcomplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964; 204: 998-1000.
  22. Bodmer JG, Marsh SG, Albert DE, Bodmer WF, Bontrop RE, Charron D et al. Nomenclature for factors of the HLA system 1996. *Vox Sang* 1997; 73: 105-130.
  23. Mattiuz P, Ihde D, Piazza A, Ceppellini R, Bodmer WF. New approaches to the population genetic and segregation analysis of the HLA system. *Histocompatibility testing* 1970: 193-205.
  24. Bernstein F. Ergebnisse ciner biostatischen zusammen-tarsenden Betrachtung uber die Erblichen blutstruturen des Menschen. *Klin Wschr* 1924; 3: 1496-1498.
  25. Sveigaard A, Hauge M, Jersild C. The HLA system. An introductory Survey. En: *Monographs in Human Genetics*. Vol 7. Basilea: Karger, 1979; 1-112.
  26. Ceppellini R, Curtoni E, Mattiuz P. Genetics of leukocyte antigens. A family study of segregation and acoplamiento. *Histocompatibility Testing* 1967; 149-185.
  27. Peña AS, Mann DL, Hague N, Heck JA, Van Leeuwen HA, Van Rood JJ et al. Genetic basis of gluten sensitive enteropathy. *Gastroenterology* 1978; 75: 230-235.
  28. De Marchi M, Carbonara A, Ansaldi N, Santini B, Borelli I, Rossino P et al. HLA DR3 and DR7 in coeliac disease: immunogenetics and clinical aspects. *Gut* 1983; 24: 706-712.
  29. 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; 39: 78-83.
  30. Tighe MR, Hall MA, Barbado M, Cardi E, Welsh KI, Ciclitira PJ. HLA class II alleles associated with celiac disease susceptibility in a southern european population. *Tissue Antigens* 1992; 40: 90-97.
  31. Fernandez Arquero M, Clerici N, Polanco I, Escobar H, Figueredo MA, De la Concha EG. HLA DQ alleles and susceptibility to celiac disease in Spanish children. *Tissue Antigens* 1995; 45: 145-147.
  32. Fernandez Arquero M, Figueredo MA, Maluenda C, De la Concha EC. HLA Linked genes acting as additive susceptibility factors in celiac disease. *Hum Immunol* 1995; 42: 295-300.
  33. Michalski JP, McCombs CC, Arai T, Elston RC, Cao T, McCarthy CF et al. HLA DR-DQ genotypes of celiac disease patients and healthy subjects from the West of Ireland. *Tissue Antigens* 1996; 47: 127-133.
  34. Bolsover W, Hall M, Vaughan R, Welsh K, Ciclitira P. Family study confirms that the HLA DP association with coeliac disease are the result of an extended HLA DR3 haplotype. *Hum Immunol* 1991; 31: 100-108.
  35. Betuel H, Gobuhrer L, Descos L, Percebois H, Minaire Y, Bertrand S. Adult coeliac disease associated with HLA DRw3 and Dw7. *Tissue Antigens* 1980; 15: 231-239.
  36. Bugawan TL, Angelini G, Larrick J, Auricchio S, Ferrara GB, Erlich MA. A combination of a particular HLA DP  $\beta$  allele and an HLA DQ heterodimer confers susceptibility to coeliac disease. *Nature* 1989; 339: 470-473.
  37. De Marchi M, Borelli J, Olivetti E, Richardi P, Wright P, Ansaldi N et al. Two HLA DR alleles are associated with celiac disease. *Tissue Antigens* 1979; 14: 309-316.
  38. Tosi R, Tanigaki N, Polanco I, De Marchi M, Woodrow JC, Hetzel P. A radioimmunoassay typing study of non DQw2 associated coeliac disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1986; 39: 168-172.
  39. Spurkland A, Sollid LM, Polanco I, Vartdal F, Thorsby E. HLA DR and DQ genotypes of celiac patients serologically typed to be non DR3 and non DR5/7. *Hum Immunol* 1992; 35: 188-192.
  40. Grillo R, Petronzelli F, Ferrante P, Mora B, Bonamico M, Mazzilli MC. Short communication. Unusual HLA typing in coeliac disease. *Dis Markers* 1996; 13: 61-64.
  41. Pettersson A, Sjöberg K, Lernmark A, Eriksson S. HLA genotypes in celiac disease and healthy individuals carrying gliadin antibodies. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1993; 5: 445-450.