

## ORIGINAL

## Cribado de enfermedad celíaca en población infantil genéticamente seleccionada

### Screening for celiac disease in children genetically selected

Cilleruelo M L <sup>1</sup>, Jiménez J <sup>2</sup>, Fernández S <sup>1</sup>, Arranz E <sup>3</sup>, Garrote J A <sup>3</sup>, Sánchez M <sup>1</sup>, Martín del Valle F <sup>1</sup>, Rayo A <sup>1</sup>, Blanco C <sup>1</sup>, Centeno M <sup>1</sup>, Hdo de Larramendi C <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Pediatría. Hospital Severo Ochoa. <sup>2</sup> Servicio de Bioquímica. Hospital Severo Ochoa. <sup>3</sup> Laboratorio de Inmunogenética. Facultad de Medicina de Valladolid

#### Resumen

La enfermedad celíaca (EC) se desarrolla exclusivamente en individuos genéticamente predispuestos. El objetivo de este estudio prospectivo ha sido determinar la prevalencia de EC en una cohorte de niños HLA-DQ2 positivos. Para ello se realizó en primer lugar el HLA-DQ2 en sangre de cordón umbilical del recién nacido y posteriormente la EC fue confirmada mediante estudio serológico (anticuerpos antiendomiso y antitransglutaminasa). De un total de 1716 recién nacidos participaron en el estudio 1291 (75,23%) de los cuales 361 (27,97%) fueron HLA-DQ2 positivos. La prevalencia de EC en este grupo de riesgo genético fue de 9,54%.

#### Palabras clave:

Enfermedad Celíaca, HLA-DQ2, cribado.

#### Abstract

Celiac disease (CD) is developed in only genetically susceptible individuals. The aim of this prospective study is to investigate the prevalence of CD in a cohort of HLA-DQ2 positive children. Firstly, we determined the HLA-DQ2 in umbilical cord blood and subsequently CD was confirmed by the positivity of serum antiendomysial antibodies and human tissue transglutaminase antibodies. From 1716 newborns 1291 (75,23%) were selected; 361 (27,97%) were HLA-DQ2 positives. In at-risk group the prevalence of CD was 9,54%.

#### Key words:

Celiac Disease, HLA-DQ2, screening.

#### Introducción

La enfermedad celíaca (EC) es una intolerancia permanente al gluten del trigo, cebada y centeno que se desarrolla en individuos genéticamente predispuestos dando lugar a una atrofia de la mucosa del intestino delgado mediada inmunológicamente [1]. Dicha lesión da lugar a una mala utilización de los nutrientes que se manifiesta clínicamente de manera tan variable que la enfermedad puede pasar desapercibida si no se mantiene una elevada sospecha diagnóstica [2]. La exposición permanente al gluten en individuos con EC condiciona un mayor riesgo de desarrollar enferme-

dades malignas, sobre todo localizadas en el tubo digestivo, además de otras enfermedades no mortales, pero de elevada morbilidad, como son la osteoporosis, esterilidad, alteraciones neuropsiquiátricas y enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus tipo 1 [2,3]. El tratamiento consiste en la exclusión estricta del gluten de la dieta lo que da lugar a la remisión completa de la sintomatología así como la recuperación del daño de la mucosa intestinal [4].

La EC tiene una base genética. Los principales factores de riesgo se relacionan con los genes de la región HLA de clase II localizados en el brazo corto del cromosoma 6 [5] en concreto el HLA-DQ2, codificado por los genes DQA1\*0501 y DQB1\*0201, y el HLA-DQ8 codificado por los genes DQA1\*0301 y DQB1\*0302 [6,7]. Estudios epidemiológicos recientes han demostrado que aproximadamente el 90% de celíacos de diferentes áreas geográficas

#### Correspondencia

J. Jiménez Jiménez  
Hospital Severo Ochoa. Leganés. Madrid 28911  
jjimenez.hsvo@salud.madrid.org

cas presentan el heterodímero DQ2; los celíacos DQ2 negativos se dividen al 50% entre que portan el heterodímero DQ8 y los que presentan la mitad del heterodímero DQ2, siendo extraordinariamente infrecuente (menos del 0,5%) que no presenten ninguno de los heterodímeros conocidos [8,9].

La aplicación de los tests serológicos en el diagnóstico de la enfermedad han posibilitado la realización de estudios epidemiológicos que han permitido conocer la auténtica prevalencia de la enfermedad, que se sitúa en 1/100-1/300 de la población general [10-15].

En la actualidad, se considera que la mejor aproximación epidemiológica en el diagnóstico de la EC es un proceso sistemático de búsqueda de casos entre aquellos pacientes que presenten los síntomas y asociaciones características de esta enfermedad y en los familiares de primer grado [16]. Sin embargo, se comienza a discutir actualmente la necesidad de un cribado activo en la población general [17] dado que esta enfermedad cumple todos los criterios requeridos por la OMS para ser una enfermedad susceptible de cribado masivo [18].

Se ha sugerido que el tipaje de HLA como primer paso del cribado de EC en pacientes de riesgo es conveniente desde el punto de vista coste-beneficio, ya que la negatividad del HLA-DQ2 y DQ8 excluye la EC de por vida mejor que la serología. En este modelo, el estudio serológico se aplicaría sólo a los individuos HLA-DQ2 o DQ8 positivos [19].

Los estudios realizados en sangre de cordón umbilical ha posibilitado la determinación de los HLA de riesgo de enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus [20] y, en un estudio publicado recientemente, la EC [21].

El objetivo de nuestro estudio ha sido determinar la prevalencia de EC en una cohorte de niños HLA-DQ2 positivos. Para ello se realizó en primer lugar estudio genético en sangre de cordón umbilical a todos los recién nacidos y posteriormente fue confirmada la existencia de EC mediante estudio serológico.

## Material y métodos

Se trata de un estudio prospectivo en el que se incluyeron, por muestreo consecutivo no probabilístico, todos los recién nacidos en la maternidad del Hospital Severo Ochoa en el periodo comprendido entre Julio-2004 a Julio-2005. Participaron todos los recién nacidos vivos cuyos padres consintieron participar en el estudio. Se excluyeron aquellos recién nacidos con malformaciones congénitas graves incompatibles con la vida y aquellos cuya muestra de sangre fue insuficiente y no permitía la extracción adecuada de DNA.

Se utilizó la sangre que habitualmente se extrae del cordón umbilical de todos los recién nacidos para la determinación del hematocrito. Como muestra de seguridad, ante la posibilidad de fallo en la extracción del DNA, se utilizó la sangre de cordón que se emplea para la determinación del Rh y grupo sanguíneo. Las muestras de sangre se conservaron un máximo de 72 horas; durante este tiempo, los pediatras solicitaron el consentimiento a los padres indicando posteriormente al Servicio de Bioquímica que muestras debían ser estudiadas.

Se determinó la presencia de los alelos DQA1\*0501 y DQB1\*0201 mediante la técnica PCR/SSP según protocolo descrito por Olerup [22]. La extracción de DNA se realizó mediante tecnología de partículas magnéticas, BioRobot EZ1 (Izasa).

Una vez establecida la cohorte de niños HLA-DQ2 positivos se contactó telefónicamente con las familias a partir de los 2 años de edad del niño con el fin de valorar los posibles síntomas sugestivos de la EC y recabar su permiso para la realización del estudio serológico.

Para realizar el cribado se utilizó un test inmunocromatográfico determinando autoanticuerpos antitransglutaminasa tisular humana IgA/IgG/IgM (Operon-Tec-Laim S.A.). A los pacientes positivos se les efectuó una extracción de sangre venosa en la que se determinó: Inmunoglobulina A mediante nefelometría (BN II, Siemens), anticuerpos antiendomisio tipo IgA (BioSystems, Atom) y anticuerpos antitransglutaminasa tipo IgA (Celikey IgA. Immuno-Cap250 Phadia). En aquellos niños con déficit de inmunoglobulina A (valor inferior a 10 mg/dl) se efectuaron los mismos anticuerpos de clase IgG.

Se calculó el número total y porcentajes de positividad, tanto para el HLA-DQ2 como para la serología de EC, y su distribución por sexos.

## Resultados

Desde Julio de 2004 a Julio de 2005 nacieron en nuestra maternidad 1716 niños de los cuales cumplieron los criterios de inclusión 1291 (620 niñas y 671 niños) que supone un 75,23% de la población de recién nacidos.

El HLA-DQ2 fue positivo en 361 lo que supone un 27,96% de la población; 161 eran niñas y 200 niños. El HLA-DQ2 fue negativo en 930 niños; 459 niñas y 471 niños.

De los 361 niños HLA-DQ2 positivos 262 (72,57%) completaron el estudio. A estos niños se les realizó el cribado inicial de EC mediante test inmunocromatográfico siendo 26 positivos. Se confirmó la positividad mediante serología en 25 pacientes, 18 niñas (75%) y 7 niños



(25%). Esto supone un 9,54% de posibles celíacos en la población de riesgo.

De los 25 niños con serología positiva, sólo 5 presentaba una sintomatología característica de EC siendo el resto asintomáticos.

## Discusión

Se trata del primer estudio español de detección de enfermedad celíaca en población genéticamente susceptible con el fin de detectar precozmente la enfermedad.

Es de destacar el enorme interés de los padres hacia el estudio que se refleja en el alto porcentaje de participación que llegó a un 75,23% de las familias. Se trata de una importante colaboración, dado que se contaba con que un porcentaje de la población se perdería al existir fines de semana y periodos de vacación en los que fue imposible informar a las familias y pedir su inclusión en el estudio.

Es práctica habitual extraer sangre de cordón umbilical a todos los recién nacidos para valorar la situación hematológica del niño. Esta muestra es de gran interés para estudios de cribado debido a que no supone una agresión añadida al neonato. Por esta razón aprovechamos esta muestra para realizar estudio genético de la enfermedad celíaca mediante determinación de HLA-DQ2 que incluye más del 95% de la población de enfermos celíacos. En nuestra experiencia el otro HLA de riesgo asociado a EC, el HLA-DQ8, sólo se encuentra en el 1% de los niños celíacos por tanto, debido a su bajo rendimiento, se decidió no realizar su determinación basándonos en el estudio previo [23]. En nuestra población de recién nacidos el 27,96% presentan el HLA-DQ2 positivo. Este porcentaje era el esperado y es similar al encontrado en la bibliografía que llega a un máximo del 30% [6].

Una vez seleccionada esta cohorte de niños con riesgo genético se contactó nuevamente con la familia, tal y como se había indicado cuando se solicitó el consentimiento informado, a partir de los dos años de edad del niño. En este momento se considera que el rendimiento del estudio serológico es mayor, sobre todo en pacientes con escasa sintomatología. Se efectuó contacto telefónico consiguiendo localizar a 262 familias que suponen el 72,57% de la población seleccionada. Este porcentaje es elevado dada la dificultad que supone el contacto al transcurrir dos años desde el comienzo del estudio y perder una parte de la población por haber cambiado de área sanitaria.

Debido a la edad de los niños, y con el propósito de obtener la mayor participación posible, se eligió un test inmunocromatográfico rápido y poco invasivo que consistió en la determinación de anticuerpos antitransglutaminasa en una gota de sangre obtenida mediante punción del dedo

pulgar. Mediante esta determinación 26 niños tuvieron un resultado positivo. Según el diseño de nuestro estudio, en ese mismo momento, se ofertaba a la familia la posibilidad de realizar estudio serológico mediante extracción de sangre venosa.

De los 26 niños seleccionados mediante test rápido se confirmó en 25 la presencia de anticuerpos antiendomiso y antitransglutaminasa. No existió ningún paciente con déficit de IgA. La concordancia entre el test inmunocromatográfico y las pruebas serológicas fue del 96,15%.

En nuestra población seleccionada por riesgo genético hemos encontrado una prevalencia de EC de 9,54%. En el estudio de Hoffenberg y cols [21] que estima la frecuencia de EC en niños en la población general de Denver, se realiza seguimiento de 987 pacientes seleccionados por HLA de riesgo a lo largo de cinco años y encuentran una frecuencia del 2% de niños con serología positiva para la EC. Esta cifra es claramente inferior a la nuestra aunque hay que considerar que nuestros pacientes están aún en seguimiento y el porcentaje podría disminuir. No obstante nos parece altamente improbable llegar a este porcentaje ya que supondría la negativización de 20 pacientes.

De los 25 niños con serología positiva, cinco presentaban síntomas de EC clásica y el resto era silente desde el punto de vista clínico aunque analíticamente 8 presentaban ferropenia sin anemia.

En el momento actual se especula con la posibilidad de realizar cribado poblacional de EC, no obstante hay que considerar que la mayoría de nuestros pacientes están asintomáticos o tienen leves alteraciones analíticas. Por este motivo estos niños están en fase de seguimiento realizando una dieta normal para poder valorar cual es la evolución de estos pacientes lo que contribuirá al conocimiento de la historia natural de la enfermedad. ■

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sollid L, Lundin K. Coeliac disease: An inappropriate immune response. *Lancet* 2001; 358:513.
2. Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease-active, silent, latent, potential. *Gut* 1993; 34: 150-1.
3. Ventura A, Magazzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 1999; 117:297-303.
4. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001; 120:636-51.

5. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ( 'Celiac Sprue'). *Gastroenterology* 1992; 102:330-54.
6. Sollid LM, Markusen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ  $\cdot$ -, heterodimer. *J Exp Med* 1989; 169:345-50.
7. Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993; 105:910-2.
8. Karelk K, Louka AS, Moodie SJ, 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; 64:469-77.
9. 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; 59:169-75.
10. Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994; 343:200-3.
11. Meloni G, Dore A, Fanciulli G, Tanda F, Bottazzo GF. Sub-clinical coeliac disease in schoolchildren from northern Sardinia. *Lancet* 1999; 353:37.
12. Csizmadia C, Mearin ML, Von Blomberg B, Brand R, Verloove-Vanhorick P. S. An iceberg of childhood coeliac disease in the Netherlands. *Lancet* 1999; 353:813-4.
13. Riestra S, Fernández E, Rodrigo L, García S, Ocio G. Prevalence of celiac disease in the general population of Northern Spain. Strategies of serologic screening. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35:398-402.
14. Mäki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T et al. Prevalence of celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med* 2003; 348:2517-24.
15. Cilleruelo ML, Román E, Jiménez J, Rivero MJ, Barrio J, Castaño A, Campelo O, Fernández A. Enfermedad celíaca silente: explorando el iceberg en población escolar. *An Esp Pediatr* 2002; 57:321-6.
16. Hin H, Bird G, Fisher P. Coeliac disease in primary care: case finding study. *BMJ* 1999; 318:164-7.
17. Fasano A. European and North American populations should be screening for coeliac disease. *Gut* 2003; 52:168-9.
18. WHO mass screening recommendations: <http://www.who.int/en/>
19. Csizmadia CG, Mearin ML, Oren A, Kromhout A, Crusius JB, von Blomberg BM, et al. Accuracy and cost-effectiveness of a new strategy to screen for celiac disease in children with Down syndrome. *J Pediatr* 2000; 137:743-4.
20. Rewers M, Bugawan TL, Norris JM, Blair A, Beaty B, Hoffman M et al. Newborn screening for HLA markers associated with IDDM: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetologia* 1996; 39:807-12.
21. Hoffenberg EJ, MacKenzie T, Barriga KJ, Eisenbarth GS, Bao F, Haas JE et al. A prospective study of the incidence of childhood celiac disease. *J Pediatr* 2003; 143:308-14.
22. 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; 41:119-34.
23. Cilleruelo ML, Jimenez J, Román E, Bornstein B, Arranz E, Garrote JA, H. Larramendi C. Estudio coste-efectividad de la aplicación del diagnóstico genético en la valoración de la enfermedad celíaca. *Mapfre Medicina* 2006; 17:234-312.

#### Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.