

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
Departamento de Inmunotecnología y Array

**“ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD CELÍACA MEDIANTE EL
DESARROLLO DE UN ENSAYO INMUNOCROMATOGRÁFICO
PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS
ANTITRANSGLUTAMINASA”**

TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO
DE DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

Dr. JOSÉ ARMANDO GALVÁN CABRERA

La Habana
2011

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
Departamento de Inmunotecnología y Array

**“ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD CELÍACA MEDIANTE EL
DESARROLLO DE UN ENSAYO INMUNOCROMATOGRÁFICO
PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS
ANTITRANSGLUTAMINASA”**

TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO
DE DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

Autor: Dr. JOSÉ ARMANDO GALVÁN CABRERA
Tutor: Dra.C. María Elena Fernández de Cossío Dorta Duque.

La Habana
2011

Agradecimientos

*A todos aquellos compañeros que de una forma u otra han contribuido
a la realización de este trabajo.*

*A mi familia, que a pesar del momento tan difícil por el que estamos atravesando,
me ha brindado todo su apoyo.*

*Especialmente a mi **esposa** e hijos por su entrega incondicional.*



Dedicatoria

A: Fidel Castro Ruz, Manuel Limonta, Victoria Ramírez, Silvio Barcelona, Pedro López Saura, Eduardo Pentón, Angel Aguilera. Pioneros de la Biotecnología en Cuba.

La investigación de
la verdad para servir a la patria.

José Martí

El futuro de nuestra Patria
tiene que ser necesariamente
un futuro de hombres de
ciencia.

Bidebarri

SÍNTESIS

En el presente trabajo se muestran los resultados del desarrollo y la evaluación de un sistema inmunocromatográfico rápido y sencillo para la detección de anticuerpos antitransglutaminasa, que es un importante marcador serológico en el diagnóstico de la enfermedad celíaca (EC). Con este sistema se pueden detectar en una misma prueba tanto anticuerpos de tipo IgA como IgG. Se obtuvieron niveles de sensibilidad, especificidad y concordancia elevados cuando se compararon con la biopsia de yeyuno que es el estándar de oro para la EC. Además, se comprobó la superioridad del sistema desarrollado respecto a otros sistemas comerciales disponibles en el mercado internacional. El ensayo inmunocromatográfico constituye una herramienta útil para el estudio de la prevalencia de la enfermedad celíaca en grupos de riesgo para esta dolencia (pacientes con síntomas clínicos sugestivos de EC, Diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Down y tiroiditis autoinmune), así como en población sana adulta e infantil; demostrándose que esta técnica resulta de gran utilidad, principalmente en los estudios de pesquisa masivos de la enfermedad en los grupos antes mencionados. En el presente trabajo también se muestra el primer estudio de los genes HLA clase II asociados a la EC realizado en la población cubana. En el país se desconoce hasta la fecha la prevalencia de la EC, entre otras razones por no poder contar con los recursos materiales necesarios para la compra de los sistemas diagnósticos serológicos que tienen un elevado precio en el mercado internacional. Los resultados alcanzados permitieron desarrollar el sistema HebertFast Line[®] anti-transglutaminasa que es el nombre comercial con el que se denomina este sistema inmunocromatográfico producido por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Estos resultados refuerzan la necesidad y la utilidad de la introducción en nuestro país de este sistema diagnóstico como complemento para el diagnóstico de la EC.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ANTECEDENTES.....	1
1.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO	5
1.3 OBJETIVOS.....	5
1.4 NOVEDAD CIENTÍFICA	6
1.5 VALOR TEÓRICO Y PRÁCTICO	6
CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 ¿QUÉ ES LA ENFERMEDAD CELÍACA?.....	9
2.1.1 Definición	9
2.1.2 Formas de presentación de la EC.....	9
2.1.3 Sintomatología.....	10
2.2 ASOCIACIÓN DE LA EC CON OTRAS ENFERMEDADES	11
2.3 COMPLICACIONES DE LA EC.....	14
2.4 EPIDEMIOLOGÍA DE LA EC.....	15
2.5 PATOGÉNESIS DE LA EC	16
2.5.1 Bases inmunológicas de la patología	16
2.6 DIAGNÓSTICO DE LA EC.....	20
2.6.1 Diagnóstico mediante los criterios de la ESPGAN	20
2.6.2 Marcadores serológicos	22
2.6.3 Marcadores genéticos.....	29
2.7 TRATAMIENTO DE LA EC.....	30
2.8 SISTEMAS INMUNOCROMATOGRÁFICOS.....	31
2.8.1 Principio del método.....	32
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1 DESARROLLO Y EVALUACIÓN DEL ENSAYO INMUNOCROMATOGRÁFICO	35
3.2 ESTUDIO DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICAS DEL SISTEMA INMUNOCROMATOGRÁFICO.....	42
3.3 PRUEBA DEL SISTEMA INMUNOCROMATOGRÁFICO CON SANGRE, SUERO Y PLASMA	43
3.4 ESTUDIOS DE PRECISIÓN	44
3.5 ESTUDIO COMPARATIVO DEL SISTEMA INMUNOCROMATOGRÁFICO CONTRA SISTEMAS SIMILARES DE LA COMPETENCIA (CD1 ANTI-TGT Y CD1+2 ANTI-TGT Y ANTI-GLIADINA, OPERON, ESPAÑA).....	45
3.6 UTILIDAD DEL USO DEL SISTEMA INMUNOCROMATOGRÁFICO EN GRUPOS DE RIESGO Y POBLACIÓN SANA	46
3.6.1 Grupos de riesgo.....	46
3.6.1.1 Grupo de pacientes con trastornos gastrointestinales.....	46
3.6.1.2 Grupo de pacientes con trastornos gastrointestinales producto a infección por Giardia lamblia	47
3.6.1.3 Grupo de pacientes con Diabetes mellitus dependiente de insulina (DMT1).....	47
3.6.1.4 Grupo de pacientes con Síndrome de Down y pacientes con tiroiditis autoinmune.....	48
3.6.2 Población sana	49
3.6.2.1 Grupo de adultos sanos.....	49
3.6.2.2 Grupo de niños sanos.....	49
3.7 ESTUDIO DE CONCORDANCIA ENTRE EL RESULTADO SEROLÓGICO POR EL SISTEMA INMUNOCROMATOGRÁFICO Y LA BIOPSIA DE YEYUNO	49

3.8 ESTUDIO DE GENES ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD CELÍACA (HLA-DQ2 Y DQ8) EN PACIENTES CON EC Y FAMILIARES DE PRIMER GRADO	50
3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	51
CAPITULO 4. RESULTADOS.....	54
4.1 DESARROLLO DEL ENSAYO INMUNOCROMATOGRÁFICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI TGT (AATGT)	54
4.2 ESTUDIO DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICAS DEL SISTEMA INMUNOCROMATOGRÁFICO.....	59
4.3 PRUEBA DEL SISTEMA INMUNOCROMATOGRÁFICO CON SANGRE, SUERO Y PLASMA	60
4.4 ESTUDIOS DE PRECISIÓN	61
4.5 ESTUDIO COMPARATIVO DEL SISTEMA INMUNOCROMATOGRÁFICO CONTRA SISTEMAS SIMILARES DE LA COMPETENCIA (CD1 ANTI-TGT Y CD1+2 ANTI-TGT Y ANTI-GLIADINA, OPERON, ESPAÑA).....	61
4.6 UTILIDAD DEL USO DEL SISTEMA INMUNOCROMATOGRÁFICO EN GRUPOS DE RIESGO Y POBLACIÓN SANA	63
4.6.1 GRUPOS DE RIESGO.....	63
4.6.1.1 Grupo de pacientes con trastornos gastrointestinales.....	63
4.6.1.2 Grupo de pacientes con giardiasis.....	63
4.6.1.3 Grupo de pacientes con Diabetes mellitus dependiente de insulina (DMT1).....	64
4.6.1.4 Grupo de pacientes con Síndrome de Down y pacientes con tiroiditis autoinmune.....	65
4.6.2 POBLACIÓN SANA	65
4.6.2.1 Grupo de adultos sanos	65
4.6.2.2 Grupo de niños sanos.....	65
4.7 ESTUDIOS DE CONCORDANCIA ENTRE RESULTADO SEROLÓGICO POR EL SISTEMA INMUNOCROMATOGRÁFICO Y LA BIOPSIA DE YEYUNO	66
4.8 ESTUDIO DE GENES ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD CELÍACA (HLA-DQ2 Y DQ8) EN PACIENTES CON EC Y FAMILIARES DE PRIMER GRADO	66
4.8.1 Asociación del HLA-DQ2 y anticuerpos antitransglutaminasa (AATGt).....	68
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN.....	69
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....	89
CAPÍTULO 7. RECOMENDACIONES	90
CAPÍTULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXOS:.....	117

GLOSARIO

AAE: Anticuerpos antiendomiso

AAG: Anticuerpos antigliadina

AAR: Anticuerpos antireticulina

AATGt: Anticuerpos antitransglutaminasa

ACC: Academia de Ciencias de Cuba

ARNm: Acido ribonucleico mensajero

CD1: Test inmunocromatográfico en un solo paso para la detección de anticuerpos anti-transglutaminasa tisular humana en suero (OPERON S.A. España).

CD1+2: Test inmunocromatográfico en un solo paso para la detección de anticuerpos de tipo IgA antigliadina y antitransglutaminasa tisular humana en suero (OPERON S.A. España).

CECMED: Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos

CIGB: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

CIGBSS: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus

CN: Control negativo

CPD: Control positivo débil

CPF: Control positivo fuerte

CPM: Control positivo medio.

CTL: Linfocitos T citotóxicos.

DLG: Dieta libre de gluten.

DMT1: Diabetes mellitus tipo 1 (Diabetes mellitus dependiente de insulina).

DQA1*03 y DQB1*0302: Alelos del HLA-DQ8.

DQA1*0501 y DQB1*02: Alelos del HLA-DQ2.

EC: Enfermedad celíaca.

ELISA: Ensayo inmunoenzimático, (siglas del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

ESPGAN: Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica (siglas del inglés *European Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition*).

HLA: Antígenos leucocitarios de humanos, (siglas del inglés *Human Leucocyte Antigen*).

HLA-DQ2, HLA-DQ8: Antígenos leucocitarios de humanos asociados a la enfermedad celíaca.

IC: Intervalo de confianza.

IFN: Interferón

IgA: Inmunoglobulina A.

IgG: Inmunoglobulina G.

IL: Interleucina

LIEs: Linfocitos intraepiteliales

MINSAP: Ministerio de Salud Pública.

MMP: Metaloproteinasas

NC: Nitrocelulosa.

pb: Pares de base.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, (siglas del inglés *Polymerase Chain Reaction*)

PEP: Prolil-endopeptidasa.

RP: Razón de probabilidad

TGF β : Factor de crecimiento transformante beta (siglas del inglés *Transforming growth*)

TGt: Transglutaminasa tisular

Th: Células T cooperadoras, (siglas del inglés *T helper*).

TNF: Factor de necrosis tumoral (siglas del inglés *Tumor necrosis factor*).

VPN: Valor predictivo negativo

VPP: Valor predictivo positivo

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Antecedentes

La enfermedad celíaca (EC), es una intolerancia permanente al gluten, principal proteína de reserva presente en el trigo, la cebada y el centeno. En individuos genéticamente predispuestos ocasiona una lesión inflamatoria del intestino delgado con la consiguiente mala absorción de los macro y micro nutrientes (Sollid, 2002). Es la única enfermedad autoinmune de la que se conoce el agente externo que la desencadena (la gliadina), el autoantígeno (la transglutaminasa tisular), el cual modifica y potencia la acción del agente externo (Dieterich y otros, 1997) y para la que se ha descrito una predisposición genética importante asociada a los antígenos de leucocitos humanos HLA-DQ2 o HLA-DQ8. Aproximadamente el 90% de los pacientes celíacos son portadores del HLA-DQ2, y la mayoría de los restantes llevan el heterodímero HLA-DQ8 (Karell y otros, 2003; Kaukinen y otros, 2002).

Hasta el inicio de este siglo la prevalencia descrita de la EC no era muy elevada debido a que el diagnóstico se basaba en la sintomatología típica asociada. Sin embargo, tras la introducción del pesquiasaje serológico, esta enfermedad ha pasado a ser común en la población llegando a alcanzar una prevalencia estimada de uno por 100 individuos (Hill y otros, 2005). A pesar de ello, la EC sigue estando infradiagnosticada, y por ello se habla del “*iceberg*” celíaco, en el que los enfermos no detectados son considerados la porción sumergida del *iceberg* (Catassi y otros, 1994).

La EC es clínicamente muy heterogénea, comprende tanto pacientes asintomáticos como enfermos con una sintomatología muy severa (Green, 2005). Además, pueden aparecer síntomas intestinales o extraintestinales. Una minoría de los enfermos, principalmente niños, debuta con una clínica típica intestinal, que consiste en malabsorción, diarrea crónica y distensión abdominal (Bottaro y otros, 1999; Catassi y otros, 1994). Sin embargo, de forma más frecuente aparecen signos inespecíficos

como anemia, retraso pondero-estatural, pérdida de peso, osteoporosis o síntomas neurológicos (Bottaro y otros, 1999).

Aunque las formas silentes y latentes son las que debutan sin sintomatología aparente, pueden llegar a ser las formas más graves, puesto que pueden desarrollarse complicaciones severas que se podrían solucionar con una dieta libre de gluten (Schuppan y otros, 2009; Case, 2005). A su vez pueden desarrollarse linfomas intestinales u otros cánceres, como el linfoma de células T no-Hodgkin, muy asociado a la EC (Catassi y otros, 2005a). El cumplimiento de esta dieta reduce el costo de atención de salud y mejora la calidad de vida de los pacientes con EC (Bongiovanni y otros, 2010) y además, disminuye el riesgo de complicaciones asociadas (Catassi y otros, 2005a).

Existen individuos con determinadas patologías que tienen una mayor probabilidad de padecer EC, considerados por tanto grupos de riesgo, como individuos con deficiencia selectiva de IgA, Diabetes mellitus tipo I, síndrome de Down, dermatitis herpetiforme y tiroiditis autoinmunes, entre otras (Dubé y otros, 2005)

El diagnóstico confirmatorio de la EC se realiza mediante biopsia intestinal (Walker-Smith y otros, 1990). En el informe de la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición (ESPGAN) de 1990 relativo al diagnóstico de la EC, se concedió gran valor a los resultados obtenidos con los marcadores serológicos (Walker-Smith y otros, 1990). Está bien documentado el valor de estos marcadores como apoyo del diagnóstico de la EC (Fasano y otros, 2008). Su empleo permitió la realización del diagnóstico sobre la base de una única biopsia intestinal, aunque no se aconseja que se usen de forma exclusiva (Rostom y otros, 2005). Por ello a los pacientes con sintomatología típica o a aquellos pertenecientes a grupos de riesgo, se les realizan test de detección de marcadores serológicos como paso previo para la realización de la biopsia.

Si bien las pruebas basadas en la medida de anticuerpos antigliadina (AAG) han sido durante mucho tiempo los ensayos más utilizados en la pesquisa de EC (Troncone y otros, 1991), tienen el inconveniente que este marcador también aparece en individuos sanos y en una variedad de desórdenes como esofagitis, gastritis, gastroenteritis, enfermedad inflamatoria del intestino, intolerancia a la lactosa (Uibo y otros, 1993) y giardiasis (Rastogi y otros, 1999). Lo más recomendado es la valoración mediante ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) de los niveles de IgA antitransglutaminasa y por inmuno fluorescencia indirecta confirmar la positividad con la detección de anticuerpos IgA antiendomiso (AAE-IgA) (Rostom y otros, 2005; Lagerqvist y otros, 2001; Sardy y otros, 1999; Dieterich y otros, 1998). También se cuantifican los niveles de IgA sérica total para descartar falsos negativos en pacientes deficientes en esta inmunoglobulina, en cuyo caso se les miden los niveles de AATGt-IgG y AAE-IgG. Aunque estos sistemas han demostrado una adecuada sensibilidad y especificidad, requieren de sofisticados equipos de laboratorio no siempre disponibles, de un personal altamente calificado para su realización, consumen tiempo y por lo general tienen un alto costo en el mercado internacional (Catassi y otros, 2005; Rostom y otros, 2005).

A finales de la década del 80 del siglo pasado, comenzó el uso a escala comercial de las membranas de nitrato de celulosa en pruebas inmunocromatográficas de flujo lateral y flujo continuo, comúnmente llamadas pruebas rápidas. En un inicio estuvieron basadas en la inmovilización de anticuerpos (Rosenstein y otros, 1989; Campbel y otros, 1987) pero actualmente también se inmovilizan antígenos. Esta metodología para inmunodiagnóstico tiene como ventajas la sencillez y rapidez del sistema, no requiere de equipamiento ni de personal especializado y se puede implementar a cualquier nivel de la atención médica.

En Cuba a partir la década de los 80 la EC se diagnosticaba mediante sospecha clínica y biopsia intestinal. Estos estudios incluyeron varias decenas de pacientes, fundamentalmente niños y familiares de primer grado de pacientes con EC (Rabasa y otros, 1981; Sagaró y otros, 1981; Rabasa y otros, 1980). Es de destacar que en Cuba no existen estudios de la prevalencia de la EC ni en grupos de riesgo y ni en la población sana. Actualmente, el diagnóstico se realiza por los síntomas clínicos y la determinación de anticuerpos antigliadina y cuando estos resultan positivos, se confirman con la biopsia.

Como hemos mencionado, dada la baja especificidad de los AAG (Hill, 2005; Rostom y otros 2005; Uibo y otros, 1993) se les realiza innecesariamente la biopsia intestinal a un número elevado de pacientes. Debido a esto se hacen impracticables los estudios poblacionales, por lo que se desconoce hasta el momento la prevalencia de la EC en nuestro país. A lo que se adiciona el alto precio que tienen en el mercado internacional los ensayos basados en la determinación de anticuerpos antitransglutaminasa, que si bien son muy específicos e ideales para este tipo de estudio, resultan muy caros.

Con todos estos antecedentes y aprovechando la experiencia acumulada por nuestro grupo en el desarrollo de sistemas de flujo lateral tales como el inmunoanálisis para la detección de Troponina I cardiaca (Mainet y otros, 2004) y los sistemas Heberfast Line[®] Embarazo (Torres y otros, 1998), Heberfast Line[®] Rotavirus, Heberfast Line[®] Gavac, nos propusimos desarrollar un sistema inmunocromatográfico en un solo paso para la detección de anticuerpos antitransglutaminasa en sangre, suero y plasma, cuya prueba de concepto había sido probada previamente solo en suero y plasma (Sorell y otros, 2002).

1.2 Hipótesis de trabajo

Sobre la base de los elementos anteriormente expuestos, se definió la siguiente **hipótesis de este trabajo**: “Es posible desarrollar la determinación de anticuerpos antitransglutaminasa en sangre, suero y plasma mediante un ensayo inmunocromatográfico en un solo paso; lo que permitirá mejorar el diagnóstico y la investigación de la enfermedad celiaca en nuestro país”.

1.3 Objetivos

General

Contribuir al diagnóstico y la investigación de la enfermedad celíaca en Cuba mediante la introducción de un sistema de producción nacional de tipo inmunocromatográfico para la determinación de anticuerpos antitransglutaminasa.

Específicos

1. Desarrollar un sistema inmunocromatográfico en un solo paso para la detección de anticuerpos antitransglutaminasa en sangre, suero o plasma humano.
2. Determinar la utilidad del sistema inmunocromatográfico en la pesquisa de la enfermedad celiaca en grupos de riesgo tales como: pacientes que acuden a consulta de gastroenterología, Diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Down y tiroiditis autoinmune.
3. Determinar la utilidad del sistema inmunocromatográfico en la pesquisa de la enfermedad celiaca en población adulta e infantil aparentemente sana.
4. Evaluar la utilidad del genotipaje HLA como parte del proceso de diagnóstico de la enfermedad celiaca mediante el análisis de la presencia de los marcadores HLA-DQ2 y HLA-DQ8 en pacientes diagnosticados con esta enfermedad y sus familiares de primer grado.

1.4 Novedad científica

En este trabajo se desarrolló y se puso a punto el sistema inmunocromatográfico HeberFast Line[®] anti-transglutaminasa que permite la detección de anticuerpos anti-transglutaminasa IgA e IgG en suero, plasma y sangre, que resulta muy útil para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad celíaca (EC). También se muestran estudios realizados por primera vez en Cuba que aportan nuevos conocimientos y evidencias del comportamiento de la enfermedad celíaca en cuanto a prevalencia y a susceptibilidad genética en la población cubana.

El sistema está protegido por patente en Cuba (Sorell y otros, 2004), la Comunidad Económica Europea (Sorell y otros, 2006), E.U.A (Sorell y otros, 2005), México, Canadá, Rusia y Argentina, y tiene Registro Sanitario en Cuba aprobado por el Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED) en el año 2007.

1.5 Valor teórico y práctico

El sistema inmunocromatográfico HeberFast Line[®] anti-transglutaminasa resulta novedoso con relación a los que existen actualmente en el mercado internacional para estos fines, que por lo general son de tipo ELISA que consumen mucho más tiempo y requieren de dos ensayos independientes para la detección de anticuerpos de clase IgA e IgG. Mientras que el sistema HeberFast Line[®] anti-transglutaminasa es fácil de realizar, no requiere de equipamiento de laboratorio para la interpretación de los resultados, ni de personal especializado para su realización. Debido a estas características este sistema puede ser utilizado en laboratorios con recursos mínimos e incluso en áreas de atención primaria de salud, lo que lo hace muy útil para estudios poblacionales y de grupos de riesgo de la enfermedad. Desde el punto de vista de su impacto social, el hecho de poder contar con esta metodología significa una ayuda inestimable para el médico que atiende a estos pacientes pues le permite, no sólo contar con un método útil para el diagnóstico de la EC, sino

también disponer de un continuo monitoreo de los mismos y así tomar oportunas medidas correctoras sin tener que acudir a la biopsia intestinal, prueba cruenta y no exenta de complicaciones.

No menos importante resulta el hecho de que la biopsia intestinal se ha visto limitada en nuestro país en los últimos años por no disponerse de la cantidad suficiente de cápsulas que se requieren para ello, ya que tienen un elevado precio en el mercado internacional (aproximadamente 500 USD por unidad), lo que implica demoras en la realización de la prueba y la necesidad de tener que mantener ingresado al paciente días antes y después de realizado el procedimiento.

Con el sistema HeberFast Line[®] anti-transglutaminasa se pueden reducir en más de un 30% los estudios por biopsia de yeyuno que se realizan en los Servicios de Gastroenterología de nuestro país, con el significativo ahorro económico por concepto de recursos y el costo de ingreso del paciente.

Con ello se evita la ejecución de la biopsia en aquellos que en la práctica pueden resultar dudosos.

Por la alta especificidad del estudio serológico de anticuerpos anti-transglutaminasa (AATGt) en caso de un resultado positivo se puede proceder con la confirmación por biopsia, con una baja probabilidad de equivocación. En estos momentos ya se encuentra introducido este diagnosticador en todos los Servicios Provinciales de Gastroenterología Pediátrica del país.

Esta tesis consta de once partes: título; síntesis; sumario; los capítulos de Introducción, Revisión Bibliográfica, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión; Conclusiones, Recomendaciones, las Referencias Bibliográficas y los Anexos.

Los resultados que en ella se exponen se han presentado en 17 eventos científicos y nueve publicaciones; han sido premiados como Mención Provincial XII Expo Forjadores del Futuro (2006), Distinción Especial XVI Forum Municipal y Provincial de Ciencia y Técnica 2007, Mención Provincial Premio Anual de la Salud 2007 en la categoría Mejor Tesis de Terminación de

Especialidad, Premio Anual de la Salud 2007 en la categoría Innovación Tecnológica, Premio de la ACC en el año 2007 y forman parte de cinco Logros Institucionales del CIGB.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 ¿Qué es la Enfermedad Celíaca?

2.1.1 Definición

La Enfermedad Celíaca (EC) es una enteropatía que se caracteriza por alteraciones en la mucosa intestinal asociadas a una intolerancia permanente al gluten, específicamente a su fracción proteica, la gliadina en el trigo y a sus proteínas homólogas en otros cereales como la hordeína (cebada), la secalina (centeno) y la avenina (avena). Aunque fue descrita por primera vez en 1888 por Samuel Gee, no fue hasta 1950 que se identificó el trigo y los productos derivados de este como responsables del daño en los pacientes celíacos (Dicke y otros, 1950). Investigaciones posteriores permitieron concluir que lo que resulta perjudicial para dichos pacientes es el gluten y no el almidón o las albúminas (Ciclitira y Ellis, 1998).

2.1.2 Formas de presentación de la EC

Existe gran heterogeneidad en la forma de presentación de la EC (tabla 1) desde la forma clásica a un amplio espectro que incluye la forma silente, latente y potencial de la enfermedad (Bottaro y otros, 1999; Catassi y otros, 1994).

Tabla 1. Formas clínicas de la Enfermedad Celíaca

Sintomática	Clásica:	Esteatorrea y síndrome de mala absorción.
	Atípica:	Oligo y monosintomáticas con síntomas digestivos inespecíficos y/o extraintestinales.
Silente	Definida por la ausencia de manifestaciones clínicas a pesar de la existencia de una lesión vellositaria característica de EC. El motivo que ha indicado la biopsia intestinal es generalmente la presencia de uno o varios marcadores inmunes de EC detectados en un despistaje familiar o poblacional, o por padecer una enfermedad de reconocida asociación con la enfermedad celíaca.	
Latente	Personas con biopsia intestinal normal en estudios previos y que tienen la presencia de uno o varios marcadores inmunes de EC detectados en un despistaje familiar o poblacional, que desarrollarán la EC con posterioridad.	
Potencial	Familiares de primer grado con linfocitosis intraepitelial intestinal que desaparecen al suprimir el gluten de la dieta.	

2.1.3 Sintomatología

La sintomatología clínica clásica (tabla 2), se produce fundamentalmente en niños menores de 3 años que presentan un aspecto poco saludable, náuseas, vómitos, diarreas, distensión abdominal, pérdida de masa muscular y peso, fallo del crecimiento, laxitud e irritabilidad. Después de los tres años son frecuentes las deposiciones blandas, talla baja, anemias ferropénicas resistentes a tratamiento y alteraciones del carácter (Fasano, 2005).

En los adolescentes, en cambio, suele ser asintomático y en adultos de la 3^{ra} y 4^{ta} décadas, donde los síntomas más frecuentes son: fatiga, dolores abdominales, meteorismo, anemias ferropénicas, estreñimiento y frecuentemente son diagnosticados de síndrome de intestino irritable. La osteomalacia, osteopenia y osteoporosis son habituales, incluso en ausencia de mal absorción, con el consiguiente incremento del riesgo de fracturas (Green, 2005).

La EC puede aparecer con otras sintomatologías (EC atípica) en las que predominan los síntomas no digestivos, que podrían presentarse a cualquier edad, y en dependencia de esta puede incluir retraso del crecimiento, retraso del desarrollo y la pubertad (que en la edad adulta, especialmente en la mujer, tendrían su equivalente en infertilidad, o abortos de repetición, alteraciones del metabolismo calcio/ fósforo con osteopenia y osteoporosis y manifestaciones articulares), anemia por falta de hierro que no responde al tratamiento, lesiones en la boca (hipoplasia y aftas de repetición), alteraciones neurológicas (epilepsias y ataxias) y psiquiátricas (alteraciones de conductas y depresión), entre otras (Bushara, 2005). En algunos países estas formas atípicas superan en frecuencia a la forma clásica (Green, 2005; Fasano y otros, 2003).

La EC puede presentarse muchas veces de manera asintomática o latente (Bottaro y otros, 1999; Catassi y otros, 1994). En la actualidad se piensa que estas formas sin síntomas pueden ser muy frecuentes e incluso superar a las formas sintomáticas (Green, 2005).

Tabla 2. Manifestaciones clínicas según la edad de presentación

Niños	Adolescentes	Adultos
Síntomas		
Deposiciones blandas Anorexia Vómitos Dolores abdominales Irritabilidad Apatía Introversión Tristeza	Frecuentemente asintomáticos Dolor abdominal Cefaleas Artralgias Retraso menstrual Irregularidades menstruales Estreñimiento Deposiciones blandas	Dispepsia Deposiciones blandas crónicas Dolor abdominal Síndrome intestino irritable Dolores óseos Infertilidad, abortos recurrentes Parestesias, tetania Ansiedad, depresión, epilepsia, ataxia
Signos		
Distensión abdominal Malnutrición Hipotrofia muscular Retraso pondo-estatural Dislexia, autismo, hiperactividad Raquitismo Hematomas Anemias mixtas	Aftas orales Hipoplasia del esmalte Distensión abdominal Debilidad muscular Baja talla Artritis, osteopenia Queratosis folicular Anemia por déficit de hierro	Malnutrición con o sin pérdida de peso Edemas periféricos Baja talla Neuropatía periférica Miopatía proximal Anemia ferropénica Hipertransaminemia Hipoesplenismo

2.2 Asociación de la EC con otras enfermedades

La EC se presenta con mayor frecuencia asociada a otras enfermedades donde pueden manifestarse simultáneamente e incluso después de ella (tabla 3). Los pacientes que las padecen son considerados grupos de riesgo; ya que su asociación se produce con una frecuencia superior a la esperada; tales como:

- ✓ **Diabetes mellitus dependiente de insulina (DMT1):** Entre el 1,8% y el 16,4% de estos pacientes son enfermos celíacos (Schober y otros, 2002). Esto se ha tratado de explicar por el hecho de que ambas entidades comparten genes de susceptibilidad como son los alelos HLA B8, DR3 y DQ B1*02 (Arranz y otros, 1997; Sollid y otros, 1989). Por lo general cuando ambas enfermedades coexisten, la EC cursa de forma silente y usualmente se diagnostica primero la diabetes. Además la EC puede acelerar el empeoramiento de la diabetes produciéndose un mal control glucémico. Cuando estos pacientes son tratados con una dieta

libre de gluten (DLG) mejora el control de la diabetes y disminuyen los requerimientos insulínicos (Rakesh y otros, 2002; Cronin y Shanahan, 1997).

- ✓ **Síndrome de Down:** La prevalencia de la enfermedad celíaca en pacientes con síndrome de Down oscila entre el 3% al 12%, con una estimación un 8% de presunción de la EC mediante análisis serológicos y una estimación del 5,5% confirmada por biopsia (Rumbo y otros, 2002; Bonamico y otros, 2001).
- ✓ **Dermatitis herpetiforme:** Algunos especialistas la consideran como una variante de la EC, en lugar de una enfermedad asociada a esta, debido a que alrededor del 75% de los pacientes con esta patología tienen una biopsia intestinal alterada, indistinguible de la EC y en el resto se observan también cambios de la mucosa (Dahlbom y otros, 2010). Esta enfermedad se trata con dieta libre de gluten (DLG) y con medicamentos como el Dapsone para controlar el rash (Herrero-González, 2010).
- ✓ **Déficit selectivo de IgA:** Del 2,6 al 10% de los enfermos celíacos tienen una deficiencia de IgA, dato relevante desde el punto de vista analítico ya que la coexistencia con este déficit determinará la presencia de falsos negativos serológicos por la mayoría de los sistemas de diagnóstico que existen actualmente en el mercado (Cataldo y otros, 2000).
- ✓ **Enfermedades hepáticas:** Un 40% de los pacientes diagnosticados de EC, no tratados, tienen elevadas las transaminasas. La hipertransaminasemia es un hallazgo frecuente en los pacientes celíacos pediátricos y en muchos de ellos puede ser la única manifestación de la EC. Por eso en los primeros pasos del diagnóstico de enfermedades hepáticas en pacientes pediátricos deben estar los marcadores serológicos de EC (Rubio-Tapia y Murray, 2007).
- ✓ **Otras enfermedades autoinmunes;** que por lo general se diagnostican primero que la EC y esta cursa de forma silente.

- **Tiroiditis:** Es la enfermedad autoinmune órgano específica más común, usualmente es el resultado de una disfunción (hiperfunción o hipofunción o ambas) de la glándula tiroidea (Stagi y otros, 2005). La EC se produce en el 1,5-6,7% de estos pacientes, con una estimación combinada con la biopsia del 3,0% (95% CI; 2,3–3,8) (Ch'ng y otros, 2005; Stagi y otros, 2005; Mainardi y otros, 2002).
 - **Enfermedad de Addison:** Es la causa más común de insuficiencia adrenocortical primaria y comparte mucha de su sintomatología clínica con la EC por lo que puede enmascararla, por eso la EC debe buscarse activamente en estos pacientes. Hay estudios que informan una prevalencia de alrededor de un 5,4% de EC en este grupo de riesgo (Biagi y otros, 2006).
 - **Cardiomiopatía:** Esta enfermedad asociada a la EC, es una condición seria y potencialmente letal. La cardiomiopatía en pacientes con EC puede ser completamente reversible si se hace un diagnóstico temprano y se establece precozmente tratamiento con una DLG (Lodha y otros, 2009).
- ✓ **Complicaciones neuropsiquiátricas:**
- **Epilepsia,** atrofia cerebral, calcificaciones cerebrales (Lionetti y otros, 2010). Existen informes de un efecto beneficioso con una DLG en el control de los ataques y en la disminución de la medicamentación anti-epiléptica pero no en la resolución de los ataques (Cernibori y otros, 1995).
 - **Esquizofrenia:** Afecta aproximadamente al 1% de la población mundial y es considerada entre las 10 causas de incapacidad a ese nivel. Dado el alto costo social de esta enfermedad es imperativo tener opciones de tratamiento. Según estudios muy recientes, una DLG puede reducir los síntomas de esta enfermedad en un determinado número de pacientes (Kalaydjian y otros, 2006; Wei y otros, 2005).

- **Autismo:** Es un desorden del desarrollo mental en edades tempranas, con una incidencia en la población infantil de aproximadamente 1:1000 casos. Se caracteriza por problemas en la interacción y comunicación social con una ausencia del habla en aproximadamente el 50% de los casos (Gillberg y otros, 1999). Algunos estudios informan una mejoría en la conducta de los niños autistas cuando siguen una DLG (Knivsberg y otros, 2002; Knivsberg y otros, 2001).
- **Giardiasis:** esta no es una entidad asociada a la enfermedad, pero en países tropicales donde su incidencia es alta debe valorarse su coexistencia con la EC (Rastogi y otros, 1999).

2.3 Complicaciones de la EC

En 1967 se describió por primera vez que había una asociación entre la EC y una ulceración del intestino delgado (Bayless y otros, 1967). Posteriormente la EC ha sido asociada con una mayor incidencia de linfoma intestinal cuando no es diagnosticada y tratada tempranamente (Di Sabatino y otros, 2009; Green, 2009). Se conoce que alrededor del 8-13% de los pacientes con EC desarrollan algún cáncer (Garrido y otros, 2009; Corrao y otros, 2001). Son frecuentes los adenocarcinomas del tracto gastrointestinal; el riesgo relativo de desarrollar un cáncer de esófago está aumentado doce veces con respecto a la población normal y los tumores malignos de faringe y boca son diez veces más frecuentes (Corrao y otros, 2001). Sin embargo lo más frecuente es el desarrollo de linfomas intestinales de células T (linfoma No-Hodking) (Di Sabatino y otros, 2009). El riesgo de padecer dichos linfomas en pacientes celíacos y pacientes con dermatitis herpetiforme que incumplen con la DLG es 50 a 60 veces mayor que en la población normal (Green, 2009; Askling y otros, 2002). Existen numerosos trabajos que documentan que la DLG reduce la probabilidad de desarrollo de tumoraciones malignas a cifras normales y por tanto es importante su cumplimiento (Schuppan y otros, 2009; Case, 2005).

Una pérdida de masa ósea que provoca problemas severos de osteoporosis ha sido descrita asociada a la EC, aunque se ha demostrado que en pacientes que siguen una DLG desde niño, no se observa aumento del riesgo de osteoporosis sintomática (Scotta y otros, 1997). Así mismo se han descrito problemas de infertilidad (Ozgör y otros, 2009) y de otro tipo, derivados de carencias nutricionales, especialmente en los depósitos de hierro. Estos se deben a la mala absorción causada por el daño de la mucosa intestinal y también mejoran al eliminar el gluten de la dieta.

2.4 Epidemiología de la EC

La incidencia general de la EC se estima entre 1:100 y 1:300 individuos. La prevalencia estimada en los europeos y sus descendientes es del 1% (Mearin y otros, 2005; Steens y otros, 2005; Maki y otros, 2003), siendo dos veces más frecuente en las mujeres (Megiorni y otros 2008).

En un estudio multicéntrico realizado por la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición (ESPGAN) se encontró una prevalencia promedio de 1:100 niños con unas cifras que oscilan desde 1:285 a 1:33 en Suecia (Myléus y otros 2009; Carlsson y otros, 2001; Cavell y otros, 1992), entre 1:99 y 1:66 en Finlandia (Maki y otros, 2003). Los estudios más extensos se han realizado en Italia con una prevalencia de 1: 210 (17,210 estudiantes) (Catassi y otros, 1996). En España probablemente se sitúe alrededor de 1:300 (Fernández y otros, 2010).

En la Comunidad Económica Europea se ha llegado a señalar que habría más de un millón de ciudadanos que sufrirían de una intolerancia al gluten, sintomática o silente (Mustalahti y otros, 2010).

En la actualidad, la posibilidad de utilizar sistemas de diagnóstico sencillos en la pesquisa de la EC, nos permite diagnosticar formas subclínicas y latentes de la enfermedad (Rostom y otros, 2005). Los estimados basados en estudios seroepidemiológicos sugieren que por cada caso diagnosticado de EC pueden existir entre 3-7 casos sin diagnosticar y que entre el 1-3% de la población general de

Europa y Estados Unidos estarán afectadas en algún momento de sus vidas (Collin, 2005). Este incremento de la prevalencia puede deberse al aumento del índice de sospecha clínica y al uso de sistemas serológicos de detección cada vez más sensibles y específicos (Rostom y otros, 2005).

Existen informes de la presencia de la EC en poblaciones de África del Norte (Catassi y otros, 1999), Irán (Bahari y otros, 2010) y de la India (Bharadia y Sharma, 2008) lo cual indica la amplia diseminación de la enfermedad y contradice la afirmación de que solo la población caucásica la padece.

2.5 Patogénesis de la EC

2.5.1 Bases inmunológicas de la patología

La EC es el resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales, expresándose en individuos genéticamente susceptibles mediante una respuesta inmune inadecuada frente a péptidos derivados de prolaminas de trigo, cebada, centeno y, probablemente, también de avena. Es conocido que los linfocitos T CD4⁺ de lámina propia de la mucosa intestinal constituyen un elemento central de la inmunopatogenia, ya que reconocen péptidos de gliadina modificados por la enzima transglutaminasa tisular (TGt), en el contexto de moléculas de antígenos leucocitarios humanos (HLA), específicamente las moléculas HLA-DQ2/DQ8, y liberan citocinas y otros mediadores de inflamación que, en conjunto, determinan los cambios histológicos característicos (Schuppan y otros, 2002; Sollid, 2002; Nilsen y otros, 1995; Lundin y otros, 1993). Tradicionalmente se ha considerado la EC como el resultado de una respuesta inmune adaptativa alterada frente a péptidos tóxicos, como los de la región 56-88 de las α -gliadinas (Qiao y otros, 2004; Anderson y otros, 2000; Arentz-Hansen y otros, 2000); sin embargo, la inmunidad innata parece jugar un rol crítico en el desencadenamiento de las señales inflamatorias iniciales (Hue y otros, 2004; Maiuri y otros, 2003).

Por lo tanto, el gluten podría activar dos tipos de respuesta inmune que se desarrollarían de forma consecutiva o en paralelo.

La EC tiene una base genética conocida y presenta una de las asociaciones más fuertes con genes situados en la región del HLA de clase II, los que podrían contribuir al 40% de la predisposición genética (Louka y otros, 2003). Más del 95% de los pacientes con EC presentan los alelos de riesgo DQB1*02 y DQA1*0501 o DQB1*0302 y DQA1*03 (Karell y otros, 2003; Lundin y otros, 1993) y los casos DQ2/DQ8 negativo, suelen tener al menos uno de los alelos de riesgo por separado (DQA1*0501 o DQB1*02), siendo muy raros los casos en los que ambos están ausentes (Polvi y otros, 1998).

La concordancia de EC en gemelos monocigotos es del 75% y sólo un 1-2% de los individuos portadores de HLA-DQ2/DQ8 desarrollan la enfermedad, lo que sugiere que otros factores serían responsables de la activación (o cronificación) de la respuesta inmune local frente a las prolaminas tóxicas en individuos genéticamente predispuestos (De la Concha, 2007). Se han descrito varias zonas “calientes” en el genoma (Greco y otros, 1998) y algunos genes candidatos fuera del HLA, pero sin llegar a ningún resultado concluyente. Se postula que diferentes combinaciones de las variantes de genes implicadas en la respuesta inmune podrían determinar el curso y/o la expresión de la EC en cada paciente (Louka y otros, 2003; Sollid, 2002).

En los últimos años se han realizado ensayos *ex vivo* donde se cultivan piezas de biopsias con diferentes fragmentos de prolaminas, si bien difíciles de realizar por cuestiones éticas y experimentales, han aportado información sumamente valiosa (Lammers y otros, 2008; Gianfrani y otros, 2006; Molberg y otros, 2003). En este sentido, la observación de las alteraciones histológicas, así como los marcadores de activación de células T, en cortes de biopsias incubadas con diferentes fracciones, ha permitido la identificación de los fragmentos tóxicos (por ejemplo péptidos derivados

de la digestión de gliadinas por tripsina y pepsina) (Ellis y otros, 2003; Fraser y otros, 2003; Ciclitira y otros, 1998).

Mediante ensayos *in vitro* empleando líneas de células T establecidas de la mucosa intestinal de pacientes celíacos, se obtuvo un conocimiento más preciso de las secuencias inductoras de estimulación T y potencialmente tóxicas (Koning, 2003; Arentz-Hansen y otros, 2002; Shan y otros, 2002), siendo una de las más estudiadas el péptido 33 mer, 56-88 α -gliadinas (Qiao y otros, 2004).

Aunque la mayoría de los estudios se basan en el análisis de fragmentos derivados de gliadina, también se encuentran secuencias tóxicas en gluteninas (Molberg y otros, 2005). Además, Vader y colaboradores en el 2003 mostraron que se puede observar una reactividad similar al comparar los índices de estimulación de diferentes líneas T frente a péptidos de gliadina, hordeínas (cebada) y sedalinas (centeno). El análisis de secuencia de los fragmentos empleados mostró que comparten cierto grado de homología. La observación de que los péptidos de gliadina deamidados por la TGt presentaban mayor capacidad de unión a HLA-DQ2 y mayor estimulación de las líneas T, introdujo un cambio sustancial en la interpretación del rol de la TGt en la patología (Molberg y otros, 1998; van de Wal y otros, 1998).

La deamidación de glutaminas por la TGt no es al azar, ya que estudiando sustratos naturales o péptidos de síntesis, se establecieron ciertos requisitos de secuencia para la deamidación selectiva (Vader y otros, 2002). Por otro lado, los estudios de unión de péptidos a la molécula HLA-DQ2 (Costantini y otros, 2005; Kim y otros, 2004) y a DQ8 (van de Wal y otros, 1998), permitieron establecer las restricciones de anclaje y definir las secuencias de gliadina que tienen mayor afinidad de unión. Considerando en conjunto las restricciones de secuencia para la deamidación selectiva y las restricciones de anclaje de las moléculas HLA-DQ2/DQ8, fue posible proponer algoritmos que predicen, en forma teórica, las secuencias potencialmente tóxicas (Vader y otros, 2002).

La estimulación *in vitro* de biopsias de intestino delgado de pacientes celíacos con fragmentos de gliadina obtenidos por digestión enzimática o con péptidos sintéticos, induce una respuesta de tipo Th1, en la que predomina el IFN γ , cuyos niveles se normalizan en la fase de remisión (Forsberg y otros, 2002; Nilsen y otros, 1998; Troncone y otros, 1998; Nilsen y otros, 1995).

Dado que el IFN γ se produce en ausencia de IL-12, su síntesis dependería de otros factores, como IFN α (Monteleone y otros, 2001), y de otras citocinas de la familia del receptor IL-2R (clase I) (Trinchieri y otros, 2003), como IL-18, IL-7 e IL-15 (Salvati y otros, 2002; Maiuri y otros, 2000).

La IL-10 tiene un importante rol regulador de la respuesta en la mucosa y, en particular, se ha sugerido que podría inhibir las respuestas Th1 frente al gluten (Salvati y otros, 2005). La mucosa intestinal produce IL-10, cuyo origen puede estar en los linfocitos T de la lámina propia (Beckett y otros, 1996) o en los linfocitos intraepiteliales (LIEs) (Forsberg y otros, 2002), aunque hay estudios en los que no se ha detectado expresión ARNm de IL-10 en el intestino de pacientes con EC (Nilsen y otros, 1998).

Otro factor regulador de interés es el TGF β , cuya expresión está disminuida en el intestino de pacientes con EC, comparado con el intestino de individuos sanos (Lionetti y otros, 1999). Un rol importante lo tendrían las células dendríticas de la lámina propia ya que participan en la modulación de la respuesta y en la diferenciación de las células T reguladoras (Chirido y otros, 2005).

En resumen, la activación de linfocitos T reactivos al gluten, en el intestino delgado de pacientes celíacos, pone en marcha una respuesta inflamatoria dominada por citocinas de patrón Th1, en el que predomina el IFN γ , y otras citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-15 e IL-18), con un descenso proporcional de la expresión de citocinas inmunoregulatoras (IL-10 y TGF β), (León y otros, 2005). Este desequilibrio, además de incrementar el número de células del sistema inmune en la mucosa intestinal y el grado de activación, regula la actividad de los factores de crecimiento epitelial y de las

metaloproteinasas. Estas últimas están encargadas de mantener y renovar la estructura de la mucosa, y en situaciones de inflamación, provocan la lesión intestinal que conduce al síndrome de mal absorción (Ciccocioppo y otros, 2005; Daum y otros, 1999).

2.6 Diagnóstico de la EC

2.6.1 Diagnóstico mediante los criterios de la ESPGAN

Históricamente el diagnóstico de la EC se ha basado en la evaluación de las manifestaciones clínicas y su respuesta a la eliminación del gluten de la dieta (Fasano y otros, 2008; Walker-Smith y otros, 1990; Meeuwise y otros, 1970; Dicke, 1950). En 1970 la ESPGAN estableció criterios basados en la histología de la mucosa intestinal. Los mismos permitían el diagnóstico diferencial de la EC entre otras enteropatías gastrointestinales que cursan con sintomatología similar (Meeuwise y otros, 1970). Así se aceptaron universalmente tres criterios diagnósticos:

- 1- Mucosa intestinal anormal, generalmente plana, en una biopsia realizada mientras el paciente sigue una dieta normal con gluten.
- 2- Respuesta clínica e histológica con normalización al retirar el gluten de la dieta.
- 3- Reparación de la lesión histológica al reintroducir el gluten en la dieta (prueba de provocación).

Sin embargo, en los últimos años se han revisado estos criterios y la propia definición de la enfermedad, ya que cada vez son más frecuentes las formas oligosintomáticas y latentes de la misma. Además los criterios establecidos en 1970, según los cuales eran necesarias tres biopsias intestinales, resultaron muy agresivos (Meeuwise y otros, 1970). Así, numerosos miembros de la ESPGAN demostraron que con la primera biopsia intestinal se diagnosticaba correctamente el 95% de los pacientes (Walker-Smith y otros, 1990). Esto motivó que en 1990 se emitiera un nuevo

informe por parte de esta asociación con criterios diagnósticos menos rígidos (Walker-Smith y otros, 1990), que se mencionan a continuación:

- 1- Atrofia de las vellosidades con hiperplasia de las criptas y una superficie epitelial anormal, acompañado de un aumento del infiltrado linfocitario, mientras que el paciente sigue con una dieta normal con gluten.
- 2- Remisión clínica total al eliminar el gluten de la dieta.

El diagnóstico de EC es más certero si a los criterios antes mencionados se le adiciona: “La aparición en suero de niveles altos de anticuerpos antigliadina (AAG), antiendomiso (AAE) o antireticulina (AAR) y de anticuerpos antitransglutaminasa (AATGt), coincidiendo con la toma de la biopsia y estos disminuyen o desaparecen al seguir una DLG”. Solamente es necesario realizar una segunda biopsia intestinal en aquellos pacientes en los que la respuesta clínica a la dieta es dudosa, o en aquellos que debutan como asintomáticos (Fasano y otros, 2008).

- 3- Someter al paciente a una prueba de provocación con gluten solo en ocasiones especiales:
 - a) Cuando existen dudas de cómo se hizo el diagnóstico.
 - b) Cuando hay sospechas de que otras patologías infantiles pueden enmascarar el diagnóstico.
 - c) Si la primera biopsia se realizó antes de los dos años de edad. Se conoce que el 5-18% de los niños clasificados como positivos a esta edad no son realmente enfermos celíacos (Burgin-Wolff y otros, 1991).
 - d) En adolescentes que abandonan la dieta sin gluten.

En cualquier caso es siempre el especialista quien debe decidir si conviene iniciar un período de provocación. En caso afirmativo debe realizarse bajo supervisión médica (nunca antes de los 6 años), suministrando una dosis mínima de 10 gramos de gluten al día y sin alterar los hábitos

alimentarios normales. La biopsia debe realizarse después de tres o seis meses, aunque los marcadores serológicos ayudan a decidir el momento adecuado. Si la tercera biopsia no resulta alterada debe hacerse un seguimiento del paciente en los dos años siguientes.

En cualquier caso es conveniente un seguimiento de por vida, especialmente si hay recurrencias de síntomas o si algunos de los marcadores serológicos están elevados (Troncone y otros, 1996).

2.6.2 Marcadores serológicos

Se ha descrito que en el suero de pacientes celíacos se incrementan los niveles de anticuerpos frente a proteínas presentes en los cereales, comúnmente denominados anticuerpos antigliadina (AAG), así como frente a proteínas de tejido conectivo nombrados anticuerpos antireticulina (AAR) y anticuerpos antiendomiso (AAE). Este hecho hace posible que dichos anticuerpos puedan ser utilizados como marcadores serológicos de la enfermedad (Unsworth y otros, 1983).

En el informe de la ESPGAN de 1990, relativo al diagnóstico de la EC, se concedió gran valor a los resultados obtenidos con los marcadores serológicos (Walker-Smith y otros, 1990). Estos marcadores han mostrado ser sensibles y específicos y está bien documentado su valor como apoyo del diagnóstico de la EC. Su empleo ha permitido la realización del diagnóstico sobre la base de una única biopsia intestinal, aunque no se aconseja que se usen de forma exclusiva (Rostom y otros, 2005).

Los marcadores serológicos también son muy útiles para el pesquiasaje de la EC en grupos de riesgo, tales como los familiares de primer grado, pacientes con Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), Síndrome de Down y otras patologías asociadas previamente descritas (Fasano y otros, 2008; Rostom y otros, 2005).

En la práctica clínica se observan falsos negativos en pacientes con déficit de IgA (Cataldo y otros, 1998) y falsos positivos en pacientes con enfermedades gastrointestinales distintas de la EC, tales

como síndromes post-gastroenteritis, infección por *Giardia lamblia*, enfermedad inflamatoria de Crohn e intolerancia a las proteínas alimentarias (Suomalainem y otros, 1992). Además son frecuentes los falsos positivos entre pacientes con otras patologías autoinmunes asociadas a la EC probablemente debido a sus peculiares características inmunológicas (McCormi y otros, 1998; Maki y otros, 1984).

Los AAG y los AAE son los marcadores serológicos más empleados, ambos desaparecen con una DLG, aunque siguen cinéticas diferentes. Los AAG de clase IgA desaparecen muy rápido, entre dos y seis meses después de suprimir el gluten de la dieta, por lo que son marcadores más útiles en el control de la misma. Por el contrario los AAG de clase IgG necesitan períodos muy superiores para su aclaramiento, entre 6 y 24 meses, aunque a veces no llegan a hacerlo completamente (Savilahti y otros, 1983). Los AAE persisten más tiempo que los AAG clase IgA pero no tanto como los AAG clase IgG; su velocidad de desaparición es variable y no depende del nivel de respuesta inicial ni de la edad del paciente (Kapusinska y otros, 1987).

2.6.2.1 Anticuerpos antigliadina (AAG)

La formación de pequeñas cantidades de anticuerpos frente a proteínas y nutrientes ingeridos en la dieta es un proceso fisiológicamente normal. Sin embargo, en 1958 en el Hospital Infantil de Basilea, Berger demostró que la EC estaba asociada con el aumento en la concentración de AAG (Berger, 1958). Los AAG séricos son predominantemente de isotipos IgA e IgG y en menos proporción IgM.

Al nivel intestinal predominan los AAG clase IgA e IgM, conformando el llamado patrón intestinal (Arranz y otros, 1994). Los anticuerpos de clase IgM no son específicos de la EC y no se relacionan con su clínica. El estudio en suero de las diferentes subclases de AAG IgA ha demostrado el predominio de los AAG IgA1 sobre los AAG IgA2, lo que indica que los AAG séricos no proceden

de las mucosas sino que tienen un origen sistémico (Kemp y otros, 1988). Con respecto a los AAG IgG, algunos autores han encontrado anticuerpos de las cuatro subclases (Barners y otros, 1986).

Generalmente se acepta que los ensayos basados en la determinación de AAG de clase IgG son muy sensibles pero poco específicos para el diagnóstico de la EC ya que dichos anticuerpos aumentan en otras patologías e incluso en controles normales, mientras que los basados en la determinación de AAG IgA son mucho más específicos pero menos sensibles (Rostom y otros, 2005; Arranz y otros, 1986). Los niveles de AAG IgA en suero son muy utilizados en el diagnóstico serológico de la EC y en muchos casos proporciona el mejor método para el pesquiasaje de la enfermedad (Fasano y otros, 2008; Rostom y otros, 2005). Aún así, como la EC se asocia a una deficiencia selectiva de IgA entre el 2-10% de los pacientes (Cataldo y otros, 2000), algunos autores recomiendan hacer una valoración conjunta de AAG IgA e IgG (Dickey y otros, 1997).

Para medir los niveles de AAG se utilizan diversos métodos, aunque los más extendidos son los ensayos inmunoenzimáticos de tipo ELISA, los cuales se basan en la formación de inmunocomplejos entre el antígeno y los AAG circulantes (Fasano y otros, 2008; Rostom y otros, 2005).

También se han desarrollado micro-métodos que emplean tiras reactivas recubiertas con gliadina, los cuales clasifican los sueros como positivos y negativos según el color desarrollado. Estos, aunque son poco precisos, constituyen una buena alternativa como método rápido de pesquiasaje de la EC (Corazza y otros, 1997). Un método semicuantitativo de evaluación visual que permite la detección de AAG desarrollado en el CIGB demostró ser de utilidad en el diagnóstico serológico de la EC (Garrote y otros, 1999).

Las pruebas basadas en la medida de AAG han sido durante mucho tiempo los ensayos más utilizados en la pesquisa de EC (Troncone y otros, 1991). Se han publicado numerosos trabajos que

analizan la sensibilidad y especificidad de este tipo de ensayos, encontrándose diferencias muy significativas para estos parámetros en las distintas pruebas antigliadina (Fasano y otros, 2008; Rostom y otros, 2005; Catassi y otros, 1999; Walker-Smith y otros, 1990). Por ejemplo para AAG IgG, los valores de sensibilidad fluctúan entre un 46-100% y los valores de especificidad entre un 45-100%, mientras que para AAG IgA la sensibilidad oscila entre 31-100% y la especificidad entre 83-100% (Catassi y otros, 2005).

Un hecho que impide el análisis comparativo de resultado entre las distintas pruebas antigliadina es que cada ensayo analiza poblaciones diferentes (distinto tamaño de muestra y edad media así como diferentes grupos control y prevalencia de la enfermedad). Un ejemplo de ello es la variación que se obtiene al utilizar el mismo ensayo con una población infantil o con adultos, observándose que la sensibilidad disminuye aproximadamente un 30% cuando se analiza población adulta (Bode y otros, 1994; Bode y otros, 1993).

Los AAG correlacionan muy bien con la atrofia de la mucosa intestinal en niños pequeños; sin embargo el valor predictivo de los mismos disminuye con la edad. Así se ha demostrado que en pacientes celíacos que consumen gluten durante años, los niveles de AAG van disminuyendo gradualmente y pueden incluso llegar a desaparecer aunque existan alteraciones de la mucosa intestinal (Burgin-Wolff y otros, 1991). Por otro lado, en la población sana parece aumentar la positividad frente a AAG con la edad (Catassi y otros, 2005).

2.6.2.2 Anticuerpos frente a tejido conectivo

2.6.2.2.1 Anticuerpos antireticulina (AAR)

En 1971 se demostró por primera vez la presencia de anticuerpos dirigidos contra tejido conectivo en individuos con EC. Estos fueron encontrados tanto en el suero como en las secreciones

intestinales de los pacientes. Inicialmente se detectaron mediante inmunofluorescencia indirecta en riñón de rata y se denominaron anticuerpos antireticulina (AAR) (Seah y otros, 1971).

Resulta difícil determinar el valor diagnóstico de los AAR debido a la gran heterogeneidad de criterios ofrecidos en los diversos trabajos realizados al respecto (Catassi y otros, 2005). En algunos de ellos se determinan AAR de clase IgG y en otros se utiliza un suero polivalente de anti-inmunoglobulinas humanas (Seah y otros, 1973).

Recientemente la tendencia es otorgar un valor superior a los anticuerpos de clase IgA. También hay que tener en cuenta la edad de la población estudiada, puesto que los niños tienden a responder mejor y con tasas más altas que los adultos (Seah y otros, 1971). De aquí se deduce que el valor diagnóstico de los AAR disminuye en los pacientes adultos (Seah y otros, 1971).

Los AAR tienen una inespecificidad relativa, pues pueden parecer en muchas enfermedades distintas de la EC como por ejemplo la enfermedad de Crohn (Wright y otros, 1988), en la infección por *Giardia lamblia*, (Monteiro y otros, 1986), en la DMT1, (Maki y otros, 1984) así como en otras enfermedades asociadas y no asociadas con la EC (Catassi y otros, 2005).

2.6.2.2.2 Anticuerpos antiendomiso (AAE)

En 1984 se describieron los anticuerpos antiendomiso (AAE) clase IgA y se relacionó su presencia con la dermatitis herpetiforme (Chorzelski y otros, 1984). Trabajos posteriores encontraron AAE en pacientes con EC (Garrote y otros, 1991; Maki y otros, 1991). Se conoce que los AAE reaccionan con el tejido conjuntivo situado entre las fibras del músculo liso cercano al epitelio intestinal (endomiso), preferentemente en el esófago terminal, pero no lo hacen con la reticulina de otros órganos (Kumar y otros, 1984). Son preferentemente de clase IgA, y la imagen de positividad es semejante a una malla fina que envuelve los haces de miofibrillas de la musculatura del esófago (Volta y otros, 1995).

Las pruebas para la detección de AAE se realiza mediante inmunofluorescencia indirecta usando como sustrato secciones de esófago de primates por lo que resultan muy costosas (Catassi y otros, 2005). En los últimos años se ha considerado la posibilidad de sustituir el sustrato por secciones de cordón umbilical humano con el objetivo de abaratar la técnica y eliminar así uno de los principales inconvenientes de la misma (Volta y otros, 1995).

Este marcador es muy sensible y específico para la EC, resaltando su alta especificidad en el diagnóstico diferencial de enfermos celíacos activos entre pacientes con otras patologías gastrointestinales distintas de la EC o con otras enfermedades autoinmunes (Fasano y otros, 2008). Sin embargo, se han descrito falsos negativos para AAE en niños menores de dos años que son frecuentes entre enfermos celíacos latentes debido a que la aparición de estos anticuerpos parece estar relacionada con el daño tisular (Volta y otros, 1992). Además, estos no se consideran útiles para detectar ligeras transgresiones en la dieta por lo que no se recomiendan en el seguimiento de la misma (Troncone y otros, 1996).

Numerosos trabajos se han llevado a cabo valorando el empleo de marcadores tisulares en el diagnóstico de la EC (Fasano y otros, 2008; Catassi y otros, 2005; Volta y otros, 1995). Aunque de indudable valor clínico, expresado por su alta sensibilidad y especificidad, este marcador presenta algunos inconvenientes que lo hacen menos adecuado como primer eslabón en la búsqueda de pacientes con sospecha de EC en grupos numerosos (Fasano y otros, 2008; Catassi y otros, 2005; Volta y otros, 1995). La determinación de AAE, resulta muy laboriosa, no es cuantitativa, no puede automatizarse, es cara y no siempre está al alcance de todos los laboratorios. Además, como esta determinación está basada en la detección de anticuerpos de tipo IgA, no detecta individuos celíacos con deficiencia selectiva de IgA (Fasano y otros, 2008; Cataldo y otros, 2000).

2.6.2.2.3 Anticuerpos antitransglutaminasa (AATG)

La TGt es una enzima calcio dependiente que se libera en tejidos dañados y promueve la cicatrización de las heridas mediante la estabilización de la matriz extracelular a través de la promoción de enlaces cruzados entre la fibronectina y el colágeno. Su identificación como el principal autoantígeno del endomisio frente al cual se dirigen los AAE (Dieterich y otros, 1997), fomentó la base para el desarrollo de nuevos sistemas de diagnóstico serológico de la EC.

La detección de anticuerpos antitransglutaminasa ha demostrado ser altamente sensible y específica para el diagnóstico de la enfermedad celíaca. (Sorell y otros, 2002; Lagerqvist y otros, 2001; Schuppan y otros, 2001; Sardy y otros, 1999; Dieterich y otros, 1998). Por ello, se han desarrollado sistemas de diagnóstico tipo ELISA o por Radioligando para la detección de anticuerpos anti-transglutaminasa, empleando para ello TGt extraída de hígado de cobayo o TGt humana recombinante, clonada y expresada a partir de ARNm de distintos tejidos (Seissler y otros, 1999; Sulkanen y otros, 1998). La sensibilidad y especificidad informada con estos métodos para el diagnóstico de la EC iguala o supera a la de los anticuerpos anti-endomisio (Amin y otros, 1999; Bazzigaluppi y otros, 1999), que como antes se señaló, eran hasta entonces considerados los mejores para el diagnóstico serológico de la EC.

La principal limitante de estos procedimientos es que se trata de técnicas instrumentales que requieren para su realización y evaluación de equipamiento de laboratorio (lectores de placas de microtitulación o contadores de radiactividad) y de un personal técnico altamente capacitado. Son además métodos laboriosos que contemplan múltiples operaciones y toman varias horas para su realización. Se requiere además de dos ensayos independientes si se pretende la detección de anticuerpos anti-transglutaminasa de clase IgG o IgA.

2.6.3 Marcadores genéticos

La EC muestra una de las asociaciones más fuertes que se conocen entre una enfermedad y el sistema HLA, en especial, con la región HLA-clase II. En la mayoría de las poblaciones estudiadas, más del 90% de los pacientes con EC portan el mismo heterodímero HLA-DQ2 codificado por los alelos DQA1*0501 y DQB1*02 (Sollid y Lie, 2005). Los pacientes no portadores de DQ2 (5-10%) suelen mostrar un segundo heterodímero, DQ8, codificado por los alelos DQA1*03 y DQB1*0302 (Sollid y Lie, 2005). Por último, los pacientes que no poseen DQ2 ni DQ8 pueden tener al menos uno de los dos alelos de riesgo por separado (DQA1*0501 o DQB1*02), y se han descrito muy pocos casos en los que ambos están ausentes (Polvi 1998, Karell 2003, Louka 2003).

La utilidad de estos marcadores debe ser considerada siempre en el contexto de la expresión clínica y de la evaluación histológica de la biopsia como principal prueba diagnóstica. La identificación aislada de los alelos que codifican las moléculas DQ2 o DQ8 no permite el diagnóstico de la EC, pero es muy útil en las siguientes situaciones:

1. Ayuda diagnóstica ante la sospecha clínica en casos poco claros, con patrón histopatológico o pruebas serológicas dudosas, también en individuos con EC latente y serología positiva pero biopsia normal, o cuando el paciente ha comenzado ya la dieta sin gluten o no disponemos de una biopsia inicial (Kaukinen y otros, 2002). No es un marcador específico, dado que la frecuencia de DQ2 en la población general es del 25-30%, y sólo una pequeña proporción de los portadores de DQ2 o DQ8 desarrollan la EC, pero dado el alto valor predictivo negativo próximo al 100% de este análisis, es muy poco probable que las personas que no portan estos genes padezcan la EC (Sollid y Lie, 2005; Rostom y otros, 2004; Kaukinen y otros 2002).

2. Selección de individuos con mayor susceptibilidad a desarrollar la EC entre grupos de riesgo, como los familiares de pacientes celíacos, en los que el estudio debe hacerse comparando los

resultados con el probando y teniendo en cuenta que el ser familiar confiere ya un riesgo mayor respecto a la población general (Dolinsek y otros, 2004).

2.7 Tratamiento de la EC

En la actualidad, el único tratamiento efectivo para la EC es la exclusión total del gluten de la dieta. El cumplimiento estricto de la dieta conduce, en la mayoría de los casos, a una rápida y completa recuperación de la histología normal de la mucosa intestinal, remisión de los síntomas y negativización de los marcadores serológicos en pocos meses (Case, 2005; Hill y otros, 2005).

El control del seguimiento de la dieta en estos pacientes se realiza comúnmente mediante la determinación de anticuerpos antigliadina en sangre periférica, ya que constituyen un buen indicador de las transgresiones (Hill y otros, 2005). El cumplimiento estricto de la dieta muchas veces no es satisfactorio debido a la ingesta inadvertida de gluten por falta de información precisa de los pacientes sobre los productos aptos y errores en la identificación de los productos comerciales (Case, 2005). Sin embargo, el mayor problema lo constituye las transgresiones voluntarias, principalmente debido al desconocimiento de los pacientes sobre sus consecuencias, a un espectro limitado de productos libres de gluten apetecibles que hacen poco atractiva la dieta a largo plazo y al costo elevado de los productos (Stevens y otros, 2008; Case, 2005). También se ha observado que el cumplimiento de la dieta es más bajo en los pacientes adultos con escasa o nula sintomatología al momento de su diagnóstico, o en aquellos que han sido diagnosticados mediante un protocolo de cribado (Case, 2005; Pietzak y otros, 2005).

La evaluación de parámetros de calidad de vida (aquellos que consideran no sólo la condición física o clínica de los pacientes, sino también la situación anímica y cómo este interpreta su condición), muestra claramente que muchos enfermos encuentran difícil sobrellevar la dieta libre de gluten en forma estricta (Case, 2005). Por esta razón, se ha propuesto que la ingesta de bajas cantidades de

gluten, en ciertas ocasiones como viajes o eventos sociales, o el empleo de terapias complementarias a la dieta, podría mejorar su calidad de vida (Sollid y Khosla, 2005).

2.8 Sistemas inmunocromatográficos

A finales de la década del 80 del siglo pasado, comenzó a escala comercial el uso de las membranas de nitrato de celulosa en pruebas inmunocromatográficas de flujo lateral y flujo continuo, comúnmente llamadas pruebas rápidas. En un inicio estuvieron basadas solo en la inmovilización de anticuerpos (Rosenstein y otros, 1989; Campbel y otros, 1987), actualmente también se inmovilizan otras proteínas.

La inmunocromatografía es una de las técnicas de inmunodiagnóstico más modernas cuyas principales ventajas son la sencillez y rapidez del sistema (Jelinek, 1999). Teniendo en cuenta la factibilidad de su empleo, el ahorro de tiempo y de recursos de laboratorio, cada vez son más las aplicaciones de esta técnica, tanto en el diagnóstico de enfermedades bacterianas, parasitarias y virales, en la medicina humana y la veterinaria. (Reithinger y otros, 2002),

Los sistemas inmunocromatográficos son sistemas rápidos, basados en la captura inmunológica de un coloide coloreado durante su paso a través de una membrana sobre la cual ha sido inmovilizado un anticuerpo (o un antígeno). Las principales características de estos sistemas son (Jelinek y otros 1999):

- Rápido: basta añadir la muestra al sistema y esperar entre 5 y 20 minutos.
- Sencillo: no se requiere ningún instrumental de laboratorio complicado.
- Fácil de interpretar: Aparece una línea indicando si el sistema es positivo o no.
- Fiable: Lleva incorporada una línea de control cuya aparición verifica el correcto funcionamiento del ensayo
- De fácil ejecución: Puede ser realizado por personal no especializado.

La inmunocromatografía es una técnica que permite visualizar la reacción antígeno anticuerpo por la acumulación de oro coloidal o látex del conjugado en las zonas específicas de la membrana de nitrocelulosa donde previamente se han fijado anticuerpos o antígenos de captura (Engler, 2002; Millipore, 2001).

Teniendo en cuenta las potencialidades del uso de oro coloidal como marcaje, este ha tenido un gran desarrollo en los últimos años. En primer lugar las partículas se pueden fabricar en diferentes tamaños, desde 2-3 nm hasta 150 nm, con todas las posibilidades intermedias. Las partículas de oro adsorben a todo tipo de proteína formando complejos muy estables, manteniendo las proteínas sus propiedades y actividad biológica (Leunissen y otros, 1989 De Mey, 1985; Roth, 1983).

En estos momentos son varios los sistemas inmunocromatográficos disponibles en el mercado de diagnosticadores, entre los cuales podemos mencionar los sistemas para la detección de embarazo, infarto del miocardio, niveles de glucosa, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (HIV), Dengue, *Leishmania*, *Taenia solium*, detección de antígenos de diversos líquidos biológicos, infecciones por *Streptococcus β -hemolítico*, *Chlamydia*, virus de la hepatitis, malaria, entre otros. (Valero, 2006; Mainet y otros, 2004; Bell, 2001; Veda Lab 2000, Jelinek, 1999; Sundar y otros, 1998; Beristain, 1995; World Health Organization, 1995).

2.8.1 Principio del método.

Cada determinación está compuesta por una tira de nitrocelulosa (NC), con una porosidad que permite el flujo lateral de sustancias, la cual se encuentra adherida a una superficie de plástico, que le confiere rigidez y a su vez esta tira se encuentra contenida dentro de un casete plástico. La NC puede ser sensibilizada en una primera línea (línea de captura) con anticuerpo, en el caso de que se pretenda detectar un antígeno en la muestra; o con un antígeno si se pretende detectar anticuerpos. La segunda línea (línea de control) se sensibiliza con un reactivo de control capaz de unir al exceso

de conjugado de oro coloidal. La membrana de NC se pone en contacto por el extremo más cercano a la línea de captura con la membrana capturadora de eritrocitos, en la cual se encuentra depositado y seco el conjugado de oro coloidal, que puede ser conjugado de anticuerpos-oro coloidal para la detección de antígenos o conjugado de antígeno-oro coloidal si es para la detección de anticuerpos. Por el extremo superior de la NC se localiza un material absorbente o mecha, que facilita la migración (Figura 1).

De esta manera, cuando se adiciona una muestra de sangre en el respectivo pocillo del casete plástico, esta se pone en contacto con la membrana capturadora de eritrocitos, quedando estos atrapados y la parte líquida de la sangre continúa su migración produciendo la solubilización del conjugado. Si la muestra de sangre tiene anticuerpos o antígenos, según sea el caso, estos reaccionan con las partículas de oro conjugadas formando inmunocomplejos que migran a través de la NC originándose así la fase móvil del sistema. En ausencia del analito en la muestra de sangre, esta línea de captura no se forma. Al mismo tiempo el exceso de conjugado, no atrapado en la línea de captura, continúa migrando y es atrapado por un reactivo fijado a la fase sólida capaz de reaccionar con el conjugado de oro coloidal, formándose una segunda banda horizontal coloreada (línea de control) como demostración de que los reactivos han funcionado correctamente. La línea de control se forma tanto con las muestras que contengan inmunocomplejos, como con las muestras negativas. El ensayo no se considera válido si esta línea no aparece (Figura 2).

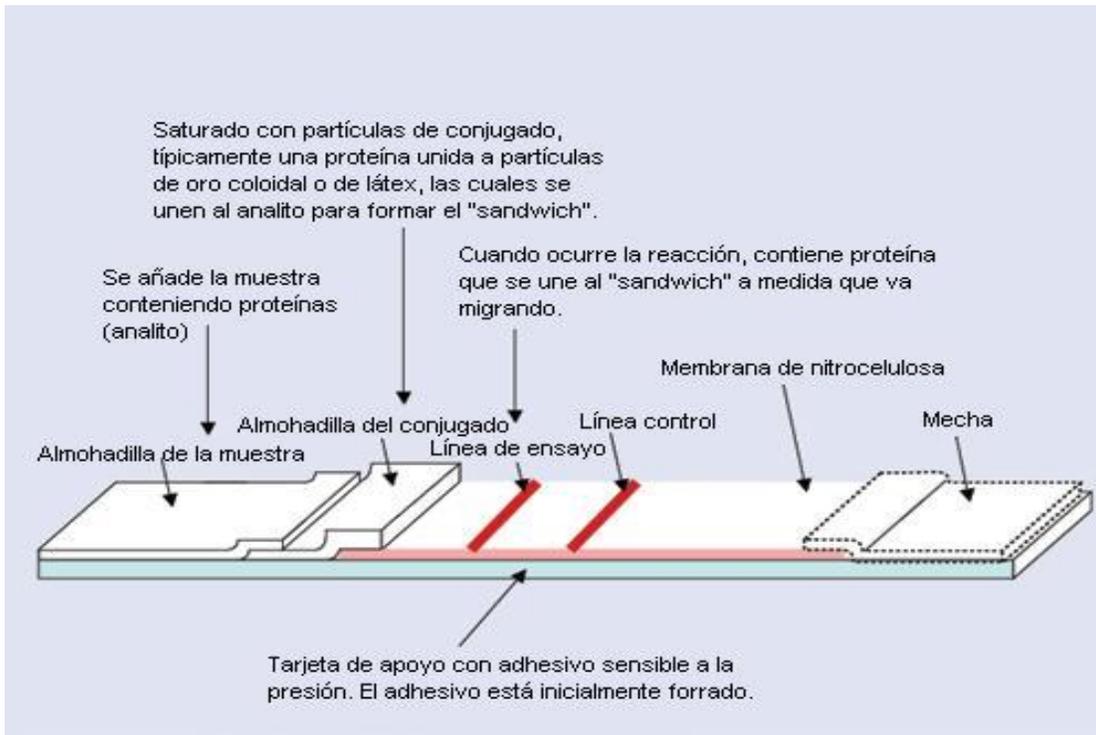


Fig. 1: Formato de conformación de una tira cromatográfica.

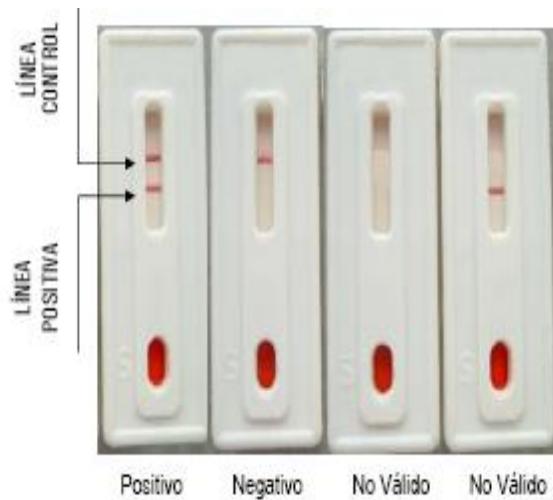


Fig. 2: Posibles resultados a obtener.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Desarrollo y evaluación del ensayo inmunocromatográfico

3.1.1 Materiales y reactivos utilizados para el desarrollo de este sistema:

- Membrana de nitrocelulosa CNPC-SS12-L2-P25, 15 µm, 62,5 x 300 mm, 25 mm (Advance Microdevice, Pvt. Ltd. India).
- Material absorbente AP-080, 11 x 300 mm (Advance Microdevice, Pvt. Ltd. India).
- Membrana capturadora de glóbulos rojos WFR-1, 3 x 30 cm (Advance Microdevice, Pvt. Ltd. India).
- Transglutaminasa tisular (TGt) (EC 2.3 2.13) (Sigma T-5398, Lote: 99H7425, EUA).
- Coloide de oro de tamaño de partícula de 40 nm de (EM.GC40, Lote: 5733, BBIInternational, Reino Unido).
- Casetes plásticos de 9 mm (Advance Microdevice, Pvt. Ltd. India).
- Sobre de aluminio plasticado 50 mm x 120 mm (Advance Microdevice, Pvt. Ltd. India).
- Bolsa desecante de sílica gel (Advance Microdevice, Pvt. Ltd. India).
- Todos los reactivos químicos empleados eran de calidad analítica.

3.1.2 Preparación de la cristalería para la producción del conjugado

Toda la cristalería empleada en la producción del conjugado debe estar completamente limpia y silanizada para evitar la floculación del coloide. Para ello se preparó una mezcla al 90% de diclorometano (CH_2Cl_2) (Merck, Alemania) y 10% de trimetilclorosilano (Merck, Alemania) en un frasco ámbar. El recipiente a silanizar se llena con esta disolución y se mantiene en la oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA) (20-25 °C). Luego se recupera la disolución y se enjuaga el recipiente.

3.1.3 Preparación de la transglutaminasa (TGt) para la producción del conjugado y de las tiras

Se tomó un vial de la TGt de cobayo liofilizada (Sigma, EUA) y se disolvió a una concentración final de 1 mg/mL en el tampón Tris-HCl 10 mmol/L, CaCl₂ 5 mmol/L pH 7,5. Se mantuvo por 5 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) hasta su completa disolución, se dividió en alícuotas y se conservó a -70 °C hasta su uso. Una vez agotadas todas las alícuotas preparadas se resuspendía un nuevo vial y se procedía de igual forma.

3.1.4 Preparación del conjugado

Para la preparación del conjugado de TGt-oro coloidal se utilizó un coloide de oro comercial de un tamaño de partícula de 40 nm (BBInternational, Reino Unido).

3.1.4.1 Determinación del pH de conjugación del coloide

Se siguió el método descrito por Beesley con algunas modificaciones (Beesley, 1989), para ello se añadió 1 mL de la disolución de oro coloidal comercial de 40 nm en 7 viales de 1,5 mL. Luego a cada tubo se le ajustó pH a valores entre 6,0 y 10 adicionando 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 y 15 µL de una disolución de K₂CO₃ 0,1 mol/L y se homogenizó suavemente. Seguidamente se le añadió a cada vial 20 µL con una concentración saturante de TGt (20 µg/mL de coloide) y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C). Luego se colocaron en una placa de ELISA (Costar, EUA) de 96 pocillos dos réplicas de 200 µL de cada uno de los viales a los distintos pH e inmediatamente se procedió a realizar la prueba de floculación añadiendo a cada pocillo 20 µL de disolución acuosa de NaCl 10%. Como control de la floculación se utilizó un pocillo con 200 µL del coloide sin proteína al que se le añadieron 20 µL de la disolución acuosa de NaCl 10%. La floculación está dada por un cambio de coloración de rosado (color del coloide) a azul cuando no está totalmente protegido. Inmediatamente se procedió a medir la absorbancia de cada pocillo a 620 nm en un lector de placa

PR-521 (Tecnosuma Internacional, La Habana, Cuba), este paso también se puede realizar visualmente. El pH de conjugación es aquel donde no se produce floculación y su medición se realizó mediante tiras de pH (rango de 5 a 10) (Sigma, EUA).

3.1.4.2 Determinación de la cantidad mínima protectora de TGt

Una vez seleccionado el pH óptimo se procedió a determinar la cantidad mínima protectora que no es más que la menor cantidad de proteína necesaria para proteger la disolución de oro coloidal de la floculación en presencia de sales. Para ello se prepararon 11 viales de 1,5 mL con el coloide al pH de conjugación (previamente ajustado con K_2CO_3 0,1 mol/L). Luego se prepararon otros 11 viales de 1,5 mL con 100 μ L de tampón Tris-HCl 10 mmol/L, $CaCl_2$ 5 mmol/L a los cuales se le añadieron 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 μ g de TGt y a su vez estos fueron añadidos a los viales con 1 mL de coloide al pH escogido según el acápite 3.1.4.1. Luego se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) y se procedió a realizar nuevamente la prueba de floculación siguiendo el mismo procedimiento que para la determinación del pH de conjugación (acápite 3.1.4.1).

3.1.4.3 Escalado de la conjugación

Se escaló la conjugación al volumen deseado de oro coloidal, añadiendo a la disolución de oro con el pH previamente ajustado (según acápite 3.1.4.1) la cantidad de proteína a la concentración final que se obtuvo en la titulación (acápite 3.1.4.2). Se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) en un beaker previamente silanizado poniéndose en agitación a 200 rpm. El escalado se realizó según la siguiente fórmula:

$$\text{Vol.A TGt} = \text{Vol.T coloide} \times \text{Vol.1 TGt} \times 1,1$$

Donde:

Vol.A TGt: volumen de TGt a 1 mg/mL necesario para estabilizar el volumen total de coloide.

Vol.T coloide: Volumen total de coloide.

Vol.1 TGt: Volumen de TGt a 1 mg/mL necesario para estabilizar 1 mL de coloide.

1,1: Coeficiente a utilizar para calcular un 10% de volumen extra.

Se procedió a añadirle al volumen total de coloide la cantidad necesaria para una dilución de 1:10 de la disolución A de bloqueo (es una disolución acuosa compuesta por polímeros y proteínas que garantiza la estabilidad del conjugado al bloquear posibles espacios vacíos entre las moléculas de proteínas adsorbidas en la superficie de las partículas de oro), se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) en agitación a 200 rpm. Posteriormente se filtró la mezcla por un filtro de celulosa de 0,2 µm (Sartorius AG, Gotingen, Alemania) para eliminar la presencia de grumos y se procedió a centrifugar a $7\ 257 \times g$ durante 30 minutos a 4 °C en centrífuga (Hitachi 20PR-52D, Japón). Finalmente se eliminó el sobrenadante por aspiración y se midió su volumen final con una pipeta automática (P200). El precipitado blando del conjugado se resuspendió en igual volumen de una disolución B (es una disolución acuosa similar a la disolución A, a la que se le añadió azida de sodio 0,1% para evitar contaminaciones del conjugado) y se le determinó la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro (Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech, EUA) mediante una dilución 1:200 del conjugado en la disolución B. Luego se ajustó su densidad óptica entre 20 y 25 DO con volúmenes suficientes de la disolución B y se chequeó de igual manera la absorbancia a 520 nm. El conjugado final se conservó a 4 °C hasta por un año.

3.1.5 Material de calibración

La calibración se realizó mediante dos sistemas ELISA comerciales diseñados para la determinación cuantitativa de anticuerpos antitransglutaminasa en suero y plasma: anti-IgA (Celikey IgA) y anti-IgG (Celikey IgG) (Celikey Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania). Para ambos sistemas, según el fabricante, se consideró como negativo niveles de IgG o IgA $< 5\text{U/mL}$, como indeterminado entre 5 y 8 U/mL y como positivo $> 8\text{U/mL}$.

El calibrador de inmunoanálisis consistió en una mezcla de 3 mL de cinco sueros de pacientes celíacos al que se denominó control positivo fuerte (CPF), las muestras se tomaron en días previos a la biopsia de yeyuno y sin estar el paciente en dieta libre de gluten. El control negativo (CN) consistió en 30 mL de la mezcla de 1 mL de suero de 30 individuos sanos proveniente de Banco de Sangre con antecedentes de salud y sin antecedentes familiares de EC. A ambos controles se les realizó determinación de AATGt por los sistemas comerciales antes mencionados y se filtraron por una membrana de acetato de celulosa de 0,45 μm (Sartorius AG, Gotingen, Alemania). Se realizaron alícuotas de 150 μL , se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se utilizaron en menos de cinco ciclos de congelación y descongelación.

Para establecer los otros controles, se realizó una curva de dilución por duplicado del CPF en el CN y se escogió la dilución 1:50 que se denominó control positivo medio (CPM) y la dilución 1:100, último punto de la curva detectado por el ELISA Celikey IgG (resultó indeterminado por el Celikey IgA), que se denominó control positivo débil (CPD). Estas diluciones escogidas como controles medio (CPM) y débil (CPD) se preparaban en el momento de su uso y después se desechaban. En la tabla 3 se muestran los valores de IgA o IgG de los controles.

Tabla 3. Valores de IgA o IgG de los controles por Celikey IgA o Celikey IgG (Celikey Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania) realizados por duplicados.

	Celikey IgA media (U/mL) \pm DE	Celikey IgG media (U/mL) \pm DE
CPF	>100	>100
CPM	21 \pm 1,41	30 \pm 4,24
CPD	8 \pm 2,12	13 \pm 0,71
CN	<5	<5

CPF: Control Positivo Fuerte, CPM: Control Positivo Medio, CPD: Control Positivo Débil, CN: Control Negativo.
DE: Desviación estándar.

3.1.6 Titulación de la concentración de TGt en el recubrimiento

Se recubrieron en grupos de 20 tiras de NC (de 4 mm de ancho) a una distancia aproximada de 4 cm del borde inferior de la tira con 0,5; 1; 1,5 y 2,0 μg de TGt/tira en el tampón Tris-HCl 10 mmol/L,

CaCl₂ 5 mmol/L pH 7,5; siendo 1 μL el volumen de aplicación. Adicionalmente se aplicó 1 μL de una disolución acuosa del reactivo de control (compuesto por una disolución acuosa de un reactivo policatiónico) para alcanzar una concentración de 0,150 μg/tira a una distancia aproximada de 5 cm. del borde inferior de la tira. Sobre la membrana de captura de eritrocitos se depositó la disolución del conjugado de TGT-oro a razón de 5 μL por cada 4 mm de matriz, previa dilución 1:2 del conjugado entre 20 y 25 DO en la disolución C del conjugado (es una disolución acuosa compuesta por polímeros, proteínas, surfactantes, carbohidratos, azida de sodio 0,1% para garantizar la estabilidad del conjugado una vez deshidratado sobre su soporte en la tira inmunocromatográfica).

Las tiras y la matriz liberadora del conjugado se secaron por dos horas a 37 °C y luego se realizó el montaje de esta matriz y del material absorbente sobre la tira. Finalmente se evaluaron las tiras con las diferentes concentraciones de recubrimiento realizándose la corrida cromatográfica con 100 μL de cada uno de los controles: CPF, CPM, CPD y CN (ver preparación de los controles en el acápite 3.1.5) por duplicado y en un tiempo no mayor de 20 minutos (para considerar que un ensayo cromatográfico es rápido, el tiempo de corrida no debe ser mayor de 20 minutos) (Jelinek y otros 1999). Como criterio de selección para la mejor condición de recubrimiento se estableció que apareciera una señal fácilmente visible con el CPD, así como una ausencia de señal con el CN. A la señal producida por el CPF le asignamos una unidad arbitraria de tres, la del CPM de dos, a la del CPD de uno, y a la ausencia de señal del CN de cero. En caso de aparecer alguna señal perceptible con el CN también le asignamos uno como unidad arbitraria.

3.1.7 Selección del tiempo mínimo de corrida

Una vez seleccionada la mejor condición de recubrimiento se procedió a recubrir un grupo de 30 tiras para determinar el tiempo óptimo mínimo de corrida cromatográfica. Se siguió el mismo procedimiento descrito en el acápite 3.1.6. Se evaluaron tiempos de 5, 10, 15 y 20 minutos. La

corrida cromatográfica se realizó por duplicado con 100 μ L de cada uno de los controles: CPF, CPM, CPD y CN (ver preparación de los controles en el acápite 3.1.5). Como criterio de selección para el tiempo de corrida se estableció que apareciera una señal fácilmente visible con el control CPD y además ausencia de señal con el CN en un tiempo no mayor de 20 minutos. A las señales producidas con los distintos controles se le asignaron los mismos valores arbitrarios de intensidad propuestos en el acápite 3.1.6.

3.1.8 Estudios de estabilidad

3.1.8.1 Estudio de estabilidad acelerada a 60 °C

Este tipo de ensayo nos predice de forma muy fiel la estabilidad de un sistema a temperatura ambiente y a tiempo real (Gunter, 1999).

Una vez seleccionada la mejor condición de recubrimiento y de tiempo de corrida se procedió nuevamente a conformar un grupo de 100 tiras siguiendo el mismo procedimiento antes descrito en el acápite 3.1.6. Luego del proceso de secado y de montaje se procedió a colocar las tiras cortadas a 4 mm de ancho dentro de los casetes plásticos. Estos se envasaron y se sellaron dentro de sobres de aluminio plasticado (50 mm x 120 mm) con una bolsa de sílica gel como desecante. Un grupo de 50 tiras se sometió a un estrés térmico de 60 °C durante 9 días y las otras 50 se conservaron a TA (20-25 °C). En el estudio de estabilidad acelerada las tiras se evaluaron diariamente y la corrida cromatográfica se realizó por duplicado con 100 μ L de cada uno de los controles: CPF, CPM, CPD y CN (ver preparación de los controles en el acápite 3.1.5). Como criterio de estabilidad se estableció que apareciera en un tiempo no mayor de 20 minutos una señal fácilmente visible con el control CPD, ausencia de señal con el CN. A las señales producidas con los distintos controles se le asignaron los mismos valores arbitrarios de intensidad propuestos en el acápite 3.1.6.

Como criterios adicionales se establecieron que en todas las tiras tenía que aparecer señal en la línea control del ensayo y que además el conjugado debía desprenderse totalmente de su matriz liberadora. Una vez concluida la corrida cromatográfica, se procedía a desarmar los casetes para realizar la inspección visual del desprendimiento del conjugado.

3.1.8.2 Estudio de estabilidad acelerada a 60 °C con agente protector en el recubrimiento

Con este propósito siguiendo el mismo procedimiento antes descrito en el acápite 3.1.6, se conformaron un grupo de 100 tiras sin agente protector en el recubrimiento y 100 tiras con el agente protector en el recubrimiento. Luego se siguió el mismo protocolo descrito en el acápite anterior (3.1.8.2).

3.1.8.3 Estudio de estabilidad a tiempo real y a temperatura ambiente

Una vez seleccionadas las condiciones para el sistema luego de concluida la estabilidad acelerada, se conformó un grupo de 200 tiras siguiendo el procedimiento antes descrito (ver acápite 3.1.8.1) y se almacenaron a temperatura ambiente (20-25 °C). Las tiras se evaluaron mensualmente durante 15 meses, se siguió el mismo criterio descrito en el acápite 3.1.8.1 para el estudio de la estabilidad acelerada.

3.2 Estudio de sensibilidad y especificidad diagnósticas del sistema inmunocromatográfico

El estudio de sensibilidad se realizó con muestras de suero de 50 pacientes celíacos sin tratamiento y diagnosticados según la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición (Walker-Smith y otros, 1990), tres de ellos tenían además diagnóstico de déficit selectivo de IgA. Para la especificidad se testaron muestras de 40 pacientes que presentaban desórdenes intestinales pero que la EC se descartó mediante biopsia de yeyuno. Estos sueros utilizados para el estudio y la información relativa a los mismos se cedieron gentilmente por los Drs. José Antonio Garrote y Eduardo Arranz del Hospital Clínico Universitario, Valladolid, España (Sorell y otros, 2002).

Todas estas muestras se evaluaron con un ELISA comercial para anticuerpos IgA (Celikey IgA, Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania) contra transglutaminasa y anticuerpos IgA contra endomisio de mono (BioSystem, Barcelona, España), así como por el sistema inmunocromatográfico desarrollado por nuestro grupo.

La sensibilidad y especificidad de estos tres sistemas (ELISA, inmunofluorescencia indirecta y ensayo inmunocromatográfico) se calcularon sobre la base del resultado de la biopsia de yeyuno como estándar de oro para la enfermedad celíaca.

3.3 Prueba del sistema inmunocromatográfico con sangre, suero y plasma

Este estudio se realizó en 225 individuos, de ellos 25 pacientes con alta sospecha de EC por lo cual estaban ingresados en el Instituto de Gastroenterología para la realización de la biopsia de yeyuno confirmatoria y 200 individuos aparentemente sanos que estaban siendo sometidos a exámenes médicos de rutina por su centro laboral en la provincia de La Habana. A ambos grupos se les extrajo 10 mL de sangre luego que dieran su consentimiento informado (anexo 3) y se les llenó una planilla de recolección de datos (anexo 4). A todos se les realizó inmediatamente la determinación de AATGt con 100 μ L de sangre por el método inmunocromatográfico descrito previamente en el acápite 3.1. El resto de la sangre se dividió a partes iguales en tubo seco para la obtención del suero y en tubo con citrato de sodio al 3,2% para el plasma. Se realizaron alícuotas de 200 μ L de suero y plasma y se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización para la determinación de AATGt por el método inmunocromatográfico (acápite 3.1).

Los datos del resultado de la biopsia de los 25 pacientes con sospecha de EC se obtuvieron a *posteriori* y en todos se comprobaron cambios morfológicos en la histología de la mucosa intestinal compatibles con la EC.

Además, al grupo de individuos aparentemente sanos se les determinó en suero y plasma los AATGt por ELISA (Celikey IgA, Pharmacia & Upjohn, Diagnostics AB, Freiburg, Alemania). Los sujetos aparentemente sanos que resultaron positivos para AATGt por cualquiera de los métodos serológicos, se remitieron a consulta de gastroenterología para confirmar la enfermedad mediante biopsia de yeyuno y también se les realizó el genotipaje de las moléculas de HLA-DQ2/DQ8 según lo descrito en el acápite 3.8.

3.4 Estudios de precisión

3.4.1 Precisión intraensayo (repetibilidad)

Para este estudio se utilizó un grupo de tiras del lote destinado al estudio de estabilidad a tiempo real descrito en el acápite 3.1.8.2. La corrida cromatográfica se realizó con cinco réplicas de 100 μ L de cada uno de los controles: CPF, CPM, CPD y CN (ver preparación de los controles en el acápite 3.1.5). El análisis se realizó por dos observadores.

3.4.2 Precisión interdía (reproducibilidad)

Para este estudio se utilizó un grupo de tiras del lote destinado al estudio de estabilidad a tiempo real descrito en el acápite 3.1.8.2. Para ello la corrida cromatográfica se realizó por duplicado con 100 μ L de cada uno de los controles: CPF, CPM, CPD y CN (ver preparación de los controles en el acápite 3.1.5) a lo largo de 5 días consecutivos. El análisis se realizó por dos observadores.

3.4.3 Precisión interlote

Siguiendo el procedimiento descrito en el acápite 3.1.8.1 se conformaron tres lotes de 50 tiras cada uno. Para este estudio, la corrida cromatográfica se realizó por duplicado con 100 μ L de cada uno de los controles: CPF, CPM, CPD y CN. El análisis se realizó por dos observadores.

3.4.4 Precisión interlaboratorio

Se realizó en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid, España. En el acápite siguiente (3.5) se describe como se realizó este estudio.

3.5 Estudio comparativo del sistema inmunocromatográfico contra sistemas similares de la competencia (CD1 anti-TGt y CD1+2 anti-TGt y anti-gliadina, Operon, España)

3.5.1 Características de la seroteca

Los sueros utilizados para este estudio se cedieron gentilmente por el Dr. Eduardo Arranz del Hospital Clínico Universitario, Valladolid, España. Este estudio se realizó a ciegas, la información relativa a las muestras (anexo 1) se adquirió luego de la realización del ensayo en nuestro país.

El estudio de sensibilidad comparativo se realizó con muestras de suero de 22 pacientes celíacos (diagnosticados por biopsia de yeyuno y positivos para HLA-DQ2) con serología positiva para AATGt IgA y/o IgG (Celikey IgA y Celikey IgG, Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania). Para la especificidad de un total de 27 muestras con serología negativa para AATGt IgA e IgG (Celikey IgA y Celikey IgG, Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania), solo se testaron 22 muestras (19 familiares de primer grado, 2 pacientes celíacos en DLG y un paciente con enfermedad inflamatoria intestinal). Las cinco muestras faltantes no eran útiles para el uso a su llegada.

3.5.2 Sistema inmunocromatográfico

Para este fin se realizó un lote de 200 tiras en la Unidad de Producción de Diagnosticadores del CIGB de Sancti Spiritus y 100 de ellas se enviaron al Dr. Eduardo Arranz del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, España para realizar el mismo estudio interlaboratorios (ver anexo 2).

3.5.3 Sistemas inmunocromatográficos CD1 anti-TGt y CD1+2 anti-TGt y anti-gliadina, Operon, España

Para realizar este estudio se adquirieron cantidades suficientes de los sistemas CD1 anti-TGt y CD1+2 anti-TGt y anti-gliadina, Operon, España (Ferre-López y otros, 2004). A continuación se describe brevemente el procedimiento empleado para ambos sistemas.

Una vez atemperado los materiales a utilizar, para cada uno de los sueros se prepararon en viales de 1,5 mL una dilución 1:10 para el CD1 anti-TGt y de 1:30 para el CD1+2 en sus respectivos tampones de dilución. Se extrajeron de su envoltorio las tiras a utilizar y se introdujeron en posición vertical en los viales de reacción. Al sumergir las tiras en las muestras se tuvo el cuidado de no sobrepasar la zona marcada con las flechas. Se esperó 10 minutos de corrida cromatográfica. El análisis se realizó por dos observadores.

3.6 Utilidad del uso del sistema inmunocromatográfico en grupos de riesgo y población sana

3.6.1 Grupos de riesgo

3.6.1.1 Grupo de pacientes con trastornos gastrointestinales

Se disponía de un total de 637 sueros AAG positivos, pertenecientes a pacientes con trastornos gastrointestinales provenientes del Instituto de Gastroenterología. La edad promedio de este grupo de pacientes fue de $12 \pm 10,91$ años. A todos se les realizó determinación de AATGt por el método inmunocromatográfico descrito previamente en el acápite 3.1. Los que resultaron positivos se remitieron nuevamente a la consulta de gastroenterología para ser confirmada la EC mediante biopsia de yeyuno. En caso de existir discordancia entre el resultado de los AATGt y el resultado de la biopsia se les realizó genotipaje de los genes HLA DQ2 y DQ8 según lo descrito en el acápite 3.8.2.

A todos los pacientes se les extrajo la muestra de sangre luego que dieran su consentimiento informado (anexo 3) y se les llenó una planilla de recolección de datos (anexo 4).

3.6.1.2 Grupo de pacientes con trastornos gastrointestinales producto a infección por *Giardia lamblia*

Se estudiaron 40 pacientes cubanos con una edad media de 37 años (4-86 años), infestados por *Giardia lamblia*, para valorar la posibilidad de EC. A todos, el diagnóstico de giardiasis se confirmó por la búsqueda de parásitos en muestras de heces y de trofozoitos en la aspiración duodenal; además se investigó la EC por biopsia intestinal y por determinación de la presencia de AAG y AATGt. La enfermedad celíaca se sospechó cuando se encontraron alteraciones en la mucosa intestinal y al menos un marcador serológico (IgA AAG o IgA AATG). Las determinaciones séricas de anticuerpos IgA frente a gliadina (IgA AAG) se realizaron gentilmente por los Drs. José Antonio Garrote y Eduardo Arranz (Hospital Clínico Universitario, Valladolid, España) por ELISA (IgA UniCAP Gliadin, Pharmacia & Upjohn, Diagnostics AB, Freiburg, Alemania). Los anticuerpos antitransglutaminasa se detectaron por el ensayo inmunocromatográfico descrito previamente en el acápite 3.1. Además, también se determinaron los anticuerpos IgA antitransglutaminasa (IgA AATGt) por ELISA (Celikey IgA, Pharmacia & Upjohn, Diagnostics AB, Freiburg, Alemania). A los pacientes se les extrajo la muestra de sangre luego que dieran su consentimiento informado (anexo 3) y se les llenó una planilla de recolección de datos (anexo 4).

3.6.1.3 Grupo de pacientes con Diabetes mellitus dependiente de insulina (DMT1)

Se estudiaron 208 pacientes provenientes del Instituto Nacional de Endocrinología (INE) con diagnóstico de DMT1, con un promedio de edad de 19,04 años (2-58 años). A todos se les realizó determinación de AATGt por el método inmunocromatográfico descrito previamente en el acápite 3.1. Los que resultaron positivos se remitieron a la consulta de gastroenterología para la

confirmación de la EC mediante biopsia de yeyuno. A los pacientes se les extrajo la muestra de sangre luego que dieran su consentimiento informado (anexo 3) y se les llenó una planilla de recolección de datos (anexo 4).

3.6.1.4 Grupo de pacientes con Síndrome de Down y pacientes con tiroiditis autoinmune

Se disponía de un total de 263 sueros de pacientes con Síndrome de Down procedentes del Instituto de Gastroenterología y de 100 sueros de pacientes con diagnóstico de tiroiditis autoinmune provenientes del Instituto Nacional de Endocrinología (INE). A todos se les realizó determinación de AAG y AATGt.

Los AAG se realizaron por el método AuBIO Dot anti gliadina (Heber Biotec S.A, La Habana, Cuba). El método se basa en tiras de ocho pocillos de poliestireno blanco opaco recubiertas con gliadina de trigo (Sigma, EUA). Los sueros a probar previamente diluidos 1:50 en tampón de lavado (PBS-Tween 20 al 0,5%) son añadidos a los pocillos y se incuban durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego de un lavado con PBS-Tween 20 al 0,5%, se añade un conjugado de proteínas A oro coloidal y se incuba por 10 minutos. Posterior a un nuevo lavado con PBS-Tween 20 al 0,5% la reacción es amplificada añadiendo una disolución de iones de plata (Amersham Rainham. Essex, Reino Unido). La reacción termina después de cinco minutos añadiendo agua destilada en exceso. La intensidad del color de cada pocillo es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos antigliadina en las muestras. En el juego de reactivo se incluye una muestra positiva alta y una muestra de control de corte que sirven para clasificar las muestras en positivas o negativas por simple inspección visual (Garrote y otros 1999).

Los AATGt se realizaron por el método inmunocromatográfico descrito previamente en el acápite 3.1.

A los médicos de cabecera de estos pacientes se les notificaron los resultados de los marcadores

realizados y en el caso de ser positivos para AATGt se les sugirió que la EC debía ser diagnosticada mediante biopsia de yeyuno.

3.6.2 Población sana

3.6.2.1 Grupo de adultos sanos

Se describe como parte del acápite 3.3.

3.6.2.2 Grupo de niños sanos

Se estudiaron un total de 595 muestras de suero de niños sanos (sin antecedentes de vómitos, diarreas, distensión abdominal, retraso del crecimiento, ni antecedentes de familiares con EC) provenientes de la provincia de Pinar del Río, con una edad comprendida entre los 3 años y los 3 años 11 meses y 29 días. Las muestras se facilitaron por el Instituto de Gastroenterología y se les realizó determinación de la presencia de AATGt por el método inmunocromatográfico descrito previamente en el acápite 3.1. Posteriormente se les realizó determinación de anticuerpos IgA e IgG antitransglutaminasa mediante los sistemas comerciales Celikey IgA y Celikey IgG (Celikey Pharmacia & Upjohn, Diagnostics AB, Freiburg, Alemania). Al Instituto de Gastroenterología se le notificó los individuos que resultaron positivos para AATG por cualquiera de los métodos para que les realizaran confirmación de la enfermedad mediante biopsia de yeyuno.

3.7 Estudio de concordancia entre el resultado serológico por el sistema inmunocromatográfico y la biopsia de yeyuno

Para este estudio se seleccionaron aquellos pacientes de los diferentes grupos de riesgos estudiados a los cuales se les realizó la biopsia de yeyuno y la determinación de AATGt por el sistema inmunocromatográfico, para un total de 103 pacientes con ambos procedimientos realizados.

3.8 Estudio de genes asociados a la enfermedad celíaca (HLA-DQ2 y DQ8) en pacientes con EC y familiares de primer grado

3.8.1 Pacientes y controles

El estudio incluyó un total de 22 pacientes celíacos, con un promedio de edad de 15 años (2-35 años). Se estudiaron 18 pacientes al debut de la enfermedad y cuatro en régimen de dieta libre de gluten, procedentes de consulta del Instituto de Gastroenterología. El diagnóstico de la EC se basó en un resultado positivo con el ensayo para anticuerpos antitransglutaminasa por el método inmunocromatográfico descrito previamente en el acápite 3.1 y confirmado por una biopsia de yeyuno según los criterios de la ESPGAN (Walker-Smith y otros, 1990). Se estudiaron además 54 familiares de primer grado de los pacientes celíacos y 60 sujetos sanos como controles pareados por sexo, edad y color de la piel. A todos se les realizó determinación de AATGt, los que resultaron positivos se remitieron a la consulta de gastroenterología para ser confirmados por biopsia de yeyuno. Todos los pacientes, familiares y sujetos controles firmaron su consentimiento para formar parte de este estudio (anexo 3) y se les llenó una planilla de recolección de datos (anexo 4).

3.8.2 Genotipaje HLA-DQ

El análisis de los alelos de HLA se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa empleando el “*Go Taq PCR Core System II*” de la firma *Promega* (EUA). En la tabla 4 se muestran los alelos de HLA analizados en el estudio, así como las condiciones empleadas para el PCR (Olerup y otros, 1993). La presencia o no de los alelos de HLA analizados se determinó a través de geles de agarosa al 2%.

Tabla 4. Cebadores y condiciones del PCR para los alelos de HLA analizados (tomado de Olerup y otros, 1993)

HLA-alelos	Cebadores(5'-3')	C(MgCl ₂) (mmol/L)	PCR(°C) 30 ciclos
	HLA-DQ2		
HLA-DQA1*0501	ACG GTC CCT CTG GCC AGT A AGT TGG AGC GTT TAA TCA GAC	2,0	95/62/72
HLA-DQB1*02	GTG CGT CTT GTG AGC AGA AG GCA AGG TCG TGC GGA GCT	2,0	95/62/72
	HLA-DQ8		
HLA-DQA1*0301	TTC ACT CGT CAG CTG ACC AT CAA ATT GCG GGT CAA ATC TTC T	2,0	95/62/72
HLA-DQB1*0302	GAC GGA GCG CGT GCG TTA AGT ACT CGG CGT CAG GCG	2,0	95/60/72
	Control interno		
DR52	TGC CAA GTG GAG CAC CCA A GCA TCT TGC TCT GTG CAG AT	2,0	95/62/72

C(MgCl₂) Concentración de cloruro de magnesio empleada en el PCR.

PCR (°C): Temperaturas de desnaturalización/ Hibridación/ extensión del PCR para cada HLA

3.9 Análisis estadísticos

Para realizar el análisis de los resultados para cada uno de los inmunoensayos utilizados respecto al sistema de referencia empleado, se utilizó el Programa para Análisis Epidemiológico de Datos Tabulados (EPIDAT) versión 3.1.

Para los análisis de sensibilidad y especificidad se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

- Sensibilidad: Es el porcentaje de individuos con la enfermedad, que tienen un resultado positivo.

$$\text{Sensibilidad} = (\text{verdaderos positivos} / (\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos})) \times 100$$

- Especificidad: Es el porcentaje de individuos sin la enfermedad, que tienen un resultado negativo.

$$\text{Especificidad} = (\text{verdaderos negativos} / (\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos})) \times 100$$

Los resultados de sensibilidad y especificidad se informaron en % y entre paréntesis el intervalo de confianza (IC) para un 95% de confiabilidad.

Con el objetivo de determinar el grado de concordancia entre los sistemas evaluados se determinó el Índice de Concordancia Kappa (K), que se utiliza con el fin de determinar hasta que punto la concordancia observada es superior a la que es esperable obtener por puro azar (Landis y Koch, 1977; Cohen, 1960). En caso de acuerdo perfecto la proporción de concordancia será la unidad (Tabla 5).

Tabla 5. Escala de rangos de valores (Grados de concordancia) según Landis y Koch, 1977.

kappa	Grado de acuerdo
< 0,00	sin acuerdo
>0,00 - 0,20	insignificante
0,21 - 0,40	discreto
>0,41 - 0,60	moderado
0,61 - 0,80	sustancial
0,81 - 1,00	casi perfecto

Para la comparación de la seguridad de las pruebas diagnósticas tuvimos en cuenta:

- Valor Predictivo Positivo (VPP): Es la probabilidad (o proporción) de tener realmente la enfermedad, cuando su resultado es positivo.

$$\text{VPP} = \text{verdaderos positivos} / (\text{verdaderos positivos} + \text{falsos positivos}).$$

- Valor Predictivo Negativo (VPN): Es la probabilidad (o proporción) de no tener la enfermedad cuando el resultado es negativo.

$$\text{VPN} = \text{verdaderos negativos} / (\text{falsos negativos} + \text{verdaderos negativos}).$$

Para comparar la frecuencia de alelos del HLA DQ2 y DQ8 entre pacientes y controles se utilizaron las pruebas de Fisher y la de Chi cuadrado con corrección de Yates para comparar la frecuencia de dichos alelos entre los familiares de primer grado y los controles en tablas de 2X2. También se estimó la razón de probabilidad (RP) (95% CI). Para todos los casos se consideró la existencia de

diferencias significativas para una probabilidad igual o menor de 0,05. Estos cálculos se realizaron con el software SPSS 11.0; SPSS, Chicago, IL.

CAPITULO 4. RESULTADOS

4.1 Desarrollo del ensayo inmunocromatográfico para la detección de anticuerpos anti TGt (AATGt)

4.1.1 Condiciones para la preparación del conjugado TGt-oro coloidal (pH del coloide y cantidad mínima protectora de TGt)

Los experimentos realizados para determinar el pH del coloide de oro y determinar la cantidad mínima de TGt protectora del coloide, permitieron establecer que la disolución de oro coloidal quedaba completamente protegida de la floculación al añadir volúmenes entre 7,5 y 15 μL de K_2CO_3 0,1 mol/L por cada mililitro de la disolución coloidal (esto se corresponde con valores de pH entre 7,0 y 10,0) y a cantidades de TGt entre 8 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de coloide (figura 3 a y b).

Se escogieron como parámetros de la conjugación por cada mililitro de la disolución coloidal: 10 μL de K_2CO_3 0,1 mol/L que se corresponde con un valor de pH de 7,5 y 10 μg de TGt como cantidad protectora.

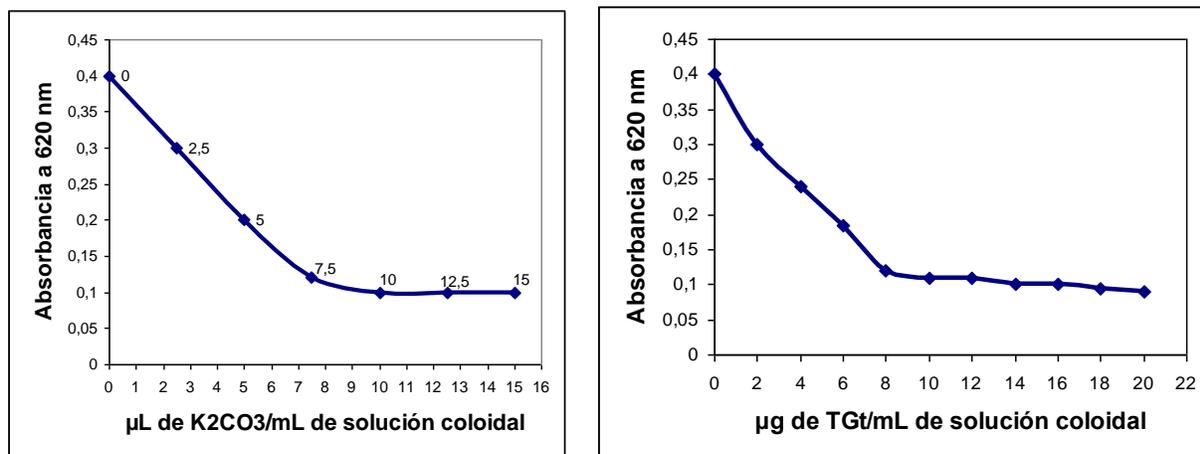


Fig. 3: Condiciones de conjugación de la TGt a oro coloidal 40 nm BBI en un aumento de la fuerza iónica:

- volumenes de K_2CO_3 0,1 mol/L por cada mililitro de coloide.
- Cantidad de TGt por cada mililitro de coloide a pH 7,5.

4.1.2 Titulación de la cantidad de TGt para el recubrimiento de las tiras

Luego de establecer las condiciones de la preparación del conjugado de TGt-oro coloidal se procedió a determinar la mejor cantidad de TGt en el recubrimiento de la tira de nitrocelulosa y se escogió 1 μg de TGt por tira. Como puede apreciarse en la figura 4 luego de 20 minutos de corrida cromatográfica, para las tiras recubiertas con 0,5 μg de TGt aparece señal con el CPF y el CPM pero no hay señal visible con el CPD y no se obtiene señal con el CN. Con las tiras recubiertas a 1 y 1,5 μg se obtuvo un comportamiento similar para ambas, con estas se detecta el CPF, CPM y el CPD que es visible a los 20 minutos sin ninguna dificultad y además con el CN no aparece señal visible. Por el contrario con las tiras recubiertas con 2 μg de TGt se observan señales con todos los controles incluyendo al CN. En la figura 5 se muestra un ejemplo visual de las unidades arbitrarias asignadas según la intensidad de las señales desarrolladas en la tira inmunocromatográfica con los diferentes controles establecidos.

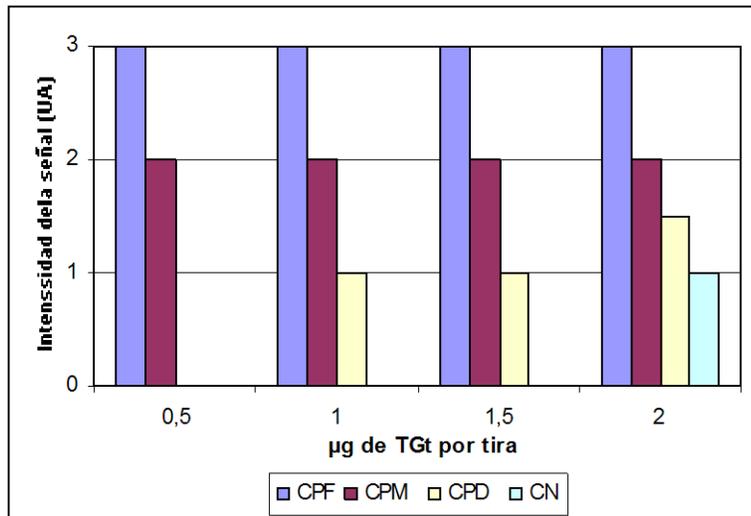


Fig.4: Determinación de la concentración de recubrimiento mediante percepción visual de la intensidad de la señal dada en unidades arbitrarias (UA). Intensidad de señal 3 corresponde a una señal fuertemente visible; intensidad 2 corresponde con una señal visible; intensidad 1 corresponde con una señal débilmente visible e intensidad 0 con ausencia de señal. CPF: control positivo fuerte, CPM: control positivo medio, CPD: control positivo débil, CN: control negativo. Tiempo de corrida 20 minutos, las muestras se aplicaron por duplicado y el experimento se repitió 3 veces consecutivas. El análisis se realizó siempre por los mismos observadores (2). Galván JA, 2011

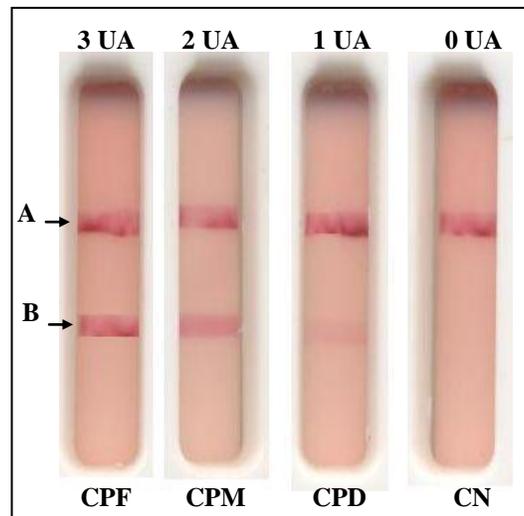


Fig.5: Unidades arbitrarias (UA) asignadas según la intensidad de la señal en la corrida cromatográfica. 3UA corresponde a una señal fuertemente visible; 2UA corresponde con una señal visible; 1UA corresponde con una señal débilmente visible y 0UA corresponde con ausencia de señal. CPF: control positivo fuerte, CPM: control positivo medio, CPD: control positivo débil, CN: control negativo. Tiempo de corrida 20 minutos. A: línea control B: línea específica.

4.1.3 Establecimiento del tiempo de corrida

El experimento realizado para determinar este parámetro nos permitió confirmar que el tiempo factible de corrida es de 20 minutos para lograr una correcta detección de muestras con una señal baja. A los 5 minutos solo se detectaba el CPF, entre los 10 y 15 minutos se comenzó a detectar además el CPM y a los 20 minutos las señales del CPF, CPM y CPD se hicieron francamente visibles. En los tiempos ensayados no se observó señal con el CN (Figura 6).

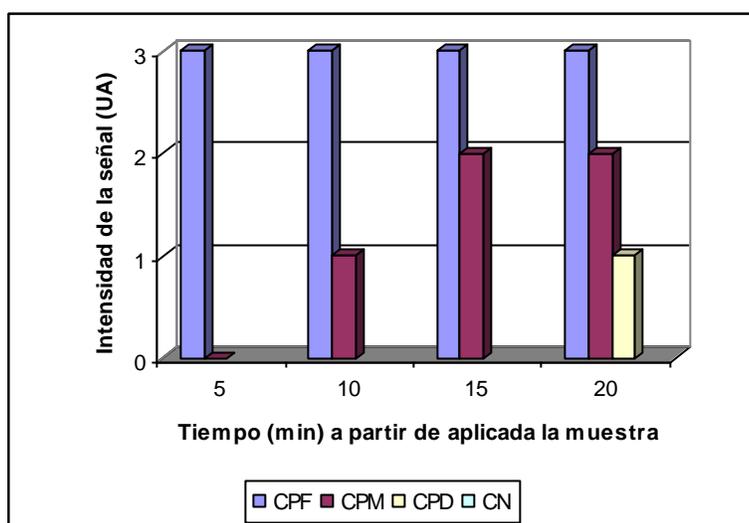


Fig.6: Determinación del tiempo de corrida inmunocromatográfica mediante percepción visual de la intensidad de la señal dada en unidades arbitrarias (UA). Intensidad de señal 3 corresponde a una señal fuertemente visible; intensidad 2 corresponde con una señal visible; intensidad 1 corresponde con una señal débilmente visible e intensidad 0 con ausencia de señal. CPF: control positivo fuerte, CPM: control positivo medio, CPD: control positivo débil, CN: control negativo. Las muestras se aplicaron por duplicado y el experimento se repitió 3 veces consecutivas. El análisis se realizó siempre por los mismos observadores (2).

4.1.4 Estudios de estabilidad del sistema

4.1.4.1 Estudio de estabilidad acelerada del recubrimiento a 60 °C

Con el objetivo de conocer *a priori* cual o cuales de los componentes del prototipo de sistema pueden resultar más inestables en el tiempo, este se sometió a un estrés térmico para así simular el envejecimiento a tiempo real. El recubrimiento resultó el elemento inestable del prototipo de

sistema. Se arribó a esta conclusión porque cuando se sustituyó en la tira sometida al estrés térmico el conjugado por un conjugado conservado a TA (20-25 °C), no se observó señal con ninguno de los controles positivos. En cambio cuando este conjugado que le fue retirado a las tiras sometidas al estrés térmico se utilizó en tiras inmunocromatográficas conservadas a TA (20-25 °C) se observó señal con los controles positivos y ausencia de señal con el CN.

Como puede apreciarse en la figura 7 la formulación inicial empleada en el recubrimiento no garantizó la estabilidad de la proteína utilizada en el recubrimiento. A los tres días de estudio a 60 °C el sistema no era capaz de detectar al CPM y CPD. Por lo que hubo que modificar la formulación del tampón de recubrimiento y se identificó un agente protector (carbohidrato) que permitió garantizar la estabilidad del prototipo del sistema durante 9 días a 60 °C. No apareció ninguna señal inespecífica en la línea de captura con el CN. En todas las tiras se pudo observar la señal en la línea control del ensayo y al desarmar los casetes también se comprobó el total desprendimiento del conjugado de su matriz liberadora.

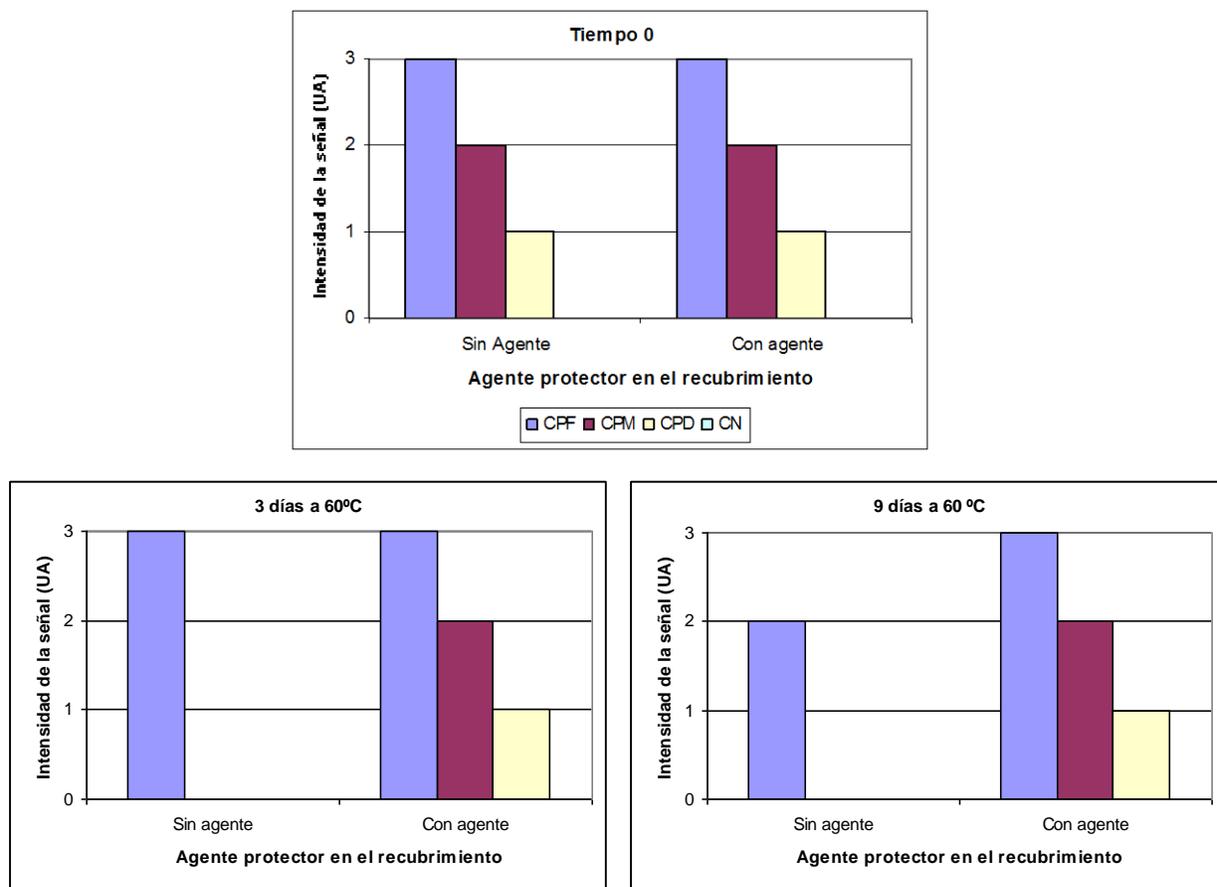


Fig.7: Estudio de estabilidad acelerada del sistema a 60 °C con y sin agente protector en el recubrimiento. Se realiza comprobación mediante percepción visual de la intensidad de la señal dada en unidades arbitrarias (UA). Intensidad de señal 3 corresponde a una señal fuertemente visible; intensidad 2 corresponde con una señal visible; intensidad 1 corresponde con una señal débilmente visible e intensidad 0 con ausencia de señal. CPF: control positivo fuerte, CPM: control positivo medio, CPD: control positivo medio, CN: control negativo. Tiempo de corrida 20 minutos, las muestras se aplicaron por duplicado y el experimento se repitió 3 veces consecutivas. El análisis se realizó siempre por los mismos observadores (2).

4.1.5.2 Estudio de estabilidad a tiempo real y a temperatura ambiente del sistema

Para verificar si realmente el prototipo de sistema desarrollado era estable en su conjunto se procedió al montaje de la estabilidad a tiempo real y a temperatura ambiente (20-25 °C). Como se muestra en la figura 8 se comprobó que durante los 15 meses de estudio de estabilidad, el sistema era capaz de detectar a los 20 minutos el CPM y el CPD sin que apareciera señal visible con el CN. En todas las tiras se pudo observar la señal en la línea control del ensayo y al desarmar los casetes también se comprobó el total desprendimiento del conjugado de su matriz liberadora.

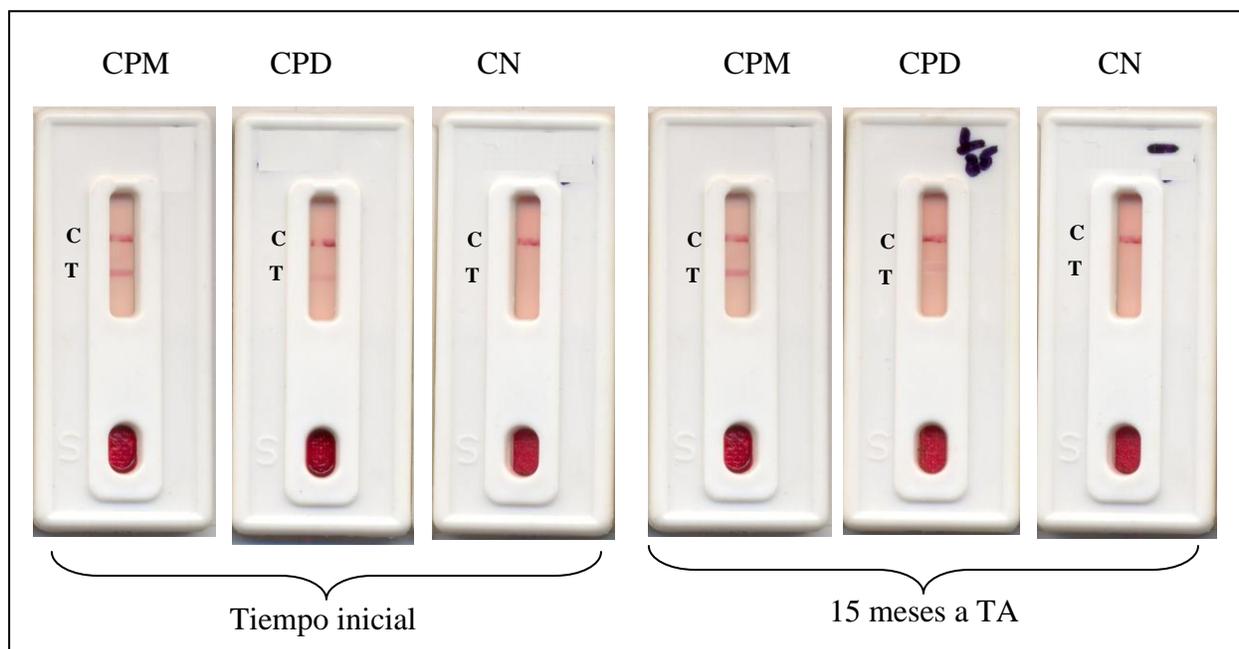


Fig. 8: Estudio de estabilidad a tiempo real y a temperatura ambiente del prototipo de sistema. CPM: control positivo medio, CPD: control positivo débil, CN: control negativo. C: Línea Control, T: línea específica. Tiempo de corrida 20 minutos, las muestras se aplicaron por duplicado. El análisis se realizó siempre por los mismos observadores (2)

4.2 Estudio de sensibilidad y especificidad diagnósticas del sistema inmunocromatográfico

Para verificar el desempeño del prototipo de sistema desarrollado, se realizó la evaluación con muestras de suero de 50 pacientes celíacos sin tratamiento y diagnosticados según la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición, pudiéndose comprobar que el ensayo resultó positivo en los 50 pacientes para un 100% de sensibilidad (95% CI, 92,9-100%) independientemente de que existían tres muestras con déficit selectivo de IgA, por lo tanto el sistema inmunocromatográfico pudo detectar respuestas de tipo IgA e IgG en una misma prueba.

Estas mismas muestras se evaluaron con un ELISA comercial (Celikey IgA, Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania) para anticuerpos IgA contra transglutaminasa y anticuerpos IgA contra endomisio de mono (BioSystem, Barcelona, España), de ellas 47 muestras fueron positivas por el ELISA para una sensibilidad del 94% (IC 95%: 88,2-98,4%) y 48 positivas por inmunofluorescencia indirecta para un 96% (IC 95%: 89,1-99%).

Las muestras de los 40 pacientes que presentaban desórdenes intestinales en los que la EC fue descartada por biopsia de yeyuno fueron negativas por los tres sistemas para un 100% de especificidad (IC 95%: 91,2-100%).

4.3 Prueba del sistema inmunocromatográfico con sangre, suero y plasma

Con el objetivo de comprobar la posibilidad del uso de muestras de sangre, de suero y de plasma en el sistema inmunocromatográfico se estudiaron de 25 pacientes con diagnóstico de EC por biopsia de yeyuno, todos resultaron positivos para los AATGt por el método inmunocromatográfico independientemente del tipo de muestra empleada para su determinación.

También se analizaron 200 individuos aparentemente sanos. De ellos solo un individuo resultó positivo para AATGt por el sistema inmunocromatográfico para muestra de sangre, suero o plasma. También, este mismo individuo resultó positivo para AATGt en suero y plasma cuando se le realizó la misma determinación por el sistema comercial ELISA Celikey IgA (Celikey Pharmacia & Upjohn, Diagnostics AB, Freiburg, Alemania). Se comprobó además, que esta persona tenía anemia (hemoglobina 10 g/L) por déficit de hierro durante el análisis médico de rutina.

Al resto de las 199 personas incluidas en el estudio también se les realizaron los mismos procedimientos antes descritos y todas resultaron negativas para los AATGt por ambos procederes (inmunocromatográfico y ELISA Celikey IgA) independientemente del tipo de muestra utilizada. En la tabla 6 se muestran los resultados de la prueba del sistema inmunocromatográfico con muestras de sangre, suero y plasma.

El sujeto positivo para AATGt se sometió a biopsia de yeyuno donde se detectó una atrofia parcial de las vellosidades con marcado incremento de los linfocitos intraepiteliales (LIEs), cambios morfológicos compatibles con EC. Además a este sujeto se le comprobó la presencia de ambos alelos del HLA-DQ2 (HLA-DQA1* 0501-DQB1* 02) cuando se le realizó la determinación de los

genes HLA-DQ2/DQ8 (ambos asociados al desarrollo de la EC en estos pacientes). Este individuo se clasificó como enfermo celíaco y se le estableció una dieta libre de gluten (DLG). Al año de evolución se comprobó que el marcador serológico era negativo tanto para muestra de sangre, suero o plasma y se constató una mejoría clínica (Hemoglobina 12 g/L) e histológica (mucosa normal con ligero incremento de los LIEs).

Tabla 6. Prueba del sistema inmunocromatográfico con muestras de sangre, suero y plasma.

Sistema inmunocromatográfico	Sangre		Suero		Plasma	
	AATGt		AATGt		AATGt	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Pacientes celíacos no tratados (n=25)	25*	0	25*	0	25*	0
Individuos aparentemente sanos (n=200)	1*	199	1*	199	1*	199

*casos confirmados por biopsia de yeyuno

4.4 Estudios de precisión

Los resultados obtenidos en las pruebas de precisión intraensayo (reproducibilidad), interdía (repetibilidad) e interlote fueron similares demostrando la alta precisión del ensayo inmunocromatográfico.

4.5 Estudio comparativo del sistema inmunocromatográfico contra sistemas similares de la competencia (CD1 anti-TGt y CD1+2 anti-TGt y anti-gliadina, Operon, España)

En el análisis realizado con las muestras positivas se pudo comprobar que el sistema inmunocromatográfico nuestro era capaz de detectar las 22 muestras positivas para AATGt IgA y/o IgG (Celikey IgA y Celikey IgG, Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania) para un 100% (IC 95% 97,73; 100) de sensibilidad; el CD1+2 anti-TGt y antigliadina detectó correctamente 21 muestras (un falso negativo) para un 95,45% (IC 95%: 84,4; 100) y el sistema CD1 anti-TGt solo detectó 20 muestras (dos falsos negativos) para un 90,91% (IC 95%: 76,62; 100).

Cuando comparamos los tres sistemas inmunocromatográfico con las muestras negativas pudimos comprobar que nuestro sistema de las 22 muestras negativas para AATGt IgA e IgG (Celikey IgA y Celikey IgG, Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania), clasificó correctamente 21 muestras (un falso positivo), el CD1+2 anti-TGt y anti-gliadina 20 muestras (dos falsos positivos) y el CD1 anti-TGt las 22 muestras para un 95,45% (IC 95%: 84,48; 100), 90,91% (IC 95%: 76,62; 100) y 100% (IC 95%: 97,73; 100) de especificidad respectivamente.

Se obtuvo una concordancia de 0,95 ($p_{\text{kappa}}=0,00$) entre los resultados por nuestro sistema inmunocromatográfico y por AATGt IgA y/o IgG (Celikey IgA y Celikey IgG, Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania). Mientras que para los sistemas CD1 anti-TG y CD1+2 anti-TGt y anti-gliadina fue de 0,86 ($p_{\text{kappa}}=0,00$) y 0,90 ($p_{\text{kappa}}=0,00$) respectivamente.

Estos resultados se muestran en la tabla 7 y se calcularon sobre la base del resultado de los AATGt IgA e IgG (Celikey IgA y Celikey IgG, Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania).

Este mismo estudio se realizó por el Dr. Eduardo Arranz del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, España y se obtuvieron resultados similares, corroborándose además la precisión interlaboratorios (ver anexo 2).

Tabla 7. Comparación del sistema inmunocromatográfico (INMC), CD1 anti-TGt (CD1) y CD1+2 anti-TGt y anti-gliadina (CD1+2) utilizando como patrón de referencia los resultados de 22 muestras positivas y 22 negativas por el ELISA comercial Celikey IgA y Celikey IgG, Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania.

	INMC	CD1	CD1+2
Sensibilidad (%)	100 IC (97,73 ; 100)	90,91 IC (76,62 ; 100)	95,45 IC (84,48 ; 100)
Especificidad (%)	95,45 IC (84,48 ; 100)	100 IC (97,73 ; 100)	90,91 IC (76,62 ; 100)
Concordancia ^(a)	0,95 ^(b)	0,86 ^(b)	0,90 ^(b)
VPP ^(c) (%)	95,65	100	91,67
VPN ^(d) (%)	100	91,67	95,65

^a Prueba de kappa ^b $p_{\text{kappa}}=0,00$ ^c Valor Predictivo Positivo ^d Valor Predictivo Negativo
IC: intervalo de confianza al 95%

4.6 Utilidad del uso del sistema inmunocromatográfico en grupos de riesgo y población sana

4.6.1 Grupos de riesgo

4.6.1.1 Grupo de pacientes con trastornos gastrointestinales

Del total de 637 pacientes con síntomas clínicos, AAG positivos y con criterio para la realización de biopsia, solo 88 resultaron positivos para AATGt para una seroprevalencia del 13,81%. Hasta la terminación de este trabajo, se le había realizado la biopsia de yeyuno a 57 de los 88 pacientes, de estos, 56 tuvieron un patrón histológico compatible con la EC y un paciente resultó negativo en dos ocasiones por este proceder. A este paciente debido a la incongruencia entre el resultado de los AATGt y el resultado de la biopsia, se le realizó genotipaje de los alelos de riesgo para EC (DQB1*02 y DQA1*0501 (DQ2) y DQB1*0302 y DQA1*03 (DQ8)) y resultó negativo para todos los alelos. La prevalencia probada por biopsia en este grupo de pacientes fue de un 8,95%.

4.6.1.2 Grupo de pacientes con giardiasis

De los 40 pacientes con giardiasis, 37 presentaban una estructura de las vellosidades normal y tres un patrón histológico alterado. En el grupo de 37 individuos con histología normal, se encontraron anticuerpos IgA antigliadina (AAG) en 30 pacientes para una especificidad del 82%. Ninguno de estos pacientes tenían AATGt en el ensayo inmunocromatográfico ni en ELISA (100% especificidad).

Los tres pacientes que tenían un patrón histológico alterado, presentaban una atrofia subtotal de las vellosidades y linfocitosis intraepitelial compatible con el diagnóstico de EC. La gravedad de las lesiones fue muy similar en todos los pacientes y no fue posible diferenciarlas en la exploración histológica; sin embargo, sólo dos de ellos tuvieron resultados positivos de AATGt en ambas pruebas. Estos dos individuos se clasificaron como pacientes con sospecha de EC y se les estableció una dieta libre de gluten (DLG) junto con el tratamiento específico de la giardiasis, observándose

una mejoría clínica en el seguimiento. La recuperación histológica se valoró al año por una segunda biopsia intestinal y el hecho de que los marcadores serológicos fueran negativos confirmó el diagnóstico (criterio revisado de la ESPGAN) (Walker-Smith y otros, 1990).

Al tercer paciente que tuvo una mucosa con atrofia subtotal y AATGt negativos, solo se trató con secnidazol (30 mg/kg) y no se le suprimió el gluten de la dieta. También se le realizó biopsia intestinal y determinación de AATGt evolutivos y a pesar de no suprimirle el gluten de la dieta se observó una recuperación histológica en la biopsia y el marcador serológico continuó negativo.

4.6.1.3 Grupo de pacientes con Diabetes mellitus dependiente de insulina (DMT1)

De los 208 pacientes estudiados, 194 resultaron negativos para AATGt y 14 resultaron positivos para una seroprevalencia de un 6,73%. De estos 14 pacientes solo dos de ellos (14,28%) presentaban síntomas clínicos asociados a EC (dolor abdominal, diarrea y anorexia), los restantes 12 pacientes no mostraron síntomas asociados.

La confirmación de la EC se realizó mediante biopsia de yeyuno en solo seis pacientes, que dieron su consentimiento, el resto se negó. En todos ellos se observaron cambios morfológicos en la mucosa yeyunal consistente con EC, cinco pacientes tuvieron una atrofia parcial de las vellosidades intestinales con un aumento del número de linfocitos intraepiteliales y uno mostró una atrofia subtotal de las vellosidades con un aumento del número de linfocitos intraepiteliales. Por lo que la prevalencia de la EC diagnosticada por biopsia intestinal en este grupo de riesgo es de un 2,88% (6/208).

En el grupo de seis pacientes diabéticos con AATGt positivos y EC confirmada por biopsia, en cuatro pacientes el diagnóstico de la EC se realizó al debut de la diabetes y dos de ellos presentaron síntomas sugestivos de EC (dolor abdominal, diarrea y anorexia). En los otros dos pacientes

diabéticos con AATGt positivos y EC confirmada por biopsia el diagnóstico se realizó a los 2 y 10 años respectivamente del debut; ninguno de estos dos pacientes tenía síntomas sugestivos de EC.

4.6.1.4 Grupo de pacientes con Síndrome de Down y pacientes con tiroiditis autoinmune

Se determinó que de los 263 pacientes con Síndrome de Down estudiados, 63 (23,9%) de ellos resultaron AAG positivos y 200 negativos; mientras que para los AATGt solo seis (2,2%) fueron positivos.

En el caso de los 100 pacientes con tiroiditis autoinmune, en 13 (13%) de ellos se determinó la presencia de AAG. Los restantes 87 resultaron negativos para este marcador. Sin embargo cuando se les realizó determinación de AATGt, solo resultaron positivos 3 (3%) pacientes y 97 resultaron negativos.

4.6.2 Población sana

4.6.2.1 Grupo de adultos sanos

Estos resultados se muestran en el acápite 4.3.

4.6.2.2 Grupo de niños sanos

En este estudio se determinó que siete niños resultaron positivos para AATGt tanto por el sistema inmunocromatográfico como por el ELISA Celikey IgG (Celikey Pharmacia & Upjohn, Diagnostics AB, Freiburg, Alemania), los restantes 588 niños resultaron negativos por ambos procedimientos. En cambio solo cinco niños resultaron positivos por el ELISA Celikey IgA (Celikey Pharmacia & Upjohn, Diagnostics AB, Freiburg, Alemania) y 590 resultaron negativos (de este grupo, dos resultaron positivos por el inmunocromatográfico y por el Celikey IgG). Cuando se realizó la escritura de este trabajo no se tenían los resultados de la biopsia de yeyuno de los niños que resultaron positivos para AATGt por cualquiera de los procedimientos realizados.

4.7 Estudios de concordancia entre resultado serológico por el sistema inmunocromatográfico y la biopsia de yeyuno

Del total de 103 pacientes estudiados, se corroboró que de los 65 pacientes que resultaron positivos para AATGt y que tenían realizada la biopsia de yeyuno, un total de 64 coincidieron para ambos procedimientos. Mientras que los 38 pacientes negativos para AATGt y que tenían realizada la biopsia de yeyuno todos coincidieron (Tabla 8). En este caso el índice de concordancia entre las pruebas realizadas es de 0,98; lo que es considerado como un grado de acuerdo casi perfecto entre ambas pruebas, según se refiere en la escala de Landis y Koch (Landis y Koch, 1977).

Tabla 8. Estudio de concordancia entre anticuerpos antitransglutaminasa (AATGt) y Biopsia de yeyuno

Grupo	N	Biopsia+ AATGt +	Biopsia – AATGt +	Biopsia – AATGt –
Síntomas clínicos	57	56	1	0
Diabetes mellitus T1	6	6	0	0
Giardiasis	40	2	0	38
Total	103	64	1	38

Concordancia 0,98 p(kappa)=0,00

4.8 Estudio de genes asociados a la enfermedad celíaca (HLA-DQ2 y DQ8) en pacientes con EC y familiares de primer grado

Cuando se estudió la proporción de pacientes positivos para el heterodímero del HLA-DQ2 la proporción de pacientes fue significativamente mayor cuando lo comparamos con los controles sanos: 86,3% versus 20%, $p=0,000004$; RP: 4,32 (CI: 0,090–0,554), estos resultados se muestran en la tabla 9 y en la figura 9 se expone una muestra del resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto del PCR con los cebadores del alelo DQB1*02 del HLA-DQ2 en pacientes y controles.

La proporción de los alelos DQA1*0501 y DQB1*02 del HLA-DQ2 también fue mayor en los pacientes que en los controles: 86,3% versus 56,6%, y 90,2% versus 45% respectivamente; pero no se detectó diferencia significativa entre ambos grupos.

La proporción del heterodímero del HLA-DQ2 en familiares de primer grado de los pacientes celíacos también fue mayor cuando los comparamos contra los controles sanos: 70,3% versus 20%, $p=0,0006$; RP: 3,52 (CI: 0,135–0,599). Un familiar de primer grado presentó solo el alelo DQB1*02.

En cuanto al HLA-DQ8 (DQA1*0301, DQB1*0302), de los 22 pacientes uno resultó positivo para ambas cadenas del heterodímero y otro solo positivo para el alelo DQA1*03 de este gen.

Tabla 9. HLA-DQA1*0501 y DQB1*02 en pacientes, familiares de primer grado y controles.

	N	DQA1*0501	DQB1*02	HLA DQ2 + (Ambos alelos)
Pacientes celíacos	22	19 (86,3%) ($p = 0,26$)	20 (90,2%) ($p = 0,06$)	19 (86,3%) ($p = 0,000004$) RP:4,32 (CI: 0,090-0,554)
Familiares de primer grado	54	38 (70%) ($p = 0,012$)	48 (90%) ($p = 0,020$)	38 (70%) ($p = 0,0006$) RP:3,52 (CI: 0,135-0,599)
Controles	60	34 (56,6%)	27 (45%)	12 (20%)

Valores de p comparado contra controles.

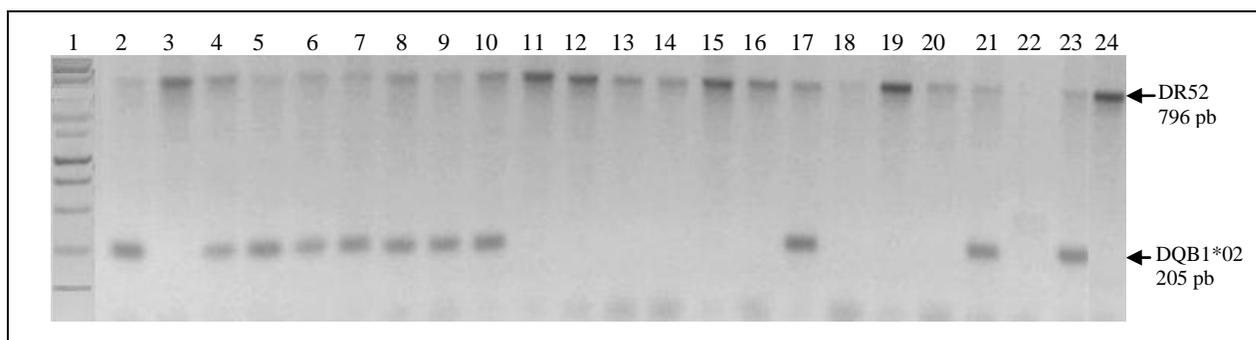


Fig. 9: Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto del PCR del alelo DQB1*02 del HLA-DQ2 en una muestra de pacientes y controles. Línea 1: Patrón de masa molecular 100 bp DNA "step leader" (1500-100 pb), líneas 2-21: muestras, Línea 22: control negativo PCR, Línea 23: muestra control positivo, Línea 24: muestra control negativo. DR52 humano: control interno de la reacción. pb: pares de bases.

4.8.1 Asociación del HLA-DQ2 y anticuerpos antitransglutaminasa (AATGt)

De los 22 pacientes celíacos, cuatro resultaron negativos para los AATGt ya que estaban en régimen de DLG. De estos cuatro pacientes, dos de ellos resultaron positivos para ambos alelos del HLA-DQ2 y uno negativo, pero positivo para los alelos del HLA-DQ8 (DQA1*0301, DQB1*0302) y el otro paciente restante fue positivo solo para el alelo DQB1*02 del HLA DQ2.

Los otros 18 pacientes celíacos se estudiaron al debut de la enfermedad por lo tanto todos ellos fueron positivos para los AATGt y el diagnóstico de EC se confirmó mediante biopsia de yeyuno. De este grupo de 18 pacientes, 17 resultaron positivos para ambos alelos del HLA-DQ2 y un paciente resultó positivo solamente para el alelo DQA1*03 del HLA-DQ8.

Para el grupo de los familiares de primer grado (54 individuos), 10 individuos resultaron positivos para los AATGt y de ellos siete resultaron positivos para ambos alelos del HLA DQ2. A estos siete individuos se les realizó la biopsia de yeyuno, en cinco individuos se encontraron cambios morfológicos en la histología intestinal compatibles con la EC y dos resultaron negativos por este proceder. Todos los controles sanos resultaron negativos para los AATGt.

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

En los últimos años los resultados de diversos estudios clínicos y epidemiológicos han demostrado que la EC cuando se busca de forma activa, tiene una incidencia mucho más alta de la pronosticada. Por otro lado se conoce que si la enfermedad no es diagnosticada y tratada a tiempo puede provocar el desarrollo de otras enfermedades, dentro de ellas el linfoma intestinal y otros tipos de cáncer ((Di Sabatino y otros, 2009; Green, 2009). Todo esto conduce a la necesidad de realizar un diagnóstico certero y precoz de la EC.

Lo que resulta aún más importante es que a diferencia de otras enfermedades de naturaleza autoinmune, que por lo general tienen un mal pronóstico y requieren de un tratamiento complejo, no exento de efectos secundarios y no siempre suficientemente efectivos, la EC una vez diagnosticada tiene un tratamiento muy sencillo que consiste en la eliminación del gluten de la dieta de estos pacientes, o sea, una dieta libre de gluten (DLG). Aunque esto significa algunas limitaciones y una modificación del estilo de vida, no son comparables a las de otras enfermedades autoinmunes. Se ha demostrado además que si el paciente celíaco cumple con una dieta estricta, puede desarrollar una vida normal con un riesgo no mayor que el de la población general a padecer las enfermedades antes mencionadas (Di Sabatino y otros, 2009; Green, 2009).

Otro aspecto importante a destacar es que en los últimos años se ha podido demostrar que además de las formas típicas de la EC, que se presentan con los síntomas característicos descritos con anterioridad, existen formas atípicas, con síntomas clínicos extra intestinales o casos monosintomáticos (Green, 2007). Es posible que estas formas de presentación de la enfermedad sean tan o más frecuentes que la EC clásica, lo que introduce un nuevo reto para el diagnóstico de la misma. Por otro lado se conoce en la actualidad que ya no puede considerarse a la EC una patología estrictamente pediátrica pues tiene una elevada incidencia en la población adulta, incluso de la

tercera edad (Green, 2005). Todo lo anterior reafirma la primera idea expresada en esta discusión: la importancia de un diagnóstico certero y precoz de la EC.

Como se mencionó antes, en la actualidad el estándar de oro para el diagnóstico de la EC continúa siendo la biopsia de yeyuno (Fasano y otros, 2008). Sin embargo, teniendo en cuenta diversos puntos de vista este método no es bueno como primera opción para el diagnóstico, sobre todo cuando se trata de hacer una pesquisa de la enfermedad, bien sea en grupos de riesgo o en la población general, para estudiar la incidencia de la misma en una determinada región o país. Entre las desventajas que presupone este método se encuentran las de orden ético y las de orden económico.

En cuanto a las de orden ético la biopsia de yeyuno es un método invasivo y cruento que les causa molestias a los pacientes sobre todo si son niños. Desde el punto de vista económico resulta costoso pues las cápsulas para realizar las biopsias cuestan alrededor de 500 USD cada una y tienen una vida limitada. Además por lo complejo del proceder y la disponibilidad de cápsulas, existen limitaciones para el número de biopsias que pueden realizarse por día.

Habría que sumar a todo esto que por lo general los pacientes requieren ser ingresados para realizar este proceder y que una correcta interpretación del resultado de la biopsia requiere de un patólogo con gran experiencia ya que otras patologías gastrointestinales pueden provocar alteraciones de la mucosa intestinal muy parecidas a las que ocasiona la EC (Green, 2007).

Son estas las razones fundamentales que han incentivado el desarrollo de pruebas serológicas, las cuales han servido como un complemento importante para el diagnóstico de la EC y han permitido, al menos, disminuir el número de biopsias intestinales que deben realizarse para confirmar la enfermedad. Los diagnósticos serológicos resultan además una herramienta fundamental para el seguimiento de los pacientes bajo un régimen de DLG, ya que permiten detectar transgresiones de la

dieta y para el seguimiento durante los estudios de reto o provocación con gluten, ya que nos permiten identificar el mejor momento para realizar la biopsia intestinal confirmatoria.

Dentro de las pruebas serológicas, la que ha resultado de mayor utilidad para el diagnóstico de la EC por su sensibilidad y especificidad ha sido la detección de anticuerpos antiendomiso (AAE) y más reciente la detección de anticuerpos anti transglutaminasa (AATGt) (Green, 2007; Rostom y otros, 2005). Los primeros se detectan por inmunohistoquímica mediante inmunofluorescencia indirecta y estos sistemas no son automatizables, requieren tiempo para su realización (horas) y además requieren un personal altamente calificado, así como de un equipamiento costoso (Catassi y otros, 2005; Rostom y otros, 2005).

Por su parte los AATGt se detectan fundamentalmente por técnicas tipo ELISA que si son automatizables, pero también requieren de equipamiento de laboratorio, de personal calificado y también consumen tiempo para su realización (Catassi y otros, 2005; Rostom y otros, 2005).

Para recomendar el despistaje poblacional de una enfermedad deben cumplirse tres premisas: i) que exista un ensayo de diagnóstico sensible y de bajo costo, con mínima agresión al paciente; ii) que se disponga de un tratamiento efectivo de la enfermedad; y iii) que el desarrollo de la enfermedad sea más perjudicial para el paciente o la sociedad que la adhesión al tratamiento (Green, 2009).

En la EC las premisas descritas sólo se cumplen parcialmente. Los sistemas serológicos de diagnóstico existen, aunque presentan limitaciones que impiden que sustituyan a la biopsia intestinal. El tratamiento también es posible, aunque son necesarios estudios que valoren los niveles de gluten tolerados por los enfermos. Con respecto a la tercera premisa, podemos decir que *i)* existe un aumento del riesgo de desarrollar linfomas u otros tumores del tracto intestinal con respecto a la población normal; *ii)* dicho riesgo es tanto mayor cuanto más tarde se diagnostica la enfermedad; y *iii)* la dieta sin gluten normaliza el riesgo, se justifica la necesidad de hacer una búsqueda activa de

la EC (Green, 2009). Además, a pesar de que no existen suficientes trabajos que documenten cómo es dicho riesgo en enfermos con EC latente, en un estudio con familiares se encontró que la muerte causada por algún tipo de cáncer estaba aumentada en 10 veces con respecto a un grupo control del mismo sexo y edad; el 20% de los familiares se diagnosticaron como enfermos celíacos y aproximadamente el 50% de éstos eran enfermos con EC latente (Marsh, 1997; Stokes y otros, 1976).

En nuestro país se desconoce hasta ahora el comportamiento real de la EC, entre otras razones por no poder contar con los recursos materiales necesarios para la compra de los sistemas de diagnóstico serológicos que tienen un elevado precio en el mercado internacional. Por ello decidimos trabajar en esa dirección, tratando de desarrollar nuevos sistemas de diagnóstico serológicos de la enfermedad, de modo que las limitaciones no sean técnicas sino que se deban únicamente al cuestionamiento de la tercera premisa: *que el desarrollo de la enfermedad sea más perjudicial para el paciente o la sociedad que la adhesión al tratamiento.*

Con todos estos antecedentes y aprovechando la experiencia acumulada por nuestro grupo en el desarrollo de sistemas inmunocromatográficos (Sorell y otros, 2004), nos dimos a la tarea de desarrollar y llevar a escala productiva la determinación de anticuerpos antitransglutaminasa en sangre, suero y plasma mediante la tecnología inmunocromatográfica.

En cuanto al desarrollo del sistema, primeramente se establecieron las condiciones de pH y de concentración de TGt para su conjugación a oro coloidal. A partir de estos resultados y para la producción de cantidades mayores del conjugado de TGt-oro coloidal se estableció un valor de pH de 7,5 y una concentración de TGt de 10 µg/mL de coloide.

El pH de 7,5 se escogió porque cae en el rango de pH óptimo para la conjugación y cercano al punto isoeléctrico de la TGt, lo cual es recomendado por otros autores, que sugieren que en general, una

proteína se adsorbe al máximo en la superficie de la partícula de oro en el punto isoeléctrico (pI) de la molécula de 0 a 0,5 unidades de pH por encima de dicho punto (Albrecht, 1993; Roth, 1983). Escogimos la concentración de 10 µg/mL de coloide a partir de a experiencia mostrada en otros sistemas inmunocromatográficos (IC) desarrollados por nuestro grupo donde se ha observado que la concentración de la proteína a conjugar en un orden superior a la cantidad mínima protectora nos brinda un margen de seguridad en la protección total del coloide (Mainet y otros, 2004).

Para la producción del conjugado de TGt-oro coloidal en su formulación final se le añadieron sustancias que aumentan su estabilidad y previenen de la contaminación (tampón C de dilución del conjugado). En estas condiciones se ha descrito que los conjugados con oro coloidal son estables durante años a 4 °C (Mainet y otros, 2004, Paek y otros, 2000).

Es importante señalar que al realizar el conjugado del sistema con la propia TGt esto hace que nuestro ensayo sea capaz de detectar indistintamente cualquier clase de anticuerpos contra la TGt, lo cual resulta una ventaja en el caso de la EC donde pueden aparecer fundamentalmente anticuerpos de clase IgA e IgG. Los sistemas tipo ELISA que existen por el momento en el mercado permiten solo la detección de AATGt de la clase IgA o de la IgG pero no a la vez. Esto evidentemente representa una desventaja ya que es conocido que hasta un 10% de los pacientes celíacos desarrollan un déficit selectivo de IgA e incluso pacientes que resulten negativos por ELISA y tienen niveles normales de IgA pueden tener anticuerpos de clase IgG (Cataldo y otros, 1998). Para resolver esta situación hay que realizar los dos ensayos independientes, uno para detectar anticuerpos IgA y otro para detectar los IgG, con el consiguiente consumo de recursos y tiempo.

Como parte de los estudios de estabilidad que hay que realizar para el desarrollo de un sistema diagnóstico resulta fundamental una vez que se tiene un prototipo del mismo, evaluar su estabilidad. Esto permite conocer cual o cuales de sus componentes resultan más vulnerables al menos en cuanto

a la estabilidad en el tiempo, lo que permite trabajar para encontrar condiciones que mejoren esta estabilidad o simplemente sustituir dicho(s) componente(s) en la medida de lo posible.

Sin embargo, el conocer la estabilidad del sistema a tiempo real independientemente que es un requisito imprescindible e indispensable para realizar el Registro Sanitario de un diagnosticador ante el CECMED (que es la entidad regulatorias del MINSAP para este fin), consume mucho tiempo ya que este tipo de diagnosticadores deben ser estables por largos períodos (un año o más). Una forma de solucionar este problema, es someter el sistema y/o sus componentes a un estrés térmico como por ejemplo 60 °C que simula el envejecimiento a tiempo real de los componentes (Paek y otros, 2000; Gunter, 1999; Deshpande, 1996). Estos estudios, si bien son solo una aproximación a lo que resulta luego en la realidad, brindan una información importante en un corto período de tiempo, sobre todo acerca de los componentes que resulten más inestables y así no tenemos que esperar por un largo período de tiempo para tener la información si debemos cambiar alguna formulación o componente.

En el estudio de estabilidad del sistema a 60 °C el componente que resultó más inestable fue la TGt del recubrimiento. Esta proteína de alta masa molecular (aproximadamente 85 kDa) puede sufrir con el tiempo cambios conformacionales que afecten su estructura y por ende los epitopos que son reconocido por los anticuerpos. Estos cambios pueden estar dados por la deshidratación a la cual es sometida la TGt una vez que se deposita sobre la nitrocelulosa (Mainet y otros, 2004; Paek y otros, 2000). Para prevenir esto se utilizan algunos estabilizantes; en nuestro caso lo denominamos agente protector. Algunos autores plantean que cuando una proteína es deshidratada en presencia de estos agentes, las moléculas de agua unidas en la estructura proteica por puentes de hidrógeno son evaporadas y los sitios son reemplazados por el agente manteniendo la conformación estructural intacta (Paek y otros, 2000; Deshpande, 1996). El uso de este agente protector en la formulación del

tampón de recubrimiento garantizó la estabilidad de la TGt por al menos 15 meses a temperatura ambiente.

Después de seleccionadas las condiciones del desarrollo del sistema y del estudio de estabilidad acelerada se evaluó un grupo de tiras con un panel bien caracterizado de muestras de pacientes celíacos y no celíacos.

El diagnóstico de la EC se hizo según los criterios de la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición (Walker-Smith y otros, 1990). En el estudio con muestras de pacientes celíacos al diagnóstico, la sensibilidad y la especificidad fue de un 100% ya que hubo una total concordancia con el resultado por biopsia, que como hemos dicho, es el estándar de oro para el diagnóstico de la EC. Sin embargo, por el ELISA comercial Celikey IgA (Celikey Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania) se dejaron de detectar tres pacientes para una sensibilidad del 94% (88,2-98,4%) y por el método de inmunofluorescencia indirecta (BioSystem, Barcelona, España), se dejaron de detectar dos pacientes para un 96% (89,1-99%).

Estos resultados se deben a la alta incidencia de déficit selectivo de IgA en los individuos con EC, de ahí la desventaja de estos sistemas que solo detectan anticuerpos de clase IgA y que no se pueden utilizar para identificar a los individuos con EC que tienen deficiencia selectiva de IgA. Por lo tanto para tales casos son necesarias estrategias alternativas como la determinación de IgG.

En este sentido varios autores han sugerido que la deficiencia selectiva de IgA ocurre en individuos sanos con una frecuencia de 1:163- 1:965 individuos (Pereira y otros; 1997; Clark y otros, 1983; Carneiro-Sampaio y otros, 1989). También se ha planteado que esta deficiencia es mucho más común en individuos con EC donde la frecuencia es de aproximadamente 1:50 personas (Cataldo y otros, 2000; Cataldo y otros, 1998; Heneghan y otros, 1997).

Una vez obtenido el sistema inmunocromatográfico y caracterizado con un panel de sueros de pacientes celíacos y no celíacos se comprobó en el terreno que en el ensayo además de utilizar suero y plasma sin diluir también se puede utilizar sangre total. Todas las muestras que resultaron positivas para AATGt en sangre total, también lo fueron para suero y plasma y además la EC fue confirmada por biopsia de yeyuno en estos pacientes. No se observaron falsos negativos asociados al tipo de muestra empleada. En cambio los sistemas comerciales solo usan suero/plasma o sangre previa dilución de la muestra a utilizar (Bazzigaluppi y otros, 2006; Raivio y otros; 2006; Ferre-López y otros, 2004; Bazzigaluppi y otros, 1999).

También como parte de la caracterización del sistema inmunocromatográfico desarrollado se realizó un estudio comparativo contra un sistema similar de la competencia (CD1 anti-TGt y CD1+2 anti-TGt y anti-gliadina Operon, España) (Ferre-López y otros, 2004).

Cuando se va a utilizar un diagnosticador para el pesquise masivo de una enfermedad es muy importante que el mismo posea altos valores de sensibilidad y un alto Valor Predictivo Negativo (VPN) que no es más que la probabilidad o proporción de no tener la enfermedad cuando un resultado es negativo. De esta forma se garantiza que ningún posible enfermo escape a la pesquisa y que luego pueda ser comprobado el resultado serológico por métodos confirmatorios, como es el caso de la biopsia de yeyuno para la enfermedad celiaca (Walker-Smith y otros, 1990), como antes hemos expuesto. En este estudio comparativo pudimos comprobar que nuestro sistema tuvo una sensibilidad de 100% contra una sensibilidad de 91,66% y 95,66% para el CD1 y CD1+2 respectivamente. Mientras que el VPN para el inmunocromatográfico también fue de 100% y de 91,67% y de 95,65% para el CD1 y CD1+2 respectivamente. En resumen nuestro sistema mostró un diagnóstico más preciso de la enfermedad en el grupo estudiado. Esto permite la aplicación segura

de la biopsia de yeyuno solo en aquellos pacientes que resulten positivos para la determinación de AATGt con una baja probabilidad de error.

Independientemente del pobre desempeño del sistema de la competencia en el laboratorio respecto al nuestro, también es un sistema visual rápido basado en la técnica de inmunocromatografía pero que consta de dos tipos de tira, una doble para la detección de AATGt de clase IgA y AAG; y una simple, para anticuerpos IgA e IgG específicos frente a TGt. Como la tira doble solo detecta anticuerpos IgA, deja sin resolver el problema de los pacientes con déficit de IgA, al contrario de nuestra tira donde se determinan anticuerpos IgA e IgG anti-TGt en un mismo ensayo. Además la identificación simultánea de AATGt de clase IgA y AAG no mejora la sensibilidad de la prueba en la selección de los pacientes con sospecha de EC que deben ser sometidos a una biopsia diagnóstica. Por el contrario, puede crear problemas de interpretación de los resultados, como ocurre con la aparición de casos positivos para AAG pero negativos para AATGt.

Como este sistema comercial necesita realizar la determinación de AATGt primero mediante la tira doble, y después, cuando el resultado es negativo, con la tira sencilla, que si detecta anticuerpos antitransglutaminasa IgA e IgG; esta propuesta del uso combinado de las dos tiras, sólo hace que esta prueba diagnóstica se convierta en un procedimiento más complejo, más costoso y con mayor consumo de tiempo, ya que en definitiva el resultado final de la prueba solo se obtiene después del resultado de la tira simple. De esta manera se pierden las ventajas de la rapidez sobre los métodos ELISA que existen en la actualidad para estos fines.

Una vez concluida la fase de desarrollo y evaluación preliminar del sistema, nos dimos a la tarea de probarlo en grupos de riesgos para demostrar su utilidad e importancia.

El primer grupo estudiado fue el de pacientes con síntomas gastrointestinales, como ya hemos reflejado anteriormente en la forma clásica de la enfermedad aparecen síntomas tales como náuseas,

vómitos, diarreas, distensión abdominal, pérdida de masa muscular y peso, falla de crecimiento, laxitud e irritabilidad (Green, 2005). En adultos de la 3^{ra} y 4^{ta} década, los síntomas más frecuentes son fatiga, dolores abdominales, meteorismo, anemias ferropénicas, estreñimiento y frecuentemente son diagnosticados de síndrome de intestino irritable (Green, 2005).

En nuestro país dado los prohibitivos precios de los sistemas comerciales, el diagnóstico de la EC se realizaba mediante clínica y biopsia de yeyuno, esto entrañaba que se realizaran innecesariamente muchas biopsias con la consiguiente molestia para el paciente y el incremento del gasto económico.

Una vez que se introdujeron los anticuerpos antigliadina (AAG) en los servicios de gastroenterología del país este número disminuyó pero no lo suficiente dada la poca especificidad de este marcador ya que dichos anticuerpos aumentan en otras patologías e incluso en controles normales (Uibo y otros, 1993; Arranz y otros, 1986), mientras que la detección de anticuerpos anti-transglutaminasa ha demostrado ser altamente sensible y específica para el diagnóstico de la enfermedad celíaca (Sardy y otros 1999; Dieterich y otros, 1998; Schuppan y otros, 2001; Lagerqvist y otros, 2001).

En el estudio realizado a 637 pacientes con síntomas clínicos sugestivos de EC y con AAG positivos, por lo tanto con criterio de biopsia de yeyuno según el procedimiento que se llevaba hasta ese momento en nuestro país, solo el 13,8% de los pacientes (88 individuos) resultaron positivos para los AATGt. Por lo tanto se le hubiese realizado innecesariamente este cruento proceder al 86,2% del total de pacientes. Hasta el momento de esos 88 pacientes positivos para AATGt se han confirmado por biopsia de yeyuno 57 personas, de estos, 56 tuvieron un patrón histológico compatible con la EC por lo que la prevalencia en este grupo de pacientes probada por biopsia de yeyuno, fue de un 8,95%. Un paciente resultó negativo en dos ocasiones por la biopsia de yeyuno y al determinársele los alelos de los genes HLA DQ-2 y DQ8 también resultaron negativos, por lo que

le fue descartada la enfermedad y el resultado de los AATGt fue catalogado como falso positivo apoyándonos en el hecho de que el análisis genético es muy útil para excluir la EC en pacientes con riesgo o sospecha, con un valor predictivo negativo próximo al 100% (Sollid y Lie, 2005; Rostom y otros, 2004).

El grupo de pacientes con infección por *Giardia lamblia* es un grupo particular dentro del grupo de pacientes con síntomas clínicos sugestivo de EC ya que también puede cursar con diarreas crónicas. La etiología de la diarrea crónica en niños de zonas tropicales se investigó por Rastogi y colaboradores (Rastogi A y otros, 1999) y Altuntas y colaboradores (Altuntas B y otros, 1999). Estos autores encontraron que basándose en la historia, exploración clínica y biopsia duodenal, la giardiasis y la EC son algunas de las principales causa de la diarrea crónica. Puesto que la giardiasis y la EC comparten algunos síntomas clínicos es recomendable determinar si un paciente con giardiasis también tiene EC.

Esto es importante porque se ha demostrado en otras investigaciones que el tratamiento de la giardiasis invierte la EC que pasa de activa a latente, cura los síntomas de diarrea y devuelve al intestino delgado su morfología normal sin necesidad de DLG (Carroccio y otros, 2001).

En este sentido Carroccio y colaboradores sugieren que un estado de EC activa, con atrofia de la mucosa intestinal, puede regresar a un estado de EC latente con una histología normal de la mucosa intestinal después de la eliminación de los factores ambientales que supuestamente han precipitado el daño de la mucosa (Carroccio y otros, 2001). Plantean además que el comportamiento de los anticuerpos AAE y AATGt no es una característica permanente para toda la vida y en función de esto se debe recomendar en el mismo paciente la repetición de estos marcadores cuando se sospecha una EC, independientemente que los marcadores serológicos hayan sido negativos con anterioridad (Carroccio y otros, 2001).

Como se ha planteado en varias ocasiones el diagnóstico de EC exige una biopsia de intestinal pero no es el procedimiento de primera elección para el cribaje de la EC (Fasano y otros, 2008; Catassi y otros, 2005). En este estudio encontramos anticuerpos IgA frente a gliadina en un número considerable de pacientes con giardiasis, en los cuales se descartó la EC por biopsia intestinal, por lo que la especificidad de los AAG no es buenos para cribar la EC en estos pacientes. Cuando se realizó la determinación de AATGt con el ensayo inmunocromatográfico, ninguno de los pacientes no celíacos con giardiasis fueron positivos, con una especificidad del 100%. Por otra parte un paciente de 84 años con AATGt negativos presentaba alteraciones de la mucosa sin otro marcador de EC y se consideró que la atrofia de las vellosidades se debió a la infección parasitaria y tras el tratamiento con secnidazol se consiguió una mejoría clínica. Los marcadores serológicos se repitieron después del tratamiento y permanecieron negativos y en una segunda biopsia se demostró una recuperación completa de la mucosa.

Los dos pacientes con giardiasis y sospecha de EC se trataron simultáneamente para ambas afecciones. Se consideró la posibilidad de comenzar primero con el tratamiento contra la giardiasis y siguiendo una dieta normal y después de eliminar la giardiasis comenzar con la DLG. Sin embargo este procedimiento no era éticamente aceptable dado el riesgo de invertir la EC a un estado latente como se ha descrito previamente (Carroccio y otros, 2001). El hecho de que los AATGt se hicieran negativos se consideró de gran valor para confirmar el diagnóstico de EC, máxime cuando en una segunda biopsia se demostró una recuperación completa de la mucosa.

Se ha comunicado que la EC puede estar presente en los sujetos con Diabetes mellitus Tipo 1 (DMT1) entre un 1 y 16,4% (Schober y otros, 2002), lo que se ha tratado de explicar por el hecho de que ambas entidades comparten genes de susceptibilidad como son los alelos HLA B8, DR3 y DQ B1*02 (Arranz y otros, 1997; Sollid y otros, 1989).

En nuestro estudio se pudo determinar una prevalencia confirmada por biopsia del 2,8% para este grupo de pacientes, lo cual es muy similar a lo informado por otros investigadores (Schober y otros, 2002).

Es muy frecuente que la EC sea asintomática con DMT1 (Freemark y Levitsky, 2003). De los 14 pacientes positivos para AATGt, 12 (85,72%) de ellos no tuvieron síntomas sugestivos de EC y solo dos (14,28%) pacientes presentaron esta sintomatología (dolor abdominal, diarrea y anorexia).

Todavía es tema de debate el beneficio potencial de un cribado sistemático de la EC en pacientes con DMT1 (Holmes, 2001). Algunos estudios refieren que este cribado se debe hacer regularmente (Freemark y Levitsky, 2003; Holmes, 2001) y que además la aparición de EC puede acelerar el empeoramiento de la diabetes produciéndose un mal control glucémico (Rakesh y otros, 2002). Cuando estos pacientes son tratados con una DLG mejora el control de la diabetes y disminuyen los requerimientos insulínicos (Cronin y Shanahan, 1997). Por lo tanto un pesquisaje activo de la EC en este grupo de riesgo permite mejorar la conducta terapéutica en este tipo de pacientes.

La prevalencia de EC en pacientes con DMT1 es aproximadamente 20 veces mayor que el de la población general. El 60% de los casos tienen la EC al debut de la diabetes de forma asintomática y el restante 40% la desarrollan pocos años después del debut de la diabetes (Barera, 2002). En éste estudio se confirmó lo anteriormente expuesto ya que el 66,66% de los casos con EC diagnosticada por biopsia eran niños y tenían la enfermedad al debut de la diabetes.

Otra enfermedad asociada a la EC es el síndrome de Down (Gale y otros, 1997). La prevalencia de la enfermedad celíaca en pacientes con síndrome de Down oscila entre el 3% al 12%, con una estimación del 8% de presunción de la EC mediante análisis serológicos y una estimación del 5,5% confirmada por biopsia (Rumbo y otros, 2002; Bonamico y otros, 2001). Esto indica que el riesgo de la enfermedad celíaca en pacientes con síndrome de Down es de al menos cinco veces la de la

población en general. Como en la población general la EC en pacientes con síndrome de Down está restringido a las personas con HLA-DQ2 o HLA-DQ8. Sin embargo, la prevalencia de DQ2/DQ8 en pacientes con síndrome de Down es similar a la de la población en general (Book y otros, 2001), lo que indica que algunos factores desconocidos están asociados con el aumento del riesgo de la enfermedad celíaca en pacientes con síndrome de Down. La tipificación de HLA puede ser útil para ayudar a excluir la posibilidad del futuro desarrollo de la enfermedad celíaca en estos pacientes (Sollid y Lie, 2005; Rostom y otros, 2004; Kaukinen y otros 2002).

En los individuos con síndrome de Down que son incapaces de describir los síntomas, se les debía realizar el cribado de los AATGt. En nuestro estudio detectamos un 2,2% de presunción de la EC por anticuerpos AATGt. Dada las implicaciones éticas, en este estudio no pudimos realizar la biopsia de yeyuno en los pacientes que resultaron positivos para AATGt para confirmar la enfermedad. Es nuestra intención realizar un llamado de alerta a las autoridades competentes sobre la necesidad del pesquiasaje rutinario de la EC en este tipo de paciente, pudiéndose utilizar el tipaje de HLA como herramienta alternativa para el diagnóstico final de la EC en este grupo de riesgo.

La prevalencia de la enfermedad celíaca en pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune se ha evaluado en múltiples estudios (Ch'ng y otros, 2005; Stagi y otros, 2005; Mainardi y otros, 2002). Estos estudios son consistentes en la presentación de informes de que la EC se produce en el 1,5% - 6,7% de estos pacientes, con una estimación combinada con la biopsia del 3,0% (95% CI; 2,3–3,8). En el estudio realizado a una muestra de la población cubana, se determinó que el 3% de los pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune tienen presunción de la EC por anticuerpos AATGt, lo cual debe ser corroborado por biopsia de yeyuno.

Como se ha reflejado anteriormente la EC tiene una base genética conocida y presenta una de las asociaciones más fuertes con genes situados en la región del HLA de clase II, los que podrían

contribuir al 40% de la predisposición genética (Louka y otros, 2003). Más del 95% de los pacientes con EC presentan los alelos de riesgo DQB1*02 y DQA1*0501 o DQB1*0302 y DQA1*03 (Karell y otros, 2003; Lundin y otros, 1993) y los casos DQ2/DQ8 negativo, suelen tener al menos uno de los alelos de riesgo por separado (DQA1*0501 o DQB1*02), siendo muy raros los casos en los que ambos están ausentes (Polvi y otros, 1998). Además cuando los resultados por serología y biopsia no son concluyentes en pacientes con riesgo o sospecha de EC, el diagnóstico también se apoya en los análisis genéticos para excluir la enfermedad dado el alto valor predictivo negativo próximo al 100% de este análisis (Sollid y Lie, 2005; Rostom y otros, 2004; Kaukinen y otros 2002).

Por esta razón nos propusimos estudiar por primera vez en Cuba la presencia de estos marcadores genéticos en una población de enfermos celíacos y sus familiares de primer grado, así como la asociación de esos marcadores con los AATGt. Mediante este estudio se determinó que en nuestra población que tiene una fuerte ascendencia europea (Cintado y otros, 2009), un 86,3% de los pacientes analizados porta los alelos del HLA DQ2; lo cual es similar a lo informado en otras poblaciones (Karell y otros, 2003; Lundin y otros, 1993).

Los resultados del Cluster Genético Europeo de EC (Karell y otros, 2003) muestran que el 83,8% de los pacientes de Italia y el 83,8% de los franceses son positivos para el heterodímero del DQ2. Esta proporción es de un 91% en Finlandia, un 91,4% en Noruega y Suecia y de un 87,7% en el Reino Unido. En España determinaron que el 92% de los pacientes celíacos son DQ2 positivos (Arranz y otros, 1997). En América del Sur un estudio argentino informó que el 95% de sus pacientes son positivos para el DQ2 (Herrera y otros, 1994).

En los familiares de primer grado de enfermos celíacos se encontró una alta proporción (70%) de individuos positivos para el DQ2 cuando se comparó con los controles sanos. Se conoce que la EC es más común en ciertos grupos de riesgo, tales como los familiares de enfermos celíacos conocidos

(Dolinsek y otros, 2004; Schuppan, 2000). La determinación de AATGt puede ser utilizada para detectar enfermos antes de que desarrollen serias complicaciones (Lagerqvist y otros, 2001; Schuppan y Hahn, 2001; Dieterich y otros, 1998). Por otra parte el tipaje de HLA ha demostrado que es una herramienta útil especialmente para excluir la enfermedad dado su alto valor predictivo negativo (Rostom y otros, 2004, Kaukinen y otros 2002). En nuestro estudio encontramos que 10 familiares de primer grado, de un total de 54, eran positivos para AATGt y que siete de ellos eran DQ2 positivos. A estos siete individuos se les realizó biopsia de yeyuno, 5 de ellos resultaron positivos por este proceder y se clasificaron como enfermos con una EC silente. Mientras que los dos restantes resultaron negativos y se designaron como individuos con una EC Latente dado el hecho de que tenían AATGt y HLA DQ2 positivos.

Una vez que se comprobó que el sistema inmunocromatográfico es una herramienta útil para el pesquisaje de la EC en grupos de riesgo, nos dimos a la tarea de probar su aplicabilidad en población sana.

En cuanto a la pesquisa de EC en adultos, varios estudios refieren que esta enfermedad es común en varios países en vías de desarrollo (Cataldo y otros, 2007; Catassi y otros, 2007; Crovella y otros 2007). La presencia de la EC ha sido bien establecida en países de América del Sur (Crovella y otros 2007; Gómez y otros, 2001) y algunos países del continente africano han informado una alta prevalencia de EC (Catassi y otros, 2001; Catassi y otros, 1999). Es conocido que los principales factores genéticos (HLA DQ2 y DQ8) y ambientales (gluten) responsables para el desarrollo de la EC muestran una amplia distribución mundial.

Cuba no puede ser la excepción sobre todo por el alto consumo de trigo y por la fuerte ascendencia europea que se presenta en los cubanos (Cintado y otros, 2009). Además como se demostró previamente en este trabajo, nuestra población también porta los genes HLA-DQ2 y DQ8 asociados

a la EC. Hasta el momento no tenemos noticias de estudios similares que se hayan realizado en América Central o en el Caribe. En estos países existe un subregistro de la EC debido a la baja percepción de la enfermedad y a dificultades de acceso a facilidades diagnósticas (Catassi y Cobellis, 2007).

La biopsia intestinal es aun el “Patrón de Oro” para el diagnóstico de la EC (Fasano y otros 2008; Walker-Smith y otros, 1990). Por lo tanto, se estableció secuencialmente el diagnóstico de EC determinando los AATGt y luego la confirmación de la enfermedad por biopsia. Aplicando estos dos procedimientos en los 200 individuos estudiados, sólo se diagnosticó a uno como enfermo celíaco, el cual se corroboró además mediante el análisis genético de HLA. Anteriormente, cuando este individuo se sometió a exámenes médicos de rutina se comprobó que tenía anemia ferropénica. Como se expuso en la revisión bibliográfica la EC silente incluye manifestaciones atípicas como la anemia, la osteoporosis, enfermedades neurológicas, así como individuos realmente asintomáticos que solo son detectados mediante pesquisajes en grupos de riesgos o en población abierta. Los síntomas son diversos, y la enfermedad puede ser asintomática (Fasano y otros, 2003; Maki y otros, 2003); por tanto, es evidente que sin un pesquisaje serológico activo continuarán sin diagnóstico la mayoría de los casos con EC silente (Green, 2005).

En este estudio también se evaluó la utilidad del sistema inmunocromatográfico como herramienta para el diagnóstico de la EC en población sana. Cuando se comparó con el sistema ELISA Celikey IgA (Celikey Pharmacia & Upjohn, Diagnostics AB, Freiburg, Alemania) se comprobó que existía una total concordancia entre ambos métodos independientemente del tipo de muestra (sangre, suero o plasma) utilizada en el ensayo inmunocromatográfico. Aunque en este trabajo se ha planteado en diferentes ocasiones, queremos remarcar que pueden aparecer casos de falsos negativos con el uso de estos sistemas ELISA producto a que hasta un 10% de los enfermos celíacos pueden tener un

déficit selectivo de IgA (Cataldo y otros, 2000; Cataldo y otros, 1998). Por otra parte, como se ha demostrado anteriormente el sistema inmunocromatográfico detecta indistintamente anticuerpos IgA e IgG contra la transglutaminasa, lo cual provee a este sistema de una ventaja sobre los que basan su detección en la determinación de anticuerpos IgA, por lo que irremediamente a los individuos que resultan negativos para AATGt-IgA se les deben realizar otro ensayo de tipo AATGt-IgG para descartar los déficit selectivos de IgA.

Hay informes de que la prevalencia de EC en niños en Suecia está entre 1:285 y 1:33, en Finlandia entre 1:99 y 1:67, en Italia de 1:230 a 1:106 en escolares (Myléus y otros 2009; Maki y otros, 2003; Carlsson y otros, 2001; Cavell y otros, 1992). En Estados Unidos en un estudio realizado en niños de 5 años demostró que la prevalencia era de 1:104 (Hoffenberg y otros, 2003).

La EC clásica representa solo la punta del *iceberg* de la enfermedad, se conoce que de cada paciente diagnosticado con la enfermedad hay de tres a siete sin diagnosticar (Catassi y otros, 1999; Catassi y otros, 1994). Algunos autores plantean que debido al alto contenido de gluten en la dieta infantil, la mayoría de los niños con EC son sintomáticos (Ascher y otros, 1993).

Sin embargo, en nuestro caso el estudio realizado a un grupo de niños sugiere una alta prevalencia de EC silente (1,17%), lo cual confirma los resultados de otros autores que sugieren que la EC generalmente ocurre sin síntomas y la mayoría de los casos no son diagnosticados (Fasano y otros, 2008; Fasano, 2005; Catassi y otros, 1999, Catassi y otros, 1994).

Por otra parte, cuando se comparó al sistema inmunocromatográfico con el ELISA comercial Celikey IgA (Celikey Pharmacia & Upjohn, Diagnostics AB, Freiburg, Alemania), no hubo una completa concordancia entre los resultados. De hecho dos pacientes negativos para la determinación de anticuerpos IgA transglutaminasa por Celikey IgA, resultaron positivos por el inmunocromatográfico. Estas dos muestras y las cinco restantes que resultaron positivas para

AATGt por el inmunocromatográfico, se corroboraron como positivas por el sistema comercial Celikey IgG (Celikey Pharmacia & Upjohn, Diagnostics AB, Freiburg, Alemania). Por esta razón se sugiere que estos dos pacientes que resultaron negativos con el sistema ELISA Celikey IgA pueden presentar un déficit selectivo de IgA.

Estos resultados deben ser confirmados mediante biopsia y presencia de los marcadores genéticos asociados a EC. Este estudio se realizó en una población de niños sanos proveniente de la provincia de Pinar del Río, por lo que habría que extenderlo a otras provincias para corroborar si se presenta el mismo comportamiento en el resto del país y así determinar la prevalencia de la EC en Cuba para este grupo poblacional.

A través de los estudios de validación del sistema inmunocromatográfico realizados con los diferentes grupos de riesgo estudiados se pudo comprobar según el test de kappa que el sistema inmunocromatográfico posee un índice de concordancia de 0,983 entre la presencia de AATGt y el resultado de la biopsia de yeyuno, por lo que es muy probable que ante un marcador serológico positivo en la biopsia se encuentren cambios morfológicos compatibles con la EC.

Por todo lo anterior podemos afirmar que el sistema inmunocromatográfico desarrollado nos permite indicar la biopsia de yeyuno de manera específica y sin elevado riesgo de error sólo a aquellos pacientes, en especial niños y adolescentes, en los que el sistema de referencia resulte positivo, lo que evitará la ejecución de la instrumentación (por método per-oral, que consiste en la introducción de la cápsula de biopsia por la boca hasta el yeyuno o mediante endoscopia con la realización de una duodenoscopia). Ambos métodos además de ser invasivos y molestos, son costosos; requieren de personal especializado para su ejecución y no están exentos de ciertos riesgos, por lo que la selección adecuada del posible paciente con EC reducirá notablemente dichos estudios, con el

significativo ahorro que significa desde el punto de vista económico unido a los aspectos humanos de evitar la ejecución de la biopsia en aquellos que en la práctica pueden resultar dudosos.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto en el desarrollo de este trabajo se realizó la transferencia tecnológica de este sistema a la Unidad de Producción de Diagnosticadores (UPD) del CIGB de Sancti Spiritus y se realizó el Registro Sanitario (anexo 5) de este producto ante el CECMED. Una vez registrado forma parte de la línea HeberFast Line[®] que es el nombre comercial para los sistemas inmunocromatográficos producidos por el CIGB.

En estos momentos el sistema **HeberFast Line[®] anti-transglutaminasa** (anexo 6), que es como ha sido denominado este en particular, se ha generalizado en todos los Servicios Provinciales de Gastroenterología Pediátrica del país. Este resultado también debería hacerse extensivo a los Servicios de Gastroenterología de Adultos del país pues como se ha demostrado en este trabajo la EC no es una enfermedad que la padecen exclusivamente los niños.

Con vistas a la exportación de este producto, la empresa española Farmaiuris SC representa al CIGB en la licitación del sistema HeberFast Line[®] anti-transglutaminasa para su introducción y comercialización en Europa y Estados Unidos de Norteamérica. Por tal motivo esta empresa aportó al país la suma de \$97 876,86 USD, lo que permitió la renovación, de la tecnología obsoleta, que se destinaba para la producción de otros sistemas inmunocromatográficos de la línea HeberFast Line[®], en la Unidad de Producción de Diagnosticadores del CIGBSS, (Anexo 7).

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

1. El principio del ensayo inmunocromatográfico para la determinación de anticuerpos antitransglutaminasa permite la detección simultánea de anticuerpos antitransglutaminasa de clase IgA e IgG en la misma prueba, y es realizable tanto para muestras de sangre, suero o plasma. Además este ensayo nos permite indicar la biopsia de yeyuno con un bajo riesgo de error sólo a aquellos pacientes en los que el sistema de referencia resulte positivo.
2. El sistema inmunocromatográfico para la determinación de anticuerpos antitransglutaminasa resultó una herramienta útil para la pesquisa de la EC en pacientes que acuden a consulta de gastroenterología y otros grupos de riesgo como la Diabetes mellitus tipo 1 donde la EC por lo general cursa de forma silente.
3. El sistema inmunocromatográfico para la determinación de anticuerpos antitransglutaminasa permitió la detección de individuos con EC en población aparentemente sana. El curso silente de esta enfermedad tanto para población adulta como infantil justifica esta pesquisa.
4. La detección de marcadores genéticos HLA resultó una herramienta útil para dilucidar el diagnóstico de EC en los pacientes con síntomas sugestivos así como en los familiares de primer grado (de pacientes con EC) que tuvieron resultados discordantes entre la biopsia de yeyuno y el resultado serológico por el sistema HeberFast Line® anti-transglutaminasa. Además, el genotipaje de HLA permitió demostrar que el 86,3% de los pacientes estudiados con diagnóstico de EC portan los alelos de riesgo DQB1*02 y DQA1*0501 (HLA-DQ2).

CAPÍTULO 7. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de prevalencia de EC en grupos más amplios de la población cubana.
2. Confirmar la EC mediante biopsia de yeyuno en los pacientes con síndrome de Down, tiroiditis autoinmune y en el grupo de niños sanos.

CAPÍTULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albrecht, R.M., Simmons, S.R. and Pawley, J.B. 1993. Correlative video-enhanced light microscopy, high voltage transmission electron microscopy, and field emission scanning electron microscopy for the localization of colloidal gold labels. In: Immunocytochemistry a Practical Approach, Beesley, J.E. (ed), Oxford Univ. Press, 151-176, 1993.
2. Altuntaş B., Gül H., Yarali N., Ertan U. Etiology of chronic diarrhea. *Indian J Pediatr.* 66(5) 657-61, 1999.
3. Amin M., Eckhardt T., Kapitza S., Fleckenstein B, Jung G, Seissler J, Weichert H, Richter T., Stern M., Mothes T. Correlation between tissue transglutaminase antibodies and endomysium antibodies as diagnostic markers of coeliac disease. *Clin Chim Acta.* 282(1-2) 219-25, 1999.
4. Amin R., Murphy N., Edge J., Marion L.A., Acerini C.L., Dunger D.B. A longitudinal study of the effects of a gluten-free diet on glycemic control and weight gain in subjects with type 1 diabetes and celiac disease. *Diabetes Care.* 25(7) 1117-22, 2002.
5. Anderson R.P., Degano P., Godkin A.J., Jewell D.P., Hill A.V. In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as a dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med.* 6(3) 337-342, 2000.
6. Arentz-Hansen H., Körner R., Molberg O., Quarsten H., Vader W., Kooy Y.M., Lundin K.E. The intestinal T cell response to a-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deaminated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med.* 191(4) 603-612, 2000.

7. Arentz-Hansen H., Mcadam S.N., Molberg O., Fleckenstein B., Lundin K.E., Jorgensen T.J., Jung G. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*. 123(3) 803-9, 2002.
8. Arranz E., Blanco-Quiros A., Alonso M., Calvo C., Telleira J.J., Guisasola J.A., Sanchez-Villares E. IgA1 anti-gliadin antibodies are the most specific in children with coeliac disease. *J Clin Nutr Gastroenterol*. 1(1) 291-95, 1986.
9. Arranz E., Bode J., Kingstone K., Ferguson A. Intestinal antibody pattern of coeliac disease: association with gamma/delta T cell receptor expression by intraepithelial lymphocytes, and other indices of potential coeliac disease. *Gut*. 35(4) 476-82, 1994.
10. Arranz E., Telleria J., Sanz A., Martin J., Alonso M., Calvo C., Blanco-Quiroz A.: HLA-DQA1*0501 and DQB1*02 homozygosity and disease susceptibility in Spanish celiac patients. *Exp Clin Immunogenet*. 14(4):286-90, 1997.
11. Ascher H., Holm K., Kristiansson B., Mäki M. Different features of celiac disease in two neighboring countries. *Arch Dis Child*. 69(3) 375–80, 1993.
12. Askling J., Linet M., Gridley G., Halstensen T.S., Ekstrom K., Ekbom A. Cancer incidence in a population-based cohort of individuals hospitalized with celiac disease or dermatitis herpetiformis. *Gastroenterology*. 123(5) 1428-35, 2002.
13. Bahari A., Karimi M., Sanei-Moghaddam I., Firouzi F., Hashemi M. Prevalence of celiac disease among blood donors in Sistan and Balouchestan Province, Southeastern Iran. *Arch Iran Med*. 13(4) 301-5, 2010.
14. Barera G., Bonfanti R., Viscardi M., Bazzigaluppi E., Calori G., Meschi F., Bianchi C., Chiumello G. Occurrence of celiac disease after onset of type 1 diabetes: a 6-year prospective longitudinal study. *Pediatrics*. 109(5) 833-8, 2002.

15. Barners R.M., Harvey M.M., Blears J., Finn R., Jondon P.M. IgG subclass of human serum antibodies reactive with dietary proteins. *Int Allergy Appi Immunol.* 81(2) 141-147, 1986.
16. Bayless T.M., Kapelowitz R.F., Shelley W.M., Ballinger W.F., Hendrix T.R. Intestinal ulceration: a complication of celiac disease. *N Engl J Med.* 276(18) 996-1002, 1967.
17. Bazzigaluppi E., Lampasona V., Barera G., Venerando A., Bianchi C., Chiumello G., Bonifacio E., Bosi E. Comparison of tissue transglutaminase-specific antibody assays with established antibody measurements for coeliac disease. *J Autoimmun.* 12(1) 51-6, 1999.
18. Bazzigaluppi E., Roggero P., Parma B., Brambillasca M.F., Meroni F., Mora S., Bosi E., Barera G. Antibodies to recombinant human tissue-transglutaminase in coeliac disease: diagnostic effectiveness and decline pattern after gluten-free diet. *Dig Liver Dis.* 38(2) 98-102, 2006.
19. Beckett C.G., Dell'Olio D., Kontakou M., Przemioslo R.T., Rosen-Bronson S., Ciclitira P.J. Analysis of interleukin-4 and interleukin-10 and their association with the lymphatic infiltrate in the small intestine of patients with coeliac disease. *Gut.* 39(6) 818-23, 1996.
20. Beesley J. "Coloidal gold. A new perspective for cytochemical marking" in: *Royal microscopical Society Handbook No 17.* Oxford Science Publications. Oxford University Press. 1989
21. Bell D., Go R., Miguel C., Walker J., Cacal L., Saul A. Diagnosis of malaria in a remote area of the Philippines: comparison of techniques and their acceptance by health workers and the community. *Bull World Health Organ.* 79(10) 933-41, 2001.
22. Bergen en Henegouwen P. M. P, Leunissen J. Controlled growth of colloidal gold particles and implications for labelling efficiency. *Hystochemistry.* 85(1) 81-7, 1986.

23. Berger E. Zur allergischen Pathogenese der Coliakie. *Bibliotheca Paediatrica*. 67. 1-55, 1958.
24. Beristain C.N., Rojkin L.F., Lorenzo L.E. Evaluation of a Dipstick Method for the Detection of Human Immunodeficiency Virus Infection. *J ClinLab Anal*. 9(6) 347-50, 1995.
25. Bharadia L., Sharma A. Celiac disease in India. *Indian J Gastroenterol*. 27(4) 174, 2008.
26. Biagi F., Campanella J., Soriani A., Vailati A., Corazza G.R. Prevalence of coeliac disease in Italian patients affected by Addison's disease. *Scand J Gastroenterol*. 41(3) 302-5, 2006.
27. Bode S., Gudmand-Hoyer E. Evaluation of the gliadin antibody test for diagnosing coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*. 29(2) 148-52, 1994.
28. Bode S., Weile B., Krasilnikoff P.A., Gudmand-Hoyer E. The diagnostic value of the gliadin antibody test in celiac disease in children: a prospective study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 17(3) 260-4, 1993.
29. Bonamico M., Mariani P., Danesi H.M., Crisogianni M., Failla P., Gemme G., Quartino A.R., Giannotti A., Castro M., Balli F., Lecora M., Andria G., Guariso G., Gabrielli O., Catassi C., Lazzari R., Balocco N.A., De Virgiliis S., Culasso F., Romano C. Prevalence and clinical picture of celiac disease in Italian Down syndrome patients: a multicenter study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 33(2) 139-143, 2001.
30. Bongiovanni T.R., Clark A.L., Garnett E.A., Wojcicki J.M., Heyman M.B. Impact of gluten-free camp on quality of life of children and adolescents with celiac disease. *Pediatrics*. 125(3) e525-9, 2010.
31. Book L., Hart A., Black J., Feolo M., Zone J.J., Neuhausen S.L. Prevalence and clinical characteristics of celiac disease in Down syndrome in a US study. *Am J Med Genet*. 98(1) 70-4, 2001.

32. Bottaro G., Cataldo F., Rotolo N., Spina M., Corazza G.R. The clinical pattern of subclinical/silent celiac disease: an analysis on 1026 consecutive cases. *Am J Gastroenterol.* 94(3) 691-6, 1999.
33. Burgin-Wolff A., Gaze H., Hadzisehmovic F., Huber H., Lentze M.J., Nusslé D., Reymond-Berthet C. Antigliadin and antiendomysium antibody determination for celiac disease. *Arch Dis Child.* 66(8) 941-47, 1991.
34. Bushara K. O. Neurologic Presentation of Celiac Disease. *Gastroenterology.* 128(4 Suppl 1) S92–S97, 2005.
35. Campbell R.L., Wagner D.B. Solid-phase assay with visual readout, U.S. Pat. 4703017, 1987.
36. Carlsson A.K., Axelsson I.E., Borulf S.K., Bredberg A.C., Ivarsson S.A. Serological screening for celiac disease in healthy 2.5 year old children in Sweden. *Pediatrics.* 107(1) 42-45, 2001.
37. Carneiro-Sampaio M.M., Carbonare S.B., Rozentraub R.B., de Araujo M.N., Riberiro M.A., Porto M.H. Frequency of selective IgA deficiency among Brazilian blood donors and healthy pregnant women. *Allergol Immunopathol (Madr).* 17(4) 213-6, 1989.
38. Carroccio A., Cavataio F., Montalto G., et al. Treatment of giardiasis reverses active coeliac disease to latent coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 13(9) 1-5, 2001.
39. Case S. The Gluten-Free Diet: How to Provide Effective Education and Resources *Gastroenterology;* 128(4 Suppl 1) S128–34, 2005.
40. Cataldo F., Lio D., Marino V., Picarelli A., Ventura A., Corraza G.R. IgG(1) antiendomysium and IgG anti-tissue Transglutaminasa (anti-t TG) antibodies in coeliac

- patients with selective IgA deficiency. Working Groups on Coeliac of SIGEP and Club del Tenue. *Disease. Gut.* 47(3) 366-69, 2000.
41. Cataldo F., Marino V., Ventura A., Bottaro G., Corazza G.R. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Italian Society of Paediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) and "Club del Tenue" Working Groups on Coeliac Disease. *Gut.* 42(3) 362-5, 1998.
 42. Cataldo F., Montalto G. Celiac disease in the developing countries: a new and challenging public health problem. *World J Gastroenterol.* 13(15) 2153-9, 2007.
 43. Catassi C, Bearzi I, Holmes GK. Association of celiac disease and intestinal lymphomas and other cancers. *Gastroenterology.* 128(4 Suppl 1) S79-86, 2005a.
 44. Catassi C, Fasano A, Corazza GR (eds): *The Global Village of Coeliac Disease. Perspectives on Coeliac Disease, vol. II.* AIC Press. pp 45-56. 2005
 45. Catassi C., Cobellis G. Coeliac disease epidemiology is alive and kicking, especially in the developing world. *Dig Liver Dis.* 39(10) 908-10, 2007.
 46. Catassi C., Doloretta Macis M., Rättsch 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(6) 402-6, 2001.
 47. Catassi C., Fabiani E., Rättsch I.M., Coppa G.V., Giorgi P.L., Pierdomenico R., Alessandrini S., Iwanejko G., Domenici R., Mei E., Miano A., Marani M., Bottaro G., Spina M., Dotti M., Montanelli A., Barbato M., Viola F., Lazzari R., Vallini M., Guariso G., Plebani M., Cataldo F., Traverso G., Ventura A., et al. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr Suppl.* 412. 29-35, 1996.

48. Catassi C., Ratsch I.M., Fabiani E., Rossini M., Bordicchia F., Candela F., Coppa G.V., Giorgi P.L. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet*. 343(8891) 200-3, 1994.
49. Catassi C., Ratsch I.M., Gandolfi L., Pratesi R., Fabiani E., El Asmar R., Frijia M., Bearzi I., Vizzoni L. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet*. 354(9179) 647-48, 1999.
50. Cavell B., Stemhammar L., Asher H., Danielsson L., Dannaeus A., Lindberg T., Lindquist B. Increasing incidence of childhood coeliac disease in Sweden. Result of National study. *Acta Paediatr*. 81(8) 589-592, 1992.
51. Cernibori A., Gobbi G. Partial seizures, cerebral calcifications and celiac disease. *Ital J Neurol Sci*. 16(3) 187-91, 1995.
52. Ch'ng C.L., Biswas M., Benton A., Jones M.K., Kingham J.G. Prospective screening for coeliac disease in patients with Graves' hyperthyroidism using anti-gliadin and tissue transglutaminase antibodies. *Clin Endocrinol*. 62(3) 303-306, 2005.
53. Chirido F.G., Millington O.R., Beacock-Sharp H., McI Mowat A. Immunomodulatory Dendritic cells in intestinal lamina propria. *Eur. J Immunol* 35(6) 1831-40, 2005.
54. Chorzelwski T., Beutner E., Sulej, Tchorzewska H., Jablonska S., Kumar V., Kapuschincka A. IgA anti-endomysial antibody. A new immunological marker of dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Br Dermatol*. 111(4) 395-402, 1984.
55. Ciccocioppo R., Di Sabatino A., Bauer M., Della Riccia D.N., Bizzini F., Biagi F., Cifone M.G. Matrix metalloproteinase pattern in celiac duodenal mucosa. *Lab Invest*. 85(3) 397-407, 2005.

56. Ciclitira P.J., Ellis H.J. In vivo gluten ingestion in celiac disease. *Dig Dis Sci.* 16(6) 337-340, 1998.
57. Cintado A., Companioni O., Nazabal M., Camacho H., Ferrer A., De Cossio M.E., Marrero A., Ale M., Villarreal A., Leal L., Casavilla R., Benitez J., Novoa L., Diaz-Horta O., Dueñas M. Admixture estimates for the population of Havana City. *Ann Hum Biol.* 36(3) 350-60, 2009.
58. Clark J.A., Callicot P.A., Brenner N.A., et al. Selective IgA deficiency in Blood donors. *Am J Clin Path.* 80(2) 210-3, 1983.
59. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas.* 20. 37-46, 1960.
60. Collin P. Should adults be screened for celiac disease? What are the benefits and harms of screening? *Gastroenterology.* 128(4 Suppl 1) S104-8, 2005.
61. Corazza G.R., Biagi F., Andreani M.L., Gasbarrini G. Screening test for celiac disease. *Lancet.* 349(9048) 235-26, 1997.
62. Corrao G, Corazza GR, Bagnardi V, Brusco G, Ciacci C, Cottone M, Sategna Guidetti C, Usai P, Cesari P, Pelli MA, Loperfido S, Volta U, Calabró A, Certo M; Club del Tenue Study Group. Mortality in patients with coeliac disease and their relatives: a cohort study. *Lancet.* 358(9279) 356-61, 2001.
63. Costantini S., Rossi M., Colonna G., Facchiano A.M. Modelling of HLA-DQ2 and its interaction with gluten peptides to explain molecular recognition in celiac disease. *J Mol Graph Model.* 23(5) 419-31, 2005.
64. Cronin C.C., Shanahan F. Insulin-dependent diabetes mellitus and celiac disease. *Lancet.* 349(9058) 1096-7, 1997.

65. Crovella S., Brandao L., Guimaraes R., Filho J.L., Arraes L.C., Ventura A., Not T. Speeding up coeliac disease diagnosis in the developing countries. *Dig Liver Dis.* 39(10) 900-2, 2007.
66. Dahlbom I., Korponay-Szabó I.R., Kovács J.B., Szalai Z., Mäki M., Hansson T. Prediction of clinical and mucosal severity of coeliac disease and dermatitis herpetiformis by quantification of IgA/IgG serum antibodies to tissue transglutaminase. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 50(2) 140-6, 2010.
67. Daum S., Bauer U., Foss H.D., Schuppan D., Stein H., Riecken E.O., Ullrich R. Increased expression of RNAm for matrix metalloproteinase-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut.* 44(1) 17-25, 1999.
68. De la Concha E.G. Celiac disease: etiology and susceptibility. *An R Acad Nac Med (Madr).* 124(4) 813-24, 2007.
69. De Mey, J. The preparation of immunoglobulin gold conjugates (IGS reagents) and their use as markers for light and electron microscopic immunocytochemistry. In Cuello, A.C. (ed.), *Immunohistochemistry.* Wiley, New York, NY, pp.347-72, 1983.
70. Deshpande, S. S. *Enzyme Immunoassays from Concept to Product Development*, p. 464, Chapman & Hall, New York, 1996.
71. Di Sabatino A., Corazza G.R. Coeliac disease *Lancet.* 373(9673) 1480-93, 2009.
72. Dicke, W. *Coeliac Disease: Investigation of harmful effects of certain types of cereal on patients with celiac disease.* Doctoral Thesis, University of Utrecht, 1950.
73. Dickey W., McMillan S.A., Mc Cnim E.E., Evans E.E. Association between serum levels of total IgA and IgG class endomysial and antigliadin antibodies: implications for celiac screening. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 9(6) 59-62, 1997.

74. Dieterich W., Ehnis T., Bauer M., Donner P., Volta U., Riecken E.O., Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med.* 3(7) 797-801, 1997.
75. Dieterich W., Laag E., Schopper H., Volta U., Ferguson A., Gillet H., Riecken O., Schuppan D. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology.* 115(6)1317-21, 1998.
76. Dolinsek J., Urlep D., Karell K., Partanem J., Micetic-Turk D. The prevalence of celiac disease among family members of celiac disease patients. *Wien Klin Wochenschr.* 116 (Suppl 2) 8-12, 2004.
77. Dubé C., Rostom A., Sy R., Cranney A., Saloojee N., Garritty C., Sampson M., Zhang L., Yazdi F., Mamaladze V., Pan I., Macneil J., Mack D., Patel D., Moher D. The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review. *Gastroenterology* 128(4 Suppl 1) S57-67, 2005.
78. Ellis H.J., Pollock E.L., Engel W., Fraser J.S., Rosen-Bronson .S, Wieser H., Ciclitira P.J. Investigation of the putative immunodominant T cell epitopes in celiac disease. *Gut.* 52(2) 212-17, 2003.
79. Engler, K.H., Efstratiou A., Norn D., Kozlov R.S., Selga I., Glushkevich T.G., Tam M., Melnikov V.G., Mazurova I.K. Immunochromatographic strip test for rapid detection of diphtheria toxin: description and multicenter evaluation in areas of low and high prevalence of diphtheria. *J Clin Microbiol.* 4(1) 80-3, 2002.
80. Fasano A. Clinical Presentation of Celiac Disease in the Pediatric Population. *Gastroenterology.* 128(4 Suppl 1) S68–73, 2005.

81. Fasano A., Araya M., Bhatnagar S., Cameron D., Catassi C., Dirks M., et al. Celiac Disease Working Group. Federation of International Societies of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Consensus report on celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 47(2) 214-9, 2008.
82. Fasano A., Berti I., Gerarduzzi T., Not T., Colletti R.B., Drago S., Elitsur Y., Green P.H., Guandalini S., Hill I.D., Pietzak M., Ventura A., Thorpe M., Kryszak D., Fornaroli F., Wasserman S.S., Murray J.A., Horvath K. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multi-center study. *Arch Intern Med.* 163(3) 286-292, 2003.
83. Fernández A., González L., de la Fuente J. Coeliac disease: clinical features in adult populations. *Rev Esp Enferm Dig.* 102(8) 466-71, 2010.
84. Ferre-López S., Ribes-Koninckx C., Genzor C., Gamen S., Peña L., Ortigosa L., Méndez E. Immunochromatographic sticks for tissue transglutaminase and antigliadin antibody screening in celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2(6) 480-4, 2004.
85. Forsberg G., Hernell O., Melgar S., Israelsson A., Hammarström S., Hammarström M.L. Paradoxical coexpression of proinflammatory and down-regulatory cytokines in intestinal T cells in childhood celiac disease. *Gastroenterology.* 123(3) 667-78, 2002.
86. Fraser J. S., Engel W., Ellis H. J., Moodie S. J., Pollock E. L., Wieser H., Ciclitira P. J. Coeliac disease: in vivo toxicity of the putative immunodominant epitope. *Gut.* 52(12) 1698-1702, 2003.
87. Freemark M., Levitsky L. Screening for celiac disease in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 26(6) 1932-9, 2003.

88. Gale L., Wimalaratna H., Brotodiharjo A., Duggan J.M. Down's syndrome is strongly associated with celiac disease. *Gut*. 40(4) 492-6, 1997.
89. Garrido A., Luque A., Vázquez A., Hernández J.M., Alcántara F., Márquez J.L. Primary small bowel neoplasms as a complication of celiac disease. *Gastroenterol Hepatol*. 32(9) 618-21, 2009.
90. Garrote J.A., Blanco-Quiros A., Alonso M., Calvo C., Izquierdo B. Usefulness of antiendomysial Antibodies as a serological marker in coeliac disease. *Pediatr Allergy Immu*. 2(4) 199-208, 1991.
91. Garrote J.A., Sorell L., Alfonso P., Acevedo B., Ortigosa L., Ribes-Koninckx C., Gavilondo J., Mendez E. A novel visual immunoassay for coeliac disease screening. *Eur J Clin Invest*. 29(8) 697-9, 1999.
92. Gee S.J. On the coeliac affection. *St Bartholomew's Hospital Report*. 24.17-20, 1888.
93. Gianfrani C., Levings M.K., Sartirana C., Mazzarella G., Barba G., Zanzi D., Camarca A., Iaquinto G., Giardullo N., Auricchio S., Troncone R., Roncarolo M.G. Gliadin-specific type 1 regulatory T cells from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J Immunol*. 177(6) 4178-86, 2006.
94. Gómez J.C., Selvaggio G.S., Viola M., Pizarro B., la Motta G., de Barrio S., Castelletto R., Echeverría R., Sugai E., Vazquez H., Mauriño E., Bai J.C. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol*. 96(9) 2700-4, 2001.
95. Greco L., Corazza G., Babron M.C., Clot F., Fulchignoni-Lataud M.C., Percopo S. Genome search in celiac disease. *Am J Hum Genet*. 62(3) 669-75, 1998.
96. Green P.H., Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med*. 357(17) 1731-43, 2007.

97. Green P.H. Mortality in celiac disease, intestinal inflammation, and gluten sensitivity. *JAMA*. 302(11) 1225-6, 2009.
98. Green P.H. The Many Faces of Celiac Disease: Clinical Presentation of Celiac Disease in the Adult Population. *Gastroenterology*. 128(4 Suppl 1) S74-8, 2005.
99. Gunter R.G. Rational use of polimers, surfactants in dry reagent test systems. Course about theory and practice of rapid immunodiagnostic test; 1999 May 12-13; Milan, Italy: Biodot and Schlicher & Schuell, 1999.
100. Henegham M.A., Stevens F.M., Cryam E.M., Waner R.H., McCarthy C.F. Celiac sprue and immunodeficiency states: a 25 years review. *J Clin Gastroenterol*. 25(2) 421-5, 1997.
101. Herrera M., Theiler G., Augustovski F., Chertkoff L., Fainboim L., De Rosa S., Cowan E.P., Satz M.L. Molecular characterization of HLA class II genes in celiac disease patients of Latin American Caucasian origin. *Tissue Antigens*. 43(2) 83, 1994.
102. Herrero-González J.E. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of dermatitis herpetiformis. *Actas Dermosifiliogr*. 101(10) 820-6, 2010.
103. Hill I.D. Serological testing and diagnostic algorithms. In: Catassi C, Fasano A, Corazza GR (eds): *The Global Village of Coeliac Disease. Perspectives on Coeliac Disease*, vol. II. AIC Press, pp 131-35, 2005.
104. Hill I.D., Dirks M.H., Liptak G.S., Colletti R.B., Fasano A., Guandalini S., Hoffenberg E.J., Horvath K., Murray J.A., Pivor M., Seidman E.G. Guidelines for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: Recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 40(1) 1-19, 2005.

105. Hoffenberg EJ, MacKenzie T, Barriga KJ, Eisenbarth GS, Bao F, Haas JE, Erlich H, Bugawan TI T, Sokol RJ, Taki I, Norris JM, Rewers M. A prospective study of the incidence of childhood celiac disease. *J Pediatr.* 143(3) 308-14, 2003.
106. Holmes G.K. Celiac disease and type 1 diabetes mellitus – the case for screening. *Diabet Med;* 18(3) 169-77, 2001.
107. Hùe S., Mention J.J., Monteiro R.C., Zhang S., Cellier C., Schmitz J., Verkarre V., Fodil N., Bahram S., Cerf-Bensussan N., Caillat-Zucman S. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity.* 21(3) 367-377, 2004.
108. Jelinek, T., Eichenlaub S., Loscher T. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 18(9) 669–670, 1999.
109. Kalaydjian A.E., Eaton W., Cascella N., Fasano A. The gluten connection: the association between schizophrenia and celiac disease. *Acta Psychiatr Scand.* 113(2) 82-90, 2006.
110. Kapuscinska A., Zalewski T., Chorzelski T.P., Sulej J., Beutner E.H., Kumar V., Rossi T. Disease specificity and dynamics of changes in IgA class anti-endomysial antibodies in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 6(4) 529-34, 1987.
111. Karell K., Louka A.S., Moodie S.J., Ascher H., Clot F., Greco L., Ciclitira P.J., Sollid L.M., Partanen J. 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.* 64(4) 469-77, 2003.
112. Kaukinen K., Partanen J., Maki M., Collin P. HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 97(3) 695–9, 2002.

113. Kemp M., Husby S., Larsen M.I., Sveliag S.E. ELISA analysis of IgA subclass antibodies to dietary antigens. Elevated IgA1 antibodies in children with celiac disease. *Int Arch Allergy Appl Immunot.* 87(3) 247-53, 1988.
114. Kim C.Y., Quarsten H., Bergseng E., Khosla C., Sollid L.M. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc Nat Acad Sci.* 101(12) 4175-79, 2004.
115. Knivsber A.M., Reichelt K.L., Nodland M. Reports on dietary intervention in autistic disorders. *Nutr Neurosci.* 4(1) 25-37, 2001.
116. Knivsberg A.M., Reichelt K.L., Hoiien T., Nodland M. A randomised, controlled study of dietary intervention in autistic syndromes. *Nutr Neurosci.* 5(4) 251-61, 2002.
117. Koning F. The molecular basis of celiac disease. *J Mol Recognit.* 16(5) 333-6, 2003.
118. Kumar V., Beutner E.H., Chorzelski T.P. Distribution of monkey esophagus antigens reactive with IgA-class antibodies in the sera of dermatitis herpetiformis patients. *Arch Dermatol Res.* 276(5) 293-6, 1984.
119. Lagerqvist C., Ivarsson A., Juto P., Persson L.A., Hernell O. Screening for adult coeliac disease- which serological marker(s) to use? *J. Internal Med.* 250(3) 241-8, 2001.
120. Lammers K.M., Lu R., Brownley J., Lu B., Gerard C., Thomas K., Rallabhandi P., Shea-Donohue T., Tamiz A., Alkan S., Netzel-Arnett S., Antalis T., Vogel S.N., Fasano A. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology.* 135(1) 194-204, 2008.
121. Landis J.R., Koch G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 33(1) 159-74, 1977.

122. León F., Sánchez L., Camarero C., Roy G. Cytokine production by intestinal intraepithelial lymphocyte subsets in celiac disease. *Dig Dis Sci.* 50(3) 593-600, 2005.
123. Lionetti E., Francavilla R., Pavone P., Pavone L., Francavilla T., Pulvirenti A., Giugno R., Ruggieri M. The neurology of coeliac disease in childhood: what is the evidence? A systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol.* 52(8) 700-7, 2010.
124. Lionetti P., Pazzaglia A., Moriondo M., Azzari C., Resti M., Amorosi A., Vierucci A. Differing patterns of TGF- β expression in normal intestinal mucosa and in active celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 29(3) 308-13, 1999.
125. Lodha A., Haran M., Hollander G., Frankel R., Shani J. Celiac disease associated with dilated cardiomyopathy. *South Med J.* 102(10) 1052-4, 2009.
126. Louka AS, Sollid LM. HLA in coeliac disease: unraveling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens.* 61(2) 105-17, 2003.
127. Lundin K.E., Scott H., Hansen T., Paulsen G, Halstensen T.S., Fausa O., Thorsby E., Sollid L.M. Gliadin-specific, HLA-DQ ($\alpha 1^*0501$, $\beta 1^*0201$) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med.* 178(1) 187-96, 1993.
128. Mainardi E., Montanelli A., Dotti M., Nano R., Moscato G. Thyroid related autoantibodies and celiac disease: a role for a glutenfree diet? *J Clin Gastroenterol.* 35(3) 245-8, 2002.
129. Mainet-Gonzalez D., Galvan-Cabrera J.A., Sorell-Gomez L., Torres-Cabrera M.B., Abdo-Cuza A., Castellano-Gutierrez R., Padron-Brito N., Palenzuela-Gardon D., Novoa-Perez L.I. Evaluación preliminar de un inmunoanálisis de un solo paso, cualitativo y rápido de Troponina I cardíaca en el diagnóstico del infarto agudo del miocardio. *Invest Clin.* 45(3) 221-42, 2004.

130. Maiuri L., Ciacci C., Auricchio S., Brown V., Quarantino S., Londei M. Interleukin-15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*. 119(4) 996-1006, 2000.
131. Maiuri L., Ciacci C., Ricciardelli I., Vacca L., Raia V., Auricchio S., Picard J., Osman M., Quarantino S., Londei M. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet*. 362 (9377) 30-7, 2003.
132. Maki M, Hallstrom O, Marttinen A. Reaction of human non-collagenous polypeptides with celiac disease autoantibodies. *Lancet*. 338(8769) 724-5, 1991.
133. Maki M., Hallstrom O., Vesikari T., Visakorpi J.K. Evaluation of a serum IgA-class reticulin antibody test for the detection of childhood celiac disease. *J Pediatr*. 105(6) 901-5, 1984.
134. Maki M., Mustalahti K., Kokkonen J., Kulmala P., Haaplahti M., Karttunen T., Clonen J., Laurila K., Dahlbom I., Asno T., Hopfl P., Knip M. Prevalence of celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med*. 348(25) 2517-24, 2003.
135. Marsh M.N. Is celiac disease (gluten sensitivity) a premalignant disorder? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 24(5) S25-7, 1997.
136. McCormi P.A., Feighery C., Dolan D., O'Farrelly C., Kelliher P., Graeme-Cokk F., Finch A., Ward K., Fitzgerald M., O'Donoghue D. Altered gastrointestinal immune response in sarcoidosis. *Gut*. 29(12) 1628-31, 1988
137. Mearin M.L., Ivarsson A., Dickey W. Coeliac disease: is it time for mass screening? *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 19(3) 441-52, 2005.
138. Meeuwse G.W. Diagnostic criteria in celiac disease. *Acta Paediatr Scand*. 59(4) 461-3, 1970
139. Megiorni F., Mora B., Bonamico M., Barbato M., Montuori M., Viola F., Trabace S., Mazzilli M.C. HLA-DQ and susceptibility to celiac disease: evidence for gender differences and parent-of-origin effects. *Am J Gastroenterol*. 103(4) 997-1003, 2008.

140. Millipore Corporation. A short guide for developing immunochromatographic test strips. [36 screens] (1996). Available from: URL: <http://www.millipore.com> (consultado: 29 de octubre de 2007).
141. Molberg O., Mcadam S.N., Körner R., Quarsten H., Kristiansen C., Madsen L., Fugger L., Scott H., Norén O., Roepstorff P., Lundin K.E., Sjöström H., Sollid L.M. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med.* 4(6) 713-7, 1998.
142. Molberg O., Solheim Flaete N., Jensen T., Lundin K.E., Arentz-Hansen H., Anderson O.D., Kjersti Uhlen A., Sollid L.M. Intestinal T-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterology.* 125(2) 337-44, 2003.
143. Molberg O., Uhlen A.K., Jensen T., Flaete N.S., Fleckenstein B., Arentz-Hansen H., Raki M., Lundin K.E., Sollid L.M. Mapping of gluten T cell epitopes in the bread wheat ancestors; implications for celiac disease. *Gastroenterology.* 128(2) 393-401, 2005.
144. Monteiro E., Menezes M.L., Magalhaes Ramalho P. Anti-reticulin antibodies: a diagnostic and monitoring test for childhood coeliac disease. *Scand J Gastroenterol.* 21(8) 955-7, 1986.
145. Monteleone G., Pender S.L., Alstead E., Hauer A.C., Lionetti P., McKenzie C., MacDonald T.T. Role of interferon- α in promoting T helper cell type 1 response in the small intestine in coeliac disease. *Gut.* 48(3) 425-9, 2001.
146. Mustalahti K., Catassi C., Reunanen A., Fabiani E., Heier M., McMillan S., Murray L., Metzger M.H., Gasparin M., Bravi E., Mäki M.; Coeliac EU Cluster, Project Epidemiology. The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med.* 42(8) 587-95, 2010.

147. Myléus A., Ivarsson A., Webb C., Danielsson L., Hernell O., Högberg L., Karlsson E., Lagerqvist C., Norström F., Rosén A., Sandström O., Stenhammar L., Stenlund H., Wall S., Carlsson A. Celiac disease revealed in 3% of Swedish 12-year-olds born during an epidemic. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 49(2) 170-6, 2009.
148. Nilsen E.M., Jahnsen F.L., Lundin K.E., Johansen F.E., Fausa O., Sollid L.M., Jahnsen J., Scott H., Brandtzaeg P. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology.* 115(3) 551-63, 1998.
149. Nilsen E.M., Lundin K.E., Krajci P., Scott H., Sollid L.M., Brandtzaeg P. Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from celiac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma. *Gut.* 37(6) 766-76, 1995.
150. Olerup O., Alder A., Fogdell A. HLA-DQB1 and DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in two tours. *Tissue Antigens.* 41(3) 119-34, 1993.
151. Ozgör B., Selimoğlu M.A. Coeliac disease and reproductive disorders. *Scand J Gastroenterol.* 45(4) 395-402, 2010.
152. Paek S.H., Lee S.H., Cho J.H., Kim Y.S. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. *Method.* 22(1) 55-60, 2000.
153. Pereira L.F., Sapina A.M., Arroyo J., Vinuelas J., Bardaji R.M., Prieto L. Prevalence of selective IgA deficiency in Spain: more than we thought. *Blood.* 90(2) 893, 1997.
154. Pietzak M.M. Follow-up of patients with celiac disease: achieving compliance with treatment. *Gastroenterology;* 128(4 Suppl 1) S135-41, 2005.
155. Polvi A., Arranz E., Fernandez-Arquero M., Collin P., Mäki M., Sanz A., Calvo C., Maluenda C., Westman P., de la Concha E.G., Partanen J. HLA-DQ2-negative celiac disease in Finland and Spain. *Hum Immunol.* 59(3) 169-75, 1998.

156. Qiao S.W., Bergseng E., Molberg O., Xia J., Fleckenstein B., Khosla C., Sollid L.M. Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *J Immunol.* 173(3) 1757-62, 2004.
157. Rabasa B., Sagaro E., Fragoso T., Castañeda C., Gra B. Demonstration of celiac disease in Cuba. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 37(4) 587-97, 1980.
158. Rabassa E., Sagaro E., Fragoso T., Castañeda C., Gra B. Coeliac disease in Cuban children. *Arch Dis Child.* 56(2) 128-31, 1981.
159. Raivio T., Kaukinen K., Nemes E., Laurila K., Collin P., Kovács J.B., Mäki M., Korponay-Szabó .IR. Self transglutaminase-based rapid coeliac disease antibody detection by a lateral flow method. *Aliment Pharmacol Ther.* 24(1) 147-54, 2006.
160. Rastogi A., Malhotra V., Uppal B., Aggarwal V., Kalra K.K., Mittal S.K. Aetiology of chronic diarrhoea in tropical children. *Trop Gastroenterol.* 20(1) 45-9, 1999.
161. Reithinger, R., Quinnell, R. J., Alexander, B. & Davies, C. R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 40(7) 2352–56, 2002.
162. Rosenstein R.W., et al. Solid-phase assay employing capillary flow, U.S. Pat. 4,855,240, 1989.
163. Rostom A., Dubé C., Cranney A., Saloojee N., Sy R., Garritty C., Sampson M., Zhang L., Yazdi F., Mamaladze V., Pan I., McNeil J., Moher D., Mack D., Patel D. Celiac disease. *Evid Rep Technol Assess (Summ).* 104. 1–6, 2004.
164. Rostom A., Dubé C., Cranney A., Saloojee N., Sy R., Garritty C., Sampson M., Zhang L., Yazdi F., Mamaladze V., Pan I., MacNeil J., Mack D., Patel D., Moher D. The diagnostic

- accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology*. 128(4 Suppl 1) S38-46, 2005.
165. Roth J. The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry. In: Bullock G.R. and Petrusz P, eds. *Techniques in Immunocytochemistry*; 2: 217-84. New York, Academic Press, London, 1983.
166. Rubio-Tapia A., Murray J.A. The liver in celiac disease. *Hepatology*. 46(5) 1650-8, 2007.
167. Rumbo M., Chirido F.G., Ben R., Saldungaray I., Villalobos R. Evaluation of coeliac disease serological markers in Down syndrome patients. *Dig Liver Dis*. 34(2) 116–21, 2002.
168. Sagaro E., Jimenez N. Family studies of celiac disease in Cuba. *Arch Dis Child*. 56(2) 132-3, 1981.
169. Salvati V.M., MacDonald T.T., Bajaj-Elliott M., Borrelli M., Staiano A., Auricchio S., Troncone R., Monteleone G. Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in celiac disease. *Gut* 50(2) 186-90, 2002.
170. Salvati V.M., Mazzarella G., Gianfrani C., Levings M.K., Stefanile R., De Giulio B., Iaquinto G., Giardullo N., Auricchio S., Roncarolo M.G., Troncone R. Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured coeliac intestinal mucosa. *Gut*. 54(1) 46-53, 2005.
171. Sardy M., Odenthal U., Karpati S., Paulsson M., Smyth N. Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. *Clin Chem*. 45(12) 2142-9, 1999.
172. Savilahti E., Pelkonen P., Verkasalo M., Koskimies S. Selective deficiency of immunoglobulin A. *Klin Pediatr*. 197 (4) 336-40, 1983.

173. Schober E., Rami B., Granditsch G., Crone J. Coeliac disease in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: to screen or not, to treat or not? *Horm Res.* 57(Suppl 1) 97-100, 2002.
174. Schuppan D., Hahn E.G. *Biomedicine.* Gluten and the gut – lessons for immune regulation. *Science.* 297(5590) 2218-20, 2002.
175. Schuppan D., Hahn E.G. IgA anti-tissue transglutaminase: setting the stage for celiac disease screening. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 13(6) 635-7, 2001.
176. Schuppan D, Junker Y, Barisani D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology.* 137(6) 1912-33, 2009.
177. Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology;* 119(1) 234-42, 2000.
178. Scotta M.S., Salvatore S., Salvatoni A., De Amici M., Ghiringhelh D., Brogginini M., Nespoli L. Bone mineralization and body composition in young patients with celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 92(8) 1331-34, 1997.
179. Seah P.P., Fry L., Hoffbrand A.V., Holborow E.J. Tissue antibodies in dermatitis herpetiformis and adult coeliac disease. *Lancet.* 1(7704) 834–6, 1971.
180. Seah P.P., Fry L., Holborow E.J., Rossiter M.A., Doe W.F., Magalhaes A.F., Hoffbrand A.V. Antireticulin antibody: incidence and diagnostic significance. *Gut.* 14(4) 311-5, 1973.
181. Seissler J., Boms S., Wohlrab U., Morgenthaler N.G., Mothes T., Boehm B.O., Scherbaum W.A. Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase measured by radioligand assay: Evidence for high diagnostic sensitivity for celiac disease. *Horm Metab Res.* 31(6) 375-9, 1999.

182. Shan L., Molberg O., Parrot I., Hausch F., Filiz F., Gray G.M., Sollid L.M., Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*. 297(5590) 2275-9, 2002.
183. Sollid L.M and Khosla C. Future therapeutic options for coeliac disease. *Nat Clin Pract*. 2(3) 140-7, 2005.
184. Sollid L.M. and Lie B.A. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 3(9) 843-51, 2005.
185. Sollid L.M., Markussen G., Ek J., Gjerde H., Vartdal F., Thorbsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ α/β heterodimer. *J Exp med*. 169(1) 345-50, 1989.
186. Sollid L.M. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Rev*. 2(9) 647-55, 2002.
187. Sorell L., Acevedo B. Assay for anti transglutaminase antibodies detection useful in celiac disease diagnosis. U.S. Patent US 6, 905,835 B2, filed May 25, 2001, and issued Jun 14, 2005.
188. Sorell L., Acevedo B. Assay for anti transglutaminase antibodies. European Patent EP 1 164 375 B1, filed June 06, 2001, and issued August 02, 2006. Bulletin 2006/31.
189. Sorell L., Acevedo B. Procedimiento para la detección de anticuerpos antitransglutaminasa con utilidad en el diagnóstico de la enfermedad celíaca. Cuban Patent CU 22968 A1, filed June 07, 2000, and issued July 07, 2004.
190. Sorell L., Garrote J.A., Acevedo B, Arranz E. One-step immunochromatographic assay for screening of celiac disease. *Lancet* 359(9310) 945-6, 2002.
191. Stagi S., Giani T., Simonini G., Falcini F. Thyroid function, autoimmune thyroiditis and coeliac disease in juvenile connective tissue diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 23(2) 277, 2005.

192. Steens R.F., Csizmadia C.G., George E.K., Ninaber M.K., Hira Sing R.A., Mearin M.L. A national prospective study on childhood celiac disease in the Netherlands 1993-2000: an increasing recognition and changing clinical picture. *J Pediatr.*; 147(2) 239-43, 2005.
193. Stevens L., Rashid M. Gluten-free and regular foods: a cost comparison. *Can J Diet Pract Res.* 69(3) 147-50, 2008.
194. Stokes P.L., Prior P., Sorahan T.M., McWalter R.J., Waterhouse J.A.T, Cooke W.T. Malignancy in relatives of patients with coeliac disease. *Br J Pre Soc Med.* 30(1) 17-21, 1976.
195. Sulkanen S., Halttunen T., Laurila K., Kolho K.L., Korponay-Szabó I.R., Sarnesto A., Savilahti E., Collin P., Mäki M. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology.* 115(6) 1322-28, 1998.
196. Sundar S., Reed S. G., Singh V. P., Kumar P. C., Murray H. W. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet.* 351(9102) 563-5, 1998.
197. Suomalainen H., Isolauri E., Kaila M., Virtanen E., Arvilomni H. Cow's milk provocation induce immune response to unrelated dietary antigens. *Gut.* 33(9) 1179-83, 1992.
198. Torres E., Muñoz M. y otros: Validación clínica del inmunoensayo rápido BioLine-hCG para el diagnóstico precoz del embarazo BioLine-hCG. *Rev Cubana Med.* 37(3) 131-5, 1998.
199. Trinchieri G., Pflanz S., Kastelein R.A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players of T cell responses. *Immunity.* 19(5) 641-4, 2003.
200. Troncone R., Ferguson A. Antigliadin antibodies. *J Pediatr gastroenterol Nutr.* 12(2) 150-58. 1991.

201. Troncone R., Gianfrani C., Mazzarella G., Greco L., Guardiola J., Auricchio S., De Berardinis P. The majority of gliadin-specific T cell clones from the coeliac small intestinal mucosa produce both γ -interferon and IL-4. *Dig Dis Sci.* 43(1) 156-61, 1998.
202. Troncone R., Mayer M., Spagnuolo F., Muir L., Greo L. Endomysial antibodies as unreliable markers for slight transgressions in adolescents with coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 21(1) 355-73, 1995.
203. Uibo O., Uibo R., Kleimola V., Jõgi T., Mäki M. Serum IgA antigliadin antibodies in adult population sample. High prevalence without coeliac disease. *Dig Dis Sci.* 38(11) 2034-7, 1993.
204. Unsworth D.H., Walker-Smith J.A., Holborow E.J. Gliadin and reticulim antibodies in childhood coeliac disease. *Lancet.* 1(8329) 874-5, 1983.
205. Vader L.W., Stepniak D.T., Bunnik E.M., Kooy Y.M., de Haan W., Drijfhout J.W., Van Veelen P.A., Koning F. Characterization of cereal toxicity for coeliac disease patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology*; 125(4) 1105-13, 2003.
206. Vader W, Kooy Y, Van Veelen P, De Ru A, Harris D, Benckhuijsen W, Peña S, Mearin L, Drijfhout JW, Koning F. The gluten response in children with coeliac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology.* 122(7) 1729-37, 2002.
207. Valero N., Montiel M., Arias J. Fuentes B., Mavarez A, Nava L, Hernández, J. Comparación entre los métodos de inmunocromatografía e inmunoensayo enzimático (ELISA) en el diagnóstico del dengue. *Kasmera.* 34(1) 53-60, 2006
208. van de Wal Y., Kooy Y., van Veelen P., Peña S., Mearin L., Papadopoulos G., Koning F. Selective deamination by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol.* 161(4) 1585-8, 1998.

209. Veda Lab. New test generation. In: Clinical Laboratory International. Reed Elsevier Publication; 24: 13, 2000.
210. Volta U., Molinaro N., de Francis R. Correlation between IgA endomysial antibodies and subtotal villous atrophy in dermatitis herpetiformis. J Clin Gastroenterol. 14(4) 298-301, 1992.
211. Volta U., Nicolino M., Franceschi L., Fratangelo D., Bianchi F.B. IgA Anti-Endomysial Antibodies on Human Umbilical Cord Tissue for Celiac Disease Screening. Dig Dis Sci. 40(9) 1902-5, 1995.
212. Walker-Smith J.A., Guandalini S., Schmitz J., Schmerling D.H., Visakorpi J.K. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology, Nutrition. Arch Dis Child; 65(8) 909–11, 1990.
213. Wei J., Hemmings G.P. Gene, gut and schizophrenia: the meeting point for the gene-environment interaction in developing schizophrenia. Med Hypot. 64(3) 547-52, 2005.
214. Wright R. Role of autoimmunity in disease of the gastrointestinal tract and liver in: Immunology of the gastrointestinal tract and liver. Hayworth and Jones Eds. 1993-2017, New York ltd, 1998.

ANEXOS:

ANEXO 1: Datos de la seroteca proporcionados por el Dr. Eduardo Arranz del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, España

No. Tubo	Código	EliA-Celikey		Tiras rápidas				Inmuno Fluorescencia EmA IgA	Genética		Biopsia/Observaciones
		IgG (u/ml)	IgA (u/ml)	HFL ^a	CD 1	CD 1+ 2			DQ.A1*	DQ.B1*	
				AATGt ^b	AATGt ^b	AATGt ^b	AGA ^c				
1	03/110	3.5	57.9	+	+	+	-	-	+	+	EC al diag. AVT
2	03/27	14	138	+	+	+	+	+	+	+	EC al diag. 3/03 DSG
3	05/225	0.5	0.8	+ débil	-	+ débil	-	-	-	-	PADRE
4	96/325	272	154	+	+ débil	+	-	+			AVT al diag.
5	04/114	34.6	112	+	+ débil	+	-	-	+	+	EC al diag.
6	04/100	52.8	600	+	+	+	+	+	+	+	EC al diag.
7	03/23	3.3	600	+	+	+	+	-	+	+	EC al diag. AVT 2/03 DGS
8	03/84	23.7	600	+	+	+	-	-	+	+	EC al diag. AVST
9	03/101			+	+	+		-	+	+	EC al diag. AVT
10	03/123	67	600	+	+	+	+	-	+	+	EC al diag. AVT
11	03/115	138	600	+	+	+	+	-	+	+	EC al diag. AVT
12	03/119	11.6	600	+	+	+	+	-	+	+	EC al diag. AVT
13	05/45	13.3	600	+	+	+	+	-	+	+	AVST
14	05/42	20.4	38.4	+	-	+	+	+	+	+	AVT
15	02/166	2.6	600	+	+	+	-	+	+	+	Atrofia + infiltración
16	02/92	2.4	77.9	+	+	+	-	+	+	+	EC al diag. DM. 9/02 DSG
17	02/04	3.1	600	+	+	+	+	-	+	+	DH. EC al diag. AVT
18	03/161	7.5	66.5	+	+	+	+	+	+	+	EC al diag. AVT
19	96/105	18.1	600	+	+	+	+	+			AVT
20	98/65	11.2	600	+	+	+	-	+	+	+	AVT
21	03/133	0.4	600	+ débil	-	-	-	-	+	-	Sosp. EC al diag. Def IgA
22	05/194						-		+	+	PADRE
23	94/81	6.9	52	+	+	+	-	+			AVT al diag.
24	02/148	47.5	600	+	+	+	+	+	+	+	EC al diag. 11/02 DSG

25	02/7	28.5	600	+	+	+	-	+	-	-	EC al diag. 1/02 DSG
26	05/83	0.5	0.5	-	-	-	-	-			Enf. Inflam. Intestinal
27	05/218	0.8	1.7	-	-	-	-		+	+	PADRE
28	05/5	0.5	0.3	-	-	-	-		+	+	PADRE
29	05/107	0.6	0.7	-	-	-	-		+	+	PADRE
30	05/128	0.3	0.2	-	-	-	-		+	-	PADRE
31	05/123	0.3	0.3	-	-	-	-	-	+	+	PADRE
32	05/153	0.3	0.9	-	-	-	-	-	-	+	PADRE
33	05/160	0.3		-	-	-	-	-	+	+	PADRE
34	04/137	0.3	0.3	-	-	-	-	-	+	+	PADRE
35	04/127	0.6	0.3	-	-	-	-	-	+	+	PADRE
36	05/173	0.5	0.2	-	-	-	-	-	+	+	PADRE
37	05/168	0.6	0.8	-	-	-	-	-	+	+	PADRE
38	05/180	0.6	0.5	-	-	-	-	-	-	+	PADRE
39	05/232	1.1	0.4	-	-	-	-	-	+	+	PADRE
40	05/44	0.7	0	-	-	-	+		+	-	HERMANA
41	04/141	3.1	9.6	-	-	+	-	-	+	+	DSG desde 9/04
42	05/22	0.4	0	-	-	-	-		+	+	HERMANO
43	05/23	0.5	0.5	-	-	-	-	-	+	+	Atrof. III
44	05/27	0.7	1.2	-	-	-	-	-	+	+	HERMANA
45	05/28	0.8	0.8	-	-	-	-	-			HERMANA
46	05/29	0.6	0.7	-	-	-	-	-	+	+	MADRE
47	05/30	0.7	0.8	-	-	-	-	-	+	+	EC (en DSG)

Valores de referencia (EliA-Celikey IgA e IgG)

IgG: <7 negativo 7-10 dudoso >10 positivo
IgA: <7 negativo 7-10 dudoso >10 positivo

ANEXO 2: Informe de validación del sistema HeberFast Line® anti-transglutaminasa realizado por el Dr. Eduardo Arranz del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, España



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Departamento de Pediatría, Inmunología
Ginecología-Obstetricia, Nutrición-Bromatología,
Psiquiatría e Historia de la Ciencia

FACULTAD DE MEDICINA
Avda. Ramón y Cajal nº 5; 47005-VALLADOLID
Tlf: 983 42 31 86 / Fax: 983 18 38 12
e-mail: pediatria@med.uva.es

Validación de la prueba rápida (HEBER FAST LINE anti Transglutaminasa) para la detección de anticuerpos anti-transglutaminasa (TGt) de clase IgA e IgG

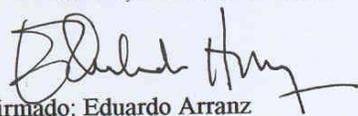
Se ha confirmado la utilidad diagnóstica en la enfermedad celíaca (EC) de la prueba Heber Fast Line (HFL) que detecta conjuntamente anticuerpos IgA e IgG antitransglutaminasa (Sorell y cols, Lancet 2002; 359:945-46), con una sensibilidad del 100% en pacientes con dieta libre y biopsia intestinal con atrofia vellositaria. Además, se observó una correspondencia entre los resultados de esta prueba y la determinación de anticuerpos antiendomiso (AEm-IgA) por inmunofluorescencia indirecta (IFI), y de anticuerpos anti-TGt mediante un ELISA comercial (Celikey, Pharmacia). También se ha confirmado la utilidad de la prueba en el diagnóstico diferencial de otras patologías gastrointestinales (Sorell y cols, Am J Gastroenterol 2004; 99:1330-32).

Para validar la utilidad diagnóstica de la prueba rápida HFL anti Transglutaminasa producida por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus, Cuba, en individuos sometidos a seguimiento y monitorización periódica por pertenecer a grupos de riesgo (familiares de pacientes con EC, etc.), se han estudiado 22 muestras de suero o plasma con serología positiva (en especial, anticuerpos anti-TGt de clase IgA e IgG por ELISA) obtenidas de pacientes con EC al diagnóstico (lesión atrófica y HLA-DQ2 positivo en todos, excepto en 4 casos, en los que no se pudo hacer el estudio genético); y otras 27 muestras con serología negativa, 20 de familiares directos de pacientes con EC (14 con EC potencial: HLA-DQ2 positivo y serología negativa, 5 casos tenían al menos uno de los alelos de riesgo, y en 1 no se pudo realizar el estudio genético); 3 eran pacientes con EC en dieta sin gluten, 1 fue estudiado por sospecha de EC para descartar la enfermedad, y 1 paciente con enfermedad inflamatoria intestinal.

Se realizó un análisis comparativo entre la prueba rápida HFL y las otras pruebas serológicas utilizadas en el diagnóstico de la EC (AEm-IgA, y anti-TGt IgA e IgG por ELISA), así como con otras pruebas rápidas ya existentes (CD1 anti-TGt y CD1+2 anti-TGt y anti-gliadina, Operon). En los pacientes con EC y dieta libre (al diagnóstico), la concordancia fue total entre los resultados de la prueba rápida HFL (IgA+IgG anti-TGt) y de IgA anti-TGt por ELISA comercial (Celikey, Pharmacia), tomado como referencia. No se detectó ningún falso negativo por HFL, y sólo 3/22 falsos positivos tenían niveles bajos de IgG anti-TGt por ELISA. En el grupo de individuos con serología negativa, la correlación fue también significativa entre la prueba HFL y los resultados de AEm y anti-TGt por ELISA. Respecto a la determinación de AEm, la concordancia de la prueba HFL fue menor. Por el contrario, los resultados de la otra tira rápida muestran casos falsos negativo (pacientes EC con dieta libre y biopsia atrófica), y positivo (familiares con serología negativa, o pacientes con EC y dieta sin gluten).

Se han confirmado las ventajas de la prueba rápida HFL comparada con otras ya existentes, debido a que se trata de una prueba simple, que no requiere equipamiento para su realización o evaluación, y que proporciona resultados rápidos y reproducibles. Los datos confirman el interés y utilidad de esta prueba para la detección de IgA e IgG anti-TGt en el diseño de estrategias para la identificación y seguimiento de individuos con alto riesgo de EC en los Centros de Salud y consultas de Atención Primaria.

En Valladolid, a 12 de febrero del 2007


Firmado: Eduardo Arranz

ANEXO 3: Consentimiento informado

Consentimiento informado firmado por el padre o tutor para participar en el estudio de búsqueda de genes asociados a enfermedades que afectan la salud humana.

La enfermedad celíaca es una intolerancia permanente a las proteínas presentes en algunos cereales como el trigo, la cebada, el centeno y posiblemente la avena, que provocan un daño de la mucosa intestinal en los individuos genéticamente predispuestos. Los principales síntomas clínicos son diarreas, vómitos y retardo del crecimiento. Afecta generalmente a niños menores de tres años, pero también se presenta en adultos, muchas veces de manera asintomática o latente. La enfermedad celíaca ha sido asociada con una mayor incidencia de linfoma intestinal cuando no es diagnosticada y tratada tempranamente. El tratamiento consiste en la eliminación de por vida de la dieta de estos pacientes aquellos alimentos que contengan estas proteínas (alimentos libres de gluten) y por ello se requiere de un diagnóstico precoz y certero de la enfermedad. Este diagnóstico se realiza mediante biopsia intestinal. Para reducir el número de biopsias que se requieren para un diagnóstico preciso de esta enfermedad se ha recomendado el uso de pruebas serológicas para evaluar los niveles de anticuerpos anti gliadina, antiendomisio y antitransglutaminasa.

Existe una alta asociación entre la presencia de determinados genes que codifican para moléculas de clase HLA y la enfermedad celíaca, además la predisposición familiar a padecer esta enfermedad está aumentada entre un 10 y un 12%. Este estudio en nuestro país no se ha realizado aún, por lo que es de una gran importancia su colaboración para la implementación del mismo para una mejor caracterización de esta enfermedad.

Doy mi consentimiento para que se me realice una extracción de sangre de 10 mL, necesaria para la obtención de mi ADN, el cual será utilizado en la búsqueda de genes relacionados con la enfermedad celíaca. En caso ser necesario estoy de acuerdo con que se me realice una segunda extracción con iguales características.

He sido informado además que al firmar esta acta de consentimiento de participación en este estudio autorizo no solo a los investigadores, sino además a las autoridades regulatorias, a tener libre acceso a mi historia clínica para verificar cualquier dato de interés manteniendo en todo momento la confidencialidad. Los documentos que me identifican serán confidenciales y no estarán a disposición pública. De igual forma, de publicarse los resultados obtenidos en esta investigación mi identidad será confidencial.

Conozco y he comprendido claramente los objetivos de este trabajo, así como en qué consisten los procedimientos médicos. Declaro que he tenido la oportunidad de aclarar todas mis dudas respecto a esta investigación por lo que estoy totalmente de acuerdo en autorizar a mi hijo como parte de este estudio.

Se me ha explicado que esta aprobación es totalmente voluntaria y no representa ningún compromiso, pues estoy en plena libertad de no aceptarla o retirarla cuando estime conveniente, con garantías de recibir una atención médica adecuada

Yo, _____, quien suscribe, hago constar por este medio mi consentimiento voluntario para que mi hijo participe en un estudio de búsqueda de genes asociados a la enfermedad celíaca.

Para constancia de lo expuesto anteriormente firmo este documento, en Ciudad de la Habana, el día _____ del 200_.

Firma del padre o tutor

Firma del Investigador principal

ANEXO 5: Certificado de Registro Sanitario



REPÚBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA

CENTRO PARA EL CONTROL ESTATAL DE LA CALIDAD DE LOS MEDICAMENTOS

CERTIFICADO DE REGISTRO SANITARIO

Se otorga el presente como constancia de que se ha autorizado la comercialización en el territorio nacional del producto que a continuación se describe, dando cumplimiento así a lo establecido en el Reglamento para el Registro Sanitario de Diagnosticadores vigente.

1. PRODUCTO	HeberFast Line anti-transglutaminasa
1.1 Aplicación	Para la detección de anticuerpos contra transglutaminasa en suero o plasma humano. Uso profesional.
1.2 Presentación	Estuche para 25 pruebas.
1.3 Almacenamiento	De 2 a 8 °C.
1.4 Periodo de validez	12 meses.
2. TITULAR	Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). 2.1 País CUBA
2.2 Domicilio legal	Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana.
2.3 Razón social	Titular.
3. FABRICANTE	Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus (CIGB-SS). 3.1 País CUBA
3.2 Domicilio legal	Circunvalante Norte, S/N, Olivos 3, Apdo. Postal 83, CP 60200, Sancti Spiritus.
4. INSCRIPCIÓN No.	D0702-03 4.1 Fecha 2 FEB 2007

Este Certificado es válido única y exclusivamente para lo declarado en el Expediente de Registro del producto descrito, que obra en poder del CECMED, y cuya vigencia expira en la fecha **Febrero 2012**

CERTIFICADO DE REGISTRO SANITARIO

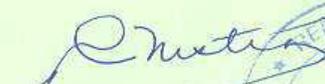
5. RELACIÓN DE COMPONENTES DEL PRODUCTO

6. RENOVACIÓN SI NO Fecha de aprobación: -

7. MODIFICACIÓN SI NO Fecha de aprobación: -

Aspectos modificados: -

8. OBSERVACIONES -


DR. RAFAEL B. PÉREZ CRISTIA
DIRECTOR



Registro de la Secretaría del CECMED/

Tomo 02 Folio 000107 No. 005/01.024.001 fecha 02/02/15 Firma 

ANEXO 6: Prospecto del sistema HeberFast Line® anti-transglutaminasa

HeberFast Line® anti-transglutaminasa

Prueba rápida, de un paso, para la detección de anticuerpos contra transglutaminasa en suero, plasma y sangre humana

Prueba inmunocromatográfica para IgG / IgA

Para uso profesional



IVD



INTRODUCCIÓN

La enfermedad celiaca (EC) es una intolerancia permanente al gluten, específicamente a su fracción proteica, la gliadina en el trigo y a sus proteínas homólogas en otros cereales como la hordeína (cebada), la secalina (centeno), que provocan un daño de la mucosa intestinal en los individuos genéticamente predispuestos (1,2). La incidencia general de la EC se estima entre 1:100 y 1:300. La sintomatología clínica clásica, se produce fundamentalmente en niños menores de 3 años y en adultos de la 3ª y 4ª década, donde predominan los síntomas digestivos y las afectaciones nutricionales. La EC puede presentarse con otras patologías (EC atípica) en las que predominan los síntomas no digestivos, que pueden presentarse a cualquier edad, y que en dependencia de esta pueden incluir retraso del crecimiento, retraso del desarrollo y la pubertad (que en la edad adulta, especialmente en la mujer, tendrían su equivalente en infertilidad, o abortos a repetición, alteraciones del metabolismo calcio/ fósforo con osteopenia, osteoporosis y manifestaciones articulares), anemia por falta de hierro que no responde al tratamiento, lesiones en la boca (hipoplasia y las aftas a repetición), alteraciones neurológicas (epilepsias y ataxias) y psiquiátricas (alteraciones de conductas y depresión), entre otras. En algunos países estas formas atípicas superan en frecuencia a la forma clásica. La EC se presenta con mayor frecuencia asociada a otras enfermedades tales como la Diabetes Insulinodependiente, el Síndrome de Down, la Dermatitis herpetiforme, entre otras. Además la EC puede presentarse muchas veces de manera asintomática o latente (3). En la actualidad se piensa que estas formas sin síntomas pueden ser muy frecuentes e incluso superar a las formas sintomáticas. La EC ha sido asociada con una mayor incidencia de linfoma intestinal cuando no es diagnosticada y tratada tempranamente (4). El tratamiento de la EC consiste en la eliminación de por vida de la dieta de estos pacientes, los alimentos que contengan estas proteínas (alimentos libres de gluten). Por ello se requiere de un diagnóstico precoz y certero de la enfermedad, el cual se realiza mediante biopsia intestinal. Con el objetivo de reducir el número de biopsias necesario para dar un diagnóstico preciso de la EC, la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición ha recomendado el uso de pruebas serológicas para evaluar los niveles de anticuerpos antigliadinas (AGA), antiendomiso (EMA) o antireticulinas (ARA) en el suero de estos pacientes (5).

En el año 1997 Dietrich y colaboradores identificaron a la transglutaminasa (tTG) como el antígeno principal reconocido por los anticuerpos antiendomiso y como marcador más específico de la enfermedad celiaca (6).

El diagnosticador HeberFast Line® anti-Transglutaminasa para la detección de anticuerpos IgG e IgA en suero, plasma o sangre humana, es un ensayo rápido y simple, de un solo paso, sin procesamiento previo de las muestras de sangre y con un tiempo de duración de 15 minutos, el cual puede ser realizado incluso, en condiciones de campo (7).

HeberFast Line® anti-Transglutaminasa consiste en un juego compacto especialmente desarrollado para la operación manual y lectura visual de los resultados. Su empleo es recomendable en:

- El pesquiasaje de pacientes con síntomas clínicos sugestivos de enfermedad celiaca (EC).
- El diagnóstico de individuos asintomáticos con antecedentes familiares de EC.
- El estudio de pacientes portadores de patologías donde la EC ha sido reportada con mayor frecuencia (ej: Diabetes mellitus insulino dependiente, síndrome de Down, deficiencia selectiva de IgA).
- El monitoreo de la eficacia de una dieta libre de gluten en los pacientes celiacos.

La prueba constituye un complemento importante a una primera biopsia intestinal para el diagnóstico de la EC.

PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO

HeberFast Line® anti-Transglutaminasa es un ensayo cualitativo rápido, de un paso, para la detección de anticuerpos IgG e IgA anti-transglutaminasa. Cada determinación está compuesta por una tira de nitrocelulosa (NC), sensibilizada con transglutaminasa tisular de cobayo en una primera línea (LÍNEA POSITIVA) y un reactivo de control capaz de unir al conjugado de tTG-oro coloidal en exceso en una segunda línea (LÍNEA DE CONTROL), que constituyen la fase sólida del sistema. La membrana de NC se pone en contacto por el extremo inferior con un material macroporoso, en el cual se encuentra depositado y seco el conjugado de transglutaminasa-oro coloidal, que constituye la fase móvil del sistema. Por el extremo superior de la NC se localiza un material absorbente, que facilita la migración de la reacción.

De esta manera al ponerse en contacto el material macroporoso con una muestra líquida, se produce una solubilización del conjugado y una migración de las sustancias reaccionantes a través de la tira de NC. Si la muestra tiene anticuerpos anti-transglutaminasa estos reaccionan con las partículas de oro conjugadas con tTG. Los inmunocomplejos migran a través de la NC formándose una primera línea horizontal coloreada (LÍNEA POSITIVA).

En ausencia de anticuerpos anti-transglutaminasa en la muestra esta LÍNEA POSITIVA no se forma. Al mismo tiempo el exceso de conjugado, no atrapado en la LÍNEA POSITIVA, continúa moviéndose y es atrapado por un reactivo fijado a la fase sólida, capaz de reaccionar con el conjugado tTG-oro coloidal, formándose una segunda línea horizontal coloreada (LÍNEA CONTROL). La LÍNEA CONTROL se forma tanto con las muestras que contengan anticuerpos anti-transglutaminasa, como con las muestras negativas, como demostración de que los reactivos han funcionado correctamente.

PRESENTACION

Cada estuche HeberFast Line® anti-Transglutaminasa contiene:

- 20 tiras reactivas, cada una en un casete plástico dentro de una bolsa sellada de aluminio conteniendo además una bolsita desecante.
- 1 frasco conteniendo 5 mL del tampón de dilución de las muestras a evaluar.
- 1 estuche conteniendo 30 microcapilares heparinizados para la toma de las muestras de sangre.
- 20 lancetas estériles.
- Instrucciones para el uso

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

La prueba HeberFast Line® anti-Transglutaminasa debe ser almacenada de 2 a 8 °C (36 a 42 °F) en su bolsa sellada hasta la fecha de vencimiento declarada en el envase. No congelar la bolsa conteniendo la tira ni la solución de dilución.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- No utilice las tiras reactivas después de la fecha de vencimiento impresa en el envase exterior del producto.
- Los componentes de esta prueba son completamente inocuos y no representan ningún riesgo biológico para quienes realicen la prueba.
- Utilice siempre una lanceta nueva y estéril para realizar la punción digital a cada paciente.
- Las muestras de cada paciente pueden contener agentes infecciosos, por lo que deben ser tratadas y desechadas como material biológico, tomándose las precauciones universales establecidas para el trabajo con fluidos corporales de origen humano.
- Los resultados de la prueba deben interpretarse después de transcurridos los 15 minutos de reacción, aunque para muestras con altos títulos de anticuerpos puede tenerse un resultado de la prueba mucho antes (5-10 minutos). No evaluar el resultado de la prueba después de 15 minutos.
- Esta prueba no es reutilizable.

PROCEDIMIENTO

- 1) Espere que la solución de dilución, la bolsa con la tira reactiva y las muestras de suero o plasma, alcancen la temperatura ambiente antes de comenzar la prueba.
- 2) Abra cuidadosamente la bolsa de aluminio empleando el corte lateral y extraiga la tira reactiva. Coloque el casete plástico sobre una superficie horizontal.
- 3) Extracción de sangre; la muestra de sangre se extraerá mediante punción digital (puede elegirse el dedo índice, medio o anular), procediendo según los pasos descritos a continuación:
 - a. Limpie la punta del dedo elegido con un algodón humedecido en alcohol al 70 % (no suministrado) y deje secar al aire.
 - b. Coloque la mano con la palma hacia arriba y puncione con una lanceta estéril. Deseche inmediatamente la misma en un contenedor apropiado.
 - c. Utilice el microcapilar para coleccionar la sangre. Tenga en consideración que el dedo puncionado debe mantenerse a una altura inferior a la del codo y que se debe presionar el mismo en la base de la punción de forma suave e intermitente, para favorecer la extracción de la muestra de sangre. El microcapilar se mantendrá horizontalmente, de manera que el extremo contacte con las gotas de sangre. Termine la colecta de la muestra, una vez que la columna del microcapilar alcance unas ¾ partes de su volumen total.
- 4) Aplique rápidamente la muestra de sangre extraída directamente en el pocillo de la muestra, identificado con la letra "S" en el casete plástico. Garantice que todo el contenido del microcapilar ha sido depositado, golpeando suavemente el extremo del mismo en el fondo interior del pocillo. Para muestras de suero o plasma aplique 2 gotas (aprox. 100 µL). Puede auxiliarse de uno de los capilares suministrados.
- 5) A continuación, añada en el mismo pocillo de la muestra (S), 2 gotas del tampón de dilución, auxiliándose del gotero.
- 6) Lea los resultados transcurridos 15 minutos después de aplicar la muestra (Figura 1).
- 7) **Resultado Positivo:** cuando aparecen dos (2) líneas de color rojo o rosado en la ventana de resultados. Las líneas pueden no ser de igual intensidad y aparecer una antes que la otra. Un resultado positivo no cambiará con el tiempo transcurrido a partir de que aparecieron las dos líneas.
- 8) **Resultado Negativo:** cuando aparece sólo una (1) línea coloreada en la mitad superior de la ventana de resultados.
- 9) **Resultado No Válido:** cuando no se observa la línea control en la parte superior de la ventana de resultados. En este caso repita la prueba con otra tira reactiva.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICAS

En la evaluación del desempeño realizada con muestras de suero de 50 pacientes celíacos sin tratamiento y diagnosticados según la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición, la prueba resultó positiva en los 50 pacientes para un 100 % de sensibilidad (95% CI, 92.9-100%). Estas mismas muestras fueron testadas con un ELISA comercial (Celikey Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Germany) para anticuerpos IgA contra transglutaminasa y anticuerpos IgA contra endomisio de mono (BioSystem, Barcelona, España), de ellas 47 muestras fueron positivas por el ELISA para una sensibilidad del 94 % (88.2-98.4%) y 48 positivas por inmunofluorescencia indirecta para un 96% (89.1-99%).

Para la especificidad se testaron muestras de 40 pacientes no celíacos que presentaban trastornos intestinales, todas las muestras fueron negativas por los tres sistemas para un 100% de especificidad (91.2-100%). La sensibilidad y especificidad de estos tres sistemas (ensayo inmunocromatográfico, ELISA e inmunofluorescencia indirecta) se calcularon sobre la base del resultado de la biopsia de yeyuno como estándar de oro para la enfermedad celíaca.

En 15 pacientes con biopsia intestinal normal y en dieta libre de gluten (DLG) o después del reto, encontramos un falso positivo con nuestro ensayo y cinco falsos positivos con el ELISA.

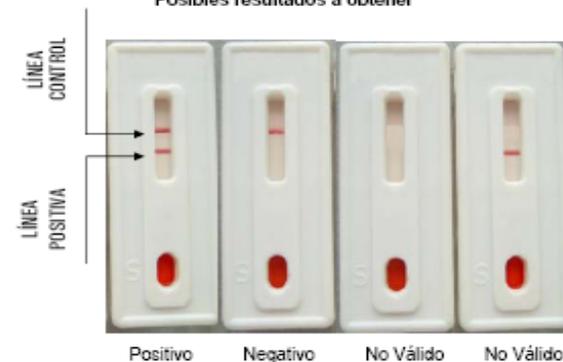
En seis pacientes con atrofia parcial de las vellosidades (tres con DLG y tres en reto) el ensayo inmunocromatográfico mostró tres falsos negativos, mientras que el ELISA detectó cuatro falsos negativos. En seis pacientes cuyas biopsias presentaban atrofia total o subtotal de las microvellosidades después del reto con gluten, el sistema ELISA no detectó un paciente con déficit de IgA, mientras que nuestro ensayo HeberFast Line® anti-Transglutaminasa lo detectó.

Se estudiaron con los ensayos inmunocromatográfico, ELISA, y de inmunofluorescencia indirecta las muestras de suero de veintidós familiares de primer grado (sin síntomas clínicos) de enfermos celíacos y se detectaron dos muestras positivas con estos tres ensayos, sugiriendo que estos dos individuos pueden ser enfermos celíacos con una presentación silente de la enfermedad (7).

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Cole SG et al. Ann Rev Nutr 1985; 5: 241-266.
- 2.- Ferguson A et al. Dyn Nutr Res Basel Karger 1992;2: 119-127.
- 3.- Catassi C et al. Lancet 1994; 343: 200-203.
- 4.- Holmes GK et al. Gut 1989; 30: 333-338.
- 5.- Walker-Smith et al. Rep. Work Group Eur Soc Pediatric Gastroenterol Nutr 1990;65: 909-911.
- 6.- Dietrich W et al. Nat Med 1997 ;3 : 797-801
- 7 Luis Sorell, et al. Lancet 2002 Mar 16;359(9310):945-6.

Figura 1.
Posibles resultados a obtener



Distribuidor



Heber Biotec S.A., Apdo. 6162, La Habana, Cuba.



Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus, Circunvalante Norte, S/N, Olivos 3, Apdo. Postal 83, Código Postal 60 200, Sancti Spiritus, Cuba.

e-mail: atencioncliente.ciqbss@ciqb.edu.cu

☎: (53-041)-326273 Fax: (53-041)-328539

SÍMBOLOS UTILIZADOS EN EL ROTULADO

	Estuche para "n" pruebas		Consulte las instrucciones para el uso
	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>		Lote
	Fabricante		Fecha de vencimiento
	Temperatura de almacenamiento		

HeberFast Line® es la marca registrada de las tiras cromatográficas para el diagnóstico *in vitro* producidas por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus y comercializadas por Heber Biotec S.A.

ANEXO7: Aval económico



Aval del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología sobre aporte económico de la propuesta para Premio del XVI Forum de Ciencia y Técnica del trabajo titulado “DESARROLLO, VALIDACION Y REGISTRO DEL SISTEMA *HeberFast Line*® *Anti-Transglutaminasa*. CONTRIBUCIÓN AL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD CELIACA EN CUBA.”

El método en que se basa el sistema ***HeberFastLine*® *Anti-Transglutaminasa*** fue objeto Patente (Assay for anti transglutaminase antibodies, Patente numero [EP1164375](#)) presentada y aprobada en Cuba, Comunidad Económica Europea, E.U.A, Rusia y Argentina. Es de destacar que el 1% de la población Europea y de América del Norte padece la enfermedad celiaca, lo cual representa un gran mercado para nuestro producto.

La Empresa Farmaiuris SC de España que representa al CIGB en las negociaciones ante tres compañías europeas interesadas en la licitación del sistema ***HeberFast Line*® *Anti-Transglutaminasa*** en Europa y Estados Unidos, aportó al país un total de **\$97 876.86 USD** para la producción de las determinaciones necesarias para la licitación del sistema ***HeberFast Line*® *Anti-Transglutaminasa*** en Europa y Estados Unidos. El total de este dinero fue ingresado a nuestro centro.

Del dinero aportado a nuestro país por la Empresa Farmaiuris SC, **\$ 24,868.86 USD** fueron por concepto de materias primas y **\$ 73 008.00 USD** por concepto de la compra del equipamiento y accesorios necesarios para la producción (ver anexos).

Con la adquisición de este equipamiento se cambió totalmente la tecnología inmunocromatográfica de la Unidad de Producción de Diagnosticadores del CIGB-SS, que ya era obsoleta. Por lo que al valor económico de esta inversión hay que añadirle que con la nueva tecnología adquirida se aumenta la productividad y la eficiencia en la producción de otros sistemas inmunocromatográficos de la línea ***HeberFastLine*®** como el ***HeberFastLine*® *Embarazo*** y el ***HeberFastLine*® *Rotavirus***, ambos con Registro Sanitario aprobado por el Centro para el Control Estatal y la Calidad de los Medicamentos (CECMED).

Sin otro asunto que tratar,

Ing. Fidel Lima Pérez
Director Económico.
CIGB



AUTOBIBLIOGRAFÍA

Publicaciones del autor relacionadas con el tema de tesis:

1. **José A Galván**; Carlos Castañeda; Emilio A. Rodríguez, et al Screening for celiac disease in a healthy Cubans children cohort from Pinar del Río province. **Biotechnol Apl.** [online]. 2010, vol.27, n.4, pp. 291-293. ISSN 1027-2852.
2. **José A. Galván**, Gilda Lemos, María E. Fernández de Cossio, et al. Silent Celiac disease in a cohort of healthy adults **Autoimmunity 2009. Dec;42(8):705-8.**
3. **José Armando Galván**, Boris Acevedo, Lidia Inés Novoa, et al. Desarrollo, validación y registro del sistema HeberFast Line[®] Anti-Transglutaminasa. Contribución al diagnóstico de la enfermedad celiaca en Cuba. **Biotechnol Apl, enr.-mar. 2008, 25(1):62-5.**
4. **José A. Galván Cabrera**, Eduardo Cabrera Rode, Gisela Molina Mato, et al. Celiac disease-associated antibodies in type 1 diabetes patients in Cuba. **Biotechnol Apl enr.-mar. 2008, 25(1):47-50.**
5. Velasco Elizalde C. Sorell Gómez L. Garrote JA. **Galván JA**, et al. Diagnóstico de la Enfermedad Celíaca en pacientes con giardiasis: Importancia de los anticuerpos antitransglutaminasa. **Revista de Gastroenterología de México. Vol. 71. Supl. 2. Nov. 2006. Pg. 132**
6. Cintado A, Sorell L, **Galván JA**, et al. HLA DQA1*0501 and DQB1*02 in Cuban celiac patients. **Human Immunology 2006, 67(8):639-42.**
7. L Sorell, **JA Galván**, B Acevedo. Screening of celiac disease in Cuba. **In: Catassi C, Fasano A, Corazza GR (eds): The Global Village of Coeliac Disease. Perspectives on Coeliac Disease, vol. II. AIC Press, 2005. pp 131-35.**

8. Sorell L, Garrote JA, **Galván JA**, et al. Celiac Disease Diagnosis in Patients with Giardiasis: High Value of Antitransglutaminase Antibodies. **Am J Gastroenterol. 2004; 99(7):1330-2.**
9. Castaneda, C.; Alvarez-Fumero, R.; Sorell, L.; **Galvan, J. A.**; Carvajal, F. Screening for coeliac disease in risk group in Cuba. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition: Volume 39 Supplement 1 June 2004 pp S211-S212**

Otras publicaciones del autor relacionadas con la temática:

1. Santana-Porbén S, **Galván-Cabrera JA**, Noa-Pedroso G, et al. CeliacScore 2.0: Actualización del Sistema de puntaje para el diagnóstico de la Enfermedad celíaca. Asociación con los alelos DQB1*02 y/o DQB1*0302. Revista de Gastroenterología de México. **Revista de Gastroenterología de México 2011; 76(1):26-33.**
2. Levi González Rivero; Eduardo Cabrera Rode; Silvia Elena Turcios Tristá; José Armando Galván Cabrera; et.al Antithyropoxidase and antitransglutaminase antibodies in first degree relatives of type 1 diabetes persons and its relation to some clinical, biochemical and immunological features. **Revista Cubana de Endocrinología.2010; 21(2)126-144.**
3. **José A Galván**, Eduardo Cabrera Rode, Gisela Molina, et al. Anticuerpos asociados a diabetes mellitus en pacientes celíacos cubanos y familiares de primer grado. **Revista de la Asociación Latinoamericana de Diabetes. 2007; XV (No3): 106-107.**
4. Sánchez JC, Cabrera-Rode E, Sorell L, **Galván J.A**, et al.. Celiac Disease Associated Antibodies in Persons with Latent Autoimmune Diabetes of Adult and Type 2 Diabetes. **Autoimmunity. 2007; 40(2):103-7.**
5. ESPINOSA REYES, Tania, ARANA ROSAINZ, Manuel de Jesús, GALVAN CABRERA, José Armando et al. Valor del pesquiasje de la enfermedad celíaca en niños con baja talla. Métodos

serológicos: una opción eficaz. **Rev Cubana Endocrinol, set.-dec. 2007, vol.18, no.3, p.0-0. ISSN 1561-2953.**

6. J.A. CREMATA, L. SORELL, R. MONTESINO, R. GARCÍA, M. MATA, G. CABRERA, J. A. GALVAN, et al. Hypogalactosylation of serum IgG in patients with coeliac disease. **Clinical and Experimental Immunology, 2003; 133:422-429.**

Otras publicaciones del autor:

1. Cabrera-Rode, L. Sarmiento, G. Molina, C. Pérez, C. Arranz, **José A Galvan**, M. Prieto, J. Barrios, R. Palomera, M. Fonseca, P. Mas, O. Díaz- Díaz, O. Díaz-Horta: Islet Cell Related Antibodies and Type 1 Diabetes Associated with Echovirus 30 Epidemic: a case report. **Journal Medicin of Virology 2005; 76(3):373-7.**
2. Mainet-Gonzalez D, **Galvan-Cabrera JA**, Sorell-Gomez L, Torres-Cabrera MB, Abdo-Cuza A, Castellano-Gutierrez R, Padron-Brito N, Palenzuela-Gardon D, Novoa-Perez LI. Evaluación preliminar de un inmunoanálisis de un solo paso, cualitativo y rápido de Troponina I cardíaca en el diagnóstico del infarto agudo del miocardio. **Invest Clin. 2004; 45(3):221-42.**
3. Rojas G, Flores RM, **Galvan JA**, Vicedo A, Gabilondo JV. A visual Simple immunoassay (VIA) for the semiquantitative determination of plasma elastase levels. **Clin Chim Acta 1999; 284(1):93-100.**
4. Fernandez de Cossio ME, Díaz T, **Galvan JA**, et al: Antigen recognition characteristics and comparative performance in immunoaffinity purification of two monoclonal antibodies specific for the hepatitis B virus surface antigen. **J Biotecnol 1997 Aug; 56(2):80.**

Eventos científicos donde han sido expuestos los resultados de la tesis.

1. V Congreso Nacional de Nutrición Clínica y Metabolismo. La enfermedad celíaca en Cuba. Epidemiología e intervención. Mesa redonda (13 nov. 2009, Ciudad de la Habana, CIMEQ).

2. J.A Galván y otros ALAPAD 2009. HeberFast Line[®] anti-transglutaminasa, novedoso método para el diagnóstico de la enfermedad celíaca. Cartel, autor principal.
3. J.A Galván. Hematología 2009. Enfermedad Celíaca en Cuba. Aplicación del sistema HeberFast Line[®] anti-transglutaminasa para su diagnóstico. Presentación oral. (Autor).
4. J.A Galván y otros Biotecnología 2009. Aplicación del sistema HeberFast Line[®] anti-transglutaminasa para el diagnóstico de la Enfermedad Celíaca. Cartel, autor principal.
5. Tercer Congreso Mundial de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y Nutrición Brasil 2008. Celiac disease in Cuban children. Follow up. Cartel (coautor).
6. J.A Galván y otros CONAPAC 2008. Diagnóstico serológico de la enfermedad celiaca en Cuba. Cartel.
7. J.A Galván y otros Girón 2007. HeberFast Line[®] Anti-transglutaminasa. Sistema rápido para el diagnóstico de la Enfermedad Celíaca.
8. J. A Galván y otros ALAD 2007. Anticuerpos asociados a diabetes mellitus en pacientes celíacos cubanos y familiares de primer grado. Cartel.
9. J. A Galván y otros XII Expo Forjadores del Futuro (2006). HeberFast Line[®] Anti-transglutaminasa. Sistema rápido para el diagnóstico de la Enfermedad Celíaca. Premio Municipal y Mención Provincial.
10. J. A Galván y otros Congreso Nacional de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia 2006. Estudio de la incidencia de la enfermedad celíaca en pacientes cubanos con diabetes mellitus tipo 1. Cartel (resultó premiado entre los tres mejores trabajos presentados a este evento).
11. Cintado A, Galván JA, Martínez L, Castañeda C, Frago T, Camacho H, Ferrer A, Companioni O, Benitez J, Nazábal M, Dueñas M, Novoa LI. HLA DQA1*0501 y DQB1*02 en pacientes

- celíacos cubanos. 1er Congreso internacional de Genética Comunitaria. Habana Cuba 2006. Cartel.
12. J.A Galván y otros Biotecnología Habana 2006. Screening of coeliac disease in Cuban patients with gastrointestinal disorders. Cartel.
 13. Castañeda C, Álvarez R, Sorell L, Galván JA, Carvajal F. Pesquisaje de la enfermedad celíaca en grupos de riesgo en Cuba, Aplicación de los métodos serológicos de producción nacional. 16 Congreso Latinoamericano 7^{mo} Congreso Iberoamericano 1^{er} Congreso Colombiano de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica. Cartagenas de India 2005. Cartel.
 14. Galván JA, Sorell L, Cabrera E, Martínez Cardet L, Molina G. Anticuerpos asociados a Diabetes mellitus Tipo 1 en pacientes celíacos y familiares de primer grado. VI Congreso Cubano de Endocrinología 2005. Tema Libre.
 15. Castaneda, C.; Alvarez-Fumero, R.; Sorell, L.; Galvan, J. A.; Carvajal, F. Screening for celiac disease in risk group in Cuba. Segundo Congreso Mundial de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y Nutrición Paris Francia 2004. Cartel.
 16. Sorell L, Galván JA y col. Screening of Celiac Disease in Cuba. XIV International Symposium on Celiac Disease, Belfast, Irlanda del Norte, 23-27, abril 2004.
 17. Galván JA, Sorell L, Cabrera E, Castañeda C. Estudio de la incidencia de la enfermedad celíaca en pacientes pediátricos y adolescentes con diabetes mellitus tipo 1. Primer Congreso Nacional de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia, Habana, Cuba, Nov 2003.
 18. Sorell L, Galván JA y col. Screening of celiac disease in Cuba. Conferencia Biotecnología Habana 2003.
 19. Galván JA, Sorell L y col. Screening of celiac disease in Cuban subjects with Type 1 diabetes mellitus. Póster. Biotecnología Habana 2003.

20. Galván JA. Enfermedad Celíaca y Diabetes tipo 1. Conferencia. Congreso Diabetes 2002.Habana Cuba.

Reconocimientos alcanzados con los resultados de la tesis:

Premios:

1. Premio de la ACC en el año 2007: Desarrollo, validación y registro del sistema HeberFast Line[®] Anti-Transglutaminasa. Contribución al diagnóstico de la enfermedad celiaca en Cuba. Autor principal
2. Mención Provincial. Categoría Mejor Tesis de Terminación de Especialidad. Premio Anual de la Salud 2007.
3. Premio Anual de la Salud 2007. Categoría Innovación Tecnológica. Autor principal.

Premios en Forum:

1. XVI Forum de Base de Ciencia y Técnica 2007. Desarrollo, validación y registro del sistema HeberFast Line[®] Anti-Transglutaminasa. Contribución al diagnóstico de la enfermedad celiaca en Cuba. Premio Relevante. (Autor principal).
2. Forum Municipal de Ciencia y Técnica 2007. Desarrollo, validación y registro del sistema HeberFast Line[®] Anti-Transglutaminasa. Contribución al diagnóstico de la enfermedad celiaca en Cuba. Premio Relevante. Distinción Especial. (Autor principal).
3. XVI Forum Provincial de Ciencia y Técnica 2007. Desarrollo, validación y registro del sistema HeberFast Line[®] Anti-Transglutaminasa. Contribución al diagnóstico de la enfermedad celiaca en Cuba. Premio Relevante. (Autor principal).
4. XII Expo Forjadores del Futuro (2006). HeberFast Line[®] Anti-transglutaminasa Sistema rápido para el diagnóstico de la Enfermedad Celíaca. Premio Municipal. (Autor principal).

5. XII Expo Forjadores del Futuro (2006). HeberFast Line[®] Anti-transglutaminasa Sistema rápido para el diagnóstico de la Enfermedad Celíaca. Mención Provincial (Autor principal).

Logros Institucionales:

1. Mejora del diagnosticador HeberFast Line[®] anti-transglutaminasa para el diagnostico de la Enfermedad Celiaca, producido en el CIGB SS. **Logro Institucional 2008.**
2. Registro Sanitario del sistema Heber Fast Line[®] anti-transglutaminasa. **Logro Institucional 2007.**
3. Desarrollo, validación y registro del sistema HeberFast Line[®] Anti-Transglutaminasa. Contribución al diagnóstico de la enfermedad celiaca en Cuba. **Logro Institucional 2007.**
4. Negociación con empresa de España para introducción de tiras ATG (celiaca) en Europa y EUA. **Logro Institucional 2006.**
5. Estudio de HLA DQ en familiares y enfermos de celiaquia. **Logro Institucional 2006.**
6. Transferencia tecnológica del sistema Heber Fast Line[®] anti-Transglutaminasa a la Unidad de Producción de Sancti Spiritus. **Logro Institucional 2005** (Autor Principal).