

MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo del ensayo inmunocromatográfico para la determinación de los anticuerpos antitransglutaminasa

Materiales y reactivos utilizados: Todos los reactivos químicos empleados en la preparación de soluciones fueron de calidad analítica reconocida y certificada: Membrana de nitrocelulosa CNPC-SS12-L2-P25, 15 μ , 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, Lot 99H7425, EUA); casetes plásticos de 9 mm (Advance Microdevice, Pvt. Ltd. India); sobre de aluminio plastificado 50 mm x 120 mm (Advance Microdevice, Pvt. Ltd. India); bolsa desecante de sílica gel (Advance Microdevice, Pvt. Ltd. India).

Preparación de la cristalería de trabajo: Se garantizó la completa limpieza y silanización de la cristalería empleada en la producción del conjugado, para así 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 llenó con esta solución, y se mantuvo en la oscuridad durante 20 minutos a TA (20-25°C). Transcurrido este tiempo, se recuperó la solución, y el recipiente se enjuagó con agua destilada.

Preparación de la proteína transglutaminasa: Se tomó un vial de la proteína TGt liofilizada de cobayo (Sigma, EEUU), y se disolvió a una concentración final de 1 mg/mL en un tampón Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹, Cloruro de calcio 5 mmol.L⁻¹ (pH 7.5). La proteína se dejó reposar durante cinco minutos a temperatura ambiente (20-25°C) hasta la completa disolución, se dividió en partes alícuotas, y se conservó a -70 °C hasta su uso. Una vez agotadas todas las partes alícuotas preparadas, se resuspendía un nuevo vial de la proteína liofilizada y se procedía de la forma descrita en este acápite.

Preparación del conjugado: Para la preparación del conjugado de TGt-oro coloidal se utilizó un coloide de oro comercial con un tamaño de partícula de 40 nm (Gold Colloid, 40 nm, EM.GC40, BATCH 5733. BBInternational. Reino Unido).

El pH óptimo de conjugación del coloide se determinó mediante el método descrito por Beesley, con algunas modificaciones.¹⁷⁷ Para ello, se añadió 1 mL de la solución de oro coloidal comercial (tamaño de la partícula: 40 nm) a siete viales de 1.5 mL de capacidad cada uno. Luego, a cada tubo se le ajustó el pH a valores entre 6.0 y 10.0 por adición de 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 y 15 μ L de una disolución de K_2CO_3 0.1 mol.L⁻¹; respectivamente. El contenido de cada vial se homogeneizó suavemente. Seguidamente, se le añadió a cada vial 20 μ L con una concentración saturante de TGt (20 μ g/mL de coloide), y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente (20-25°C). Luego, en una placa de ELISA (Costar, EEUU) de 96 pocillos se colocaron dos réplicas de 200 μ L de cada uno de los viales a los distintos valores de pH, e inmediatamente se procedió a realizar la prueba de floculación al añadir a cada pocillo 20 μ L de solución acuosa de NaCl 10%. Como control de la floculación se utilizó un pocillo con 200 μ L del coloide sin proteína al que se le añadieron 20 μ L de una disolución acuosa de NaCl 10%. La floculación está

dada por un cambio de coloración de rosado (color natural 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 medición: 5 – 10) (Sigma, EEUU).

Determinación de la cantidad mínima protectora de TGt: Una vez seleccionado el pH óptimo de conjugación del coloide, se procedió a determinar la cantidad mínima protectora, que no es más que la menor cantidad de proteína necesaria para proteger la solución de oro coloidal de la floculación en presencia de sales. Para ello, se prepararon 11 viales de 1.5 mL de capacidad con el coloide colocado en el 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 que se le añadieron 0; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; y 20 μ g de TGt. A su vez, el contenido de estos viales se añadió a los viales que contenían 1 mL del coloide al pH escogido según el acápite anterior. Luego, los viales se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente (20 – 25°C), para proceder acto seguido a realizar nuevamente la prueba de floculación. Se siguió el procedimiento descrito anteriormente para la determinación del pH óptimo de conjugación.

Escalado de la conjugación: Se escaló la conjugación al volumen deseado de oro coloidal, y se le añadió a la solución de oro con el pH previamente ajustado (según el acápite anterior) la cantidad de proteína a la concentración final que se obtuvo en la titulación previamente descrita. La solución resultante se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente (20 – 25°C) en un recipiente previamente silanizado, con agitación a 200 revoluciones por minuto (rpm). El escalado se realizó según la siguiente fórmula:

$$\text{Vol.A TGt} = \text{Vol.T coloide} * \text{Vol.I TGt} * 1.1 \quad (1)$$

En la fórmula anterior: 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.I TGt: volumen de TGt a 1 mg/mL necesario para estabilizar 1 mL de coloide; y 1.1: Coeficiente a utilizar para calcular 10% de volumen extra; respectivamente.

Se procedió a añadirle al volumen total de coloide la cantidad necesaria para una dilución de 1:10 de la disolución A de bloqueo. 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). La mezcla resultante se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente con agitación a 200 rpm. Posteriormente, la mezcla se filtró a través de un filtro de celulosa de 0.2 μ m (Sartorius AG, Gottingen, Alemania) para eliminar la presencia de grumos. El filtrado obtenido se centrifugó a 7257 x g durante 30 minutos a 4°C en una centrifuga refrigerada (Hitachi 20PR-52D, Japón). Finalmente, se eliminó el sobrenadante mediante aspiración, y se midió el volumen final obtenido con una pipeta automática (P200). El precipitado blando del conjugado se resuspendió en igual volumen de una disolución B (similar a la disolución A, y 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 con un espectrofotómetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, EEUU) mediante una dilución 1:200 del conjugado en la disolución B. Luego, se ajustó la densidad óptica de la suspensión entre 20 y 25 DO con volúmenes suficientes de la disolución

B. Completado este paso, se chequeó nuevamente la absorbancia a 520 nm. El conjugado final se conservó a 4°C hasta por un año.

Preparación del material de calibración: La calibración del sistema inmunocromatográfico se realizó mediante dos sistemas ELISA comerciales diseñados para la determinación cuantitativa de AATGt en suero y plasma: *Anti-IgA*: Celikey IgA; *Anti-IgG*: Celikey IgG (ambos de Celikey Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania). Para ambos sistemas, según el fabricante, se consideró la siguiente escala de interpretación: *Negativo*: Niveles de IgG o IgA < 5 U/mL; *Indeterminado*: Entre 5 y 8 U/mL; y *Positivo*: > 8 U/mL.

El calibrador del 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, 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 aparentemente sanos proveniente de un Banco de Sangre sin antecedentes familiares de EC. Los AATGt presentes en ambos controles se determinaron mediante los sistemas comerciales antes mencionados. Obtenido el resultado, los controles se filtraron por una membrana de acetato de celulosa de 0.45 µm (Sartorius AG, Gotingen, Alemania). Se realizaron partes alícuotas de 150 µL, que se conservaron a -20 °C hasta el momento del ensayo, 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 escogieron las diluciones 1:50, que se denominó “Control Positivo Medio” (CPM); y 1:100: el último punto de la curva detectado por el sistema ELISA Celikey IgG, que se denominó “Control Positivo Débil” (CPD). Se debe aclarar que la presencia de AATGt en esta dilución 1:100 resultó indeterminada por el Celikey IgA. Las diluciones escogidas respectivamente como CPM y CPD se preparaban en el momento de su uso, y los sobrantes se desechaban a la conclusión del ensayo. La Tabla 3 muestra los valores de las concentraciones de las clases IgA/IgG AATGt de los controles empleados en la calibración del sistema.

Tabla 3. Valores de las concentraciones de las clases IgA/IgG AATGt de los controles empleados en la calibración del sistema. Se hicieron determinaciones duplicadas de cada control. La escala de interpretación fue como sigue: *Negativo*: Niveles de IgG o IgA < 5 U/mL; *Indeterminado*: Entre 5 y 8 U/mL; y *Positivo*: > 8 U/mL

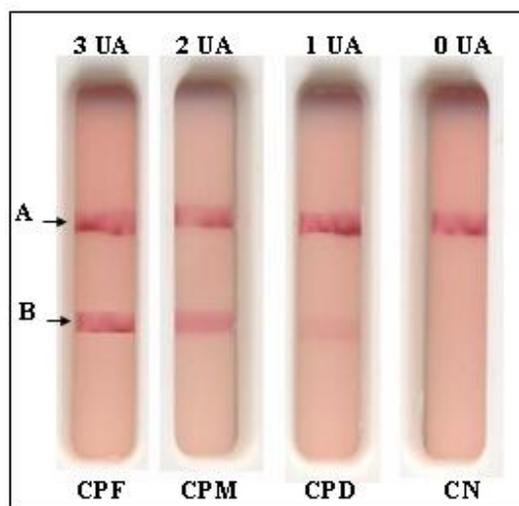
Control	AATGt IgA U/mL, media ± DE	AATGt IgG U/mL, media ± DE
CPF	> 100	> 100
CPM	21.00 ± 1.41	30.00 ± 4.24
CPD	8.00 ± 2.12	13.00 ± 0.71
CN	< 5	< 5

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

Titulación de la concentración de transglutaminasa en el recubrimiento: Grupos de 20 tiras de nitrocelulosa (NC) de 4 mm de ancho se recubrieron con 0.5; 1.0; 1.5 y 2.0 µg de TGt/tira disuelta en tampón Tris-HCl 10 mmol/L, CaCl₂ 5 mmol/L (pH 7.5) a una distancia aproximada de 4 cm del borde inferior de la tira. El volumen de aplicación fue de 1 µL.

Adicionalmente, se aplicó 1 μL de una solución acuosa del reactivo de control (compuesto por una disolución acuosa de un reactivo policatiónico) para alcanzar una concentración de 0.15 $\mu\text{g}/\text{tira}$ a una distancia aproximada de 5 cm del borde inferior de la tira. Sobre la membrana de captura de eritrocitos se depositó la solución 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 (disolución acuosa compuesta por polímeros, proteínas, surfactantes, carbohidratos, y Azida de sodio 0.1 % para garantizar la estabilidad del conjugado una vez deshidratado sobre su soporte en la tira inmunocromatográfica).

Figura 3. Escala análogo-visual para la calificación de la condición de recubrimiento de la tira reactiva. Se asignaron unidades arbitrarias (UA) según la intensidad de la señal obtenida en la corrida cromatográfica después del ensayo del control: *Señal fuertemente visible*: 3 UA; *Señal visible*: 2 UA; y *Señal débilmente visible*: 1 UA; respectivamente. Se asignó el valor de 0 a la ausencia de señal. Tiempo de corrida: 20 minutos.



Leyenda: CPF: Control Positivo Fuerte; CPM: Control Positivo Medio; CPD: Control Positivo Débil; CN: Control Negativo. A: Línea control B: Línea específica.

Las tiras y la matriz liberadora del conjugado se secaron por dos horas a 37°C, para proceder luego al montaje de la matriz y el material absorbente sobre la tira. Finalmente, se evaluaron las tiras con las diferentes concentraciones de recubrimiento. La corrida cromatográfica se realizó con 100 μL de cada uno de los controles descritos previamente: CPF, CPM, CPD y CN; por duplicado, y en un tiempo no mayor de 20 minutos. Llegado este punto, para considerar que un ensayo cromatográfico es rápido, el tiempo de corrida no debe ser mayor de 20 minutos. (200. 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 se le asignó un valor arbitrario de 3 unidades, 2 unidades a la observada con el CPM, y 1 unidad a la del CPD. La ausencia de señal del CN fue

calificado como 0. En caso de que apareciera alguna señal perceptible con el CN también se le asignó (arbitrariamente) el valor de 1 unidad.

Selección del tiempo mínimo de corrida: Una vez seleccionada la mejor condición de recubrimiento, se prepararon 30 tiras para determinar el tiempo óptimo mínimo de corrida cromatográfica. Se siguió el mismo procedimiento descrito en ocasión de la titulación de la concentración de TGt en el recubrimiento. Se evaluaron tiempos de 5, 10, 15 y 20 minutos; respectivamente. La corrida cromatográfica se realizó por duplicado con 100 μ L de cada uno de los controles: CPF, CPM, CPD y CN. Como criterio de selección para el tiempo de corrida, se estableció que apareciera una señal fácilmente visible con el control CPD, además de 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 más arriba.

Evaluación del ensayo inmunocromatográfico para la determinación de los anticuerpos antitransglutaminasa

Estudio de estabilidad acelerada a 60°C: Los resultados del estudio de estabilidad acelerada del sistema inmunocromatográfico a 60°C predicen de forma fiel la estabilidad del mismo a temperatura ambiente, en condiciones reales de explotación.¹⁷⁸

Una vez seleccionada la mejor condición de recubrimiento de la tira, y el tiempo de corrida, se procedió nuevamente a conformar un grupo de 100 tiras con el mismo procedimiento descrito más arriba. Concluidos el secado y montaje, se procedió a colocar las tiras cortadas a 4 mm de ancho dentro de los casetes plásticos. Éstos se envasaron y se sellaron dentro de sobres de aluminio plastificado (50 mm x 120 mm) con una bolsa de silica gel como desecante. Cincuenta tiras se sometieron a un estrés térmico de 60°C durante 9 días, mientras que las otras 50 se conservaron a TA (20-25°C).

Durante la conducción del 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 previamente preparados: CPF, CPM, CPD y CN. Como criterio de estabilidad se estableció que apareciera en un tiempo no mayor de 20 minutos una señal fácilmente visible con el control CPD, y ausencia de señal con el CN. A las señales producidas con los distintos controles se le asignaron los mismos valores arbitrarios de intensidad propuestos más arriba.

Como criterios adicionales de estabilidad se estableció que en todas las tiras tenía que aparecer la 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 procedió a desarmar los casetes para inspeccionar visualmente la extensión del desprendimiento del conjugado de la matriz liberadora.

Estudio de estabilidad acelerada a 60 °C con agente protector en el recubrimiento: Con este propósito, y siguiendo el mismo procedimiento descrito en el acápite correspondiente, se conformó un primer grupo de 100 tiras sin agente protector en el recubrimiento; y un segundo grupo también de 100 tiras con el agente protector en el recubrimiento. Se siguió el protocolo ya descrito para la evaluación de la estabilidad del sistema.

Estudio de estabilidad a tiempo real y a temperatura ambiente: Una vez seleccionadas las condiciones para la operación del sistema, luego de concluida la evaluación de la estabilidad acelerada, se conformaron 200 tiras con el procedimiento antes descrito, y se almacenaron a temperatura ambiente (20 – 25°C) hasta el momento del ensayo. Las tiras se evaluaron

mensualmente durante 15 meses. Se siguió el protocolo descrito para la evaluación de la estabilidad del comportamiento del sistema en las nuevas condiciones.

Determinación de la sensibilidad y especificidad diagnósticas del sistema inmunocromatográfico: La sensibilidad diagnóstica del sistema se estimó después del ensayo de muestras de suero de 50 pacientes celíacos sin tratamiento, diagnosticados según los criterios de la ESPGAN.¹⁴ Tres de ellos tenían, además, una deficiencia selectiva de IgA. Para la evaluación de la especificidad diagnóstica del sistema se evaluaron muestras de 40 pacientes que presentaban desórdenes intestinales diversos, pero en los que se desechó la presencia de la EC mediante biopsia de yeyuno.

Los sueros utilizados en esta fase del estudio, y la información relativa a ellos, fueron cedidos gentilmente por los doctores José Antonio Garrote y Eduardo Arranz, ambos del Hospital Clínico Universitario de la ciudad de Valladolid (España).³²

Todas estas muestras de suero se ensayaron con un sistema ELISA comercial para los anticuerpos AATGt IgA (Celikey IgA, Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania), y los anticuerpos IgA contra endomisio de mono (BioSystem, Barcelona, España); así como por el sistema inmunocromatográfico desarrollado en este trabajo.

La sensibilidad y especificidad diagnósticas de estos tres sistemas en comparación (a saber: ELISA, inmunofluorescencia indirecta, y ensayo inmunocromatográfico) se calcularon teniendo el resultado de la biopsia de yeyuno como estándar de oro para el diagnóstico de la EC.

Evaluación del rendimiento del sistema inmunocromatográfico con muestras de sangre, suero y plasma: En esta fase del estudio, se utilizaron muestras de sangre, suero y plasma de 225 individuos. Veinticinco de ellos estaban ingresados en el Instituto de Gastroenterología de La Habana (Cuba) en espera de una biopsia de yeyuno confirmatoria de EC debido a la elevada sospecha de la presencia de esta afección. Los 200 sujetos restantes estaban aparentemente sanos, y se encontraban sujetos a exámenes médicos de rutina a pedido de un centro laboral de la antigua Provincia Habana.

De cada sujeto se obtuvo el correspondiente consentimiento informado, y se le rellenó una planilla con datos personales de carácter sociodemográfico y de salud. Completados estos pasos, se le extrajeron 10 mL de sangre por punción venosa antecubital (siempre que fuera posible), y la presencia de AATGt en 100 µL de la sangre recién colectada fue determinada por el método inmunocromatográfico desarrollado y descrito previamente.

El resto de la sangre se distribuyó a partes iguales entre un tubo seco para la recuperación del suero, y otro tratado con citrato de sodio al 3.2%, para la obtención del plasma. Los tubos fueron centrifugados, y se realizaron alícuotas de 200 µL de suero o plasma, que se conservaron a -20°C hasta la posterior determinación de los AATGt.

Los resultados de la biopsia yeyunal de los 25 pacientes con sospecha de EC se obtuvieron *a posteriori*. En todas las muestras se observaron cambios morfológicos de la histología de la mucosa intestinal que fueron compatibles con el diagnóstico de EC.

La presencia de los AATGt en las muestras de suero o plasma de los individuos aparentemente sanos se determinó mediante el sistema ELISA Celikey IgA (Pharmacia & Upjohn, Diagnostics AB, Freiburg, Alemania). Los sujetos aparentemente sanos que resultaron positivos para AATGt por cualquiera de los métodos serológicos fueron remitidos a la Consulta ambulatoria de Gastroenterología para la confirmación de la presencia de la EC mediante biopsia de yeyuno. Adicionalmente, en estos sujetos se realizó el genotipaje de las moléculas de HLA-DQ2/DQ8, según el protocolo descrito más adelante.

Repetibilidad: Imprecisión intraensayo: Para la evaluación de la imprecisión intra-ensayo del sistema inmunocromatográfico, se utilizaron las tiras del lote destinado al estudio de estabilidad en tiempo real descrito más arriba. La corrida cromatográfica se realizó con cinco réplicas de 100 μ L de cada uno de los controles: CPF, CPM, CPD y CN. El análisis se realizó por dos observadores.

Reproducibilidad: Imprecisión interensayo: Para la evaluación de la imprecisión inter-ensayo, se utilizaron las tiras del lote destinado al estudio de estabilidad en tiempo real descrito más arriba. Para ello, la corrida cromatográfica se realizó por duplicado con 100 μ L de cada uno de los controles: CPF, CPM, CPD y CN, a lo largo de cinco días consecutivos. El análisis se realizó por dos observadores.

Imprecisión interlote: Para la evaluación de la imprecisión entre-lotes, se utilizaron tiras preparadas según el protocolo para el estudio de la estabilidad acelerada a 60°C. Se conformaron de esta manera tres lotes de 50 tiras cada uno. La corrida cromatográfica se realizó por duplicado con 100 μ L de cada uno de los controles: CPF, CPM, CPD y CN; con tiras de cada uno de los lotes preparados. El análisis se realizó por dos observadores.

Comparación de métodos: El desempeño del sistema inmunocromatográfico desarrollado y descrito en este trabajo se comparó con los de otros sistemas disponibles para la determinación de AATGt. Para ello, se adquirieron cantidades suficientes de los sistemas analíticos CD1 anti-TGt y CD1+2 anti-TGt (Operon, España).¹⁷⁹

Una vez atemperados los materiales a utilizar en el ensayo, el suero problema se diluyó convenientemente, según las especificaciones del fabricante, y empleando siempre las soluciones tampones correspondientes: *CD1 anti-TGt*: 1:10; *CD1+2 anti-TGt*: 1:30. Las diluciones se hicieron en viales de 1.5 mL de capacidad. Hechas las diluciones, 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 fijaron 10 minutos de duración de la corrida cromatográfica. El análisis se realizó por 2 observadores.

También se evaluó si los resultados obtenidos con el sistema inmunocromatográfico concordaban con los emitidos por otro laboratorio que utilizara diferentes métodos analíticos. Para ello, se ensayaron muestras de suero de 22 pacientes celíacos estudiados y diagnosticados en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid (España). El diagnóstico de EC incluyó el aspecto de la mucosa yeyunal después de biopsia, la presencia de anticuerpos AATGt IgA y/o IgG (Celikey IgA, Celikey IgG; ambos de Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania); y la presencia de los alelos HLA-DQ2.

El ensayo se extendió para incluir muestras de suero obtenidas de otros 22 pacientes en los que no se pudo demostrar la presencia de AATGt. Estos pacientes se distribuyeron de la manera siguiente: 19 familiares en primer grado de enfermos celíacos, 2 pacientes celíacos sujetos a DLG, y un paciente atendido por una enfermedad inflamatoria intestinal*.

Los sueros de los 44 sujetos utilizados en este ensayo fueron cedidos gentilmente por el Dr. Eduardo Arranz. Las muestras de los sujetos fueron ensayadas “a ciegas” en los laboratorios del CIGB de La Habana, y los resultados contrastados a la conclusión del análisis.

Finalmente, se preparó un lote de 200 tiras reactivas en la Unidad de Producción de Diagnosticadores del CIGB de la ciudad de Sancti Spiritus (Sancti Spiritus, Cuba); y 100 de éstas fueron remitidas al Dr. Arranz para la realización *in situ* de ensayos de comparación de métodos.

* Las cinco muestras faltantes no eran útiles para el uso a su llegada.

Aplicación del sistema inmunocromatográfico en pacientes con trastornos gastrointestinales de etiología no aclarada: Con el sistema inmunocromatográfico desarrollado y descrito en este trabajo se ensayaron 637 muestras de sueros AAG-positivos que fueron obtenidas de pacientes con trastornos gastrointestinales de etiología no aclarada que eran atendidos en el Instituto de Gastroenterología de La Habana (Cuba). La edad promedio de estos pacientes fue de 12.0 ± 10.9 años. Los pacientes cuyas muestras resultaron AATGt-positivos fueron localizados telefónicamente y reevaluados en la consulta ambulatoria de Gastroenterología para la realización de una biopsia yeyunal confirmatoria. Los casos de discrepancia entre los resultados de la determinación de los AATGt y la biopsia yeyunal fueron resueltos mediante el tipaje de los genes HLA DQ2/DQ8, según el protocolo descrito más adelante, y respetando la voluntad del enfermo, expresada en la correspondiente acta de consentimiento informado.

Aplicación del sistema inmunocromatográfico en pacientes infectados por *Giardia lamblia*: Con el sistema inmunocromatográfico desarrollado y descrito en este trabajo se ensayaron muestras de sangre de 40 pacientes atendidos en la consulta ambulatoria de Gastroenterología (Edad: 37 ± 13.7 años; rango: 4 – 86 años) debido a infección por *Giardia lamblia*. El diagnóstico de giardiasis se estableció ante la presencia de formas adultas del parásito en muestras de heces, y de trofozoitos en la aspiración duodenal. Adicionalmente, se investigó la presencia de EC mediante biopsia intestinal y determinación de la presencia de AAG y AATGt. La enfermedad celíaca se sospechó ante la existencia de alteraciones de apariencia de la mucosa intestinal y la positividad de (al menos) uno de los marcadores serológicos. En todo momento se respetó la voluntad del enfermo expresada mediante la correspondiente acta de consentimiento informado.

La determinación de la presencia de anticuerpos IgA frente a gliadina (IgA AAG) en las muestras examinadas de sangre fue posible gracias a la gentileza de los Dres. José Antonio Garrote y Eduardo Arranz (Hospital Clínico Universitario, Valladolid, España). Para ello, se empleó el método ELISA *IgA UniCAP Gliadin* (Pharmacia & Upjohn, Diagnostics AB, Freiburg, Alemania). Los IgA AATGt se determinaron, adicionalmente, mediante el sistema ELISA Celikey IgA (Pharmacia & Upjohn, Diagnostics AB, Freiburg, Alemania).

Aplicación del sistema inmunocromatográfico en pacientes con Diabetes mellitus insulino-dependiente: Mediante el sistema inmunocromatográfico desarrollado y descrito en este trabajo se ensayaron muestras de sangre de 208 pacientes (Edad: 19.0 ± 9.3 años; rango: 2 – 58 años) diagnosticados de Diabetes mellitus insulino-dependiente (DMT1) y atendidos en el Instituto Nacional de Endocrinología (La Habana, Cuba). Los casos AATGt-positivos fueron remitidos a la consulta ambulatoria de Gastroenterología para la realización de una biopsia de yeyuno confirmatoria de EC. En todo momento se respetó la voluntad del enfermo expresada mediante la correspondiente acta de consentimiento informado.

Aplicación del sistema inmunocromatográfico en pacientes con Síndrome de Down y tiroiditis autoinmune: Mediante el sistema inmunocromatográfico desarrollado y descrito en este trabajo se ensayaron muestras de suero obtenidas de 263 pacientes con síndrome de Down y 100 enfermos diagnosticados con tiroiditis autoinmune, respectivamente. Las muestras de suero se conservaban a temperatura de congelación en el Instituto de Gastroenterología de La Habana (Cuba) y el Instituto Nacional de Endocrinología, respectivamente. El médico de cabecera del paciente fue notificado del resultado del marcador serológico, y se le recomendó la realización de una biopsia de yeyuno para la confirmación del diagnóstico de la EC en los casos AATGt-positivos.

Adicionalmente, las muestras de suero fueron ensayadas para la presencia de AAG mediante el método AuBIO Dot Antigliadina (Heber Biotec S.A, La Habana, Cuba). El método ofrece tiras de poliestireno blanco opaco con ocho pocillos recubiertas con gliadina de trigo (Sigma, EEUU). Brevemente, el suero problema se diluyó 1:50 con tampón de lavado (PBS-Tween 20 al 0.5%), se añadió al pocillo correspondiente, y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar los pocillos de reacción con PBS-Tween 20 al 0.5%, se añadió el conjugado de proteínas A y oro coloidal, y dejó incubar por otros 10 minutos. Posteriormente, los pocillos se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.5%, y se les añadió una solución de iones de plata (Amersham Rainham, Essex, Reino Unido) durante 5 minutos más. La reacción se terminó añadiendo agua destilada en exceso, y se inspeccionó visualmente el color desarrollado en el pocillo. La intensidad del color en cada pocillo fue directamente proporcional a la concentración de AAG presente en la muestra problema. El estuche de reactivos incluye un control positivo y otro negativo para la clasificación visual de las muestras problema (Garrote y otros, 1999).

Aplicación del sistema inmunocromatográfico en adultos sanos: Mediante el sistema inmunocromatográfico desarrollado y descrito en este trabajo se ensayaron las muestras de sangre de 200 sujetos aparentemente sanos que se encontraban sujetos a exámenes médicos de rutina a pedido de un centro laboral de la antigua Provincia Habana, como se ha expuesto más arriba.

Aplicación del sistema inmunocromatográfico en niños sanos: Mediante el sistema inmunocromatográfico desarrollado y descrito en este trabajo se ensayaron muestras de suero de 595 niños aparentemente sanos, libres de antecedentes de vómitos, diarreas, distensión abdominal, y retraso del crecimiento; y sin historia de familiares con EC. Los niños provenían de la provincia de Pinar del Río, y tenían edades entre los tres años cumplidos y los 3 años 11 meses y 29 días. Las muestras de suero se conservaban a temperatura de congelación en el Instituto de Gastroenterología de La Habana (Cuba).

Adicionalmente, se ensayó la presencia de IgA e IgG AATGt en las muestras de suero mediante los sistemas comerciales Celikey IgA y Celikey IgG (Celikey Pharmacia & Upjohn, Diagnostics AB, Freiburg, Alemania).

El médico de cabecera del paciente fue notificado del resultado del marcador serológico (independientemente del método empleado), y se le recomendó la realización de una biopsia de yeyuno para la confirmación del diagnóstico de la EC en los casos AATG-positivos.

Concordancia entre el sistema inmunocromatográfico y la biopsia yeyunal: La concordancia entre los resultados del sistema inmunocromatográfico y la biopsia yeyunal se estimó con los valores obtenidos con cada proceder en 103 pacientes incluidos en los diferentes grupos de riesgo descritos más arriba.

Estudios familiares: Se seleccionaron 22 enfermos celíacos (Edad: 15.0 ± 5.5 años; rango: 2 – 35 años) diagnosticados y atendidos en el Instituto de Gastroenterología de La Habana (Cuba) para la realización de estudios familiares. Cuatro de los enfermos seguían una DLG. El diagnóstico de EC se estableció ante la concurrencia de AATGt positivos detectados por el sistema inmunocromatográfico desarrollado y descrito en este trabajo, y el aspecto de la mucosa yeyunal calificada según los criterios de la ESPGAN.136

Junto con los enfermos se estudiaron 54 familiares de primer grado. Se incluyeron en el protocolo de trabajo 60 sujetos aparentemente sanos apareados por sexo, edad y color de la piel, para que sirvieran de controles. De todos ellos se retiraron muestras de sangre que fueron ensayadas con el sistema inmunocromatográfico para la determinación de los AATGt. En todo

momento se respetó la voluntad del enfermo expresada mediante la correspondiente acta de consentimiento informado.

Los casos AATGt-positivos fueron remitidos a la consulta ambulatoria de Gastroenterología para la realización de una biopsia de yeyuno confirmatoria de la presencia de EC.

Genotipaje HLA-DQ: La presencia de los alelos HLA DQ2/DQ8 en pacientes seleccionados y sus familiares se determinó mediante la amplificación de restos digeridos de material genético obtenido de glóbulos blancos de la sangre gracias a la reacción en cadena de la polimerasa. Se empleó el sistema *Go Taq PCR Core System II* (Promega, EEUU). Los fragmentos amplificados fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. La tabla 4 muestra los alelos HLA analizados en el estudio, junto con las condiciones empleadas para la amplificación de los fragmentos digeridos.¹⁸⁰

Tabla 4. Cebadores y condiciones del PCR para los alelos de HLA analizados, tal y como fue tomado del manuscrito de Olerup y otros (1993), y citado en [180]. Se completaron 30 ciclos en cada una de las 3 fases del ensayo.

HLA-alelos	Cebadores(5'-3')	[MgCl ₂], mM	°C
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

Leyenda: [MgCl₂]: Concentración (en mM) de Cloruro de magnesio empleada en el ensayo.

°C: Temperatura de Desnaturalización/Hibridación/Extensión de la reacción en cadena de la polimerasa para cada alelo HLA.

Procesamiento de los datos y análisis estadístico de los resultados

El procesamiento de los datos y el análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa EPIDAT (versión 3.1) para el análisis epidemiológico de los datos tabulados.

La sensibilidad se estimó del porcentaje de individuos enfermos que tienen un resultado positivo; mientras que la especificidad se calculó como el porcentaje de individuos no enfermos que tienen un resultado negativo:

$$\text{Sensibilidad, \%} = \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{(\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Negativos})} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Especificidad, \%} = \frac{\text{Verdaderos Negativos}}{(\text{Verdaderos Negativos} + \text{Falsos Positivos})} \times 100 \quad (3)$$

Los estimados de sensibilidad y especificidad se expresaron como porcentajes, y se acompañaron de los correspondientes intervalos de confianza (IC) al 95% de confiabilidad.

El grado de concordancia entre los resultados de los sistemas evaluados se determinó mediante el Índice Kappa de Concordancia (K). El índice K se utiliza para determinar hasta qué punto la concordancia observada es superior a la que cabe obtener del puro azar.¹⁸¹⁻¹⁸² En caso de acuerdo perfecto, $K = 1$. Si no existiera acuerdo alguno, $K = 0$. La Tabla 5 muestra los valores notables del índice K.

Tabla 5. Escala de rangos posibles de valores (léase grados de concordancia) del índice K.

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
1.00	Perfecto

Fuente: Referencia [181].

Para la evaluación de la seguridad de las pruebas diagnósticas se tuvieron en cuenta los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN). El VPP representa la probabilidad (la proporción de sujetos) de presentar realmente la enfermedad, cuando el resultado de la prueba es positivo. Por su parte, el VPN es la probabilidad (proporción de sujetos) de no tener la enfermedad cuando el resultado es negativo:

$$\text{VPP} = \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{(\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Positivos})} \quad (4)$$

$$\text{VPN} = \frac{\text{Verdaderos Negativos}}{(\text{Verdaderos Negativos} + \text{Falsos Negativos})} \quad (5)$$

La frecuencia de ocurrencia de los alelos DQ2/DQ8 del sistema HLA en los enfermos celíacos, los familiares de primer grado de éstos, y los sujetos aparentemente sanos se estimó mediante técnicas estadísticas basadas en tablas de contingencia 2 x 2, como el test de la probabilidad exacta de Fisher y el test de ji-cuadrado corregido según Yates para valores observados de casillas < 5.¹⁸³ El cálculo del estadígrafo del test se acompañó de la razón de disparidades. Para todos los casos se consideró que existían diferencias significativas si la probabilidad de ocurrencia del resultado fuera ≤ 0.05 .

Los cálculos estadísticos se realizaron con el sistema SPSS versión 11.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).