

Desarrollo, validación y registro del sistema HeberFast Line® antitransglutaminasa. Contribución al diagnóstico de la enfermedad celíaca en Cuba

✉ José A Galván^{1*}, Boris Acevedo¹, Lidia I Novoa¹, Daniel O Palenzuela¹, Julio A Rubí², Edel Torres², Vladimir Leal², Maylin Castellanos², Carmen Talavera², Reinaldo Blanco², Milvia Muñoz², Liudmila Benítez², Yeleine Machín², Bárbara López², Delia Roche², Tamara Díaz¹, Arlene Rodríguez¹, Alberto Cintado¹, Luis Marchena², Ernesto López¹

¹División de Inmunodiagnóstico y Genómica, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB Ave. 31 e/ 190 y 158, AP 6162, CP 10 600, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus Sancti Spiritus, Cuba

E-mail: armando.galvan@cigb.edu.cu

Introducción

La enfermedad celíaca (EC) es una de las enteropatías más comunes ocasionadas por una intolerancia alimentaria en el hombre. Aunque el diagnóstico definitivo de la enfermedad se realiza mediante una biopsia intestinal que muestre los cambios histológicos característicos de la mucosa, los métodos serológicos, como la detección de anticuerpos antigliadinas (AGA), anticuerpos antiendomisio (EMA) o antitransglutaminasa (AATGt), resultan más baratos y menos invasivos para efectuarlo [1].

Considerada una enfermedad de origen esencialmente europeo y poco común en el continente americano, en la actualidad se reconoce que la incidencia de la enfermedad celíaca en los Estados Unidos y en Canadá puede ser tan alta como en los países europeos [2, 3]. Otros estudios realizados en Brasil y Argentina evidencian que también es frecuente en países de Latinoamérica [4, 5].

La EC ha sido asociada con mayor incidencia de linfoma intestinal cuando no es diagnosticada y tratada tempranamente. Su tratamiento consiste en la alimentación con una dieta libre de gluten (DLG) de por vida para estos pacientes. Por tanto, se ha requerido un diagnóstico precoz y certero de la enfermedad mediante la biopsia intestinal [6,7]. 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* recomienda el uso de pruebas serológicas para evaluar los niveles de AGA, EMA o ARA en el suero de estos pacientes.

En Cuba, la EC ha sido investigada desde la década de los 80, mediante sospecha clínica y biopsia intestinal [8-10]. Actualmente, el diagnóstico se realiza por los síntomas y la determinación de anticuerpos antigliadinas y cuando estos resultan positivos, se confirma con la biopsia. Dada la baja especificidad de estos anticuerpos se les realiza innecesariamente la biopsia intestinal a un número elevado de pacientes [1, 7]. Recientemente se ha desarrollado un inmunoensayo de evaluación visual para la detección de anticuerpos antitransglutaminasa tisular [6], a causa de existir ahora la capacidad de hacer una pesquisa de EC en grupos de riesgo y en la población general [1, 6, 7, 10-14].

Sistema HeberFast Line® antitransglutaminasa

El diagnosticador HeberFast Line® antitransglutaminasa (Figura 1) 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 a 20 minutos que puede ser realizado

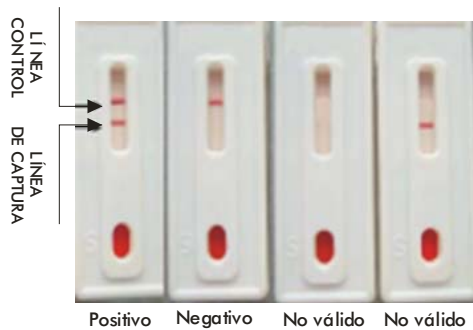
1. Sorell L, Galván JA, Acevedo B. Screening of celiac disease in Cuba. In: Catassi C, Fasano A, Corazza GR (eds): The Global Village of Coeliac Disease. Perspectives on Coeliac Disease, vol. II. AIC Press 2005. p.131-5.



A. Estuche



B. Componentes (lancetas, capilares, casete, prospecto)



Positivo Negativo No válido No válido

C. Posibles resultados

Figura 1. Sistema Heberfast Line® Antiitransglutaminasa.

incluso bajo condiciones de campo. Consiste en un juego compacto especialmente desarrollado para la operación manual y lectura visual de los resultados. Su empleo es recomendable en el pesquisaje de pacientes con síntomas clínicos sugerentes de EC, en el diagnóstico de individuos asintomáticos con antecedentes familiares de EC, en el estudio de pacientes afectados de enfermedades en las que la EC ha sido reportada con mayor frecuencia (diabetes mellitus dependiente de insulina, síndrome de Down, deficiencia selectiva de IgA), para el monitoreo de la eficacia de una dieta libre de gluten en pacientes celíacos y para realizar estudios poblacionales de prevalencia de la enfermedad. Este diagnosticador resultó Premio Nacional de Salud de Cuba 2007 en la categoría de innovación tecnológica.

Sensibilidad y especificidad clínicas

En la evaluación del desempeño de la prueba de referencia, 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 el 100 % de sensibilidad (95% CI, 92.9-100%) [6]. Estas mismas muestras fueron sometidas al test 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 el 96% (89.1-99%). Para la especificidad se testaron muestras de 40 pacientes "no celíacos" que presentaban desórdenes intestinales, todas las muestras fueron negativas por los tres sistemas para el 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 [6].

Estudios de prevalencia de enfermedad celíaca en grupos de riesgo y población sana

Grupo de pacientes con síntomas sugerentes de enfermedad celíaca

De un total de 637 pacientes con sintomatología sugerente de EC, positivos para AGA y por tanto con criterio de biopsia, sólo 88 (49 del sexo femenino y 39 del sexo masculino) resultaron positivos para AATGt, para una seroprevalencia del 13.81%. La edad promedio de este grupo de pacientes fue de 12 ± 10.91 años. Se les realizó biopsia de yeyuno a 57 de estos pacientes, 56 de ellos con un patrón histológico compatible con EC y 1 paciente que resultó negativo en dos ocasiones por este proceder. La biopsia de yeyuno fue el "patrón de oro" para confirmar el diagnóstico de EC. Estos estudios arrojaron una prevalencia comprobada por biopsia en este grupo de pacientes de 8.95% [1]. En las figuras 2 y 3 se muestran el algoritmo actual de diagnóstico y el algoritmo a seguir en este grupo de pacientes una vez introducida rutinariamente la determinación de AATGt.

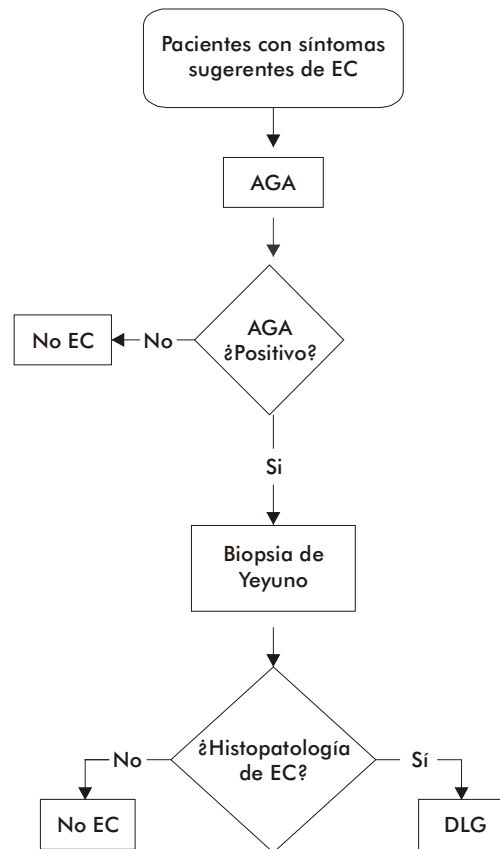


Figura 2. Algoritmo actual de diagnóstico en Cuba de la EC. AGA (anticuerpos antigliadinas); EC (enfermedad celíaca); DLG (dieta libre de gluten).

Grupo de pacientes con giardiasis

De los 40 pacientes con giardiasis, 37 presentaban una estructura normal de las vellosidades intestinales. Los 3 pacientes restantes presentaban una atrofia subtotal de las vellosidades e infiltración intraepitelial de linfocitosis, compatibles con el diagnóstico de EC [7]. La gravedad de las lesiones fue muy similar en todos los pacientes y no fue posible diferenciarlas en la exploración histológica; sin embargo, sólo 2 de ellos tuvieron resultados positivos de AATGt y se clasificaron como pacientes con sospecha de EC. Se les estableció una DLG junto con el tratamiento específico de la giardiasis. El tercer paciente, que presentó una mucosa con atrofia subtotal y AATGt negativos, sólo se trató con secnidazol. Se observó mejoría clínica en el seguimiento de los 2 pacientes con sospecha de EC. La recuperación histológica se constató en una segunda biopsia intestinal y además, el hecho de presentar AATGt negativos confirmó el diagnóstico, según criterio revisado de la *Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición*. También se aplicó la misma conducta con el tercer paciente, al que no se le suprimió el gluten de la dieta y sólo se trató con secnidazol; es decir, se le realizó biopsia intestinal evolutiva y se observó recuperación histológica, además, se le realizó la determinación de AATGt, que continuó negativa [7].

2. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, et al. Prevalence of celiac disease in at-risk groups in the United States: a large multi-center study. *Arch Intern Med* 2003;163: 286-92.

3. Cranney AB, Zarkadas M, Graham ID, Switzer CM. The Canadian celiac health survey- The Ottawa chapter pilot. *BMC Gastroenterol* 2003;3:1-11.

4. Gandolfi L, Pratesi R, Cordova JC, Taüll PL, Gasparin M, Catassi C. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brasil. *Am J Gastroenterol* 2000;95: 689-92.

5. Gómez JC, Selvaggio GS, Viola M, Pizarro B, la Mota G, de Barrio S, et al. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol* 2001;96: 2700-4

6. Sorrell L, Garrote JA, Acevedo B, Arranz E. One-step immunochromatographic assay for screening of coeliac disease. *Lancet* 2002;359(9310):945-6.

7. Sorrell L, Garrote JA, Galván JA, Velazco C, Edrosa CR, Arranz E. Celiac Disease Diagnosis in Patients with Giardiasis: High Value of Antitransglutaminase Antibodies. *Am J Gastroenterol* 2004;99(7):1330-2.

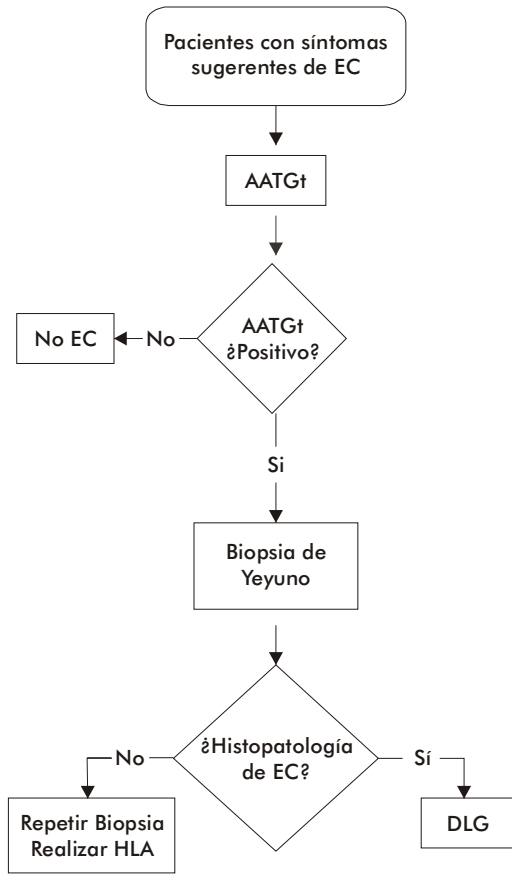


Figura 3. Algoritmo propuesto de diagnóstico de la EC. AGA (anticuerpos antigliadinas); EC (enfermedad celíaca); DLG (dieta libre de gluten); HLA (antígenos leucocitarios humanos).

Grupo de pacientes con Diabetes mellitus tipo 1

De los 208 pacientes estudiados, 194 resultaron negativos para AATGt y 14 resultaron positivos, para una seroprevalencia de 6.73%. De ellos, 9 eran del sexo femenino y 5 del masculino. De estos 14 pacientes, sólo 2 (14.28%) tuvieron síntomas clínicos asociados a EC (dolor abdominal, diarrea y anorexia). Los demás pacientes no presentaron síntomas asociados. La confirmación de EC se realizó mediante biopsia de yeyuno y sólo 6 pacientes dieron su consentimiento. En todos ellos se observó cambios morfológicos consistentes con EC en epitelio yeyunal, 5 pacientes presentaron una atrofia parcial moderada de las vellosidades intestinales con aumento del número de linfocitos intraepiteliales, y 1 mostró una atrofia subtotal de las vellosidades. En general, la prevalencia de EC diagnosticada por biopsia intestinal en este grupo de riesgo es de 2.88% (6/208). El promedio de edad en el grupo de pacientes diabéticos positivos para AATGt y EC confirmada por biopsia fue de 9 ± 1.79 años, con diferencias estadísticamente significativas al compararlo con el grupo de pacientes diabéticos con AATGt negativos (p < 0.0044). El promedio de edad al ser diagnosticados de EC fue de 11 ± 4.56 años. El intervalo promedio entre el diagnóstico de la diabetes y de EC fue de 2 ± 4 años. En este grupo de pacientes diabéticos

positivos de EC, 4 fueron diagnosticados al debut de la diabetes y los otros 2, a los 2 y 10 años del debut, respectivamente. Ninguno de estos 2 pacientes tenía síntomas sugerentes de EC. Es de destacar que ninguno de los pacientes estudiados tenían antecedentes familiares de primer grado con EC [14].

Estudio de prevalencia en población sana infantil y adulta

Se realizó pesquisa de EC en un grupo de 500 niños y 200 adultos. A ambos grupos se les realizó determinación de AATGt. Los que resultaron positivos fueron remitidos a consulta de Gastroenterología, para confirmar el diagnóstico mediante biopsia de yeyuno y realizarle estudio de genes asociados a EC.

En la tabla se muestra la seroprevalencia de AATGt en los principales grupos estudiados.

Alelos HLA DQA1*0501 y DQB1*02 en pacientes celíacos cubanos y familiares de primer grado

La susceptibilidad para padecer EC está fuertemente asociada con los genes HLA-DQ2 y HLA-DQ8 del sistema mayor de histocompatibilidad clase II (HLA) [11]. Por primera vez en Cuba, fueron estudiados los alelos HLA DQA1*0501 y DQB1*02 (DQ2) en un grupo de 136 individuos provenientes de varias provincias del país [11]. De ellos, 22 eran pacientes celíacos diagnosticados por biopsia de yeyuno, 54 familiares de primer grado y 60 sujetos sanos como control. A todos los individuos se les realizó determinación en suero de AATGt con resultados positivos en el 100% de los probandos, así como en el 19% de los familiares de primer grado, mientras que el 100% de los controles sanos resultaron negativos para esta determinación.

En el estudio genético realizado pudo comprobarse que el 86.3% de los sujetos a estudio fueron positivos para el alelo DQA1*0501, el 90.2% para el DQB1*02 y el 86.3% para ambos alelos. La frecuencia de distribución de alelos en el conjunto de familiares fue de 70% (DQA1*0501), 90% (DQB1*02) y 70% (ambos alelos), y en los controles sanos 56.6%, 45%, y 20%, respectivamente. Es notable que de los 10 familiares de primer grado positivos para AATGt, 7 fueran positivos para ambos alelos del HLA DQ2 y de estos, 5 fueran positivos en la biopsia de yeyuno y dos negativos [11].

Conclusiones

El sistema HeberFast Line® antitransglutaminasa constituyó el primer sistema en el mundo para el diagnóstico de EC que detecta anticuerpos de clase IgA e IgG en un mismo ensayo, lo que permite reducir en más del 30% los estudios por biopsia de yeyuno que se

8. Rabasa B, Sagaro E, Fragoso T, Castañeda C, Gra B. Demonstration of celiac disease in Cuba. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1980;37:587-97

9. Rabassa E, Sagaro E, Fragoso T, Castañeda C, Gra B. Coeliac disease in Cuban children. *Arch Dis Child* 1981;56:128-31.

10. Sagaro E, Jimenez N. Family studies of celiac disease in Cuba. *Arch Dis Child* 1981;56:132-3.

11. Cintado A, Sorell L, Galván JA, Martínez L, Castañeda C, Fragoso T, et al. L11HLA DQA1*0501 and DQB1*02 in Cuban celiac patients. *Hum Immunol* 2006;67(8):639-42.

12. Sánchez JC, Cabrera-Rode E, Sorell L, Galván JA, Carvajal F. Screening for celiac disease associated antibodies in persons with latent autoimmune diabetes of adult and type 2 diabetes. *Autoimmunity* 2007;40(2):103-7.

13. Castaneda C, Alvarez-Fumero R, Sorell L, Galván JA, Carvajal F. Screening for celiac disease in risk groups in Cuba. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (Supplement June). 2004;39: S211-2.

14. Galván JA, Cabrera-Rode E, Molina G, Díaz-Horta O, Palenzuela DO, Novoa LI, et al. Celiac disease-associated antibodies in type 1 diabetes patients in Cuba. *Biotechnol Apl* 2008;25:47-50.

Tabla. Seroprevalencia de anticuerpos antitransglutaminasa (AATGt)

Grupos	Pos	Neg	Total	Seroprevalencia (%)	Ref
Diabetes mellitus tipo 1	14	194	208	6.7 (2.8)*	[14]
Diabetes mellitus tipo 2	3	155	158	1.9	[12]
Síndrome de Down	6	257	263	2.0	[1, 13]
Giardiasis	2	38	40	5.0*	[1, 7]
Hipertransaminasemia	1	114	115	0.87	[1]
Pacientes con síntomas sugerentes de EC	88	549	637	13.8 (8.95)*	[1]

*Prevalencia comprobada por biopsia de yeyuno.

realizan en los Servicios de Gastroenterología en Cuba, con un significativo ahorro económico por concepto de recursos y costo de ingreso del paciente. Con esta prueba se evita la ejecución de la biopsia en aquellos pacientes que en la práctica pueden resultar dudosos. Por la alta especificidad del estudio serológico de AATGt, puede procederse con la confirmación por biopsia sin elevado riesgo en caso de resultado positivo.

Los estudios de prevalencia realizados en algunos grupos de riesgo así como en población infantil y adulta sana muestran que la enfermedad celíaca no es infrecuente en Cuba. Todo ello refuerza la necesidad de realizar estudios más extensos de prevalencia de esta enfermedad en Cuba. En el estudio de genotipaje asociado a EC, realizado por primera vez en el país, pudo determinarse que la proporción de pacientes celíacos que portan el HLA DQ2 es muy similar al de otras poblaciones con diferente fondo genético al cubano. Es frecuente encontrar familiares de primer grado de enfermos celíacos que son positivos para AATGt, con presentación silente de la enfermedad, sólo confirmada cuando son sometidos a biopsia de yeyuno.

Con la introducción del diagnosticador de referencia en Cuba, también pudiera realizarse la pesquisa

masiva de enfermedad celíaca, lo que ubicaría a la Medicina cubana en la vanguardia mundial en el estudio de esta enfermedad. El sistema resulta novedoso comparado con los que existen actualmente en el mercado internacional para estos fines, por lo general del tipo ELISA, que consumen mucho más tiempo y requieren dos ensayos independientes para la detección de anticuerpos de clase IgA e IgG. Es fácil de manipular, no requiere de equipamiento de laboratorio para la interpretación de los resultados ni de personal especializado para su realización, lo que resultaría de gran importancia sobre todo para países tropicales y en vías de desarrollo, donde generalmente, los recursos son escasos.

El sistema HeberFast Line[®] antitransglutaminasa posee registro sanitario aprobado en Cuba y patente otorgada en Cuba, EEUU, CEE, Rusia, Argentina y Canadá, y ha sido solicitada en Venezuela y México.

Agradecimientos

Agradecemos la contribución a los resultados del presente trabajo a María Elena Fernández de Cossío, Carlos Castañeda, Gerardo Guillén, Carlos Borroto, José Cremata, Julio Raúl Fernández, Isabel Guillén, Yelaine Tejeda, Eduardo Cabrera, Luis Martínez, Trini Fragoso y Yamila Peña.