

1. Uso Previsto

La enfermedad celíaca (CD, *Celiac Disease*) es una enteropatía humana causada por una intolerancia permanente al gluten y más específicamente a su fracción proteica denominada *gliadina*. La ingesta de dicha proteína induce, en personas genéticamente predispuestas, a una lesión severa de la mucosa intestinal que se caracteriza histológicamente por una hiperplasia de criptas con atrofia total o subtotal de las vellosidades intestinales. El diagnóstico definitivo de la enfermedad celíaca se basa en los cambios histológicos característicos observados en biopsias intestinales. Sin embargo, las pruebas serológicas, tales como la detección de anticuerpos circulantes anti-gliadinas, anti-tTG y anti-endomiso, representan métodos de análisis más baratos y menos invasivos para la detección de esta enfermedad.

El test NADAL® Enfermedad Celíaca tTG y Gliadina es un test inmunocromatográfico diseñado para detectar, en sangre humana, los anticuerpos de tipo IgA contra la transglutaminasa tisular humana (tTG), el antígeno principal es reconocido por el anticuerpo endomisial y los anticuerpos contra la gliadina. Su uso está particularmente indicado en el caso de pacientes pediátricos (menores de 16 años).

2. Introducción y significado clínico

La enfermedad celíaca es una enfermedad autoinmune que provoca que el gluten, una proteína que se encuentra en los productos elaborados con trigo, cebada, centeno y avena, reaccione con el revestimiento del intestino causando daños y que impide la absorción normal de alimentos. En algunos casos leves, puede ser difícil de diagnosticar, pero cuando es grave, puede causar una evidente malnutrición (retraso del crecimiento y la falta de aumento de peso en niños, pérdida de peso en adultos) y malabsorción (mal olor, heces que flotan y tienen un aspecto graso, y diarrea).

3. Principios del test

Los anticuerpos tipo-IgA, presentes en la sangre de los pacientes celíacos, que actúan contra la transglutaminasa tisular (tTG) y contra las gliadinas entre ellos, reaccionan con las partículas de látex conjugadas con anticuerpos humanos anti-IgA. Estos complejos de partículas coloidales/anticuerpos anti-IgA/IgAs migran por un proceso cromatográfico hacia la zona de reacción. En esta zona se han depositado ambos, tTG humana recombinante y gliadinas del trigo, que reaccionan con el complejo de partículas coloidales/anticuerpos anti-IgA/anti-tTG IgA, en el primer caso, y con el complejo de partículas coloidales/anticuerpos anti-IgA/IgA anti-gliadina en el segundo caso. Ambas reacciones producen una línea roja/rosa.

4. Reactivos y materiales provistos

- 10 test cassettes NADAL® enfermedad celíaca tTG & Gliadina
- 10 lancetas estériles
- 10 pipetas de recogida
- 1 buffer de dilución

5. Almacenamiento y conservación

El test NADAL® enfermedad celíaca tTG y Gliadina debe ser almacenado a 4°C. La fecha de caducidad se encuentra impresa en el sobre.

6. Advertencias y precauciones

- Usar todos los reactivos únicamente *in vitro*.
- Las muestras de los pacientes (sangre) pueden contener agentes infecciosos y deberán ser tratadas y desechadas como materiales biológicos potencialmente peligrosos
- No intercambiar los componentes de kits con distinto número de lote
- Antes de usarlos, dejar que todos los componentes del kit y las muestras a temperatura ambiente, pues reactivos y/o muestras frías pueden reducir la funcionalidad del test. Se recomiendan de 20 a 30 minutos para alcanzar la temperatura ambiente.
- No usar los componentes del kit después de la fecha de caducidad.
- En caso de rotura del envase, el producto puede ser utilizado aún si ninguno de los componentes ha sido dañado.
- Es importante añadir la cantidad correcta de sangre en cada test. Si es inferior a la indicada puede ser que no se realice la cromatografía porque no llegue muestra a la zona de reacción; si es superior, puede diluirse el reactivo y dar una línea débil.

7. Toma de muestras y preparación

Extracción de la muestra:

- El test ha sido diseñado para su uso con muestras de sangre frescas, no hemolizadas. El kit incluye micropipetas para la recogida de la muestra a partir de gotas de sangre.
- EL test NADAL® Enfermedad celíaca tTG y Gliadina puede también ser usado con muestras de plasma o suero.

Almacenaje de la muestra

- Las muestras se pueden guardar en el refrigerador durante 1 día.

8. Procedimiento del Test

I. Preparación

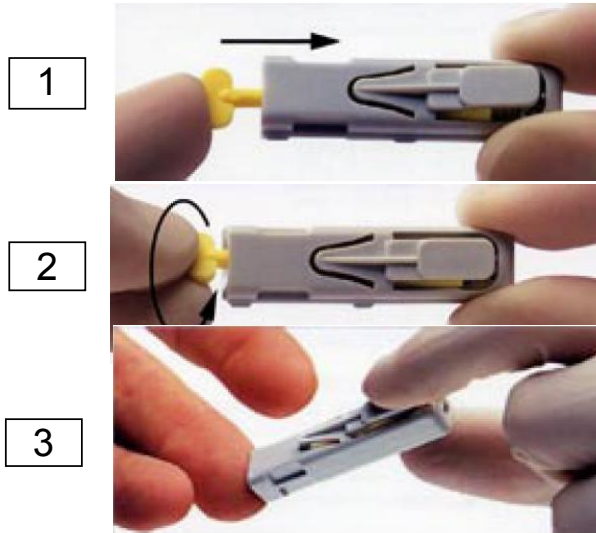
- Dejar que el dispositivo de reacción alcance la temperatura ambiente antes de abrirlo. Igualmente, dejar alcanzar la temperatura ambiente al buffer de dilución.
- Sacar el dispositivo de reacción de su envoltorio y colocarlo sobre una mesa o superficie horizontal

II. Extracción de la muestra

La sangre se debe extraer por punción digital en los dedos índice, medio o anular. Limpiar la punta del dedo con alcohol y dejar secar al aire. Poner la mano con la palma hacia arriba y hacer la punción del dedo con una lanceta NUEVA y estéril. Para ello:

1. Empuje el protector amarillo hacia el interior del cuerpo de la lanceta, hasta que se oiga un chasquido.
2. Gire el protector para romperlo y extráigalo para liberar la punta de la lanceta.
3. Apoye el extremo libre de la lanceta sobre un dedo y presione la almohadilla activadora superior.

4. Deseche la lanceta en un contenedor para objetos punzantes.

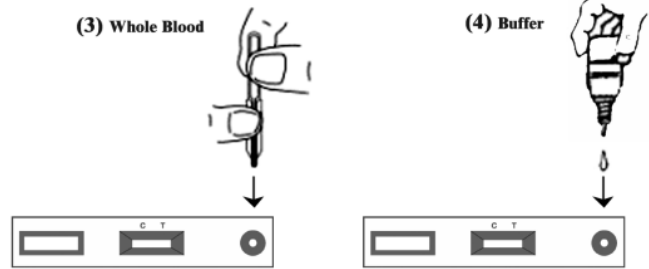
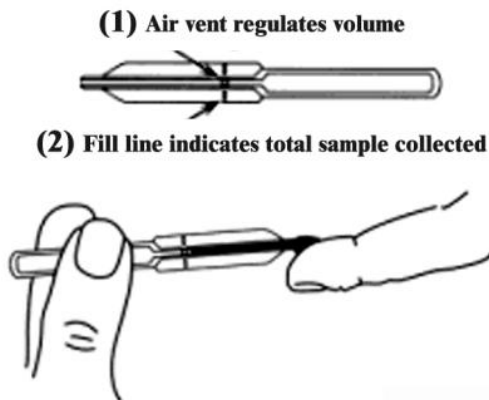


En el caso de recoger la muestra de sangre con la micropipeta provista en el kit:

Mantener el dedo por debajo del codo y apretar varias veces suave e intermitentemente en la base de la punción. Desechar la primera gota de sangre (limpiarla con una gasa estéril o un algodón). Recoger la siguiente gota de sangre con una micropipeta (1) nueva. Para ello, tocar la gota con la micropipeta, manteniéndola horizontal (2) y con el orificio de ventilación libre. **No presionar el cuerpo central de la pipeta, dejar que la sangre ascienda por capilaridad.**

Llenar la micropipeta hasta la línea, evitando la formación de burbujas de aire.

Inmediatamente, depositar la muestra de sangre en el dispositivo de reacción. Para ello, apoyar cuidadosamente la micropipeta en el centro de la ventana circular señalada con una flecha (ventana de adición de la muestra), tapar con un dedo el orificio de ventilación de la micropipeta y presionar suavemente en la parte superior de la misma (3)



Atención: Las operaciones de toma y deposición de esta muestra en el test deben realizarse de manera rápida para evitar que coagule la sangre en el interior de la micropipeta.

Esperar 30-60 seg, hasta que la sangre se absorba, y añadir en la misma ventana, gota a gota, dos gotas (con el gotero en posición vertical) o 100 microlitros del buffer de dilución.

Observar el **resultado a los 10 minutos**.

Si no se usa la micropipeta suministrada en el kit: Aplicar cuidadosamente **15 microlitros de sangre** en el centro de la ventana circular señalada con una flecha (ventana de adición de la muestra).

Esperar 30-60 seg, hasta que la sangre se absorba, y añadir en la misma ventana, gota a gota, dos gotas (con el gotero en posición vertical) o 100 microlitros de tampón de dilución.

Observar el **resultado a los 10 minutos**.

Muestras de suero

1. Preparar una dilución **1/30** del suero en el buffer de dilución del Nadal® Enfermedad celiaca tTG y gliadina. Por ejemplo: 5µl de suero + 145µl de buffer de dilución. Mezclar bien mediante pipeteo suave.

2. Añadir cuidadosamente **125 µl de la dilución**, gota a gota, en el centro de la ventana circular.

3. Observar el **resultado a los 10 minutos**.

9. Interpretación de resultados

Resultado negativo

Sólo aparece una línea transversal **AZUL** en la zona central del dispositivo de reacción alineada con la letra "C" marcada en la carcasa. Siempre debe aparecer esta línea.

Resultado Positivo

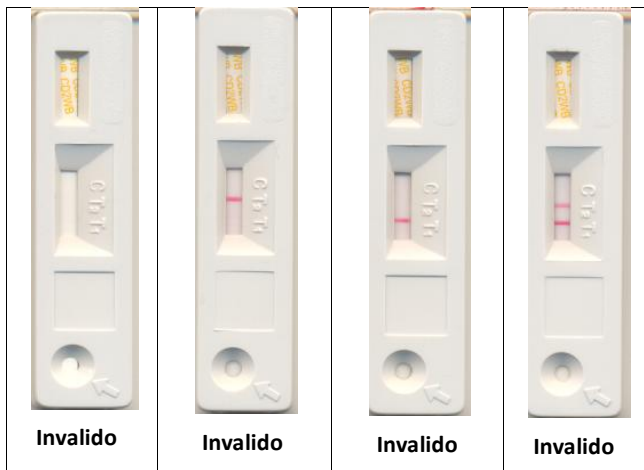
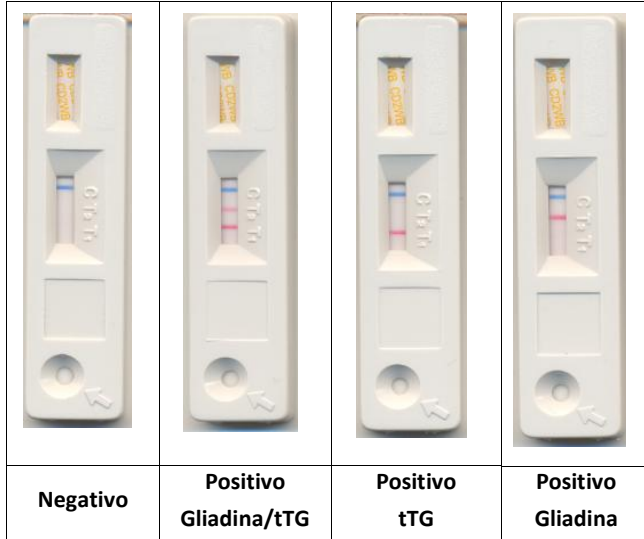
Además de la línea **AZUL** de control, aparecen una o dos líneas transversales **ROSA/ROJA** en la zona central del dispositivo de reacción, alineadas con las letras "T1" (tTG) y "T2" (Gliadina) marcadas en la carcasa. La intensidad de esta coloración será variable según la concentración presente de anticuerpos.

Resultado inválido

El test será **INVÁLIDO** si no aparece la línea azul en C, porque no se ha procedido correctamente, porque los reactivos se han deteriorado o por haber añadido una cantidad incorrecta de muestra. Repita el test.

Toda línea que por la naturaleza de la muestra pueda aparecer pasados 10 minutos no tiene valor diagnóstico.

El diagnóstico final no se debe basar sólo en el resultado de un test. Se deberá fundamentar en la correlación de los resultados del test con otros datos adecuados y con la sintomatología clínica.



10. Limitaciones

- Este test es cualitativo y cuando se reporte el resultado no debe hacerse ninguna interpretación cuantitativa en relación directa a la intensidad de la línea positiva.
- Los resultados del test deben usarse junto con otra información disponible de la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.
- Es importante añadir la cantidad correcta de sangre.
- Es importante controlar el tiempo de reacción. Si el tiempo de reacción es menor al indicado, las muestras que tienen una cantidad de anticuerpo superior al límite de sensibilidad se pueden observar claramente pero las que están en el límite no aparecerán. Si el tiempo de reacción es mayor al indicado la sensibilidad del test se verá alterada pudiendo dar lugar a interpretaciones erróneas.

11. Características de rendimiento

Sensibilidad y Especificidad

Evaluación n°1: concordancia de la sensibilidad y la especificidad del test **NADAL® enfermedad celiaca tTG y Gliadina** con el método ELISA anti-tTG y anti-gliadina IgAs (Eurospital Eu-tTG IgA; Gliatest S IgA Chromo) fue determinada analizando 157 muestras (sangre y su respectivo suero) de pacientes celíacos (diagnóstico, ya sea después de una dieta libre de gluten o no, más recientemente diagnosticado), familiares de pacientes con celiaquía y pacientes con síntomas gastrointestinales. (diarrea, malnutrición, dolor abdominal y otros). Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

		ELISA tTG		ELISA IgA	
		Pos	Neg	Pos	Neg
NADAL® enfermedad Celiaca tTG & Gliadina Test (muestra completa)	Positivo	26	6	6	4
	Negativo	4*	121	14	133
NADAL® enfermedad Celiaca tTG & Gliadina Test (<16 años)	Positivo	18	6	3	4
	Negativo	2	66	3	91

*Las cuatro muestras fueron también negativas con el test AlphaDia Imminodot Gliadina-tTG.

		Concordancia %	Sensibilidad y Concordancia %	Especificidad Concordancia %
Población de muestra completa	tTG	93.6%	86.7%	95.3%
	Gliadina	88.5%	30%	97%
Menores de 16 años	tTG	91.3%	90%	92%
	Gliadina	93%	50%	98.8%

Comentarios:

Los valores de anti-gliadina IgA fueron muy bajos en todos los casos, debido al origen de la población y a cuestiones de dietéticas. Es por eso por lo que se obtuvo una menor sensibilidad para las gliadinas con respecto a otras evaluaciones.

Evaluación n°2: La sensibilidad y especificidad del test **NADAL® Enfermedad celiaca tTG y Gliadina** fueron evaluadas con muestras de sangre de 123 pacientes, que se habían sometido a biopsias intestinales con fines diagnósticos en varias

unidades de Gastroenterología Pediátrica, en un estudio prospectivo llevado a cabo bajo la dirección de la Dra. Carmen Ribes Koninckx (Hospital infantil “La Fe”, de Valencia).

Los marcadores serológicos para la enfermedad celiaca fueron determinados simultáneamente con el test **NADAL® Enfermedad celiaca tTG y Gliadina** y un método convencional ELISA. Un total de 150 pacientes fueron incluidos, 26 con histología normal (controles), además de 122 con lesiones Marsh 3 y 2 con Marsh 2 lesiones (pacientes con Celiacía). Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Pacientes con enfermedad celiaca:

NADAL® Enfermedad celiaca tTG/ELISA concordancia = 92%

NADAL® Enfermedad celiaca tTG & Gliadina/ELISA concordancia = 67%

		CD-tTG				CD-Gliad	
		+	-			+	-
ELISA	+	108	6	68	37		
	-	4	6	4	15		
	(114)	(112)	(12)	(72)	(52)		
	(10)			(19)			

La eficacia de los diferentes métodos en el diagnóstico de la enfermedad celiaca se muestra en la siguiente tabla.

	Sensibilidad	Especificidad	Eficacia
NADAL® Enfermedad Celiaca tTG	90%	89%	90%
NADAL® Enfermedad Celiaca tTG & Gliadina	58%	80%	62%
tTG-IgA (EIA)	91,9%	80%	90%
AAG IgA (ELISA)	76%	49%	70.5%

Evaluación n°3: La concordancia sensibilidad/especificidad para el test **NADAL® enfermedad celiaca tTG & Gliadina** y los ELISAs Eurospital anti-tTG y anti-gliadin IgA (EU-tTG IgA and Gliatest S IgA Chromo) fueron evaluados con 205 muestra de sangre tomadas mediante punción digital. Los test ELISA fueron realizados con muestras de suero obtenidas de muestras de sangre por punción digital y recogidas con el Sarstedt Microvette CB300 (con EDTA).

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

		Eurospital ELISA	
		Positivo (4)	Negativo (200)
NADAL® Enfermedad Celiaca tTG & Gliadina	Positivo (3)	3	0
	Negativo (201)	1	200

Concordancia de la sensibilidad: 75% (resultados inconclusos, pocas muestras)

Concordancia de la especificidad: 100%

		Eurospital ELISA	
		Positivo (1)	Negativo (201)
NADAL® Enfermedad Celiaca tTG & Gliadina	Positivo (3)	1	2
	Negativo (199)	0	199

Concordancia de la sensibilidad: 100% (resultados inconclusos, pocas muestras)

Concordancia de la especificidad: 99%

Precisión

PRECISIÓN INTRA ENSAYO

Con 1 lote del test **NADAL® enfermedad celiaca tTG & Gliadina**, se realizaron 10 curvas de sensibilidad (disoluciones en serie de un suero de control positivo). Los análisis fueron realizados por la misma persona en el mismo día. Los resultados obtenidos en todas las curvas fueron similares, lo que demuestra la alta precisión intra ensayo del test **NADAL® enfermedad celiaca tTG & Gliadina**.

PRECISIÓN INTERDÍA

Con 1 lote del test **NADAL® enfermedad celiaca tTG & Gliadina**, se realizó un curva de sensibilidad para 10 días consecutivos (disoluciones en serie de un suero de control positivo). Los análisis fueron realizados por la misma persona, obteniéndose similares resultados cada días, lo que demuestra la alta precisión interdía del test **NADAL® enfermedad celiaca tTG & Gliadina**.

PRECISION INTERLABORATORIO

Con 1 lote del test **NADAL® enfermedad celiaca tTG & Gliadina**, se realizaron 3 curvas de sensibilidad (disoluciones en serie de un suero de control positivo). Los análisis fueron realizados por 3 técnicos el mismo día. Los resultados obtenidos en los tres casos fueron similares, lo que demuestra la alta precisión intra ensayo del test **NADAL® enfermedad celiaca tTG & Gliadina**.

PRECISION INTERLOTE

Con 3 lotes del test NADAL® enfermedad celiaca tTG & Gliadina, se realizó una curva de sensibilidad (disoluciones en serie de un suero de control positivo). Los análisis fueron realizados por el mismo técnico, obteniendo resultados similares con los tres lotes, lo que demuestra la alta precisión inter lote del test NADAL® enfermedad celiaca tTG & Gliadina.

Efecto Hook

El efecto Hook es el efecto que se produce cuando, en presencia de elevadas concentraciones del analito a detectar, se produce una disminución de la señal obtenida, llegándose incluso a negativizar muestras positivas. De esta forma podría suceder que a una muestra de elevada concentración se le asigne una cuantificación mucho menor de la real o incluso llegue a dar valor negativo.

Se han probado numerosas muestras de sangre y suero con el test NADAL® enfermedad celiaca tTG & Gliadina con contenidos totales diferentes de anti-gliadina IgAs y/o anti-tTG, sin observarse ningún tipo de inhibición de la señal positiva en ninguno de los casos. Por lo tanto, no se observó ningún efecto Hook.

Cabe señalar que la inhibición de la señal positiva basada en el contenido total de IgA en suero fue en efecto observada. Esto es debido a la competencia entre las IgAs no específicas y específicas para el enlace con el coloide. En muestras de sangre / suero donde el contenido total de IgA es bajo (como ocurre en las muestras de pacientes pediátricos) no se observa la competencia porque el coloide es capaz de capturar todas las inmunoglobulinas. Sin embargo, cuando el contenido de IgA es alto, el coloide no es capaz de capturar a todos ellos, la señal positiva puede disminuir (o incluso desaparecer por completo), dependiendo del número de enlaces de IgA específicos para el coloide.

Sustancias interferentes

Con 1 lote del test NADAL® enfermedad celiaca tTG & Gliadina se analizan una serie de sustancias interferentes que podrían llegar a encontrarse en sangre. Las sustancias interferentes se añaden al buffer en la cantidad final mostrada en la tabla y se realiza una curva de sensibilidad. Se estudiaron dos sueros de control negativos.

Sustancia	Concentración inicial	Diluyente	Concentración en el buffer
Aspirina	50 mg/ml	Etanol	2,5 mg/ml
Cafeína	10 mg/ml	Agua	0,5 mg/ml
Ibuprofeno	8 mg/ml	Agua	0,4 mg/ml
Etanol	500 mg/ml	Agua	50 mg/ml
Ácido Fólico	0,4 mg/ml	Agua	0,02 mg/ml
Ácido Nicotínico	20 mg/ml	Agua	1 mg/ml
Hemoglobina	15 mg/ml	Agua	0,75 mg/ml

Sustancia	Concentración inicial	Diluyente	Concentración en el buffer
hCG	250000 mUI/ml	Agua	500 mUI/ml
EDTA	20 mg/ml	Agua	1 mg/ml
Citrato Sódico	0,2 M	Agua	0,01 M
Heparina	500 mg/ml	Agua	50 mg/ml

Ninguna de las sustancias estudiadas afectó a la correcta realización del test.

12. Referencias

- Zhang J. et al. "Modulation of the in situ activity of tissue transglutaminase by calcium and GTP". The Journal of Biological Chemistry (1998) 273 (4): 2288-2295.
- Sárdy M. et al. "Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy". Clinical Chemistry (1999) 45 (12): 2142-2149.
- Sorell L. et al. "One-step immunochromatographic assay for screening of celiac disease". Lancet (2002) 359: 945-946.
- Drago S. et al. "Recent developments in the pathogenesis, diagnosis and treatment of celiac disease". Expert Opinion in Therapy Patents (2002) 12 (1): 45-51.
- Hansson T. et al. "Recombinant human tissue transglutaminase for diagnosis and follow-up of childhood coeliac disease". Pediatric Research (2002) 51 (6): 700-705.
- Ferre-López, S. et al. "A reliable generation of immunochromatographic sticks for both t-TG and AGA screening in Coeliac Disease". Clinical Gastroenterology and Hepatology (in press).
- Jennings J. et al. "New developments in celiac disease". Current Opinion in Gastroenterology (2003) 19 (2): 118-129.

Rev. 1, 2012-03-13 IA