

Instituto de Gastroenterología

ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO PARA DETERMINAR ANTICUERPOS ANTIGLIADINA EN PACIENTES CELIACOS

Dr. Ignacio Arencibia Mérida,* Dr. Carlos Castañeda Guillot,** Dra. Trini Fragoso Arbelo,** Dr. Antonio de Armas*** y Dr. Eladio Blanco Rabassa****

RESUMEN

Se estandarizó un ensayo inmunoenzimático para determinar anticuerpos IgA antigliadina (IgA-AG). Se ajustaron los distintos componentes de la prueba y se determinó la presencia de IgA-AG en 61 pacientes con enfermedad celíaca, síndrome de malabsorción y otras enfermedades gastrointestinales, así como 91 donantes sanos del banco de sangre y 15 niños sanos. El 51,7 % de los pacientes celíacos resultaron positivos a la determinación de dicho anticuerpo, relacionado esencialmente con transgresiones de la dieta. La prueba tuvo una sensibilidad de 81,2 % y una especificidad de 97,1 %. Se concluye que la prueba es útil en el seguimiento de pacientes celíacos y como ayuda diagnóstica en la indicación de la biopsia intestinal, además puede ser usada satisfactoriamente como prueba de pesquisa.

INTRODUCCION

Se ha reportado que los anticuerpos antigliadina en el suero, son marcadores confiables de la enfermedad celíaca en fase activa del 71 al 100 % de casos no tratados.^{1,2} Igualmente se ha planteado el predominio de la IgA o de la IgG indistintamente en cuanto al tipo de inmunoglobulina más representativa presente en ésta respuesta de anticuerpos.^{3,4}

Los anticuerpos antigliadina circulantes se han determinado por diferentes métodos tales como el luminiscente,⁵

el fluorescente,⁶ la difusión en agar visualizada con un sistema inmunoenzimático,⁷ y mediante un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA),⁸ y este último método es el más utilizado dada sus ventajas técnicas.

La sensibilidad de los varios métodos reportados varía desde 86 hasta 100 %, aunque muchos autores señalan que es del 100 %, ⁶ mientras que la especificidad va desde 85 hasta 97 % en algunos trabajos.^{6,7}

Aunque algunos autores han reportado la presencia de anticuerpos antigliadi-

* Especialista de I Grado en Inmunología, Instituto de Gastroenterología.

** Especialista de II Grado en Gastroenterología, Instituto de Gastroenterología.

*** Especialista de I Grado en Pediatría, Hospital Pediátrico Docente "Pedro Borrás Astorga".

**** Especialista de II Grado en Pediatría, Profesor Titular de Pediatría, Hospital Pediátrico Docente "Centro Habana".

na un bajo porcentaje en enfermedades inflamatorias intestinales,⁷ todos los autores coinciden en plantear que la determinación de anticuerpos antigliadina es una prueba de ayuda diagnóstica y de gran utilidad en el seguimiento de pacientes celíacos,^{3,9} y es muy útil como prueba de pesquisaje.¹⁰

En el presente estudio se realizó el montaje de un ELISA para determinar anticuerpos antigliadina en suero, con el uso de varios grupos de pacientes con diversas afecciones intestinales, con la intención de disponer de una prueba, tanto de ayuda diagnóstica como de seguimiento, de pacientes celíacos.

MATERIAL Y METODO

Se utilizaron para este estudio personas afectadas y personas sanas como grupo control. Se estudió la presencia de anticuerpos antigliadina en un total de 29 pacientes de ambos sexos con un promedio de 13,4 años de edad y diagnóstico de enfermedad celíaca, de los cuales 13 llevaban dieta libre de gluten y el resto dieta normal.

Los otros grupos de pacientes incluían 14 niños con malabsorción intestinal de causa parasitaria esencialmente, los niños con enfermedad diarreica crónica, 8 pacientes con desnutrición y baja talla y 15 niños controles sanos. Además, los controles incluyeron 91 donantes de sangre supuestamente sanos (adultos).

Del total de pacientes celíacos, 7 tenían más de 17 años de edad.

Se obtuvo el suero de los pacientes y de los controles mediante punción venosa, y se guardó a -20 ° hasta el momento de realizar la prueba.

En el montaje del ELISA para determinar anticuerpos IgA antigliadina (IgA-AG) nos guiamos por un juego diagnóstico comercial de la casa sueca Pharmacia con varias modificaciones importantes como el uso de un conjugado diferente, otros tiempos de incubación

y diferentes concentraciones del antígeno para acoplar a la placa.

Se utilizó gliadina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) en una concentración de 2 ug/mL para recubrir un soporte sólido de polivinilo (PVC) de fondo plano, y se incubó 18 horas a 25 °C. Después de lavar 3 veces y bloquear sitios libres con albúmina de 1 %, se depositó la muestra diluida a 1:1000 durante 2 horas a 25 °C.

A continuación y después de lavar se deposita el conjugado fosfatasa alcalina anti-IgA humana diluido 1:500 durante 1 hora, para añadir posteriormente el sustrato de la enzima un tiempo igual y leer en el espectrofotómetro a 405 nm.

Método estadístico. Se realizaron por 2 métodos distintos. En el primero se calculó la media más-menos 2 desviaciones estándares en un amplio grupo control, y fueron positivos los casos con valores superiores a la media más 2 desviaciones estándares. En el otro método se calculó un valor límite de 25 unidades arbitrarias (UA) mediante el uso de la fórmula:

$$\frac{\text{Densidad óptica paciente}}{\text{Densidad óptica control}} \text{ por } 100 = \text{UA}$$

positivo > 25 UA
negativo < 25 UA

Los pacientes que resultaron positivos mantuvieron su condición con ambos cálculos.

RESULTADOS

El ensayo inmunoenzimático realizado sufrió una serie de variaciones en cuanto a diluciones de la muestra, de la concentración del antígeno de recubrimiento y del conjugado, además de probarse diferentes tiempos de incubación,

antes de quedar establecida su reproducibilidad definitivamente con las condiciones planteadas en material y método.

Se realizó la determinación de anticuerpos IgA antigliadina, en los distintos grupos estudiados (tabla 1), y se encontró que los pacientes positivos estaban incluidos esencialmente en el grupo de pacientes celíacos conocidos, el cual mostró una prevalencia del 57,1 %. El resto de los pacientes que resultaron positivos están en los grupos desnutrición y baja talla y en el de controles donantes de sangre. De un total de 106 controles se encontraron sólo 3 positivos (falsos positivos), lo que representa el 97,1 % de especificidad de la prueba.

En la tabla 2 se muestra que los pacientes celíacos bajo seguimiento que no llevaban una alimentación adecuada para su enfermedad y por tanto tenían una dieta normal, presentaron anticuerpos IgA antigliadina positivos en el 81,2 % (13 pacientes). Este porcentaje representa la sensibilidad del método, dado que 3 pacientes diagnosticados como portadores de una enfermedad celíaca resultaron negativos a la determinación de anticuerpos (falsos negativos), a pesar de que sus biopsias intestinales mostraron atrofas subtotales en 2 casos y una atrofia parcial de las vellosidades en el tercero.

TABLA 2. Presencia de anticuerpos antigliadina en el seguimiento de pacientes celíacos con dieta normal y dieta libre de gluten

	Dieta libre de gluten	Dieta normal	Total
Anticuerpos Antigliadina Positivos	2	13	15
Anticuerpos Antigliadina Negativos	11	3*	14
Total de pacientes celíacos	13	16	29

* Pacientes que presentaban en sus biopsias intestinales atrofas subtotales en 2 casos y una atrofia parcial de las vellosidades en el tercero

DISCUSION

Del total de controles donantes de sangre estudiados, 3 resultaron positivos a anticuerpos IgA antigliadina (IgA-AG) para el 3,4 %, a diferencia de lo reportado por Kilander A.F. et al.,⁴ donde no fue detectado ningún caso positivo en este grupo, aunque debemos señalar que el número de donantes realizados por esos autores fue menor que el nuestro.

TABLA 1. Anticuerpos antigliadina en distintos grupos de pacientes y controles

	Anticuerpos anti-gliadina positivos	Anticuerpos anti-gliadina negativos	Total
Pacientes celíacos	15	14	29
Síndrome de malabsorción EDC*	-	14	14
Desnutrición y baja talla	1	10	10
Desnutrición y baja talla	1	7	8
Controles de niños sanos	-	15	15
Controles donantes sanos	3	88	91
Total	19	148	167

* Enfermedad Diarreica Crónica.

Usualmente se ha reportado que la cifra de sujetos sanos que resultan positivos en la determinación de IgA-AG es alrededor del 1 %;^{6,11} no obstante nosotros no hallamos ningún caso positivo, quizás por ser esta vez nuestra muestra muy pequeña. En el total de pacientes celiacos realizados se encontró una prevalencia de IGA-AG de 51,7 %, dado esencialmente por aquellos pacientes con transgresiones de la dieta y que según reporta Rosenthal, E. et al.¹⁰ en términos de frecuencia de IgA-Ag en general, esta ocurre entre 9 y 70 % de pacientes con la enfermedad.

La prevalencia de dichos anticuerpos en los demás grupos de afecciones intestinales relacionadas en total, fue relativamente bajo, 3,1 % pues otros autores encontraron valores más elevados, 4 %⁷ y 1,3 %¹², lo que entre otras cosas podría estar influido por los distintos métodos utilizados en cada caso. Los pacientes celiacos estudiados tenían diagnóstico con biopsia intestinal y eran atendidos en el Servicio de Pediatría del Instituto como promedio desde hacía 6 años. De los 13 pacientes que llevaban dieta libre de gluten, sólo en 2 casos se determinaron anticuerpos IgA-AG, por lo que sospechamos en ellos transgresiones de la dieta.

En 16 pacientes se recogió que llevaban una dieta normal o casi normal con usuales transgresiones. De ellos, 13 pre-

sentaron anticuerpos positivos, mientras que en el resto (3 pacientes) no encontraron anticuerpos, y a pesar de que eran casos bien documentados, esto podría explicarse por una deficiente respuesta de anticuerpos en esos pacientes o una insuficiente concentración de IgA-AG para que fueran detectados. Estos 3 pacientes representan los falsos negativos, por lo que la sensibilidad de nuestro ensayo fue del 81,2 %.

La sensibilidad de las pruebas ELISA reportadas para determinar IgA-AG varían entre 86 y 100 %.^{6,10} Aunque la sensibilidad de nuestro método no está alejada de los reportados, quizás deba revisarse el diagnóstico en los casos falsos negativos encontrados.

La especificidad del método fue del 97,1 % dada por encontrar 3 casos positivos entre los controles negativos estudiados muy similar a los mejores resultados reportados, que van desde el 85 hasta el 97 %.^{6,7} por lo que se plantea que el método estandarizado es confiable y práctico como método de pesquisaje, además es útil como ayuda diagnóstica y guía para indicar la biopsia intestinal en pacientes con sospechas de enfermedad celiaca, que por sus condiciones físicas o corta edad hacen difícil la realización de dicha prueba. De igual forma se demuestra su utilidad en el control del régimen dietético libre de gluten impuesto a estos pacientes.

SUMMARY

An immunoenzymatic assay to determine antigliadin IgG antibodies was standardized (IgA-AG). The different components of the test were adjusted and the presence of IgA-AG was determined in 61 patients with coeliac disease, malabsorption syndrome, and other gastrointestinal diseases, as well as in 91 healthy blood donors and 15 healthy children. A 51.7 % of the patients with coeliac disease were positive to the determination of such antibody, particularly related to diet violations. The test had a sensitivity of 81.2 % and specificity of 97.1 %. It is concluded that the test is useful for the follow-up of patients with coeliac disease and as a diagnostic aid for the indication of intestinal biopsy, besides it may be used as screening test.

RESUME

Les auteurs ont standardisé un essai immuno-enzymatique pour la détermination d'anticorps IgA antigliadine (IgA-AG). On a mis au point les divers composants de l'épreuve et on a déterminé la

présence d'IgA-AG chez 61 patients avec maladie coeliaque, syndrome de malabsorption et d'autres maladies gastro-intestinales, ainsi que chez 91 donneurs sains de la banque de sang et chez 15 enfants sains. 51,7 % des patients coeliaques ont été positifs au dosage de cet anticorps, essentiellement en rapport avec les transgressions de la diète. La sensibilité de l'épreuve a été de 81,2 % et la spécificité de 97,1 %. Les auteurs concluent que cette épreuve est utile dans la surveillance des sujets avec maladie coeliaque et, sur le plan diagnostique, dans l'indication de la biopsie intestinale, pouvant être utilisées de manière satisfaisante comme épreuve de dépistage.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Savilahti E. et al. IgA anti-gliadin antibodies: a Marker of mucosal damage in childhood coeliac disease. *Lancet* 1983; 1: 320.
2. Unsworth DJ et al. IgA anti-gliadin antibodies in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 46: 288, 1981.
3. Scott H et al. Immune response patterns in coeliac disease. Serum antibodies to dietary antigens measured by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Exp Immunol* 1984;57:25.
4. Kilander AF et al. Evaluation of gliadin antibodies for detection of coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1983;18:377.
5. Lilius EM et al. Automated luminometer setup for continuous measurement of 25 samples. In: "Proceedings on Third International Symposium on Analytical Applications of Bioluminescence and chemiluminescence. New York: Academic Press, 1987.
6. Burgin-Wolff A et al. A reliable screening test for childhood celiac disease: fluorescent immunosorbent test for gliadin antibodies. *J Pediatr* 1983;102:655.
7. Stenhammar I. et al. Serum gliadin antibodies for detection and control of childhood coeliac disease. *Acta Pediatr Scand* 1984;73:657.
8. Kieffer M et al. Wheat gliadin fractions and other cereal antigens reactive with antibodies in the sera of coeliac patients. *Clin Exp Immunol* 1982;50:651.
9. Volta U et al. Antibodies to gliadin in adult coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Digestion* 1984;30:263.
10. Rosenthal E et al. Immunofluorescent antigliadin antibody test. Tittle and profile of gluten antibodies in coeliac disease. *Am J Dis Child* 1988;138:659.
11. Beretele, PM et al. The fluorescent immunosorbent test for IgG gliadin antibodies and the leucocyte migration inhibition test in coeliac disease; comparison of diagnostic value. *Eur J Pediatr* 1987;144:58.
12. Lebenthal E. et al. Gliadin antibodies in celiac disease. *J Pediatr* 1983;102:711.

Recibido: 23 de enero de 1990. Aprobado: 23 de marzo de 1990.

Dr. Ignacio Arencibia. Instituto de Gastroenterología. Calle 25 e I, La Habana 10400.