

TESIS DOCTORAL

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS INMUNOLÓGICOS PARA LA ESTIMACIÓN DEL GLUTEN CONSUMIDO Y SUS APLICACIONES EN LA ENFERMEDAD CELIACA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Programa de doctorado en Biología Molecular, Biomedicina e
Investigación Clínica

DOCTORADO INDUSTRIAL

Bajo la dirección de los doctores:

CAROLINA SOUSA MARTÍN

ÁNGEL CEBOLLA RAMÍREZ

IRATI MENDIA AZKOAGA

Sevilla, 2023

*“Aunque los esfuerzos de atención fuesen durante años aparentemente estériles,
un día, una luz exactamente proporcional a esos esfuerzos inundará el alma.*

*Cada esfuerzo añade un poco más de oro
a un tesoro que nada en el mundo puede sustraer. “*

EL DESEO DE LUZ, Simone Weil

“Un país sin investigación es un país sin desarrollo.”

Margarita Salas

Afrontarse a un reto como este siempre da vértigo.

Muchas personas me han ayudado, de distintas maneras, en la travesía de este proyecto. Vaya mi agradecimiento a todas ellas:

A mis directores, Carolina y Ángel, que imaginaron esta tesis antes que yo. Por apostar por mí y darme la oportunidad de descubrir el mundo de la investigación desde una perspectiva industrial. Por permitirme conocer el trabajo que hay detrás de la creación de productos y servicios para mejorar la vida de las personas que padecen una enfermedad crónica. Por vuestra cercanía, por enseñarme y desplegar antes mis ojos el mapa de este viaje.

A todos mis compañeros de Biomedal, por ser el mejor equipo que uno pueda esperar. Por los momentos compartidos:

A Alba, Ale, Auxi, Carmen G., Carmen M., Cristina, Dixan, Jose, María, Manolo, Miguel, Raquel y Virginia, por vuestra generosidad, por escucharme y mostrarme vuestro apoyo. Por las charlas y el humor, tan necesarios en el día a día.

A Andrea por la gestión del Doctorado Industrial.

A Joshua, por compartir conmigo sus conocimientos y aguzarme la mirada.

A Ali y a Laura, por ser mis compañeras de batalla. Por ayudarme a plantear experimentos y presentarme sus manos en muchos de ellos. Por las largas horas en el laboratorio con la música de fondo. Por vuestros abrazos revitalizantes.

A las compañeras de farmacia. A Ángela y Verónica, por acogerme en su laboratorio como una más. Por las horas ayudándome a reclutar voluntarios.

A mis amigos del sur. A Cristina, mi primera amiga sevillana.

A mis mirillas, Alazne, Cinta y María. A Gali, Arte y Javi. A Johana y a Tamara. Por acogerme en vuestro territorio.

A mis compañeros de teatro. Por amenizarme la semana. Por enseñarme que la vida, se puede vivir de muchas maneras.

Betiko lagunei. Ines, Irati, Itziar, Maite, Naroa, Sara eta Xumal. Urruti bizi arren, gertu zaudetelako.

Familiari. Amari eta aitari, emandako balio, hezkuntza eta askatasunagatik. Baldintzarik gabeko laguntzagatik. Saiolari, inork ez bezala ulertzeagatik. Maite zaituztedalako, zuen maitasuna sentitzen dudalako.

A Ivan. Per unir-se a mi en aquest camí i continuar construint junts. Per estar al meu costat cada dia. Per inspirar noves inquietuds i aficions. T'estimo molt.

A todos los voluntarios del estudio que han hecho posible que hoy presente esta Tesis Doctoral.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABREVIATURAS y SÍMBOLOS	6
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	12
1 TRASTORNOS RELACIONADOS CON EL GLUTEN: La diferencia entre alergias, reacciones autoinmunes e intolerancias	12
2 ENFERMEDAD CELÍACA	14
2.1 CONTEXTO HISTÓRICO	14
2.2 INCIDENCIA Y PREVALENCIA	15
2.3 PATOGÉNESIS Y RESPUESTA INMUNITARIA	16
2.3.1 Factores genéticos	16
2.3.2 Factores ambientales	18
2.3.3 Respuesta inmunitaria	22
2.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	26
2.5 DIAGNÓSTICO	28
2.6 TRATAMIENTO	32
2.6.1 Dieta sin gluten	32
2.6.2 Terapias experimentales	33
2.7 HERRAMIENTAS PARA EL SEGUIMIENTO DE LA EVOLUCIÓN DEL PACIENTE (ADHERENCIA AL TRATAMIENTO)	34
3 INMUNOENSAYOS DE DIAGNOSTICO IN VITRO	36
3.1 PRODUCTOS DE DIAGNÓSTICO IN VITRO	36
3.2 INMUNOENSAYOS COMO TEST DE DIAGNÓSTICO IN VITRO	36
3.2.1 Biomarcador	37
3.2.2 La formación de inmunocomplejos y el rol de los anticuerpos	38
3.2.3 Clasificación: Formatos de detección	45
3.2.4 Técnicas	47
3.2.5 Conceptos para la evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica	51
4 INMUNOENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DE GLUTEN	54
4.1 INMUNOENSAYOS PARA EL ETIQUETADO DE ALIMENTOS SIN GLUTEN	54
4.2 INMUNOENSAYOS IVD PARA LA DETECCIÓN DE GIP DURANTE EL SEGUIMIENTO DE LA EC	57
4.2.1 Heces	57
4.2.2 Orina	58
5 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE TEST DE DIAGNÓSTICO IN VITRO EN LA INDUSTRIA	62
5.1 PRODUCTO MÍNIMO VIABLE (MVP)	62
5.2 TEST DE DIAGNÓSTICO EN FORMATO “FOR RESEARCH USE ONLY (RUO)”	63
5.3 TEST DE DIAGNÓSTICO BAJO EL REGLAMENTO IVDR REGLAMENTO (UE) 2017/746, ISO13845 Y MARCADO CE	64
5.3.1 Fase 1: Concepto, viabilidad y diseño	65
5.3.2 Fase 2: Prueba de concepto, congelación y transferencia del diseño	66
5.3.3 Fase 3: Verificación y validación del diseño	67
5.3.4 Fase 4: Revisión del resultado final y lanzamiento al mercado	68

5.3.5	Fase 5: Lanzamiento y post-vigilancia	68
5.4	IMPLICACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE I+D EN EL REGLAMENTO IVDR	69
	REFERENCIAS	70
	CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES DEL TEMA Y OBJETIVOS	92
	REFERENCIAS	95
	CAPÍTULO 3. VALIDACIÓN ANALÍTICA Y CLÍNICA DEL iVYCHECK GIP Urine	100
1	ANTECEDENTES DEL TEMA	100
1.1	GENERALES	100
1.2	REGULACIÓN	100
1.3	TRANSPORTE, ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL	101
1.4	FUNCIONALIDAD ANALÍTICA	101
1.5	FUNCIONALIDAD CLÍNICA	102
2	EQUIPOS Y SOFTWARES	102
3	MATERIALES Y MÉTODOS	103
3.1	DEMOSTRACIÓN DEL CUMPLIMIENTO DE LOS ELEMENTOS DE ENTRADA-REQUISITOS DEL CLIENTE	103
3.2	MUESTRAS DE ORINA	104
3.3	iVYCHECK GIP Urine	107
4	RESULTADOS	109
4.1	ARCHIVOS Y DATOS GENERADOS: PROs, FRMs e INFs	109
4.2	RESUMEN DE RESULTADOS	113
5	DISCUSIÓN	132
	REFERENCIAS	139
	CAPÍTULO 4: CRIBADO PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DE LA EC EN LA POBLACIÓN PEDIÁTRICA 2 A 14 AÑOS	142
1	ANTECEDENTES DEL TEMA	142
2	EQUIPOS Y SOFTWARES	145
3	MATERIALES Y MÉTODOS	145
3.1	DISEÑO DEL ESTUDIO Y VOLUNATARIOS	145
3.2	EVALUACIÓN CLÍNICA	146
3.3	HÁBITOS DE CONSUMO DE GLUTEN Y TOMA DE MUESTRAS DE ORINA PARA EL ANÁLISIS DE GIP	146
3.4	anti-tTG-IgA LFIA en SANGRE TOTAL	147
3.5	EVALUACIÓN PEDIÁTRICA	147
3.6	MONITORIZACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DE LA CVRS Y LOS SÍNTOMAS	148
3.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	148
4	RESULTADOS	148
4.1	SUJETOS	148
4.2	EVALUACIÓN CLÍNICA	149
4.3	EVALUACIÓN DE LOS HÁBITOS DE CONSUMO DE GLUTEN Y ANÁLISIS DE GIP EN ORINA	150
4.4	DETERMINACIÓN DE anti-tTG-IgA en sangre total	151
4.5	DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD CELIACA	152

4.6	MONITORIZACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DE LA CVRS y DE LA ADHERENCIA A LA DSG DE LOS ENFERMOS CELIACOS DIAGNOSTICADOS	154
5	DISCUSIÓN	155
	REFERENCIAS	162
	CAPÍTULO 5. DESARROLLO DE UN MÉTODO ELISA PARA LA DETECCIÓN DE GIP EN ORINA	172
1	ANTECEDENTES DEL TEMA	172
2	EQUIPOS Y SOFTWARES	178
3	MATERIALES y MÉTODOS	181
3.1	REACTIVOS DE USO COMÚN	181
3.2	TAMPONES DE USO COMÚN	182
3.3	PÉPTIDOS MODELO DE GIP	182
3.4	ANTICUERPOS PARA LA DETECCIÓN DE GIP EN ORINA	183
3.5	PRODUCTOS COMERCIALES	184
3.6	MUESTRAS DE ORINA	185
3.7	MÉTODO DE REFERENCIA: IVYCHECK GIP URINE E IVYCHECK READER	186
3.8	ELISA	186
3.9	HPLC	190
4	RESULTADOS	191
4.1	FASES DEL DESARROLLO	191
4.2	PROTOTIPOS ALCANZADOS	197
4.3	PARÁMETROS PREVALIDACIÓN	200
5	DISCUSIÓN	203
	REFERENCIAS	209
	CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	214
	ANEXO 1. PROCESO DEL DESARROLLO DEL MÉTODO ELISA PARA LA DETECCIÓN DE GIP EN ORINA	218
1	FASES DEL DESARROLLO DEL MÉTODO	218
1.1	DEFINICIÓN DE LOS ELEMENTOS DE ENTRADA - REQUISITOS DEL CLIENTE (EE-CRS)	218
1.2	ESTUDIO DE LA DISPONIBILIDAD DE GIP EN LA MUESTRA	219
1.3	ANÁLISIS DE LOS PROTOTIPOS DE MÉTODO ELISA	219
1.4	ELECCIÓN DEL PÉPTIDO PATRÓN	221
1.5	ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS DE OPTIMIZACIÓN	222
1.6	AJUSTE DE MEDIO DE BIORREACCIÓN	226
1.7	PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA	227
1.8	GENERACIÓN DE LA SEÑAL	230
1.9	VARIACIONES ALTERNATIVAS DEL MÉTODO PUESTO A PUNTO	231
2	RESULTADOS DE LAS FASES DEL DESARROLLO DEL MÉTODO	234
2.1	ELEMENTOS DE ENTRADA - REQUISITOS DEL CLIENTE (EE-CRS)	234
2.2	DISPONIBILIDAD DEL GIP	238
2.3	CONSTRUCCIÓN DEL PRIMER PROTOTIPO	240
2.4	PÉPTIDO PATRÓN	250

2.5	RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LOS CAMPOS OPTIMIZABLES	253
2.6	FORMULACIÓN DEL MEDIO DE BIORREACCIÓN	259
2.7	PRETRATAMIENTOS	264
2.8	GENERACIÓN DE LA SEÑAL	270
2.9	VARIACIONES SOBRE EL MÉTODO ELISA DE ELECCIÓN	272
	REFERENCIAS	274

RESUMEN

RESUMEN

La **enfermedad celiaca (EC)**, se define como una **enteropatía inflamatoria crónica del intestino delgado causada por la ingesta de gluten en individuos genéticamente predispuestos**. Por tanto, es el resultado de la interacción del gluten con factores inmunológicos, genéticos y ambientales. Afecta aproximadamente al **1,4% de la población**, aunque su prevalencia puede variar en función de la edad, el continente y la región. Esta patología está infradiagnosticada a nivel mundial ya que los criterios utilizados en los diferentes estudios epidemiológicos para su diagnóstico no son uniformes, así por ejemplo el estudio serológico, en adultos, requiere confirmación histológica.

Las proteínas del gluten están presentes en el trigo, la cebada, el centeno la avena y sus derivados, y se degradan de forma deficiente en el tracto gastrointestinal ya que son resistentes a las enzimas digestivas. Tras la ingestión de alimentos con gluten se generan péptidos inmunogénicos que son capaces de producir daño en la mucosa intestinal con una lesión que se caracteriza histológicamente por infiltrado de linfocitos intraepiteliales e hiperplasia de las criptas con distintos grados de atrofia de las vellosidades intestinales, El **cuadro clínico de la EC es heterogéneo**, presenta una gran variedad de **síntomas** que pueden ser tanto **gastrointestinales como extraintestinales**, y que difieren considerablemente en función de la edad de presentación.

La actual forma recomendada para el **diagnóstico** de la EC se basa en un flujo de pruebas, donde las primeras suelen ser las serológicas. No obstante, estas pruebas de diagnóstico sólo son válidas para detectar la enfermedad en aquellas personas que consumen gluten de forma regular y sin restricción en su dieta. Una vez efectuado el diagnóstico, la única terapia disponible es la adhesión a una **dieta sin gluten (DSG) de por vida**. No obstante, la **completa exclusión del gluten de la dieta es complejo** y las transgresiones dietéticas, tanto voluntarias como involuntarias, son frecuentes. Por ello, una monitorización continua del paciente para asegurar una correcta adherencia a la DSG resulta necesaria. Para la monitorización clínica de esta patología las guías clínicas recomiendan que en la práctica clínica se realicen de forma periódica pruebas serológicas, estudios de la sintomatología, cuestionarios dietéticos y biopsias intestinales. Sin embargo, se ha demostrado que estas herramientas son poco eficientes, invasivas o inexactas para evaluar la adherencia a la DSG. Por lo que contar con herramientas fiables para la monitorización de la DSG de forma eficiente y no invasiva es vital. En los años 2012 y 2017 se publicaron unos estudios con los que se abría la posibilidad de utilizar la determinación de los péptidos inmunogénicos del gluten (GIP) en heces y orina, respectivamente, como

marcadores directos de la ingesta de gluten, ya que permiten monitorizar la adherencia a la DSG en pacientes con EC. La recuperación de cantidades medibles de GIP en estas excreciones corporales indica de forma directa que el gluten ha pasado por el tracto digestivo y, que, por lo tanto, es al menos parcialmente resistente a la digestión gastrointestinal humana, además de que puede absorberse y acceder al torrente sanguíneo.

Estas herramientas de diagnóstico o seguimiento requieren para su amplia aplicación en la rutina clínica en la Unión Europea del marcado IVD (Diagnostico In Vitro) y CE (Conformidad Europea).

En este contexto, esta tesis doctoral se ha centrado en el desarrollo y validación de nuevas metodologías analíticas en ELISA e inmunoensayos de flujo lateral (IELF) con soluciones alternativas para facilitar el diagnóstico de la EC y la detección de la ingesta de gluten, así como el alcance de sus aplicaciones.

El **Capítulo 1** es una introducción general sobre los trastornos relacionados con el consumo de gluten, con especial atención a la EC, y sobre inmunoensayos para la detección del gluten y GIP detallando además los factores a tener en cuenta durante el desarrollo y la validación de los mismos.

En el **Capítulo 2** se exponen los antecedentes del tema y los objetivos principales de esta Tesis Doctoral.

El **Capítulo 3** incluye la validación del iVYCHECK GIP Urine, un IEFL de uso en el seguimiento de la DSG mediante la detección de los GIP para su conformidad con el reglamento 746/2017 con el objetivo de poder obtener el marcado CE IVD.

En el **Capítulo 4** se demuestra la utilidad clínica en atención primaria del CeliacDetect, un IEFL para la detección de anti-tTG-IgA en sangre, para la detección precoz de la EC mediante cribado en población pediátrica, y explorar, la conveniencia de monitorizar el consumo de gluten reciente para hacer más eficaces dichos diagnósticos.

El **Capítulo 5** describe el desarrollo de un método ELISA para la detección de GIP en orina y sus aplicaciones durante el diagnóstico y seguimiento de la EC.

Por último, en el **Capítulo 6**, contiene las conclusiones alcanzadas en esta Tesis Doctoral.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABREVIATURAS y SÍMBOLOS

λ	Longitud de onda
33-mer	Péptido de 33 aminoácidos
4PL	Modelo logístico de 4 parámetros
Ac	Anticuerpo
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
anti-DGP	Anticuerpos anti-gliadina deamidada
anti-EMA	Anticuerpos anti-endomisio
anti-tTG	Anticuerpos anti-transglutaminasa tisular
AT	Alergia al trigo
ATI	Inhibidores de la amilasa y la tripsina
BAC	Búsqueda activa de casos
BSA	Albúmina de suero bovino
CCI	Conmutación de clase de inmunoglobulina
CE	Conformidad Europea
CH	Región constante de la cadena constante del anticuerpo
CL	Región constante de la cadena ligera del anticuerpo
CRS	Requisitos del cliente
CV	Coefficiente de variación
DGS	Dieta sin gluten
DO	Densidad óptica
EC	Enfermedad Celíaca
EC50	Concentración media de la máxima efectiva
ECD	Clorhidrato de carbodiimida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Elementos de entrada
EI	Extraintestinal
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EOE	Esofagitis eosinofílica
Ep	Epítipo

ESPGHAN	Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica
Fab	Región variable del anticuerpo
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura
Fc	Región constante o cristalizable del anticuerpo
FN	Falso negativo
FODMAP	Oligo-Di-Monosacáridos y Polioles Fermentables
FP	Falso positivo
FPG	Familiar de Primer Grado
FRM	Formulario
GE	Gastritis eosinofílica
GI	Gastrointestinal
GIP	Péptido inmunogénico del gluten
GRAVY	Media general de hidropatía
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
HMS	Hipermutación somática
HRP	Peroxidasa de rábano
IAT	Inhibidores de la amilasa y la tripsina
IC ₅₀	Concentración inhibitoria de la mita de la máxima
IFU	Instrucciones de uso
Ig	Inmunoglobulinas
IL	Interleuquina
INF	Interferon
INF	Informe
iVCU	iVYCHECK GIP Urine
IVD	Diagnóstico <i>in vitro</i>
iVLU	iVYLISA GIP Urine
KLH	Hemocianina de lapa californiana
LFIA	Inmunoensayo de flujo lateral , <i>lateral flow immunoassay</i>
LIE	Linfocitos intraepiteliales
LLoQ	Límite de cuantificación inferior
LoB	Límite de blancos
LoD	Límite de detección
LoN	Límite de negativos
LSN	Límite superior a la normalidad

mAc	Anticuerpo monoclonal
PoCT	Pruebas de laboratorio en el lugar de asistencia
NK	Natural killer
OvN	Toda la noche
pABA	Ácido paraaminobenzoico
pAc	Anticuerpo policlonal
PDG	Péptidos derivados del gluten
pl	Punto isoelectrico
PI	Propiedad intelectual
PMV	Producto Mínimo Viable
PPC	Ppruebas de punción cutánea
PPO	Perfil del producto objetivo, target product profile
PRM	Plan de recogida de muestras
PRO	Protocolo
PVP 360K	Polivinilpyrrolidona 360K
RAA	reacciones adversas a alimentos
rAc	Anticuerpo recombinante
RDC	Regiones Determinantes de Complementariedad
REP	Reporte
rpm	Revoluciones por minuto
RUO	De uso exclusivo para investigación
SDE	Solución Dilución ELISA
SDR	residuos determinantes de especificidad
SDS	Dodecilsulfato sódico
SG-APM	Subunidades de glutenina de alto peso molecular
SG-BPM	Subunidades de glutenina de bajo peso molecular
SGNC	Sensibilidad al gluten no celiaca
s-NHS	sulfo-N-hidroxisuccinimida
TA	Temperatura ambiente
TCR	Receptor de células T
TEMED	Tetrametiletildiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TRF	fluorescencia en tiempo resuelto, time resolved fluorescence
TR-FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia en tiempo resuelto

TRG	Trastornos relacionados con el gluten
UE	Unión Europea
ULoQ	Límite de cuantificación superior
VC	Volúmenes de columna
VH	Región variable de la cadena constante del anticuerpo
Vh:Cd	ratio entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas
VL	Región variable de la cadena ligera del anticuerpo
VN	Verdadero negativo
VP	Verdadero positivo
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
WDEIA	anafilaxia inducida por ejercicio físico dependiente del trigo

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1 TRASTORNOS RELACIONADOS CON EL GLUTEN: La diferencia entre alergias, reacciones autoinmunes e intolerancias

Las **reacciones adversas a alimentos (RAA)** son un problema creciente que afecta tanto a la población adulta como a la infantil. Las RAA se definen como la respuesta clínica anormal producida tras la ingesta, contacto o inhalación de un alimento o componente alimentario.

Entre las **RAA destacan los trastornos relacionados con el gluten (TRG)**, que como su propio nombre indica se desencadenan tras la exposición al gluten y afectan aproximadamente al 5% de la población mundial (Elli et al., 2015).

En el espectro de las **TRG se incluyen la enfermedad celíaca (EC), la alergia al trigo (AT) y la sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC)**, las cuales se pueden diferenciar por su patogenia (Bascuñán et al., 2018; Biesiekierski, 2017; Cabanillas, 2020; Elli et al., 2015).

La **AT** es una reacción inmunológica que se da frente a las proteínas de trigo, entre ellas el gluten, que afecta en torno al 0,4-3% de los adultos y al 2-9% en niños dependiendo de la región. La respuesta inmunitaria de la AT puede ser de dos tipos dependiendo si es mediada o no por IgE (Bascuñán et al., 2018; Cabanillas, 2020; Elli et al., 2015; Inomata, 2009).

La AT mediada por IgE puede manifestarse de forma clásica, a través de síntomas gastrointestinales, dérmicos, respiratorios, circulatorios o cerebrales tras la ingesta, contacto físico o inhalación del trigo, o de algunas formas especiales, como la denominada asma del panadero (asma por exposición a harina), en la que los pulmones se ven afectados y puede faltar la respiración, o la anafilaxia inducida por ejercicio físico dependiente del trigo (del inglés *WDEIA* o *wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis*), en la cual la reacción alérgica se da al realizar ejercicio físico intenso tras el consumo de productos con gluten. La aparición de la sintomatología y la gravedad de la AT IgE mediada es variable, puede tardar de minutos a horas en aparecer y los síntomas pueden llegar a ser mortales. La AT no mediada por IgE se relaciona con la esofagitis eosinofílica (EOE) o gastritis eosinofílica (GE). Se manifiesta a través de síntomas gastrointestinales y extraintestinales que pueden tardar en aparecer desde horas hasta días tras la ingesta. El diagnóstico de las alergias suele realizarse a través de pruebas de punción cutánea (SPT, *skin prick test*, por sus siglas en inglés) y la medición de IgE total y específica frente al alérgeno en cuestión. Sin embargo, la exactitud diagnóstica mostrada por dichas pruebas SPT e diagnóstico *in*

vitro (IVD por sus siglas en inglés) para la AT es insatisfactoria. Actualmente, el tratamiento para la AT no WDEIA consiste en evitar los productos derivados del trigo. Mientras tanto, la estrategia principal para la prevención de la WDEIA es evitar el ejercicio durante aproximadamente 4 h después de la ingesta de trigo (Bascuñán et al., 2018; Cabanillas, 2020; Elli et al., 2015; Inomata, 2009; Taraghihah et al., 2020).

La **EC**, es una enfermedad de base autoinmune provocada por la ingesta de gluten en personas que tienen una determinada predisposición genética. Afecta aproximadamente al 1% de la población, aunque su prevalencia varía en dependencia de la edad y región. Ciertos péptidos derivados del gluten provocan una reacción inmunitaria mediada por células T y la transglutaminasa tisular (tTG), una enzima de la matriz extracelular, causando daños en la mucosa gastrointestinal y que, finalmente acaba con la atrofia de las vellosidades intestinales en los EC. El cuadro clínico de la EC es heterogéneo, conformado por diversos síntomas gastrointestinales (GI) y extraintestinales (EI), que cada enfermo manifestará de forma única. Generalmente el diagnóstico de la EC, se basa en pruebas serológicas para la detección de anticuerpos específicos de la EC, como la anti transglutaminasa tisular (anti-tTG), los anticuerpos anti endomisio (anti-EMA) o anti gliadina deamidada (anti-DGP), seguida de una biopsia GI en adultos. Por el momento, el único tratamiento disponible para la EC es realizar una dieta sin gluten (DSG) de por vida (Bascuñán et al., 2018; Cabanillas, 2020; Elli et al., 2015; Lebwohl et al., 2018; Lindfors et al., 2019).

Finalmente, la **SGNC** se define como "un síndrome caracterizado por síntomas intestinales y extraintestinales relacionados con la ingestión de alimentos que contienen gluten, en sujetos que no tienen EC ni AT. Hoy en día se desconoce la patogénesis de la SGNC, aunque se sabe que es multifactorial y que el sistema inmunitario innato juega un papel dominante. Asimismo, también se ha demostrado que otros componentes del trigo distintos del gluten, como los Oligo-Di-Monosacáridos y Polioles Fermentables (carbohidratos de cadena corta y alcoholes relacionados, que son mal absorbidos en el intestino delgado, conocidos como FODMAP por las siglas en inglés) y los inhibidores de la amilasa y la tripsina (ATI), podrían actuar como desencadenantes de algunas manifestaciones clínicas. Se estima que esta dolencia afecta entre el 0,49% y el 14,9% de la población mundial. Establecer una prevalencia exacta es difícil debido a que actualmente no existe un biomarcador con la suficiente precisión para el diagnóstico de esta afección. Para identificar a los pacientes con SGNC, primero habrá que descartar la AT y EC, y tras ello realizar una evaluación clínica del paciente mientras se somete a una prueba de estimulación con gluten a doble

ciego. El tratamiento para la SGNC es también una DSG, aunque queda esclarecer si, al igual que en la EC, sería necesaria realizarla de por vida. Aunque tras la implantación de una DSG se reduzcan eficazmente las manifestaciones clínicas, algunos pacientes con SGNC siguen presentando síntomas a pesar de seguir una DSG estricta. Una dieta baja en FODMAP puede reducir la puntuación de los síntomas (Bascuñán et al., 2018; Cabanillas, 2020; Cárdenas-Torres et al., 2021; Catassi et al., 2015; Elli et al., 2015).

Aunque la patogénesis de los TRG es distinta, la similitud en algunas manifestaciones clínicas puede dificultar su diagnóstico diferencial. Por tanto, comprender las presentaciones clínicas y la etiología de cada una de ellas es fundamental para desarrollar pruebas de diagnóstico adecuadas y proponer tratamientos.

2 ENFERMEDAD CELÍACA

“Enteropatía inflamatoria crónica del intestino delgado inmunomediada causada por la ingesta de gluten en individuos genéticamente predispuestos” es la definición consensuada para describir la enfermedad celiaca (Ludvigsson et al., 2013).

2.1 CONTEXTO HISTÓRICO

La primera descripción de la enfermedad celíaca es atribuida al médico Aretaeus de Capadocia en el siglo II AC, quien dio nombre y describió la enfermedad. Para nombrarla usó la palabra griega “κοιλιακος”, en alfabeto latino “koiliakos” y del que procede el término “celiaco”. Esta palabra hace referencia al abdomen, puesto que caracterizó a los enfermos como “*el que padece del intestino*” cuyos síntomas se resolvían con el ayuno (Lewkonia, 1974).

No obstante, hubo que esperar hasta el año 1888 para que la EC se describiera en conceptos más modernos y despertara interés en la comunidad científica. Esta descripción fue realizada por el prestigioso patólogo inglés Samuel Gee, quien describió la EC como una enfermedad que afectaba mayormente a la población infantil, de origen complejo y con una forma de presentación clínica variable. A pesar de ello, sospechaba que este trastorno debía estar estrechamente relacionado con la dieta y el intestino. En el año 1950 William Dicke, un pediatra holandés, demostró que la eliminación de ciertos cereales (trigo, el centeno y la avena) de la dieta mejoraba la condición clínica de estos enfermos y cuatro años más tarde, en el 1954, patólogo inglés Julian Paulley, describió la afectación intestinal como una atrofia de la mucosa intestinal (Burki, 2019; Lewkonia, 1974).

Desde entonces se han realizado miles de estudios para comprender los patrones, las causas y el control de esta enfermedad, quedando establecido que el único tratamiento eficaz y vigente hasta la actualidad, es una dieta libre de gluten, mantenida estrictamente y de por vida.

2.2 INCIDENCIA Y PREVALENCIA

La incidencia de la EC parece tener una tendencia ascendente con el tiempo en distintas regiones del mundo. El análisis sistemático y metaanálisis llevado a cabo por *King et al.*, 2020, en el que se incluyeron estudios desde 1950 a 2017, demostró que la **incidencia de la EC aumentó un 7,5%** (IC95%: 5,8-9,3%) **de forma anual** en este periodo (King et al., 2020). Aunque no hay certeza sobre los motivos reales de este incremento, no cabe duda de que una mayor concienciación de la población y profesionales sanitarios sobre la EC, junto con la mejora en las herramientas de diagnóstico han sido determinantes (Al-Toma et al., 2019; Bai & Ciacci, 2017).

El aumento de la incidencia tiene un efecto directo sobre la prevalencia de la enfermedad. La **prevalencia global actual de la EC** confirmada por biopsia se estima en un 0,7%, mientras que el diagnóstico basado en serología lo sitúa en el 1,4% (Singh et al., 2018). Probablemente, la prevalencia real se encuentre entre estas dos cifras, ya que las limitaciones propias de cada herramienta de diagnóstico pueden llevar a la sub- o sobrestimación de la enfermedad (Lebwohl & Rubio-Tapia, 2021).

La **incidencia** y por consiguiente la **prevalencia**, parecen mostrar **diferencias entre regiones geográficas, etnias, género y edad**.

Por ejemplo, en el metaanálisis llevado a cabo por Singh et al., 2018, clasificaron los países en cuatro percentiles según la prevalencia de la EC (0-25, 26-50, 51-75, y 76-100, de menor a mayor), dejando en evidencia las disparidades entre **áreas geográficas**. La seroprevalencia quedó comprendida entre el 0,2-0,8% y 2,1%-8,5%, para el primer y cuarto percentil respectivamente, mientras que la prevalencia por biopsia se situó entre el 0,2-0,4% y 0,9%-2,4% (Singh et al., 2018).

Asimismo, datos como los concluidos de las Encuestas Nacionales de Examen de Salud y Nutrición (NHANES) que se llevan a cabo en Estados Unidos, evidencian diferencias en de la enfermedad celíaca entre las **etnias**. Específicamente, en este estudio transversal se demostró que la seroprevalencia de la EC era menos frecuente en individuos estadounidenses negros no hispanos (0,2%) e hispanos (0,3%) que en los blancos (1,0%) (Choung et al., 2015).

A pesar de que la EC puede desarrollarse a cualquier **edad**, incluso en la etapa geriátrica, estudios recientes de cohortes han mostrado que la mayoría de los casos de EC se desarrollan antes de los 10 años (Andrén Aronsson et al., 2019; Catassi et al., 2010; Collin et al., 2018; Liu, E., Dong, F., Barón, A. E., Taki, I., Norris, J. M., Frohnert, B. I., Hoffenberg, E. J., & Rewers, 2017).

Con respecto al **género**, según publicaciones recientes, la incidencia global de EC es generalmente mayor en mujeres que en hombres (17 vs. 7,8 por 100.000 personas/año). No obstante, es posible que las cifras estén infraestimadas en hombres debido a que son menos propensos a realizarse pruebas diagnósticas (King et al., 2020).

2.3 PATOGÉNESIS Y RESPUESTA INMUNITARIA

La patogénesis es el proceso por el cual se describe el origen y desarrollo de una enfermedad con todos los factores que están involucrados en ella. En el caso de la EC incluye los **factores ambientales, genéticos e inmunológicos** que se describen a continuación:

2.3.1 Factores genéticos

El hecho de que se observe una prevalencia mayor de la enfermedad entre los familiares de primer grado de EC (FPR-EC) frente a la de la población general, un 2,6%-12,6% frente a un 1-2% respectivamente, evidencia la influencia del componente genético en el desarrollo de esta enfermedad (Singh et al., 2015).

A fecha de hoy, se ha descubierto que casi la totalidad de los EC son portadores de ciertos **genes específicos para la expresión del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II** (Espino & Núñez, 2021; Karnes et al., 2017; Lebwohl et al., 2018; Lindfors et al., 2019).

Los HLA son proteínas que se expresan en la superficie en células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés) y se encargan de presentar antígenos al receptor de células T (TCR). Hecho que permite al sistema inmune diferenciar lo propio de lo ajeno y dar una respuesta a aquello que es potencialmente infectivo. Sin embargo, en el caso de los EC, los péptidos del gluten son los presentados como ajenos y los que estimulan, por tanto, la respuesta inmune (Espino & Núñez, 2021; Gualandris, F., Castellani, L., Falanga, 2021; Lebwohl et al., 2018; Lindfors et al., 2019; Pishesha et al., 2022).

Los HLA expresados por los EC, también conocidos como HLA-DQ, son proteínas heterodiméricas compuestas por una cadena α (de 32-34 kD) y/u otra cadena β (de 29-32 kD) (Figura 1.1) (Gualandris, F., Castellani, L., Falanga, 2021).

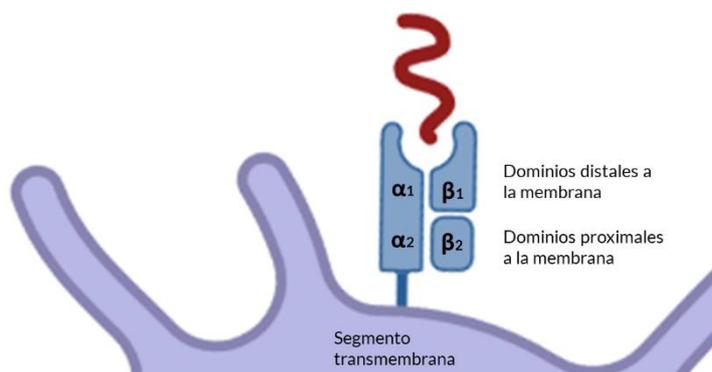


Figura 1.1. Estructura de la molécula HLA tipo II.

Cada cadena es codificada por los genes HLA-DQA1 y/o HLA-DQB1, respectivamente. Debido a la existencia de más de un alelo para la codificación de estos genes, y las múltiples posibilidades de combinación de estos en distintos haplotipos, existen **distintos heterodímeros o isoformas HLA-DQ asociados a EC** (Tabla 1.1). No obstante, **no todos aparecen con la misma frecuencia, ni confieren la misma inmunoadividad en los celíacos** (Brown et al., 2019; Espino & Núñez, 2021; Gualandris, F., Castellani, L., Falanga, 2021; Núñez et al., 2018).

Tabla 1.1. Haplotipos de HLA-DQ más habituales en la enfermedad celiaca y los alelos que lo conforman.

Haplotipo	Alelo cadena alpha	y/o	Alelo cadena beta	Frecuencia
DQ2.2	DQA1*02:01	y	DQB1*02:01	< 1%
DQ2.5	DQA1*05	y	DQB1*02	90-95%
DQ7.5	DQA1*05:05	y	DQB1*03:01	< 1%
DQ8	DQA1*03:01	y	DQB1*03:02	5-10%
Medio DQ 2	DQA1*05	o	DQB1*02	< 1%

Entre el 90-95% de los EC son portadores de HLA-DQ2.5 y casi la mayoría del resto, portadores del HLA-DQ8. Otros haplotipos como el DQ2.2, DQ7.5 o medio DQ2 también se asocian a la EC pero con una menor frecuencia (<1%)(Espino & Núñez, 2021; Gualandris, F., Castellani, L., Falanga, 2021).

Estos haplotipos se pueden heredar en el mismo cromosoma (configuración *cis*) o en distintos cromosomas (*trans*) (Brown et al., 2019; Espino & Núñez, 2021; Gualandris, F., Castellani, L., Falanga, 2021; Núñez et al., 2018). La presencia en homocigosis del DQ2.5 (con dos copias del alelo HLA-DQB1*02) conlleva un mayor riesgo de padecer EC, hasta el 30%, frente al 3% de riesgo que supone el genotipo heterocigoto (una copia del alelo HLA-DQB1*02) o ser homocigoto HLA-DQ8 (Brown et al., 2019; Espino & Núñez, 2021; Gualandris, F., Castellani, L., Falanga, 2021).

No obstante, la presencia de los haplotipos arriba mencionados (Tabla 1.1) es una condición necesaria pero no suficiente para el desarrollo de la EC. En efecto, el 40% de la población de América, Europa y el sudeste asiático es portadora de haplotipos, frente al 1% que lo desarrolla. Se conoce que los haplotipos HLA contribuyen al 40% del riesgo genético de padecer la enfermedad (Brown et al., 2019; Espino & Núñez, 2021; Lebwohl et al., 2018; Lindfors et al., 2019; Núñez et al., 2018).

Otras regiones genómicas no-HLA que se han asociado a la EC parecen explicar la susceptibilidad genética. Los Estudios de Asociación de todo el Genoma (*Genome-wide association study*, GWAS) indican fuertes asociaciones con las regiones COELIAC2 (5q31-33), COELIAC3 (2q32) y COELIAC4 (19p13.1), que codifican citoquinas relacionadas con la respuesta Th2 e interleuquinas, moléculas co-estimuladoras CTLA4 y CD28 en las células T activadas y distintas variantes del gen de la miosina IXB que dan lugar a la alteración de la remodelación epitelial, respectivamente (Amundsen et al., 2006; Fasano & Shea-Donohue, 2005).

2.3.2 Factores ambientales:

2.3.2.1 El gluten

El gluten es el principal factor ambiental implicado en el desarrollo de la EC (Lebwohl et al., 2018; Lindfors et al., 2019).

2.3.2.1.1 Definición

Se conoce popularmente como gluten **la compleja mezcla de cientos de proteínas de almacenamiento de cereales como el trigo**, el centeno, la cebada y la avena, que generan respuestas inmunogénicas a personas con TRC. No obstante, el término científico correcto para estas proteínas de almacenamiento es “**prolamina(s)**”, tomando nombres específicos dependiendo del cereal en que se encuentren. En el trigo destacan las **gliadinas y gluteninas** por su abundancia, la secalina en el centeno, la hordeína en la cebada y las aveninas en la avena (Chaudhry et al., 2021; P. Shewry, 2019; CODEX STAN 118 - 1979, 2008; Wieser, 2007). Dentro de las prolaminas también se engloban proteínas de almacenamiento de otros cereales como el maíz o arroz, que no se consideran dañinos para los TRC y, por tanto, quedarían fuera del término gluten.

2.3.2.1.2 Clasificación

Las prolaminas son polipéptidos heterogéneos con masas moleculares desde 10 hasta más de 100KDa. Estas pueden clasificarse de diversas formas, en base a su **solubilidad** en

distintos disolventes, a la riqueza en puentes disulfuro, entre **monoméricas y poliméricas** o en dependencia de su **tamaño** (Tapia-Hernández et al., 2019; Wieser, 2007; Wieser et al., 2023).

Tradicionalmente estas proteínas se han catalogado en base a su extracción en una serie de disolventes: siendo las gliadinas solubles en soluciones de alcohol-agua al 60-70% y las gluteninas, sólo en condiciones alcalinas extremas (Tapia-Hernández et al., 2019; Wieser, 2007; Wieser et al., 2023).

Las gliadinas (10-180 KDa) son proteínas monoméricas que reciben una subclasificación según su peso molecular y secuencia de aminoácidos (aa). Existen las $\alpha+\beta$ -, ω -, y γ -gliadinas. De ellas, todas excepto las ω -gliadinas son ricas en puentes disulfuro y de bajo peso molecular (LMW) (Tapia-Hernández et al., 2019; Wieser et al., 2023).

Las gluteninas son las proteínas poliméricas más grandes en la naturaleza (100-10.000KDa) y contienen dos subunidades: subunidades de glutenina de bajo peso molecular (SG-BPM, en inglés, LMW-GS) y de alto peso molecular (SG-APM, en inglés, HMW-GS) (Wieser, 2007; Wieser et al., 2023).

2.3.2.1.3 Importancia en la dieta e industria alimentaria

Los cereales con “gluten”, en especial el trigo, han sido algunos de los cultivos más extendidos en el mundo debido a su fácil cosecha por la adaptación a cualquier tipo de suelo y/o clima. Este hecho, junto con su fácil almacenamiento, utilidad como fuente de energética y proteica y la factibilidad de poder consumirlo de muchas formas (productos derivados de la harina y/o sémola, como el pan, la cerveza o la pasta), han convertido a los productos derivados de estos **cereales en alimentos básicos** en la dieta humana (Bilgic et al., 2016; de Sousa et al., 2021). Se estima que la ingesta media diaria de gluten en una dieta occidental oscila entre 5 y 20 g/día, de los 1,5-2 kg de alimentos diarios consumidos (Biesiekierski, 2017; Cohen et al., 2019; Lindfors et al., 2019).

Actualmente, el gluten ha adquirido un protagonismo aún mayor en la dieta. Es el **segundo aditivo más usado por la industria** alimentaria, además de ser usado en otras industrias como la cosmética o farmacéutica, debido a las múltiples propiedades que ofrece a un bajo coste (Biesiekierski, 2017; Lindfors et al., 2019; Song et al., 2021; Wieser, 2007). La ubicuidad del gluten solo es comparable a la del azúcar en la vida cotidiana.

Son las inusuales propiedades reológicas y funcionales del gluten, como su propiedad gelificante, emulgente, de absorción de agua, cohesividad, viscoelástica o de esponjosidad,

las valoradas por la industria alimentaria y la cocina doméstica o artesana. Estas cualidades se obtienen al mezclar estas proteínas con agua y dependen en gran parte de las secuencias tan características de sus proteínas (P. R. Shewry et al., 2002; Song et al., 2021; Tapia-Hernández et al., 2019; Wieser, 2007; Wieser et al., 2023).

2.3.2.1.4 Péptidos inmunológicos e inmunogénicos derivados del gluten

La **composición aminoacídica** de las prolaminas es particular. Predominan relativamente pocos aa, siendo la **prolina (P)** y la **glutamina (Q)** los más abundantes ya que juntos configuran más del 70% de los residuos aminoacídicos presentes en el gluten (Shan et al., 2002; Wieser, 2007; Wieser et al., 2023). El elevado contenido en estos aminoácidos hidrofóbicos confiere estas características tan apreciadas por la industria alimentaria, pero a su vez son las responsables de que estas proteínas creen estructuras muy compactas resistentes a la digestión proteolítica de las enzimas gástricas, pancreáticas e intestinales. En resumen, esta característica confiere a muchas de estas estructuras la particularidad de ser altamente **resistentes a la degradación** de enzimas humanas (Lindfors et al., 2019; Mamone et al., 2023; Schalk et al., 2017; Shan et al., 2002, 2005; Wieser et al., 2023).

Algunos de estos **péptidos generados tras la digestión** del gluten (PDG), predominantemente los derivados de la gliadina, son capaces de generar una **respuesta inmunitaria** en EC una vez absorbidos. Ciccocioppo et al., 2005, sugirieron dividir los PDG en dos grupos dependiendo si activan la respuesta inmune innata o adaptativa: **péptidos inmunotóxicos o inmunogénicos del gluten** respectivamente. Los péptidos inmunotóxicos serían aquellos con un efecto directo sobre el epitelio intestinal, mientras que los péptidos inmunogénicos del gluten (también conocidos como GIP por sus siglas en inglés, *Gluten Immunogenic Peptides*) serían aquellos que activen los linfocitos T CD4+ de la lámina propia (Ciccocioppo et al., 2005).

Los péptidos clasificados como **GIP** son mucho más abundantes y perjudiciales para la EC. Durante las últimas décadas, se han realizado esfuerzos considerables para **mapear los motivos inmunogénicos celíacos**, un trabajo que, de vez en cuando, se actualiza para añadir nuevas secuencias inmunogénicas del gluten a los cientos de secuencias ya descritas (Tabla 1.2)(Sollid et al., 2020).

Tabla 1.2. Péptidos del gluten identificados con relevancia en la patogenia de la enfermedad celíaca. Modificado según Sollid et al., 2020, habiendo añadido los péptidos descritos por Chlubnová et al., 2023 (Chlubnová et al., 2023; Sollid et al., 2020).

Nombre epítopo	Elemento de restricción HLA	Proteína de origen	Secuencia del péptido	Referencias
DQ2.5-glia-α1a	DQ2.5	glia α1a	PFPQPELPY	(Arentz-Hansen et al., 2000)
DQ2.5-glia-α1b	DQ2.5	glia α1b	PYPQPELPY	(Arentz-Hansen et al., 2002)
DQ2.5-glia-α2	DQ2.5	glia α2	PQPELPYPQ	(Arentz-Hansen et al., 2000)
DQ2.5-glia-α3	DQ2.5	glia α3	FRPEQPYPQ	(W. Vader et al., 2002)
DQ2.5-glia-α4	DQ2.5	glia α4	PQPEQPYPQ	(Chlubnová et al., 2023)
DQ2.5-glia-α5	DQ2.5	glia α5	PQPEYPQPQ	(Chlubnová et al., 2023)
DQ2.5-glia-γ1	DQ2.5	glia γ1	PQPSFPEQQ	(Sjöström et al., 1998)
DQ2.5-glia-γ2	DQ2.5	glia γ2	IQPEQPAQL	(S.-W. Qiao et al., 2005; W. Vader et al., 2002)
DQ2.5-glia-γ3	DQ2.5	glia γ3	QQPEQPYPQ	(Arentz-Hansen et al., 2002)
DQ2.5-glia-γ4a	DQ2.5	glia γ4a	SQPEQEFPPQ	(Arentz-Hansen et al., 2002)
DQ2.5-glia-γ4b	DQ2.5	glia γ4b	PQPEQEFPPQ	(S.-W. Qiao et al., 2005)
DQ2.5-glia-γ4c	DQ2.5	glia γ4c	QQPEQPFPQ	(Arentz-Hansen et al., 2002)
DQ2.5-glia-γ4d	DQ2.5	glia γ4d	PQPEQPFPQ	(S. W. Qiao & Sollid, 2019)
DQ2.5-glia-γ4e	DQ2.5	glia γ4e	LQPEQPFPQ	(S. W. Qiao & Sollid, 2019)
DQ2.5-glia-γ4f	DQ2.5	glia γ4f	PQPEQELPQ	(Chlubnová et al., 2023)
DQ2.5-glia-γ5	DQ2.5	glia γ5	QQPFPEQPQ	(Arentz-Hansen et al., 2002)
DQ2.5-glia-γ6	DQ2.5	glia γ6	PFQPEQEL	(Chlubnová et al., 2023)
DQ2.5-glia-ω1	DQ2.5	glia ω1	PFPQPEQPF	(Tye-Din et al., 2010)
DQ2.5-glia-ω11	DQ2.5	glia ω11	PQPEQPFPW	(Tye-Din et al., 2010)
DQ2.5-glia-ω3	DQ2.5	glia ω3	PFPEQPYPE	(Chlubnová et al., 2023)
DQ2.5-glut-L1	DQ2.5	glut L1	PFSEQEQPV	(W. Vader et al., 2002)
DQ2.5-glut-L2	DQ2.5	glut L2	FSQQQESPF	(Stepniak et al., 2005; W. Vader et al., 2002)
DQ2.5-hor-1	DQ2.5	hor 1	PFPQPEQPF	(Tye-Din et al., 2010; L. W. Vader et al., 2003)
DQ2.5-hor-2	DQ2.5	hor 2	PQPEQPFPQ	(L. W. Vader et al., 2003)
DQ2.5-hor-3a	DQ2.5	hor 3a	PIPEQPQPYPY	(Tye-Din et al., 2010)
DQ2.5-hor-3b	DQ2.5	hor 3b	PYPEQPQPYPY	(Hardy et al., 2015)
DQ2.5-sec-1	DQ2.5	sec 1	PFPQPEQPF	(Tye-Din et al., 2010; L. W. Vader et al., 2003)
DQ2.5-sec-2	DQ2.5	sec 2	PQPEQPFPQ	(L. W. Vader et al., 2003)
DQ2.5-sec-3	DQ2.5	sec 3	PFPEQPEQI	(Hardy et al., 2015)
DQ2.5-ave-1a	DQ2.5	ave 1a	PYPEQEEPF	(Arentz-Hansen et al., 2004; L. W. Vader et al., 2003)
DQ2.5-ave-1b	DQ2.5	ave 1b	PYPEQEPPF	(Arentz-Hansen et al., 2004; L. W. Vader et al., 2003)
DQ2.5-ave-1c	DQ2.5	ave 1c	PYPEQEQQPI	(Hardy et al., 2015)
DQ2.2-glut-L1	DQ2.2	glut L1	PFSEQEQPV	(Bodd et al., 2012)
DQ2.2-glut-α1	DQ2.2	glut α1	QGSVQPQQL	(Dørum et al., 2014)
DQ2.2-glut-α2	DQ2.2	glut α2	QYSQPEQQPI	(Dørum et al., 2014)
DQ8-glia-α1	DQ8	glia α1	EGSFQPSQE	(Van De Wal et al., 1998)
DQ8-glia-γ1a	DQ8	glia γ1a	EQPQQPFPQ	(Tollefsen et al., 2006)
DQ8-glia-γ1b	DQ8	glia γ1b	EQPQQPYPE	(Tollefsen et al., 2006)
DQ8-glia-γ2	DQ8	glia γ2	EQPQQPYPE	(Petersen et al., 2016)
DQ8-glut-H1	DQ8	glut H1	QGYYPSTSPQ	(Van De Wal et al., 1999)
DQ8.5-glia-α1	DQ8.5	glia α1	EGSFQPSQE	(Kooy-Winkelaar et al., 2011)
DQ8.5-glia-γ1	DQ8.5	glia γ1	PQQSFPEQE	(Kooy-Winkelaar et al., 2011)

La inmunogenicidad de cada tipo de GIP podría ser variable en función de la especificidad y las repeticiones de los epítomos inmunógenos activantes de células T que contienen. Esta cantidad puede variar fácilmente en función de la fuente de gluten de donde se origina el péptido (Lindfors et al., 2019). El péptido 33-mer de la α -2-gladina es reconocido como el péptido de gluten inmunodominante, debido a que contiene seis epítomos parcialmente superpuestos y potencialmente dañinos (activadores de células T): una copia de PFPQPQLPY (DQ2.5-glia- α 1a), dos copias del PYPQPQLPY (DQ2.5-glia- α 1b) y tres copias del PQPQLPYPQ (DQ2.5-glia- α 2 (Schalk et al., 2017).

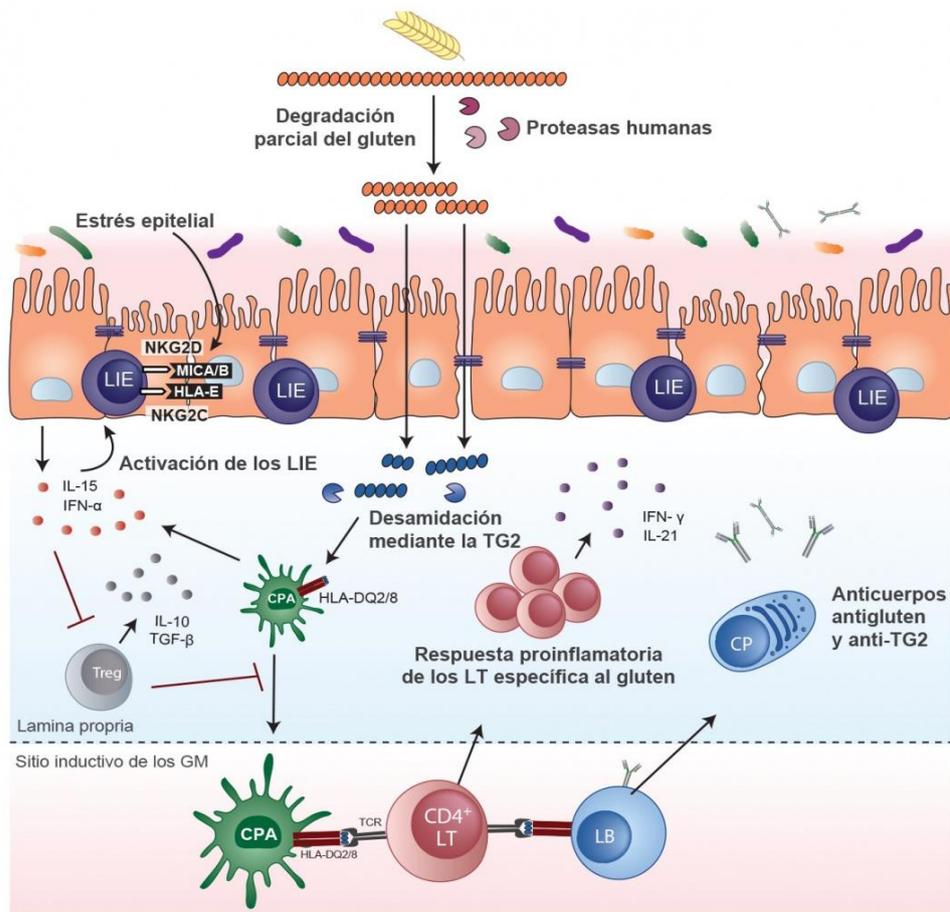
2.3.2.2 Otros factores ambientales

La ingesta de gluten y los genes HLA son requisitos indispensables para el desarrollo de la EC. Sin embargo, a pesar de que el 40% de la población europea y norteamericana los tenga, y casi el 100% de ésta consume gluten en su dieta, sólo el 1% acaba desarrollando la enfermedad. Por ello, deben existir otros factores que disminuyen el hecho de padecer esta enfermedad (Lebwohl et al., 2018; Lindfors et al., 2019).

El tipo de lactancia recibida, algunas prácticas de alimentación infantil, la estación de año en el que tiene lugar el parto, el parto por cesárea, el padecimiento de algunas infecciones GI, como el rotavirus o campylobacter, el hábito tabáquico, la toma de algunos antibióticos e inhibidores de bombas de protones han sido descritos como factores de riesgo al desarrollo de la EC. Asimismo, el microbioma también podría jugar un papel crucial para el desarrollo de la enfermedad celíaca (Lebwohl et al., 2018; Lebwohl & Rubio-Tapia, 2021; Ludvigsson & Murray, 2019).

2.3.3 Respuesta inmunitaria

La patogenia de la enfermedad celíaca es compleja debido a que intervienen múltiples factores que actúan además a través de diferentes vías. La Figura 1.2 trata de representar los principales factores de esta respuesta:



LIE: linfocitos intraepiteliales; CPA: célula presentadora de los antígenos; LT: linfocitos T; LB: linfocitosB; GM: ganglios mesentéricos; TG: transglutaminasas; CP: célula plasmática

Figura 1.2. Fisiopatología de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa de la EC, donde los péptidos inmunotóxicos e inmunogénicos (GIP) del gluten activan los linfocitos intraepiteliales (LIE) y los linfocitos T específicos del gluten. Adaptado de (Tye-Din et al., 2018).

2.3.3.1 Tránsito de los péptidos del gluten del lumen a la lámina propia

Los péptidos del gluten pueden llegar del lumen (dominio apical) a la lámina propia (dominio basal) por dos vías: la ruta paracelular (entre las uniones estrechas de las células epiteliales intestinales) y la transcelular (a través de las células epiteliales del intestino). Ambas rutas, además, se ven potenciadas por la ingesta de gluten en los EC (Gujral et al., 2012; Lebwohl et al., 2018; Lindfors et al., 2019; Tye-Din et al., 2018).

Por un lado, se ha demostrado que la gliadina puede producir una liberación de zonulina, una molécula que desensambla las uniones estrechas intercelulares de las células epiteliales intestinales aumentando de forma inmediata y transitoria la permeabilidad paracelular (Clemente et al., 2003; Fasano et al., 2000; Lammers et al., 2008).

Por otro lado, existe evidencia científica de que el gluten puede transferirse a la lámina propia por la vía transcelular durante la fase aguda de la enfermedad celíaca. Este acontecimiento se debe a que en esta fase el receptor de transferrina CD71, que

normalmente se expresa en la cara basolateral de los enterocitos, se sobre expresa en la cara apical del epitelio intestinal, conduciendo a una retrotranscitosi a la lámina propia de los péptidos de que se encuentran formando complejos con la IgA secretora (Gujral et al., 2012; Heyman et al., 2012; Schumann et al., 2008).

2.3.3.2 Inmunidad innata

El factor de activación de la respuesta innata en la EC es controvertido, puesto que existen una **serie de factores** que podrían causar el estrés necesario para que las células dendríticas y/o epiteliales intestinales desencadenarán la respuesta inmunitaria, entre ellos se incluyen (Lindfors et al., 2019; Zevallos et al., 2017):

- Los **péptidos inmunotóxicos** del gluten como el P31-43.
- **Infecciones entéricas**, incluidos los patógenos víricos y bacterianos (por ejemplo, rotavirus o campylobacter).
- Cambios postinfecciosos o inflamatorios en la **microbiota**.
- Los **ATI**, como aquellos presentes en el trigo, pero en una fracción distinta al gluten. Sin embargo, aún no se ha determinado la relevancia clínica de las ATI en la EC.

El estrés induciría a células dendríticas y/o epiteliales intestinales a un aumento en la expresión de **citoquinas proinflamatorias** comenzando una respuesta bioquímica en **cascada**. Los mensajeros químicos como las interleuquinas (IL) IL-15, IL-8 e interferones (IFN) de tipo I toman especial relevancia en la respuesta inmunitaria innata de la EC. Asimismo, también induciría a la expresión de las **moléculas MIC y HLA-E en las células epiteliales intestinales** (Caio et al., 2019; Lindfors et al., 2019; Tye-Din et al., 2018).

La IL-15 es conocida por contribuir al desarrollo de la enfermedad de múltiples maneras, por ejemplo, a través de la inhibición de los efectos reguladores de las células T CD4+ (Treg), autorizando a los linfocitos intraepiteliales (LIE) a destruir las células epiteliales intestinales. Esta respuesta se conoce como **linfocitosis intraepitelial**, muy característica de la respuesta innata en la EC (Abadie & Jabri, 2014; Mention et al., 2003). Esta autorización se da a través de la inducción de la expresión de los receptores NKG2D y NKG2C en los LIE, los cuales se unirán a las moléculas MIC y HLA-E de las células epiteliales, resultando en su apoptosis (Hüe et al., 2004; Meresse et al., 2004).

La IL-8 activa neutrófilos y actúa como quimioatrayente, iniciando la cascada que causará, entre otras, la enteropatía en el intestino delgado (Jelínková et al., 2004).

Al final toda esta respuesta en cascada, son el enlace entre la inmunidad adaptativa e innata.

2.3.3.3 Inmunidad adaptativa

La respuesta inmune adaptativa es consecuencia de la **activación de las TCD4+ mediada por una interacción específica con GIP**.

Los GIP son presentados a las TCD4+ a través de las moléculas HLA-DQ2/DQ-8 de las APC (Espino & Núñez, 2021; Lebwohl et al., 2018; Lindfors et al., 2019). Las APC incluyen células dendríticas, macrófagos, enterocitos y células B. Los GIP, por su parte, pueden presentarse de forma “natural” o desaminada, siendo esta última más inmunogénica, debido a que los HLA presentan mayor afinidad por los GIP desaminados. La desaminación de los GIP, por la que se modifican ciertos residuos de glutamina a ácido glutámico, es llevada a cabo por la enzima transglutaminasa (TG2). La TG2 tiene preferencia por los sitios QxP (donde x, puede ser cualquier aminoácido), muy frecuentes y característicos de las gliadinas (Caio et al., 2019; Lebwohl et al., 2018; Lindfors et al., 2019; Tye-Din et al., 2018).

Los TCD4+ reconocen a los GIP a través de los receptores de tipo Toll (Toll-like receptors, TLRs). Dicho reconocimiento, acarreará dos respuestas principales. Por un lado, **activará la proliferación de TCD4+ y la expresión de ciertas citoquinas proinflamatorias** como la IL-21 o INF- γ , que generarán **inflamación en la lámina propia del intestino delgado** favoreciendo al **daño tisular**. Por otro lado, enviarán señales de ayuda a los **linfocitos B** promoviendo así su activación y diferenciación en células plasmáticas, que **secretan anticuerpos** contra los péptidos de gliadina desaminados (**anti-DGP**), la transglutaminasa tisular (**anti-tTG**) y endomisio (**anti-EMA**). Estos anticuerpos, que se pueden encontrar en circulación por la sangre, **aumentarán la permeabilidad** de la barrera intestinal, permitiendo una entrada aún mayor de los péptidos derivados del gluten (PDG) a la lámina propia (Caio et al., 2019; Lebwohl et al., 2018; Lindfors et al., 2019; Tye-Din et al., 2018).

Todo este cúmulo de respuestas al final se traduce en una lesión intestinal, caracterizada por una linfocitosis intraepitelial que puede acarrear la atrofia de las vellosidades (cuando los LIE inducen la muerte de las células epiteliales intestinales) e hiperplasia de las criptas (inflamación inducida por citoquinas), que se puede expresar a través de una serie de síntomas (Lebwohl et al., 2018; Lindfors et al., 2019).

2.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las principales guías para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad celiaca coinciden en que la presentación de síntomas relacionados con esta condición son el principal motivo para derivar al paciente a la realización de pruebas de diagnóstico (Ludvigsson et al., 2013; Raiteri et al., 2022).

La amplia variedad de síntomas a través de los cuales se puede manifestar la EC derivó en una multitud de definiciones para agrupar la expresión de las manifestaciones de la EC. En este sentido, un panel expertos acotó la terminología para clasificar las distintas presentaciones de la EC, éstas se conocen como “las definiciones de Oslo” (Ludvigsson et al., 2013):

- **EC sintomática:** se denomina a aquella forma de presentación en la que se muestran síntomas gastrointestinales y/o síntomas extraintestinales evidentes asociados con la ingesta de gluten (Figura 1.3). En los niños, la diarrea crónica o intermitente es el síntoma GI más común y el retraso del crecimiento y la pérdida de peso, los más comunes (Husby et al., 2020).
- **EC clásica:** se denomina a aquella forma de presentación sintomática relacionada con signos y síntomas de malabsorción como la diarrea crónica, pérdida de peso, anemia ferropénica y otros dependientes de la edad como la osteoporosis en adultos, o vómitos y retrasos en el crecimiento en niños, entre otros.
Se desaconseja el uso de términos como EC típica.
- **EC no clásica:** se denomina como aquella forma de presentación sintomática NO relacionada con signos y síntomas de malabsorción y asociados.
La EC no clásica engloba síntomas como el dolor abdominal, fatiga crónica, estreñimiento crónico, cefaleas, manifestaciones dermatológicas y/o neurológicas, retraso en la pubertad, infertilidad o depresión y ansiedad, entre otros síntomas.
Se desaconseja el uso de términos como EC atípica.
- **EC subclínica:** se denomina como aquella forma de presentación que queda por debajo del umbral clínico de detección. Engloba a aquellos enfermos que no presentan signos o síntomas suficientes, que según las guías clínicas son necesarias, para ser derivados a pruebas de diagnóstico EC en la práctica clínica.
Se desaconseja el uso de los nombres de EC silente o asintomática.
- **EC refractaria:** se caracteriza por la persistencia de sintomatología asociada a la malabsorción y signos de atrofia vellositaria tras el seguimiento de una DSG estricta por más de 12 meses, y en ausencia de otras enfermedades. Se divide en

dos categorías: tipo I, donde la infiltración de linfocitos intraepiteliales es normal y tipo II, donde hay una expansión anormal de linfocitos.

- **EC potencial:** engloba a aquellos pacientes que presentan serología celíaca positiva pero no presentan síntomas, ni alteraciones en la mucosa intestinal y no hay atrofia vellositaria.

Se desaconseja el uso de términos como EC latente.

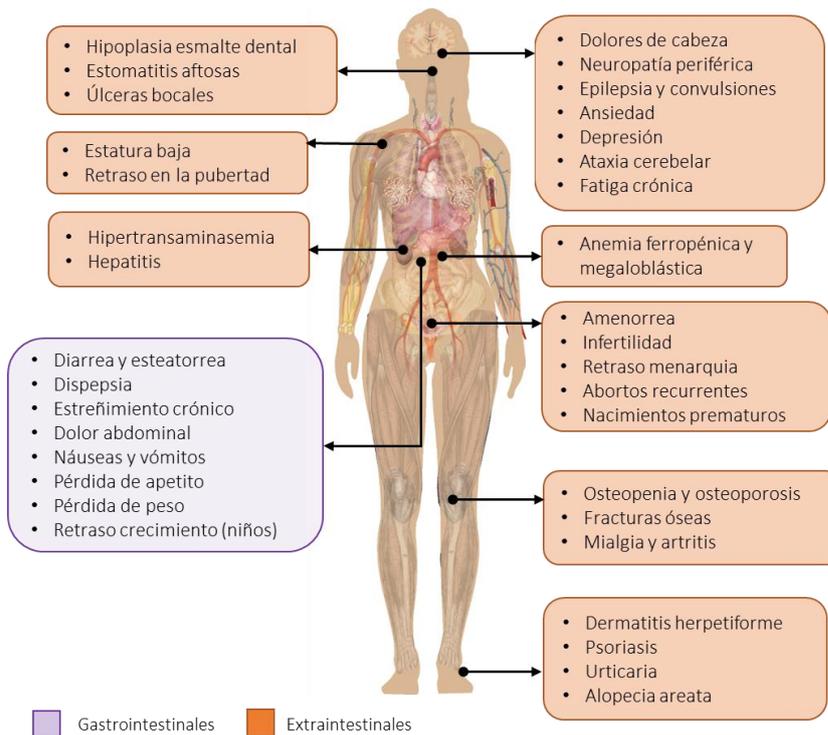


Figura 1.3. Figura modificada de Lindfords et al., 2018, donde se recogen los diversos síntomas asociados a la enfermedad celíaca, divididos por la ubicación de su manifestación: gastrointestinal o extraintestinal (Lindfors et al., 2019).

Tal y como se ha podido observar, la EC se puede manifestar a través de un **amplio espectro de síntomas** que no sólo **varía entre individuos, sino también a lo largo de la vida de un mismo paciente.**

A pesar de esta variabilidad, el número de pacientes diagnosticados con EC ha aumentado en las últimas décadas, especialmente gracias a una mayor concienciación entre los médicos sobre las manifestaciones clínicas amplias y variadas de este trastorno, al desarrollo y la disponibilidad de pruebas de diagnóstico más precisas, además de un aumento de la incidencia de la enfermedad (asociada a factores ambientales como el aumento del consumo de trigo), como ya se ha mencionado anteriormente (Al-Toma et al., 2019; Bai & Ciacci, 2017). No obstante, se estima que entre el **75%-90% de los enfermos celíacos permanecen aún sin diagnóstico**, asimismo es frecuente que se produzcan

retrasos de hasta 4-10 años en el diagnóstico, contando como inicio el debut de la enfermedad (Al-Toma et al., 2019; Fuchs et al., 2014; Husby et al., 2020; Ravikumara et al., 2007; Riznik, De Leo, et al., 2019).

En este sentido las pruebas de diagnóstico han jugado y jugarán un papel clave a la hora de realizar el diagnóstico de la EC debido a que han permitido y permitirán asociar un mayor espectro de síntomas a la EC, así como realizar diagnósticos más tempranos, que evitarán complicaciones a largo plazo y muchas visitas y pruebas médicas improductivas.

2.5 DIAGNÓSTICO

Debido a que no existe una característica diferencial para la EC, su diagnóstico depende de una combinación de varios factores. No obstante, todas las guías actuales coinciden en un **enfoque secuencial** para efectuar el diagnóstico (Al-Toma et al., 2019; Husby et al., 2020; Raiteri et al., 2022).

Primero se ha de tener la **sospecha** de que el paciente pueda sufrir la EC. Para considerarlo sospechoso debe mostrar sintomatología compatible y/o pertenecer a grupos de riesgo. Ser familiar de primer grado de un enfermo celiaco (FPG-EC) o padecer algunas determinadas enfermedades de base genética o autoinmune como son la diabetes mellitus tipo 1 o el síndrome de Down, es considerado ser grupo de riesgo (Al-Toma et al., 2019; Husby et al., 2020; Raiteri et al., 2022).

Frente a la sospecha, se dará comienzo a las **pruebas de diagnóstico**. Las primeras pruebas son las **serológicas**, que tienen como objetivo la detección de anticuerpos específicos que se presentan en la EC activa: los anticuerpos (Ac) anti-tTG, anti-DGP y anti-EMA. Todos ellos, existen en tipo IgA e IgG (Al-Toma et al., 2019; Husby et al., 2020; Raiteri et al., 2022).

La detección de unos sobre otros dependerá del tipo de paciente, la factibilidad y las características diagnósticas de los inmunoensayos para la detección de estos biomarcadores.

Los inmunoensayos para la determinación de anti-tTG-IgA son los más sensibles (98%; IC95:78-100%) pero menos específicos (70%, IC95: 45-95%) debido a que pueden elevarse en otras condiciones como la hipergammaglobulinemia, en enfermedades autoinmunes, en enfermedades hepáticas crónicas o en aquellos con insuficiencia cardiaca congestiva, mientras que los anti-EMA-IgA son los más específicos (99%; IC95: 97-100%). No obstante, se debe tener en cuenta que estos dos tipos de Ac no suelen estar presentes en niños menores de dos años, ni en pacientes con deficiencia de IgA, que representan un

2-3% de la población celiaca. Por ello, en estos contextos, se deberían testar los anti-DGP-IgG (sensibilidad: 80%; IC95: 70–95% y especificidad: 98%; IC95: 95–100%) (Al-Toma et al., 2019; Husby et al., 2020).

Al margen de estas excepciones, las guías coinciden en determinar primero las anti-tTG-IgA y tras ello los anti-EMA e/o IgA total como una verificación del primer resultado. El aplazamiento de la determinación de anti-EMA a una segunda línea en el proceso de confirmación de EC, es mayormente debido a que la determinación de éstos precisa de técnicas de laboratorio más caras y complejas, aunque es común la determinación de ambos simultáneamente para la comodidad del paciente (Al-Toma et al., 2019; Husby et al., 2020; Raiteri et al., 2022).

Hasta hace relativamente poco, la prueba que seguía en esta secuencia de diagnóstico en la mayoría de las guías era la biopsia endoscópica. No obstante, en los últimos años se han producido importantes modificaciones, incluyendo la posibilidad de un **diagnóstico sin biopsia en niños y adolescentes**. La invasividad de la biopsia, sumada a la demostración de la correlación entre el umbral de 10 veces el límite superior de la normalidad (10x LSN) de los Ac anti-tTG-IgA con la EC activa, ha llevado a las guías a recomendar el diagnóstico sin biopsia en estos casos. Algunas precisan la coexistencia de síntomas u otros factores que lleven a una elevada sospecha clínica para efectuar el diagnóstico final (Husby et al., 2020; Reilly et al., 2018; Riznik, Balogh, et al., 2019).

Para aquellos niños y adolescentes que muestren niveles detectables de anti-tTG-IgA pero por debajo de este umbral, muestren otros anticuerpos específicos de la EC activa o presenten inmunodeficiencias, se realizará la determinación de HLA específica de EC. Solamente en caso de que esta sea positiva, se realizará la biopsia como última prueba confirmatoria (Husby et al., 2020).

En adultos, las guías clínicas principales desaconsejan el diagnóstico sin biopsia, a pesar de que exista una corriente que abogue por su implementación (Penny et al., 2021; Reilly et al., 2018). La evaluación histopatológica del intestino delgado, que se realiza en las muestras tomadas por **biopsia endoscópica**, es el estándar de oro en el diagnóstico de la EC en adultos. Esta se debe hacer tanto, en pacientes seropositivos, como en aquellos seronegativos en los que se tenga una elevada sospecha clínica. Entre el 2-15% de los adultos son seronegativos en el momento de diagnóstico (Al-Toma et al., 2019).

La toma de muestras y su posterior evaluación debe ser realizada por profesionales expertos debido a la complejidad de ésta. Para una correcta valoración, se recomiendan

tomar al menos cuatro biopsias del duodeno distal y al menos una del bulbo duodenal. La presencia de lesiones en dos o más muestras confirmaría la sospecha de EC (Al-Toma et al., 2019; Raiteri et al., 2022).

La lesión histológica en los EC se caracteriza por la atrofia parcial o total de las vellosidades, criptas alargadas, disminución de la relación vellosidad/cripta, aumento del índice mitótico en las criptas, aumento de la densidad de LIEs e infiltración de células plasmáticas en la lámina propia. El aumento de LIEs tiende a localizarse en la punta de las vellosidades y suelen ser CD8+ (Hujoel et al., 2019) (Figura 1.4).

La categorización del daño histológico se puede realizar por distintos sistemas: Marsh, Marsh-Oberhuber, el cual propone una mejor estandarización del sistema de Marsh, Corazza-Villanacci y Q-MARSH. Todas proponen el recuento de linfocitos intraepiteliales (LIE) y una evaluación del estado de las vellosidades y criptas (Adelman et al., 2018; Corazza et al., 2007; Marsh, 1992; Oberhuber, 2000).

La determinación de la concentración de los LIE es más objetiva y precisa, siendo el valor de corte usado similar para todas las técnicas (Walker et al., 2010). Es en la valoración del estado de las criptas y vellosidades, donde distan las técnicas. Las tres primeras clasificaciones son cualitativas y subjetivas a la mirada del patólogo, la concordancia del resultado entre los observadores suele ser baja (Gujral et al., 2012). Por contra, se ha propuesto el algoritmo Q-MARSH como complemento, que es cuantitativo. Clasifica a los pacientes en base al ratio entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas (Vh:Cd) medidas a través de potentes programas informáticos, eliminando la variabilidad interobservador. El reciente desarrollo de este algoritmo y la necesidad de un mayor tiempo para su determinación hace que esta prueba no esté extendida en la atención clínica todavía (Adelman et al., 2018). Por el momento, el método más usado es el de Marsh-Oberhuber y distingue 6 estadios: 0, 1, 2, 3a, 3b y 3c (Figura 1.4, Tabla 1.3).

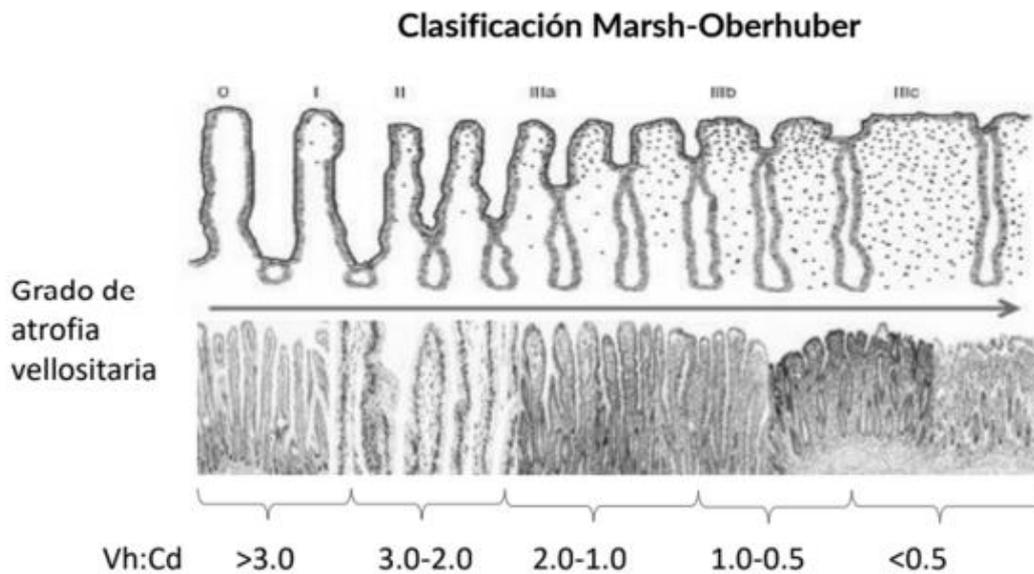


Figura 1.4. Imágenes histológicas de la mucosa duodenal sana y con distintos niveles de daño, clasificadas a través del sistema Marsh-Oberhuber y con el algoritmo Q-MARSH.

Tabla 1.3. Clasificación del sistema Marsh-Oberhuber y su relación con el algoritmo Q-MARSH. Los 6 estadios distinguidos en la escala Marsh-Oberhuber determinan la probabilidad de cursar enfermedad celiaca. El estadio tipo 0 donde indica la presencia de una mucosa normal y por tanto improbabilidad elevada para cursar EC activa. El estadio tipo 1 indica una lesión infiltrativa de tipo 1 y probabilidad enfermedad celiaca; tipo 2, lesión hiperplásica y enfermedad celiaca; tipo 3 lesión destructiva y enfermedad celiaca.

Marsh-Oberhuber	Vellosidades	Criptas	Q-MARSH (Vh:Cd)	LIEs*
0	Normal	Normal	≥ 3,0	0 o ≥ 25/100
1	Normal	Normal	≥ 3,0	≥ 40/100
2	Normal	Hiperplasia	≥ 2,0 - <3,0	≥ 40/100
3a	Artrofia parcial	Hiperplasia	≥ 1,0 - <2,0	≥ 25/100 o ≥ 40/100
3b	Artrofia subtotal	Hiperplasia	≥ 0,5 - <1,0	≥ 25/100 o ≥ 40/100
3c	Artrofia total	Hiperplasia	> 0,5	≥ 25/100 o ≥ 40/100

LIE: linfocito intraepitelial

*Concentración variable según el estudio

A pesar de que las anomalías histológicas son un patrón distintivo de la EC, no son patognomónicas. Existe un amplio espectro de enfermedades que pueden producir lesiones histológicas intestinales. Sólo alrededor del 16% de las lesiones se relacionan realmente con una EC (Al-Toma et al., 2019). Por ello, es necesario obtener la combinación de al menos la serología y biopsia positivas para efectuar el diagnóstico. En caso de sólo presentar una de ellas, se procede a otras vías de confirmación (Raiteri et al., 2022).

Para la correcta discriminación entre la EC activa y no activa y/o ausencia de EC en ambas pruebas, es necesario que el paciente **ingiera gluten de forma regular en su dieta**. En el caso contrario se obtendrían como respuesta, falsos negativos.

Debido, entre otras causas, al conocimiento popular de la relación del gluten con afecciones GI, muchos pacientes sintomáticos optan por su retirada de la dieta, previo al diagnóstico de la enfermedad.

Ante estos casos, las guías clínicas proponen el proceso conocido como “**gluten-challenge**” o desafío de gluten, que consiste en la toma de una suma considerable de gluten durante un periodo determinado para la positivización de los marcadores a determinar. La guía ESPGHAN 2022 recomienda un “gluten-challenge” de 3-6 meses, con una ingesta diaria de 10-15 g en niños y adolescentes, y la ESsCD 2019 de 6-8 semanas consumiendo 10g de gluten de forma diaria (Al-Toma et al., 2019; Husby et al., 2020).

No obstante, este proceso genera rechazo entre los pacientes sintomáticos. Por ello, actualmente se están realizando esfuerzos en la búsqueda de (bio)marcadores para los EC no diagnosticados en DSG y en el desarrollo de métodos para la detección de éstos. La mayoría de ellos, recaen en la búsqueda de citoquinas proinflamatorias tras una provocación con gluten (Singh et al., 2019; Smithson et al., 2021).

2.6 TRATAMIENTO

2.6.1 Dieta sin gluten

Actualmente, el **único tratamiento eficaz y seguro** para la enfermedad celíaca consiste en la **exclusión estricta del gluten de por vida**, es decir, realizar la dieta conocida como la dieta sin gluten (DSG) (Aljada et al., 2021; Bascuñán et al., 2017; Kivelä et al., 2021; Lebwohl et al., 2018; Lindfors et al., 2019).

Se ha demostrado científicamente que una adherencia estricta a la DSG permite una restauración histológica completa del intestino delgado, una reducción de la inflamación de la mucosa gastrointestinal, una normalización en los niveles de los marcadores serológicos y una remisión de los síntomas. La recuperación es progresiva, con un timing distinto para cada manifestación (Bascuñán et al., 2017; Kurppa et al., 2009).

Es en la sintomatología gastrointestinal donde primero suele notar mejoría el paciente. La resolución de síntomas asociados a la EC se suele dar en un plazo de días o semanas (Murray et al., 2004). Los síntomas extraintestinales, son de más tardío restablecimiento (Jericho et al., 2017). Tras 6-12 meses, suele acontecer una negativización en los anticuerpos. Finalmente, se consigue la restauración histológica del intestino delgado. Esta recuperación, suele ser más rápida en los niños que en los adultos. En un plazo de dos años un 95% de los niños frente a un 34% de los adultos consiguen dicha recuperación. Tras cinco años el porcentaje de adultos histológicamente recuperados aumenta a un 66%,

todavía por debajo del porcentaje de niños recuperados a los dos años (Rubio-Tapia et al., 2010; Wahab et al., 2002).

Seguir ingiriendo gluten puede reducir la calidad de vida, exacerbar los síntomas clínicos, incrementar el daño de la mucosa gastrointestinal, además de aumentar el riesgo de futuros cánceres, como el adenocarcinoma del intestino delgado, el cáncer de esófago, el melanoma o el linfoma no-Hodgkin (Fuchs et al., 2018; Rubio-Tapia et al., 2009).

A pesar de que la susceptibilidad al gluten es variable entre individuos con EC, los estudios sugieren que la **exposición continuada a cantidades por encima de los 10-50 mg es dañina** para una gran parte de los enfermos (Cohen et al., 2019).

Por ello, es vital que la DSG se realice de forma estricta y correcta durante toda la vida. La DSG reside en la exclusión de todos aquellos alimentos que contienen proteínas del gluten procedentes del trigo, centeno, cebada y cereales relacionados de la dieta (Bascuñán et al., 2017). Esto supone evitar aquellos alimentos cuyo uno de sus constituyentes principales sea un cereal con gluten, como son los productos de panadería y repostería, la cerveza o la pasta, así como aquellos alimentos procesados que contienen gluten en calidad de aditivo. Como se ha mencionado anteriormente, el gluten es el segundo aditivo más usado por la industria alimentaria debido a las múltiples propiedades. Está presente en múltiples snacks, sopas preparadas, carnes procesadas y salsas, entre muchos otros (Biesiekierski, 2017; de Sousa et al., 2021; P. R. Shewry et al., 2002; Song et al., 2021; Tapia-Hernández et al., 2019; Wieser, 2007; Wieser et al., 2023). Asimismo, se deben evitar contaminaciones cruzadas y elegir con cuidado los establecimientos para comer fuera de casa. Un estudio afirmó que el 32% de los restaurantes libres de gluten testaron positivo para esta proteína en alguno de sus alimentos (Lerner et al., 2020).

Debido a esta abundante representación de los alimentos con gluten y su difícil evasión, el inicio de la DSG representa un cambio de 180° en hábitos alimentarios de los enfermos con EC. Por este motivo, recibir una educación nutricional y tener a mano alimentos y herramientas que permitan realizar la DGS con una mayor facilidad y seguridad es la forma más pertinente para alcanzar con éxito una completa adherencia a la DSG.

2.6.2 Terapias experimentales

Debido a la dificultad que implica el seguimiento de la DSG muchos equipos de investigación están dedicando esfuerzos al desarrollo de **terapias experimentales no dietéticas**.

Éstas abarcan desde la modificación o el pretratamiento del propio gluten hasta la inhibición o reducción de alguna de las fases de la respuesta inmune (Figura 1.5). La terapia que se encuentra en un estadio más avanzado está en la Fase 3, por lo que todavía cabe esperar varios años más hasta que alguna de ellas alcance el mercado (Kivelä et al., 2021).

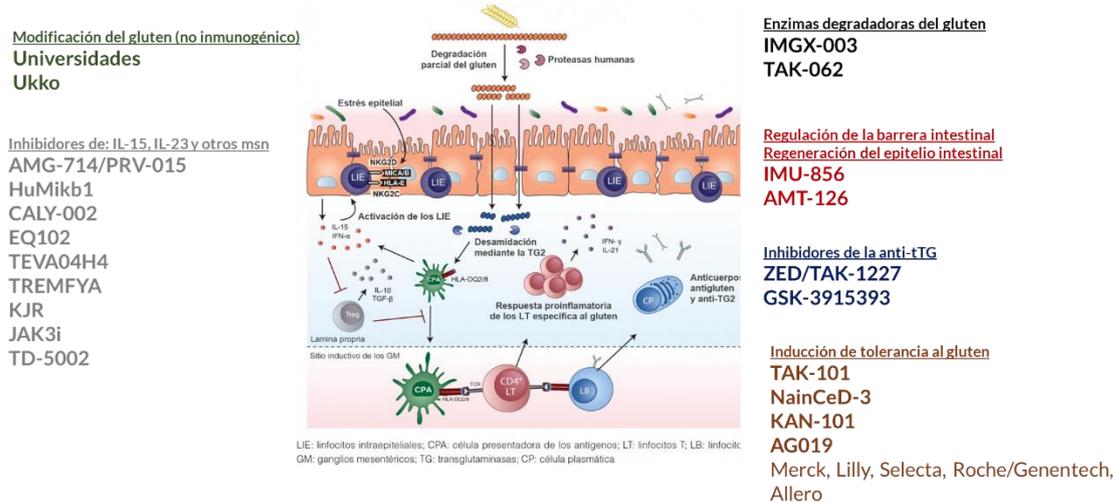


Figura 1.5. Patogénesis de la enfermedad celíaca y los enfoques de investigación que se han probado como futuros tratamientos. Imagen modificada de(Leon, 2019).

Para verificar el funcionamiento de estas terapias, los voluntarios, tanto controles como enfermos incluidos en las Fases 2-4, se someten a un proceso de “gluten-challenge”. Este proceso es similar al propuesto por las guías clínicas para la confirmación de la sospecha de EC en los voluntarios que han iniciado la DGS previo a su diagnóstico, pero es la entidad propietaria del fármaco quien indica como se realiza. Para testarlos, generalmente se incluyen provocaciones con más de 2 g de gluten durante más de dos semanas.

2.7 HERRAMIENTAS PARA EL SEGUIMIENTO DE LA EVOLUCIÓN DEL PACIENTE (ADHERENCIA AL TRATAMIENTO)

La tabla que se muestra a continuación (Tabla 1.4) resume las herramientas actuales más utilizadas para el seguimiento de la DSG, tanto en la rutina clínica como en publicaciones científicas, presentando las ventajas e inconvenientes de cada técnica.

La cura del paciente celíaco podría considerarse cuando se consigue una completa recuperación de la mucosa intestinal. El riesgo de que la exposición al gluten es siempre una amenaza, que puede deteriorar o perpetuar el daño histológico. El proceso de recuperación completa sólo puede lograrse mediante una adherencia total a la DSG.

Tabla 1.4. Ventajas e inconvenientes de las herramientas actuales existentes para la evaluación de la adherencia a la DSG.

Herramienta para el seguimiento de la DSG	Ventajas	Desventajas
Sintomatología	<ol style="list-style-type: none"> 1. Barato 2. No invasivo 	<ol style="list-style-type: none"> 1. No se pueden usar con pacientes que no presentan síntomas 2. Los síntomas causados por la EC deben ser diferenciados de otros de distinto origen 3. Baja fiabilidad en relación con la recuperación de la atrofia intestinal
Cuestionarios dietéticos	<ol style="list-style-type: none"> 1. No requiere de instrumentación médica 2. Existencia de cuestionarios dietéticos estandarizados 3. No invasivo 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Deben ser traducidos y validados en todos los idiomas y culturas 2. Se requiere de tiempo para rellenarlos 3. Imprecisos y subjetivos, debido a que están sujetos a las respuestas de cada paciente 4. Baja sensibilidad para predecir la atrofia intestinal y la adherencia a la DSG
Endoscopia con biopsias duodenales	<ol style="list-style-type: none"> 1. Determinación de las consecuencias de la ingesta de gluten por el chequeo del estado de la mucosa GI 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Caro 2. Invasivo 3. Su ejecución requiere de profesionales experimentados y aparatos médicos especializados 4. La recuperación del daño intestinal varía (en tiempo) de paciente a paciente
Marcadores serológicos basados en anticuerpos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Coste efectivos 2. Resultados positivos podrían indicar una exposición continuada al gluten en la dieta 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Semi-invasivos 2. Baja especificidad. Los valores negativos no muestran una buena correlación con una buena adherencia o reversibilidad del daño. 3. No se pueden aplicar a pacientes inmunocomprometidos 4. Podrían obtenerse resultados falso positivo por la reacción cruzada con otros anticuerpos. 5. El tiempo para la negativización de estos anticuerpos varía de paciente a paciente. 6. No existe una correlación lineal entre los valores obtenidos en la serología y recuperación de la mucosa GI
Interleuquina-2	Pocas evidencias de la utilidad en el seguimiento	
Células T CD4+ gluten-específicas		<ol style="list-style-type: none"> 1. Necesidad de equipos costosos 2. Necesidad de profesión cualificados
Péptidos inmunogénicos del gluten	<ol style="list-style-type: none"> 1. Coste efectivo 2. No invasivo 3. Indicador directo de que ha habido una ingesta de gluten 	<ol style="list-style-type: none"> 1. La ventana de detección está limitada en una franja de horas o días 2. Requiere de varias muestras (mínimo dos) para incrementar la precisión

4. Puede ayudar a identificar el origen de la exposición al gluten

DSG: dieta sin gluten

3 **INMUNOENSAYOS DE DIAGNOSTICO IN VITRO**

3.1 **PRODUCTOS DE DIAGNÓSTICO IN VITRO**

Las reacciones que ocurren *in vivo*, en condiciones naturales, se pueden generar *in vitro*, en condiciones artificiales. Esta capacidad se usa para distintas aplicaciones, entre ellas, en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades humanas. Estos productos se conocen como productos de diagnóstico *in vitro*.

Concretamente, la definición de un producto para diagnóstico *in vitro* (IVD, en inglés, *in vitro diagnostics*) hace referencia a cualquier producto sanitario que consista en un reactivo, producto reactivo, calibrador, material de control, instrumento, aparato, pieza de equipo, programa informático o sistema, utilizado solo o en combinación con otros, destinado por el fabricante a ser utilizado *in vitro* para el estudio de muestras procedentes del cuerpo humano, incluidas las donaciones de sangre y tejidos, con el fin de proporcionar información sobre uno o varios de los siguientes aspectos (UE 2017/ 746, 2017):

- a) relativa a un proceso o estado fisiológico o patológico;
- b) relativa a deficiencias físicas o mentales congénitas;
- c) relativa a la predisposición a una afección médica o a una enfermedad;
- d) para determinar la seguridad y compatibilidad con posibles receptores;
- e) para predecir la respuesta o la reacción al tratamiento;
- f) para definir o supervisar medidas terapéuticas.

Distintos métodos analíticos capacitan la obtención de dicha información, entre los que se encuentran las técnicas de biología molecular, las de inmunoquímica y los métodos electroquímicos, existiendo una diversidad de métodos dentro de cada uno de ellos.

3.2 **INMUNOENSAYOS COMO TEST DE DIAGNÓSTICO IN VITRO**

Los métodos inmunoquímicos se basan en la simulación y medición *in vitro*, de la respuesta inmunitaria general mediada por anticuerpos que se produce en nuestro organismo frente a cualquier antígeno (*in vivo*).

Las técnicas inmunoquímicas incluyen: los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA, por sus siglas en inglés, de *enzyme-linked immunosorbent assay*), los ensayos inmunocromatográficos, la inmunotransferencia (por ejemplo, ensayo *Western blot*), las reacciones de precipitación y aglutinación, la inmunoelectroforesis, el inmunofenotipado, y citometría, entre otros.

Los inmunoensayos son aquellas pruebas que se basan en la creación *in vitro* de complejos de anticuerpo y su molécula diana, es decir, inmunocomplejos, como medio para generar un resultado perceptible que será interpretado.

Los primeros inmunoensayos fueron descritos en la década de 1960 por Yalow, y Berson y Ekins, y fueron desarrollados para medir la insulina y la tiroxina respectivamente (Ekins, 1960; Yalow, 1959). Desde entonces este campo ha sufrido un crecimiento exponencial, tanto en técnicas como en sus aplicaciones.

Para poder desarrollar y/o mejorar un inmunoensayo, es importante conocer el (bio)marcador a analizar, el mecanismo de la síntesis y los subtipos de anticuerpos, así como los factores que intervienen la formación de los inmunocomplejos.

3.2.1 **Biomarcador**

Las moléculas biológicas que se encuentran en la sangre, otros líquidos o tejidos del cuerpo, y cuya presencia es un signo de un proceso normal o anormal, de una afección, de una enfermedad o de un tratamiento se llaman biomarcadores. Los tests de IVD se diseñan para permitir diferenciar aquellos valores normales de los alterados de estos biomarcadores.

Por ejemplo, un tipo de biomarcador son los **anticuerpos**, debido a que la presencia o los niveles alterados de anticuerpos específicos en sangre pueden estar directamente relacionados con la aparición, el estadio o la evolución de enfermedades. Por ejemplo, las alergias, las enfermedades autoinmunes, o algunas infecciosas, pueden diagnosticarse mediante la determinación de anticuerpos específicos en sangre (Breiteneder et al., 2020; Castro, 2010; Kramvis et al., 2022).

Últimamente, el interés científico se ha centrado en descubrir nuevos patrones de anticuerpos específicos relacionados con diversas enfermedades humanas, incluidas las oncológicas, inflamatorias, neurológicas o autoinmunes, como la enfermedad celiaca (Smithson et al., 2021). El análisis de estos nuevos biomarcadores es potencialmente útil para el diagnóstico completo y determinar la evolución de la enfermedad. Antes del

diagnóstico, pueden emplearse para el cribado y/o evitar riesgos, como contagios. Durante el diagnóstico, los niveles de anticuerpos pueden determinar el estadio de la enfermedad y/o la graduación y la selección de la terapia inicial. Más tarde, pueden utilizarse para el seguimiento de la terapia, para seleccionar un tratamiento adicional o para controlar las enfermedades coincidentes, como se ha comentado en los apartados de diagnóstico y seguimiento de la EC.

Los anticuerpos suelen ser biomarcadores convenientes, ya que se generan en cantidades relativamente grandes en comparación con los antígenos asociados a la enfermedad y son biomoléculas muy estables en el suero.

3.2.2 La formación de inmunocomplejos y el rol de los anticuerpos:

Se llama **antígeno (Ag)**, a aquellas sustancias capaces de inducir una respuesta inmunitaria específica en el organismo. Estas suelen ser principalmente de naturaleza peptídica o carbohidratos, aunque también existen antígenos lipídicos y de ácidos nucleicos (Pishesha et al., 2022).

Aunque en su totalidad la molécula de antígeno es potencialmente inmunogénica, en la práctica, el sistema inmune sólo reconoce y genera respuesta frente a los determinantes antigénicos denominados **epítotos (Ep)**. Las dimensiones de los epítotos pueden variar según una serie de factores, pero en general constan de 5 a 15 aminoácidos (en las proteínas). Los epítotos se pueden categorizar en dos tipos principales, dependiendo si es la secuencia de residuos adyacentes o la estructura tridimensional de este quien genera la respuesta inmune. A los primeros se les denomina continuos o secuenciales y a los segundos conformacionales (Chiu et al., 2019; Frank, 2002; Pishesha et al., 2022).

Los **anticuerpos (Ac)** o inmunoglobulinas (Ig) son glicoproteínas generadas y segregadas por los linfocitos B como parte de la respuesta inmune humoral-adaptativa, con el objetivo de identificar y neutralizar los Ag (Cooper, 2015; Pishesha et al., 2022).

Las distintas clases y subclases de inmunoglobulinas (isotipos) difieren en sus características biológicas, estructura, especificidad de diana y distribución. Es conveniente conocer la estructura, los subtipos y la especificidad a la diana, para la selección y preparación de anticuerpos como herramientas para inmunoensayos y otras aplicaciones de detección (Kaplun et al., 2023).

La **estructura de un anticuerpo** se asemeja a la letra "Y". Consta de dos cadenas polipeptídicas idénticas ligeras (L), de ~25 KDa, y dos cadenas idénticas pesadas (H, por

heavy en inglés), de ~50 KDa, unidas por puentes disulfuro formando un heterodímero bilateralmente simétrico. Los extremos aminoterminales de estas cadenas polipeptídicas, presentan variaciones considerables en la composición de aminoácidos de clon de anticuerpo a clon, y se denominan regiones variables (V), distinguiéndose así de las regiones relativamente constantes (C).

En humanos, existen dos tipos de cadena ligera κ o λ . Ambas presentan un dominio variable, V_L , y un dominio constante, C_L . Las cadenas pesadas de los anticuerpos humanos constan de un dominio variable, V_H y tres o cuatro dominios constantes C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , y C_{H4} (Figura 1.6). El número de dominios constantes dependerá del isotipo de la Ig. En los humanos existen cinco isotipos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, según su función en la inmunidad adquirida (Chiu et al., 2019).

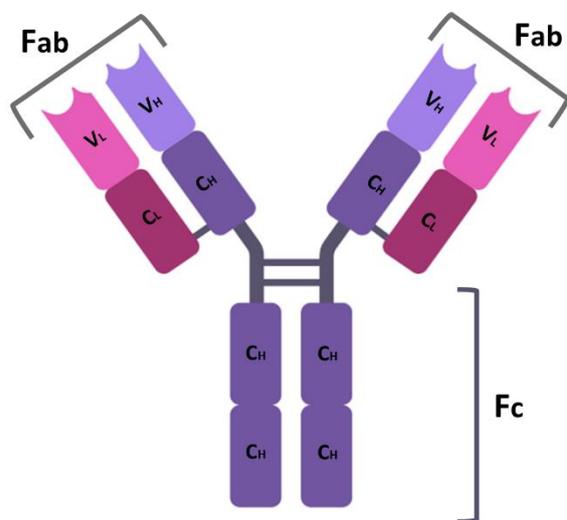


Figura 1.6. Estructura básica de un anticuerpo. Con las cadenas ligeras (L) marcadas en rosa, y las pesadas (H), con tres dominios C_{H3} , en morado, unidas por puentes disulfuro. La región cristalizable es la comprendida dentro del Fc y las regiones variables en el Fab.

En cuanto a la funcionalidad, la molécula de anticuerpo se puede fragmentar en tres componentes: un fragmento cristalizable (Fc) y dos fragmentos de unión a antígeno (Fab) (Figura 1.6) (Chiu et al., 2019; Cooper, 2015).

La región cristalizable, Fc, la constituyen las regiones constantes de las cadenas pesadas, C_H . Estos dominios son constantes para cada isotipo y gozan de estabilidad a la estructura, garantizando que la respuesta inmunitaria sea generada (Figura 1.6).

Las IgD e IgM están relacionadas con el mecanismo de respuesta inmune. Las IgD actúan como receptor de antígenos en los linfocitos B, activando los basófilos y los mastocitos; a su vez, la IgM es secretada por los linfocitos B formando una molécula pentamérica cuyo

objetivo es eliminar los patógenos en la fase inicial de la respuesta humoral. Las IgA se presentan fundamentalmente en forma de dímero en áreas mucosas, como el tracto respiratorio, el gastrointestinal o urogenital, para la prevención de su colonización por patógenos. La IgE interviene en procesos alérgicos, uniéndose a alérgenos y desencadenando la liberación de histamina por parte de mastocitos y basófilos. Finalmente, la IgG, es la clase predominante de anticuerpo producida durante la etapa más madura de la respuesta inmunitaria. Proporciona la mayor parte de la inmunidad basada en anticuerpos contra patógenos y, por tanto, es la clase de anticuerpo más estudiada y empleada en el campo de la biociencia (Chiu et al., 2019).

La expresión de isotipos dependerá de la recombinación genética que tiene lugar durante la etapa de maduración de una célula B. Las células B naive expresan isotipos de IgM e IgD con genes variables no mutados, que se producen a partir de la misma transcripción inicial después del empalme alternativo. No obstante, la exposición a un antígeno puede dar lugar a un "cambio de clase" (CSR, del inglés *class-switch recombination*). Este CSR provoca la expresión de otro tipo de isotipo de anticuerpo. Durante este cambio, se modifica la región C_H , pero no la región V_H . Este cambio, por tanto, no afecta a la especificidad del anticuerpo para su antígeno, pero sí altera las funciones efectoras que cada clase de anticuerpo puede ejecutar (Cancro & Tomayko, 2021).

La región variable (Fv) de los Fabs es la que dota al anticuerpo de capacidad de unión contra un determinado antígeno. Esta región está formada por una pareja de dominios constantes de cadena ligera y pesada (C_L y C_H), y otra de dominios variables también de cadena ligera y pesada V_L y V_H . Estos dominios variables están situados en el extremo amino y son únicos para cada anticuerpo monoclonal y son la región que se une al antígeno, también conocido como parátopo (Figura 1.6). Cada dominio variable aporta tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2, CDR3) que son altamente divergentes y cuya estructura tridimensional coincide en el extremo del Fab. Juntas, las CDRs de las cadenas ligeras y pesadas de la Ig, forman una superficie que es complementaria al antígeno. De forma más concreta, los aminoácidos que contactan con el antígeno, denominados residuos determinantes de especificidad (SDRs), son lo que generan distintos patrones según el tipo de antígeno. La hipervariabilidad de esta región se genera en el proceso de recombinación e hipermutación somática (HMS), durante el desarrollo del sistema inmune (Almagro, 2004; Chiu et al., 2019; Raghunathan et al., 2012).

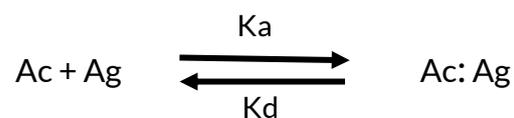
3.2.2.1 Unión anticuerpo-antígeno

La unión de un anticuerpo y un antígeno específico es una reacción bioquímica que ocurre cuando estos se acercan a una distancia de varios nanómetros. Esta unión implica interacciones no covalentes débiles y reversibles que comprenden principalmente fuerzas de van der Waals, fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno y fuerzas hidrofóbicas. La formación de múltiples enlaces garantiza que el antígeno se una firmemente al anticuerpo. La fuerza de unión anticuerpo-antígeno se puede comprender a través de varios parámetros y es susceptible a cambios en su entorno. La afinidad, avidéz, especificidad y reactividad cruzada son algunos de estos parámetros (Chiu et al., 2019; Frank, 2002; Rudnick & Adams, 2009):

- **Afinidad:** Se define como afinidad la suma de todas las fuerzas atractivas y repulsivas entre un epítipo y el sitio de unión a este epítipo en un Ac concreto (por ejemplo, cuando se usa un Ac monoclonal). Se puede definir como la constante de equilibrio (K_{eq}) de una interacción Ac-Ag, según la ley de acción de masas:

$$K_{eq} = \frac{K_a}{K_d} = \frac{[Ac:Ag]}{[Ac][Ag]}$$

Al comienzo, esta reacción bioquímica se da predominantemente en una dirección asociando ambas partes (K_a , constante de asociación), pero la velocidad de la reacción inversa (K_d , constante de disociación) aumenta progresivamente hasta que las velocidades inversas sean iguales. En este punto, se dice que la reacción ha alcanzado su equilibrio:



En equilibrio, la relación entre las concentraciones del producto ([complejo]) y los reactivos ([antígeno] y [anticuerpo]) es constante.

- **Avidéz:** Es un término más amplio que la afinidad, también conocido como afinidad funcional. La avidéz viene dada por el hecho de que los anticuerpos y antígenos son multivalentes, es decir, poseen más de un sitio de unión entre ellos. La suma de las fuerzas que se constituyen entre un anticuerpo por cada sitio de unión se denomina avidéz. Su valor es mucho mayor que la suma de afinidades. Por tanto, la avidéz depende de las afinidades individuales de cada uno de los determinantes

individuales de ese antígeno, el número total de sitios de unión implicados (la valencia) y la disposición estructural de epítomos y parátomos.

- **Especificidad:** Se define como la capacidad de un determinado sitio activo de anticuerpo para reconocer e interactuar con un único determinante antigénico (epítomo) o la capacidad de una población de moléculas de anticuerpos de reaccionar con un único antígeno. Las reacciones antígeno-anticuerpo poseen un grado de especificidad extremadamente alto.

- **Reactividad cruzada:** Se denomina reactividad cruzada cuando el anticuerpo o la población de anticuerpos que han sido generados específicamente frente a un único epítomo o antígeno, respectivamente, reacciona contra otro.

Las reacciones cruzadas son interacciones multiespecíficas que surgen porque el antígeno que ha sido reconocido por reactividad cruzada y el antígeno inmunizante comparten un epítomo o porque el epítomo tiene propiedades químicas y estructurales similares al del antígeno inmunizante.

Son muchos los factores que influyen en las reacciones antígeno-anticuerpo. Pueden clasificarse convenientemente en dos grupos según actúen o no sobre la constante de equilibrio (Tabla 1.5) (Reverberi & Reverberi, 2007):

Tabla 1.5. Factores que influyen en las reacciones antígeno-anticuerpo. Modificado de (Reverberi & Reverberi, 2007).

Factores que afectan al constante de equilibrio
Temperatura
pH
Fuerza iónica
Tratamiento enzimático de las células sanguíneas
Otros factores
Concentración del antígeno y anticuerpo
Cigosidad (número de sitios de unión al antígeno)
Duración de la incubación

La **temperatura** óptima para la reacción antígeno-anticuerpo dependerá de la naturaleza química del epítomo, del parátomo o, mejor dicho, de los tipos de enlaces débiles implicados en su interacción. Los enlaces de hidrógeno son exotérmicos y más estables a baja temperatura. Son especialmente importantes cuando el antígeno es un hidrato de carbono. Por el contrario, los enlaces hidrofóbicos son endotérmicos y por tanto más estables con el aumento de la temperatura (Reverberi & Reverberi, 2007).

El efecto del **pH** sobre la constante de equilibrio se caracteriza por una curva simétrica en torno a un máximo situado entre pH 6,5 y 8,4. A pH 5,0 o 9,5, la constante de equilibrio suele ser 100 veces menor que a pH 6,5-7,0. A ambos lados del máximo, la reacción antígeno-anticuerpo queda fuertemente inhibida, debido a que los pH extremos inducen cambios conformacionales en el anticuerpo que probablemente destruyen la complementariedad con el antígeno (Reverberi & Reverberi, 2007).

El efecto de la **fuerza iónica** es especialmente influyente cuando se efectúan uniones entre anticuerpos y antígenos de baja afinidad. En una solución salina normal, los cationes y aniones se agrupan alrededor del complejo y neutralizan parcialmente las cargas, interfiriendo potencialmente con la unión del anticuerpo al antígeno (Reverberi & Reverberi, 2007).

Es conocido que el tratamiento con algunas **enzimas proteolíticas** favorece la reacción Ac-Ag.

El **ratio Ag-Ac** y la **disponibilidad** de ambos determinará la formación de complejos Ac-Ag. Si el medio no cambia, la K_{eq} no cambiará, pero la reacción (K_a , K_d) se forzarán a un lado u otro. El aumento de la concentración de antígeno y/o anticuerpo potencia la (K_a de la) reacción y la disminución de la concentración de alguno de ambos, por contrario, daría lugar a la disociación de los complejos ya formados (K_d). La detección de complejos Ag-Ac depende directamente de la proporción de las moléculas de ambos que estén presentes en un momento determinado (Chiu et al., 2019; Frank, 2002; Rudnick & Adams, 2009).

Un anticuerpo presentará más ocasiones de unirse a un antígeno, a mayor **número de sitios de unión** que pueda ofrecer. Por ejemplo, un anticuerpo de isotipo IgM se unirá de forma más eficiente a un determinado antígeno que su homólogo IgG, debido a que el primero es un pentámero, es decir, presentará 10 sitios de unión al antígeno, mientras que el segundo es un dímero y por tanto, presentará dos sitios de unión al antígeno (Chiu et al., 2019; Frank, 2002; Rudnick & Adams, 2009).

Para obtener la máxima sensibilidad, debe permitirse que la reacción antígeno-anticuerpo **alcance el equilibrio**. Sin embargo, para cada par de Ag-Ac alcanzar este equilibrio lleva un **tiempo** determinado. Conociendo los factores que afectan a la constante de equilibrio se puede acelerar este proceso.

3.2.2.2 Producción de anticuerpos

Los anticuerpos pueden ser fabricados “a la carta” en el laboratorio frente a casi cualquier analito de un cierto tamaño. El progreso en la biología molecular y la biotecnología ha proporcionado nuevas herramientas y técnicas para una síntesis más eficiente y con las mejores características (afinidad, especificidad etc.) de anticuerpos.

Dependiendo del proceso de producción, los anticuerpos pueden ser **monoclonales (mAc)**, **policlonales (pAc)** o **recombinantes (rAc)**. Tecnologías como la **maduración de la afinidad** (*affinity maturation*, en inglés) o la **fragmentación** en Fab o F(ab')₂ permiten mejorar o modelar las características de éstos.

Los **anticuerpos policlonales (pAc)** se obtienen directamente del suero de animales inmunizados, derivando, por tanto, de múltiples clones de linfocitos B. Cada clon reconocerá un epítipo distinto del mismo antígeno, mostrando distintas características en los parámetros que intervienen en la fuerza de unión anticuerpo-antígeno. Así, los anticuerpos que constituyen el suero policlonal reconocerán la estructura global del antígeno. La principal limitación de los anticuerpos policlonales es que su producción no puede ser 100% imitada, puesto que la respuesta inmune variará entre individuos, aunque sean de la misma especie (Stills, 2012).

Los **anticuerpos monoclonales (mAc)**, se obtienen de líneas celulares híbridas que son generadas a partir de la fusión de linfocitos B productores de anticuerpo de un animal inmunizado (generalmente ratón) con una línea celular tumoral de mieloma inmortalizada. Este tipo de líneas celulares se denominan hibridomas. Puesto que cada linfocito B produce un anticuerpo único, se obtiene una única Ig a partir de un único clon celular, por lo que cada mAc es específico de un único epítipo. Debido a que se hibridan con líneas celulares tumorales, las líneas celulares obtenidas son inmortales y muy estables, proporcionando una fuente ilimitada de Ac con afinidades idénticas mientras la línea celular del hibridoma sea estable (Gao et al., 2018).

Los **anticuerpos recombinantes (rAc)**, son producto de la ingeniería genética. A través de esta técnica se permite la producción de fragmentos de anticuerpos con afinidades y especificidades mejoradas o moduladas en huéspedes de menor complejidad, como bacterias o levaduras. La producción de rAc consta de varios pasos, que implican el aislamiento y la clonación de mRNA codificantes en células inmunizadas, la expresión en el huésped y el cribado de la especificidad del antígeno (Kunert & Reinhart, 2016).

La **maduración por afinidad** es el resultado de la HMS que sufren los genes de los linfocitos B, a través del cual los anticuerpos pueden mejorar la función y el rendimiento. Actualmente se pueden usar varios enfoques para alterar las características de unión de un anticuerpo, como, por ejemplo, la introducción de mutaciones en la región variable del anticuerpo. Al alterar la secuencia del anticuerpo, se puede modular la velocidad de asociación y/o disociación del anticuerpo para potenciar o debilitar la interacción con el antígeno (Eisen, 2014; Victora & Nussenzweig, 2022).

Los **Fab, Fab', F(ab')₂ o scFv**, son diversos fragmentos de unión al antígeno que se pueden generar tanto *in vitro* por expresión en células procariotas o eucariotas (bacterias, levaduras, mamíferas etc.), como por proteólisis enzimática a partir de la escisión del Fc de las inmunoglobulinas, generalmente, de la IgG y la IgM (Figura 1.7). A pesar de que presenten menor avidéz y estabilidad, confieren otras ventajas como la reducción de las uniones inespecíficas generadas por las interacciones Fc, menor inmunogenicidad o una penetración más eficaz en los tejidos, características que los hacen deseables en terapias biológicas e inmunohistoquímica (Zhao et al., 2019).

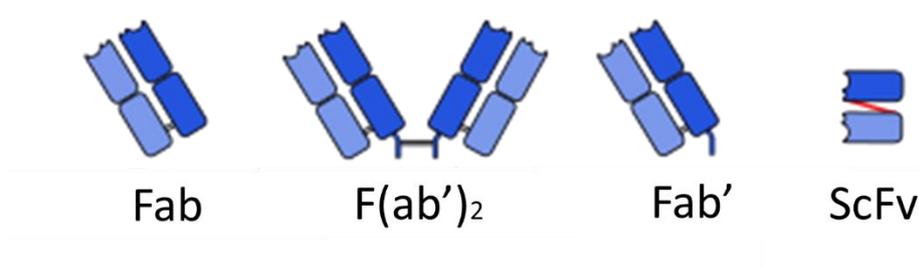


Figura 1.7. Fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos monoclonales obtenidos por diseño de ingeniería genética o digestión proteolítica.

3.2.3 Clasificación: Formatos de detección

Los inmunoensayos pueden clasificarse de varias formas, en base a la técnica de medición del analito, en base al medio donde se realiza la medición y por el marcador que genera la señal detectable.

En cuanto a la forma de detección del analito se pueden distinguir entre ensayos **no-competitivos** y **competitivos** (Figura 1.8) (Hosseini et al., 2018).

En los ensayos **no-competitivos** el analito es capturado del medio (la muestra) por anticuerpos que se encuentran inmovilizados sobre una plataforma. Estos Ac son conocidos como **anticuerpos de captura**. Normalmente, en este tipo de inmunoensayos el analito unido al anticuerpo no es capaz de producir una respuesta medible. Para generar

respuestas medibles, la señal se obtiene tras la conformación de la estructura sándwich, con un segundo Ac, el **Ac de detección**. La detección de un antígeno por sándwich suele requerir de la presentación de dos epítomos distintos por el antígeno, habilitando su reconocimiento por dos anticuerpos distintos, el de captura y el de detección (Figura 1.8B).

En los **inmunoensayos competitivos**. Toman este nombre porque el analito existente en la muestra bloquea parte o la totalidad de la señal que le sería posible emitir al inmunoensayo, por tanto, la señal que se obtiene es inversamente proporcional a la concentración de analito.

En caso de que el anticuerpo específico se encuentre inmovilizado en la superficie, la muestra que contiene el analito diana se añade junto con un analito conjugado (competidor), estableciéndose así, una competencia entre las dos moléculas para interactuar con el anticuerpo. En este caso, el analito marcado es el que se detecta.

En cambio, en los inmunoensayos competitivos que contienen inmovilizados en superficie un análogo del analito (**antígeno de recubrimiento**), es el anticuerpo el que se detecta. Para ello, primeramente, la muestra se debe incubar con una determinada concentración de anticuerpo y, a continuación, se añade a la superficie. De nuevo, se establece una competencia entre las tres especies, y el anticuerpo libre no unido interactúa con el antígeno de recubrimiento, generando también una respuesta inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra.

Dependiendo de la metodología usada la señal se puede generar por la detección de los cambios que se generan tras la unión, o debido a marcadores que emiten señales medibles. Estos marcadores pueden estar directamente unidos a los anticuerpos de detección y/o analito análogo o pueden estar unidos a una segunda molécula que reconoce esta primera, tomando los nombres de detección **directa** e **indirecta**, respectivamente.

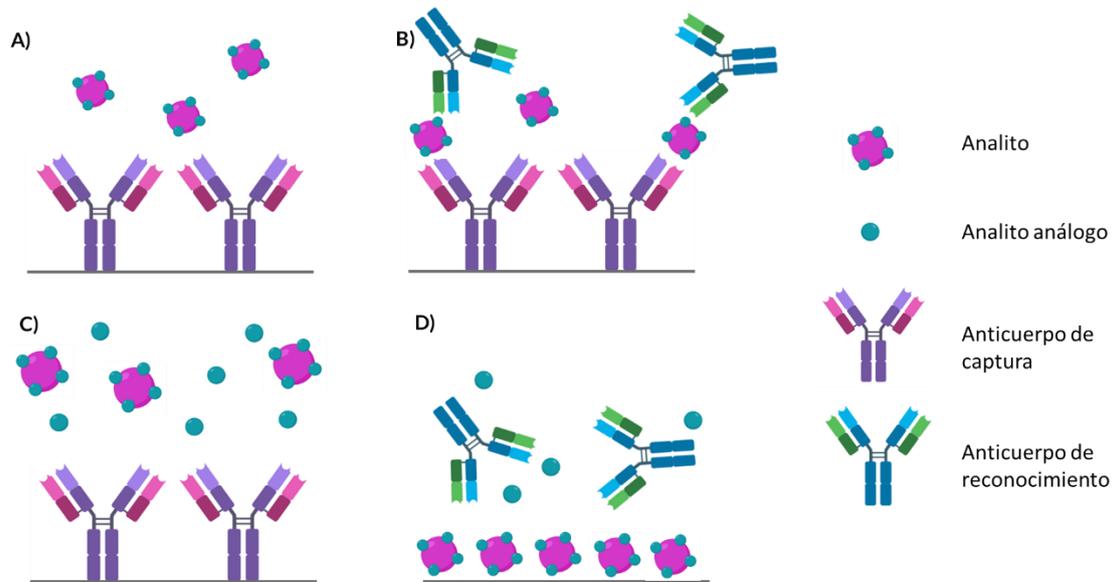


Figura 1.8. Principales formatos de inmunoensayo: A) detección directa no competitiva, B) detección no competitiva o sándwich C) detección competitiva en superficie de anticuerpo y D) detección competitiva en superficie de análogo.

Los inmunoensayos tipo sándwich suelen ser más sensibles, específicos y robustos, debido a que el anticuerpo se une a dos sitios del antígeno, aumentando la especificidad de unión de los anticuerpos de captura y detección al antígeno.

Los inmunoensayos competitivos suelen tener menor sensibilidad y especificidad, debido a que sólo requiere un sitio de unión en el antígeno. No obstante, suelen ser más rápidos y flexibles.

3.2.4 Técnicas

Dos de los inmunométodos más populares son el inmunoensayo de flujo lateral (IEFL o LFIA por sus siglas en inglés, *lateral flow immunoassay*) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por su acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

Aunque ambos permiten la detección de los mismos antígenos, las características que ofrece cada método determinan su momento de aplicación.

3.2.4.1 LFIA

El éxito de los LFIA reside principalmente en su baja complejidad técnica, fácil portabilidad, bajo coste y rapidez.

La baja complejidad técnica de estas pruebas y la sencillez en la interpretación de sus resultados posibilita su ejecución tanto por profesionales, como por usuarios sin formación. Asimismo, los LFIA se engloban dentro de las pruebas tipo PoCT (Pruebas de Laboratorio en el lugar de Asistencia o cercanas al paciente, acrónimo anglosajón proveniente del término, *Point-of-care testing*) que, como su propio nombre indica, se

consideran una especie de laboratorio en mano, laboratorios móviles y adaptables a cualquier tipo de entorno, permitiendo la detección *in situ* del analito de interés. Además, están fabricados para la obtención inmediata de los resultados, con una media de ejecución hasta la obtención de los resultados de 5-30 min. En resumen, estas herramientas capacitan a cualquier persona en cualquier lugar a tomar decisiones mejor fundamentadas y más rápidas (Di Nardo et al., 2021; Mirica et al., 2022).

Generalmente, estas propiedades tan positivas tienen como desventaja una menor capacidad de cuantificación de los resultados, generalmente cualitativos, y un peor, pero suficiente, rendimiento diagnóstico para ser usado como test de evaluación inicial en cribados, o de seguimiento. Sumado a esto su bajo coste, el coste-efectividad del uso de estas pruebas es elevada (Di Nardo et al., 2021; Mirica et al., 2022).

En definitiva, la integración de este tipo de pruebas en la rutina de distintas industrias ha supuesto un cambio de paradigma, ayudando, por ejemplo, en la detección de alérgenos alimentarios en línea o *in situ*, evitando problemas y costes futuros, o en la prevención y el seguimiento de múltiples enfermedades (Hocking et al., 2021).

Los LFIA suelen estar conformados por una serie de fibras independientes, también conocidas como “pads” o almohadillas, hechas de diversos materiales, anticuerpos o antígenos, necesarios para producir resultados y etiquetas, normalmente nanopartículas de oro de color, precisos para la lectura de los resultados producidos.

Los LFIA pueden estar en formato sándwich o competitivo (Figura 1.8).

El proceso para la obtención del resultado comienza cuando la muestra (líquida) se añade a la “almohadilla de la muestra”. Es entonces, cuando la muestra comienza un flujo capilar a lo largo de la tira pasando a través de las diversas almohadillas. La “almohadilla de la muestra” actúa como primera etapa del proceso de absorción y, en algunos casos, contiene un filtro para garantizar el flujo preciso y controlado de la muestra. Tras ello, la muestra pasa a la “almohadilla conjugada”, normalmente hecha de fibra de vidrio o poliéster, donde se encuentran los anticuerpos y/o antígenos conjugados, que se unirán al analito de interés. Tanto si la diana está presente como si no, con la llegada del flujo, estos anticuerpos comenzarán a migrar a lo largo de la prueba, habitualmente una membrana porosa de nitrocelulosa. A medida que la muestra avanza a lo largo del método, los reactivos de unión situados en la “almohadilla inmovilizada” se unirán a la diana en la línea test. Se formará una línea coloreada cuya saturación de la línea variará en función de la cantidad de diana

presente. Finalmente, la muestra llegará a la “almohadilla absorbente” que captará el exceso de muestra (Figura 1.9) (Mirica et al., 2022).

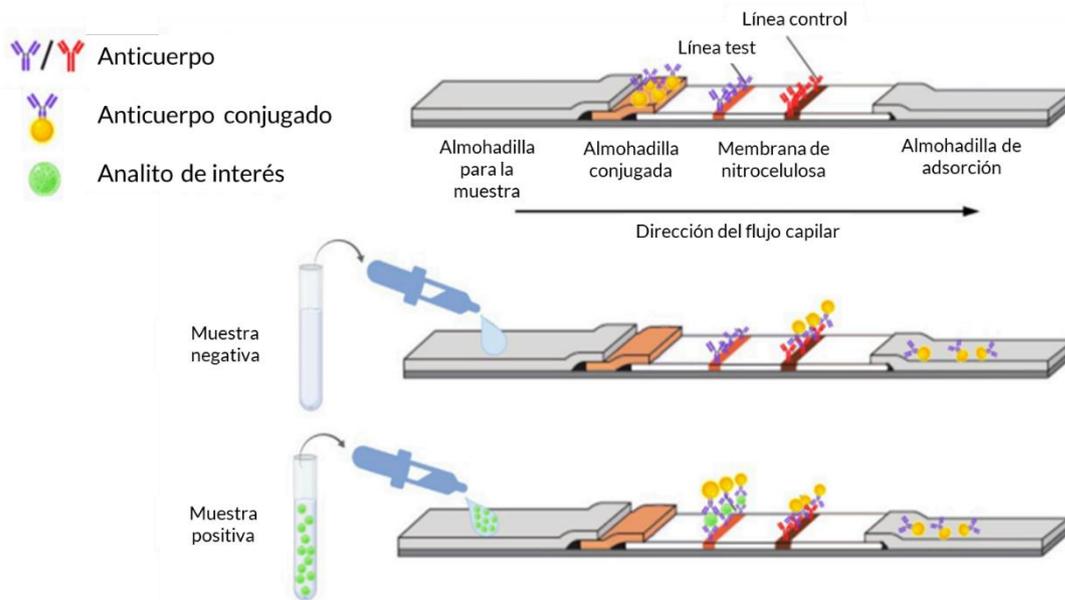


Figura 1.9. Figura modificada de Mirica et al., 2022 (Mirica et al., 2022). Principio de funcionamiento de un LFA tipo sándwich donde se ven todos los materiales que lo conforman.

Visualmente, los LFA suelen contener una línea control y una o varias líneas test (multiplex). La primera actúa como control interno, confirmando el correcto funcionamiento del test, y la segunda, sirve para confirmar la presencia/ausencia del analito/de los analitos de interés. Normalmente, la lectura del resultado suele ser cualitativa, y se puede realizar *de visu*, aunque algunas pruebas permiten obtener resultados cuantitativos o semicuantitativos al acoplarlos a un lector. El lector a usar dependerá del tipo de etiqueta usada (Mirica et al., 2022; Park, 2022).

3.2.4.2 ELISA

Los ELISA son el patrón de oro de los inmunoensayos. Es un método muy estandarizado con elevada presencia en la mayoría de los laboratorios analíticos. Los ensayos ELISA destacan por naturaleza cuantitativa, bajo coste, su elevada eficiencia, la elevada cantidad de muestras analizables de forma simultánea pero, sobre todo, por su alta sensibilidad y especificidad. No obstante, se necesita de un cierto nivel de habilidad para realizar este ensayo de forma consistente, el procedimiento es largo, laborioso y requiere de instalaciones de laboratorio (Hosseini et al., 2018).

Desde su desarrollo en la década de los 70, los ensayos tipo ELISA se han empleado con múltiples propósitos, los primeros métodos detectaban la presencia de hormonas y virus (Hosseini et al., 2018).

Los ELISA pueden estar en cualquiera de los formatos mostrados en la Figura 1.8.

La mayoría de las pruebas ELISA se realizan en microplacas, constituidas por múltiples pocillos, generalmente 96 o 384. El fondo de estos pocillos sirve de superficie sólida para la unión de los anticuerpos de captura, en el formato sándwich, u homólogos del analito, en los ensayos competitivos, así como otros reactivos necesarios. Para poder detectar la señal generada por los anticuerpos de detección, suelen estar unidos a una molécula que dará señal, normalmente colorimétrica, aunque también puede ser fluorescente o quimioluminiscente, o ser detectados a través de un anticuerpo secundario unido a estas etiquetas (Hosseini et al., 2018).

La figura 1.10 muestra el flujo de trabajo de un ensayo ELISA sándwich típico:

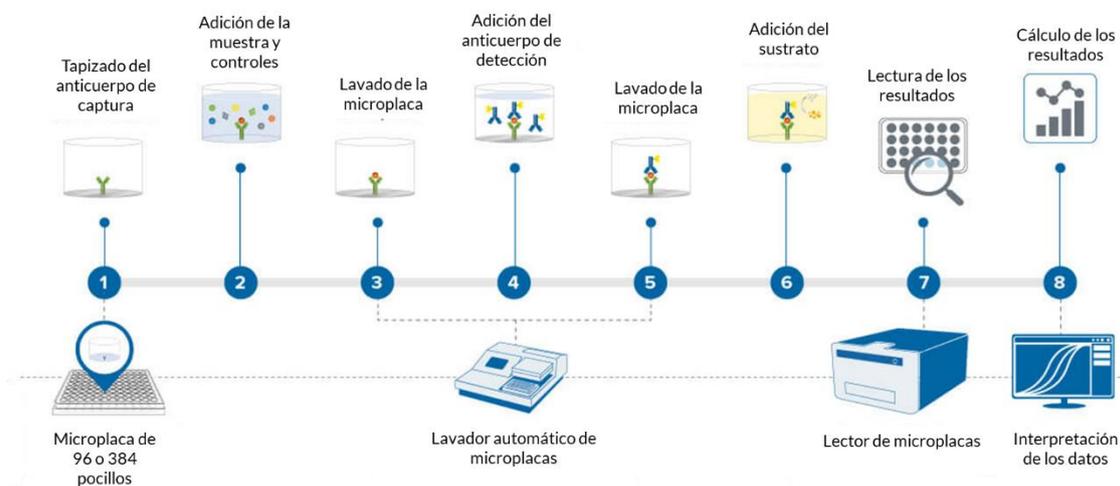


Figura 1.10. Muestra el flujo de trabajo de un ensayo ELISA sándwich. Se puede emplear un lavador de microplacas para eliminar el material no específico de los pocillos, y un lector de microplacas ELISA para detectar el cambio de señal producido cuando está presente el antígeno diana. Además, se utiliza un software de lector de placas para trazar curvas estándar y calcular los resultados.

3.2.4.3 LFIA vs ELISA

A la hora de elegir un tipo de inmunoensayo se analizan las características ofrecidas por la misma. En la Tabla 1.6 se resumen las principales características valoradas en términos generales:

Tabla 1.6. Características inherentes y generalizadas de las técnicas LFIA y ELISA.

	LFIA (sin lector)	ELISA
Uso	Fácil - Personal cualificado NO necesario	Complejo- Profesionales cualificados
Coste	Bajo	Medio-bajo
Portabilidad (Necesidad de instrumentación)	Si	No - Necesario equipamiento de laboratorio
Cantidad de muestra	Poca (40-200 µL)	Media (µL-mL)
Estabilidad-tiempo	Larga (1-3 años)	Larga (1-2 años)

Estabilidad-temperatura	Temperatura ambiente	4-8°C
Implementación	Muy fácil	Fácil - si existe equipamiento y personal
Sensibilidad	Media (>10 ng/mL)	Baja (>0,1 ng/mL)
Especificidad	Alta	Alta
Resultado	(Semi) cualitativo	Cuantitativo
Interpretación	Subjetiva - Sujeta al observador	Objetiva- No sujeta al observador
Diagnóstico	Necesidad de confirmación	Resultado confirmatorio
Variabilidad inter-lote	Puede existir	Muy baja (con anticuerpo monoclonal)
Análisis en tanda	No	Si

LFIA: *Lateral Flow immunoassay*; ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

3.2.5 Conceptos para la evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica

Conocer y determinar algunos términos sobre las características analíticas y clínicas nos permite evaluar la validez y confiabilidad de las pruebas de diagnóstico para un uso determinado. Entre los más importantes se encuentran (UE 2017/ 746, 2017):

- **Valor de corte:** Valor divisorio en la escala de medición de resultados en base al cual los resultados se dividen en diferentes categorías interpretables; normalmente positivos (indican que alguien tiene la afección de interés), o negativos (indican que alguien no tiene la afección de interés).

Parámetros analíticos:

- **Sensibilidad analítica:** La capacidad del método para discernir entre las señales emitidas por las muestras negativas y positivas con la menor concentración de marcador/analito.
 - **Límite de blancos (LoB):** El valor más alto que es probable que se observe para una muestra blanca/negativa, con una probabilidad establecida (Figura 1.11).
 - **Límite de cuantificación inferior (LLOQ):** La concentración más baja en la que el analito no sólo puede detectarse de forma fiable y distinguible de forma estadísticamente significativa del LoB, sino en la que, además, se cumplen algunos objetivos predefinidos de sesgo y precisión. Puede coincidir con el valor de corte (Figura 1.11).

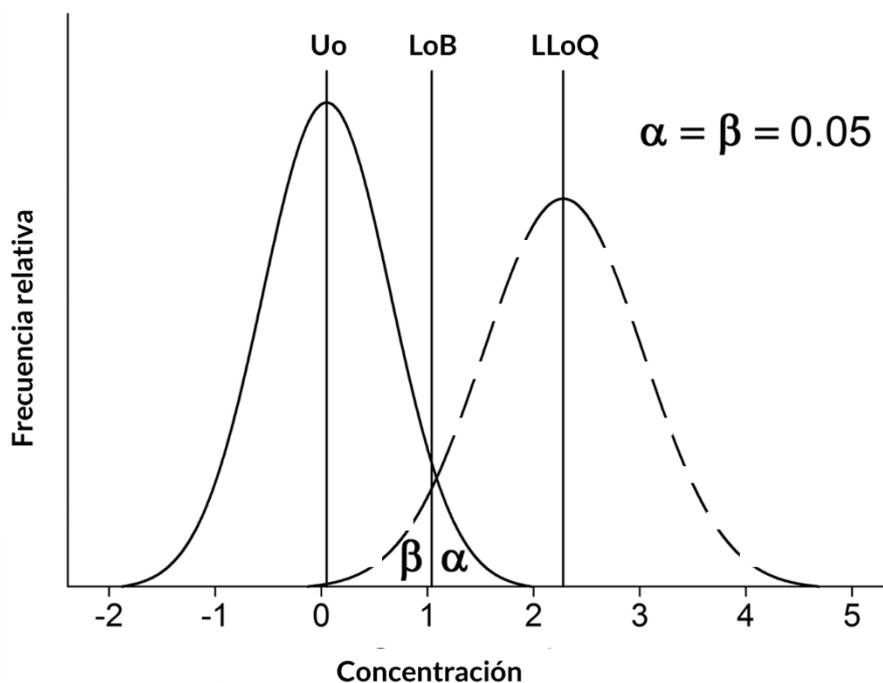


Figura 1.11. Relación entre LoB y LLoQ. La línea continua representa la distribución de resultados para las muestras negativas y se usa para definir el LoB. La línea discontinua representa la distribución de resultados para las muestras positivas con menor cantidad de marcador/analito distinguible y se emplea para definir el LLoQ.

En este caso concreto, el LoB se ha fijado de forma que sólo una pequeña proporción de los resultados de las muestras que definen el LLoQ caigan dentro ("β" con error de 0,05). Estos resultados son considerados falsos negativos. En cambio, el LLoQ se ha definido como la mediana de la señal de las muestras que definen el LLoQ, y por tanto, la pequeña proporción de resultados en blanco en el área "α" seguirían siendo considerados negativos. En caso de que el error "α" traspasara la señal delimitada para el LLoQ se considerarían resultados falso positivo.

- **Exactitud (resultante de la veracidad o sesgo y la precisión):** Evalúa el error total, tanto el error aleatorio, medido a través de la precisión, como el sistemático, medido a través de la veracidad.
- **Rango de medida:** Conjunto de valores de magnitudes del mismo tipo que pueden ser medidos por un instrumento o sistema de medida determinado.
 - **Rango lineal:** se define como la capacidad de proporcionar valores de cantidades medidas que sean directamente proporcionales al valor del mensurando en la muestra.
- **Límite de cuantificación superior (ULoQ):** La concentración más alta en la que el analito no sólo puede detectarse de forma fiable y distinguible de forma estadísticamente significativa de valores más elevados, sino en la que, además, se cumplen algunos objetivos predefinidos de sesgo y precisión. Es el límite de concentración máxima en la que se comprende el rango de medida, a partir del cual deja de ser proporcional la señal a la concentración del analito.

- **Robustez:** La capacidad de un procedimiento analítico de no verse afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su fiabilidad durante el uso rutinario por distintos analistas o usuarios.
- **Estabilidad:** La capacidad de un procedimiento analítico de no verse afectado por el tiempo cuando éste es guardado en las condiciones de almacenamiento óptimas.

Parámetros diagnósticos:

- **Sensibilidad diagnóstica:** Capacidad de un método para identificar la presencia de un marcador diana asociado a una condición concreta.
- **Especificidad diagnóstica:** Capacidad de un producto para reconocer la ausencia de un marcador diana asociada a una condición concreta.
- **Valor predictivo positivo:** La capacidad de un método para separar los verdaderos resultados positivos de los resultados falsos positivos para un atributo determinado en una población determinada.
- **Valor predictivo negativo:** Capacidad de un método de separar los resultados verdaderos negativos de los falsos negativos para un atributo determinado en una población determinada.

El cálculo de estos parámetros diagnósticos se realiza a través de una tabla de contingencia de 2x2 (Tabla 1.7):

Tabla 1.7. Tabla de contingencia para el cálculo de los parámetros diagnósticos.

		Enfermedad	
		Presente	Ausente
Resultado de la prueba	Positivo	VP	FP
	Negativo	FN	VN

VP: verdadero positivo
 FP: Falso positivo
 FN: falso negativo
 VN: Verdadero negativo

$$Sensibilidad\ diagnóstica = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$Especificidad\ diagnóstica = \frac{VN}{VN + FP}$$

$$Valor\ predictivo\ positivo = \frac{VP}{VP + FP}$$

$$Valor\ predictivo\ negativo = \frac{VN}{VN + FN}$$

Cada uso requerirá de unas características determinadas. Por ejemplo, no se le requerirán las mismas cualidades a una prueba de cribado que a una de evaluación del estado de la enfermedad o que a una prueba de diagnóstico. Por ello, también los términos descritos a continuación son de considerable importancia:

- **Usabilidad:** Característica de la interfaz de usuario. Facilita el uso y establece la eficacia, la eficiencia y la satisfacción del usuario en el entorno de uso previsto (UNE-EN 62366-1:2015/A1:2020, 2020).
- **Coste-efectividad:** es un tipo de evaluación económica que compara los costes frente al impacto de intervenciones sanitarias alternativas (GOV.UK - Office for Health Improvement and Disparities, 2020).

4 INMUNOENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DE GLUTEN

4.1 INMUNOENSAYOS PARA EL ETIQUETADO DE ALIMENTOS SIN GLUTEN

Una mayor concienciación y apoyo social a la EC derivó en que la industria alimentaria produjese un incremento en la disponibilidad de alimentos homólogos sin gluten y del desarrollo de un etiquetado adecuado a la disponibilidad de análisis que pudiesen detectar gluten en cantidades potencialmente tóxicas para celíacos.

Con el objetivo de evitar fraudes y garantizar el correcto etiquetado de productos alimentarios “sin-gluten”, el Codex Alimentarius emitió la normativa Codex Standard 118-1979. Esta normativa, por un lado establece un valor de corte de 20 ppm (20 mg/kg; 20.000 ng/mL) para que un alimento pueda ser etiquetado “sin gluten”, y por otro estipula los métodos de análisis aceptados para la determinación de trazas de gluten en alimentos (CODEX STAN 118 - 1979, 2008). Esta legislación ha sido adoptada y puesta en marcha como reglamento de obligatorio cumplimiento por la Unión Europea, así como muchos otros países (UE N° 828/2014, 2014).

En este contexto, se han desarrollado diversos inmunométodos, basados en distintos Ac, para la detección de gluten en distintas matrices alimentarias. No todos se encuentran actualmente aceptados por el Codex Alimentarius.

En la Tabla 1.8 se muestran los principales inmunoensayos presentes en el mercado para la determinación del gluten en alimentos:

Tabla 1.8. Listado de kits comerciales, tipo ELISA y LFIA para la detección de gluten en alimentos, catalogados en base al anticuerpo que emplean.

Ac	Tipo Ac	Epítopo(s)	Test comercial	n° de referencia	Casa comercial	Tipo	LoD (ppm)	LoQ (ppm)
R5	Monoclonal	QQPFP, QQQFP, LQPFP, QLPPF	INgezim Gluten Hidrolizado	R.30.GLH.K2	Eurofins Ingenasa	Comeptitivo	0,25	nd
			RIDASCREENFAST Gliadin sensitive	R7051	R-Biopharm, AG	Sandwich	0,4	2,5
			RIDASCREEN Gliadin Sandwich	R7001	R-Biopharm, AG	Sandwich	1	5
			INgezim Gluten	30.GLU.K.2	Eurofins Ingenasa	Sandwich	3	3
			RIDASCREEN Gliadin Competitive	R7021	R-Biopharm, AG	Comeptitivo	4,6	10
			Veratox for Gliadin R5	8510	Neogen Corp.	Sandwich	5*	nd
			INgezim Gluten Semi Q	30.GSQ.K.2	Eurofins Ingenasa	Sandwich	10	nd
			Rida Quick Gliadin	R7004	R-Biopharm, AG	LFIA	4,4-6,3	n/a
G12	Monoclonal	QPQLPY	GlutenTox ELISA G12 Rapid	KIT3075	Hygiena (antes, Biomedal Diagnostics)	Comeptitivo	nd	0,6
			GlutenTox ELISA Competitive G12	KIT3012	Hygiena (antes, Biomedal Diagnostics)	Comeptitivo	1,6	2,5
			AgraQuant ELISA Gluten G12	10001994	Romer Labs	Sandwich	2	4
			AgraStrip Gluten	10002000 (COKAL0210AS)	Romer Labs	LFIA	4	n/a
			AgraStrip Gluten G12TM	10001995 (COKAL0200AS)	Romer Labs	LFIA	desde 5	n/a
G12 y A1	Monoclonal	QPQLPY QLPYPQP	GlutenTox Pro	KIT3000	Hygiena (antes, Biomedal Diagnostics)	LFIA	desde 3,5	n/a
			GlutenTox Sticks Plus	KIT3005	Hygiena (antes, Biomedal Diagnostics)	LFIA	desde 5	n/a
Skerrit (a.k.a. 401.21)	Monoclonal	PQPQPFPPQ E, PQQPPFPE E	AllerTek Gluten	150619/SE110019	ELISA Technologies, Inc	Sandwich	5	nd
			Veratox for Gliadin	8480	Neogen Corp.	Sandwich	10*	nd
			Reveal 3-D for Gluten	8580	Neogen Corp.	LFIA	5	n/a
			EZ gluten	051101	Elisa Technologies	LFIA	10	n/a
X6	Monoclonal	QXQPFPPXP	X380 Sema test Gluten Ultrasensitive	X380	Xema	LFIA	2	n/a

13F6 y 14G11	Monoclonal	nd	MonoTrace Gluten ELISA Kit	GLU-EK-96	BioFront Technologies	Sandwich	0,36	2
			GLU-EK-96			NimaSensor	LFIA	0,1
MloBS	Policlonal	nd	Wheat Protein ELISA (MloBS)	M2114	Morinaga Institute of Biological Sciences, Inc.	Sandwich	0,26	0,26

Ac: anticuerpo; nd: sin datos; n/a: no aplica; LoD: límite de detección; ppm: partes por millón; LFIA: Lateral Flow Immunoassay

** Los valores de referencia estaban expresados en gliadina, y se han multiplicado al doble para expresarlo en gluten.*

Como se observa en la Tabla 1.8, las pruebas para la detección de gluten se pueden encontrar en formato LFIA y ELISA sándwich y competitivo. Todas ellas permiten la detección de gluten por debajo del valor de corte establecido de 20 ppm para el etiquetado de alimento “sin-gluten”. Ningún formato destaca por ofrecer una mayor sensibilidad analítica. Al clasificarse en base al anticuerpo empleado sí se aprecian diferencias más significativas (13F6 y 14G11: 0,1-0,36 ppm; G12 y/o A1: 0,6-5 ppm; Skerrit: 5-10 ppm), aunque probablemente, la mayoría de estos métodos se podrían ajustar para ofrecer distintas características. Por ejemplo, los métodos basados en el Ac R5 se mueven en un rango de límite de detección (LoD) de entre 0,25-10 ppm.

A diferencia de la mayoría de las pruebas de ELISA tipo sándwich, donde el antígeno es detectado por dos tipos de anticuerpos distintos, uno para la detección y otro para la captura, la mayoría de los test ELISA tipo sándwich para la detección de gluten usan el mismo anticuerpo para ambas funciones. Esta anomalía se debe a la continuada repetición de fragmentos encontrados en las proteínas que conforman el gluten.

4.2 INMUNOENSAYOS IVD PARA LA DETECCIÓN DE GIP DURANTE EL SEGUIMIENTO DE LA EC

Se ha demostrado que los péptidos derivados del gluten (PDG) son excretados a través de las principales vías fisiológicas de eliminación, la renal (orina) y la intestinal (heces). Se desconoce si también pueden ser eliminados por otras vías.

4.2.1 Heces

4.2.1.1 Heces como matriz y presencia de GIP

A pesar de que las heces se presentan como una muestra biológica atractiva para la monitorización de enfermedades GI ya que puede recogerse de forma no invasiva y longitudinal, la aplicación de los análisis basados en las heces está muy limitada en la práctica. Por un lado, la producción de muestras es dependiente del tracto GI del paciente, por lo que no se puede pedir su toma durante el encuentro clínico, y por otro, se ha demostrado que en aquellas enfermedades GI que necesitan del análisis periódico de muestras de heces, la entrega de muestras por parte de los pacientes tiene frecuentes omisiones. Las encuestas destinadas a conocer el motivo de este rechazo han revelado que dos de los principales motivos del escaso cumplimiento del cribado fecal repetido han sido la evitación, el olvido, la repulsión y la vergüenza de la recogida de heces (Grego et al., 2022). Asimismo, los técnicos de laboratorio también son reacios a tratar las muestras de

heces, no sólo por repulsión, sino también por la necesidad de pretratamiento, al ser una matriz sólida/pegajosa, suelen requerir de un proceso de extracción previo.

Las heces humanas están formadas por los residuos y la humedad que quedan tras la absorción de los nutrientes de los alimentos y las bacterias que coexisten en el intestino (microbioma intestinal), por lo que su composición es dependiente de los alimentos ingeridos y la microbiota.

La presencia de GIP en heces ha sido demostrada por inmunoensayos (Comino et al., 2012; Coto et al., 2021). La secuenciación de los GIP que llegan a las heces es una tarea compleja y no se tiene constancia de que se haya realizado en ningún estudio. No obstante, al haber sido detectadas por inmunoensayos específicos, se ha modelizado la cantidad de GIP que puede llegar a las heces tras una ingesta determinada (Syage et al., 2018). El modelo es el siguiente:

$$y = 0,0649x^2 + 1,0461x$$

Donde:

y, hace referencia a la cantidad de GIP excretada en $\mu\text{g/g}$

x, la cantidad de gluten ingerida en g

Por lo que un consumo de 150 mg podría resultar en un promedio de concentración de 0,16 $\mu\text{g GIP/g}$.

4.2.1.2 Inmunoensayos IVD comerciales para la detección de GIP en heces

Los inmunoensayos comerciales existentes en el mercado para la detección de GIP en heces están fabricados por Biomedal SL (Sevilla, España) y son:

- iVYLISA GIP Stool: método cuantitativo en formato ELISA Sándwich, basado en el anticuerpo G12.
- iVYCHECK GIP Stool: ensayo cualitativo en formato LFIA basado en los anticuerpos G12 y A1.

4.2.2 Orina

La orina está ganando cada vez más atención como muestra para el diagnóstico y/o monitorización de enfermedades, ya que permite su recolección de forma fácil, no invasiva, en grandes cantidades y de forma repetida a lo largo del tiempo (Santucci et al., 2014).

Por contra, la orina es una matriz compleja, altamente heterogénea, lo que plantea retos para la determinación analítica de proteínas y otros constituyentes (Chatziharalambous et

al., 2016). La orina está formada por diversos compuestos inorgánicos y orgánicos, desde moléculas de baja masa molar hasta polímeros; la orina puede contener células, como células sanguíneas o bacterias, iones inorgánicos como K⁺, Na⁺, Cl⁻, y Ca²⁺, así como péptidos procedentes de más de 3000 proteínas, entre otros (Aitekenov et al., 2021; Santucci et al., 2014). Además, es importante tener en cuenta que, tanto el pH como la concentración de proteínas en la orina tomada de los pacientes, puede variar mucho dependiendo de la dieta, el ejercicio y la hora del día en que el paciente haya orinado (Jaques et al., 2023; Kim et al., 2014; Wang et al., 2021). Asimismo, tanto estos como otros aspectos de las orinas pueden ir variando desde su momento de recolección en dependencia de su almacenamiento.

La elevada heterogeneidad de estas muestras, su variabilidad, además de la alta frecuencia de interferentes de matriz, complica la reproducibilidad y robustez de los inmunoensayos en orina (Aitekenov et al., 2021; Chatziharalambous et al., 2016).

La presencia de los PDG en orina ha sido demostrada tanto en personas con EC como en personas sanas. La primera constancia de la presencia de péptidos derivados del gluten data de 1998, se estudió por cromatografía en orinas de enfermos celíacos (Reichelt et al., 1998). Posteriormente, ésta ha sido confirmado mediante inmunometodos basados en los anticuerpos monoclonales G12 y A1, los cuales fueron diseñados para detectar de forma específica secuencias del péptido inmunogénico 33-mer de la α-gliadina (Coto et al., 2021; Moreno et al., 2017; B. Morón et al., 2008; B. C. Morón et al., 2008; Soler et al., 2016). Estos métodos pudieron demostrar la presencia de PDG en orina y estimar su secuencia, pero no determinarla.

Recientemente, Palanski *et al.*, 2022, han desarrollado un método en HPLC-MS “*High-Performance Liquid chromatography–mass spectrometry*” que ha permitido precisar algunas de las secuencias de los PDG que se encuentran en orina (Tabla 1.9) (Palanski et al., 2022). La mayoría de las secuencias determinadas son detectables por G12 y/o A1.

Tabla 1.9. Tabla modificada de Palanski et al., 2022 (Palanski et al., 2022). Donde se visualizan los PDG encontrados en las orinas de voluntarios que habían ingerido gluten y el número de epítomos para G12 y A1, marcados en negrita y rojo, respectivamente.

Tamaño molécula r (KDa)	Secuencia	Nº de epítomos para G12	Nº de epítomos para A1	Nº de voluntarios
4,28	SQQPEQTISQQ PPQQFPFQQ PHQPQQPYPPQQPYGSSL	2	1	6/8
3,46	PQQPPFSQQQQQQQQQQPPFSQQQQPVL	0	0	3/8
3,41	PyrQQQQPPFSQQPPISQQQQPPFSQQQQPQF	0	0	1/8
3,33	TQQ PPFPQQ PPFPQTQQPPFPQ	3	2	3/8

3,15	FLQPQQPFPQQPQQPYPQQPQQPFPQ	3	1	1/8
3,1	TQQPQQPFPQQPQQPFPQQPQQPFPQ	3	2	3/8
2,76	LGQQQPFPPQQPYPQPQPFPSQQP	0	1	5/8
2,51	SQQPQQPFPQQPHQPQQPYPQ	2	1	5/8
2,35	P[I/L]QPQQPFPQQPQQPFPQPQ ^c	2	2	2/8
2,35	PyrQTFPHQPQQVQPQQPQQP	0	0	5/8
2,29	GQQQPFPPQQPYPQPQPFPS	0	1	8/8
2,21	GQQQPFPPQQPYPQPQPFPS	0	1	7/8
1,89	QPFPPQQPYPQPQPFPS	0	1	2/8
1,46	SCHVMQQQCCQ	0	0	5/8
1,39	CHVMQQQCCQ ^d	0	0	1/8
1,33	SCHVMQQQCC	0	0	6/8

Para que el gluten pueda llegar a la orina, éste primero debe ser digerido en el tracto gastrointestinal (GI), después ser absorbido y ser o no metabolizado, y finalmente, tras un proceso de filtración de la sangre en el riñón, se excretaría en orina.

Las gliadinas tienen tamaños moleculares de entre 3-8 KDa y gluteninas entre 100-10.000KDa; las prolaminas suelen estar desde los 10 hasta más de 100KDa (Tapia-Hernández et al., 2019; Wieser, 2007). No obstante, deben ser digeridas hasta aminoácidos y/o oligopéptidos para poder ser absorbidos por el intestino. Se espera que estos aa y oligopéptidos pequeños lleguen al torrente sanguíneo por la vía transcelular y paracelular (Schumann et al., 2008). Sin embargo, se deben tener en cuenta varios factores que podrían alterar la presencia en cuanto al tipo de PDG absorbidos por cada ser humano:

- 1) Debido a la desregulación que sufren los enfermos celíacos en la digestión y absorción, se estima que la digestión de los péptidos no sea tan efectiva y que péptidos más grandes pudieran ser absorbidos en mayores cantidades. Por tanto, bajo las mismas condiciones, se espera que los PDG encontrados en los enfermos celíacos sean distintos a los encontrados en aquellas personas consideradas sanas, o con EC no activa.
- 2) Las prolaminas tienen secuencias variables entre géneros y especies. Por ejemplo, el péptido 33-mer de la α -gliadina, no se encuentra en todas las especies de trigo (Schalk et al., 2017), por lo que las secuencias que se generen dependerán de las secuencias del gluten de origen. Cabe recordar que en este estudio (Tabla 1.9) todos los voluntarios ingirieron la misma cantidad y tipo de gluten, por lo que la heterogeneidad de las secuencias podría haber sido más amplia si estos hubieran consumido distintas variedades de cereal.

- 3) Cada ser humano hidrolizará el gluten de forma diferente, por lo que las secuencias de PDG que se encuentren en las orinas podrán ser compartidas entre varios individuos o ser exclusivas de un único voluntario (Tabla 1.9) (Palanski et al., 2022).
- 4) Asimismo, las secuencias determinadas tienen un tamaño molecular < 5KDa, pero podría haber secuencias más largas, ya que el protocolo diseñado para el pretratamiento de las muestras tenía un paso para la exclusión molecular de aquellas partículas mayores a 10 KDa (Palanski et al., 2022).

Una vez absorbidos, aquellos PDG metabolizados o no metabolizados, se excretarían en orina. La formación de la orina es un proceso de tres etapas que se da en el riñón: filtración glomerular, secreción tubular activa y reabsorción tubular pasiva.

La filtración glomerular es la etapa en la que la sangre llega a la nefrona y es filtrada en el glomérulo renal, favoreciendo el paso de los componentes considerados desechos a la orina. La estructura de la barrera de filtración glomerular limita el paso de los componentes por tamaño y carga eléctrica y, por ende, la composición del filtrado glomerular. Las moléculas con radio molecular superior a 45 Angströms (Å) no pueden filtrarse, independientemente de su carga. Por otro lado, las moléculas catiónicas se filtran con mayor facilidad, debido a la presencia de glucoproteínas con carga negativa en la barrera. Al contrario, la filtración de las moléculas aniónicas queda muy restringida. Casi todos los solutos, se filtran con facilidad en esta etapa, excepto las proteínas plasmáticas que están negativamente cargadas (López-Novoa, 2013; Mestres-Miralles & Duran-Hortolà, 2013).

Tras este paso, tiene lugar la secreción tubular activa, donde los productos de deshecho que no fueron filtrados anteriormente pueden pasar por difusión facilitada por osmosis al filtrado glomerular. A pesar de que multitud de moléculas orgánicas son filtradas constantemente, la orina normal apenas contiene cantidades relevantes de ellas debido al proceso de reabsorción que se produce en los túbulos renales. En el túbulo proximal se reabsorben prácticamente la totalidad de los aminoácidos y péptidos filtrados, que vuelven a la circulación sistémica (López-Novoa, 2013; Mestres-Miralles & Duran-Hortolà, 2013). Asumiendo una filtración media por día de 180 L, se estima que entrarían unos 2 g de proteínas a la cápsula de Bowman, de las cuales 1,9 g se reabsorberían y 0,1 g se excretarían en la orina (Derrickson, 2018). Por lo tanto, en una persona normal la concentración de proteína en la orina es muy baja (menos de 100 mg/L para una producción de orina media de 1,5 L/día) en comparación con otros fluidos corporales como el plasma, que puede llegar a ser mil veces más alta. De hecho, una excreción proteica

superior en la orina puede ser indicativo de una disfunción renal. A este respecto, se ha reconocido la existencia de una relación entre algunos fenotipos de enfermedad celíaca y las enfermedades renales, como la glomerulonefritis y la nefropatía diabética (Nurmi et al., 2022).

Tras todo este circuito se puede predecir que la cantidad de GIP que llega a la orina, tras la ingesta de gluten es ínfima. Syage *et al.*, 2018 realizaron estimaciones para poder relacionar la concentración de GIP excretada en orina a una determinada ingesta de gluten (Syage et al., 2018). Estas predicciones las fundamentó en la detección de GIP por inmunométodos basados en G12 y A1. Relacionaron un consumo promedio de 150 mg de gluten a una presencia de GIP de 3,2 ng/mL.

4.2.2.1 Inmunoensayos comerciales para la detección de GIP en orina

El único inmunoensayo comercial existente en el mercado para la detección de GIP en orina está fabricado por Biomedal SL (Sevilla, España) y es:

- iVYCHECK GIP Urine®: ensayo cualitativo en formato LFIA basado en los anticuerpos G12 y A1.

5 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE TEST DE DIAGNÓSTICO IN VITRO EN LA INDUSTRIA

A principios del siglo XXI se produjo un cambio radical en la comunidad de los laboratorios clínicos. Los conceptos de la metrología, la ciencia de la medición, empezaron a aplicarse con más cuidado a la comunidad del IVD es decir, a los fabricantes, a través de diversas normativas de variación según el país de fabricación y/o venta (Armbruster & Donnelly, 2016).

5.1 PRODUCTO MÍNIMO VIABLE (MVP)

El Producto Mínimo Viable (MVP, por sus siglas en inglés) es la versión más básica del producto que la empresa quiera lanzar al mercado. El objetivo de este lanzamiento es poner a prueba el producto en un escenario real para obtener retroalimentación de los posibles consumidores y mejorar así las características del producto final.

La respuesta recibida tras el lanzamiento del MVP, ayudará al equipo de I+D y/o de marketing a concretar con mayor facilidad las carencias y puntos fuertes del producto, para poder agudizarlas o ensalzarlas en el producto final, respectivamente.

Después de la obtención del *feedback* de los usuarios iniciales del producto y haber introducidos los cambios deseados, el producto final estará listo para su lanzamiento al mercado (Figura 1.12).

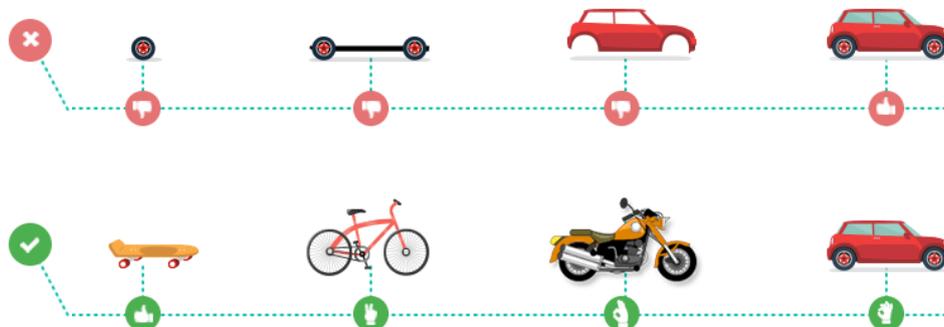


Figura 1.12. Figura explicativa del concepto de la utilidad del MVP en la transición a un producto final. Se irán seleccionando las características básicas del MVP que deben constituir el producto final. La figura indica el desarrollo de un producto que ayudará a la movilidad de las personas. Se observa primero un patinete que ayuda a recorrer un camino de forma más rápida que andando, la bici y la moto ayudarán a recorrer dicho camino de forma más rápida aun y realizando menos esfuerzo que con el patinete, y finalmente el coche proporciona una mayor eficacia y confort al usuario.

Un producto MVP debe cumplir tres características distintas: que tenga suficientes características para que llame la atención de los consumidores y lo compren, que tenga algún tipo de mecanismo de retroalimentación en el que los usuarios puedan enviar sus comentarios sobre el producto, y por último, que tenga suficientes beneficios futuros para los consumidores que adquieran el producto en primer lugar.

5.2 TEST DE DIAGNÓSTICO EN FORMATO “FOR RESEARCH USE ONLY (RUO)”

El etiquetado RUO (para uso exclusivo de investigación, por sus siglas en inglés), hace mención a que ese determinado producto sirve básicamente para investigación, como investigación básica de laboratorio, investigación de rendimiento, investigación de diseño, etc.

Etiquetar productos como RUO significará que los productos apenas están sujetos a controles reglamentarios en virtud del Reglamento sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. En Europa el Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017(UE 2017/ 746, 2017). Muchos fabricantes y operadores apuestan por esta alternativa debido a que al no tener que cumplir con tantos requisitos legales son más baratos y requieren de menor demostración técnica.

En Europa, el documento de orientación MEDDEV 2.14/2 (IVD Guidance: Research Use Only products - A guide for manufacturers and notified bodies) ofrece pistas sobre los productos que se pueden englobar en la definición de RUO (Guidance Document - In Vitro

Diagnostic Medical Devices - Research Use Only Products - MEDDEV 2.14/2 Rev.1, 2004; Distribution of In Vitro Diagnostic Products Labeled for Research Use Only or Investigational Use Only., 2013).

5.3 TEST DE DIAGNÓSTICO BAJO EL REGLAMENTO IVDR REGLAMENTO (UE) 2017/746, ISO13845 Y MARCADO CE

La finalidad de cualquier producto sanitario, entre ellos los productos de IVD, es beneficiar y mejorar la calidad de vida de sus pacientes y/o usuarios. Para reducir al mínimo los riesgos de uso de dichos productos, las autoridades han endurecido la normativa en los últimos años con el objetivo de que los fabricantes incorporen una mayor calidad y eliminen riesgos asociados a los productos que lanzan al mercado. A pesar de que haya similitudes, cada país tiene una legislación propia respecto. En este escenario, los fabricantes y distribuidores de productos sanitarios europeos estarán obligados a tener el marcado CE del producto sanitario (para diagnóstico IVD) que requerirá del cumplimiento el Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017, antes del 2025-2027 (UE 2017/ 746, 2017). Básicamente esta normativa exige tener clasificado el Producto Sanitario o Producto Sanitario para el Diagnóstico in vitro, la elaboración de la documentación técnica, la evaluación de la conformidad y el registro del producto. La fecha exacta de cumplimiento de la normativa dependerá de la categoría a la que se asocie el producto sanitario en cuestión; esta clasificación que atiende al riesgo que supone para el paciente (UE 2017/ 746, 2017).

Dado que el desarrollo de productos sanitarios es un procedimiento delicado y complejo, la norma ISO 13485 fue actualizada en 2016, con el objetivo de capacitar a las organizaciones a cumplir con esta normativa de la UE 2017/746 (ISO 13485:2016, 2016; UE 2017/ 746, 2017).

Se ha de tener en cuenta que las normas y reglamentos son de amplia interpretación, por lo que, a continuación, se resume el sistema generado en Biomedal SL tras la interpretación del reglamento 2017/746 y la ISO 13485 (ISO 13485:2016, 2016; UE 2017/ 746, 2017):

Usando la normativa ISO 13485 como base para aplicar el reglamento 2017/746, en Biomedal se ha creado un flujo de trabajo, para encauzar de forma adecuada estas primeras fases del desarrollo de productos IVD (Figura 1.13).



Figura 1.13. Fases para el desarrollo de un producto IVD.

Estas fases actúan como los pilares fundamentales ayudando a guiar y mantener centrados los objetivos de los proyectos que tienen como fin alcanzar el mercado. Ayudan a ejecutarlos cada paso de forma adecuada y eficiente, ofreciendo una visión general de los obstáculos y oportunidades que pueden surgir. De esta forma se definen 5 fases principales de desarrollo de productos sanitarios a seguir.

Dentro de cada fase existen distintas etapas y procesos que deben de ser correctamente documentados, pero serán amovibles dependiendo de las características del producto objetivo a desarrollar.

5.3.1 **Fase 1: Concepto, viabilidad y diseño**

La “fase 1” del proceso de desarrollo de un producto sanitario consiste en la conceptualización del producto. Para ello será necesario planificar, investigar y documentarse.

Esta fase se podría dividir en dos bloques principales, uno en cuanto a la definición del producto y otro para ver si se disponen de los medios para su desarrollo.

Definición del producto y sus criterios de entrada (diseño conceptual). Servirán para establecer el potencial práctico que tiene el producto conceptual, y de base para la realizar las tareas de diseño y desarrollo posteriores y validar el prototipo. Una base sólida de requisitos es la actividad de control del diseño más importante.

1. Definir los requisitos de rendimiento:
 - a. Los requisitos de los clientes.
 - b. El uso previsto.
 - c. Las características necesarias que debe cumplir el producto.
2. Definir los requisitos funcionales:
 - a. Las materias primas necesarias para el desarrollo.
 - b. La(s) tecnologías(s) que garantizarán los máximos resultados.

3. Definir los requisitos de seguridad y normativos: evaluar los riesgos que puedan surgir durante el desarrollo y comercialización del producto.
4. Definir de forma clara y objetiva los hitos a lograr, y establecer la forma de medir su ejecución y viabilidad de alcance. Así se podrá demostrar si son realistas y si se podrán conseguir o no.

Viabilidad del proyecto. Servirá para visualizar la capacidad (técnica, económica etc.) del que se dispone para asumir el desarrollo del producto y la rentabilidad que ofrece.

1. Evaluar la complejidad técnica para el desarrollo del producto y de asumir esa capacidad a nivel técnico.
2. Evaluar la capacidad para la posterior fabricación de productos sanitarios, y de cumplir con la normativa vigente.
3. Evaluar de la necesidad económica para desarrollar ese proyecto y las estrategias de financiación para llevarlo a cabo. Pensar, entre otros gastos, en la necesidad de proteger la propiedad intelectual (PI), o en la necesidad de realizar ensayos clínicos para demostrar la utilidad clínica del mismo.
4. Evaluar los mercados en los que se quiere entrar, y las ganancias que van a aportar el lanzamiento del producto en dichos mercados (impacto económico, nombre etc). Es fundamental analizar los posibles competidores en cada mercado, y conocer las normativas y retos de cada mercado.

Esta primera fase, por tanto, servirá para evaluar las ganancias frente al coste y complejidad técnica que va a suponer el desarrollo, en resumen, incitará o disuadirá en el empeño del desarrollo del producto.

5.3.2 Fase 2: Prueba de concepto, congelación y transferencia del diseño

Si la evaluación de la fase 1 ha sido favorable, se abordará esta segunda fase, en la que se buscará financiación para la creación de prototipos y la demostración de su utilidad.

Los criterios de entrada definidos en la fase 1, se emplearán como punto de partida para el desarrollo del prototipo: se obtendrán las materias primas previamente precisadas (sea comprándolas directamente en el mercado, implementando un proceso de desarrollo y/o fabricación interna o encargándolo a terceros), y se ajustarán a la tecnología indicada para que puedan ejercer la funcionalidad prevista, con la calidad y seguridad exigida.

En caso de que los criterios de salida cumplan con los criterios de entrada, es decir, si se puede objetivamente demostrar el funcionamiento del prototipo, se procederá a la congelación de dicho diseño y a la transferencia a producción.

En caso de que no lo haga, se evaluará si: los criterios de salida son aceptables frente a los requisitos de rendimiento, funcionalidad, seguridad y normativos, se pueden variar las características de entrada (el diseño) para atajar el desarrollo por otra vía, las características son aceptables para otro uso o se abandona el proyecto.

5.3.3 Fase 3: Verificación y validación del diseño

Una vez que el producto haya tomado forma (se dispone de un prototipo y se han realizado algunas pruebas), el diseño se pondrá a prueba con el objetivo de demostrar que resistirá a las presiones que se le exigirán en el mundo real. Por consiguiente, la tercera fase del desarrollo del producto sanitario se centra en la verificación y validación del método.

En la verificación del diseño se tratará de demostrar que el producto cumple los requisitos de diseño (aspectos técnicos), mientras que en la validación se demostrará que el producto satisface las necesidades del usuario (aspectos clínicos). La verificación de productos IVD tratará de demostrar aspectos técnicos como la estabilidad a tiempo real y en transporte, la sensibilidad analítica, el rango dinámico y la robustez de la prueba, entre otros. La validación, en cambio, tratará de demostrar la utilidad clínica para el/los uso(s) previstos. En caso de que en la fase 1 se determinara la necesidad de ensayos clínicos para demostrar la utilidad clínica del producto, será el momento de comenzar la investigación clínica.

Todos los ensayos y estudios que formen parte de la verificación y validación del producto serán meticulosamente diseñados y documentados, garantizando su trazabilidad. Se redactarán protocolos para demostrar el cumplimiento de cada requisito, y se crearán plantillas para el almacenamiento y tratamiento de los datos. Los protocolos deberán mínimamente contar con un procedimiento cerrado y los criterios de aceptación para el requisito en evaluación. Tras la ejecución de este protocolo, se almacenarán y tratarán todos los datos de la forma exigida, y los resultados serán documentados en informes.

Será de vital importancia documentar todos los fallos potenciales que puedan producirse debido a un mal diseño, un proceso de fabricación deficiente o errores que pueda cometer el usuario. Se actualizará, trayendo aún más a la realidad las prácticas de gestión de riesgos. Se reflexionará a fondo sobre ellos, ya que el producto no saldrá al mercado si se considera un riesgo para la seguridad del paciente. Asimismo, se realizarán las actualizaciones necesarias de la estrategia reglamentaria.

5.3.4 Fase 4: Revisión del resultado final y lanzamiento al mercado

La cuarta fase del desarrollo de productos sanitarios se centra en la preparación del material para el lanzamiento del producto al mercado.

Como primer paso, se asegurará que todos los resultados de las pruebas de validación y verificación, así como el proceso de fabricación, el empaquetado y etiquetado, los controles de calidad, el análisis de riesgos, el plan de comercialización, sistemas para la recogida de quejas y sugerencias etc., han de estar finalizados, recopilados y documentados. En resumen, todos los documentos que muestren que el producto cumple las expectativas con todos los requisitos reglamentarios para su lanzamiento al mercado. Es importante revisar esta documentación con cautela y preguntarse, si es necesario volver a realizar alguna prueba o cambio. Esta documentación será revisada y aprobada por una autoridad competente, y en caso de que se realice un cambio significativo a posteriori, habrá que volver a notificárselo y que ésta lo audite.

Toda esta documentación técnica se recopilará en un expediente técnico para presentarla ante la autoridad competente (organismo notificado) que comprobará si está completo y si cumple las expectativas. Tras una evaluación positiva, el organismo notificado otorgará una licencia para poder comercializar el método. Se podrá decir que el producto cumple el reglamento IVDR, ofreciendo una mayor seguridad a los clientes.

Tras la revisión por el organismo notificado se comenzará el marketing y la creación de la(s) marca(s), en definitiva, todo aquel material que sea necesario para el lanzamiento del producto al mercado. Es sustancial que toda la información que se ponga en la documentación de marketing tenga un respaldo técnico. No se reivindicará ninguna información sin pruebas que la respalden.

Las agencias reguladoras suelen considerar los materiales de marketing una forma de etiquetado, y tienen requisitos estrictos para ello en su reglamento, coyuntura que sirve para comprender la trascendencia de la información redactada en el material de marketing.

5.3.5 Fase 5: Lanzamiento y post-vigilancia

Una vez realizada la revisión del expediente técnico, obtenido el certificado para la comercialización y la documentación de marketing preparada, el producto estará listo para su lanzamiento al mercado.

Una vez en el mercado, el método quedará al alcance de los usuarios, así que se debe estar preparados para recibir comentarios de los clientes, introducir mejoras y revisar continuamente los sistemas internos de calidad. Se dispondrá de un sistema de calidad interno sólido para llevar a cabo las mejoras que se vean pertinentes.

5.4 IMPLICACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE I+D EN EL REGLAMENTO IVDR

El departamento de I+D estará sobre todo implicado en las fases 1-4, en especial con todos aquellos aspectos que tengan relación con las especificaciones técnicas del producto. Comenzando por la definición del producto y sus criterios de entrada (diseño conceptual), pasando por el desarrollo de un prototipo, su transferencia a producción y finalizando por el análisis de sus características técnicas y clínicas a través de los procesos de verificación y validación.

REFERENCIAS

- Abadie, V. & Jabri, B. (2014). IL-15 a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunological Reviews*, 260, 221–234. <https://doi.org/10.1111/imr.12191>
- Adelman, D. C., Murray, J., Wu, T. T., Mäki, M., Green, P. H. & Kelly, C. P. (2018). Measuring change in small intestinal histology in patients with celiac disease. *American Journal of Gastroenterology*, 113(3), 339–347. <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.480>
- Aitekenov, S., Gaipov, A. & Bukasov, R. (2021). Talanta Review: Detection and quantification of proteins in human urine. *Talanta*, 223(P1), 121718. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121718>
- Al-Toma, A., Volta, U., Auricchio, R., Castillejo, G., Sanders, D. S., Cellier, C., Mulder, C. J. & Lundin, K. E. A. (2019). European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. *United European Gastroenterology Journal*, 7(5), 583–613. <https://doi.org/10.1177/2050640619844125>
- Aljada, B., Zohni, A. & El-Matary, W. (2021). The Gluten-Free Diet for Celiac Disease and Beyond. *Nutrients*, 13(11), 3993. <https://doi.org/10.3390/nu13113993>
- Almagro, J. C. (2004). Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: Implications for the rational design of antibody repertoires. *Journal of Molecular Recognition*, 17(2), 132–143. <https://doi.org/10.1002/jmr.659>
- Amundsen, S. S., Monsuur, A. J., Wapenaar, M. C., Lie, B. A., Ek, J., Gudjónsdóttir, A. H., Ascher, H., Wijmenga, C. & Sollid, L. M. (2006). Association Analysis of MYO9B Gene Polymorphisms with Celiac Disease in a Swedish/Norwegian Cohort. *Human Immunology*, 67(4–5), 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.03.020>
- Andrén Aronsson, C., Lee, H. S., Hård Af Segerstad, E. M., Uusitalo, U., Yang, J., Koletzko, S., Liu, E., Kurppa, K., Bingley, P. J., Toppari, J., Ziegler, A. G., She, J. X., Hagopian, W. A., Rewers, M., Akolkar, B., Krischer, J. P., Virtanen, S. M., Norris, J. M. & Agardh, D. (2019). Association of gluten intake during the first 5 years of life with incidence of celiac disease autoimmunity and celiac disease among children at increased risk. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 322(6), 514–523. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.10329>

- Arentz-Hansen, H., Fleckenstein, B., Molberg, Ø., Scott, H., Koning, F., Jung, G., Roepstorff, P., Lundin, K. E. A. & Sollid, L. M. (2004). The Molecular Basis for Oat Intolerance in Patients with Celiac Disease. *PLoS Medicine*, 1(1), e1. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0010001>
- Arentz-Hansen, H., Körner, R., Molberg, Ø., Quarsten, H., Vader, W., Kooy, Y. M. C., Lundin, K. E. A., Koning, F., Roepstorff, P., Sollid, L. M. & McAdam, S. N. (2000). The intestinal T cell response to α -gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *Journal of Experimental Medicine*, 191(4), 603–612. <https://doi.org/10.1084/jem.191.4.603>
- Arentz-Hansen, H., McAdam, S. N., Molberg, Ø., Fleckenstein, B., Lundin, K. E. A., Jørgensen, T. J. D., Jung, G., Roepstorff, P. & Sollid, L. M. (2002). Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*, 123(3), 803–809. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.35381>
- Armbruster, D. & Donnelly, J. (2016). Harmonization of Clinical Laboratory Test Results: The Role of the IVD Industry. *Ejifcc*, 27(1), 37–47.
- Bai, J. C. & Ciacci, C. (2017). World Gastroenterology Organisation Global Guidelines Celiac Disease February 2017. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 51(9), 755–767. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000919>
- Bascuñán, K. A., Roncoroni, L., Branchi, F., Doneda, L., Scricciolo, A., Ferretti, F., Aray, M. & Elli, L. (2018). The 5 Ws of a gluten challenge for gluten-related disorders. *Nutrition Reviews*, 76(2), 79–87. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux068>
- Bascuñán, K. A., Vespa, M. C. & Araya, M. (2017). Celiac disease: understanding the gluten-free diet. *European Journal of Nutrition*, 56(2), 449–459. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1238-5>
- Biesiekierski, J. R. (2017). What is gluten? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 32(1), 78–81. <https://doi.org/10.1111/jgh.13703>
- Bilgic, H., Hakki, E. E., Pandey, A., Khan, M. K. & Akkaya, M. S. (2016). Ancient DNA from 8400 Year-Old Çatalhöyük Wheat: Implications for the origin of neolithic agriculture. *PLoS ONE*, 11(3), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151974>
- Bodd, M., Kim, C., Lundin, K. E. A. & Sollid, L. M. (2012). T-cell response to gluten in patients with HLA-DQ2.2 reveals requirement of peptide-MHC stability in celiac disease. *Gastroenterology*, 142(3), 552–561. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.11.021>

- Breiteneder, H., Peng, Y. Q., Agache, I., Diamant, Z., Eiwegger, T., Fokkens, W. J., Traidl-Hoffmann, C., Nadeau, K., O'Hehir, R. E., O'Mahony, L., Pfaar, O., Torres, M. J., Wang, D. Y., Zhang, L. & Akdis, C. A. (2020). Biomarkers for diagnosis and prediction of therapy responses in allergic diseases and asthma. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 75(12), 3039–3068. <https://doi.org/10.1111/all.14582>
- Brown, N. K., Guandalini, S., Semrad, C. & Kupfer, S. S. (2019). A clinician's guide to celiac disease HLA genetics. *American Journal of Gastroenterology*, 114(10), 1587–1592. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000310>
- Burki, T. K. (2019). Samuel Gee: the modern era for coeliac disease. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, 4(2), 100. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(18\)30424-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30424-2)
- Cabanillas, B. (2020). Gluten-related disorders: Celiac disease, wheat allergy, and nonceliac gluten sensitivity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(15), 2606–2621. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1651689>
- Caio, G., Volta, U., Sapone, A., Leffler, D. A., De Giorgio, R., Catassi, C. & Fasano, A. (2019). Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Medicine*, 17(1), 142. <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1380-z>
- Cancro, M. P. & Tomayko, M. M. (2021). Memory B cells and plasma cells: The differentiative continuum of humoral immunity. *Immunological Reviews*, 303(1), 72–82. <https://doi.org/10.1111/imr.13016>
- Cárdenas-Torres, F. I., Cabrera-Chávez, F., Figueroa-Salcido, O. G. & Ontiveros, N. (2021). Non-celiac gluten sensitivity: An update. *Medicina*, 57(6), 1–20. <https://doi.org/10.3390/medicina57060526>
- Castro, C. and G. M. (2010). Diagnostic Testing and Interpretation of Tests for Autoimmunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.041>.
- Catassi, C., Elli, L., Bonaz, B., Bouma, G., Carroccio, A., Castillejo, G., Cellier, C., Cristofori, F., de Magistris, L., Dolinsek, J., Dieterich, W., Francavilla, R., Hadjivassiliou, M., Holtmeier, W., Körner, U., Leffler, D. A., Lundin, K. E. A., Mazzarella, G., Mulder, C. J., ... Fasano, A. (2015). Diagnosis of non-celiac gluten sensitivity (NCGS): The salerno experts' criteria. *Nutrients*, 7(6), 4966–4977. <https://doi.org/10.3390/nu7064966>
- Catassi, C., Kryszak, D., Bhatti, B., Sturgeon, C., Helzlsouer, K., Clipp, S. L., Gelfond, D.,

- Puppa, E., Sferruzza, A. & Fasano, A. (2010). Natural history of celiac disease autoimmunity in a USA cohort followed since 1974. *Annals of Medicine*, 42(7), 530–538. <https://doi.org/10.3109/07853890.2010.514285>
- Chatziharalambous, D., Lygirou, V., Latosinska, A., Stravodimos, K., Vlahou, A., Jankowski, V. & Zoidakis, J. (2016). Analytical performance of ELISA assays in Urine: One more bottleneck towards biomarker validation and clinical implementation. *PLoS ONE*, 11(2), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149471>
- Chaudhry, N. A., Jacobs, C., Green, P. H. R. & Rampertab, S. D. (2021). All Things Gluten: A Review. *Gastroenterology Clinics of North America*, 50(1), 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.10.007>
- Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A. & Gilliland, G. L. (2019). Antibody structure and function: The basis for engineering therapeutics. *Antibodies*, 8(4), 55. <https://doi.org/10.3390/antib8040055>
- Chlubnová, M., Christophersen, A. O., Sandve, G. K. F., Lundin, K. E. A., Jahnsen, J., Dahal-Koirala, S. & Sollid, L. M. (2023). Identification of gluten T cell epitopes driving celiac disease. *Science Advances*, 9(4), 1–9. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade5800>
- Choung, R. S., Ditah, I. C., Nadeau, A. M., Rubio-Tapia, A., Marietta, E. V., Brantner, T. L., Camilleri, M. J., Rajkumar, S. V., Landgren, O., Everhart, J. E. & Murray, J. A. (2015). Trends and racial/ethnic disparities in gluten-sensitive problems in the United States: Findings from the national health and nutrition examination surveys from 1988 to 2012. *American Journal of Gastroenterology*, 110(3), 455–461. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.8>
- Ciccocioppo, R., Di Sabatino, A. & Corazza, G. R. (2005). The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 140(3), 408–416. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02783.x>
- Clemente, M. G., De Virgiliis, S., Kang, J. S., Macatagney, R., Musu, M. P., Di Pierro, M. R., Drago, S., Congia, M. & Fasano, A. (2003). Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*, 52(2), 218–223. <https://doi.org/10.1136/gut.52.2.218>
- Cohen, I. S., Day, A. S. & Shaoul, R. (2019). Gluten in celiac disease more or less? *Rambam Maimonides Medical Journal*, 10(1), 1–6. <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10360>
- Collin, P., Vilppula, A., Luostarinen, L., Holmes, G. K. T. & Kaukinen, K. (2018). Review

- article: coeliac disease in later life must not be missed. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 47(5), 563–572. <https://doi.org/10.1111/apt.14490>
- Comino, I., Real, A., Vivas, S., Síglez, M. Á., Caminero, A., Nistal, E., Casqueiro, J., Rodríguez-Herrera, A., Cebolla, Á. & Sousa, C. (2012). Monitoring of gluten-free diet compliance in celiac patients by assessment of gliadin 33-mer equivalent epitopes in feces. *American Journal of Clinical Nutrition*, 95(3), 670–677. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.026708>
- Cooper, M. D. (2015). The early history of B cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(3), 191–197. <https://doi.org/10.1038/nri3801>
- Corazza, G. R., Villanacci, V., Zambelli, C., Milione, M., Luinetti, O., Vindigni, C., Chioda, C., Albarello, L., Bartolini, D. & Donato, F. (2007). Comparison of the Interobserver Reproducibility With Different Histologic Criteria Used in Celiac Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5(7), 838–843. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2007.03.019>
- Coto, L., Mendia, I., Sousa, C., Bai, J. C. & Cebolla, A. (2021). Determination of gluten immunogenic peptides for the management of the treatment adherence of celiac disease: A systematic review. *World Journal of Gastroenterology*, 27(37), 6306–6321. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i37.6306>
- de Sousa, T., Ribeiro, M., Sabeça, C. & Igrejas, G. (2021). The 10,000-year success story of wheat! *Foods*, 10(9), 2124. <https://doi.org/10.3390/foods10092124>
- Derrickson, B. (2018). Aparato urinario. In Editorial médica panamericana (Ed.), *Fisiología humana* (pp. 664–701). Panamericana.
- Di Nardo, F., Chiarello, M., Cavalera, S., Baggiani, C. & Anfossi, L. (2021). Ten years of lateral flow immunoassay technique applications: Trends, challenges and future perspectives. *Sensors*, 21(15). <https://doi.org/10.3390/s21155185>
- Dørum, S., Bodd, M., Fallang, L.-E., Bergseng, E., Christophersen, A., Johannesen, M. K., Qiao, S.-W., Stamnaes, J., de Souza, G. A. & Sollid, L. M. (2014). HLA-DQ Molecules as Affinity Matrix for Identification of Gluten T Cell Epitopes. *The Journal of Immunology*, 193(9), 4497–4506. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301466>
- Eisen, H. N. (2014). Affinity enhancement of antibodies: how low-affinity antibodies produced early in immune responses are followed by high-affinity antibodies later and in memory B-cell responses. *Cancer Immunology Research*, 2(5), 381–392.

<https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0029>

Ekins, R. P. (1960). The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clinica Chimica Acta*, 5(4), 453–459. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(60\)90051-6](https://doi.org/10.1016/0009-8981(60)90051-6)

Elli, L., Branchi, F., Tomba, C., Villalta, D., Norsa, L., Ferretti, F., Roncoroni, L. & Bardella, M. T. (2015). Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. *World Journal of Gastroenterology*, 21(23), 7110–7119. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i23.7110>

Espino, L. & Núñez, C. (2021). The HLA complex and coeliac disease. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 358). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.09.009>

Guidance document - In vitro diagnostic medical devices - Research Use Only products - MEDDEV 2.14/2 rev.1, 1 (2004).

Fasano, A., Not, T., Wang, W., Uzzau, S., Berti, I., Tommasini, A. & Goldblum, S. E. (2000). Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet*, 355(9214), 1518–1519. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02169-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02169-3)

Fasano, A. & Shea-Donohue, T. (2005). Mechanisms of disease: The role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*, 2(9), 416–422. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0259>

Distribution of In Vitro Diagnostic Products Labeled for Research Use Only or Investigational Use Only., (2013).

Frank, S. A. (2002). Specificity and Cross-Reactivity. In *Immunology and Evolution of Infectious Disease* (pp. 33–56). Princeton University Press. <https://doi.org/10.2307/j.ctv15r5djw.7>

Fuchs, V., Kurppa, K., Huhtala, H., Collin, P., Mäki, M. & Kaukinen, K. (2014). Factors associated with long diagnostic delay in celiac disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 49(11), 1304–1310. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.923502>

Fuchs, V., Kurppa, K., Huhtala, H., Mäki, M., Kekkonen, L. & Kaukinen, K. (2018). Delayed

- celiac disease diagnosis predisposes to reduced quality of life and incremental use of health care services and medicines: A prospective nationwide study. *United European Gastroenterology Journal*, 6(4), 567–575. <https://doi.org/10.1177/2050640617751253>
- Gao, Y., Huang, X., Zhu, Y. & Lv, Z. (2018). A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 39(4), 351–364. <https://doi.org/10.1080/15321819.2018.1515775>
- GOV.UK - Office for Health Improvement and Disparities. (2020). *Cost effectiveness analysis: health economic studies* -. Gov.Uk. <https://www.gov.uk/guidance/cost-effectiveness-analysis-health-economic-studies>
- Grego, S., Welling, C. M., Miller, G. H., Coggan, P. F., Sellgren, K. L., Hawkins, B. T., Ginsburg, G. S., Ruiz, J. R., Fisher, D. A. & Stoner, B. R. (2022). A hands-free stool sampling system for monitoring intestinal health and disease. *Scientific Reports*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14803-9>
- Gualandris, F., Castellani, L., Falanga, A. (2021). The Association of HLA-DQ2 with Celiac. In *Celiac Disease (IntechOpen)* (pp. 1–26). <https://doi.org/10.5772/intechopen.95837>
- Gujral, N., Freeman, H. J. & Thomson, A. B. R. (2012). Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 18(42), 6036–6059. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i42.6036>
- Hardy, M. Y., Tye-Din, J. A., Stewart, J. A., Schmitz, F., Dudek, N. L., Hanchapola, I., Purcell, A. W. & Anderson, R. P. (2015). Ingestion of oats and barley in patients with celiac disease mobilizes cross-reactive T cells activated by avenin peptides and immunodominant hordein peptides. *Journal of Autoimmunity*, 56, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.10.003>
- Heyman, M., Abed, J., Lebreton, C. & Cerf-bensussan, N. (2012). Intestinal permeability in coeliac disease : insight into mechanisms and relevance to pathogenesis. *Gut*, 61(9), 1355–1364. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300327>
- Hocking, L., George, J., Broberg, E. K., Struelens, M. J., Leitmeyer, K. C., Deshpande, A., Parkinson, S., Francombe, J., Morley, K. I. & de Carvalho Gomes, H. (2021). Point of Care Testing for Infectious Disease in Europe: A Scoping Review and Survey Study. *Frontiers in Public Health*, 9, 722943. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.722943>

- Hosseini, S., Vázquez-Villegas, P., Rito-Palomares, M. & Martínez-Chapa, S. O. (2018). Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA): From A to Z. In *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology*. <http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-6766-2>
- Hüe, S., Mention, J. J., Monteiro, R. C., Zhang, S. L., Cellier, C., Schmitz, J., Verkarre, V., Fodil, N., Bahram, S., Cerf-Bensussan, N. & Caillat-Zucman, S. (2004). A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*, 21(3), 367–377. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.018>
- Hujoel, I. A., Reilly, N. R. & Rubio-Tapia, A. (2019). Celiac Disease: Clinical Features and Diagnosis. *Gastroenterology Clinics of North America*, 48(1), 19–37. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2018.09.001>
- Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I., Kurppa, K., Mearin, M. L., Ribes-Koninckx, C., Shamir, R., Troncone, R., Auricchio, R., Castillejo, G., Christensen, R., Dolinsek, J., Gillett, P., Hróbjartsson, A., Koltai, T., Maki, M., Nielsen, S. M., Popp, A., Størdal, K., ... Wessels, M. (2020). European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 70(1), 141–156. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002497>
- Inomata, N. (2009). Wheat allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 9(3), 238–243. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32832aa5bc>
- ISO 13485:2016, (2016).
- Jaques, D. A., Seigneux, S. De, Feraille, E., Burnier, M. & Pech, A. (2023). Variability of 24-Hour Sodium Urinary Excretion in Young Healthy Males Based on Consecutive Urine Collections: Impact on Categorization. *Journal of Renal Nutrition*, 226(23), 1–6. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2022.12.010>
- Jelínková, L., Tučková, L., Cinová, J., Flegelová, Z. & Tlaskalová-Hogenová, H. (2004). Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF- α through a mechanism involving NF- κ B. *FEBS Letters*, 571(1–3), 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.057>
- Jericho, H., Sansotta, N. & Guandalini, S. (2017). Extraintestinal Manifestations of Celiac Disease: Effectiveness of the Gluten-Free Diet. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 65(1), 75–79. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001420>

- Kaplon, H., Crescioli, S., Chenoweth, A., Visweswaraiyah, J. & Reichert, J. M. (2023). Antibodies to watch in 2023. *MAbs*, 15(1), e2153410. <https://doi.org/10.1080/19420862.2022.2153410>
- Karnes, J. H., Bastarache, L., Shaffer, C. M., Gaudieri, S., Xu, Y., Glazer, A. M., Mosley, J. D., Zhao, S., Raychaudhuri, S., Mallal, S., Ye, Z., Mayer, J. G., Brilliant, M. H., Hebring, S. J., Roden, D. M., Phillips, E. J. & Denny, J. C. (2017). Phenome-wide scanning identifies multiple diseases and disease severity phenotypes associated with HLA variants. *Science Translational Medicine*, 9(389), 1–14. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aai8708>
- Kim, K., Mall, C., Taylor, S. L., Hitchcock, S., Zhang, C., Wettersten, H. I., Jones, A. D., Chapman, A. & Weiss, R. H. (2014). Mealtime , Temporal , and Daily Variability of the Human Urinary and Plasma Metabolomes in a Tightly Controlled Environment. *PLoS ONE*, 9(1), e86223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086223>
- King, J. A., Jeong, J., Underwood, F. E., Quan, J., Panaccione, N., Windsor, J. W., Coward, S., Debruyne, J., Ronksley, P. E., Shaheen, A. A., Quan, H., Godley, J., Veldhuyzen Van Zanten, S., Lebwohl, B., Ng, S. C., Ludvigsson, J. F. & Kaplan, G. G. (2020). Incidence of Celiac Disease Is Increasing over Time: A Systematic Review and Meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology*, 115(4), 507–525. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000523>
- Kivelä, L., Caminero, A., Leffler, D. A., Pinto-Sanchez, M. I., Tye-Din, J. A. & Lindfors, K. (2021). Current and emerging therapies for coeliac disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 18(3), 181–195. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00378-1>
- Kooy-Winkelaar, Y., van Lummel, M., Moustakas, A. K., Schweizer, J., Mearin, M. L., Mulder, C. J., Roep, B. O., Drijfhout, J. W., Papadopoulos, G. K., van Bergen, J. & Koning, F. (2011). Gluten-Specific T Cells Cross-React between HLA-DQ8 and the HLA-DQ2 α /DQ8 β Transdimer. *The Journal of Immunology*, 187(10), 5123–5129. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101179>
- Kramvis, A., Chang, K. M., Dandri, M., Farci, P., Glebe, D., Hu, J., Janssen, H. L. A., Lau, D. T. Y., Penicaud, C., Pollicino, T., Testoni, B., Van Bömmel, F., Andrisani, O., Beumont-Mauviel, M., Block, T. M., Chan, H. L. Y., Cloherty, G. A., Delaney, W. E., Geretti, A. M., ... Revill, P. A. (2022). A roadmap for serum biomarkers for hepatitis B virus: current status and future outlook. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 19(11),

727–745. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00649-z>

Kunert, R. & Reinhart, D. (2016). Advances in recombinant antibody manufacturing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(8), 3451–3461. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7388-9>

Kurppa, K., Collin, P., Viljamaa, M., Haimila, K., Saavalainen, P., Partanen, J., Laurila, K., Huhtala, H., Paasikivi, K., Mäki, M. & Kaukinen, K. (2009). Diagnosing Mild Enteropathy Celiac Disease: A Randomized, Controlled Clinical Study. *Gastroenterology*, 136(3), 816–823. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.11.040>

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. (2008). Gliadin Induces an Increase in Intestinal Permeability and Zonulin Release by Binding to the Chemokine Receptor CXCR3. *Gastroenterology*, 135(1), 194–204. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.023>

Lebwohl, B. & Rubio-Tapia, A. (2021). Epidemiology, Presentation, and Diagnosis of Celiac Disease. *Gastroenterology*, 160(1), 63–75. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.06.098>

Lebwohl, B., Sanders, D. S. & Green, P. H. R. (2018). Seminar Coeliac disease. *The Lancet*, 391(10115), 70–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31796-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31796-8)

Leon, F. (2019). Therapeutic advances for celiac disease. *CoeliacUK*. <https://www.coeliac.org.uk/document-library/5698-therapeutic-advances-for-coeliac-disease-dr-francisco-leon/>

Lerner, B. A., Vo, L. P., Yates, S., Rundle, A. G., Lebwohl, B. & Francisco, S. (2020). Analysis of Crowd-Sourced Data. 114(5), 792–797. <https://doi.org/10.14309/ajg.000000000000202.Detection>

Lewkonja, R. M. (1974). Samuel Gee, Aretaeus, and the Coeliac Affection. *British Medical Journal*, 2(5916), 442. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5916.442-b>

Lindfors, K., Ciacci, C., Kurppa, K., Lundin, K. E. A., Makharia, G. K., Mearin, M. L., Murray, J. A., Verdu, E. F. & Kaukinen, K. (2019). Coeliac disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0054-z>

Liu, E., Dong, F., Barón, A. E., Taki, I., Norris, J. M., Frohnert, B. I., Hoffenberg, E. J., & Rewers, M. (2017). High incidence of Celiac Disease in a Long-term Study of Adolescents With

- Susceptibility Genotypes. *Gastroenterology*, 152(6), 1329–1336. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.02.002.High>
- López-Novoa, J. M. (2013). Fisiología del riñón. In Editorial médica Panamericana (Ed.), *Hernando. Nefrología Clínica* (4th ed., Vol. 1, pp. 21–36). <https://www.medicapanamericana.com/es/libro/hernando-nefrologia-clinica-version-digital>
- Ludvigsson, J. F., Leffler, D. A., Bai, J. C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P. H. R., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Kelly, C. P., Leonard, J. N., Lundin, K. E. A., Murray, J. A., Sanders, D. S., Walker, M. M., Zingone, F. & Ciacci, C. (2013). The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*, 62(1), 43–52. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301346>
- Ludvigsson, J. F. & Murray, J. A. (2019). Epidemiology of Celiac Disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 48(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2018.09.004>
- Mamone, G., Di Stasio, L., Vitale, S., Picascia, S. & Gianfrani, C. (2023). Analytical and functional approaches to assess the immunogenicity of gluten proteins. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1049623. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1049623>
- Marsh, M. N. (1992). Gluten, Major Histocompatibility and the Small Intestine Complex. *Gastroenterology*, 102(1), 330–354.
- Mention, J. J., Ahmed, M. Ben, Bègue, B., Barbe, U., Verkarre, V., Asnafi, V., Colombel, J. F., Cugnenc, P. H., Ruemmele, F. M., McIntyre, E., Brousse, N., Cellier, C. & Cerf-Bensussan, N. (2003). Interleukin 15: A key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*, 125(3), 730–745. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)01047-3](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)01047-3)
- Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., Tretiakova, M., Bhagat, G., Krausz, T. N., Raulet, D. H., Lanier, L. L., Groh, V., Spies, T., Ebert, E. C., Green, P. H. & Jabri, B. (2004). Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity*, 21(3), 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.020>
- Mestres-Miralles, C. M. & Duran-Hortolà, M. (2013). Introducción a la farmacología. Conceptos básicos de terapia con fármacos. In *Farmacología en nutrición* (1st ed., pp. 1–54). Médica Panamericana.
- Mirica, A. C., Stan, D., Chelcea, I. C., Mihailescu, C. M., Ofiteru, A. & Bocancia-Mateescu, L.

- A. (2022). Latest Trends in Lateral Flow Immunoassay (LFIA) Detection Labels and Conjugation Process. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.922772>
- Moreno, M. D. L., Cebolla, Á., Muñoz-Suano, A., Carrillo-Carrion, C., Comino, I., Pizarro, Á., León, F., Rodríguez-Herrera, A. & Sousa, C. (2017). Detection of gluten immunogenic peptides in the urine of patients with coeliac disease reveals transgressions in the gluten-free diet and incomplete mucosal healing Study patients. *Gut*, 66(2), 250–257. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310148>
- Morón, B., Bethune, M. T., Comino, I., Manyani, H., Ferragud, M., López, M. C., Cebolla, Á., Khosla, C. & Sousa, C. (2008). Toward the Assessment of Food Toxicity for Celiac Patients: Characterization of Monoclonal Antibodies to a Main Immunogenic Gluten Peptide. *PLoS ONE*, 3(5), e2294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002294>
- Morón, B. C., Cebolla, Á., Manyani, H., Álvarez-Maqueda, M., Megías, M., Thomas, M. del C., López, M. C. & Sousa, C. (2008). Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 405–414. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.2.405>
- Murray, J. A., Watson, T., Clearman, B. & Mitros, F. (2004). Effect of a gluten-free diet on gastrointestinal symptoms in celiac disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(4), 669–673. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.4.669>
- Núñez, C., Garrote, J. A., Arranz, E., Bilbao, J. R., Fernández-Bañares, F., Jiménez, J., Perucho, T., Ruiz-Casares, E., Sánchez-Valverde, F. & Serrano-Vela, J. I. (2018). Recommendations to report and interpret HLA genetic findings in coeliac disease. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 110(7), 458–461. <https://doi.org/10.17235/reed.2018.5269/2017>
- Nurmi, R., Pasternack, C., Salmi, T., Hervonen, K., Koskinen, I., Järvelin, J., Huhtala, H., Collin, P., Mustonen, J., Kaukinen, K. & Mäkelä, S. (2022). *The risk of renal comorbidities in celiac disease patients depends on the phenotype of celiac disease*. 779–787. <https://doi.org/10.1111/joim.13532>
- Oberhuber, G. (2000). Histopathology of celiac disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 54(7), 368–372. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(01\)80003-2](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(01)80003-2)
- Palanski, B. A., Weng, N., Zhang, L., Hilmer, A. J., Fall, L. A., Swaminathan, K., Jabri, B., Sousa, C., Fernandez-Becker, N. Q., Khosla, C. & Elias, J. E. (2022). An efficient urine

- peptidomics workflow identifies chemically defined dietary gluten peptides from patients with celiac disease. *Nature Com*, 13(888). <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41467-022-28353-1>
- Park, J. (2022). Lateral Flow Immunoassay Reader Technologies for Quantitative Point-of-Care Testing. *Sensors*, 22, 7398. <https://doi.org/10.3390/s22197398>
- UE 2017/ 746, 2017 Diario Oficial de la Unión Europea 117/176 (2017).
- UE N° 828/2014, 2014 Diario Oficial de la Unión Europea 228/5 (2014).
- UNE-EN 62366-1:2015/A1:2020, 1 (2020).
- Penny, H. A., Raju, S. A., Lau, M. S., Marks, L. J. S., Baggus, E. M. R., Bai, J. C., Bassotti, G., Bontkes, H. J., Carroccio, A., Danciu, M., Derakhshan, M. H., Ensari, A., Ganji, A., Green, P. H. R., Johnson, M. W., Ishaq, S., Lebwohl, B., Levene, A., Maxim, R., ... Sanders, D. S. (2021). Accuracy of a no-biopsy approach for the diagnosis of coeliac disease across different adult cohorts. *Gut*, 70(5), 876–883. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-320913>
- Petersen, J., Kooy-Winkelaar, Y., Loh, K. L., Tran, M., van Bergen, J., Koning, F., Rossjohn, J. & Reid, H. H. (2016). Diverse T Cell Receptor Gene Usage in HLA-DQ8-Associated Celiac Disease Converges into a Consensus Binding Solution. *Structure*, 24(10), 1643–1657. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.07.010>
- Pishesha, N., Harmand, T. J. & Ploegh, H. L. (2022). A guide to antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*, 22(12), 751–764. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00707-2>
- Qiao, S.-W., Bergseng, E., Molberg, Ø., Jung, G., Fleckenstein, B. & Sollid, L. M. (2005). Refining the Rules of Gliadin T Cell Epitope Binding to the Disease-Associated DQ2 Molecule in Celiac Disease: Importance of Proline Spacing and Glutamine Deamidation. *The Journal of Immunology*, 175(1), 254–261. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.1.254>
- Qiao, S. W. & Sollid, L. M. (2019). Two novel HLA-DQ2.5-restricted gluten T cell epitopes in the DQ2.5-glia-γ4 epitope family. *Immunogenetics*, 71(10), 665–667. <https://doi.org/10.1007/s00251-019-01138-5>
- Raghunathan, G., Smart, J., Williams, J. & Almagro, J. C. (2012). Antigen-binding site anatomy and somatic mutations in antibodies that recognize different types of

- antigens. *Journal of Molecular Recognition*, 25(3), 103–113. <https://doi.org/10.1002/jmr.2158>
- Raiteri, A., Granito, A., Giamperoli, A., Catenaro, T., Negrini, G. & Tovoli, F. (2022). Current guidelines for the management of celiac disease: A systematic review with comparative analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 28(1), 154–175. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i1.154>
- Ravikumara, M., Nootigattu, V. K. T. & Sandhu, B. K. (2007). Ninety percent of celiac disease is being missed. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 45(4), 497–499. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31812e5710>
- Reichelt, W. H., Ek, J., Stensrud, M. & Reichelt, K. L. (1998). Peptide Excretion in Celiac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 26(3), 305–309. <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/00005176-199803000-00012>
- Reilly, N. R., Husby, S., Sanders, D. S. & Green, P. H. R. (2018). Coeliac disease: To biopsy or not? *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 15(1), 60–66. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.121>
- Reverberi, R. & Reverberi, L. (2007). Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfusion*, 5(4), 227–240. <https://doi.org/10.2450/2007.0047-07>
- Riznik, P., Balogh, M., Bódi, P., De Leo, L., Dolinsek, J., Guthy, I., Gyimesi, J., Horváth, Á., Kis, I., Klemenak, M., Koletzko, B., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I. R., Krencnik, T., Not, T., Palcevski, G., Pollák, É., Sblattero, D., Tokodi, I., ... Rybak, A. (2019). The Use of Biopsy and “no-Biopsy” Approach for Diagnosing Paediatric Coeliac Disease in the Central European Region. *Gastroenterology Research and Practice*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9370397>
- Riznik, P., De Leo, L., Dolinsek, J., Gyimesi, J., Klemenak, M., Koletzko, B., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I. R., Krencnik, T., Not, T., Palcevski, G., Sblattero, D., Vogrincic, M., Werkstetter, K. J. & Dolinsek, J. (2019). Diagnostic Delays in Children with Coeliac Disease in the Central European Region. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 69(4), 443–448. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002424>
- Rubio-Tapia, A., Kyle, R. A., Kaplan, E. L., Johnson, D. R., Page, W., Erdtmann, F., Brantner, T. L., Kim, W. R., Phelps, T. K., Lahr, B. D., Zinsmeister, A. R., Melton, L. J. & Murray, J. A. (2009). Increased Prevalence and Mortality in Undiagnosed Celiac Disease. *Gastroenterology*, 137(1), 88–93. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.03.059>

- Rubio-Tapia, A., Rahim, M. W., See, J. A., Lahr, B. D., Wu, T. T. & Murray, J. A. (2010). Mucosal recovery and mortality in adults with celiac disease after treatment with a gluten-free diet. *American Journal of Gastroenterology*, 105(6), 1412–1420. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.10>
- Rudnick, S. I. & Adams, G. P. (2009). Affinity and avidity in antibody-based tumor targeting. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 24(2), 155–161. <https://doi.org/10.1089/cbr.2009.0627>
- Santucci, L., Candiano, G., Petretto, A., Bruschi, M., Lavarello, C., Inglese, E., Giorgio, P. & Marco, G. (2014). ScienceDirect From hundreds to thousands : Widening the normal. *Journal of Proteomics*, 112, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.021>
- Schalk, K., Lang, C., Wieser, H., Koehler, P. & Scherf, K. A. (2017). Quantitation of the immunodominant 33-mer peptide from α -gliadin in wheat flours by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Scientific Reports*, 7(1), 45092. <https://doi.org/10.1038/srep45092>
- Schumann, M., Richter, J. F., Wedell, I., Moos, V., Zimmermann-Kordmann, M., Schneider, T., Daum, S., Zeitz, M., Fromm, M. & Schulzke, J. D. (2008). Mechanisms of epithelial translocation of the α 2-gliadin- 33mer in coeliac sprue. *Gut*, 57(6), 747–754. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.136366>
- Shan, L., Molberg, Ø., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., Sollid, L. M. & Khosla, C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in Celiac Sprue. *Science*, 297(5590), 2275–2279. <https://doi.org/10.1126/science.1074129>
- Shan, L., Qiao, S. W., Arentz-Hansen, H., Molberg, Ø., Gray, G. M., Sollid, L. M. & Khosla, C. (2005). Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: Implications for Celiac Sprue. *Journal of Proteome Research*, 4(5), 1732–1741. <https://doi.org/10.1021/pr050173t>
- Shewry, P. (2019). What is gluten—Why is it special? *Frontiers in Nutrition*, 6, 101. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00101>
- Shewry, P. R., Halford, N. G., Belton, P. S. & Tatham, A. S. (2002). The structure and properties of gluten: An elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1418), 133–142. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.1024>

- Singh, A., Pramanik, A., Acharya, P. & Makharia, G. K. (2019). Non-invasive biomarkers for celiac disease. *Journal of Clinical Medicine*, 8(6), 1–17. <https://doi.org/10.3390/jcm8060885>
- Singh, P., Arora, A., Strand, T. A., Leffler, D. A., Catassi, C., Green, P. H., Kelly, C. P., Ahuja, V. & Makharia, G. K. (2018). Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 16(6), 823-836.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.06.037>
- Singh, P., Arora, S., Lal, S., Strand, T. A. & Makharia, G. K. (2015). Risk of celiac disease in the first- and second-degree relatives of patients with celiac disease: A systematic review and meta-analysis. In *American Journal of Gastroenterology* (Vol. 110, Issue 11, pp. 1539–1548). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.296>
- Sjöström, H., Lundin, K. E. A., Molberg, Körner, R., Mcadam, S. N., Anthonen, D., Quarsten, H., Norén, O., Roepstorff, P., Thorsby, E. & Sollid, L. M. (1998). Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: General importance of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition. *Scandinavian Journal of Immunology*, 48(2), 111–115. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1998.00397.x>
- Smithson, G., Siegelman, J., Oki, T., Maxwell, J. R. & Leffler, D. A. (2021). The Evolving Landscape of Biomarkers in Celiac Disease: Leading the Way to Clinical Development. *Frontiers in Immunology*, 12, 665756. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.665756>
- Soler, M., Estevez, M., Lourdes, M. De, Cebolla, A. & Lechuga, L. M. (2016). *Biosensors and Bioelectronics Label-free SPR detection of gluten peptides in urine for non-invasive celiac disease follow-up*. 79, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.11.097>
- Sollid, L. M., Tye-Din, J. A., Qiao, S. W., Anderson, R. P., Gianfrani, C. & Koning, F. (2020). Update 2020: nomenclature and listing of celiac disease–relevant gluten epitopes recognized by CD4+ T cells. *Immunogenetics*, 72(1–2), 85–88. <https://doi.org/10.1007/s00251-019-01141-w>
- Song, J., Sun, C., Gul, K., Mata, A. & Fang, Y. (2021). Prolamin-based complexes: Structure design and food-related applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1120–1149. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12713>
- Stepniak, D., Vader, L. W., Kooy, Y., Van Veelen, P. A., Moustakas, A., Papandreou, N. A., Eliopoulos, E., Drijfhout, J. W., Papadopoulos, G. K. & Koning, F. (2005). T-cell

recognition of HLA-DQ2-bound gluten peptides can be influenced by an N-terminal proline at p-1. *Immunogenetics*, 57(1-2), 8-15. <https://doi.org/10.1007/s00251-005-0780-8>

Stills, H. F. (2012). Polyclonal Antibody Production. In R. W. Mark Suckow, Karla Stevens (Ed.), *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (1st ed., pp. 259-274). American College of Laboratory Animal Medicine. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00011-0>

Syage, J. A., Kelly, C. P., Dickason, M. A., Ramirez, A. C., Leon, F., Dominguez, R. & Sealey-Voyksner, J. A. (2018). Determination of gluten consumption in celiac disease patients on a gluten-free diet. *American Journal of Clinical Nutrition*, 107(2), 201-207. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqx049>

Tapia-Hernández, J. A., Del-Toro-Sánchez, C. L., Cinco-Moroyoqui, F. J., Juárez-Onofre, J. E., Ruiz-Cruz, S., Carvajal-Millan, E., López-Ahumada, G. A., Castro-Enriquez, D. D., Barreras-Urbina, C. G. & Rodríguez-Felix, F. (2019). Prolamins from cereal by-products: Classification, extraction, characterization and its applications in micro- and nanofabrication. *Trends in Food Science and Technology*, 90, 111-132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.005>

Taraghikhah, N., Ashtari, S., Asri, N., Shahbazkhani, B., Al-Dulaimi, D., Rostami-Nejad, M., Rezaei-Tavirani, M., Razzaghi, M. R. & Zali, M. R. (2020). An updated overview of spectrum of gluten-related disorders: clinical and diagnostic aspects. *BMC Gastroenterology*, 20(1), 258. <https://doi.org/10.1186/s12876-020-01390-0>

Tollefsen, S., Arentz-Hansen, H., Fleckenstein, B., Molberg, Ø., Ráki, M., Kwok, W. W., Jung, G., Lundin, K. E. A. & Sollid, L. M. (2006). HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. *Journal of Clinical Investigation*, 116(8), 2226-2236. <https://doi.org/10.1172/JCI27620>

Tye-Din, J. A., Galipeau, H. J. & Agardh, D. (2018). Celiac disease: A review of current concepts in pathogenesis, prevention, and novel therapies. *Frontiers in Pediatrics*, 6, 350. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00350>

Tye-Din, J. A., Stewart, J. A., Dromey, J. A., Beissbarth, T., Van Heel, D. A., Tatham, A., Henderson, K., Mannering, S. I., Gianfrani, C., Jewell, D. P., Hill, A. V. S., McCluskey, J., Rossjohn, J. & Anderson, R. P. (2010). Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Science Translational Medicine*, 2(41), 41-51.

<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001012>

Vader, L. W., Stepniak, D. T., Bunnik, E. M., Kooy, Y. M. C., De Haan, W., Drijfhout, J. W., Van Veelen, P. A. & Koning, F. (2003). Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology*, 125(4), 1105–1113. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)01204-6](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)01204-6)

Vader, W., Kooy, Y., Van Veelen, P., De Ru, A., Harris, D., Benckhuijsen, W., Pea, S., Mearin, L., Drijfhout, J. W. & Koning, F. (2002). The Gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology*, 122(7), 1729–1737. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.33606>

Van De Wal, Y., Kooy, Y. M. C., Van Veelen, P. A., Peña, S. A., Mearin, L. M., Molberg, Ø., Lundin, K. E. A., Sollid, L. M., Mutis, T., Benckhuijsen, W. E., Drijfhout, J. W. & Koning, F. (1998). Small intestinal T cells of celiac disease patients recognize a natural pepsin fragment of gliadin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17), 10050–10054. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.10050>

Van De Wal, Y., Kooy, Y. M. C., Van Veelen, P., Vader, W., August, S. A., Drijfhout, J. W., Peña, S. A. & Koning, F. (1999). Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response. *European Journal of Immunology*, 29(10), 3133–3139. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199910\)29:10<3133::AID-IMMU3133>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199910)29:10<3133::AID-IMMU3133>3.0.CO;2-G)

Victoria, G. D. & Nussenzweig, M. C. (2022). Germinal Centers. *Annual Review of Immunology*, 40, 413–442. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-120419-022408>

Wahab, P. J., Meijer, J. W. R. & Mulder, C. J. J. (2002). Histologic follow-up of people with celiac disease on a gluten-free diet: Slow and incomplete recovery. *American Journal of Clinical Pathology*, 118(3), 459–463. <https://doi.org/10.1309/EVXT-851X-WHLC-RLX9>

Walker, M. M., Murray, J. A., Ronkainen, J., Aro, P., Storskrubb, T., D'Amato, M., Lahr, B., Talley, N. J. & Agreus, L. (2010). Detection of Celiac Disease and Lymphocytic Enteropathy by Parallel Serology and Histopathology in a Population-Based Study. *Gastroenterology*, 139(1), 112–119. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.04.007>

Wang, T., Tang, L., Lin, R., He, D., Zhang, Y., Yang, P. & He, J. (2021). Individual variability in human urinary metabolites identifies age-related, body mass index-related, and sex-

- related biomarkers. *Molecular Genetics & Genomics Medicine*, 9(8), 1738.
<https://doi.org/10.1002/mgg3.1738>
- CODEX STAN 118 - 1979, CODEX ALIMENTARIUS-Normas internacionales de alimentos (2008).
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24(2), 115–119.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.004>
- Wieser, H., Koehler, P. & Scherf, K. A. (2023). Chemistry of wheat gluten proteins: Qualitative composition. *Cereal Chemistry*, 100(1), 23–35.
<https://doi.org/10.1002/cche.10572>
- Yalow, R. B. S. (1959). Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods Immunological Methods. *Nature*, 21, 1648–1649.
- Zevallos, V. F., Raker, V., Tenzer, S., Jimenez-Calvente, C., Ashfaq-Khan, M., Rüssel, N., Pickert, G., Schild, H., Steinbrink, K. & Schuppan, D. (2017). Nutritional Wheat Amylase-Trypsin Inhibitors Promote Intestinal Inflammation via Activation of Myeloid Cells. *Gastroenterology*, 152(5), 1100-1113.e12.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.006>
- Zhao, L., Wu, Q., Song, R. & Yun, Z. (2019). Genetic Engineering Antibody: Principles and Application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 612, 022045.
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/612/2/022045>

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES DEL TEMA Y OBJETIVOS

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES DEL TEMA Y OBJETIVOS

La **enfermedad celíaca (EC)** se define como un proceso sistémico que produce una enteropatía crónica inmunomediada del intestino delgado causada por la ingesta de gluten en individuos genéticamente predispuestos (Ludvigsson et al., 2013).

La **seroprevalencia mundial** conjunta de esta patología, basada en la detección de anticuerpos anti-transglutaminasa tisular y/o anti-endomisio, es del 1,4% (intervalo de confianza del 95%, 1,1%-1,7%) (Singh et al., 2018). No obstante, la literatura sitúa entre un **70-95% a las personas que permanecen sin diagnóstico** y que se atribuye, entre otros factores a):(Castillejo et al., 2023; Cichewicz et al., 2019):

- **La presentación de la EC de forma subclínica** por parte de aproximadamente la mitad de los que sufren esta patología (Stahl et al., 2021). Las guías clínicas desaconsejan realizar las pruebas de diagnóstico a aquellas personas que no pertenezcan a grupos de riesgo o no presenten síntomas asociados a la EC, por lo que es otro factor para que estos queden fuera de las vías de diagnóstico (Ludvigsson et al., 2013; Raiteri et al., 2022).
- El **amplio espectro de los síntomas** con el que se manifiesta la EC, así como la variabilidad en el tiempo de las mismas que puede sufrir un enfermo celiaco, hacen que la búsqueda activa de casos sea complejo (Cichewicz et al., 2019; Lindfors et al., 2019).
- El **acceso limitado a especialistas o pruebas de diagnóstico** (Cichewicz et al., 2019).
- La **retirada del gluten de la dieta por moda o molestias** causadas por su ingesta (Anderson, 2022). Hasta la fecha, las herramientas utilizadas para el diagnóstico de la EC requieren que los pacientes mantengan una dieta con gluten o en su defecto, someterse a un “*gluten-challenge*” (desafío de gluten) en las semanas previas al diagnóstico para evitar resultados falsos negativos (Al-Toma et al., 2019; Husby et al., 2020).

La **no detección o detección tardía de esta enfermedad, así como el incumplimiento del tratamiento**, la dieta sin gluten (DSG), pueden llevar a **complicaciones graves a largo plazo**, como osteoporosis, infertilidad e incluso un mayor riesgo de enfermedades neoplásicas tales como adenocarcinoma de intestino delgado, cáncer de esófago, linfoma no Hodgkin de células B y T y particularmente linfoma intestinal de células T, además de estar asociado con un incremento en el consumo de fármacos y del uso de recursos sanitarios, y una baja calidad de vida (Fuchs et al., 2018; Gasbarrini et al., 2000; Rubio-

Tapia et al., 2009; Tio et al., 2012; Ukkola et al., 2012). Por ello, un diagnóstico precoz de la enfermedad y la eliminación del gluten en la dieta de por vida son de enorme importancia para controlar la EC.

Sin embargo, **la adherencia a la DSG es una tarea complicada y exigente**. Entre un 4-58% de los pacientes con EC reportan dificultades para adherirse a una DSG; la abundancia del gluten, el desconocimiento, la contaminación cruzada, el etiquetado erróneo, la disponibilidad limitada de productos sin gluten, sus elevados costes y la mala palatabilidad de los mismos, entre otros, son los principales responsables (Lindfors et al., 2019; Wieser et al., 2021).

Para el control regular de la enfermedad, es necesario evaluar la adherencia de la DSG en estos pacientes. Para el seguimiento clínico de este tipo de dieta, las guías clínicas recomiendan usar la serología, la sintomatología, los cuestionarios dietéticos y a veces endoscopia intestinal con biopsia, en caso de los adultos (Raiteri et al., 2022). No obstante, **estas herramientas han demostrado ser poco sensibles, eficientes, invasivas o inexactas para evaluar la adherencia a la DSG** (Wieser et al., 2021). Además, a excepción de los cuestionarios, estas herramientas miden la consecuencia y no la causalidad de la adherencia al tratamiento.

La complejidad en realizar una adherencia estricta de la DGS ha llevado también a la investigación y el desarrollo de **terapias no dietéticas alternativas**. **La eficacia de las mismas debe ser demostrada verificando el gluten ha sido absorbido por el organismo, de forma que pueda causar una respuesta en aquellos enfermos celíacos, participantes en estos estudios clínicos** (Kivelä et al., 2021).

En base a estos antecedentes, el **OBJETIVO GENERAL** de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo y validación de inmunométodos para el control de la ingesta de gluten, el diagnóstico de la EC, durante el cumplimiento de la DSG o evaluación de la efectividad de terapias experimentales, así como la utilidad clínica de pruebas rápidas para la detección precoz de la EC en la población pediátrica mediante cribados.

El objetivo general ha sido desarrollado en los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**:

1. **Validación analítica y clínica de la herramienta iVYCHECK GIP Urine**, método LFIA para la detección de péptidos inmunogénicos derivados del gluten en orina, de acuerdo a las exigencias del **reglamento vigente** para productos sanitarios de diagnóstico in vitro (UE 2017/ 746, 2017).

2. **Validar la utilidad clínica del uso de una prueba rápida serológica tipo LFIA para determinar la presencia de anti-tTG-IgA** para la detección precoz de la EC en la población pediátrica de 2 a 14 años, determinando previamente mediante el iVYCHECK GIP Urine el consumo de gluten para evitar falsos negativos en las pruebas serológicas.
3. **Desarrollar un inmunométodo automatizable, basado en la técnica ELISA, para la detección de GIP en orina para su utilidad clínica en el diagnóstico, monitorización de la DSG y control de terapias farmacológicas experimentales no dietéticas para el tratamiento de la EC.**

REFERENCIAS

- Al-Toma, A., Volta, U., Auricchio, R., Castillejo, G., Sanders, D. S., Cellier, C., Mulder, C. J. & Lundin, K. E. A. (2019). European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. *United European Gastroenterology Journal*, 7(5), 583–613. <https://doi.org/10.1177/2050640619844125>
- Anderson, R. P. (2022). Review article: Diagnosis of coeliac disease: a perspective on current and future approaches. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 56(S1), S18–S37. <https://doi.org/10.1111/APT.16840>
- Castillejo, G., Ochoa-Sangrador, C., Pérez-Solís, D., Cilleruelo, M. L., Donat, E., García-Burriel, J. I., Sánchez-Valverde, F., Garcia-Calatayud, S., Eizaguirre, F. J., Martínez-Ojinaga, E., Barros, P., Leis, R., Salazar, J. C., Barrio, J., Peña-Quintana, L., Luque, V., Polanco, I., Ribes, C. & Roman, E. (2023). Coeliac Disease Case–Control Study: Has the Time Come to Explore beyond Patients at Risk? *Nutrients*, 15(5), 1–11. <https://doi.org/10.3390/nu15051267>
- Cichewicz, A. B., Mearns, E. S., Taylor, A., Boulanger, T., Gerber, M., Leffler, D. A., Drahos, J., Sanders, D. S., Thomas Craig, K. J. & Lebwohl, B. (2019). Diagnosis and Treatment Patterns in Celiac Disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 64(8), 2095–2106. <https://doi.org/10.1007/s10620-019-05528-3>
- Fuchs, V., Kurppa, K., Huhtala, H., Mäki, M., Kekkonen, L. & Kaukinen, K. (2018). Delayed coeliac disease diagnosis predisposes to reduced quality of life and incremental use of health care services and medicines: A prospective nationwide study. *United European Gastroenterology Journal*, 6(4), 567–575. <https://doi.org/10.1177/2050640617751253>
- Gasbarrini, A., Torre, E. S., Trivellini, C., De Carolis, S., Caruso, A. & Gasbarrini, G. (2000). Recurrent spontaneous abortion and intrauterine fetal growth retardation as symptoms of coeliac disease. *Lancet*, 356(9227), 399–400. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02535-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02535-6)
- Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I., Kurppa, K., Mearin, M. L., Ribes-Koninckx, C., Shamir, R., Troncone, R., Auricchio, R., Castillejo, G., Christensen, R., Dolinsek, J., Gillett, P., Hróbjartsson, A., Koltai, T., Maki, M., Nielsen, S. M., Popp, A., Størdal, K., ... Wessels, M. (2020). European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and

- Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 70(1), 141–156. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002497>
- Kivelä, L., Caminero, A., Leffler, D. A., Pinto-Sanchez, M. I., Tye-Din, J. A. & Lindfors, K. (2021). Current and emerging therapies for coeliac disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 18(3), 181–195. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00378-1>
- Lindfors, K., Ciacci, C., Kurppa, K., Lundin, K. E. A., Makharia, G. K., Mearin, M. L., Murray, J. A., Verdu, E. F. & Kaukinen, K. (2019). Coeliac disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0054-z>
- Ludvigsson, J. F., Leffler, D. A., Bai, J. C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P. H. R., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Kelly, C. P., Leonard, J. N., Lundin, K. E. A., Murray, J. A., Sanders, D. S., Walker, M. M., Zingone, F. & Ciacci, C. (2013). The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*, 62(1), 43–52. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301346>
- UE 2017/ 746, 2017 Diario Oficial de la Unión Europea 176 (2017). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0746&from=EN>
- Raiteri, A., Granito, A., Giamperoli, A., Catenaro, T., Negrini, G. & Tovoli, F. (2022). Current guidelines for the management of celiac disease: A systematic review with comparative analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 28(1), 154–175. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i1.154>
- Rubio-Tapia, A., Kyle, R. A., Kaplan, E. L., Johnson, D. R., Page, W., Erdtmann, F., Brantner, T. L., Kim, W. R., Phelps, T. K., Lahr, B. D., Zinsmeister, A. R., Melton, L. J. & Murray, J. A. (2009). Increased Prevalence and Mortality in Undiagnosed Celiac Disease. *Gastroenterology*, 137(1), 88–93. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.03.059>
- Singh, P., Arora, A., Strand, T. A., Leffler, D. A., Catassi, C., Green, P. H., Kelly, C. P., Ahuja, V. & Makharia, G. K. (2018). Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 16(6), 823–836.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.06.037>
- Stahl, M. G., Geno Rasmussen, C., Dong, F., Waugh, K., Norris, J. M., Baxter, J., Yu, L., Steck, A. K., Frohnert, B. I., Liu, E. & Rewers, M. J. (2021). Mass Screening for Celiac Disease: The Autoimmunity Screening for Kids Study. *American Journal of Gastroenterology*,

116(1), 180–187. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000751>

Tio, M., Cox, M. R. & Eslick, G. D. (2012). Meta-analysis: Coeliac disease and the risk of all-cause mortality, any malignancy and lymphoid malignancy. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 35(5), 540–551. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04972.x>

Ukkola, A., Kurppa, K., Collin, P., Huhtala, H., Forma, L., Kekkonen, L., Mäki, M. & Kaukinen, K. (2012). Use of health care services and pharmaceutical agents in coeliac disease: a prospective nationwide study. *BMC Gastroenterology*, 12(136). <https://doi.org/10.1186/1471-230X-12-136>

Wieser, H., Ruiz-Carnicer, Á., Segura, V., Comino, I. & Sousa, C. (2021). Challenges of Monitoring the Gluten-Free Diet Adherence in the Management and Follow-Up of Patients with Celiac Disease. *Nutrients*, 13(7), 2274. <https://doi.org/10.3390/nu13072274>

CAPÍTULO 3

VALIDACIÓN ANALÍTICA Y CLÍNICA DEL IVYCHECK GIP URINE

CAPÍTULO 3. VALIDACIÓN ANALÍTICA Y CLÍNICA DEL iVYCHECK GIP Urine

1 ANTECEDENTES DEL TEMA

La demostración de la funcionalidad y estabilidad de un producto de diagnóstico *in vitro* (iVD) es necesaria para garantizar el correcto desempeño del mismo durante un periodo de tiempo determinado. Además de ser obligatorio para la obtención del **mercado CE iVDR bajo reglamento UE 2017/746** (UE 2017/ 746, 2017).

Las características de funcionalidad y estabilidad que debía poseer el producto **iVYCHECK GIP Urine (iVCU, Biomedal S.L., Sevilla, España)** para su uso en el **seguimiento de la dieta sin gluten (DSG) a través de la detección de péptidos inmunogénicos derivados del gluten (GIP) en orina**, quedaron recogidas en el documento de **elementos de entrada-requisitos del cliente (EE-CRS)**. Cada requisito identificado fue catalogado con un **código numérico único**, y en dependencia de la obligatoriedad con la que se debía cumplir, expresado en **imperativo (debe/tiene que) o condicional (debería/tendría que)**.

El objetivo de la validación analítica y clínica del iVCU por tanto, fue **evidenciar que el producto cumplía con los EE-CRS generales** (Tabla 3.1), **de regulación** (Tabla 3.2) **de estabilidad** (Tabla 3.3) y **funcionales** (Tabla 3.4 y 3.5) **que le eran exigidos**.

1.1 GENERALES

Tabla 3.1. Elementos de entrada-requisitos del cliente generales.

ID	Requisitos	Referencia
CR1.1	El producto tiene que ser capaz de detectar péptidos inmunogénicos derivados del gluten. <i>El 33-mer se utilizará en varios estudios como un modelo de GIP y también se empleará como patrón para la curva.</i>	N/A
CR1.2	El producto tiene que ser capaz de detectar GIP en muestras de orina.	N/A
CR1.3	El producto tiene que ser específico para GIP en orina.	N/A

GIP, péptido inmunogénico del gluten.

1.2 REGULACIÓN

Tabla 3.2. Elementos de entrada-requisitos del cliente regulatorios.

ID	Requisito	Referencia
----	-----------	------------

CR6.1	El diseño del producto tiene que ser compatible con la regulación IVD y el marcado CE europeo.	(UE 2017/746, 2017)
--------------	--	---------------------

IVD, diagnóstico *in vitro*; CE, conformidad europea.

1.3 TRANSPORTE, ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL

Tabla 3.3. Elementos de entrada-requisitos del cliente sobre transporte, almacenamiento y vida útil.

ID	Requisito	Referencia
CR10.1	El producto tiene que almacenarse a temperatura de ambiente.	N/A
CR10.2	La funcionalidad del producto tiene que mantenerse inalterada tras fluctuaciones de temperatura que puedan ocurrir durante el transporte. <i>Es decir, habrá que elegir un nivel de control de temperatura durante el transporte que asegure el control necesario de temperatura.</i>	N/A
CR10.3	El producto debería tener una vida útil de al menos 12 meses.	N/A

1.4 FUNCIONALIDAD ANALÍTICA

Tabla 3.4. Elementos de entrada-requisitos del cliente sobre funcionalidad analítica.

ID	Requisito	Referencia
CR12.1	El producto no debería dar reacción cruzada con ningún componente que se encuentre frecuentemente en orinas humanas, a parte de los definidos en la IFU (especificidad).	N/A
CR12.2	El producto debería tener una sensibilidad analítica en muestras de orina de al menos 2,5 ng 33-mer/mL de orina con un 95% confianza. <i>Estudios preliminares indican que tal sensibilidad sirve para su uso clínico.</i>	N/A
CR12.3	El producto debería presentar una repetibilidad superior al 95%, entendida como el número de resultados esperados - positivos o negativos - frente al total de repeticiones ensayadas en las mismas condiciones.	N/A

ID	Requisito	Referencia
CR12.4	El producto tiene que presentar una reproducibilidad superior al 95%, entendida como el número de resultados esperados - positivos o negativos - frente al total de repeticiones ensayadas por distintos analistas en días diferentes y utilizando diferentes lotes del producto.	N/A
CR12.5	El límite de detección superior debe estar por encima de una cantidad de GIP supra-fisiológica.	N/A
CR12.6	El producto tiene que resistir interferencias por sustancias que se encuentren frecuentemente en orina.	N/A

IFU: instrucciones de uso; GIP: péptido inmunogénico del gluten.

1.5 FUNCIONALIDAD CLÍNICA

Tabla 3.5. Elementos de entrada-requisitos del cliente sobre funcionalidad clínica.

ID	Requisito	Referencia
CR13.1	El producto tiene que ser capaz de detectar GIP en muestras de pacientes que siguen una dieta con gluten.	N/A
CR13.2	El producto tiene que ser capaz de detectar GIP en muestras de pacientes que hayan tomado 2g de gluten <i>Representativo de usos como los siguientes: i) un niño que come gluten sin avisar a sus padres ii) un restaurante se equivoca y sirve ej. pasta con gluten</i>	N/A
CR13.3	El producto debería detectar ingestas de gluten de 50mg, representando el límite inferior de su sensibilidad diagnóstica, establecido como el mínimo consumo de gluten que resulta en daños intestinales detectables.	(Catassi et al., 2007)

GIP: péptido inmunogénico del gluten.

2 EQUIPOS Y SOFTWARES

2.1 EQUIPOS DE TEMPERATURA

Se emplearon distintos equipos de temperatura cubriendo el rango desde -80 a 100°C:

- Estufas, para almacenamiento y/o incubaciones de 10-60°C: I-40 (Raypa, Barcelona, España), T20 (Heraeus, Hanau, Alemania) e IPP-55 (Mettler, Schwabach, Alemania).

- Frigoríficos para almacenamiento a temperaturas de 4-8°C: FRS-U20DLC (Daewoo, Seoul, Corea del Sur), Cámara de 4-8°C (Biomedal SL, Sevilla, España).
- Congeladores para almacenamiento a temperaturas de -16 a -22°C: 3GF8601B

2.2 TERMÓGRAFOS

Los termógrafos Data Logger WiFi testo Saveris 2-T3 (Titisee-Neustadt, Alemania) fueron usados para el seguimiento y control de temperatura. Las temperaturas eran medidas con sondas conectables que registraban y enviaban directamente los datos al Testo Cloud (almacenamiento de datos online) a través de su WLAN.

2.3 PIPETAS

Micropipetas monocanal con volúmenes comprendidos entre 2-5000 µL: modelos de Biohit Proline Plus (Sartorius AG, Göttingen, Alemania), PhysioCare Concept y ResearchPlus (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

2.4 VORTEX

Vortex con diversos cabezales: VXMNAL (Ohaus Europe GmbH, Näniko, Suiza), Genie 2 G-560E (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EE.UU.).

2.5 SOFTWARES PARA EL TRATAMIENTO DE DATOS

Para el tratamiento de los datos se emplearon los siguientes softwares:

- Microsoft Excel 2303 (Microsoft, Washington, EE.UU.).
- IBM SPSS Statistics 23 (IBM, Nueva York, EE.UU.).
- Epidat 3.1 (Servicio de Epidemiología de la Dirección Xeral de Saúde Pública da Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, Galicia, España).
- BLAST 2.2.25 (accedido vía web del National Center for Biotechnology Information, Maryland, EE.UU.).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DEMOSTRACIÓN DEL CUMPLIMIENTO DE LOS ELEMENTOS DE ENTRADA-REQUISITOS DEL CLIENTE

Para poder demostrar el cumplimiento de los requisitos/grupo de requisitos mencionados en el apartado 1.1 de este capítulo (Tabla 3.1-3.5), se empleó el del **procedimiento P-07** Diseño y Desarrollo (Biomedal SL, Sevilla, España) basado en la ISO 13485:2016 y Reglamento de la UE 2017/746 (ISO 13485:2016, 2016; UE 2017/ 746, 2017) y las **plantillas** F-P-07-19 Protocolo de V&V (**PRO**), F-P-07-20 Formulario (**FRM**), F-P-07-22 Informe de V&V (**INF**) (todas de Biomedal, Sevilla, España) asociadas al mismo.

Para la justificación de cada requisito/grupo de requisitos, se generó un **PRO**, dos **FRMs**, uno genérico para todos los ensayos de validación de iVCU y otro específico del requisito/grupo de requisitos, y un **INF**.

En cada **PRO** quedó recogido el objetivo (la aprobación de un/un grupo EE-CRS), la metodología de diseño, la organización, la realización del estudio de la evaluación, (incluyendo, la ejecución del ensayo, el número y tipo de muestras, y la cantidad de kits de iVCU), las consideraciones estadísticas y el/los criterios de aprobación del/de EE-CRS(s) bajo estudio. De los dos **FRM**, el **genérico**, se usaba para la recogida de datos crudos, equipos y materiales usados en el ensayo, y el **específico**, para tratamiento de los datos crudos generados tras la ejecución del PRO. Finalmente, tras el tratamiento de los datos generados durante la ejecución de cada PRO, se redactaba el **INF**, donde quedaban escritos los resultados y conclusiones del estudio; documento que evaluaba la adecuación del iVCU sobre el criterio de aprobación.

Todos los PRO y INF fueron redactados en Microsoft Word y los FRM diseñados en Microsoft Excel (Microsoft Office, versión 2303 compilación 16.0.16227.20202) (Microsoft, Nuevo México, EE.UU.).

3.2 MUESTRAS DE ORINA

Todas las orinas usadas eran procedentes de **estudios clínicos** promovidos Biomedal S.L. (Sevilla, España) y/o el grupo de investigación del departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla (Sevilla, España) con otros fines, o **de campañas lanzadas** dentro de los círculos cercanos de estas entidades, **para recolectar muestras de forma específica para este fin**; la validación del iVCU.

3.2.1 Criterios de inclusión y exclusión

Para su inclusión de las muestras en cualquier estudio para la demostración del cumplimiento de un/un grupo de EE-CRS, las muestras de orina debían:

1. Poderse identificar de forma correcta.
2. Tener <24 meses.
3. No haber sufrido >5 ciclos de congelación-descongelación.
4. Haber sido almacenadas a -20°C.
5. Para las procedentes de estudios clínicos con otros fines: (1) Cumplir con los criterios de inclusión exigidos en dicho estudio; (2) haber recibido el consentimiento por parte de los participantes que sus muestras fueran analizadas con carácter retroactivo para otros fines.

6. Para las procedentes de campañas de recolecta para la validación de iVCU: (1) Proceder de participantes mayores de 18 años; (2) no diagnosticados de EC, sensibilidad al gluten no celíaca, alergias alimentarias, intolerancias alimentarias u otro tipo de enfermedades gastrointestinales; (3) participantes que estuvieran dispuestos a seguir una dieta estricta; (4) haber sido instruidos para seguir una DSG, en caso de que se exigiera; (5) tener la determinación y la capacidad para la recogida diaria de orina; y (6) tener la capacidad de rellenar cuestionarios dietéticos.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

1. Imposibilidad de identificar la muestra, debido a causas como una identificación incorrecta o etiqueta ilegible.
2. Tener >24 meses.
3. Haber sufrido >5 ciclos de congelación-descongelación.
4. No haber sido almacenadas a -20°C.
5. Encontrarse en un recipiente, roto, abierto o en mal estado.
6. Para las procedentes de estudios clínicos con otros fines: (1) Cumplir con los criterios de exclusión exigidos en dicho estudio; (2) No haber recibido el consentimiento por parte de los participantes para que sus muestras fueran analizadas con carácter retroactivo para otros fines.
7. Para las procedentes de campañas de recolecta para la validación de iVCU: (1) participantes <18 años y de edad; (2) participantes con patologías asociadas o enfermedades psiquiátricas graves; (3) participantes que no recogieran las muestras correctamente; (4) no haber sido instruidos en realizar una DSG, en caso de que esta fuera necesaria; y (5) participantes que no rellenaran los cuestionarios dietéticos.

3.2.2 Muestroteca, procedencia de las muestras

3.2.2.1 Plan de recogida de muestras negativas (PRM-)

Campaña voluntaria lanzada en noviembre de 2019 **para la recolecta de orinas GIP negativas** entre los trabajadores de Biomedal S.L. La orinas fueron nombradas como “PRM-.Código de voluntario (binumérico)_Fecha(AAMMDD)_Hora(HHMM)”, por ejemplo “PRM-.02_191124_1724”.

Para la obtención estas muestras se les pidió a los participantes que siguieran una estricta **dieta sin gluten durante al menos 24 horas** ($\geq 24h$) y las horas posteriores de recolecta, y

que, además, rellenaran cuestionarios dietéticos para confirmar la ausencia de gluten en su dieta.

En total, se recolectaron **45 orinas** de 5 participantes con volúmenes entre **20-50 mL**, las cuales, tras la revisión de los cuestionarios dietéticos, se consideraron **GIP negativas**.

3.2.2.2 Plan de recogida de muestras positivas (PRM+)

Campaña voluntaria lanzada en septiembre de 2020 para la recolecta de orinas **GIP positivas** entre los trabajadores de Biomedal S.L. Las orinas fueron nombradas como “PRM+.Código de voluntario (binumérico)_O_ número de la orina(binumérico)”, por ejemplo “PRM+.02_O_09”.

Para la obtención estas muestras se les pidió a los participantes que durante dos días consecutivos **ingirieran para cenar**, el primer día, **un plato de pasta (10 g de gluten)** y el segundo, **una hamburguesa de seitán (20 g de gluten)** y recolectaran las orinas durante las 24 h siguientes.

En total, se recolectaron **83 orinas** de 6 voluntarios con volúmenes entre **20-50 mL**, las cuales, se consideraron **GIP positivas**.

3.2.2.3 Seguimiento de la DSG en EC recién diagnosticados y diagnosticados hace más de 24 meses (HVR)

Se dispuso de **108 orinas** de 29 participantes **de EC recién diagnosticados a dieta con gluten** del estudio de Ruiz-Carnicer *et al.*, 2020 (Ruiz-Carnicer *et al.*, 2020). Dichas orinas, **consideradas GIP positivas**, estaban identificadas como “Código de voluntario (binumérico)_Letra (a, b, c, d, en dependencia del día de la recolecta de orina)_0 meses”, por ejemplo, “178_c_0 meses”. El acrónimo de identificación de este estudio es HVR.

3.2.2.4 Ingestas controladas de gluten (DINAGIP PILOTO y DINAGIP)

Se dispuso de 882 orinas del estudio **DINAGIP** de Coto *et al.*, 2021 (Coto *et al.*, 2021). Este estudio abarcó a 20 voluntarios sanos que **siguieron la misma dieta** durante un periodo de 19 días. De las 882 orinas, **213 fueron consideradas GIP positivas**, entre ellas las **106 orinas** excretadas tras la ingesta de **50 mg** y **107**, tras la ingesta de **2 g**, y **el resto de ellas fueron consideradas GIP negativas** (Figura 3.1). Estas orinas estaban identificadas como “D.Código de voluntario (binumérico)_O_nº de la orina (tres números)”, por ejemplo “D07_O_047”.

Fase de lavado

Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Dieta sin gluten	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ingesta 50 mg							X												
Ingesta 2 g																		X	
Comida sin-gluten precocinada*								X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Recolección de orina						X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Cuestionario dietético	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

*Estos menús fueron preparados de por un catering y la ausencia de gluten en cada uno de los platos fue certificada.

Figura 3.1. Cronograma del estudio, para la recolección de muestras GIP positivas tras la ingesta de 50 mg y 2 g de gluten. Figura modificada de (Coto et al., 2021).

Asimismo, se tuvieron al alcance las orinas del estudio piloto de DINAGIP. Este estudio piloto llevado a cabo en marzo de 2019, tuvo como objetivo ajustar el estudio DINAGIP. En él participaron **tres voluntarios sanos**, empleados de Biomedal SL, quienes durante **7 días llevaron una DSG** estricta ingiriendo los días **2, 4 y 6 del estudio, 50 mg, 500 mg y 5 g de gluten** respectivamente. Cada orina fue enumerada, en orden de entrega. En caso de que una orina hubiera sido recolectada en varios botes, fue identificada como “n°orina.n°bote”, por ejemplo “38.2”.

En este estudio piloto recolectaron un total de 154 botes de 101 micciones, con un volumen entre 5-30 mL. Las **71 orinas botes recibidos los días el día 1, 3, 5 y 7 del estudio se consideraron GIP negativas, los 83 botes recibidos el día 2, 4 y 6, GIP positivas.**

3.2.3 Orinas con concentraciones conocidas de GIP

Para la obtención de orinas con concentraciones conocidas de GIP se realizaron fortificaciones de orinas GIP negativas con **33-mer de la α -gliadina** (Biomedal S.L., Sevilla, España), péptido empleado como modelo de GIP en orina.

Previo a la fortificación, se comprobaba por el método iVYCHECK GIP Urine, (Biomedal S.L., Sevilla, España), que la orina GIP negativa seleccionada era en efecto GIP negativa. Tras ello, el 33-mer de la α -gliadina era resuspendido en PBS 1X llevándolo a 10, 1 o 0,1 μ g/mL. Finalmente, el volumen requerido del 33-mer resuspendido en PBS1X era añadido a la orina GIP negativa; respetando que el volumen añadir de 33-mer no sobrepasara el 10% del volumen total.

3.3 iVYCHECK GIP Urine

El iVYCHECK GIP Urine (iVCU, Biomedal S.L., Sevilla, España) es un producto diseñado para la detección de GIP en muestras de orina, cuyo método se encuentra basado en un ensayo cualitativo de tipo LFIA. Este kit lo constituyen dos compones:

- **Solución de acondicionamiento_iVYC (referencia: RS-6429)**, un buffer para las orinas. Envasado por volúmenes de **5 mL**.

- **iVYCHECK Stick** (con pipeta de plástico) (**referencia: RS-6514**), tira inmunocromatográfica de flujo lateral. Cada IEFL es envasado de **forma individual**.

Se debe tener en cuenta que existen dos formatos del mismo kit, que sólo difieren en el número de IEFL que los componen:

- **KT-6412:** Test rápido para la detección de Péptidos Inmunogénicos del Gluten (GIP) en orina, **10 Test**.
- **KT-6411:** Test rápido para la detección de Péptidos Inmunogénicos del Gluten (GIP) en orina, **25 Test**.

En dependencia de los ensayos diseñados para la verificación y validación del mismos se **solicitó la producción de un número de kits y lotes cerrado**.

Para el análisis de muestras de orina con este producto, primero se descongelaban (en caso necesario), atemperaban y homogeneizaban las orinas de interés. Tras ello, las orinas eran diluidas 70:30 v:v, en solución de acondicionamiento, posteriormente, 100 µL de la mezcla añadida en la tira inmunocromatográfica. Finalmente, transcurridos 30 min desde la adición de la muestra, se realizaba una interpretación visual de los resultados. Los resultados obtenidos fueron de tres tipos (Figura 3.2):

- **Positivo:** línea test de color rojizo, y la línea control verde.
- **Negativo:** línea test no coloreada, roja incompleta o de un color distinto al rojizo, y la línea control verde.
- **Inválido:** Ausencia de línea verde en la zona control.

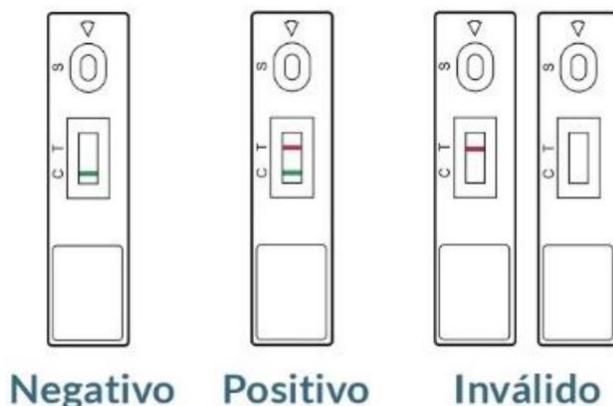


Figura 3.2. Resultados posibles para el test de iVYCHECK GIP Urine.

3.3.1 Interpretación semi-cuantitativa de los resultados: Escala G

A fin de obtener **mayor información de las muestras**, y debido a que la línea test se colorea de forma más intensa a medida que aumenta la concentración de GIP en la muestra, se empleó **la escala G** (Biomedal S.L., Sevilla, España). Se debe tener en cuenta de que este

método es complementario al producto iVCU, que su uso es meramente informativo, y que **no está validado**.

La escala G, establece la **escala intensidades rojizas jerárquicas**, G0-G10, obtenibles en la zona de la línea control de la prueba iVCU. Estas intensidades se valoran de forma visual a la finalización de la prueba, es decir, transcurridos los 30 minutos tras la adición de la muestra (Figura 3.3).

El valor $\geq G2$ es considerado como marcador de positividad (Figura 3.3). Por tanto:

- Las orinas cuyo resultado visual en la escala G era determinado entre **G2-G10** se consideraban **positivas**, interpretando que aquellas con un valor numérico G mayor tendrán una concentración de GIP superior.
- Las orinas a las que se les atribuía un valor **G0-G1**, eran consideradas **negativas**, donde el G1 fue empleado para todas aquellas orinas cuya línea test era de cualquier tono distinto al rojo.



Figura 3.3. Patrón de intensidades de la línea test.

4 RESULTADOS

4.1 ARCHIVOS Y DATOS GENERADOS: PROs, FRMs e INFs

En relación con los EE-CRS descritos en el apartado 1.1 de este capítulo solicitados al iVCU, se determinó la necesidad de **validar los parámetros recogidos en la Tabla 3.6**. Una vez establecidos, se elaboraron: un formulario genérico, para la recogida datos generados durante el ensayo, el FRM-0001v01; nueve protocolos y nueve formularios específicos, uno por cada parámetro a validar (Tabla 3.6). El cumplimiento de todos los EE-CRS se tuvo en cuenta en todo momento, a pesar de que su demostración quedara recogida en un único protocolo.

Una vez generado y aprobado el PRO y el FRM asociado, se solicitaba al departamento de producción un número y lote de kits de iVCU y 33-mer cerrado, necesario para su ejecución, además de buscar y preparar las muestras especificadas (Tabla 3.7).

Luego de ejecutar un PRO, a modo de evidencia de su realización, los FRM genéricos y específicos rellenos se almacenaban siguiendo las indicaciones del P-07, y los resultados recogidos en un INF (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Protocolos y formularios creados para la verificación y validación de los parámetros de funcionamiento analítico y clínico del producto iVCU, especificados según el CRS que demuestran.

EE-CRS						Parámetro	ID protocolo	ID formulario	ID informe
1.3	12.1	12.6				Especificidad analítica	PRO-0019v01	FRM-0020v01	INF-0021v01
1.1	12.2					Sensibilidad Analítica	PRO-0013v01	FRM-0014v01	INF-0015v01
12.2	12.5					Rango dinámico	PRO-0141v01	FRM-0144v01	INF-0142v01
12.3						Repetibilidad	PRO-0077v01	FRM-0078v01	INF-0088v01
12.4						Reproducibilidad	PRO-0079v01	FRM-0078v01	INF-0088v01
10.1	10.3					Estabilidad a Tiempo Real	PRO-0025v01	FRM-0026v01	INF-0027v01
10.1	10.2	10.3				Estabilidad en Transporte	PRO-0072v01	FRM-0026v01	INF-0027v01
1.1	1.2	12.1	13.1	13.2	13.3	Funcionamiento clínico	PRO-0028v01	FRM-0029v01	PER-0030v01

Tabla 3.7. Cálculo de kit y muestras según lo especificado en los protocolos.

Parámetro	ID protocolo	Referencia kit	n° de lotes	n° kit/lote	Ud. 33-mer*	n° muestras GIP -	Volumen/ muestra GIP -	n° muestras GIP +	Volume n/ muestras GIP +	Otros
Especificidad analítica	PRO-0019v1	KT-6411	1	12	n/a	n/a	n/a	100	≥ 5 mL	Análisis BLAST
Sensibilidad analítica	PRO-0013v1	KT-6411	2	3	1	75	73* ≥ 1,2 mL / 2* ≥ 6 mL	n/a	n/a	n/a
Rango dinámico	PRO-0141v1	KT-6411	1	1	1	1	≥ 1,5 mL	n/a	n/a	n/a
Repetibilidad	PRO-0077v1	KT-6411	1	2	n/a	2	≥ 2 mL	2	≥ 2 mL	n/a
Reproducibilidad	PRO-0079v1	KT-6411	3	5 kits*2lotes/10 kits*1 lote	1	9	8* ≥ 3 mL / 1* ≥ 40 mL	9	≥ 3 mL	n/a
Estabilidad a Tiempo Real	PRO-0025v1	KT-6412	3	10	1	3	2* ≥ 20 mL / 1* ≥ 80 mL	2	≥ 20 mL	n/a
Estabilidad en Transporte	PRO-0072v1	KT-6412	1	12	1	3	2* ≥ 10 mL / 1* ≥ 30 mL	2	≥ 10 mL	n/a
Funcionamiento clínico	PRO-0028v1	KT-6411	2	10	n/a	120	≥ 1 mL	120	≥ 1 mL	Publicaciones científicas

ID: identificación; PRO: protocolo; n°: número; ud: unidad(es); GIP: péptido inmunogénico del gluten; GIP -: GIP negativa; GIP +: GIP positivas.

*El 33-mer se encuentra envasado en unidades de 10 y 14,4 µg, el hecho de que sea necesaria 1 ud no implica el uso de todo el contenido

4.2 RESUMEN DE RESULTADOS

A continuación, se recoge un breve resumen, de cada PRO generado, así como algunos recortes de los datos tratados con los FRM, y los resultados volcados en los INF. Se debe tener en consideración en todo momento, que:

- Para discernir entre valores positivos y negativos se usó el valor $\geq G2$ como marcador de positividad (Figura 3.3).
- La verificación de los requisitos se realizó en términos cualitativos (negativo/positivo) debido a que esta la funcionalidad del test se basa en este resultado de tipo dicotómico. El valor G se usó para una valoración más objetiva de los resultados.
- Todos los EE-CRS se debían cumplir en todo momento, aunque el objetivo no fuese su verificación.
- En cada ensayo a ejecutar especificado por un PRO, las muestras se ensayaron utilizando un lote de iVYCHECK GIP Urine por un solo analista, un mismo día, en las mismas condiciones, a no ser que se indicara lo contrario.

4.2.1 Especificidad analítica

4.2.1.1 Terminología y Objetivo

Con el objetivo de demostrar que el iVCU cumple con los **CR1.3**, **CR12.1** y **CR12.6** se crearon y ejecutaron el PRO e FRM asociados a especificidad analítica (Tabla 3.6).

La especificidad analítica viene definida por la capacidad de un producto para **medir una diana concreta en una matriz específica** en presencia de otras sustancias/organismos interferentes, especies/agentes de reactividad cruzada y similares. Por tanto, el propósito fue verificar que el producto no da reacción cruzada con ningún componente que se encuentre frecuentemente en orinas humanas, cuya llegada a la misma se considere inevitable o incontrolable, como, por ejemplo:

1. Componentes típicos de la orina.
2. Sustancias ingeridas por el paciente (alimentos, suplementos vitamínicos, etc.).
3. Virus y bacterias propias del tracto GI y urinario, o aquellas adquiridas por transmisión.

4.2.1.2 Protocolo

El análisis del límite de la especificidad analítica consistió en:

- El análisis de 100 orinas GIP negativas una única vez. Estas orinas debían provenir de al menos 10 voluntarios a DSG (>24h), con un consumo de alimentos variado y correctamente registrado.
- Análisis BLAST para la detección de epítomos reconocidos por los Ac G12 y A1 en proteínas humanas, víricas y bacterianas.

4.2.1.3 Análisis de los resultados

Finalmente se analizaron de todas las orinas recolectadas los días 9 y 13 en el estudio DINAGIP (Figura 3.1). Un total de 116 orinas provenientes de 20 voluntarios cuyas comidas incluyeron:

- Productos lácteos: leche, yogur, queso fresco, cuajada de queso, kéfir.
- Carne, pescado y huevos:
 - Pescado: melva (similar al atún), pulpo, calamar, bacalao.
 - Carne: pollo, cerdo, pavo.
 - Huevos
- Tubérculos, legumbres y frutos secos.
 - Tubérculos; patatas.
 - Legumbres: garbanzos, lentejas.
 - Frutos de cáscara: almendras, nueces,
- Cereales, azúcares:
 - Cereales: arroz
 - Productos etiquetados como sin gluten*: pasta, pan, patatas fritas, galletas, bollería, chocolate, mayonesa, etc.
 - Azúcares: azúcar blanco, miel
- Frutas y verduras:
 - Frutas: papaya, naranja, fresas, mandarina, pera, caqui, plátano, kiwi, tomate
 - Verduras: aguacate, pimientos, espinacas, champiñones, calabacín.
- Aceites, margarinas, manteca y alimentos derivados del cerdo:
 - Aceite de oliva.
 - Margarina.
 - Fuet, jamón serrano, jamón york.
- Bebidas:
 - Alcohólicas: vino, cerveza sin gluten.
 - Sin alcohol: agua, zumo de naranja, té, coca cola, café.

114/116 (98,27%) obtuvieron un resultado negativo (<G2) (Tabla 3.8). Los dos voluntarios que presentaron muestras positivas > 24 h después de la última ingesta de gluten documentada, no habían ingerido ningún alimento con gluten según sus cuestionarios dietéticos. Además, estos mismos individuos presentaron otras orinas negativas. Asimismo, otros individuos ingirieron los mismos alimentos, por lo que la **inespecificidad causa de la ingesta de un tipo de alimento en concreto o algún componente específico de la orina quedó descartada.**

Tabla 3.8. Resultados del ensayo: orinas negativas analizadas para el ensayo de especificidad analítica.

Voluntario	ID muestra	Día del estudio	Tiempo desde la última ingesta de gluten (h)*	Condición	Resultado por iVYCHECK GIP Urine
DINAGIP.1	D01-O-036	13	27,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.1	D01-O-037	13	32,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.1	D01-O-038	13	34,33	Negativo	Negativo
DINAGIP.1	D01-O-039	13	37,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.2	D02-O-009	9	25,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.2	D02-O-034	13	25,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.2	D02-O-035	13	28,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.2	D02-O-036	13	31,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.2	D02-O-037	13	33,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.2	D02-O-038	13	34,25	Negativo	Negativo
DINAGIP.2	D02-O-039	13	35,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.2	D02-O-040	13	37,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.3	D03-O-026	13	32,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.3	D03-O-027	13	35,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.4	D04-O-039	13	28,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.4	D04-O-040	13	32,33	Negativo	Negativo
DINAGIP.4	D04-O-041	13	35,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.5	D05-O-026	13	28,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.5	D05-O-027	13	30,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.5	D05-O-028	13	33,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.5	D05-O-029	13	38,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.6	D06-O-006	9	25,00	Negativo	Positivo
DINAGIP.6	D06-O-024	13	25,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.6	D06-O-025	13	32,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.6	D06-O-026	13	36,42	Negativo	Negativo
DINAGIP.6	D06-O-027	13	38,83	Negativo	Negativo
DINAGIP.7	D07-O-087	13	25,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.7	D07-O-088	13	25,83	Negativo	Negativo
DINAGIP.7	D07-O-089	13	26,42	Negativo	Negativo

DINAGIP.7	D07-O-090	13	28,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.7	D07-O-091	13	29,17	Negativo	Negativo
DINAGIP.7	D07-O-092	13	29,93	Negativo	Negativo
DINAGIP.7	D07-O-093	13	31,58	Negativo	Negativo
DINAGIP.7	D07-O-094	13	33,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.7	D07-O-095	13	34,75	Negativo	Negativo
DINAGIP.7	D07-O-096	13	35,62	Negativo	Negativo
DINAGIP.7	D07-O-097	13	36,17	Negativo	Negativo
DINAGIP.7	D07-O-098	13	36,83	Negativo	Negativo
DINAGIP.7	D07-O-099	13	37,25	Negativo	Negativo
DINAGIP.7	D07-O-100	13	38,42	Negativo	Negativo
DINAGIP.8	D08-O-051	13	24,33	Negativo	Negativo
DINAGIP.8	D08-O-052	13	27,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.8	D08-O-053	13	28,67	Negativo	Negativo
DINAGIP.8	D08-O-054	13	30,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.8	D08-O-055	13	32,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.8	D08-O-056	13	33,83	Negativo	Negativo
DINAGIP.8	D08-O-057	13	35,75	Negativo	Negativo
DINAGIP.8	D08-O-058	13	37,33	Negativo	Negativo
DINAGIP.9	D09-O-010	9	27,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.9	D09-O-035	13	25,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.9	D09-O-036	13	27,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.9	D09-O-037	13	29,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.9	D09-O-038	13	30,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.9	D09-O-039	13	33,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.9	D09-O-040	13	35,67	Negativo	Negativo
DINAGIP.9	D09-O-041	13	37,25	Negativo	Negativo
DINAGIP.10	D10-O-046	13	27,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.10	D10-O-047	13	28,33	Negativo	Negativo
DINAGIP.10	D10-O-048	13	30,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.10	D10-O-049	13	30,67	Negativo	Negativo
DINAGIP.10	D10-O-050	13	31,67	Negativo	Negativo
DINAGIP.10	D10-O-051	13	32,67	Negativo	Negativo
DINAGIP.10	D10-O-052	13	36,67	Negativo	Negativo
DINAGIP.10	D10-O-053	13	38,25	Negativo	Negativo
DINAGIP.11	D11-O-040	13	24,85	Negativo	Negativo
DINAGIP.11	D11-O-041	13	27,58	Negativo	Negativo
DINAGIP.11	D11-O-042	13	29,92	Negativo	Negativo
DINAGIP.11	D11-O-043	13	33,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.11	D11-O-044	13	36,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.11	D11-O-045	13	38,15	Negativo	Negativo
DINAGIP.12	D12-O-031	13	28,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.12	D12-O-032	13	29,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.12	D12-O-033	13	33,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.12	D12-O-034	13	38,92	Negativo	Negativo

DINAGIP.13	D13-O-036	13	25,43	Negativo	Negativo
DINAGIP.13	D13-O-037	13	27,08	Negativo	Negativo
DINAGIP.13	D13-O-038	13	30,08	Negativo	Negativo
DINAGIP.13	D13-O-039	13	31,53	Negativo	Negativo
DINAGIP.13	D13-O-040	13	33,53	Negativo	Positivo
DINAGIP.13	D13-O-041	13	38,75	Negativo	Negativo
DINAGIP.14	D14-O-023	13	24,15	Negativo	Negativo
DINAGIP.14	D14-O-024	13	27,30	Negativo	Negativo
DINAGIP.14	D14-O-025	13	30,75	Negativo	Negativo
DINAGIP.14	D14-O-026	13	31,58	Negativo	Negativo
DINAGIP.14	D14-O-027	13	33,42	Negativo	Negativo
DINAGIP.14	D14-O-028	13	35,87	Negativo	Negativo
DINAGIP.16	D16-O-037	13	25,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.16	D16-O-038	13	27,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.16	D16-O-039	13	29,17	Negativo	Negativo
DINAGIP.16	D16-O-040	13	32,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.16	D16-O-041	13	33,33	Negativo	Negativo
DINAGIP.16	D16-O-042	13	37,15	Negativo	Negativo
DINAGIP.17	D17-O-012	9	25,50	Negativo	Negativo
DINAGIP.17	D17-O-044	13	26,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.17	D17-O-045	13	28,25	Negativo	Negativo
DINAGIP.17	D17-O-046	13	34,25	Negativo	Negativo
DINAGIP.17	D17-O-047	13	37,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.17	D17-O-048	13	38,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.19	D19-O-034	13	25,78	Negativo	Negativo
DINAGIP.19	D19-O-035	13	28,13	Negativo	Negativo
DINAGIP.19	D19-O-036	13	30,70	Negativo	Negativo
DINAGIP.19	D19-O-037	13	35,35	Negativo	Negativo
DINAGIP.21	D21-O-040	13	25,75	Negativo	Negativo
DINAGIP.21	D21-O-041	13	27,75	Negativo	Negativo
DINAGIP.21	D21-O-042	13	30,08	Negativo	Negativo
DINAGIP.21	D21-O-043	13	33,42	Negativo	Negativo
DINAGIP.21	D21-O-044	13	36,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.22	D22-O-038	13	25,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.22	D22-O-039	13	29,20	Negativo	Negativo
DINAGIP.22	D22-O-040	13	30,60	Negativo	Negativo
DINAGIP.22	D22-O-041	13	32,28	Negativo	Negativo
DINAGIP.22	D22-O-042	13	34,47	Negativo	Negativo
DINAGIP.23	D23-O-033	13	25,00	Negativo	Negativo
DINAGIP.23	D23-O-034	13	25,75	Negativo	Negativo
DINAGIP.23	D23-O-035	13	30,33	Negativo	Negativo
DINAGIP.23	D23-O-036	13	34,50	Negativo	Negativo

ID: identificación.

*La variable "Tiempo desde la última ingesta de gluten (h)" se presenta en formato decimal.

Tras el análisis de BLASTp:

- Se identificaron tres proteínas (expresadas en los mismos loci) de tres especies de **bacterias** con epítomos para A1 y G12, la serina/treonina quinasa de *Nonomuraea sp.* NEAU-A123; proteína hipotética DME01_18560 de *Candidatus Rokubacteria* y una proteína de la familia SCO5717 reguladora del crecimiento ATPasa de *Streptomyces sp.* A0642. No obstante, no se espera que ninguna de estas bacterias esté presente en muestras humanas.
- No se encontraron **proteínas víricas** con epítomos para A1 y G12.
- No se encontraron **proteínas humanas** con epítomos para A1 y G12.

4.2.2 **Sensibilidad analítica**

4.2.2.1 Terminología y Objetivo

Con el objetivo de demostrar que el iVCU cumple con los **CR 1.1.** y **CR12.2** se crearon y ejecutaron el PRO y FRM asociados a la sensibilidad analítica (Tabla 3.6), la cual viene definida por:

1. **Límite de negativos (LoN)**, el equivalente al LoB para ensayos cualitativos se define como la señal más alta que es probable que se observe para una muestra blanca/negativa, con una probabilidad establecida.
2. **Límite de Corte (LoC)**, el equivalente al LLoQ para ensayos cualitativos, se define como aquella concentración de GIP en muestra de orina en la que al menos un porcentaje establecido de las réplicas obtienen un resultado positivo.

Teniendo en cuenta estas definiciones y los EE-CRS a cumplir, el propósito fue verificar que:

1. El producto es capaz de detectar péptidos inmunogénicos derivados del gluten, usando como modelo el 33-mer de la α -gliadina.
2. El 95% de las orinas GIP negativas obtienen un resultado considerado negativo ($<G2$); para los productos de bajo riesgo como el iVCU, una tasa de falsos positivos menor a un 5% (valor α de 0,05) en blancos es adecuada.
3. El 95% de las orinas GIP negativas fortificadas a 2,5 ng 33-mer/mL obtienen un resultado considerado positivo ($\geq G2$) (Figura 3.3); (a) para productos de bajo riesgo como el iVCU, una tasa de falsos negativos menor a un 5% (valor β de 0,05) es adecuada; (b) el valor de corte mínimo se fija en 2,5 ng 33-mer/mL orina, debido a que esta concentración está determinada como aquella que permitiría la detección de una proporción de transgresiones de 50 mg de gluten, descrita como la cantidad

mínima necesaria para causar un empeoramiento significativo de la vellosidad del intestino delgado en pacientes celíacos.

4.2.2.2 Protocolo

1. LoN:

- Consistió en el análisis único de >100 muestras de orina GIP negativas (según cuestionario dietético).

2. LoC:

- Consistió en el análisis repetido dos muestras de orina GIP negativas fortificadas con 33-mer a 1,5; 2; 2,5; 3; 5 y 25 ng/mL, analizándola 5 veces por cada fortificación con cada orina, es decir, 10 análisis por concentración. Para la selección de estas dos orinas GIP negativas a fortificar previamente se comprobó su negatividad por un análisis por triplicado en iVCU.

4.2.2.3 Análisis de los resultados

1. **LoN:** Con el objetivo de determinar el LoN, se reanalizaron los resultados obtenidos en el ensayo de especificidad analítica, donde 114 de las 116 orinas GIP negativas analizadas (**98,28% > 95%**) **obtuvieron un resultado considerado negativo (<G2)** (Tabla 3.8).
2. **LoC:** La primera concentración analizada donde $\geq 95\%$ de muestras analizadas obtuvieron un resultado positivo, fue la de 2,5 ng 33-mer/mL. En efecto, el 100% (**10/10**) repeticiones a esta concentración (**100% > 95%**) **obtuvieron un resultado positivo** (Tabla 3.9).

4.2.3 Rango dinámico

4.2.3.1 Terminología y Objetivo

Con el objetivo de demostrar que el iVCU cumple con los **CR 12.2. y CR12.5** se crearon y ejecutaron el PRO y FRM asociados al rango dinámico (Tabla 3.6).

El rango dinámico representa la capacidad de detección de concentraciones específicas de GIP por parte del producto iVCU y viene definido por sus límites inferior (LoC, en el caso que nos ocupa), y superior:

- El **LoC** quedó definido en el protocolo PRO-0013.v1 Sensibilidad Analítica, y sus resultados reflejados en el apartado 4.4.1. de este capítulo.
- El **límite superior** es la máxima concentración de GIP que el producto es capaz de detectar. En un producto cualitativo el límite superior se relativiza en

correspondencia al **efecto hook o gancho**, que se conoce como la obtención de un resultado falso negativo, invalido o una disminución de la señal, a causa de concentraciones elevadas de analito que provocan.

Teniendo en cuenta estas definiciones y los EE-CRS a cumplir, el propósito fue verificar que:

- El 95% las orinas GIP negativas fortificadas a 1000 ng 33-mer/mL obtienen un resultado positivo ($\geq G2$); (a) para productos de bajo riesgo como el iVCU, una tasa de falsos negativos menor a un 5% (valor β de 0,05) es adecuada; (b) la concentración de 1000 ng 33-mer/mL orina, se considera supra-fisiológica en base a las investigaciones de Syage *et al.*, 2018 en las que relacionan un consumo de 150 mg de gluten con una presencia de GIP en orina de 3,2 ng/mL. Estimando por tanto, que de un consumo entre 10-15 g de gluten diarios, habituales en la dieta occidental, llegarían a la orina 320 ng/mL, 3 veces menos del nivel propuesto (Syage *et al.*, 2018); (c) la intensidad generada por el 33-mer a 1000 ng/mL no de lugar al efecto Hook.
- Que el producto es capaz de detectar dentro del rango de concentraciones que van desde el LoC hasta el límite superior de detección.

4.2.3.2 Protocolo

El análisis del rango dinámico consistió en:

- El análisis repetido dos muestras de orina GIP negativas fortificadas con 33-mer a 1,5; 2; 2,5; 3; 5 y 25 ng/mL, analizándola 5 veces por cada fortificación con cada orina, es decir, 10 análisis por concentración.
- Diez análisis repetidos de una muestra de orina GIP negativa, cuya negatividad hubiese sido previamente comprobada por iVCU, fortificada con 33-mer a 1000 ng/mL.

4.2.3.3 Análisis de los resultados

En todas las concentraciones **analizadas entre 2,5 y 1000 ng 33-mer/mL de orina, el 100% (50/50) de las repeticiones analizadas obtuvieron resultado positivo ($\geq G2$)**. Además, se visualiza una relación entre el aumento de la concentración de fortificación y la intensidad de la señal (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Resultados del ensayo: análisis por triplicado de las dos orinas (38.3 y 73.3) GIP negativas empleadas para fortificar y los análisis orinas fortificadas, incluyendo el valor G como resultado.

Valor G							
30 min	Para fortificar de 33-mer en ng/mL						
Blancos	0	0	0	0	0	0	0
38.3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
73.3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Valor G							
30 min	Fortificación de 33-mer en ng/mL						
Serie	1000	25	5	3	2,5	2	1,5
1	10	8	5	3	2	1	1
2	10	8	5	3	2	2	1
3	10	8	5	3	3	2	1
4	10	8	5	3	2	1	1
5	10	8	4	3	3	1	1
6	10	8	4	3	2	2	1
7	10	7	4	3	2	2	1
8	10	7	4	3	2	2	1
9	10	7	4	3	2	1	1
10	10	8	5	3	2	1	1
% de Positivas	100%	100%	100%	100%	100%	50%	0%

4.2.4 Repetibilidad

4.2.4.1 Terminología y Objetivo

Con el objetivo de demostrar que el iVCU cumple con el **CR 12.3**, se crearon y ejecutaron el PRO y FRM asociados a la repetibilidad (Tabla 3.6).

La repetibilidad, es parte de la precisión las cuales se entienden como:

1. La **precisión** es el error aleatorio del ensayo que se define como la concordancia entre los valores obtenidos de una magnitud (muestra) mediante mediciones repetidas en el mismo objeto (equipo de análisis) o en objetos similares en condiciones específicas. La repetibilidad y la reproducibilidad son los dos componentes de la precisión en un sistema de medición.
2. La **repetibilidad** es la concordancia de los valores medidos entre **mediciones repetidas de la misma muestra, realizadas en las mismas condiciones** (mismo lugar, misma persona, mismo método, mismo equipo, durante un corto periodo de tiempo, etc).

Teniendo en cuenta estas definiciones y los EE-CRS a cumplir, el propósito fue verificar que:

1. El 95% del total de repeticiones ensayadas en las mismas condiciones de las orinas de la misma muestra GIP negativa (voluntarios a DSG <24h) obtiene un resultado negativo; (a) para productos de bajo riesgo como el iVCU, una tasa de falsos negativos menor a un 5% (valor β de 0,05) es adecuada.
 - El 95% del total de repeticiones ensayadas en las mismas condiciones de las orinas de la misma muestra GIP positiva (concentraciones por encima del LoC) obtiene un resultado positivo; (a) para productos de bajo riesgo como el iVCU, una tasa de falsos negativos menor a un 5% (valor β de 0,05) es adecuada; (b) que la intensidad generada por la misma orina este dentro de ± 2 en la escala G (Figura 3.3).

4.2.4.2 Protocolo

El análisis del límite de la repetibilidad consistió en:

- El análisis repetido dos muestras de orina GIP negativas fortificadas con 33-mer a 1,5; 2; 2,5; 3; 5 y 25 ng/mL, analizándola 5 veces por cada fortificación con cada orina, es decir, 10 análisis por concentración.
- El análisis repetido de 2 orinas GIP negativas, 10 análisis por cada muestra.
- El análisis repetido de 2 orinas GIP negativas, 10 análisis por cada muestra.

4.2.4.3 Análisis de los resultados

En todas las concentraciones analizadas entre 2,5 y 25 ng 33-mer/mL de orina, el 100% (40/40) de las repeticiones analizadas obtuvieron resultado positivo ($\geq G2$) (Tabla 3.9).

El 100% (10/10 y 10/10) de los análisis efectuados a las dos orinas GIP negativas fueron resultados negativos, y el 100% (10/10 y 10/10) de los análisis efectuados a las dos GIP positivas obtuvieron un resultado positivo (Tabla 3.10).

Tabla 3.10. Resultados del ensayo tras el análisis de 10 réplicas de dos orinas GIP negativas y dos GIP positivas, efectuadas el mismo día, por el mismo analista y mismo kit.

GIP	Identificación	Repetición	Valor G	Resultado	Lote	Analista	Día
Negativa	35	1	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	35	2	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	35	3	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	35	4	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	35	5	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	35	6	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	35	7	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	35	8	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	35	9	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	35	10	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019

Negativa	70	1	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	70	2	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	70	3	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	70	4	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	70	5	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	70	6	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	70	7	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	70	8	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	70	9	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Negativa	70	10	1	Negativa	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	27	1	7	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	27	2	7	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	27	3	7	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	27	4	7	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	27	5	7	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	27	6	7	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	27	7	7	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	27	8	7	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	27	9	7	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	27	10	7	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	59	1	4	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	59	2	4	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	59	3	4	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	59	4	4	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	59	5	4	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	59	6	4	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	59	7	4	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	59	8	4	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	59	9	4	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019
Positiva	59	10	4	Positiva	6411002	A.1	15/07/2019

GIP, péptido inmunogénico del gluten; A.1: Analista 1

4.2.5 Reproducibilidad

4.2.5.1 Terminología y Objetivo

Con el objetivo de demostrar que el iVCU cumple con el **CR 12.4**, se crearon y ejecutaron el PRO y FRM asociados a la reproducibilidad (Tabla 3.6).

La **reproducibilidad**, es parte de la **precisión** y viene definida por la **proximidad** de los valores medidos entre mediciones de la misma muestra realizadas **en condiciones diferentes** (lugar diferente, persona diferente, método diferente, equipo diferente, tiempo diferente).

Teniendo en cuenta estas definiciones y los EE-CRS a cumplir, el propósito fue verificar que:

1. El 95% del total de repeticiones ensayadas en distintas condiciones (distintos analistas, días diferentes y diferentes lotes del producto) de la misma muestra GIP negativa (voluntarios a DSG <24h) obtiene un resultado negativo; (a) para productos de bajo riesgo como el iVCU, una tasa de falsos negativos menor a un 5% (valor β de 0,05) es adecuada.
2. El 95% del total de repeticiones ensayadas en distintas condiciones (distintos analistas, días diferentes y diferentes lotes del producto) de la misma muestra GIP positiva (concentraciones por encima del LoC) obtiene resultado positivo; (a) para productos de bajo riesgo como el iVCU, una tasa de falsos negativos menor a un 5% (valor β de 0,05) es adecuada; (b) que la intensidad generada por la misma orina este dentro de ± 2 en la escala G (Figura 3.3).

4.2.5.2 Protocolo

El análisis del límite de la reproducibilidad consistió en:

- El análisis repetido dos muestras de orina GIP negativas fortificadas con 33-mer a 1,56; 2,8; 5 y 25 ng/mL, analizándola en total 12 veces por cada fortificación.
- El análisis repetido de 2 orinas GIP negativas, 12 análisis por cada muestra.
- El análisis repetido de 2 orinas GIP negativas, 12 análisis por cada muestra.
- Los 12 análisis se efectuaron en dos días, por dos analistas y 3 lotes de kit. Cada día los dos analistas realizaron un análisis de cada muestra con cada lote de kit.

4.2.5.3 Análisis de los resultados

En todas las concentraciones analizadas entre 2,8 y 25 ng 33-mer/mL de orina, **el 100% (36/36) de las repeticiones analizadas obtuvieron resultado positivo ($\geq G2$).**

El **100% (12/12 y 12/12)** de los análisis efectuados a las dos orinas **GIP negativas fueron resultados negativos**, y el **100% (12/12 y 12/12)** de los análisis efectuados a las dos **GIP positivas obtuvieron un resultado positivo**.

4.2.6 Estabilidad a tiempo real

4.2.6.1 Terminología y Objetivo

Con el objetivo de demostrar que el iVCU cumple con el **CR10.1 y CR10.3** se crearon y ejecutaron el PRO y FRM asociados a la estabilidad a tiempo real (Tabla 3.6).

La estabilidad tiempo real viene definida por:

1. La **estabilidad**, que se define como la capacidad del producto de mantener sus características físicas y funcionales de forma consistente a lo largo del tiempo.
2. **Vida útil**, que es el periodo que discurre entre la fecha de producción y el punto de tiempo anterior a la caducidad del mismo (se mide en días).
3. **Caducidad**, momento en el tiempo a partir del cual el producto pierde su capacidad de mantener sus características físicas y funcionales de forma consistente.

Teniendo en cuenta estas definiciones y los EE-CRS a cumplir, el propósito fue verificar que:

1. El kit de iVCU mantiene su funcionalidad e integridad física por un periodo mayor de 12 meses cuando se almacena en su embalaje original (sin haber sido abierto) y a temperatura ambiente: 15- 30°C. Para el producto iVCU, se considera que otros factores como la luz o humedad no alteraran su vida útil; (a) para los productos iVD un error en la apariencia o funcional en dos tiempos consecutivos se considera perdida de estabilidad; (b) una estabilidad de 12 meses permite almacenar y vender el producto con una caducidad aceptable.

4.2.6.2 Protocolo

El estudio de la estabilidad a tiempo real consistió en:

1. El análisis de **funcionalidad con tres lotes de producto** y con frecuencia trimestral y un último tiempo adicional, durante un periodo de tiempo de 25 meses de:
 - a. Una muestra positiva y dos negativas.
 - b. Una muestra de orina fortificada con el péptido 33-mer a una concentración por debajo del LoC, a 0,08 ng 33-mer/mL orina; y a dos concentraciones por encima del LoC, 1,2 y 10 veces mayor, a 3,12 ng 33-mer/mL orina, y 25 ng 33-mer/mL orina, respectivamente. Cada fortificación se efectuó de forma independiente el día del ensayo.
2. El análisis de **aspecto** de tres lotes de producto y con frecuencia trimestral y un último tiempo adicional, durante un periodo de tiempo de 25 meses.

4.2.6.3 Análisis de los resultados

En todos los tres lotes ensayados, los cuales fueron almacenados a 15-30°C, se observó el mismo efecto (Tabla 3.11):

- Del tiempo 1 al 4 del ensayo, las muestras negativas y la fortificada <LoC obtuvieron un resultado negativo. Aquella positiva y las fortificadas >LoC

obtuvieron un resultado positivo. Visualmente todos los componentes se veían correctos.

- En el tiempo 5 las muestras negativas y la fortificada <LoC obtuvieron un resultado negativo. Aquella positiva y la fortificada a 25 ng/mL obtuvieron un resultado positivo. Sin embargo, la fortificada a 3,12 ng/mL obtuvo un resultado negativo. Visualmente todos los componentes se veían correctos.
- En el tiempo 6 del ensayo, las muestras negativas y la fortificada <LoC obtuvieron un resultado negativo. Aquella positiva y las fortificadas >LoC obtuvieron un resultado positivo. Visualmente todos los componentes se veían correctos. Al volver a obtener resultados conformes a los esperados, **a tiempo 6 el iVCU se consideró estable** (549 días=18 meses).
- A tiempo 7, la solución de acondicionamiento (RS-6429), lucía aglomerados blancos enturbiando su aspecto físico y causando alteraciones en los resultados obtenidos (comprobado). Tras verificar la imposibilidad de que su aspecto físico volviera al original se dio por terminado el ensayo de estabilidad a tiempo real, no siguiendo adelante con los ensayos previstos.

Tabla 3.11. Resultados del ensayo de estabilidad a tiempo real con tres lotes de iVYCHECK GIP Urine

Lote 1/3		6412_QC01	Fecha creación	03/06/2019						
Condición muestra	ID muestra	Tiempo	0	1	2	3	4	5	6	7
		Fecha	03/06/2019	11/09/2019	22/11/2019	21/02/2020	15/05/2020	14/08/2020	03/12/2020	04/03/2021
		Tiempo transcurrido (días)	0	100	172	263	347	438	549	640
Negativo	PRM-.01_191127_1850		1	0	1	0	0	0	0	0
Negativo	PRM-.03_191127_1000		1	1	1	0	0	0	1	0
Negativa-Fortificada a 0,08 ng/mL	PRM-.03_191127_1000		1	1	1	1	0	0	1	3
Negativa-Fortificada a 3,12 ng/mL	PRM-.03_191127_1000		4	4	4	3	3	1	3	5
Negativa-Fortificada a 25 ng/mL	PRM-.03_191127_1000		8	6	7	8	8	5	9	10
Positiva	PRM+6-O-12		7	8	7	7	8	7	10	9
Aspecto visual kit (Etiquetas, embalaje y reactivos)			CORRECTO	CORRECTO	CORRECTO	CORRECTO	CORRECTO	CORRECTO	CORRECTO	INCORRECTO

Lote 2/3		6412_QC03	Fecha creación	03/06/2019						
Condición muestra	ID muestra	Tiempo	0	1	2	3	4	5	6	7
		Fecha	03/06/2019	11/09/2019	22/11/2019	21/02/2020	15/05/2020	14/08/2020	03/12/2020	04/03/2021
		Tiempo transcurrido (días)	0	100	172	263	347	438	549	640
Negativo	PRM-.01_191127_1850		1	1	1	0	0	0	1	0
Negativo	PRM-.03_191127_1000		1	1	1	1	0	0	1	0
Negativa-Fortificada a 0,08 ng/mL	PRM-.03_191127_1000		1	1	1	0	0	0	1	2
Negativa-Fortificada a 3,12 ng/mL	PRM-.03_191127_1000		4	4	4	3	3	1	4	5
Negativa-Fortificada a 25 ng/mL	PRM-.03_191127_1000		6	6	7	8	8	5	9	9
Positiva	PRM+6-O-12		7	7	7	7	8	7	9	8

Aspecto visual kit (Etiquetas, embalaje y reactivos)	CORRECTO	INCORRECTO							
--	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	------------

Lote 3/3	6412_QC02	Fecha creación	03/06/2019
----------	-----------	----------------	------------

Condición muestra	ID muestra	Tiempo	0	1	2	3	4	5	6	7
		Fecha	03/06/2019	11/09/2019	22/11/2019	21/02/2020	15/05/2020	14/08/2020	03/12/2020	04/03/2021
		Tiempo transcurrido (días)	0	100	172	263	347	438	549	640
Negativo	PRM-.01_191127_1850		0	0	1	0	0	0	1	0
Negativo	PRM-.03_191127_1000		0	0	1	0	0	0	1	0
Negativa-Fortificada a 0,08 ng/mL	PRM-.03_191127_1000		1	1	1	1	1	1	1	4
Negativa-Fortificada a 3,12 ng/mL	PRM-.03_191127_1000		4	4	4	3	3	1	3	6
Negativa-Fortificada a 25 ng/mL	PRM-.03_191127_1000		6	6	7	8	8	5	10	9
Positiva	PRM+6-O-12		8	8	7	7	8	7	10	8
Aspecto visual kit (etiquetas, embalaje y reactivos)			CORRECTO	INCORRECTO						

ID: identificación.

4.2.7 Estabilidad en transporte

4.2.7.1 Terminología y Objetivo

La estabilidad tiempo real viene definida por los mismos términos que se especifican en el punto 4.4.7.1.

La estabilidad a tiempo real es el estudio diseñado para cumplir con el **CR10.1** y **CR10.2** verificando que:

1. El kit de iVCU mantiene su funcionalidad e integridad física por un periodo mayor de 12 meses tras sufrir un periodo de transporte, y volver a ser almacenada a temperatura ambiente: 15- 30°C. Para el envío del producto iVCU en la UE, se consideran envíos como máximo de tres días de duración y la temperatura como el único factor que puede verse alterado durante el transporte; (a) para los productos iVD un error en la apariencia o funcional en dos tiempos consecutivos se considera pérdida de estabilidad; (b) una estabilidad de 12 meses permite almacenar y vender el producto con una caducidad aceptable; (c) envíos de 3 días con una variabilidad de temperatura entre -20°C y 45°C es adecuada para Europa.

4.2.7.2 Protocolo

El estudio de la estabilidad en transporte consistió en:

1. Simular las siguientes condiciones de transporte por cada cuatro kits del mismo lote de iVCU:
 - a. 72 h a -20 °C ±5°C
 - b. 72 h a 6 °C ± °C
 - c. 72 h a 45 °C ±5°C
 - d. 72 h a temperatura ambiente (15-30°C) **los ensayos de estabilidad a tiempo real efectuados con el mismo lote fueron los empleados como control.*
2. El análisis de **funcionalidad de un lote de producto**, diariamente durante la simulación de las condiciones de transporte, y tras ello con frecuencia trimestral y un último tiempo adicional, durante un periodo de tiempo de 25 meses de:
 - a. Una muestra positiva y dos negativas.
 - b. Una muestra de orina fortificada con el péptido 33-mer a una concentración por debajo del LoC, a 0,08 ng 33-mer/mL orina; y a dos concentraciones por encima del LoC, 1,2 y 10 veces mayor, a 3,12 ng 33-

mer/mL orina, y 25 ng 33-mer/mL orina, respectivamente. Dichas fortificaciones se efectúan el día del ensayo.

3. El análisis de **aspecto de un lote de producto**, diariamente durante la simulación de las condiciones de transporte y tras ello, con frecuencia trimestral y un último tiempo adicional, durante un periodo de tiempo de 25 meses.

4.2.7.3 Análisis de los resultados

En las tres condiciones de transporte ensayados, así como en el control, se observó el mismo efecto:

- Del tiempo 1 al 8 del ensayo (03/06/19, 04/06/19, 05/06/19, 06/06/19, 05/09/19, 05/12/19, 05/03/20, 15/05/2020), las muestras negativas y la fortificada <LoC obtuvieron un resultado negativo. Aquella positiva y las fortificadas >LoC obtuvieron un resultado positivo. Visualmente todos los componentes se veían correctos.
- En el tiempo 9 (14/08/20) las muestras negativas y la fortificada <LoC obtuvieron un resultado negativo. Aquella positiva y la fortificada a 25 ng/mL obtuvieron un resultado positivo. Sin embargo, la fortificada a 3,12 ng/mL obtuvo un resultado negativo. Visualmente todos los componentes se veían correctos.
- En el tiempo 10 (03/12/20) del ensayo, las muestras negativas y la fortificada <LoC obtuvieron un resultado negativo. Aquella positiva y las fortificadas >LoC obtuvieron un resultado positivo. Visualmente todos los componentes se veían correctos. Al volver a obtener resultados conformes a los esperados, a tiempo 6 el iVCU se consideró estable.
- A tiempo 11 (16/02/21), la solución de acondicionamiento (RS-6429), lucía aglomerados blancos enturbiando su aspecto físico, causando alteraciones en los resultados obtenidos (comprobado). Tras verificar la imposibilidad de que su aspecto físico volviera al original se dio por terminado el ensayo de estabilidad a tiempo real, no siguiendo adelante con los ensayos previsto.

4.2.8 Funcionamiento clínico

4.2.8.1 Terminología y Objetivo

Con el objetivo de demostrar que el iVCU cumple con el **CR12.1**, **CR12.2** y **CR12.3** se crearon y ejecutaron el PRO y FRM asociados a la estabilidad a tiempo real (Tabla 3.6).

El **funcionamiento clínico** se entiende como la capacidad de un producto para producir resultados correlacionados con un estado clínico, con un proceso, con un estado fisiológico o patológico concreto en función de la población de referencia (control) y el usuario previsto (población a la que se dirige el producto). La finalidad de los estudios de funcionamiento clínico es establecer o confirmar aspectos del funcionamiento del producto que no pueden determinarse ni mediante estudios analíticos, ni con la bibliografía y/o la experiencia previa obtenida mediante pruebas de diagnóstico rutinarias.

Dentro del funcionamiento clínico se estudian las siguientes características:

1. **Sensibilidad diagnóstica:** Capacidad de un dispositivo para identificar la presencia de un marcador diana asociado a una enfermedad o afección concreta.
2. **Especificidad diagnóstica:** Capacidad de un producto para reconocer la ausencia de un marcador diana asociado a una enfermedad o afección concreta.
3. **Valor predictivo positivo (VPP):** La capacidad de un producto para separar los resultados verdaderos positivos de aquellos los resultados falso positivo una afección/biomarcador determinado en una población determinada.
4. **Valor predictivo negativo (VPN):** La capacidad de un producto para separar los resultados verdaderos negativos de aquellos los resultados falso negativo una afección/biomarcador determinado en una población determinada.

Teniendo en cuenta estas definiciones y los EE-CRS a cumplir, el propósito fue verificar que:

1. El producto es capaz de detectar péptidos inmunogénicos derivados del gluten en orina.
2. El 95% de las orinas GIP negativas obtienen un resultado considerado negativo (<G2); (a) para productos de bajo riesgo como el iVCU, una tasa de falsos positivos menor a un 5% (valor α de 0,05) en blancos es adecuada.
3. El 95% de las orinas GIP positivas recogidas de voluntarios a dieta con gluten obtengan un resultado considerado positivo (\geq G2) (Figura 3.3), (a) para productos de bajo riesgo como el iVCU, una tasa de falsos negativos menor a un 5% (valor β de 0,05) es adecuada.
4. Se detectan orinas tras ingestas de 2g, cantidad descrita como representativa de transgresiones dietéticas. Deseablemente se detecten orinas tras ingestas de 50 mg, descrita como la cantidad mínima necesaria para causar un empeoramiento significativo de la vellosoidad del intestino delgado en pacientes celíacos.

4.2.8.2 Protocolo

Primero realizó un análisis único de >100 muestras de orina provenientes de voluntarios a DGS >24h (según cuestionario dietético) y de >100 muestras provenientes de voluntarios a dieta con gluten. Ambos tipos seleccionadas de forma aleatoria, creando una lista de números aleatorios en la columna de al lado de la base de datos de la muestra, empleado la función “=ALEAT()” en Excel y después ordenándolas por esta seguida.

Tras ello, se analizó la detección de GIP en orinas tras la ingesta de 50 mg y 2g de gluten.

4.2.8.3 Análisis de los resultados

Para la determinación de los parámetros analíticos, como orinas de orinas provenientes de voluntarios a DGS >24h, se emplearon los resultados obtenidos en el ensayo de especificidad analítica. como orinas provenientes de voluntarios a dieta con gluten, se analizaron aleatoriamente 112 orinas de voluntarios en dieta libre de gluten (Tabla 3.12):

Tabla 3.12. Resultados de los parámetros clínicos de iVYCHECK GIP Urine. A) Tabla de contingencia a partir de la cual se han calculado los parámetros clínicos. B) Resultado de los parámetros clínicos.

A)	Presencia esperada de gluten	Ausencia esperada	
Resultado positivo	101	2	103
Resultado negativo	11	114	125
	112	116	

B)		IC95%	
Sensibilidad	90,18%	84,22	96,14
Especificidad	98,28%	95,48	100
VPP	98,06%	94,91	100
VPN	91,20%	85,83	96,57

IC95%: intervalo de confianza del 95%; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

Los análisis de las orinas tras ingestas de 50 mg y 2 g quedaron reflejados en el artículo publicado por Coto *et al.*, 2021 (Coto *et al.*, 2021)

5 DISCUSIÓN

Los resultados y conclusiones obtenidos tras la ejecución de cada uno de los PROs y el tratamiento de los datos crudos generados en los FRM correspondientes, se volcaron en los INFs (Tabla 3.6).

A continuación, se muestra un breve resumen de las conclusiones recogidas en los INF, para demostrar la conformidad con los EE-CRS de funcionalidad exigidos al iVCU (Tabla 3.13):

Tabla 3.13. Resultado y conformidad con los elementos de entrada-requisitos del cliente exigidos al iVYCHECK GIP Urine tras la ejecución de los ensayos de validación.

ID	Requisitos	Resultado	Conclusión
CR1.1	El producto tiene que ser capaz de detectar péptidos inmunogénicos derivados del gluten.	El producto es capaz de detectar muestras fortificadas con 33-mer. Apartado: 4.2.2.	Aprobado
	<i>El 33-mer se utilizará en varios estudios como un modelo de GIP y también se empleará como patrón para la curva.</i>	El producto detecta GIP en orinas proveniente de voluntarios a dieta con gluten, y de ingestas de 50 mg y 2g de gluten. Apartado: 4.2.8.	
CR1.2	El producto tiene que ser capaz de detectar GIP en muestras de orina.	El producto detecta GIP en orinas proveniente de voluntarios a dieta con gluten, y de ingestas de 50 mg y 2g de gluten. Apartado: 4.2.8.	Aprobado
CR1.3	El producto tiene que ser específico para GIP en orina.	El producto no detecta otros componentes habituales en orina, ni componentes alimentarios, bacterianos o víricos exógenos que puedan llegar a la orina. 114/116 (98,27%) orinas de 20 voluntarios a DSG > 24h obtuvieron un resultado negativo. Apartado: 4.2.1.	Aprobado
CR10.1	El producto tiene que almacenarse a temperatura de ambiente.	Tras ser almacenado a 15-30°C, el producto tiene una vida útil de 18 meses (549 días) > 12 meses. Apartado: 4.2.6.	Aprobado

ID	Requisitos	Resultado	Conclusión
		<p>Tras ser simulado su transporte durante 72h a -20°C, 20 °C ±5°C, 72 h a 6 ±2°C y 45 °C ±5°C, y tras ello volver a ser almacenado a 15-30°C, el producto tiene una vida útil de 18 meses (549 días) > 12 meses.</p> <p>Apartado: 4.2.7.</p>	
<p>CR10.2</p>	<p>La funcionalidad del producto tiene que mantenerse inalterada tras fluctuaciones de temperatura que puedan ocurrir durante el transporte. Es decir, habrá que elegir un nivel de control de temperatura durante el transporte que asegure el control necesario de temperatura.</p>	<p>Tras ser simulado su transporte durante 72h a -20°C, 20 °C ±5°C, 72 h a 6 ±2°C y 45 °C ±5°C, y tras ello volver a ser almacenado a 15-30°C, el producto tiene una vida útil de 18 meses (549 días) > 12 meses.</p> <p>Apartado: 4.2.7.</p>	<p>Aprobado</p>
<p>CR10.3</p>	<p>El producto debería tener una vida útil de al menos 12 meses.</p>	<p>Tras ser almacenado a 15-30°C, el producto tiene una vida útil de 18 meses (549 días) > 12 meses.</p> <p>Apartado: 4.2.6.</p>	<p>Aprobado</p>

ID	Requisitos	Resultado	Conclusión
CR12.1	El producto no debería dar reacción cruzada con ningún componente que se encuentre frecuentemente en orinas humanas, a parte de los definidos en la IFU (especificidad).	El producto no detecta otros componentes habituales en orina, ni componentes alimentarios, bacterianos o víricos exógenos que puedan llegar a la orina. 114/116 (98,27%) orinas de 20 voluntarios a DSG > 24h obtuvieron un resultado negativo. Apartado: 4.2.1.	Aprobado
CR12.2	El producto debería tener una sensibilidad analítica en muestras de orina de al menos 2,5 ng 33-mer/mL de orina con un 95% confianza.	10 de las 10 repeticiones de las muestras GIP negativas fortificadas a 2,5 ng 33-mer/mL analizados (100% > 95%) obtuvieron un resultado considerado positivo. Apartado: 4.2.2.	Aprobado
	Estudios preliminares indican que tal sensibilidad sirve para su uso clínico.	En todas las concentraciones analizadas entre 2,5 y 1000 ng 33-mer/mL de orina, el 100% (50/50) de las repeticiones analizadas obtuvieron resultado positivo ($\geq G2$). Apartado: 4.2.3.	

ID	Requisitos	Resultado	Conclusión
CR12.3	<p>El producto debería presentar una repetibilidad superior al 95%, entendida como el número de resultados esperados -positivos o negativos - frente al total de repeticiones ensayadas en las mismas condiciones.</p>	<p>Positivas: En todas las concentraciones analizadas entre 2,5 y 25 ng 33-mer/mL de orina, el 100% (40/40) de las repeticiones analizadas obtuvieron resultado positivo ($\geq G2$) (Tabla 3.E).</p> <p>El 100% (10/10 y 10/10) de los análisis efectuados a las dos orinas GIP positivas obtuvieron un resultado positivo.</p> <p>Negativas: El 100% (10/10 y 10/10) de los análisis efectuados a las dos GIP negativas fueron resultados negativos.</p> <p>Apartado: 4.2.4.</p>	Aprobado
CR12.4	<p>El producto tiene que presentar una reproducibilidad superior al 95%, entendida como el número de resultados esperados - positivos o negativos - frente al total de repeticiones ensayadas por distintos analistas en días diferentes y utilizando diferentes lotes del producto.</p>	<p>Positivas: En todas las concentraciones analizadas entre 2,8 y 25 ng 33-mer/mL de orina, el 100% (36/36) de las repeticiones analizadas obtuvieron resultado positivo ($\geq G2$).</p> <p>El 100% (12/12 y 12/12) de los análisis efectuados a las dos orinas GIP positivas obtuvieron un resultado positivo.</p> <p>Negativas: El 100% (12/12 y 12/12) de los análisis efectuados a las dos GIP negativas fueron resultados negativos.</p> <p>Apartado: 4.2.5.</p>	Aprobado

ID	Requisitos	Resultado	Conclusión
CR12.5	El límite de detección superior debe estar por encima de una cantidad de GIP supra-fisiológica.	En todas las concentraciones analizadas entre 2,5 y 1000 ng 33-mer/mL de orina, el 100% (50/50) de las repeticiones analizadas obtuvieron resultado positivo ($\geq G2$). Apartado: 4.2.3.	Aprobado
CR12.6	El producto tiene que resistir interferencias por sustancias que se encuentren frecuentemente en orina.	El producto no detecta otros componentes habituales en orina, ni componentes alimentarios, bacterianos o víricos exógenos que puedan llegar a la orina. 114/116 (98,27%) orinas de 20 voluntarios a DSG > 24h obtuvieron un resultado negativo. Apartado: 4.2.1.	Aprobado
CR13.1	El producto tiene que ser capaz de detectar GIP en muestras de pacientes que no siguen correctamente una dieta con gluten.	El producto es capaz de discernir entre muestras de orina de voluntarios a DSG y de voluntarios a dieta con gluten (Tabla 3.9.), además de ser capaz de detectar orinas provenientes de ingestas de 2 g de gluten. Apartado: 4.2.8.	Aprobado

ID	Requisitos	Resultado	Conclusión
CR13.2	<p>El producto tiene que ser capaz de detectar GIP en muestras de pacientes que hayan tomado 2g de gluten</p> <p>Representativo de usos como los siguientes: i) un niño que come gluten sin avisar a sus padres ii) un restaurante se equivoca y sirve ej. pasta con gluten</p>	<p>Coto et al., 2021.</p> <p>Se pueden detectar el 50% de las orinas tras una ingesta de 2g (en la ventana de excreción de 2-15h).</p> <p>Apartado: 4.2.8.</p>	Aprobado
CR13.3	<p>El producto debería detectar ingestas de gluten de 50mg, representando el límite inferior de su sensibilidad diagnóstica, establecido como el mínimo consumo de gluten que resulta en daños intestinales detectables.</p>	<p>Coto et al., 2021.</p> <p>Se pueden detectar el 15% de las orinas tras una ingesta de 50 mg (en la ventana de excreción de 2-15h).</p> <p>Apartado: 4.2.8.</p>	Aprobado

GIP: péptido inmunogénico del gluten; DSG: dieta sin gluten.

De esta forma queda evidenciado y documentado que el producto iVCU contiene los parámetros analíticos y clínicos necesarios para su uso como herramienta en el **seguimiento de la DSG a través de la detección de GIP en orina**. Cumpliendo así en lo que a funcionalidad consta con las exigencias del **reglamento UE 2017/746** para la obtención del **mercado CE iVDR por organismo notificado (UE 2017/ 746, 2017) (CR6.1)**.

REFERENCIAS

- Catassi, C., Fabiani, E., Iacono, G., Agate, C. D., Francavilla, R., Biagi, F., Volta, U., Accomando, S., Picarelli, A., Vitis, I. De, Pianelli, G. & Gesuita, R. (2007). A prospective , double-blind , placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease 1 – 3. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(1), 160–166. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.1.160>
- Coto, L., Sousa, C. & Cebolla, A. (2021). Dynamics and Considerations in the Determination of the Excretion of Gluten Immunogenic Peptides in Urine: Individual Variability at Low Gluten Intake. *Nutrients*, 13(8), 2624. <https://doi.org/10.3390/nu13082624>
- ISO 13485:2016, (2016).
- UE 2017/ 746, 2017 Diario Oficial de la Unión Europea 117/176 (2017).
- Ruiz-Carnicer, A., Garzon-Benavides, M., Fombuena, B., Segura, V., Garcia-Fernandez, F., Sobrino-Rodriguez, S., Gomez-Izquierdo, L., Montes-Cano, M. A., Rodriguez-Herrera, A., Millan, R., Rico, M. C., Gonzalez-Naranjo, C., Bozada-Garcia, J. M., Diaz, J., Coronel-Rodriguez, C., Espin, B., Romero-Gomez, M., Cebolla, A., Sousa, C., ... Pizarro, A. (2020). Negative predictive value of the repeated absence of gluten immunogenic peptides in the urine of treated celiac patients in predicting mucosal healing: New proposals for follow-up in celiac disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 112(5), 1240–1251. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa188>
- Syage, J. A., Kelly, C. P., Dickason, M. A., Ramirez, A. C., Leon, F., Dominguez, R. & Sealey-Voyksner, J. A. (2018). Determination of gluten consumption in celiac disease patients on a gluten-free diet. *American Journal of Clinical Nutrition*, 107(2), 201–207. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqx049>

CAPÍTULO 4.

CRIBADO PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DE LA EC EN LA POBLACIÓN PEDIÁTRICA 2 A 14 AÑOS

CAPÍTULO 4: CRIBADO PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DE LA EC EN LA POBLACIÓN PEDIÁTRICA 2 A 14 AÑOS

1 ANTECEDENTES DEL TEMA

La enfermedad celíaca (EC) es un trastorno crónico inmunomediado desencadenado por la exposición al gluten de la dieta que afecta de por vida a ciertos individuos genéticamente predispuestos (Lindfors et al., 2019; Ludvigsson et al., 2013). A pesar de que esta enfermedad constituye un problema de salud pública en todo el mundo y su pronta detección es de suma importancia, **el diagnóstico precoz de la EC supone un reto** (Singh et al., 2018). Actualmente, **el 75%-90% de los pacientes afectados con EC permanecen sin diagnosticar**, asimismo, los retrasos en el diagnóstico pueden oscilar entre meses y más de 10 años (Cichewicz et al., 2019; Fuchs et al., 2014; Ravikumara et al., 2007; Riznik, De Leo, et al., 2019).

La forma estandarizada para **diagnosticar la EC** consiste en un flujo de pruebas en la que se combinan la **serología y la biopsia duodenal**, donde como primera prueba se recomienda la detección de anticuerpos **anti-transglutaminasa tisular IgA** (anti-tTG-IgA) y anticuerpos IgA totales. Sin embargo, la mayoría de las guías han incorporado un enfoque sin biopsia como primera vía para diagnosticar la EC en niños (Al-Toma et al., 2019; Husby et al., 2020). Este enfoque elimina la necesidad de una biopsia al permitir la confirmación de EC en niños cuyos títulos anti-tTG-IgA se encuentran por encima de 10 veces (10 x) el límite superior de la normalidad (LSN) y sean positivos para los anti-endomisio (anti-EMA) en un segundo análisis de sangre. Utilizando esta vía, se diagnostica el 50-75% de los pacientes con EC, sin necesidad de realizar pruebas adicionales, resultando positivamente en una disminución de costes y riesgos (Badizadegan et al., 2020; Husby et al., 2020; Riznik, Balogh, et al., 2019). Todas las herramientas estandarizadas para el diagnóstico de EC están hechas para discriminar entre pacientes que tienen un estado activo de la EC y pacientes sin EC, o aquellos con un estado no activo de la enfermedad. Por lo tanto, para evitar resultados falsos negativos, quienes se someten a las pruebas deben mantener una dieta en la que el gluten se consuma de forma habitual para alcanzar la EC activa (Anderson, 2022).

La **identificación de los potenciales enfermos celíacos** se efectúa principalmente a través de **tres vías**: la búsqueda activa de casos (BAC), el cribado de grupos de riesgo y el cribado masivo. Para el BAC, los médicos deben estar actualizados en la amplia gama de signos y síntomas con la que se manifiesta la EC, y a partir de la identificación dirigir a los pacientes a las pruebas para el diagnóstico de la EC de manera oportuna. Los **síntomas** de EC pueden

clasificarse como clásicos, en caso de ser manifestaciones relacionadas con la malabsorción, o no clásicos, en caso de no estar relacionadas con la malabsorción (Lindfors et al., 2019; Ludvigsson et al., 2013). Sin embargo, al referirse a los fenotipos clínicos de la EC, se utilizan los términos "gastrointestinal" (GI) y "extraintestinal" (EI), en función de la localización del síntoma. Los síntomas pueden presentarse de forma individual o combinada (Lindfors et al., 2019). A pesar de que la EC en niños se ha asociado históricamente a manifestaciones GI, también se observan con frecuencia síntomas EI (por ejemplo, anemia ferropénica, estancamiento del crecimiento, dispepsia y alteración del metabolismo óseo) (Almallouhi et al., 2017; Nurminen et al., 2019). Esta amplia diversidad de síntomas, junto con su posible variación a lo largo del tiempo, complica la BAC. Además, es importante tener en cuenta que dos tercios de los pacientes con EC presentan síntomas que están por debajo del umbral de detección clínica (estos pacientes se denominan asintomáticos) (Caio et al., 2019; Cichewicz et al., 2019; Fuchs et al., 2014). En conjunto, estos aspectos dan lugar a un valor predictivo bajo a la BAC basada en síntomas para la EC.

El valor clínico del **cribado masivo** para la detección de la EC es un tema en debate (Caio et al., 2019; Husby et al., 2020; Kivelä & Kurppa, 2018). La EC cumple la mayoría de los criterios de la Organización Mundial de la Salud para ser cribada; es una enfermedad frecuente, detectable y tratable que puede dar lugar a complicaciones si no es detectada (Wilson & Jungner, 1968). Sin embargo, la comunidad científico-clínica no tiene claro el beneficio que aporta dicho cribado (Aggarwal & Green, 2012; Almallouhi et al., 2017; Fasano & Evans, 2009). Los detractores argumentan que las pruebas de cribado disponibles tienen un valor predictivo positivo (VPP) bajo y una rentabilidad poco clara en consonancia con la baja prevalencia de la enfermedad en la población general. Además, los conocimientos sobre la evolución natural de la EC infantil no tratada son limitados, y las dificultades sociales, psicológicas y económicas asociadas a la adherencia a una dieta sin gluten (DSG), el único tratamiento disponible, son innegables. Por estas razones, esta corriente de pensamiento aboga por el **cribado únicamente en poblaciones de riesgo**, como en familiares de primer grado de pacientes con EC (FPG-EC) o pacientes con ciertos trastornos autoinmunes o síndromes de base genética, como la diabetes mellitus tipo 1 o los afectados por el síndrome de Down, que se asocian con un mayor riesgo de padecer EC. Entre estos grupos la prevalencia de EC es aproximadamente del 5-10%, frente al 1% en la población general (Aggarwal & Green, 2012; Singh et al., 2015).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que el cuadro clínico de la EC está en continua evolución, con cambios en la prevalencia, un mayor conocimiento sobre la patología de la

EC y mejores opciones para facilitar la DSG, lo que induce cambios en el valor de los cribados. Por ejemplo, la prevalencia de la EC parece haber aumentado decenalmente, desde que existen registros y que la EC puede aparecer por primera vez a cualquier edad (Rubio-Tapia et al., 2009; Singh et al., 2018). La seroprevalencia global agrupada de la enfermedad es del 1,4% (IC 95%: 1,1-1,7%) (Singh et al., 2018). Concretamente, en España se determinó una prevalencia de 1:71 en niños mediante un protocolo de abordaje secuencial en el que se examinaban primeramente los marcadores serológicos y, en caso de resultado positivo, se confirmaba la EC mediante biopsia duodenal y estudio genético (Mariné et al., 2011). Además, se ha demostrado que los **pacientes en los que la EC se diagnosticó durante la infancia logran una mayor adherencia al tratamiento y una mejor recuperación de la mucosa GI** (Högberg et al., 2003; Szakács et al., 2017). Esta mejor adherencia también **reducirá las complicaciones graves a largo plazo**, como la osteoporosis, la infertilidad y algunos tipos de neoplasias, así como el uso de tratamientos terapéuticos asociados y la presión sobre los sistemas sanitarios (Fuchs et al., 2018; Gasbarrini et al., 2000; Long et al., 2010; Mattila et al., 2013; Norström et al., 2011; Rubio-Tapia et al., 2009; Tio et al., 2012; Ukkola et al., 2012). Por último, en la actualidad existen muchas opciones para facilitar la adherencia a la DSG con un bajo coste social, psicológico y económico, que van desde una mayor disponibilidad de alimentos y restaurantes sin gluten regulados, hasta el uso de herramientas como la detección de péptidos inmunogénicos del gluten (GIP) en heces y orina (Coto et al., 2021a; UE N° 1169/2011, 2011). Además, se ha avanzado en el seguimiento de la enfermedad y en calidad y rapidez de la información que se proporciona al paciente. La creciente **disponibilidad de pruebas en el punto de atención** (PoCT, por sus siglas en inglés) es clave para proporcionar a los centros de atención terciaria y a los profesionales *in situ* resultados inmediatos de las pruebas que mejoran la información proporcionada al paciente. Por ejemplo, las PoCT han tenido un impacto positivo en el uso adecuado de antimicrobianos y en el seguimiento de enfermedades infecciosas y crónicas, entre otras (Hocking et al., 2021).

Este estudio tenía como objetivo **investigar la utilidad clínica en atención primaria del inmunoensayo de flujo lateral (LFIA) rápido anti-tTG-IgA en el cribado de la EC en niños de 2 a 14 años y determinar si el análisis de GIP en orina podría ayudar a detectar a aquellos que obtienen un falso negativo en las pruebas serológicas debido al bajo consumo de gluten en su dieta**. Este estudio incluyó tanto a la población general como a la de alto riesgo. La utilidad clínica del LFIA anti-tTG-IgA fue evaluada determinando el VPP de la herramienta y el porcentaje de pacientes con EC no diagnosticados en estas poblaciones. Además, se analizó **la evolución de la calidad de vida relacionada con la salud**

(CVRS) de los voluntarios diagnosticados para comprobar el impacto del diagnóstico efectuado mediante cribado. La utilidad de la prueba GIP se evaluó comparando los resultados de la prueba con las respuestas del cuestionario sobre hábitos de consumo de gluten.

2 EQUIPOS Y SOFTWARES

2.1 SOFTWARES PARA EL TRATAMIENTO DE DATOS

Para el tratamiento de los datos se emplearon los siguientes softwares:

- Microsoft Excel 2303 (Microsoft, Washington, EE.UU.).
- IBM SPSS Statistics 23 (IBM, Nueva York, EE.UU.).
- Epidat 3.1 (Servicio de Epidemiología de la Dirección Xeral de Saúde Pública da Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, Galicia, España).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO Y VOLUNTARIOS

Se realizó un **estudio observacional transversal** de cribado de EC en 12 centros diferentes de Sevilla y Madrid (España) desde julio de 2020 hasta julio de 2022. El protocolo del estudio fue aprobado por el comité ético local del Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla, España) (n. 1568-N-20) (ClinicalTrials.gov identificador NCT05186038).

Para la inclusión de los voluntarios en el estudio, se obtuvo el consentimiento por escrito de los padres o tutores legales de los voluntarios. Una vez obtenido el consentimiento por escrito, los voluntarios fueron sometidos **in situ a las pruebas en LFIA de anti-tTG-IgA** en sangre total y GIP en orina para detectar biomarcadores de EC y consumo de gluten en la dieta, respectivamente. Para la detección de **GIP urinario**, se indicó a los voluntarios que recogieran una muestra de orina en el cuarto de baño del centro. Los voluntarios que llevaban pañales fueron excluidos de la recogida de orina, pero sus padres y/o tutores legales rellenaron un registro de ingesta dietética de las últimas 24 horas.

Además, a través de **cuestionarios** se recogieron por un lado, los hábitos de consumo de gluten de los voluntarios y por otro, sus síntomas relacionados con la EC y otras condiciones de riesgo para desarrollar EC según las directrices de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN) 2020 (Husby et al., 2020). Estos cuestionarios fueron resueltos por los padres o tutores legales en niños de 2 a 12 años, y los propios voluntarios si su edad oscilaba entre los 13 y 14 años.

A los **voluntarios con resultado positivo** en la prueba **anti-tTG-IgA** se les programó una **visita a un gastroenterólogo pediátrico** para confirmar la presencia de EC.

Además, a todos los voluntarios que dieron positivo en el momento del cribado, y posteriormente fueron los diagnosticados de EC, se administró el cuestionario de calidad de vida **EuroQol EQ-5D-Y** (validado para España) tanto el momento del diagnóstico como a los 6-18 meses después de haber iniciado la DSG, para evaluar el cambio en la CVRS (EuroQol Research Foundation, 2020; Gusi et al., 2014). Los padres o cuidadores fueron quienes respondieron al cuestionario aportando su propia impresión sobre el estado de salud del niño o adolescente el día de la administración.

3.2 EVALUACIÓN CLÍNICA

Se administró un cuestionario clínico para determinar si los voluntarios presentaban **síntomas relacionados con la EC o factores de riesgo**, de acuerdo con las directrices ESPGHAN 2020 para el diagnóstico de la enfermedad celíaca pediátrica [8]. Además, se preguntó a los voluntarios (los padres o tutores legales de los niños de 2 a 12 años; los propios voluntarios de los niños de 13 a 14 años) si tenían algún familiar de primer grado con EC (FPG-EC) (sí/no; en caso afirmativo, debía especificarse el parentesco); si padecían otra enfermedad autoinmune o tenían algún trastorno genético en el que la EC fuera prevalente (a elegir entre ocho tipos), y que enumeraran sus síntomas recurrentes (a elegir entre 14 tipos, en caso afirmativo; debía especificarse la gravedad y la fecha de inicio).

3.3 HÁBITOS DE CONSUMO DE GLUTEN Y TOMA DE MUESTRAS DE ORINA PARA EL ANÁLISIS DE GIP

Dado que la exposición recurrente al gluten es crítica para elevar los títulos de anti-tTG-IgA a niveles detectables, se preguntó a los voluntarios sobre sus **hábitos de consumo de gluten y se evaluó su GIP urinario** el día de la prueba de anti-tTG-IgA para el cribado. Estas mediciones tenían como objetivo identificar cualquier sesgo en el consumo de gluten entre los voluntarios **FPG-EC y no FPG-EC** y confirmar los hábitos de consumo diario o reciente de gluten.

3.3.1 Hábitos de consumo de gluten

Este cuestionario tenía como objetivo **determinar la frecuencia** (diaria, ocasional o nunca, siendo ocasional menos de dos veces por semana) con la que los voluntarios **consumían** productos típicamente elaborados con **gluten**, incluyendo pan, pasteles, galletas, pasta, cereales, pizza, tarta y otras masas y productos de panadería.

3.3.2 **Muestreo de orina para el análisis de GIP**

A los voluntarios se les proporcionó un recipiente de plástico estéril con tapón de rosca de 60 mL para la recogida de muestras de orina (5-60 mL). La concentración de **GIP en orina** se determinó inmediatamente después de la recogida mediante **Gluten Detect Urine** (Biomedal S.L., Sevilla, España). Para el análisis se siguieron las recomendaciones del fabricante: se mezclaron 2 mL de orina con la solución acondicionadora y se añadieron cinco gotas a la tira. Transcurridos 30 minutos, se interpretaron visualmente los resultados cualitativos. La obtención de una línea de control verde era necesaria para garantizar la validez de los resultados. Una línea de control roja se consideraba un resultado positivo, y la ausencia de la misma o de cualquier color distinto del rojo se consideraba un resultado negativo. En el caso de los niños que llevaban pañales, la toma de muestras de orina era opcional, dado el escaso control de la micción en los niños en condiciones.

3.4 **anti-tTG-IgA LFIA en SANGRE TOTAL**

La determinación de **anti-tTG-IgA en sangre total se realizó utilizando un LFIA comercial** (Celiac Detect, Biomedal S.L., Sevilla, España) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Una vez la yema del dedo del voluntario era limpiada con una almohadilla con alcohol, se realizaba una pequeña punción en la misma mediante lanceta, y la sangre era recogida a través de un tubo capilar. Una vez lleno, la sangre se mezclaba mediante agitación manual con tampón, y se aplicaban cinco gotas a la tira. Los resultados se leían tras un periodo de incubación de 10 minutos. De acuerdo con las instrucciones de uso (IFU), la línea de control roja se utilizó como control de prueba y el resultado era determinado en base a la línea test. Se consideraba positivo si aparecía una línea roja oscura o tenue en la zona de resultado, y los que no mostraban una línea de prueba debían considerarse negativos. El límite de detección (LoD) de la prueba se definió como 5 U/mL. Aunque la prueba se validó para uso cualitativo, los resultados fueron segmentados en base a la intensidad de la línea test como débiles, intermedias o fuertes para identificar posibles correlaciones con los parámetros de título anti-tTG-IgA de ESPGHAN.

3.5 **EVALUACIÓN PEDIÁTRICA**

En aquellos voluntarios que mostraron un resultado positivo en el anti-tTG-IgA LFIA, se siguieron las **directrices de la ESPGHAN 2020 para obtener la confirmación del diagnóstico de la EC**.

Los voluntarios que obtuvieron un resultado positivo en el anti-tTG-IgA LFIA, fueron inmediatamente remitidos a un gastroenterólogo pediátrico, con el que se concertó una cita entre 2 semanas y 2 meses después de la prueba. Los voluntarios fueron examinados

para la detección la presencia de síntomas, anticuerpos anti-tTG-IgA y anti-EMA, haplotipos HLA, entre otros, y la necesidad de una biopsia intestinal, según el criterio del médico.

3.6 MONITORIZACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DE LA CVRS Y LOS SÍNTOMAS

A los 6-18 meses del diagnóstico, se contactó con los voluntarios diagnosticados de EC para una **cita de seguimiento**. Al igual que en el diagnóstico, los padres o tutores legales de los voluntarios cumplimentaron la versión española del cuestionario EQ-5D-Y (EuroQol Research Foundation, 2020; Gusi et al., 2014). El EQ-5D-Y consta del sistema descriptivo EQ-5D-Y y de la puntuación EQ-VAS. Utilizando el EQ-5D-Y, se midieron las cinco dimensiones de la **CVRS**. Estas dimensiones corresponden a la movilidad, la capacidad para cuidar de uno mismo (autocuidado), la capacidad para realizar actividades cotidianas, la presencia de dolor o malestar y la presencia de dificultades emocionales (sentirse preocupado, triste o infeliz). Las opciones de respuesta son "ninguno", "algunos" o "graves problemas actuales". La EQ-VAS registra la salud actual general de los encuestados en una escala analógica visual vertical de 0 a 100, que corresponde a su peor y mejor salud imaginada posible, respectivamente.

Asimismo, para comprobar **la evolución de los síntomas**, se preguntó a todos los voluntarios diagnosticados por los síntomas relacionados con la EC según las directrices ESPGHAN 2020 para el diagnóstico de la enfermedad celíaca pediátrica (Husby et al., 2020).

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La base de datos se registró en una hoja de cálculo de Microsoft Excel (versión 2303, Microsoft, Washington, EE.UU.). Las variables numéricas se presentaron como medias porcentuales e intervalos de confianza del 95% (IC 95%) o medianas con rangos intercuartílicos (RIC). Las variables dicotómicas se compararon mediante la prueba Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fischer, y para los datos cuantitativos se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Todos los demás métodos estadísticos se utilizaron según procediera. Los análisis estadísticos se realizaron con IBM SPSS Statistics para Windows (versión 25.0; IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.). Se consideró significativo un valor $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 SUJETOS

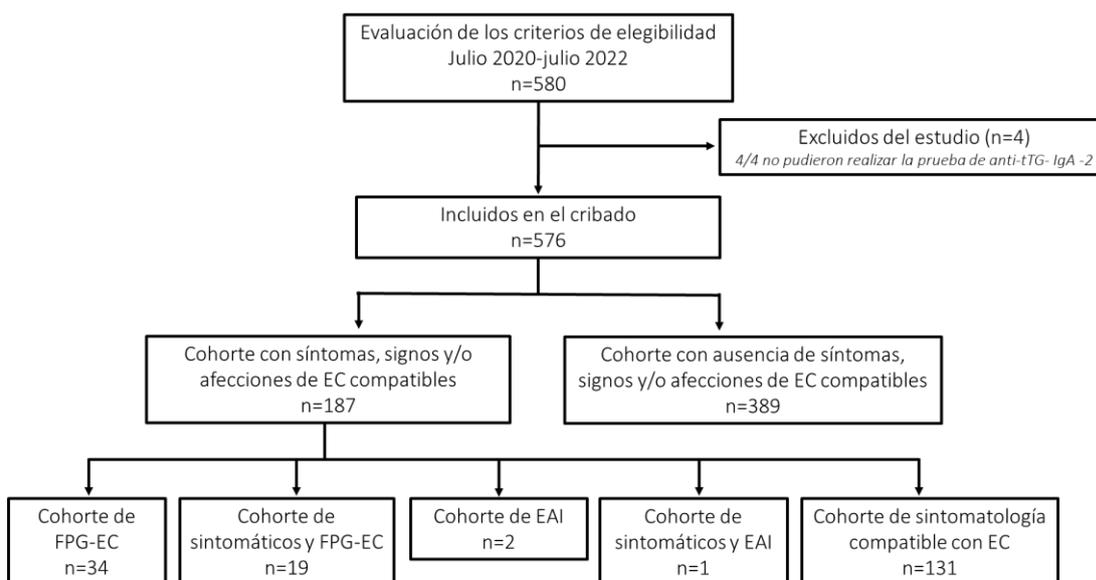
La población del estudio estaba formada por **576 voluntarios** de entre 2 y 14 años de edad, de los cuales 313 (54,3%) eran varones y 263 (45,7%) mujeres, con una mediana de edad

de 8 años (IQR: 4-10 años). Los voluntarios fueron reclutados a lo largo de 12 centros; cinco campamentos de verano (89/576), dos casas de acogida (44/576), dos clubes deportivos (35/576), un centro de investigación (2/576), una feria de enfermedad celiaca (29/576) y un centro pediátrico (377/576). Las convocatorias de cribado se realizaron de forma oral, por correo electrónico, a través de redes sociales y medios de comunicación convencionales. No obstante, la participación de un niño requería la lectura de la hoja informativa y el consentimiento informado de los tutores legales. Cuatro potenciales voluntarios fueron excluidos porque no se pudieron obtener sus muestras de sangre (Figura 4.1).

4.2 EVALUACIÓN CLÍNICA

De acuerdo con las directrices ESPGHAN 2020, **187/576 (32,46%) voluntarios habrían sido candidatos a someterse a pruebas para el diagnóstico de EC** debido a los síntomas, signos y afecciones declarados en el cuestionario de evaluación clínica (Husby et al., 2020).

En el momento de la inclusión en el cribado, 151/576 (26,21%) voluntarios llevaban más de un mes padeciendo al menos un síntoma relacionado con la EC sin una causa establecida. Un total de 53/576 (9,20%) eran conscientes de su FPG-EC, de los cuales 19/53 (34,85%) presentaban síntomas relacionados con la EC. Tres voluntarios declararon haber sido diagnosticados previamente de otras enfermedades autoinmunes: 2/576 de enfermedad tiroidea autoinmune, de los cuales uno presentaba sintomatología compatible con la EC, y 1/576 de diabetes tipo 1 (Figura 4.1).



EC: enfermedad celiaca; FPG: familiar de primer grado; EAI, enfermedad autoinmune.

Figura 4.1. Diagrama de flujo de los participantes en el estudio. La cohorte con y sin síntomas, signos y afecciones compatibles con la EC fue establecida de acuerdo con las directrices ESPGHAN 2020 (Husby et al., 2020).

4.3 EVALUACIÓN DE LOS HÁBITOS DE CONSUMO DE GLUTEN Y ANÁLISIS DE GIP EN ORINA

De los 576 voluntarios del estudio, 481 cumplieron el cuestionario sobre hábitos de consumo de gluten y 524 proporcionaron muestras de orina *in situ*, incluidos los 53/53 y 45/53 FPG-EC respectivamente. Se determinaron las **diferencias en los hábitos de consumo de gluten y la presencia de GIP en orina entre los grupos FPG-EC y no FPG-EC** (Tabla 4.1).

Según el cuestionario de consumo de gluten, los voluntarios con FPG-EC eran significativamente menos propensos a consumir gluten a diario que los no FPG-EC. Sin embargo, la magnitud de esta diferencia era pequeña. Curiosamente, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en cuanto al porcentaje de pacientes con orina positiva en GIP el día de la prueba anti-tTG-IgA. Los resultados de la prueba de GIP en orina (una medida imparcial del consumo de gluten a corto plazo) pueden identificar la ingesta de gluten en las horas anteriores a la prueba, mientras que el cuestionario sobre el consumo de gluten en la dieta (una medida no imparcial del consumo de gluten a largo plazo) permite evaluar la exposición media de gluten en la dieta (Coto et al., 2021a; Coto et al., 2021b). Sin embargo, es importante señalar que ni el cuestionario sobre hábitos de consumo de gluten ni las pruebas de GIP en orina se diseñaron para medir la magnitud del consumo de gluten; por lo tanto, la cantidad de gluten consumida al día por el grupo FPG-EC podría ser inferior a la del grupo no FPG-EC.

Tabla 4.1. Pruebas de GIP y hábitos de consumo de gluten de los voluntarios, divididos según su consanguinidad con un paciente con EC, y significación estadística de las diferencias entre los grupos.

	No FPG-EC		FPG-EC		P-valor
	n	%	n	%	
Hábitos de consumo de gluten					
Diario	427	99,77%	51	96,23%	<0,05
Ocasional o nunca	1	0,23%	2	3,77%	
Prueba de GIP única					
Positivo	430	89,77%	44	97,78%	>0,05
Negativo	49	10,23%	1	2,22%	

No FPG-EC: Familiares de no primer grado de personas con enfermedad celiaca; FPG-EC: Familiares de primer grado de personas con enfermedad celiaca; GIP: péptidos inmunogénicos del gluten.

4.4 DETERMINACIÓN DE anti-tTG-IgA en sangre total

La prueba anti-tTG-IgA es una prueba cualitativa; sin embargo, se pueden hacer diferenciaciones con respecto a la intensidad de la línea de prueba, como se muestra en la Figura 4.2.

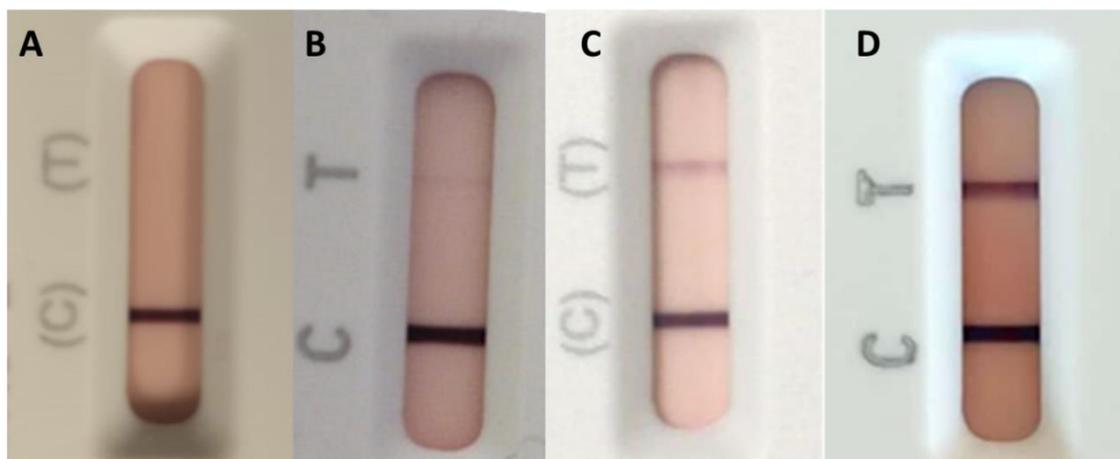


Figura 4.2. Prueba de inmunoensayo de flujo lateral anti-tTG-IgA. Resultados de la prueba de inmunoensayo de flujo lateral anti-tTG-IgA según la línea de prueba: A) ausente, B) línea gris casi indetectable, C) línea roja tenue o no saturada, y D) línea roja oscura o saturada.

En consonancia con siguiendo las IFU, los voluntarios que no obtuvieron líneas de prueba (Figura 4.2A) se consideraron negativos. Las líneas grises de prueba fueron inesperadas (Figura 4.2B), ya que no se mencionaban en las instrucciones de uso. Finalmente, cualquier tipo de líneas de prueba de tono rojo, ya fueran de intensidad roja débil o fuerte (Figuras 4.2C y 4.2D), se consideraron positivas. De acuerdo con las IFU, cualquier línea que no tuviera claramente un tono rojo se consideró negativa (Figura 4.2B). Sin embargo, para garantizar la validación no subjetiva de la prueba, también se realizó un seguimiento de los voluntarios con presencia de líneas de prueba grises.

De los voluntarios con resultados negativos, ocho (8/563) obtuvieron una línea de prueba gris casi indetectable (Figura 4.2B). Trece pacientes obtuvieron un resultado positivo en la prueba, de los cuales diez (10/13) mostraron una línea rojiza saturada (Figura 4.2D) y tres (3/13) mostraron líneas rojas no saturadas, pero claramente visibles (Figura 4.2C). **Los 13 voluntarios con resultados positivos fueron remitidos a un gastroenterólogo pediátrico para un examen más detallado y para verificar las características diagnósticas de la prueba para este uso.** Los ocho voluntarios con líneas grises en el resultado de la prueba también fueron remitidos para la validación de los resultados negativos.

Todos los voluntarios que obtuvieron un resultado positivo saturado en la prueba LFIA (10/13) (Figura 4.2D), tenían niveles de anti-tTG-IgA >10 veces el LSN cuando se midieron mediante ELISA de laboratorio. De los tres voluntarios que tuvieron un positivo intermedio como resultado (3/10) (Figura 4.2C), uno tenía >10 veces el LSN, y los dos restantes también tenían niveles medibles de anti-tTG-IgA, pero por debajo de este umbral. Por último, como se preveía, los ocho voluntarios con una línea gris, casi indetectable, mostraron seromarcadores anti-tTG-IgA no cuantificables en la prueba de laboratorio, que estaban por debajo del límite de cuantificación. Este resultado confirma que si la línea de prueba observada no tiene un tono rojo claramente discernible (líneas grises), debe considerarse como resultado negativo.

La **seroprevalencia** de la EC descrita por otros autores oscila entre una seroprevalencia global del 1,4%, y el 1,71% en niños españoles. Estas tasas son similares a la prevalencia de casos diagnosticados **en el presente estudio (1,91%)**, lo que indica que los parámetros funcionales del LFIA anti-tTG-IgA son probablemente similares a los ofrecidos por las pruebas de laboratorio habituales, que muestran un VPP de aproximadamente el 90% en niños pediátricos (Al-Toma et al., 2019; Bogaert et al., 2020; Coto et al., 2021b; Mariné et al., 2011; Singh et al., 2018). Además, la categorización de los resultados cualitativos según la intensidad de las respuestas de la línea de prueba podría permitir aún más la estratificación de los pacientes en función de su probabilidad de tener títulos de anti-tTG-IgA por encima del umbral de x10 ULN.

4.5 DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD CELIACA

De los 13 voluntarios que obtuvieron resultados positivos (Tipo C o D) en el LFIA para la detección de anti-tTG-IgA, 12 consintieron someterse a las pruebas complementarias necesarias para confirmar el diagnóstico. La EC se confirmó en 11 de los 12 voluntarios.

Estos **11 voluntarios con EC confirmada** superaron el umbral de x10 LSN y dieron positivo en anticuerpos antiendomiso (anti-EMA) y/o anticuerpos antipéptido de gliadina desaminado (anti-DGP). El paciente restante presentó títulos anti-tTG de 60,8 U/mL, anti-EMA 1/20, y una biopsia clasificada como Marsh 0-I, por lo que se encuentra actualmente en fase de seguimiento para un diagnóstico definitivo de EC. Por lo tanto, las pruebas LFIA mostraron un VPP del 91,67% (IC 95%: 71,86-100%) para resultados positivos (Figuras 4.2C y 4.2D) con respecto a la presencia de EC. No obstante, para los resultados de línea de prueba saturada (Figura 4.2D), el VPP obtenido en este estudio fue del 100% (IC 95%: 95,45-100%).

La mediana de edad de los voluntarios diagnosticados fue de 9 años (IQR: 4-11), sin mostrar diferencias estadísticamente significativas con respecto a la edad media del grupo participante ($P=0,992$). Cinco (5/313; 1,59%) pacientes eran varones y seis (6/296; 2,29%) mujeres ($P=0,546$). La edad, el sexo, los factores de riesgo y los síntomas de cada voluntario se presentan en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Datos de los voluntarios diagnosticados y presencia de síntomas relacionados con la enfermedad celíaca y afecciones clínicas concomitantes.

Género	Edad	Síntomas y afecciones relevantes	Enfermedad Autoinmune	Familiar con enfermedad celíaca
Hombre	4	No	No	Madre
Hombre	7	No	No	No
Hombre	10	Ataxia por gluten, dolor abdominal, y diarrea	No	No
Hombre	11	No	No	Madre
Hombre	13	No	No	Hermana
Mujer	2	Anemia, estancamiento en el crecimiento, dolor abdominal, y diarrea	No	No
Mujer	3	Anemia, estancamiento en el crecimiento, y dolor abdominal	No	No
Mujer	7	Anemia	No	Hermano
Mujer	9	No	No	No
Mujer	11	Dolor de cabeza, dolor abdominal, diarrea, estancamiento en el crecimiento y dermatitis herpetiforme	No	No
Mujer	14	No	No	No

De los cuatro voluntarios quienes fueron conscientes de ser **FPG-EC** al final del estudio, sólo uno sabía que tenía un FPG-EC al principio, los tres restantes, fueron definidos como FPG-EC durante el estudio. De estos tres, dos fueron hermanos diagnosticados con EC en este estudio, y el tercero, un niño de 11 años cuya madre fue diagnosticada tras el diagnóstico de su hijo, al darse cuenta de que presentaba una sintomatología compatible con la EC. Como resultado, la tasa de EC con FDR aumentó de 1/53 (1,89%) a 4/57 (7,02%) en la población del estudio; 53 pacientes conocían tener FPG-EC en el momento del cribado y 57 al final del estudio.

En cuanto a los **síntomas**, 4 /11 de los voluntarios diagnosticados de EC presentaban reconocían tener síntomas compatibles con EC con comienzo en diferentes momentos de su vida, desde 3 meses hasta más de 5 años antes de que se efectuara el cribado. El dolor abdominal, la diarrea, el estreñimiento crónico y el estancamiento del crecimiento eran los síntomas que más se repetían entre los voluntarios con manifestaciones clínicas. Adicionalmente, se detectó anemia ferropénica en tres voluntarios durante el proceso de diagnóstico de la EC, dos con síntomas compatibles a la EC autorreconocidos, y otra sin síntomas, motivo por el cual, no fue posible establecer la duración de la anemia. También

se observaron episodios de crisis y la presencia de dermatitis inespecífica, coincidentes con la descripción de la ataxia por gluten y la descripción de tipo herpetiforme, respectivamente. En general, la mayoría de los voluntarios presentaban al menos un síntoma relacionado con la EC desde al menos 1 año antes de la prueba (Tabla 4.3).

En resumen, de los 11 voluntarios diagnosticados de EC, tres (3/11; 27,27%) no presentaban síntomas ni signos, ni afecciones que aumentaran el riesgo de padecer EC. Entre los pacientes restantes, cuatro (4/11; 36,36%) eran FPG-EC, de los cuales uno tenía anemia y cuatro (4/11; 36,36%) presentaban síntomas GI y EI (Tabla 4.2).

Tabla 4.3. Cuadro clínico de los voluntarios con enfermedad celíaca detectados en el cribado. Se especifican los síntomas y signos presentados y el tiempo transcurrido desde su aparición.

Voluntario		Aparición de síntomas y signos						
Género	Edad	Anemia por deficiencia de hierro	Dolor Abdominal	Diarrea o constipación crónica	Dermatitis herpetiformis	Estancamiento en el crecimiento	Irritabilidad/Dolor de cabeza	Neuropatía
Hombre	10	n/a	>5 años	> 5 años	n/a	n/a	n/a	> 3 meses*
Mujer	11	n/a	desconocido	> 5 años	> 5 años*	1-5 años	> 5 años	n/a
Mujer	3	desconocido	1-5 años	n/a	n/a	1-5 años	n/a	n/a
Mujer	7	desconocido	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Mujer	2	desconocido	1-5 años	> 3 meses	n/a	1-5 años	n/a	n/a
Ratio de voluntarios sintomáticos diagnosticados de EC		3/5	4/5	3/5	1/5	3/5	1/5	1/5

n/a: No Aplicable, debido a que el voluntario no presenta este síntoma.

Desconocido: No es posible datar el inicio de este síntoma.

** Los padres describieron síntomas cuyas características podrían asociarse a las de la EC.*

4.6 MONITORIZACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DE LA CVRS y DE LA ADHERENCIA A LA DSG DE LOS ENFERMOS CELIACOS DIAGNOSTICADOS

De los 11 voluntarios diagnosticados de EC en el cribado, diez fueron objeto de seguimiento; se realizó una evaluación de la evolución de su CVRS desde el diagnóstico hasta los 6-18 meses después del inicio de la DSG. El undécimo participante no pudo ser seguido debido a problemas de comunicación. En la Tabla 4.4 se presenta la prevalencia de los problemas de la CVRS notificados en los dos momentos de evaluación. El dolor y/o las molestias desaparecieron en la mayoría de los pacientes. Los síntomas y signos descritos en la Tabla 4.4 desaparecieron o disminuyeron en todos los voluntarios. Sin embargo, un voluntario asintomático expresó una gran ansiedad por tener que seguir una DSG.

La puntuación EQ-VAS antes del diagnóstico de EC fue de 86,5 (IC 95%: 74,9-98,1), y aumentó a 93 (IC 95%: 86,45-99,6) después de comenzar con la DSG (P= 0,355).

Tabla 4.4. Resultados del sistema descriptivo EQ-5D-Y antes y después del diagnóstico de EC (EuroQol Research Foundation, 2020).

Dimensión EQ-5D-Y		Antes del diagnóstico		Después del diagnóstico	
		n	Respuestas (%)	n	Respuestas (%)
Movilidad (caminar)	Sin problemas	9	90%	10	100%
	Problemas moderados	1	10%	0	0%
	No puedo	0	0%	0	0%
Cuidar de mí mismo (lavarme o vestirme)	Sin problemas	10	100%	10	100%
	Problemas moderados	0	0%	0	0%
	No puedo	0	0%	0	0%
Realizar actividades cotidianas	Sin problemas	10	100%	9	90%
	Problemas moderados	0	0%	1	10%
	No puedo	0	0%	0	0%
Sentir dolor o malestar	No tener	6	60%	9	90%
	Moderados	2	20%	1	10%
	Extremo	2	20%	0	0%
Sentirse ansioso o deprimido	No tener	9	90%	8	80%
	Moderados	0	0%	2	20%
	Extremo	1	10%	0	0%

5 DISCUSIÓN

La prueba rápida, el LFIA, para la detección de anti-tTG-IgA utilizado en nuestro estudio identificó a 11 de los 576 voluntarios que posteriormente confirmados con EC.

Por lo tanto, **la prevalencia de EC observada en este estudio, del 1,91% (1:53; IC 95%: 1,08-2,74%),** fue ligeramente superior a la observada previamente por Mariné et al., 2011 en niños españoles (1:71; 1,41% IC 95%: 0,7-2,51%) (P=0,544) (Mariné et al., 2011). Dado que en este estudio se excluyeron los pacientes con EC previamente diagnosticada y que aquellos pacientes con EC pero con inmunodeficiencia en IgA no habrían sido detectados, nuestros datos demuestran que existe una población significativa de niños no diagnosticados que pueden ser identificados mediante **LFIA anti-tTG-IgA**. Por tanto, en este sentido, los dispositivos PoCT representan **una herramienta eficaz para identificar a los pacientes con EC no diagnosticada,** y que es importante considerar su valor añadido en relación con los procesos/protocolos de diagnóstico existentes.

Los voluntarios incluidos en el estudio se agruparon en función de la probabilidad de ser diagnosticados de acuerdo con los criterios de la ESPGHAN, a fin de determinar si el cribado vía LFIA sería más beneficioso para algún grupo en particular (Tabla 4.5) (Husby et al., 2020). Se asumió que los niños con FPG-EC y/o EAI que además presentan síntomas relacionados con la EC tendrían la mayor probabilidad de ser rápidamente dirigidos para realizarse pruebas diagnósticas. Por el contrario, se asumió que los niños con signos de riesgo (como ser, FPG-EC) pero asintomáticos o sintomáticos sin otras señales de riesgo, tendrían menor probabilidades de ser diagnosticados a tiempo, que aquellos sintomáticos y con signos de riesgo. Por último, se aceptó que los asintomáticos sin riesgos asociados tendrían la menor probabilidad de entrar en la vía de diagnóstico de la EC.

Tabla 4.5. Prevalencia de enfermedad celíaca no diagnosticada, valor predictivo positivo de la prueba anti-tTG-IgA y coste del cribado, en función de la probabilidad de cumplir los requisitos para ser diagnosticado según los criterios de la ESPGHAN.

		Total	FPG-EC, riesgo, y sintomático	Otros factores de riesgo	FPG-EC	Sintomático	No FPG-EC, no de riesgo, y asintomático
Prevalencia	n	11/576	0/20	0/3	1/53	4/151	6/389
	%	1,91%	0%	0%	1,89%	2,65%	1,54%
VPP (ratio)	Todos	11/12	n/a	n/a	1/1	4/4	6/8
	Línea test saturada	10/10	n/a	n/a	1/1	3/3	6/6
VPP (%)	Todos	91,67% (95%CI: 71,86-100%)	n/a	n/a	100% (IC 95%: 50,00%-100%)	100% (IC 95%: 87,50%-100%)	75,00% (IC 95%: 38,74%-100%)
	Línea test saturada	100% (IC 95%: 95,45%-100%)	n/a	n/a	100% (IC 95%: 50,00%-100%)	100% (IC 95%: 83,33%-100%)	100% (IC 95%: 91,67%-100%)
Probabilidad de diagnóstico según los criterios ESPGHAN		n/a	Elevada	Media-Elevada	Media-Elevada	Media-Elevada	Baja

EC: enfermedad celíaca; VPP: valor predictivo positivo; FPG: familiar de primer grado.

Tomando la participación global de referencia, en independientemente de sus factores de riesgo y síntomas, 1,91% de los niños fueron identificados como enfermos celíacos. Atendiendo a los **grupos creados en base a la probabilidad de diagnóstico**, en aquellos con mayor probabilidad de entrar en flujos de diagnóstico, es decir, en aquellos voluntarios sintomáticos y tener un FPG-EC y/o una afección autoinmunitaria con mayor riesgo para padecer EC, no se pudieron extraer conclusiones debido a que sólo 20 voluntarios de nuestro estudio cumplían estos criterios, un grupo poblacional insuficiente teniendo en cuenta la prevalencia de la enfermedad. Entre los niños sintomáticos o con FPG-EC, considerados con un riesgo de entrar en vías diagnóstico medio-elevado, entre el 1,89% y el 2,65% fueron identificados como enfermos celíacos. Por último, un 1,54% de los niños

asintomáticos y sin FPG-EC o EAI fueron diagnosticados de EC. Estos datos implican una **tasa de diagnóstico comparable en todos los grupos independientemente de la sintomatología o de la presencia de FPG-EC, cuando el cribado se efectúa en niños sin diagnóstico de EC.**

En base a la ESPGHAN y a su estado en el momento del cribado (síntomas, condiciones médicas, etc.), 187 de los voluntarios habrían sido dirigidos para pruebas de EC, por lo que sólo 5/11 pacientes habrían sido identificados con EC (Husby et al., 2020). En comparación con la prevalencia total obtenida en este cribado (11/576), ninguna de las estratificaciones descritas anteriormente habría dado lugar a una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de voluntarios identificados como pacientes con EC. La proporción de pacientes celíacos no diagnosticados con enfermedad activa en cada uno de estos grupos fue comparable (valores $P=0,526$ [1/187], $0,569$ [4/151] y $0,991$ [1/53] respectivamente).

Curiosamente, la evidencia científica existente afirma que los cribados en FPG-EC dan como resultado que aproximadamente el 7,5% de los familiares sean diagnosticados de esta afección (Singh et al., 2015). Concretamente, en España, se han comunicado tasas de diagnóstico de entre el 2,6-12,6% cuando se han efectuado este tipo de cribados (Singh et al., 2015). Sorprendentemente, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de EC entre la media de la población (1:53; 1,91% IC 95%: 1,08-2,74%) y los que se sabía que tenían FPG-EC en el momento del cribado (1:53; 1,89%; IC 95%: 0,00-4,95%) ($P=0,991$). Es importante señalar que los datos mostrados en la Tabla 4.4 representan la información disponible en el momento del cribado.

La **prevalencia inferior a la esperada en el grupo FPG-EC** podría explicarse en primer lugar por el pequeño tamaño de la muestra y por el hecho de que los familiares de pacientes con enfermedad celíaca pueden no consumir suficiente gluten para elevar los niveles de anticuerpos hasta límites detectables.

No obstante, se debe tener en cuenta, que para efectuar este análisis se tuvo en cuenta prevalencia de EC entre los pacientes que conocían tener FPG-EC en el momento del cribado. Es decir, no incluyó a los pacientes que tenían FPG-EC pero desconocían esta verdad, ya que ni los pacientes ni sus familiares habían recibido un diagnóstico previo. De los 10/11 de los voluntarios diagnosticados de EC en este cribado declararon que no tener una FPG-EC, 3/10 descubrieron tener FPG-EC sin diagnosticar tras el diagnóstico; el cribado también condujo al diagnóstico familiares.

En cuanto a los voluntarios sintomáticos, su probabilidad de ser remitidos para el diagnóstico de EC oscilaría entre alta y media, dependiendo de las manifestaciones clínicas presentadas. En este estudio, menos de la mitad de los voluntarios diagnosticados con EC (4/11; 36,37%) declararon tener síntomas compatibles. No obstante, estos voluntarios sintomáticos quedaron diluidos entre el 26,21% (151/576) de los participantes que manifestaron tener síntomas persistentes compatibles con EC cuyo origen desconocían.

Los voluntarios que manifestaron tener síntomas relacionados con EC, presentaban una **combinación de síntomas GI y EI**. La presencia de ataxia por gluten en un voluntario fue el más llamativo. Este voluntario tuvo varios episodios de crisis que comenzaron tres meses y medio antes de su diagnóstico con EC. Sin embargo, no todas las manifestaciones mostradas por los pacientes diagnosticados eran tan recientes. Todos los voluntarios sintomáticos presentaban al menos un síntoma relacionado con la EC desde hacía más de un año, además de que los manifestaban juntamente con otros síntomas y cuya aparición no había sido simultánea (Tabla 4.3). Estas observaciones demuestran claramente las limitaciones del diagnóstico precoz basado únicamente en las manifestaciones clínicas.

En resumen, entre los voluntarios diagnosticados de EC en este estudio, casi el 40% presentaba síntomas compatibles con EC o era FPG-EC en el momento del cribado, lo que indicaba su idoneidad para someterse a pruebas celíacas según la ESPGHAN (Husby et al., 2020). A pesar de estas directrices, varios voluntarios presentaron síntomas compatibles con EC durante un periodo prolongado; por lo que, se comprende que la inclusión de estos niños en los procesos de cribado podría haber acelerado su diagnóstico.

Los **que no pertenecían a ningún grupo de riesgo ni presentaban síntomas** asociados a EC habrían tenido una probabilidad relativamente baja de entrar en el flujo para el diagnóstico de la EC en aquellos hospitales que siguen los criterios de la ESPGHAN (Husby et al., 2020). Al menos el 54,5% (6/11) de los diagnosticados en este estudio no habrían sido identificados como enfermos celíacos o en su defecto, lo habrían sido tardíamente. Curiosamente, el diagnóstico de un voluntario asintomático desencadenó el diagnóstico de su madre con síntomas compatibles con la EC. En resumen, para pacientes asintomáticos sin FPG-ECs, el cribado poblacional permitiría el diagnóstico precoz de que de otro modo no serían identificados.

De forma adicional se estudiaron las diferencias en la prevalencia de EC entre **sexos y grupos de edad**, no observando diferencias estadísticamente significativas. Por el contrario, varios estudios han demostrado que las tasas de prevalencia y diagnóstico son más elevadas entre las mujeres. Además, un reciente estudio de cribado realizado de forma

similar a la de este estudio en población de 2 a 14 años de Colorado (EE.UU.), ha demostrado que los niños de 6 a 13 años tenían casi el doble de probabilidades de presentar títulos positivos frente a la población de menor y mayor edad analizada (King et al., 2020; Singh et al., 2018; Stahl et al., 2021).

Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre sexos, se obtuvo una proporción de diagnóstico de 1:1,44 varones frente mujeres, y una mayor prevalencia de síntomas entre las mujeres, de acuerdo con la mayoría de los estudios (King et al., 2020; Mariné et al., 2011; Singh et al., 2018). Asimismo, no se debe olvidar que la EC puede haber estado activa durante años antes del diagnóstico, especialmente en voluntarios de edad >10 años, generando lesión histológica y problemas derivados del mismo debido a un diagnóstico tardío.

Para determinar el **impacto del diagnóstico de EC** a corto plazo en cada uno de estos grupos, se evaluó el cambio en la CVRS desde el momento del diagnóstico hasta 6-18 meses de iniciar una DSG.

Los voluntarios que refirieron síntomas físicos confirmaron una notable mejora de su CVRS tras iniciar una DSG, mientras que los que inicialmente no refirieron síntomas no observaron ni una mejora ni un empeoramiento de su estado de salud, salvo una participante que manifestó mayor estrés y dificultades de socialización debido al tratamiento. Esto pone de relieve tanto el valor a corto plazo del diagnóstico de EC sintomática como las dificultades asociadas a una DSG (Fuchs et al., 2018; Norström et al., 2011).

El estudio CVRS no cuantificó los beneficios para la salud a largo plazo asociados a la detección precoz de la EC. Por lo tanto, el hecho de que las mejoras a corto plazo sean solamente visibles en pacientes sintomáticos no resta importancia a la identificación de la enfermedad en pacientes asintomáticos. Además, de que se sabe que cuanto antes se implante la DSG, mejor será la adherencia a largo plazo y la salud de la mucosa GI (Högberg et al., 2003; Szakács et al., 2017).

Por lo tanto, aunque los beneficios obtenidos del cribado masivo sean moderados a corto plazo, **el balance global del coste-beneficio podría ser ventajoso** si dichos cribados se coordinan de forma coste-efectiva (Kurppa et al., 2014; Kvamme et al., 2022; Viljamaa et al., 2005; Vilppula et al., 2011). Dado que múltiples factores, como la gran variedad de manifestaciones relacionadas con la EC y los conocimientos limitados de algunos profesionales no especializados, probablemente estén limitando el diagnóstico a tiempo

de la EC (tras la primera aparición de los síntomas), dichos cribados podrían ahorrar un coste considerable de otras pruebas diagnósticas, visitas clínicas, junto con una reducción del malestar del paciente.

El LFIA utilizado en este estudio tiene múltiples ventajas que podrían facilitar un flujo de trabajo de cribado rentable, como su facilidad de uso, el bajo coste, la reducción del tiempo de obtención de resultados y la mejora del punto de atención. Como para todas las pruebas de diagnóstico rápido, se requiere una formación mínima para realizar la prueba. Las líneas de prueba saturadas se identifican fácilmente; sin embargo, se debe prestar atención para distinguir los positivos más débiles. El tiempo para obtener el resultado es inferior a 15 min. También es beneficioso para las organizaciones, ya que no se requiere equipo adicional y las muestras se obtienen *in situ* de forma menos invasiva que en otras pruebas de laboratorio estándar, eliminando así la necesidad de equipo de almacenamiento y el riesgo de que las muestras se pierdan o se extravíen. Además, las pruebas rápidas podrían ser más baratas que las pruebas de laboratorio, aunque el precio podría variar entre marcas y depender de los costes adicionales en que incurran los trabajadores sanitarios.

Los **estudios de GIP** en orina que se realizaron simultáneamente para determinar si el voluntario consumía suficiente gluten en la dieta para validar los resultados negativos de la prueba anti-tTG-IgA, mostraron que una sola prueba no era suficiente para tal función. La determinación de GIP en una sola muestra de orina no podía predecir claramente los hábitos de consumo de gluten. Por lo tanto, si se siguiera estudiando esta estrategia, para evaluar los hábitos de consumo de gluten, se necesitarían al menos tres muestras de orina tomadas en la misma semana, como se indica en otros estudios (Burger et al., 2022; Coto et al., 2021b; Garzón-Benavides et al., 2023; Ruiz-Carnicer et al., 2020).

La rentabilidad de la inversión en el cribado LFIA anti-tTG-IgA se correlaciona directamente con la prevalencia de la enfermedad no diagnosticada en el grupo analizado, al se observarse diferencias estadísticamente significativas entre la prevalencia de EC activa no diagnosticada en los grupos analizados, la rentabilidad sería similar en cada grupo, a expensas del beneficio obtenido (Tabla 4.5). La rentabilidad del cribado LFIA anti-tTG-IgA también puede incrementarse aumentando el VPP de la prueba para reducir la necesidad de validar los resultados LFIA con pruebas anti-tTG-IgA de laboratorio. Para aquellas muestras que produjeron una línea de prueba saturada, las pruebas rápidas tuvieron un VPP del 100% (IC del 95%: 95,45%-100%), lo que indica una fuerte correlación con títulos de anti-tTG-IgA superiores a 10 veces el ULN (criterio en la mayoría de las directrices para el diagnóstico de EC en la población pediátrica) (Al-Toma et al., 2019;

Husby et al., 2020). Con una validación donde se utilice un conjunto de datos mayor, si se mantiene el VPP del 100% de las líneas de prueba saturadas para $>10x$ anti-tTG-IgA ULN, sería posible eliminar el requisito (y el coste asociado) de confirmar dichos resultados de prueba con ELISAs basados en laboratorio. Utilizando los datos de este estudio, se obtuvo un intervalo de confianza del 95,45-100%.

En resumen, las pruebas rápidas sencillas como la LFIA anti-tTG-IgA podrían ser de gran utilidad clínica en los centros de atención primaria, ya que podrían ayudar a la identificación precoz de casos de EC activa no diagnosticada. Los niños con retraso diagnóstico y aquellos que no cumplían los criterios diagnósticos de la ESPGHAN, obtuvieron el mayor beneficio del cribado de EC basado en LFIA. La aplicación oportuna de una DSG ayudaría a mejorar la CVRS y probablemente evitaría complicaciones a largo plazo en todos los pacientes con EC activa (Högberg et al., 2003; Kurppa et al., 2014; Kvamme et al., 2022; Szakács et al., 2017; Viljamaa et al., 2005; Vilppula et al., 2011).

Los costes del diagnóstico de EC se podrían reducir con alta probabilidad en el caso de una línea de prueba saturada (Figura 4.2D) se correlacionara con el umbral de $>10x$ ULN para anti-tTG-IgA, dado su elevado VPP para EC activa. Además, también podría reducir potencialmente los costes de la EC no diagnosticada si se aplicara como herramienta de cribado y se utilizara en atención primaria general, evitando derivaciones innecesarias a gastroenterólogos, reduciendo retrasos en el diagnóstico, reduciendo el riesgo de problemas a largo plazo y mejorando la CVRS de los pacientes (Coto et al., 2021a; UE N° 1169/2011, 2011; EuroQol Research Foundation, 2020; Fuchs et al., 2014; Hocking et al., 2021; Long et al., 2010; Norström et al., 2011; Ukkola et al., 2012).

REFERENCIAS

- Aggarwal, S. & Green, P. H. R. (2012). Screening for celiac disease in average-risk and high-risk populations. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 5(1), 37–47. <https://doi.org/10.1177/1756283X11417038>
- Al-Toma, A., Volta, U., Auricchio, R., Castillejo, G., Sanders, D. S., Cellier, C., Mulder, C. J. & Lundin, K. E. A. (2019). European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. *United European Gastroenterology Journal*, 7(5), 583–613. <https://doi.org/10.1177/2050640619844125>
- Almallouhi, E., King, K. S., Patel, B., Chung, W., Juhn, Y. J., Joseph, A. M. & Imad, A. (2017). INCREASING INCIDENCE AND ALTERED PRESENTATION IN A POPULATION-BASED STUDY OF PEDIATRIC CELIAC DISEASE IN NORTH AMERICA. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 65(4), 432–437. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001532>.INCREASING
- Anderson, R. P. (2022). Review article: Diagnosis of coeliac disease: a perspective on current and future approaches. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 56(Suppl1), S18–S37. <https://doi.org/10.1111/apt.16840>
- Badizadegan, K., Vanlandingham, D. M., Hampton, W. & Thompson, K. M. (2020). Value of biopsy in a cohort of children with high-titer celiac serologies: observation of dynamic policy differences between Europe and North America. *BMC Health Services Research*, 20(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12913-020-05815-0>
- Bogaert, L., Cauchie, M., Van Hoovels, L., Vermeersch, P., Fierz, W., De Hertogh, G., Hoffman, I. & Bossuyt, X. (2020). Optimization of serologic diagnosis of celiac disease in the pediatric setting. *Autoimmunity Reviews*, 19(5), 102513. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102513>
- Burger, J. P. W., van Lochem, E. G., Roovers, E. A., Drenth, J. P. H. & Wahab, P. J. (2022). Dose-Escalating (50–500 mg) Gluten Administration Leads to Detectable Gluten-Immunogenic-Peptides in Urine of Patients with Coeliac Disease Which Is Unrelated to Symptoms, a Placebo Controlled Trial. *Nutrients*, 14(9), 1771. <https://doi.org/10.3390/nu14091771>
- Caio, G., Volta, U., Sapone, A., Leffler, D. A., De Giorgio, R., Catassi, C. & Fasano, A. (2019). Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Medicine*, 17(1), 142.

<https://doi.org/10.1186/s12916-019-1380-z>

Catassi, C., Fabiani, E., Iacono, G., Agate, C. D., Francavilla, R., Biagi, F., Volta, U., Accomando, S., Picarelli, A., Vitis, I. De, Pianelli, G. & Gesuita, R. (2007). A prospective , double-blind , placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease 1 – 3. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(1), 160–166. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.1.160>

Cichewicz, A. B., Mearns, E. S., Taylor, A., Boulanger, T., Gerber, M., Leffler, D. A., Drahos, J., Sanders, D. S., Thomas Craig, K. J. & Lebwohl, B. (2019). Diagnosis and Treatment Patterns in Celiac Disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 64(8), 2095–2106. <https://doi.org/10.1007/s10620-019-05528-3>

Coto, L., Mendia, I., Sousa, C., Bai, J. C. & Cebolla, A. (2021a). Determination of gluten immunogenic peptides for the management of the treatment adherence of celiac disease: A systematic review. *World Journal of Gastroenterology*, 27(37), 6306–6321. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i37.6306>

Coto, L., Sousa, C. & Cebolla, A. (2021b). Dynamics and Considerations in the Determination of the Excretion of Gluten Immunogenic Peptides in Urine: Individual Variability at Low Gluten Intake. *Nutrients*, 13(8), 2624. <https://doi.org/10.3390/nu13082624>

UE N° 1169/2011, 2011 Diario Oficial de la Unión Europea 18 (2011).

EuroQol Research Foundation. (2020). EQ-5D-Y User Guide How to apply, score, and present results from the EQ-5D-Y Version. *Euroqol.Org*, September, 1–38. www.impact-test.co.uk

Fasano, A. & Evans, K. (2009). Head to Head: Should we screen for coeliac disease? *BMJ: British Medical Journal*, 339(7728), 998–999.

Fuchs, V., Kurppa, K., Huhtala, H., Collin, P., Mäki, M. & Kaukinen, K. (2014). Factors associated with long diagnostic delay in celiac disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 49(11), 1304–1310. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.923502>

Fuchs, V., Kurppa, K., Huhtala, H., Mäki, M., Kekkonen, L. & Kaukinen, K. (2018). Delayed celiac disease diagnosis predisposes to reduced quality of life and incremental use of health care services and medicines: A prospective nationwide study. *United European Gastroenterology Journal*, 6(4), 567–575.

<https://doi.org/10.1177/2050640617751253>

Garzón-Benavides, M., Ruiz-Carnicer, Á., Segura, V., Fombuena, B., García-Fernandez, F., Sobrino-Rodríguez, S., Gómez-Izquierdo, L., Montes-Cano, M. A., Millan-Domínguez, R., del Carmen Rico, M., González-Naranjo, C., Bozada-García, J. M., Coronel-Rodríguez, C., Espin, B., Díaz, J., Comino, I., Argüelles-Arias, F., Cebolla, Á., Romero-Gómez, M., ... Pizarro-Moreno, Á. (2023). Clinical utility of urinary gluten immunogenic peptides in the follow-up of patients with coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 57, 993–1003. <https://doi.org/10.1111/apt.17417>

Gasbarrini, A., Torre, E. S., Trivellini, C., De Carolis, S., Caruso, A. & Gasbarrini, G. (2000). Recurrent spontaneous abortion and intrauterine fetal growth retardation as symptoms of coeliac disease. *Lancet*, 356(9227), 399–400. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02535-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02535-6)

Gusi, N., Perez-Sousa, M. A., Gozalo-Delgado, M. & Olivares, P. R. (2014). Validez y fiabilidad de la versión proxy del EQ-5D-Y en español. *Anales de Pediatría*, 81(4), 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2013.11.028>

Hocking, L., George, J., Broberg, E. K., Struelens, M. J., Leitmeyer, K. C., Deshpande, A., Parkinson, S., Francombe, J., Morley, K. I. & de Carvalho Gomes, H. (2021). Point of Care Testing for Infectious Disease in Europe: A Scoping Review and Survey Study. *Frontiers in Public Health*, 9, 722943. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.722943>

Högberg, L., Grodzinsky, E. & Stenhammar, L. (2003). Better dietary compliance in patients with coeliac disease diagnosed in early childhood. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 38(7), 751–754. <https://doi.org/10.1080/00365520310003318>

Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I., Kurppa, K., Mearin, M. L., Ribes-Koninckx, C., Shamir, R., Troncone, R., Auricchio, R., Castillejo, G., Christensen, R., Dolinsek, J., Gillett, P., Hróbjartsson, A., Koltai, T., Maki, M., Nielsen, S. M., Popp, A., Størdal, K., ... Wessels, M. (2020). European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 70(1), 141–156. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002497>

King, J. A., Jeong, J., Underwood, F. E., Quan, J., Panaccione, N., Windsor, J. W., Coward, S., Debruyn, J., Ronksley, P. E., Shaheen, A. A., Quan, H., Godley, J., Veldhuyzen Van Zanten, S., Lebwohl, B., Ng, S. C., Ludvigsson, J. F. & Kaplan, G. G. (2020). Incidence of

- Celiac Disease Is Increasing over Time: A Systematic Review and Meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology*, 115(4), 507–525. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000523>
- Kivelä, L. & Kurppa, K. (2018). Screening for coeliac disease in children. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 107(11), 1879–1887. <https://doi.org/10.1111/apa.14468>
- Kurppa, K., Paavola, A., Collin, P., Sievänen, H., Laurila, K., Huhtala, H., Saavalainen, P., Mäki, M. & Kaukinen, K. (2014). Benefits of a gluten-free diet for asymptomatic patients with serologic markers of celiac disease. *Gastroenterology*, 147(3), 610–617.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.05.003>
- Kvamme, J. M., Sørbye, S., Florholmen, J. & Halstensen, T. S. (2022). Population-based screening for celiac disease reveals that the majority of patients are undiagnosed and improve on a gluten-free diet. *Scientific Reports*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16705-2>
- Lindfors, K., Ciacci, C., Kurppa, K., Lundin, K. E. A., Makharia, G. K., Mearin, M. L., Murray, J. A., Verdu, E. F. & Kaukinen, K. (2019). Coeliac disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0054-z>
- Long, K. H., Rubio-Tapia, A., Wagie, A. E., Melton, L. J., Lahr, B. D., Van Dyke, C. T. & Murray, J. A. (2010). The economics of coeliac disease: A population-based study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 32(2), 261–269. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04327.x>
- Ludvigsson, J. F., Leffler, D. A., Bai, J. C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P. H. R., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Kelly, C. P., Leonard, J. N., Lundin, K. E. A., Murray, J. A., Sanders, D. S., Walker, M. M., Zingone, F. & Ciacci, C. (2013). The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*, 62(1), 43–52. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301346>
- Mariné, M., Farre, C., Alsina, M., Vilar, P., Cortijo, M., Salas, A., Fernández-Bañares, F., Rosinach, M., Santaolalla, R., Loras, C., Marquès, T., Cusí, V., Hernández, M. I., Carrasco, A., Ribes, J., Viver, J. M. & Esteve, M. (2011). The prevalence of coeliac disease is significantly higher in children compared with adults. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 33(4), 477–486. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04543.x>

- Mattila, E., Kurppa, K., Ukkola, A., Collin, P., Huhtala, H., Forma, L., Lähdeaho, M. L., Kekkonen, L., Mäki, M. & Kaukinen, K. (2013). Burden of illness and use of health care services before and after celiac disease diagnosis in children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 57(1), 53–56. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31828ee55d>
- Norström, F., Lindholm, L., Sandström, O., Nordyke, K. & Ivarsson, A. (2011). Delay to celiac disease diagnosis and its implications for health-related quality of life. *BMC Gastroenterology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-118>
- Nurminen, S., Kivelä, L., Huhtala, H., Kaukinen, K. & Kurppa, K. (2019). Extraintestinal manifestations were common in children with coeliac disease and were more prevalent in patients with more severe clinical and histological presentation. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 108(4), 681–687. <https://doi.org/10.1111/apa.14324>
- Ravikumara, M., Nootigattu, V. K. T. & Sandhu, B. K. (2007). Ninety percent of celiac disease is being missed. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 45(4), 497–499. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31812e5710>
- Riznik, P., Balogh, M., Bódi, P., De Leo, L., Dolinsek, J., Guthy, I., Gyimesi, J., Horváth, Á., Kis, I., Klemenak, M., Koletzko, B., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I. R., Krencnik, T., Not, T., Palcevski, G., Pollák, É., Sblattero, D., Tokodi, I., ... Rybak, A. (2019). The Use of Biopsy and “no-Biopsy” Approach for Diagnosing Paediatric Coeliac Disease in the Central European Region. *Gastroenterology Research and Practice*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9370397>
- Riznik, P., De Leo, L., Dolinsek, J., Gyimesi, J., Klemenak, M., Koletzko, B., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I. R., Krencnik, T., Not, T., Palcevski, G., Sblattero, D., Vogrincic, M., Werkstetter, K. J. & Dolinsek, J. (2019). Diagnostic Delays in Children with Coeliac Disease in the Central European Region. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 69(4), 443–448. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002424>
- Rubio-Tapia, A., Kyle, R. A., Kaplan, E. L., Johnson, D. R., Page, W., Erdtmann, F., Brantner, T. L., Kim, W. R., Phelps, T. K., Lahr, B. D., Zinsmeister, A. R., Melton, L. J. & Murray, J. A. (2009). Increased Prevalence and Mortality in Undiagnosed Celiac Disease. *Gastroenterology*, 137(1), 88–93. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.03.059>
- Ruiz-Carnicer, A., Garzon-Benavides, M., Fombuena, B., Segura, V., Garcia-Fernandez, F.,

- Sobrino-Rodríguez, S., Gomez-Izquierdo, L., Montes-Cano, M. A., Rodríguez-Herrera, A., Millan, R., Rico, M. C., Gonzalez-Naranjo, C., Bozada-Garcia, J. M., Diaz, J., Coronel-Rodríguez, C., Espin, B., Romero-Gomez, M., Cebolla, A., Sousa, C., ... Pizarro, A. (2020). Negative predictive value of the repeated absence of gluten immunogenic peptides in the urine of treated celiac patients in predicting mucosal healing: New proposals for follow-up in celiac disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 112(5), 1240–1251. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa188>
- Singh, P., Arora, A., Strand, T. A., Leffler, D. A., Catassi, C., Green, P. H., Kelly, C. P., Ahuja, V. & Makharia, G. K. (2018). Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 16(6), 823-836.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.06.037>
- Singh, P., Arora, S., Lal, S., Strand, T. A. & Makharia, G. K. (2015). Risk of celiac disease in the first- and second-degree relatives of patients with celiac disease: A systematic review and meta-analysis. In *American Journal of Gastroenterology* (Vol. 110, Issue 11, pp. 1539–1548). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.296>
- Stahl, M. G., Geno Rasmussen, C., Dong, F., Waugh, K., Norris, J. M., Baxter, J., Yu, L., Steck, A. K., Frohnert, B. I., Liu, E. & Rewers, M. J. (2021). Mass Screening for Celiac Disease: The Autoimmunity Screening for Kids Study. *American Journal of Gastroenterology*, 116(1), 180–187. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000751>
- Szakács, Z., Mátrai, P., Hegyi, P., Szabó, I., Vincze, Á., Balaskó, M., Mosdósi, B., Sarlós, P., Simon, M., Márta, K., Mikó, A., Pécsi, D., Demcsák, A. & Bajor, J. (2017). Younger age at diagnosis predisposes to mucosal recovery in celiac disease on a gluten-free diet: A meta-analysis. *PLoS ONE*, 12(11), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187526>
- Tio, M., Cox, M. R. & Eslick, G. D. (2012). Meta-analysis: Coeliac disease and the risk of all-cause mortality, any malignancy and lymphoid malignancy. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 35(5), 540–551. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04972.x>
- Ukkola, A., Kurppa, K., Collin, P., Huhtala, H., Forma, L., Kekkonen, L., Mäki, M. & Kaukinen, K. (2012). Use of health care services and pharmaceutical agents in coeliac disease: a prospective nationwide study. *BMC Gastroenterology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-12-136>

- Viljamaa, M., Collin, P., Huhtala, H., Sievänen, H., Mäki, M. & Kaukinen, K. (2005). Is coeliac disease screening in risk groups justified? A fourteen-year follow-up with special focus on compliance and quality of life. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 22(4), 317–324. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02574.x>
- Vilppula, A., Kaukinen, K., Luostarinen, L., Krekelä, I., Patrikainen, H., Valve, R., Luostarinen, M., Laurila, K., Mäki, M. & Collin, P. (2011). Clinical benefit of gluten-free diet in screen-detected older celiac disease patients. *BMC Gastroenterology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-136>
- Wilson, J. & Jungner, G. (1968). Principles and practice of screening for disease. Geneva, Switzerland: World Health Organization. *Public Health Papers No 34*, 168.
- Wolf, J., Petroff, D., Richter, T., Auth, M. K. H., Uhlig, H. H., Laass, M. W., Lauenstein, P., Krahl, A., Händel, N., de Laffolie, J., Hauer, A. C., Kehler, T., Flemming, G., Schmidt, F., Rodrigues, A., Hasenclever, D. & Mothes, T. (2017). Validation of Antibody-Based Strategies for Diagnosis of Pediatric Celiac Disease Without Biopsy. *Gastroenterology*, 153(2), 410-419.e17. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.023>

CAPÍTULO 5.

DESARROLLO DE UN MÉTODO ELISA PARA LA DETECCIÓN DE GIP EN ORINA

CONFIDENCIAL

CONFIDENCIAL

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

1. Las características técnicas del producto iVYCHECK GIP Urine quedaron definidas con los requisitos exigidos al producto en su etapa de diseño para poder obtener el marcado CE (conformidad europea). Este producto ofrece una sensibilidad clínica del 90,2%, una especificidad del 98,3% y un valor predictivo positivo y negativo del 98,1% y del 91,2%, respectivamente.
2. Se validó iVYCHECK GIP Urine como una herramienta de inmunoensayo de flujo lateral (IEFL) para la detección de transgresiones dietéticas tras el diagnóstico de la enfermedad celiaca (EC). No obstante, su uso para determinar si el paciente había ingerido la cantidad suficiente gluten previo al diagnóstico de la EC no pudo ser validado.
3. La herramienta CeliacDetect, un IELF para la determinación de anti-tTG-IgA en sangre, demostró ser de utilidad clínica para la detección precoz de la EC en la población pediátrica, evidenciando que existe una población significativa de pacientes no diagnosticados que pueden ser identificados mediante este tipo de producto. Se identificaron 11 enfermos celíacos entre los 576 voluntarios participantes en el estudio (1,91%) que, posteriormente, fueron confirmados mediante pruebas clínicas recomendadas en la guía diagnóstica de EC elaboradas en el 2020 por el grupo de trabajo de la ESPGHAN (The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition).
4. El cribado realizado mediante CeliacDetect en la población pediátrica demostró que no existían diferencias estadísticamente significativas entre sexos y grupos de edad, y que la prevalencia de la EC no diagnosticada fue comparable entre los voluntarios que mostraban síntomas y/o signos compatibles con esta patología respecto a los que no las mostraron. La detección de la EC por estos procedimientos podría reducir los costes asociados de la EC no diagnosticada si se aplicase en cribados en atención primaria general.
5. Se desarrolló un método ELISA para la detección de los péptidos inmunogénicos del gluten (GIP) en orina. Su sensibilidad podría ser útil para confirmar que durante el

periodo de provocación se ha consumido gluten suficiente como para validar el diagnóstico de la EC en la rutina clínica, y en los estudios de las terapias experimentales no dietéticas en ensayos clínicos. No obstante, las características ofrecidas por el ELISA no fueron suficientes para la utilidad en la monitorización de la DSG tras el diagnóstico por falta de sensibilidad. El 15% de los voluntarios obtuvieron muestras GIP positivas tras el consumo de 2 g de gluten, y el 93% tras el consumo de 8 g. Este producto no se ha validado debido a que en comparación con el iVYCHECK GIP Urine, competidor directo, este no ofrece una ventaja competitiva conjunta en características clínicas y precio.

ANEXO 1.

PROCESO DEL DESARROLLO DEL MÉTODO ELISA PARA LA DETECCIÓN DE GIP EN ORINA

CONFIDENCIAL

CONFIDENCIAL