

UNIVERSIDAD CENTRAL DE LAS VILLAS.

FACULTAD DE FARMACIA.



Trabajo de Diploma

**“OPTIMIZACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE
DIAGNOSTICADORES BIOMÉDICOS EN EL CIGB DE
SANCTI SPIRITUS”.**

Autor: YANISLEIDY REYES SOBRINO

Tutores: Lic. EDEL TORRES GÓMEZ.

Lic. YUDITH CAÑIZARES CARMENATE.

Curso: 2009

Exergo

“ El futuro de nuestra patria necesariamente tendrá que ser un futuro de hombres de ciencia.”

Fidel Castro

Dedicatoria

A mis abuelos por ser siempre fuente de inspiración y sacrificio.

A mis padres que con perseverancia y ejemplo supieron conducirme por el camino correcto a lo largo de mi vida.

A mi esposo, por haber sido paciente y darme apoyo incondicional en este empeño.

A todos muchas gracias

Agradecimientos

En este momento tan importante de mi vida quiero agradecer:

A mis tutores **Lic. EDEL TORRES GÓMEZ y la Lic. YUDITH CAÑIZARES CARMENATE** por su agudeza y dedicación constante en el asesoramiento de esta investigación.

A mis padres por ser ejemplo de constancia y por apoyarme en estos cinco años de carrera.

A mi esposo por ser una parte importante de mi vida.

A mi familia que en los momentos más difíciles me dio apoyo y aliento para seguir.

A todas las personas que de una forma u otra aportaron sus conocimientos y esfuerzo para la realización de este trabajo.

Glosario de Términos

Agencia norteamericana para los Medicamentos y los Alimentos	(FDA)
Albúmina Sérica Bovina	(BSA)
Alfa feto proteína	(AFP)
Anticuerpo monoclonal	(AcM)
Anticuerpo policlonal	(AcP)
Antígeno trofoblástico invasivo	(ITA)
Células presentadoras de antígenos (células del sistema inmunológico)	(CPA)
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología	(CIGB)
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus	(CIGB SS)
Centro Estatal para el Control de Medicamentos y Diagnosticadotes	(CECMED)
Elastasa humana	(HLE)
Embarazo Ectópico	(EE)
Enfermedad celíaca	(EC)
Enzima transglutaminasa tisular	(TGt)
Estimación de radiorreceptores	(RRA)
HCG Hiperglicosilada	(H-hCG)
Hormona folículo estimulante	(FSH)
Hormona Gonadotropina Coriónica humana	(hCG)
Hormona Luteinizante	(LH)
Humedad relativa	(HR)
Inhibición de aglutinación	(AIT)
Instituto Nacional para Estándares y el Control de Biológicos	(NIBSC)
International Federation of Clinical Chemistry	(IFCC)
International Standard	(IS)
Mayor Histocompatibility System (Complejo Principal de Histocompatibilidad)	(MHC)
Ministerio de Salud Pública	(MINSAP)
Natural Killers (células del sistema inmunológico)	(NK)
Neurohormonas liberadoras de gonadotropinas	(GnRH)
Nitrocelulosa	(NC)

Organización Mundial de la Salud	(OMS)
Radioinmunoensayos	(RIA)
Regulación menstrual	(RM)
Solución salina tamponada con fosfatos	(SSTF)

Índice

Resumen

Introducción	3
Revisión Bibliográfica	5
2.1 Diagnóstico precoz del Embarazo	5
2.1.1 La hormona Gonadotropina Coriónica humana (hCG)	5
2.1.2 Papel fisiológico de la hCG	8
2.1.3 Biodegradación de la hCG	9
2.1.4 Hormona hCG Hiperglicosilada	13
2.1.5 Inmunoensayos rápidos y simples aplicados en el diagnóstico del embarazo.	14
2.1.5.1 Breve descripción del funcionamiento del sistema	15
2.1.6 Ventajas analíticas de los inmunoensayos sobre el diagnóstico clínico	17
2.1.7 Relación de la hCG con otros procesos como el aborto espontáneo y los embarazos ectópicos, molas hidatiformes y coriocarcinomas ováricos.....	18
2.1.8 Justificación del Uso de Diagnosticadores de Embarazo en las consultas de Regulación Menstrual y en Cuerpo de Guardia para manejo del Embarazo Ectópico.	20
2.2 Enfermedad Celíaca	22
2.2.1 Epidemiología	24
2.2.2 Presentación clínica.	24
2.2.3 Patogénesis.	24
2.2.4 Diagnóstico.	26
2.2.5 Tratamiento.	28
2.2.6 La enfermedad celíaca: un ejemplo de relación entre los conocimientos básicos y la práctica clínica.	29
2.2.7 Estudios sobre la enfermedad celíaca en Cuba. Perspectivas futuras.	30
2.2.8 Avances científicos recientes que pueden tener implicaciones en el futuro manejo de los pacientes con EC.	31
Materiales y Métodos	33
3.1 Mejoras en la producción de los diagnosticadores biomédicos.	33

3.1.1 Sensibilización o recubrimiento de las membranas de nitrocelulosa (tiras reactivas) en equipo Biodot -----	35
3.1.2 Bloqueo de los sitios libres en las membranas de nitrocelulosa. Secado.-----	35
3.1.3 Dispensado del conjugado sobre el material macroporoso. Secado.-----	36
3.1.4 Ensamblaje del sistema-----	37
3.1.5 Corte de las tiras reactivas-----	37
3.1.6 Envase-----	38
3.2 Precisiones del Límite de Detección del ensayo HeberFast Line® Embarazo frente al Estándar Internacional de Referencia.-----	39
3.3 Nueva presentación del diagnosticador precoz del embarazo.-----	41
3.4 Desarrollo del estudio de estabilidad acelerada con muestras de orina y suero.-----	42
3.5 Mejoras en el desempeño del diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa para el diagnóstico de la enfermedad celíaca.-----	42
3.5.1. Evaluación del diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa con muestras de sangre y suero.-----	43
3.5.2 Desarrollo del estudio de estabilidad acelerada con el diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa empleando muestras de sangre.-----	44
Resultados y Discusión -----	45
4.1 Mejoras en la producción de los diagnosticadores biomédicos.-----	45
4.1.1 Sensibilización o recubrimiento de las membranas de nitrocelulosa (tiras reactivas) en equipo Biodot.-----	46
4.1.2. Bloqueo de los sitios libres en las membranas de nitrocelulosa. Secado.-----	54
4.1.3. Dispensado del conjugado sobre el material macroporoso. Secado.-----	55
4.1.4. Corte de las tiras reactivas.-----	57
4.2. Precisiones del Límite de Detección del ensayo HeberFast Line® Embarazo frente al Estándar Internacional de Referencia.-----	60
4.3 Nueva presentación del diagnosticador precoz del embarazo -----	63
4.4 Resultados del estudio de estabilidad acelerada con muestras de orina y suero.-----	64
4.5 Mejoras en el desempeño del diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa para el diagnóstico de la enfermedad celíaca-----	67

4.5.1 Evaluación de desempeño del diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa , con muestras de suero y sangre.-----	71
4.5.2. Resultados del estudio de estabilidad acelerada con el diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa empleando muestras de sangre.-----	72
Conclusiones-----	74
Recomendaciones -----	76
Bibliografía-----	77

RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados alcanzados en la mejora de los diagnosticadores biomédicos para la detección del embarazo temprano y la enfermedad celíaca, producidos por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti-Spiritus. Mediante el establecimiento de mejoras técnicas, que repercutieron no sólo en un desempeño superior de cada sistema analítico, sino también en reducir los costos de producción por determinación para apoyar su disponibilidad en el país, se logró una nueva presentación del diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo**, en formato de 200 determinaciones y del diagnosticador **HeberFast Line® anti-transglutaminasa** para su empleo con muestras de suero, plasma o sangre humana, que hacen más versátil su uso. Con el objetivo de brindar una respuesta rápida y efectiva a la demanda concertada con el Ministerio de Salud Pública (MINSAP) y otros clientes, se hizo necesario además potenciar el incremento de la productividad en más de 20 veces, conllevando a un significativo ahorro de tiempo y gastos directos implícitos en cada lote de producción. Este perfeccionamiento permitió un mayor rendimiento de la producción, por el concepto de obtener tamaños de lotes de tiras reactivas de más de 50 000 unidades en el mismo período de tiempo, cuando anteriormente se producían sólo 2 000 como máximo.

I. INTRODUCCIÓN.

Actualmente, las exigencias por desarrollar inmunoensayos rápidos y simples para el diagnóstico humano y veterinario se han incrementado a nivel internacional. La rapidez y versatilidad de diferentes sistemas diagnósticos presentan algunas ventajas incluyendo sensibilidad, simplicidad, velocidad y bajo costo, todo lo cual repercute significativamente en materia del resultado a obtener (Cone 1985; Porstmann and Kiessig 1992).

A partir del año 2004, se obtuvo el Registro Sanitario por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de Sancti-Spiritus de 5 diagnosticadores biomédicos, dentro de los que se encuentran los relacionados con; el diagnóstico de procesos reproductivos como el embarazo precoz y su importancia para la detección temprana del embarazo ectópico (**HeberFast Line® Embarazo** y **HeberFast Line® MaterniTest**). Otros relacionados con el diagnóstico serológico de intolerancia a proteínas presentes en cereales (**HeberFast Line® anti-gliadinas** y **HeberFast Line® anti-transglutaminasa**), así como el diagnóstico de rotavirus en heces (**HeberFast Line® Rotavirus**), que tanto sufrimiento provocan en la población infantil menor de 5 años y responsable de diferentes afecciones por enfermedades diarreicas agudas.

Estos diagnosticadores biomédicos, fueron transferidos sus producciones desde la institución matriz del CIGB en La Habana, pero a escala de pequeñas producciones por unidades (Lotes), lo cual conspira contra los costos de producción e incrementar el compromiso de los mismos ante una demanda suficiente.

Dadas las necesidades existentes en el país por contar con estos diagnosticadores biomédicos, se concertó una producción considerable de estos productos entre el CIGB de Sancti-Spiritus como unidad productora y el MINSAP como usuario final de los mismos. Esta tarea responde así mismo a la campaña por la sustitución de importaciones a la que está llamado todo el país. Por lo que se plantea como problema científico:

Los costos, la versatilidad y la competitividad de los diagnosticadores biomédicos HeberFast Line® Embarazo y HeberFast Line® anti-transglutaminasa, están comprometidos por los materiales de envase primario involucrados en el formato actualmente registrado y limitados por el tipo de muestra biológica que emplean.

En coherencia con lo anteriormente definido, planteamos como **hipótesis** en este trabajo;

1. ¿Es posible mejorar el desempeño de los diagnosticadores biomédicos producidos en el CIGB de Sancti-Spiritus, en concordancia con las necesidades del cliente, para favorecer su versatilidad y competencia?

Para ello pretendemos cumplimentar el siguiente Objetivo General:

- **Obtener una nueva presentación de los diagnosticadores HeberFast Line® Embarazo y HeberFast Line® anti-transglutaminasa, que permitan mejorar su desempeño, versatilidad y competitividad desde el punto de vista técnico y comercial.**

Objetivos específicos:

- Mejorar la homogeneidad de las señales correspondientes a la “línea control” de los diagnosticadores biomédicos.
- Identificar los parámetros que más inciden en los rechazos del proceso productivo y definir posibles soluciones.
- Establecer las condiciones del diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo**, que mejoren su producción acorde con los criterios de calidad establecidos por las Buenas Prácticas de Fabricación.
- Desarrollar estudio de estabilidad acelerada con el diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo** con muestras de orina y suero.
- Perfeccionar el desempeño del diagnosticador **HeberFast Line® anti-transglutaminasa** para su empleo con muestras de sangre, suero o plasma humano.
- Definir un formato de autoprueba, para el diagnosticador **HeberFast Line® anti-transglutaminasa**.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 Diagnóstico precoz del Embarazo.

2.1.1 La hormona Gonadotropina Coriónica humana (hCG). Relación con el diagnóstico precoz del embarazo.

A través de la historia, la humanidad siempre ha querido conocer si una mujer está o no embarazada. Los primeros métodos usaron los efectos visibles que ciertas hormonas tienen sobre plantas y animales, los cuales se denominan métodos biológicos de detección de embarazo. Por ejemplo; las mujeres en Egipto aplicaban su orina sobre semillas de trigo y si estas germinaban antes de temporada, eran capaces de determinar si estaban embarazadas (Hussa 1981; Braunstein, Rasor et al. 1986).

Los años de función reproductiva de la mujer se caracterizan por cambios rítmicos en las tasas de secreción de las Hormonas Femeninas y cambios correspondientes en los órganos sexuales. Las funciones sexuales y reproductivas en la mujer pueden dividirse en dos fases principales; primera: la Preparación del Cuerpo para la Concepción y la Segunda: el Periodo de Gestación o Embarazo.

Durante el Periodo de Gestación en la mujer se producen grandes cantidades de estas hormonas: Gonadotropina Coriónica Humana, Estrógenos, Progesterona, y Somatomamotropina Coriónica, ya que sus niveles son esenciales para el control del Embarazo (Chian, Buckett et al. 2000).

La primera hormona glucoproteica identificada fue la hCG en 1927 por Aschheim y Zandek en la orina de la mujer, pero se produce primero por los ovarios y después por la placenta. Ambos señalaron que la orina de mujeres embarazadas tenía propiedades gonadotrópicas (Chian, Buckett et al. 2000). Su producción es estimulada por las neurohormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH) de la placenta (Willians. and Wilson 1998), o sea se sintetiza también en el cerebro. En la década de 1960 se logró aislar e identificar la estructura de esta hormona, cuyo peso molecular se calcula que ésta entre 36 000 - 40 000 Daltons y sus propiedades inmunológicas y biológicas son similares a las de la hormona luteinizante hipofisaria (LH) ya que 97 de sus 145 aminoácidos son similares. Su punto isoeléctrico es de

4.5 (Uzandizaga and De la Fuente 1998) y se sintetiza en ribosomas de la membrana celular de los sincitiotrofoblastos placentarios, es introducida en el Retículo Endoplasmático Rugoso donde el sincitio es el principal regulador de transporte y sitio de síntesis de las hormonas placentarias (Cardellà and Hernández 1999).

El patrón de secreción de hCG es diferente al de cualquier otra hormona placentaria. Sus niveles aumentan rápidamente alcanzando un pico alrededor de la semana 9-10 para descender luego rápidamente permaneciendo a niveles bajos durante el segundo y tercer trimestres del embarazo. Esto se debe a que su acción se ejerce al principio del embarazo. Tiene una acción luteotrófica, es decir que estimula la producción de progesterona en el cuerpo lúteo. Así, si existe hCG el cuerpo lúteo permanece activo a partir del día 14 postovulación, consiguiéndose que permanezca activo produciendo progesterona hasta el momento en que la placenta ya sea capaz de sintetizar su propia progesterona, lo que ocurre a partir de la semana 9. Esto se debe a que la progesterona es esencial para que el embarazo progrese adecuadamente.

La hCG presenta dos subunidades (α y β) con unión no covalente (Cardellà and Hernández 1999) que se traducen en ARN separados. En el primer trimestre de la gestación el ARNm sintetiza 6 veces más subunidad α que β , mientras que una vez superadas las 37 semanas de amenorrea, elabora 8 veces menos cantidad de subunidad α y cantidades mínimas de subunidad β . La disponibilidad ilimitada de cadena β explica también la disminución de la hCG circundante, junto con el aumento de la subunidad α libre después del primer trimestre de embarazo (Uzandizaga and De la Fuente 1998).

En la orina, las subunidades α y β están presentes en concentraciones elevadas, junto con la hGC intacta o completa. La mayor parte de la hGC purificada es heterogénea, tanto en su contenido de hidratos de carbono como secreciones de aminoácidos hecho que se piensa que esté en relación con ciertas proteínas presentes en sangre y en la orina. La subunidad α es común a otras hormonas hipofisarias como la LH (hormona luteinizante), con la que comparte funciones, la misma contiene 92 aminoácidos y un peso molecular de 16 000 Daltons aproximadamente. En cambio, la subunidad β es exclusiva de origen coriónico y por

tanto sólo puede detectarse en el embarazo (sólo existe una posibilidad excepcional en la que podría encontrarse fuera del embarazo en caso de existir un coriocarcinoma) (Uzandizaga and De la Fuente 1998).

La subunidad β es la que proporciona especificidad para cada una de las hormonas y es la responsable de las propiedades biológicas de estas. La subunidad β hCG tiene un peso molecular de 22 200 Daltons y está compuesta por 145 aminoácidos. Los 28 a 30 aminoácidos terminales del extremo carboxilo son los que la diferencian de la subunidad β de la hormona LH (Uzandizaga and De la Fuente 1998).

Utilizando la subunidad β en radioinmunoensayos (RIA) de hGC se han descubierto niveles cuantitativos de hGC en fases tan temprana como 8 días después de la concepción, los mismos aumentan con rapidez hasta alcanzar su máximo valor en el primer trimestre de embarazo, los cuales pueden contribuir a provocar náuseas y vómitos asociados al embarazo (Llusia and Núñez 1984). No se observa en sangre materna antes de la implantación, sino uno o dos días después (10 días después de la ovulación). Por lo tanto empleando RIA sensible para la subunidad β se descubren valores de hGC poco después de la implantación del blastocisto. La síntesis máxima de hGC por la célula se logra entre las 4 a 10 semanas de gestación hasta 80 días después de la fertilización. Desde la semana 10 a la semana 18 de embarazo, los niveles séricos de hGC comienzan a disminuir con lentitud a final del segundo trimestre, se observa una caída de su concentración (en un 90 %) y no se recupera a lo largo del embarazo con el consiguiente descenso en la última mitad del proceso gestacionario (Cole 2002; Rodríguez, D'espaux et al. 2004).

Específicamente en la primera parte del embarazo, los valores plasmáticos de hGC aumentan rápidamente con un tiempo de duplicación de 1,7 a 2 por días y alcanzan una concentración sérica de aproximadamente 100 mUI/ml al cabo de unos 16 días de gestación. Los valores plasmáticos de hGC varían entre 70 000 y 200 000 mUI/ml entre los días 40 y 90 del embarazo, pero caen hasta una meseta de 20 000 mUI/ml. O sea los valores esperados en el período de gestación son los siguientes (Alonso and Sánchez 2005).

Tabla No. I. Valores plasmáticos de hCG con respecto al tiempo de gestación.

SEMANAS DE EMBARAZO	RANGO de hCG mUI/ml
3 – 4	9 – 130
4 – 5	75 – 2 600
5 – 6	850 – 20 800
6 – 7	4 000 – 100 200
7 – 12	11 500 – 289 000
12 – 16	18 300 – 137 000
16 – 29	1 400 – 53 000
29 – 41	940 – 60 000

El método mas preciso para diagnosticar el embarazo es el descubrir hGC en muestras de suero o en orina materna. Se dispone de diversos tipos de pruebas de embarazo; la más precisa y sensible es la RIA para la subunidad β de hGC y la estimación de radiorreceptores (RRA) para hGC. La técnica de RIA para la subunidad β hGC puede efectuarse en una a dos horas con una sensibilidad de 5 – 40 mUI/ml y la técnica de RRA para hGC tiene sensibilidad de 200 mUI/ml. Por lo tanto utilizando los RIA se pueden descubrir el embarazo antes que falte el período menstrual y si se utiliza la RRA se descubre el embarazo entre los días 14 a 17 después de la concepción. Las técnicas más utilizadas son las de inhibición de aglutinación (AIT) que no pueden descubrir el embarazo tan rápido pues tienen sensibilidad de 750 – 1000 mUI/ml, son menos sensibles, pero son perfectamente adecuadas para el diagnostico de embarazo (Alonso and Sánchez 2005).

2.1.2 Papel fisiológico de la hCG.

Su acción biológica más importante es la estimulación de la esteroidogénesis del cuerpo amarillo o cuerpo luteo. En mujeres con ciclos normales, la administración exógena de hGC (empezando poco después de iniciada la ovulación), prolongará la fase luteínica. Está confirmada la idea de que pequeñas cantidades de hGC, que se descubren al comienzo del embarazo son necesarias para conservar el cuerpo amarillo temprano y evitar el inicio del

siguiente periodo menstrual, manteniendo así la fase secretora del endometrio imprescindible para la nutrición del embrión durante las primeras etapas del desarrollo. Asegura la estimulación continua del cuerpo amarillo hasta que la placenta comienza a producir progesterona. El cuerpo amarillo humano posee receptores específicos de gran afinidad para la hGC (Alonso and Sánchez 2005).

La importancia de detectar la hormona hCG, junto con los datos clínicos de cada paciente, permite valorar diferentes criterios diagnósticos. A continuación se mencionaran algunos procesos relacionados con el período de gestación:

- Embarazo ectópico.
- Aborto espontáneo.
- Evaluación de tumores trofoblásticos (mola hidatiforme, coriocarcinoma).
- Evaluación de tumores testiculares.
- Producción ectópica de hCG en tumores no trofoblásticos.

2.1.3 Biodegradación de la hCG.

La hCG es sintetizada normalmente por el tejido trofoblástico y su tiempo de vida media es de 40 horas. Su desactivación ocurre por ruptura y disociación.

El primer paso de desactivación o ruptura de la hormona consiste en la pérdida de la unión entre los aminoácidos 44-45 o 47-48, el cual altera la estructura terciaria de la proteína y disminuye su actividad biológica. El tiempo de vida media de esta estructura es menos de 11 horas. Este fragmento de hCG rota puede además perder el resto carboxi terminal (COOH) de la subunidad β incluso antes de la disociación de la hormona en sus subunidades, dando un fragmento con peso molecular de 26 500 Dalton. Dicha disociación aporta subunidades α libres, subunidades β libres intactas y subunidades β libres rotas. La subunidad α libre se convierte en subunidades largas y regulares con un peso molecular de 16 000 y 14 500 Dalton respectivamente. Cada subunidad tiene un tiempo de vida media de 1,5 h. Esta subunidad posteriormente es degradada por la pérdida del extremo carboxi terminal (COOH) dando un fragmento de masa molecular de 12 000 Dalton del cual se desconoce su tiempo de vida media. Finalmente este fragmento es degradado hasta el fragmento β -core que está formado por dos hebras peptídicas de la secuencia 6-40 y la 55-92, cuyo tiempo de vida

media es menor de 10 minutos y su peso molecular es de 9 000 Dalton (Gambino 1996). Estudios básicos realizados por Wehman et al (1990) han demostrado que dicho fragmento es un producto de la degradación a nivel renal de la subunidad β -hCG, aunque puede originarse de la placenta o por ruptura en la circulación (Boime, Boothby et al. 1982; Peter, Krxesicky et al. 1984). Es el fragmento más abundante en la orina de embarazadas y también aparece en orina de pacientes con enfermedades malignas y otros desórdenes benignos (Bidart and Bellet 1993).

Tanto la forma hCG nicked (clivada o rota), la subunidad β de hCG libre (nicked y no nicked), la subunidad α de hCG libre (regular y grande, hiperglicosilada), el fragmento beta core producto de la degradación terminal de hCG, la hCG hiperglicosilada (H-hCG) pueden estar presentes en la orina aunque algunas en menor proporción. La hCG nicked es una molécula con una única unión peptídica rota entre las posiciones 47 y 48 de la cadena polipeptídica de la subunidad β y menos frecuentemente entre las posiciones 43 y 44 o 44 y 45. Representa un 9% de hCG intacta en el primer trimestre de embarazo en suero (en promedio) alcanzando un 21% en el noveno mes (en promedio). La subunidad β libre de hCG (nicked y no nicked) presenta una proporción del 0,9% respecto al dímero y una forma hiperglicosilada grande (large free alfa) que contiene oligosacáridos más complejos. Esta composición previene su unión con la subunidad β para constituir el dímero. La hCG intacta como así también el péptido urinario β core fragment son más estables que la forma nicked, la subunidad β libre (nicked y no nicked). Las tres últimas incrementan su concentración en suero ya sea a temperatura ambiente como a 4 °C.

El fragmento Beta core, producto de la degradación urinaria de la subunidad β de hCG nicked es una pequeña molécula (PM: 9000) constituida por dos péptidos, residuos 6 a 40 y 55 a 92 de la subunidad β , unidos por cinco puentes de sulfuro. En el segundo mes de embarazo representa un 58% de hCG intacta en orina elevándose a un 305% en el noveno mes (en promedio). En suero es prácticamente indetectable (menos de 0,3% de hCG intacta) sugiriendo un origen renal.

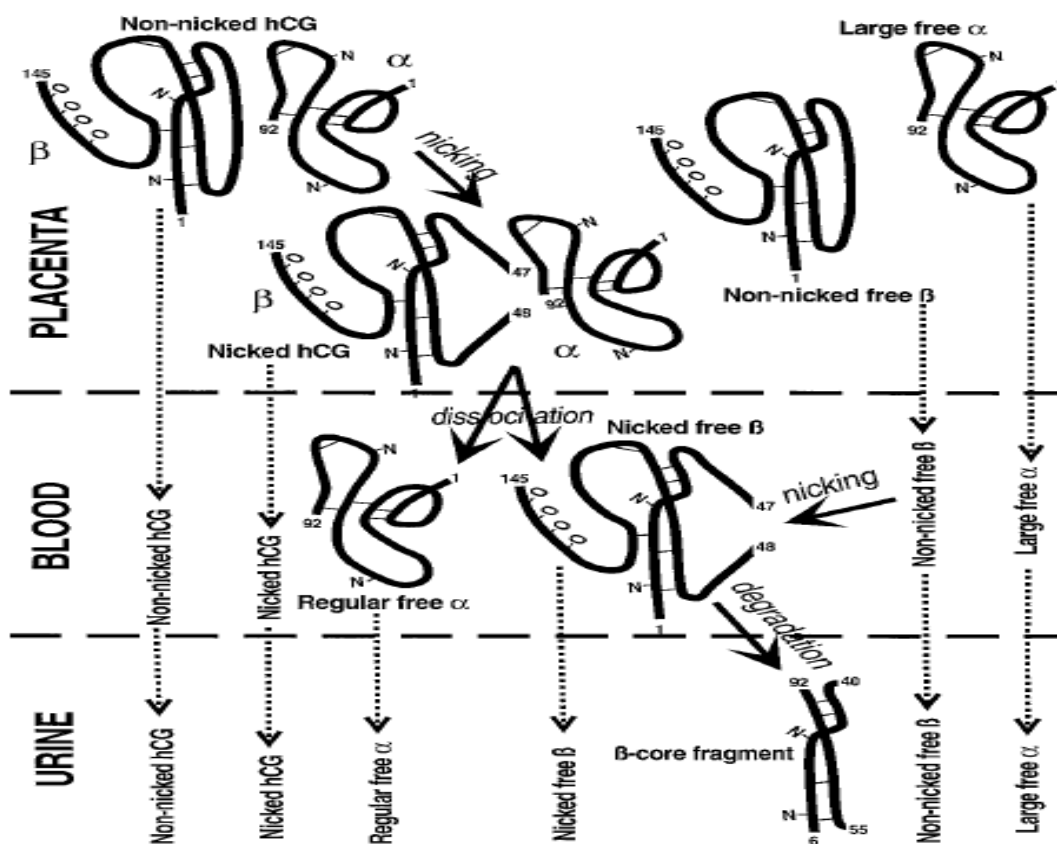


Figura # 1. La Hormona Gonadotropina coriónica humana y sus productos de degradación en suero, orina y placenta.

Tabla No. II: Principales epítomos presentes en la molécula de hCG, empleados en la generación de inmunoensayos (Cole, Seifer et al. 1993).

Componente	αβ	α1	β1	β2	β3	β4
hCG intacta	+	+	+	+	+	+
hCG rota	0	+	+	+	+	+
β libre	0	0	+	+	+	+
β core	0	0	+	+	0	0
α libre	0	+	0	0	0	0

Kardana y Cole (1990) sugieren que las formas degradadas de subunidades β libres cortadas se incorporan en un complejo que es enmascarado inmunológicamente y no es detectado (Kardana and Cole 1990).

La identidad de las enzimas que rompen la hCG "in vivo" es aún desconocida, aunque la elasta y la collagenasa tipo II provocan cortes en la región β 44-49. La hCG rota (que ha perdido el extremo -COOH- terminal de la cadena β -hCG) parece ser más inestable comparada con la hCG intacta y se disocia rápidamente en las subunidades α y β . Esta forma particular aparece también en las preparaciones standard, tiene una actividad biológica reducida y es reconocida por ciertos AcM (Birken, Gawinowicz et al. 1991).

Como la hCG rota aparece tanto en suero como en orina, parece ser que la ruptura ocurre dentro de la célula trofoblástica al tiempo de su secreción a circulación. La elastasa leucocitaria es una proteasa que rompe después de glicina, valína o leucina dentro de regiones hidrofóbicas expuestas de las proteínas. En la hCG los cortes son val-leu (44-45) y gly-val (47-48) (Cole, Kardana et al. 1991a) .

La ruptura ocurre dentro de un lazo formado por la unión de dos cisteínas por puentes disulfuro. Dicho lazo tiene una región hidrofílica y otra hidrofóbica, siendo entonces un buen sustrato para la elastasa. Los leucocitos y la enzima están presentes en altas concentraciones en la interfase trofoblástica miometral y en la interfase del tejido de los coriocarcinomas. Se ha demostrado por Birken y colaboradores que la HLE (elastasa humana) es la responsable de la ruptura de 44-45 pero la identidad de la enzima que corta en 47-48 es desconocida (Birken, Gawinowicz et al. 1991) (Figura # 2).

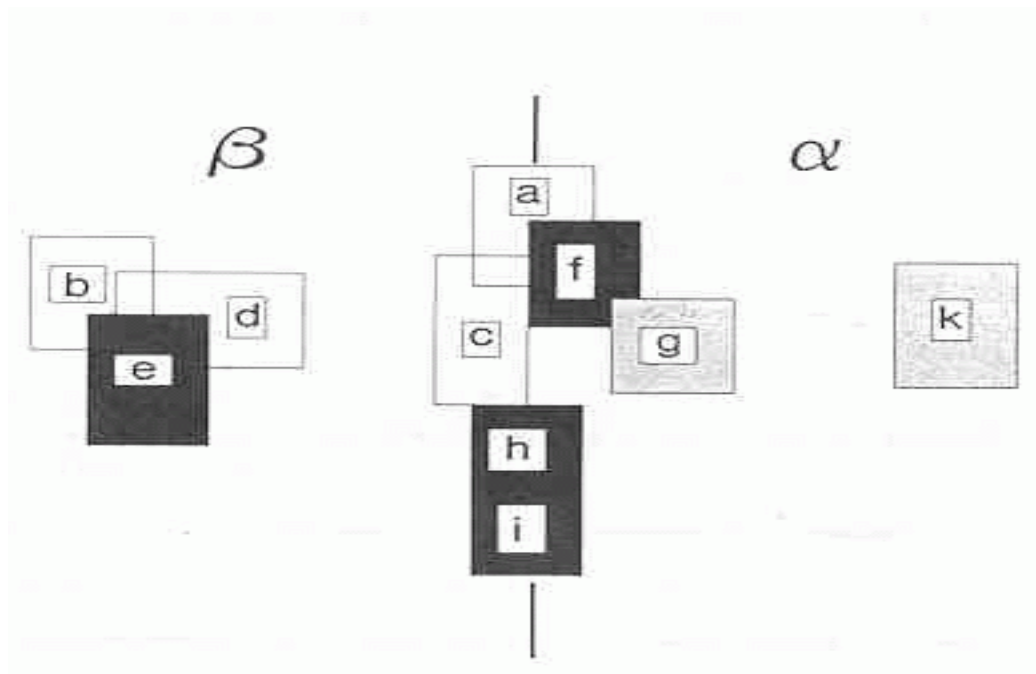


Figura # 2. Epítopes detectados en cada una de las subunidades de la hCG. Cuadros blancos; epítopes específicos, cuadros grises; epítopes presentes en las restantes glicohormonas hipofisiarias, cuadros negros; epítopes crosreaccionantes con la LH.

2.1.4 Hormona hCG Hiperglicosilada.

El descubrimiento de la forma hiperglicosilada de la hormona gonadotropina coriónica humana (*Hyperglycosylated Gonadotrophin hormone*), conocida también como antígeno trofoblástico invasivo (ITA) o H-hCG ha marcado un significativo interés por mejorar el diagnóstico del embarazo temprano (Weinans, Sancken et al. 2005; Cole and Sutton 2004). Es la forma predominante en las primeras etapas del proceso gestacionario (durante y 2 semanas después de la implantación), debido a que su síntesis que es producida por las células del citotrofoblasto. Desempeña una función autocrina al actuar sobre las células que la producen directamente, (implantación del blastocisto), tiene actividad biológica mínima en promocionar la producción de progesterona, participa como un promotor en la invasión de tumor o tumorigénesis en los coriocarcinomas. Las mediciones de H-hCG son importantes para la implantación humana próspera en prevenir la pérdida del embarazo temprano, aborto espontáneo, para pronosticar preeclampsia en el embarazo, o como un indicador de

tumor para las enfermedades de trofoblasticas (Cole, Dai et al. 2005; Cole, Butler et al. 2006; Cole 2007).

2.1.5 Inmunoensayos rápidos y simples aplicados en el diagnóstico del embarazo.

Las pruebas rápidas de embarazo en orina se basan en la identificación de hCG, pero no la cuantifican. Aunque la mayoría de las pruebas tienen gran sensibilidad, su especificidad sí varía, por lo que se recomienda que la paciente se presente después de 8 días de retraso de su periodo menstrual (Cole 2002). La orina puede ser, cualquiera emitida durante el día, pero debe ser preferentemente la primera de la mañana por su mayor concentración por lo que es actualmente un método bien establecido para la confirmación del embarazo. Su concentración se incrementa de forma exponencial con los días de gestación alcanzando su mayor pico durante el primer trimestre, convirtiéndose así en un excelente marcador diagnóstico precoz del embarazo (Braunstein, Rasor et al. 1976; Husa 1981).

El uso de una prueba analítica para el diagnóstico temprano del embarazo, detectando niveles de hCG tanto en suero como en orina, tiene además como ventaja lograr un mejor control de la exposición a factores o agentes teratogénicos (Seppälä and Purhonen 1987).

La determinación de los valores de hCG es usada en múltiples formas y estos pueden ser correlacionados con la edad gestacional. No obstante esto depende de un periodo menstrual regular y de los intervalos de referencia para cada periodo de gestación.

El anticuerpo utilizado en los primeros inmunoensayos para la detección de hCG, que data de la década del 60, reconocía epítopes en la subunidad α y β por lo que reaccionaba cruzadamente con la LH y la Hormona folículo estimulante FSH, por lo que no eran inmunoensayos sensibles y específicos. Esto hizo pensar inicialmente que la alta especificidad y sensibilidad podría lograrse si los anticuerpos no se unieran a ningún epítope de la subunidad α , es decir solo se unieran a epítopes de la subunidad β (Gambino 1996). Los juegos diagnósticos desarrollados actualmente son en su mayoría β específicos para prevenir la reactividad cruzada con otras hormonas glicoprotéicas que tienen semejante la subunidad α .

La variabilidad en el ensayo también puede aparecer como resultado de la especificidad de un anticuerpo por un epítope específico de la hormona. Así existen pruebas analíticas cuyos anticuerpos reconocen la molécula de hCG intacta, la subunidad β libre o fragmentos

contenidos dentro de la subunidad β . Se ha demostrado que esta variación en la especificidad del ligando puede conducir a resultados diferentes. Hay (1985) plantea que estas diferencias disminuyen con la edad gestacional ya que el trofoblasto inmaduro sintetiza predominantemente subunidades β libres mientras que el citotrofoblasto maduro produce suficientes unidades α para unirse a la subunidad β y formar la molécula intacta (Hay 1985). En la actualidad se han desarrollado diferentes tipos de inmunoensayos para el diagnóstico precoz del embarazo los que en dependencia de la sensibilidad alcanzada, detectan niveles tan bajos que oscilan entre 20-50 mUI/ml de hCG, las cuales se alcanzan generalmente un día antes del tiempo esperado de amenorrea o "período". Dentro de estos sistemas diagnósticos se encuentran desde los más sensibles como el Radioinmunoensayo (RIA), hasta el uso de técnicas rápidas (10 minutos o menos para obtener el resultado) como **HeberFast Line® Embarazo**.

2.1.5.1 Breve descripción del funcionamiento del sistema

HeberFast Line® Embarazo es un ensayo cualitativo rápido, de un paso, para la detección de la hormona Gonadotropina Coriónica humana (hCG) en orina. Basado en la tecnología de la tira cromatográfica y en el uso de anticuerpos monoclonales específicos contra la hCG y oro coloidal como marcador. La prueba detecta sólo la hormona intacta, en concentraciones de 100 UI/L o superiores, por lo que es capaz de detectar un posible embarazo, a partir del primer día de amenorrea, en un tiempo de 5 a 10 minutos.

Cada determinación está compuesta por una tira de nitrocelulosa (NC), con una porosidad que permite el flujo lateral de sustancias, la cual se encuentra adherida a una superficie de plástico que le confiere rigidez a la misma. Al introducir el extremo adecuado de la tira reactiva en la orina, esta comienza a desplazarse en su interior reaccionando la hCG con el conjugado de anticuerpo monoclonal marcado con oro coloidal, formándose un complejo antígeno-anticuerpo. Este inmunocomplejo se mueve hacia la ventana de resultados de la tira reactiva y reacciona con un segundo anticuerpo monoclonal anti-hCG fijado a la fase sólida, formándose una primera línea horizontal coloreada (LINEA POSITIVA). En ausencia de hCG en la muestra de orina esta LINEA POSITIVA no se forma. Al mismo tiempo el exceso de conjugado, no atrapado en la LINEA POSITIVA, continúa moviéndose y es

capturado por una mezcla de anticuerpo policlonal anti – IgG de ratón con moléculas de un polímero específico a partículas de oro (Poli L-lisina), fijados a la fase sólida, formándose una segunda línea horizontal coloreada (LINEA CONTROL) como demostración de que los reactivos han funcionado correctamente. La LINEA CONTROL se forma tanto con las muestras que contengan hCG como con las negativas. Si esta línea no aparece el ensayo se considera no válido (ver figura # 3).

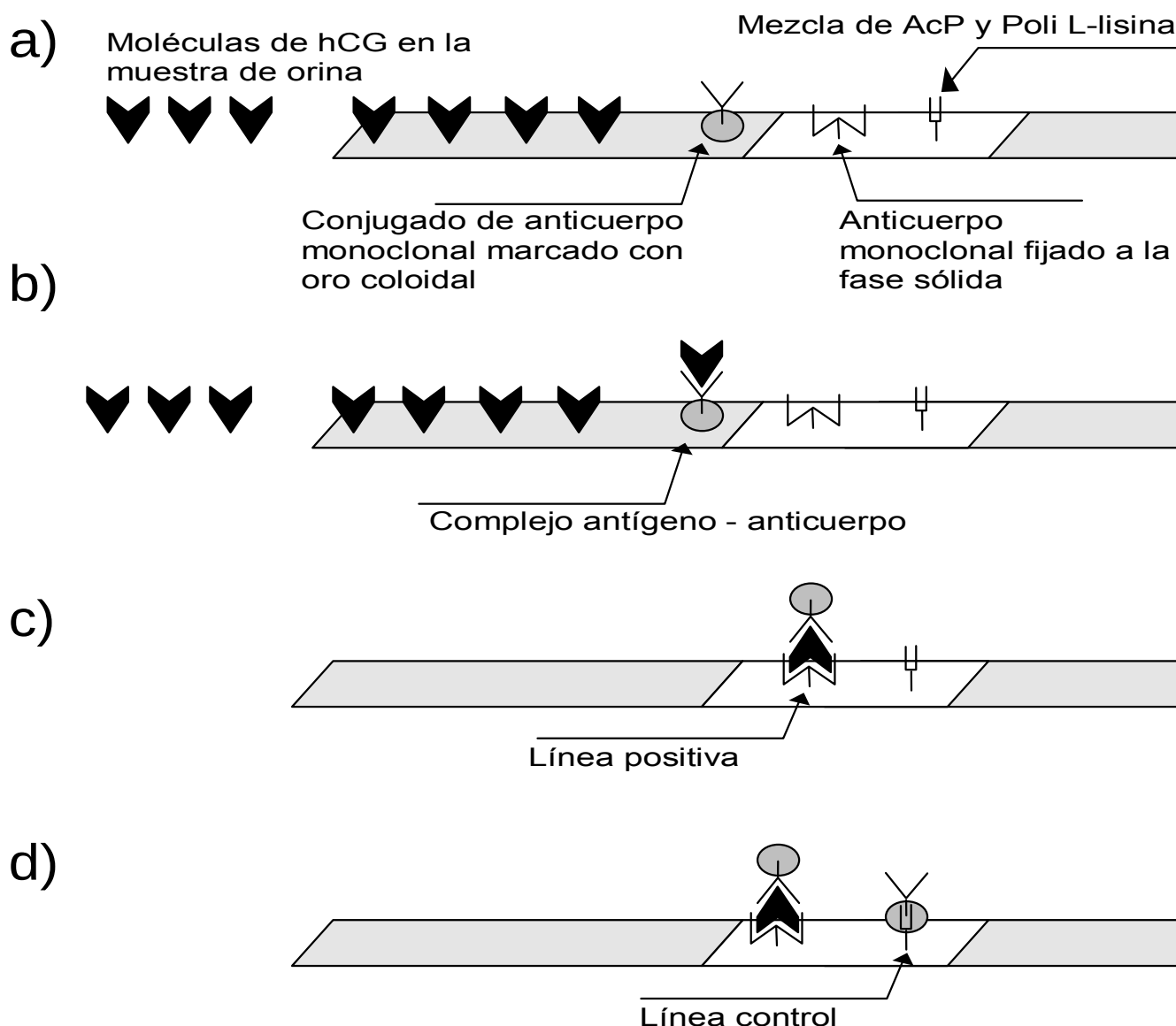


Figura # 3. Representación esquemática del principio de funcionamiento de la prueba HeberFast Line® Embarazo.

Este sistema diagnóstico incorpora un formato simple que incluye la utilización de nuevas tecnologías de detección basadas en conjugados con marcadores de coloides metálicos, como el oro, de alta eficacia y estabilidad biológica, que suprimen procedimientos necesarios en conjugados enzimáticos, al no necesitar el paso de sustrato. Todas estas características generales le confieren a dicho sistema una gran importancia tanto económica como social.

Con el desarrollo y la aplicación de este tipo de inmunoensayos rápidos, se puede conocer de una forma muy sencilla, incluso por la propia interesada si está o no embarazada, con lo que se puede evitar el proceso de Regulación Menstrual, el cual puede acarrear complicaciones como:

1. En la mayoría de los casos el embrión es tan pequeño que es probable no se evacue en el primer raspado; se ha observado que el embarazo continúa en un porcentaje que varía entre 1-5 % de las pacientes atendidas (Ooi, Perkins et al. 1989)
2. La infección es un riesgo en todas las operaciones obstétricas.
3. Posibles traumas en el útero o en el cervix.
4. Si la aspiración es incompleta (restos) el sangrado puede continuar.
5. Desde el punto de vista económico el promedio de gastos por paciente es de 8,90 USD y en los casos de legrado uterino el gasto es de 17,66 USD por paciente.

En un estudio realizado se demostró que todas las pruebas existentes para la detección de hCG deben haber sido evaluadas antes de su comercialización por un gran número de usuarios. En la validación del ensayo se incluyen parámetros como especificidad, límite mínimo de detección, reactividad cruzada con otras hormonas o medicamentos, efecto de altas concentraciones, sensibilidad y estabilidad (Daviaud, Fournet et al. 1993).

2.1.6 Ventajas analíticas de los inmunoensayos sobre el diagnóstico clínico.

Se reporta que el diagnóstico clínico (tacto vaginal) solamente referido por el ginecólogo tiene una efectividad de un 85 %, con lo cual se señala que el diagnosticador clínico es muy subjetivo, ya que depende fundamentalmente de la experiencia del ginecólogo, máxime si las pacientes consultadas asisten con un proceso gestacionario muy temprano que dificulta aún más precisar el diagnóstico final (Price and Newman 1991). El número de pacientes reportados como positivos por la clínica (falsos embarazos), es un reflejo de la ineffectividad

del método de diagnóstico por tacto vaginal ejercido por el propio ginecólogo, el cual se basa fundamentalmente en el tiempo de amenorrea y en cambios morfológicos que ocurren en el cervix durante el proceso gestacionario, etc., que no siempre son fáciles de detectar y conllevan a múltiples equivocaciones producto de lo precoz del proceso en esta etapa. Asimismo existe un número de muestras positivas al proceso gestacionario que se le escapan al diagnóstico clínico y a la técnica de la ecografía abdominal (ultrasonido).

Aproximadamente 30 de cada 100 pacientes diagnosticadas clínicamente (ginecólogo) como positivas de gestación, acuden al proceso de regulación menstrual (RM) sin estar realmente embarazadas (Nieto and Pérez 1988.; Torres and Muñoz 1998). Es en estos casos la RM un evento totalmente innecesario que conlleva a molestias, traumas e infecciones a las pacientes, lo cual repercute sobre el individuo y la sociedad en su conjunto (Valero 1987).

2.1.7 Relación de la hCG con otros procesos como el aborto espontáneo y los embarazos ectópicos, molas hidatiformes y coriocarcinomas ováricos.

La complicación más común durante el embarazo ocurre principalmente entre las semanas 1-13. La frecuencia de este suceso fue estudiada mediante determinación de hCG. Entre las embarazadas investigadas aproximadamente el 22 % de los abortos espontáneos ocurrieron antes que fueran clínicamente reconocidos. Anormalmente, bajos niveles de hCG son observados en pacientes que abortan espontáneamente y determinaciones seriadas de hCG en suero con sonografía pueden ser usadas para el diagnóstico de este evento. La disminución o el lento incremento de los niveles de hCG en los primeros tiempos de embarazo puede indicar también la presencia de un embarazo ectópico. Durante los embarazos ectópicos suele detectarse en orina 1/40 de la hCG intacta que aparece en los embarazos normales; 1/30 de la subunidad β libre y 1/50-1/800 del fragmento β -core. Debido a la gran disminución que aparece en el fragmento β -core es el más útil para ser usado en un test para embarazo ectópico, incluso mucho mejor que la hCG intacta. Se le conoce como “el gran simulador”, debido a que clínicamente se manifiestan síntomas que enmascaran la presencia de un proceso gestacionario, por lo que es muy difícil de diagnosticar clínicamente.

La no-detección a tiempo de un embarazo ectópico puede incidir directamente en la propia vida de la progenitora. En Cuba el 11,8 % de las muertes maternas se deben

fundamentalmente a embarazos ectópicos, los cuales ocurren con una frecuencia del 1 % de todos los embarazos detectados (Bidart and Bellet 1993). De ahí la importancia que reviste el empleo de un sistema analítico rápido y sencillo de detección de hCG en muestras de suero u orina en las unidades asistenciales de salud.

También se reporta la presencia de esta hormona asociada a coriocarcinomas ováricos, molas hidatiformes y tumores testiculares, por lo que se ha utilizado también para el diagnóstico y monitoreo de estas anomalías (Monteiro, Barker et al. 1982; Iles, Purkis et al. 1990) **(Tabla No. III)**. En un estudio realizado por Böttger, se utilizaron los ensayos de hCG en clínicas oncológicas para monitorear pacientes con tumores productores de esta hormona (coriocarcinomas, molas hidatiformes y tumores testiculares). Como se esperaba la dinámica de los valores de hCG se correlacionan excelentemente con el curso de la enfermedad, indicándose así la eficacia o no de la terapia (Cole, Kardana et al. 1991b). Otras investigaciones han demostrado que los niveles anormalmente elevados del fragmento β -core y la molécula de hCG intacta, asociados con niveles bajos de alfa feto proteína (AFP), están presentes en embarazadas cuyo feto presenta anomalías cromosómicas como son las conocidas trisomías 18 y 21 (Síndrome de Down) (Torres and Rosquete 1994; Gambino 1996).

En el suero de mujeres con un embarazo normal suelen aparecer hCG intacta y subunidad β libre mientras que en la orina aparecen hCG intacta, subunidad β libre y fragmento β -core.

Cáncer ginecológico: La concentración del fragmento β -core en orina aumenta de forma proporcional a la masa del tumor. El fragmento β -core de la LH es muy semejante al de la hCG, así la orina de mujeres posmenopáusicas puede arrojar resultados falsos positivos.

Cáncer testicular: La hCG rota es abundante en la orina de estos pacientes pero no en el suero. La ruptura altera la reactividad inmunológica de la hCG porque esta destruye epítopes conformacionales solo presentes en la hormona intacta (Gambino 1996).

Tabla No. III: Principales metabolitos de la hormona hCG presentes en suero y orina asociados con diferentes procesos.

	Suero			Orina	
	hCG intacta	β -hCG libre	α -hCG libre	hCG intacta	hCG β -cf.
Estado Clínico					
Emb. normal	+			++	
Emb. ectópico	++			+	+
♦ Desórdenes genéticos.					
Trisomías 21	+	++			
Trisomías 18		+	+		
♦ Enfermedades Trofoblásticas.					
Molas y coriocarcinomas.	++	++			
Cáncer testicular.				+	++
Seminoma.	+	++			
No Seminoma.	++	+			

β -cf = fragmento β -core

2.1.8 Justificación del Uso de Diagnosticadores de Embarazo en las consultas de Regulación Menstrual y en Cuerpo de Guardia para manejo del Embarazo Ectópico.

Aunque la definición varía de unos países a otros, la expresión «regulación menstrual» se aplica por lo general a la evacuación temprana del útero, en caso de retraso de la regla, a menudo sin confirmar la gestación mediante una prueba de embarazo (Geneva 2003).

En la aspiración endouterina se extrae el contenido del útero aplicando succión a través de una cánula que se introduce en el orificio cervical hacia la cavidad del útero. Otros términos para la aspiración endouterina son: aborto por succión, curetaje por vacío, curetaje por succión, regulación menstrual (RM) y mini-succión (Goldberg, Gillian et al. 2004).

Sin embargo, como todo proceder invasivo, que trae aparejado un riesgo importante de infección, debe ser tomado en consideración por los administradores de programas, las necesidades específicas de las mujeres en situaciones de aborto inducido o de RM a fin de

ofrecerles un asesoramiento y servicios realmente eficaces (Goldberg, Gillian et al. 2004; Geneva 2003).

El Embarazo Ectópico (EE) es la implantación del huevo fecundado en cualquier parte de la cavidad pelviana o abdominal que no sea la cavidad uterina. En un inicio todos los embarazos comienzan siendo ectópicos, ya que la fecundación se produce en el tercio externo de la trompa. Aproximadamente el 2 % de todos los embarazos se desarrollan fuera del útero (Rigol 2004).

La realización de una prueba de diagnóstico de embarazo, mediante la determinación de la gonadotropina coriónica humana (hCG) en orina previo a la Regulación Menstrual o a la laparoscopia en los casos de sospecha de ectópico es un método sencillo y una alternativa para minimizar los riesgos de una interrupción de embarazo, si se tiene en cuenta que:

- La detección de la hormona hCG en muestras de suero y en orina es actualmente un método bien establecido para la confirmación bioquímica del embarazo.
- La hCG, comienza a ser secretada por las células del sincitiotrofoblasto a los 7 días de haber ocurrido la concepción, desplegando su principal función sobre el cuerpo amarillo para incrementar la secreción de las hormonas ováricas; estrógeno y progesterona.
- La literatura reporta que entre el 27,7 y el 33 % de las pacientes que acuden a la consulta de RM no están embarazadas. O sea sólo se trata de un período retrasado (Miller and Fortney 1996; Åhman, Elisabeth et al. 2002).
- La RM es un evento que puede traer múltiples complicaciones como: La infección, riesgo latente en todas las operaciones obstétricas describiéndose en la literatura que más de la mitad de las pacientes con infertilidad de causa tubaria se sometieron a aborto previo, invocándose una infección previa subclínica que pasó desapercibida. Existen además otras complicaciones como traumas en el útero o en el cérvix.
- La continuación del embarazo (varía de 1 - 5%), sangramiento por aspiración incompleta, restos postregulación si no se estima adecuadamente la amenorrea, entre otras (Miller and Fortney 1996).

- Este proceder nos permite diagnosticar precozmente el Embarazo Ectópico antes de complicarse con la rotura pudiendo provocar la muerte de inmediato, esto es posible por la especificidad en la detección de la fracción β de la hCG (Nurit, Imbar et al. 1984; Braunstein, Rasor et al. 1986; Husa 1991; Sugantha, Webster et al. 2000 ; Chian, Buckett et al. 2000).

Nuestro país está enfrascado en mejorar las condiciones de los servicios de aborto y perfeccionar la técnica empleada para minimizar los riesgos y de esto no quedan excluidas las consultas de RM, además en Cuba, el aborto, incluyendo las fallecidas por Embarazo Ectópico es la primera causa de Muerte Materna Directa en el primer semestre del 2006.

2.2 Enfermedad Celíaca

La enfermedad celíaca (EC), antes considerada una entidad rara de la edad pediátrica, se ha convertido en un tema de gran interés para la ciencia y la salud pública mundial. Los conocimientos científicos obtenidos en los últimos años han permitido desarrollar nuevas herramientas para su diagnóstico y manejo, y han sentado las bases para futuras modalidades terapéuticas. Los estudios epidemiológicos indican que la prevalencia de este trastorno puede llegar hasta el 1 % de la población en muchos países.

La EC, además de ser un importante problema de salud, constituye un interesante modelo de enfermedad autoinmunitaria. Es tal vez el único ejemplo de trastorno autoinmunitario al cual se le conoce tanto su base genética principal como el factor ambiental que lo desencadena y, a diferencia de otras enfermedades autoinmunitarias, el tratamiento disponible es altamente efectivo en la gran mayoría de los pacientes.

La prevalencia de la EC en Cuba no se conoce y la mayoría de los pacientes no saben que la padecen. Esto se debe, entre otros factores, a que es considerada una entidad rara en la cual no se piensa con frecuencia, principalmente en la población adulta, y a que tampoco se cuenta con las modernas herramientas que existen para su diagnóstico. Por otra parte, muchos pacientes pueden tener presentaciones atípicas que se alejan del cuadro tradicional descrito en los libros de texto. Sin embargo, esta situación puede cambiar. El Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti-Spiritus (CIGB.SS) produce un kit para el diagnóstico de la celiaquía que se basa en la detección de anticuerpos anti-transglutaminasa

tisular en la sangre de los pacientes. Es una prueba cualitativa rápida con la que se obtiene el resultado en menos de 15 minutos. Lo más interesante es que puede ser realizada por el médico en su consultorio o en cualquier otro lugar pues no requiere ningún tipo de equipamiento. El resultado positivo de esta prueba no es definitivo para el diagnóstico de la celiaquía pues la prueba confirmatoria sigue siendo la biopsia intestinal, no obstante, sí nos indica quienes deben ser sometidos al caro, molesto y complicado diagnóstico por biopsia endoscópica. Por tanto, es una prueba ideal para hacer pesquisa activa dirigida a grupos de alto riesgo como pueden ser los parientes de primer grado de individuos enfermos o aquellas personas que tengan una sintomatología sugestiva de celiaquía. La detección de anticuerpos anti-transglutaminasa tisular en los pacientes en riesgo constituye una indicación para realizar la endoscopia con biopsia intestinal que confirme el diagnóstico.

Para propiciar un uso correcto de esta nueva herramienta diagnóstica es imprescindible que los médicos tengan los conocimientos básicos sobre la enfermedad y conozcan las tendencias actuales sobre su diagnóstico y tratamiento. En caso contrario, el uso inadecuado de este diagnosticador puede traer consigo un mal manejo del paciente y provocar inconvenientes, principalmente debido a un sobrediagnóstico.

La enfermedad celiaca, también conocida como celiaquía o sprue, es un trastorno inflamatorio autoinmunitario de la mucosa intestinal que se desencadena, en personas genéticamente susceptibles, luego de la ingestión de proteínas contenidas en el trigo, la avena o el centeno (Briani, Samaroo et al. 2008). Desde el punto de vista histopatológico se caracteriza por un infiltrado inflamatorio en la mucosa del intestino delgado que se acompaña de una atrofia de las vellosidades y una hipertrofia de las criptas. Clínicamente se expresa, en su forma clásica, como un síndrome de malabsorción, principalmente en niños que suelen mostrar un retardo en el crecimiento, aunque tiene otras formas de presentación menos dramáticas. Si el paciente se somete a una dieta libre de gluten, en días o semanas tiene una mejoría espectacular tanto clínica como histológica. El tratamiento consiste en una dieta libre de gluten por toda la vida.

Las primeras descripciones sobre síntomas sugerentes de enfermedad celiaca se remontan a la antigua Grecia, pero no fue hasta el siglo XIX que Samuel Gee definió los síntomas de la enfermedad y ofreció algunas sugerencias para su tratamiento. Sin embargo, fue el médico inglés, Willem Karel Dicke, en la década de 1940, el primero en demostrar la efectividad de

la eliminación del trigo en la dieta. John J. Paulley fue el primero en describir los daños histológicos de la enfermedad (Briani, Samaroo et al. 2008). Otros avances importantes se produjeron en las décadas de los 80 y 90 y serán tratados más adelante.

2.2.1 Epidemiología

Se estima que la prevalencia de la EC puede llegar hasta el 1% de la población en los Estados Unidos de América y que algo similar, con ligeras variaciones, puede ocurrir en otros países (Green, Stavropoulos et al. 2001). No se limita, como se pensó en un momento, a la población de origen europeo o caucásica sino que se ha detectado en Asia, África y América Latina. La mayoría de las personas afectadas no han sido diagnosticadas y por tanto, no conocen su condición de pacientes celíacos, aunque esto está cambiando en los últimos años (Green and Cellier 2007).

2.2.2 Presentación clínica

La EC se presenta clínicamente de diversas formas. En los niños es frecuente el retardo en el crecimiento, la baja estatura, la pubertad tardía, las diarreas crónicas, la distensión abdominal y la anemia. En los adultos la sintomatología típica incluye diarreas crónicas, distensión y dolor abdominal, debilidad y malabsorción. Muchos pacientes pueden presentarse con síntomas extraintestinales como dermatitis herpetiforme, anemia, osteoporosis, infertilidad, problemas neurológicos y aftas bucales a repetición, entre otros. Por todo esto, ya algunos la consideran una enfermedad multisistémica y no un trastorno exclusivo de los gastroenterólogos. Muchos pacientes reciben previamente el diagnóstico de síndrome de intestino irritable. Otros, después de mucho tiempo con síntomas y visitas a centros de salud son sometidos a intervenciones quirúrgicas hasta que finalmente se les realiza el diagnóstico de EC (Rampertab, Pooran et al. 2006). El médico debe pensar más a menudo en el posible diagnóstico de EC en pacientes con la sintomatología antes mencionada, principalmente si existen padres o hermanos con el mismo trastorno.

2.2.3 Patogénesis

Para que un individuo desarrolle la EC deben cumplirse, al menos, dos condiciones: tener la susceptibilidad genética, e ingerir gluten. Los principales genes involucrados en la

patogénesis de la celiaquía pertenecen al complejo principal de histocompatibilidad (HLA). Prácticamente todos los individuos que padecen la enfermedad expresan las variantes génicas de HLA-DQ2 y HLA-DQ8 (Sollid and Lie 2005). Sin embargo, no todos los individuos que expresan estos genes (que constituyen más del 30% de la población), padecen la enfermedad. Por tanto, es un factor genético necesario pero no suficiente. Los estudios genéticos con series de gemelos idénticos indican que la influencia del HLA no sobrepasa el 50% (Greco, Romino et al. 2002). Aunque se ha sugerido la influencia de otros genes, las evidencias no son tan fuertes ni definitivas para tenerlos en cuenta en la toma de decisiones clínicas.

El factor ambiental fundamental es la ingestión de gluten. El término gluten se refiere a todas las proteínas del grano de trigo las cuales se clasifican, en base a su solubilidad, en gliadinas y gluteninas. Las gliadinas constituyen la fracción del gluten que es soluble en alcohol y es la que contiene los péptidos tóxicos. Algunos de estos péptidos, especialmente uno de 33 aminoácidos, son muy resistentes a la digestión por enzimas, tanto a las enzimas pancreáticas como a las que están presentes en las microvellosidades de las células del epitelio intestinal. Este péptido puede permanecer sin ser digerido en la luz del intestino. Varios factores, que incluyen las infecciones intestinales, pueden alterar la permeabilidad del epitelio y permitir que este péptido lo atravesase y pase a la lámina propia. Una vez en la lámina propia, los residuos de glutamina del péptido son transformados en ácido glutámico por la acción de la enzima transglutaminasa tisular (TGt). Esta transformación enzimática aumenta la inmunogenicidad del péptido pues incrementa su afinidad por las moléculas de HLA-DQ2 y HLA-DQ8 que se expresan en la membrana de las células presentadoras de antígenos (CPA). Las CPA de la lámina propia endocitan y procesan estos péptidos y los presentan en su membrana, unidos a las moléculas de HLA previamente mencionadas (Briani, Samaroo et al. 2008). De esta forma, se presentan los péptidos a los linfocitos T CD4+, específicos para estos péptidos del gluten, los cuales son activados para proliferar y secretar linfocinas que activan la cascada inflamatoria y propician el reclutamiento de otras células de sistema inmunitario a la mucosa intestinal. Los linfocitos T CD4+ también pueden activar a los linfocitos B que secretan anticuerpos contra la TGt. Una vez activados, los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas que secretan grandes cantidades de anticuerpos contra la TGt los cuales servirán como marcadores para el diagnóstico de la

enfermedad (Green and Cellier 2007). Existen evidencias que indican que estos anticuerpos anti-transglutaminasa tisular también pueden ser patogénicos (Briani, Samaroo et al. 2008). Entre los leucocitos que son atraídos a la lámina propia de la mucosa se incluyen los linfocitos citotóxicos (CD8+) que, una vez activados, pueden infiltrar el epitelio y destruir las células del revestimiento epitelial de las vellosidades intestinales. Otras células inflamatorias producen metaloproteasas que causan destrucción de la mucosa intestinal (Briani, Samaroo et al. 2008).

Además de los mecanismos de inmunidad específica (adquirida) mencionados anteriormente, existen evidencias que otorgan un importante papel a la inmunidad innata en la patogenia de la EC. Los péptidos del gluten pueden inducir la secreción de interleucina 15 (IL-15) que da señales a los linfocitos intraepiteliales para que expresen receptores activadores de células NK (Natural Killers). Estos receptores interactúan con proteínas de stress expresadas en la membrana de las células absortivas del epitelio y provocan su destrucción.

Entre los factores ambientales también se han estudiado aquellos que pueden proteger a los individuos susceptibles de desarrollar la enfermedad. La lactancia materna resulta un elemento protector así como la introducción tardía del gluten en la dieta (Persson, Ivarsson et al. 2002) (Carlsson, Agardh et al. 2006)

2.2.4 Diagnóstico

Para confirmar el diagnóstico de la EC deben cumplirse dos premisas: 1) la presencia de los cambios histológicos típicos en la mucosa (linfocitosis intraepitelial, atrofia de las vellosidades e hipertrofia de las criptas) que se detectan por la biopsia de intestino delgado y 2) responder favorablemente a una dieta libre de gluten. Los cambios histológicos, aunque relativamente propios de la enfermedad, pueden presentarse en otros trastornos como la infestación por *Giardia*.

Uno de los descubrimientos científicos más importantes de los últimos años en relación con la EC fue la identificación de la transglutaminasa tisular como el principal autoantígeno de los llamados anticuerpos antiendomio (Dieterich, Ehnis et al. 1997); este hallazgo ha permitido el desarrollo de inmunoensayos que detectan la presencia de anticuerpos anti-transglutaminasa tisular en la sangre de los pacientes. Este tipo de prueba ha tenido un gran

impacto en el diagnóstico de la enfermedad celiaca por medio de la serología. Aunque aún no han sustituido a la biopsia como prueba de oro, los niveles de especificidad y sensibilidad de estos inmunoensayos sobrepasan el 90% (Fernández, Vivas et al. 2005). El algoritmo para el diagnóstico positivo de la enfermedad celiaca que sugiere la European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN) y la North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (NASPGHAN) consta de tres etapas y se basa, primeramente, en la indicación de la prueba serológica (determinación de la presencia de anticuerpos anti-transglutaminasa tisular en la sangre del paciente) a individuos con sospecha de celiaquía (Green and Cellier 2007). En caso que esta prueba confirme la presencia de anticuerpos anti-TGt, se indica una biopsia intestinal. Si la biopsia muestra las alteraciones histológicas típicas (Bonamico, Mariani et al. 2004; Ravelli, Bolognini et al. 2005), aún no se puede dar el diagnóstico positivo, entonces, se va al tercer paso, que consiste en indicar una dieta libre de gluten. El diagnóstico sólo se confirma si hay una respuesta favorable, comprobada por criterios clínicos o histológicos, a la dieta libre de gluten. La racionalidad detrás de este procedimiento radica en que el diagnóstico de celiaquía condena al paciente a una dieta libre de gluten para toda la vida y esto puede disminuir su calidad de vida de forma importante, en caso que sea un falso positivo.

El CIGB.SS produce un diagnosticador para detectar la presencia de anticuerpos anti-TGt en la sangre de los pacientes con enfermedad celiaca. Este diagnosticador fue desarrollado y validado por investigadores del CIGB-Habana y del CIGB-Sancti Spíritus (Galvan, Acevedo et al. 2008). El principio de la prueba consiste en un inmunoensayo cromatográfico que ha sido evaluado en varios escenarios (Cintado, Sorell et al. 2006; Galvan, Acevedo et al. 2008). El procedimiento es muy sencillo gracias a la presentación del diagnosticador en un estuche compacto que contiene los componentes necesarios para su desempeño. Se pincha el dedo del paciente empleando una lanceta estéril, depositándose la muestra de sangre en el orificio del casete plástico con la ayuda de un capilar heparinizado, y se hace la lectura de los resultados transcurridos los 15 minutos necesarios. Si se observa una sola línea, el ensayo se considera válido y negativo; si se observan dos líneas, el ensayo es válido y positivo; cualquier otra combinación es indicación que el ensayo no es válido. Para más información sobre este producto puede consultar el artículo que reporta su desarrollo y validación (Galvan, Acevedo et al. 2008).

2.2.5 Tratamiento

El único tratamiento aceptado actualmente para la enfermedad celiaca consiste en la indicación de una dieta libre de gluten. Deben evitarse los alimentos que contengan trigo, cebada y centeno. También debe administrarse un suplemento de vitaminas y minerales que supla las carencias de la dieta (Green and Cellier 2007). Se recomienda que se busque la presencia de osteoporosis que es muy común en estos pacientes. La eliminación del gluten de la dieta provoca una respuesta espectacular en días o semanas aunque la recuperación histológica demora un poco más (Leeds, Hopper et al. 2008). Actualmente se ensayan otras modalidades terapéuticas que están en fase de laboratorio e incluyen el uso de enzimas presentes en suplementos dietéticos capaces de digerir el péptido de 33 aminoácidos (Mitea, Moester et al. 2006; Siegel, Bethune et al. 2006). Otras, encaminadas a bloquear la interacción de los péptidos con las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés; Mayor Histocompatibility System), son menos atractivas por su potencial de efectos colaterales adversos.

Aproximadamente del 7 % al 30 % de los pacientes no responden a la dieta, en muchos casos debido a que esta no ha sido lo estricta que debía ser (Mitea, Moester et al. 2006). Una causa del fracaso terapéutico puede ser un diagnóstico erróneo (los síntomas del paciente obedecen a otras causas); en estos casos se recomienda determinar si el paciente es genéticamente susceptible (si expresa HLA-DQ2 o HLA-DQ8). La no expresión de estos genes tiene un valor predictivo negativo muy alto y prácticamente descarta la enfermedad. En la práctica, es bastante difícil que el paciente muestre una alta adherencia a la dieta libre de gluten por toda la vida, esto es aún más complejo en los países del tercer mundo que no cuentan con la variada oferta de alimentos libres de gluten que existe en los llamados países ricos. Aquellos pacientes más jóvenes y con una sintomatología más severa suelen ser los que mejor cumplen con la dieta (Mitea, Moester et al. 2006).

Las complicaciones de la EC incluyen los adenocarcinomas del intestino delgado; los linfomas no-Hodgkin, principalmente la enteropatía asociada al linfoma de células T; la enfermedad celiaca refractaria y las otras manifestaciones sistémicas, principalmente producto a las deficiencias nutricionales.

2.2.6 La enfermedad celiaca: un ejemplo de relación entre los conocimientos básicos y la práctica clínica.

La EC constituye un buen ejemplo de cómo los resultados que se obtienen en investigaciones básicas provocan cambios importantes en la práctica clínica. Como hemos explicado antes, se ha avanzado mucho en los conocimientos sobre la patogenia de esta enfermedad, principalmente con relación al papel que juegan algunas moléculas y células en el daño de la mucosa intestinal. Estos conocimientos también han servido de base para refinar las estrategias diagnósticas. Por ejemplo, el hecho de saber que casi todos los pacientes celíacos expresan los genes HLA-DQ2 y HLA-DQ8, permite utilizar esta información en la toma de decisiones cuando se trate de un diagnóstico dudoso pues el alto valor predictivo negativo que brinda, prácticamente excluye del diagnóstico a pacientes que no porten estos genes.

Sin dudas, el hallazgo científico más trascendental de los últimos años fue el descubrimiento de la transglutaminasa como autoantígeno de la celiaquía. A partir de este conocimiento se han desarrollado los inmunoensayos que detectan la presencia de anticuerpos anti-transglutaminasa, que es la primera prueba que se indica para estudiar a un paciente en el que se sospeche la enfermedad. Esta prueba también permite hacer pesquisa masiva en población de alto riesgo a un coste aceptable. Además, permite evaluar la respuesta al tratamiento ya que los niveles de anticuerpos anti-TGt se relacionan con el daño en la mucosa y con la ingestión de gluten.

Otro conocimiento básico de gran interés se relaciona con la estructura del péptido tóxico. Se conoce incluso la estructura de los péptidos que se unen a las moléculas de HLA-DQ2 y HLA-DQ8 y que provienen del procesamiento intracelular del péptido de 33 aminoácidos (Bergseng, Xia et al. 2005; Costantini, Rossi et al. 2005). Aunque este conocimiento básico aún no se ha concretado en la práctica clínica habitual, se considera que en un futuro puede servir de base para desarrollar nuevas herramientas terapéuticas. Ya se estudian enzimas que pueden digerir este péptido. Consideramos que esto representaría un gran avance en el tratamiento de la enfermedad. Si bien es cierto que el tratamiento basado en la eliminación del gluten de la dieta es bastante efectivo en la mayoría de los pacientes y es relativamente inocuo si se acompaña de suplementos de vitaminas y minerales, no podemos dejar de reconocer que seguir una dieta libre de gluten de por vida es difícil, especialmente en países

del tercer mundo. El consumo de trigo y sus derivados está ligado al propio origen y desarrollo de la humanidad, especialmente a partir de lo que se conoce en como el gran despegue cultural, que se produjo cuando los seres humanos pudieron hacer una vida más sedentaria y guardar un excedente de la producción. El grano de trigo fue esencial en esa etapa. Si revisamos nuestras propias costumbres, la mayoría de las cuales vienen de tiempos remotos, vemos como, por ejemplo, casi todas los rituales vinculados a eventos importantes de la vida (cumpleaños, bodas y celebraciones de todo tipo) incluyen tortas y dulces a base de harina de trigo. No hay dudas que la calidad de vida de un paciente celíaco se puede resentir al seguir esta dieta libre de gluten. A medida que los conocimientos sobre esta entidad continúen su evolución en los próximos años, estarán disponibles herramientas diagnósticas más precisas e inocuas y tal vez no sea necesario esa dieta libre de gluten tan estricta pues los pacientes celíacos podrán contar con suplementos enzimáticos u otras variantes que mejoren mucho más su calidad de vida.

2.2.7 Estudios sobre la enfermedad celíaca en Cuba. Perspectivas futuras.

El estudio más antiguo en nuestro país, data de 1980 en el que Blanco Rabasa E. y colaboradores reportan 50 casos de enfermedad celíaca en niños. Estos son los primeros casos confirmados con la histología y la instauración de una dieta libre de gluten en Cuba (Blanco, Sagaró et al. 1980). De los 50 pacientes, 31 mostraron una atrofia completa de las vellosidades. Para esa fecha se pensaba que la celiaquía era una enfermedad de europeos, norteamericanos y australianos, principalmente aquellos de descendencia celta, y el hallazgo de encontrar casos en Cuba, incluyendo pacientes de piel negra, resultaba novedoso. Estos reportes fueron ampliados en publicaciones posteriores (Sagaró and Jimenez 1981; Rabassa, Sagaró et al. 1981). Sagaró E. y Jiménez N. realizaron un estudio para determinar la prevalencia de la EC en familiares allegados de pacientes celíacos y en un total de 80 familiares de primera línea encontraron un 4,3% de casos confirmados (Sagaró and Jimenez 1981). Todos estos estudios fueron realizados mucho antes de contarse con el diagnosticador basado en la presencia de anticuerpos anti-TGt y cuando aún no habían ocurrido los grandes avances teóricos con que contamos hoy. El desarrollo del diagnosticador cubano basado en la determinación de los anticuerpos anti-TGt representó un

gran paso de avance en los estudios sobre celiaquía. Este reporte se publicó en la prestigiosa revista The Lancet (Sorell, Garrote et al. 2002).

Entre otros artículos de interés se incluye uno que estudia los problemas para el diagnóstico de la enfermedad en pacientes con giardiasis. Este trastorno puede acompañarse de alteraciones histológicas similares a las que aparecen en la celiaquía lo que dificulta su diagnóstico diferencial. El estudio demuestra como el ensayo basado en anticuerpos anti-TGt permite llegar a un diagnóstico en presencia de giardiasis (Garrote, Galván et al. 2004). Cintado A. y colaboradores demostraron que la mayoría de los pacientes cubanos también presentan HLA-DQ2 y HLA-DQ8, por tanto, en nuestra población los pacientes susceptibles tienen un fondo genético similar a los pacientes celíacos de otros países (Cintado, Sorell et al. 2006). Todo esto nos permite suponer que la prevalencia de la EC en nuestro país podría ser similar a la encontrada en otras regiones y que esta enfermedad puede constituir un importante problema de salud en Cuba, enmascarado con otros diagnósticos o con muchos pacientes que sufren de trastornos intestinales sin un diagnóstico definitivo. Estas son sólo especulaciones pues la prevalencia real no se conoce, de aquí la necesidad de realizar estudios para ganar en claridad sobre la situación de la EC en Cuba.

La disponibilidad del diagnosticador basado en la detección de anticuerpos anti-TGt facilita la realización de estudios de prevalencia en varios grupos de alto riesgo como pueden ser pacientes que padecen enfermedades autoinmunitarias y que tengan familiares allegados con EC. También se podrán realizar estudios encaminados a determinar las principales manifestaciones clínicas con que se presentan nuestros pacientes y cuál es su respuesta a la terapia. Otros estudios, relacionados con la calidad de vida de estos pacientes así como con la factibilidad de seguir una dieta libre de gluten también podrían aportar una información muy valiosa, principalmente para médicos y decisores de los servicios de salud.

2.2.8 Avances científicos recientes que pueden tener implicaciones en el futuro manejo de los pacientes con EC.

En esta sección trataremos sobre algunas publicaciones recientes que pueden tener implicaciones para la modificación del tratamiento y el diagnóstico de la EC en el futuro. Uno de los campos más activos en la investigación de la EC es el que se dedica a desarrollar estrategias que permitan la digestión del péptido tóxico con la intención de que los pacientes

puedan consumir gluten. Entre estos avances se destaca el uso de las proteasas de enterococos y de *Rhizopus oryzae* para hidrolizar proteínas del gluten. Los autores demostraron que cuando la harina de trigo fue fermentada con tres cepas de enterococos o con una combinación de proteasas de enterococos y de *R. oryzae*, se produce una degradación parcial en la fracción de la albúmina y de las gluteínas pero las gliadinas prácticamente desaparecieron por una digestión total y se logra reducir hasta un 98% la concentración de gluten durante una fermentación prolongada (Dall'asta, Galaverna et al. 2009). Este hallazgo puede tener implicaciones prácticas pues podría desembocar en un método para tratar los alimentos y eliminarles el gluten. Estudios previos también han mostrado resultados exitosos utilizando distintos tipos de agentes para propiciar la digestión de las gliadinas (Di Cagno, De Angelis et al. 2002; Zotta, Piraino et al. 2006).

Aunque la biopsia duodenal sigue siendo la prueba de oro sería conveniente y parece posible que esta sea sustituida por un proceder menos invasivo como la detección de anticuerpos anti-TGt. En este sentido se han publicado estudios que demuestran que una dieta libre de gluten puede beneficiar a pacientes con enteropatía pero con biopsia negativa según los criterios clásicos de EC. Kurppa K. y colaboradores estudiaron pacientes con anticuerpos anti-TGt pero que sólo tenían daños ligeros en la mucosa (Marsh I-II) no definitivos para el diagnóstico de celiaquía (Kurppa, Collin et al. 2008). Con estos pacientes crearon dos grupos, a uno le indicaron una dieta libre de gluten y al otro una dieta normal. Después de un año se encontró que los pacientes con la dieta libre de gluten mostraron una notable mejoría clínica e histológica y muchos pacientes del grupo con dieta libre mostraron evolución a una EC franca. Esto refuerza la idea de que, en un inicio, los pacientes celíacos pueden no tener los daños histológicos clásicos pero que ya deben ser diagnosticados y tratados, pues la dieta libre de gluten les aporta grandes beneficios. Otros estudios también han ofrecido evidencias a favor de esta hipótesis (Tursi and Brandimarte 2003; Kaukinen, Peräaho et al. 2005; Esteve, Rosinach et al. 2006; Tursi, Brandimarte et al. 2006) (Bhatnagar, Gupta et al. 2005).

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Mejoras en la producción de los diagnosticadores biomédicos.

En la figura # 4, podemos apreciar de forma general, el flujo de trabajo definido para la producción de los sistemas diagnósticos registrados en el CIGB SS, así como los puntos de inspección establecidos.

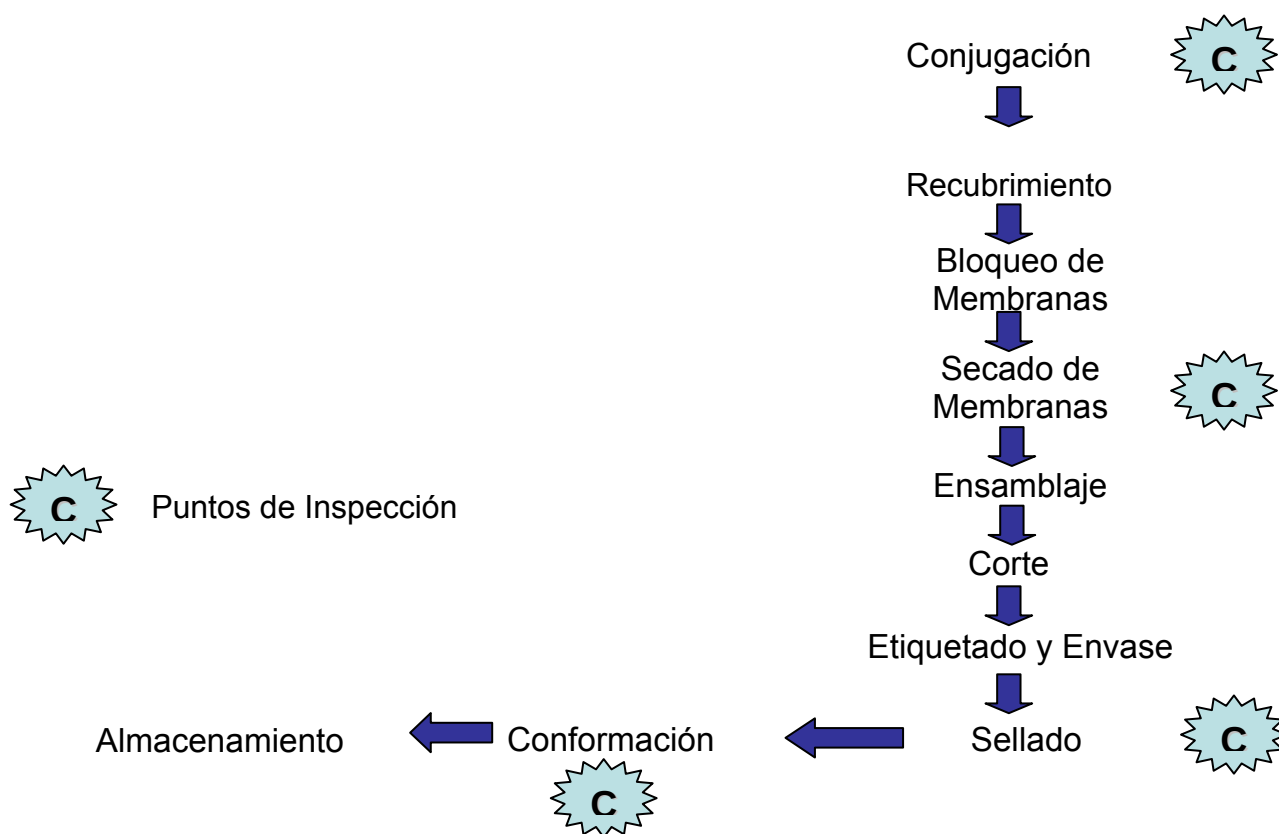


Figura # 4. Diagrama del Flujo productivo de los diagnosticadores Biomédicos establecidos en el CIGB SS.

Los diagnosticadores biomédicos ocupados en este estudio, se basan en la tecnología del “flujo lateral” y constan básicamente de un soporte sólido formado por membranas de nitrocelulosa (NC) de 15 µm de tamaño de poro (MDI, India), la cual se encuentra insertada en tarjetas de poliéster blanco opaco con dimensiones de 7.5 cm de ancho por 26 cm de largo y también de 5,8 cm de ancho por 30 cm de largo, en dependencia

del diagnosticador producido. El área de reacción que comprende la membrana de nitrocelulosa, es de 1,5 cm de ancho para el diagnosticador de Embarazo y de 3,2 cm de ancho para el diagnosticador de la enfermedad celíaca. En la misma se depositan en forma de líneas las moléculas específicas en dependencia del diagnosticador, así por ejemplo; para el diagnosticador del Embarazo se emplean anticuerpos monoclonales específicos (producidos por el CIGB SS) contra diferentes epítopes presentes en la hormona hCG, mientras que para el diagnosticador de la enfermedad celíaca se emplea la Transglutaminasa tisular de cobayo (TGt) (T-5398, SIGMA, U.S.A.).

Como línea de control definida, común a todos los diagnosticadores, estaba definido el empleo de la Poli L-lisina, un reactivo que favorece la precipitación de las partículas de oro coloidal por su carga negativa. Como parte de la mejora tanto en la señal visual, como en la estabilidad de la misma, se estudio la mezcla de un anticuerpo policlonal (AcP) anti-inmunoglobulinas de ratón con la propia Poli L-lisina, a diferentes relaciones moleculares; siempre se empleó el Anticuerpo Policlonal anti IgG de ratón a concentraciones de 4 mg/mL y la Poli L-lisina a 1 mg/mL, dadas las referencias de empleo anteriores (PPO 2.06.427.96; ediciones 01 y edición 05, respectivamente). Las variantes estudiadas fueron;

- a) 1 volumen AcPc + 1 volumen de Poli L-lisina
- b) 2 volúmenes AcPc + 1 de Poli L-lisina
- c) 4 volúmenes AcPc + 1 de Poli L-lisina
- d) 8 volúmenes AcPc + 1 de Poli L-lisina

En contacto con la nitrocelulosa por el extremo inferior se ensambla la fase móvil del sistema, constituida por un material macroporoso de poli estireno PT-R5 (MDI, India) (2,7 cm por 26 cm y 2,7 cm por 30 cm, en dependencia del sistema diagnóstico) de 100 μ m de tamaño de poro, sobre el que se deposita el marcador del sistema definido (otra biomolécula conjugada con oro coloidal de 15 – 20 nm de tamaño de partícula), diluido en una solución que favorece la migración de los inmunoreactantes a través de la membrana de NC. Este extremo es el que se introduce en la muestra a analizar y

permite la reacción y liberación del analito con el inmunocomplejo conjugado con oro por la membrana de nitrocelulosa hasta el área de reacción específica.

Por el extremo superior de la tira reactiva se ajusta un material absorbente AP-080 (MDI, India) (3,5 cm x 26 cm ó 1,1 cm x 30 cm), que favorece la migración de la reacción y con ello la rapidez en obtener los resultados esperados.

3.1.1. Sensibilización o recubrimiento de las membranas de nitrocelulosa (tiras reactivas) en equipo Biodot.

Las condiciones de trabajo se ajustaron según se describe en los procedimientos establecidos por las Buenas Prácticas de Fabricación en el CIGB SS.

Para el dispensado de las moléculas que conforman el sistema diagnóstico en los materiales de interés, empleamos el equipo Biodot (Biodot Inc, Gran Bretaña), el cual cuenta con tres cabezales integrados a tres bombas, un ordenador automático y una plataforma mecánica, que se desplaza mediante presión de aire suministrada por compresor automático (ABC, España).

Los valores elevados de humedad relativa (% de HR), requeridos en el área de recubrimiento para favorecer la sensibilización de los soportes sólidos con las biomoléculas de interés, requieren de un equipamiento definido. Para alcanzar este objetivo, se analizó el comportamiento de diferentes parámetros observados en producciones anteriores, así como la frecuencia de los mismos, donde se conformó posteriormente una Hoja de Inspección (Gráfico de Tarjado), para luego aplicar diferentes herramientas de calidad para nuestro estudio, tales como; análisis y gráfico de Pareto, Diagrama Causa – Efecto, Coeficiente de Correlación, etc., y auxiliándonos de programas como el EXCEL Versión 5,0 y el STATGRAPHICS PLUS Versión 5,0.

3.1.2. Bloqueo de los sitios libres en las membranas de nitrocelulosa. Secado.

Para el bloqueo de los sitios libres presentes en las membranas de nitrocelulosa, estos se sumergen lentamente en una solución salina tamponada con fosfatos (SSTF) a

0.015 mol/L y un pH 7,0, conteniendo además Albúmina Sérica Bovina (BSA) 0,5 %, Sacarosa 5 % y Tween 20 0,02 %. Para garantizar la ejecución de esta etapa en el incremento productivo de los sistemas diagnósticos, se diseñó y adaptó un recipiente plástico en forma de cubeta, con dimensiones de 60 cm por 45 cm, donde se introducían a su vez otras cubetas de dimensiones menores (ya establecidas), diseñadas para contener las tarjetas de nitrocelulosa requeridas. El período de incubación establecido en esta solución bloqueadora fue de 60 minutos a una temperatura de 37 °C, según el protocolo establecido. Luego se procedió al secado de las tarjetas de nitrocelulosa, retirándolas de la solución, escurriéndolas y colocándolas sobre papel absorbente desechable. Finalmente se colocaron a 37 °C en horno de secado durante 1 hora y 20 minutos. Este paso de secado es muy importante a fin de garantizar que la membrana de nitrocelulosa quede exenta de humedad, parámetro que influye posteriormente en la estabilidad real del sistema, por lo que es imprescindible garantizar el tiempo de secado a esta temperatura y realizar el mismo en un local de humedad controlada inferior al 50 %.

3.1.3. Dispensado del conjugado sobre el material macroporoso. Secado.

Para el dispensado de las moléculas conjugadas con oro coloidal sobre el material macroporoso, nos auxiliamos de cada uno de los procedimientos establecidos en la producción de las tiras reactivas de los diagnosticadores. Cada uno de los conjugados específicos se diluye en varios reactivos que facilitan su posterior migración sobre la membrana de nitrocelulosa (Sacarosa 20 %, BSA 10 %, Tritón X-100 0.5 % y Tween 20 al 1 % para el caso del diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo** y la solución salina de TRIS (TBS) / BSA para el diagnosticador **HeberFast Line® anti-transglutaminasa**). Con el objetivo de mejorar los “fondos inespecíficos” y la migración de los inmunoreactantes en el diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo**, se ensayaron diferentes soluciones similar a la establecida, pero incorporándoles otros aditivos o componentes que le confirieran una fuerza iónica mayor al componente del sistema, a fin de evitar que muestras de orina con baja molaridad afectaran la especificidad del diagnosticador. Por esta razón se ensayaron las variantes;

- A. Sacarosa 20 %, BSA 10 %, Tritón X-100 0.5 % y Tween 20 1 % (Solución Control, establecida en Procedimiento 2.06.502.96).
- B. Sacarosa 20 % en SSTF 10 X, BSA 10 %, Tritón X-100 0.5 % y Tween 20 1 %
- C. Sacarosa 20 % en SSTF 20 X, BSA 10 %, Tritón X-100 0.5 % y Tween 20 1 %
- D. Sacarosa 20 % en TRIS 2 mol/L, BSA 10 %, Tritón X-100 0.5 % y Tween 20 1

Para el dispensado de los conjugados se empleó el tercer cabezal del bioprinter Biodot, ajustando la presión a 4 PSI (Pound per Square Inches) según se indica en cada uno de los procedimientos establecidos. El secado final de los materiales impresos, se realizó incubando a 37 °C durante 20 minutos en incubadora MEMMERT.

3.1.4. Ensamblaje del sistema

El material absorbente de cada sistema se colocó sobre la parte superior de la tarjeta de nitrocelulosa, garantizando el contacto con el extremo superior de la nitrocelulosa. En la parte inferior se colocó el material macroporoso con el conjugado ya embebido, situándolo 1 mm por encima de la membrana de nitrocelulosa y ajustando el contacto entre ambos materiales con ayuda de un rodillo de goma.

Las etiquetas correspondientes a cada diagnosticador se colocaron sobre el material absorbente y el material macroporoso respectivamente, ajustándose el contacto entre ambos materiales.

3.1.5. Corte de las tiras reactivas

El corte de las tiras se realizó con ayuda de la guillotina BioDot CM 4000, programándose la misma para el corte de las tiras a 4 mm de ancho para el caso del diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo** y a 4,4 mm para el **HeberFast Line® anti-transglutaminasa**, obteniéndose de una tarjeta de nitrocelulosa aproximadamente 60 tiras reactivas individuales.

Como objetivo de estudio, se evaluó paralelamente el corte de las tiras del diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo** a 3 mm de ancho, con la finalidad de reducir los costos de producción de las mismas, obtener un mayor número de

determinaciones por tarjeta de nitrocelulosa procesada y comparar los resultados con el sistema anteriormente establecido y registrado en el país. Por tal motivo se produjeron 2 lotes de este diagnosticador; 1 primer lote de 200 tiras comprendiendo un ancho de las tiras de 4 mm (dimensión establecida) y un segundo lote de 200 tiras con un ancho de 3 mm, como dimensión a estudiar. Para la comprobación del desempeño del diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo** con ambas dimensiones, se utilizó un panel de 150 muestras de orina, de las cuales; 34 eran muestras positivas y las restantes 116 eran muestras negativas a embarazo.

3.1.6. Envase

Las tiras se almacenaron de forma individual en estuches de aluminio, con una bolsa desecante por estuche y el sellado se llevó a cabo con la selladora eléctrica (GANDUS, Italia).

Alternativamente se evaluó para el diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo** la condición de envasar varias tiras por estuche, también con la finalidad de reducir los costos de producción. En este caso por concepto de mayor número de determinaciones por material de envase primario.

Las variantes de estudio fueron las siguientes;

- A. Una tira por Bolsa*
- B. Cinco Tiras por Bolsa*
- C. Diez tiras por Bolsa*
- D. Veinticinco tiras por Bolsa*
- E. Cincuenta tiras por Bolsa*

Este proceso de envase y sellado, se llevó a cabo en un local con humedad controlada, condición que se logró con la ayuda de dos equipos deshumificadores.

Todos los lotes obtenidos, tanto los de estudio, como los correspondientes con los incrementos productivos definidos, se almacenaron de 2 a 8 °C en almacén refrigerado hasta su distribución posterior y los estudios de estabilidad acelerada.

3.2. Precisiones del Límite de Detección del ensayo HeberFast Line® Embarazo frente al Estándar Internacional de Referencia.

El diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo** se registró en el país en el año 2004, refiriendo un límite de detección de 20 mUI/mL, utilizando una preparación comercial de hCG (SIGMA CHEMICAL Co., No. Cat. C-1063) Posteriormente, se utilizó una mezcla de orinas de varias mujeres embarazadas y se cuantificó la concentración de hCG por el UMELISA hCG del Centro de Inmunoensayo (Cuba), cuyo patrón interno está calibrado contra el 4^{to} Estándar Internacional para hCG (código 751589). A partir del resultado de esta cuantificación (7 832 mUI/mL) se realizó la correspondiente dilución de esta mezcla en otra de orina de varios hombres, quedando la hormona a una concentración final de 20 mUI/mL. Esta dilución ha sido la utilizada como patrón interno para el control de los lotes de componentes y de los productos terminados del diagnosticador producido por el CIGB SS.

Dado el condicionamiento requerido por el órgano regulador nacional Centro Estatal para el Control de Medicamentos y Diagnosticadores (CECMED), de evaluar el límite de detección de este diagnosticador contra un Estándar Internacional de referencia, se ensayó entonces con el 4to Estándar Internacional (4th IS, código 75/589), distribuido por el Instituto Nacional para Estándares y el Control de Biológicos (NIBSC, por sus siglas en ingles, Inglaterra), que es la preparación que presenta la hormona hCG como molécula intacta en su mayor por ciento y es la forma que detecta el sistema **HeberFast Line® Embarazo** referido, al emplear una combinación de anticuerpos anti subunidad α conjugado a partículas de oro coloidal y un segundo anticuerpo monoclonal anti subunidad β como anticuerpo de captura.

Para este estudio se utilizó el 4^{to} Estándar Internacional de hCG (4th IS, código 75/589), la 1ra Preparación Internacional de Referencia para la subunidad α de la hCG (1st IRP α hCG, código 751569) y la 1ra Preparación Internacional de Referencia para la subunidad β de la hCG (1st IRP β hCG, código 75/55), adquiridas del Instituto Nacional para Estándares y el Control de Biológicos (NIBSC, en sus siglas en ingles), de Inglaterra.

Los estándares internacionales liofilizados se reconstituyeron en tampón fosfato salino, conteniendo azida de sodio al 0,1 % como preservante. Las diluciones de estos estándares se hicieron de forma tal que se evitara más de dos ciclos de congelación-descongelación antes de su uso. La dilución final de los estándares para evaluar las tiras se hicieron siempre en orinas negativas para hCG. Además se utilizaron 23 muestras de orina de mujeres con menos de 15 días de atraso (10 que asistieron a consulta de regulación menstrual y otras 13 de mujeres con atraso que asistieron directamente a nuestro laboratorio). Todas las muestras fueron tomadas de la primera orina de la mañana. Las orinas tomadas en la consulta de regulación menstrual se ensayaron diluidas 1/2 con la mezcla de orinas negativas para hCG. Las 13 restantes se ensayaron sin diluir.

Para este estudio se utilizaron tiras de los lotes EMA5001 del diagnosticador **HeberFast Line® MaterniTest**, producido en julio del 2005 y el lote EMP4002 del diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo**, producido en mayo del 2004. Ambos lotes fueron previamente ensayados con las muestras de orina usadas como patrones internos para la liberación de los lotes, brindando resultados satisfactorios.

Se utilizó así mismo el diagnosticador **hCG-STRIP** (Ref.: 3035, lote 06075-I), producido por la compañía francesa VEDALAB y obtenido de la farmacia del Hospital Materno Provincial de Sancti Spiritus, para la comparación de los resultados.

Ambos diagnosticadores se evaluaron siguiendo las instrucciones indicadas por los fabricantes. El 4th IS se ensayo primero a varias concentraciones de la hormona en una mezcla de orinas negativas (100; 50; 25; 12,5 y 6,5 mUI/mL), utilizando dos tiras de cada uno de los diagnosticadores utilizados, para cada una de las concentraciones.

Además la tira **HeberFast Line® Embarazo** se ensayó en las concentraciones de 70, 80, 150, 200 y 650 mUI/mL de hCG con este mismo estándar. El 1st IRP α hCG y el 1st IRP β hCG se usaron a 100 mUI/mL de la correspondiente subunidad de la hCG en una mezcla de orina negativa, para corroborar la especificidad de los diagnosticadores contra las subunidades de la hormona.

3.3. Nueva presentación del diagnosticador precoz del embarazo.

El **HeberFast Line® Embarazo** está inscrito en el Registro de los Diagnosticadores del CECMED con el número D0409-10, con la presentación de **estuches para 50 pruebas**, envasadas individualmente en una bolsa de aluminio (envase primario) junto a una bolsa desecante de gel de sílice.

Se diseña entonces como parte de este estudio de mejora, una presentación en la cual se puedan reducir los costos de producción;

- **estuches para 200 pruebas**, conteniendo 40 bolsas de aluminio (envase primario) con 5 pruebas cada una y una bolsita desecante de gel de sílice. El material de envase primario (bolsa de aluminio) y la bolsita desecante utilizado en ambas presentaciones es el mismo. Esta presentación en bolsas por 5 pruebas, se diseñó con la inclusión en el estuche de una bolsa de nylon con zipper (segundo envase primario), para almacenar las pruebas que no se utilicen de inmediato, junto a la bolsa desecante, una vez abierto el envase primario original (bolsa de aluminio).

Tanto esta nueva presentación, como la anteriormente registrada, están definidas para uso profesional en instituciones de salud, desde el nivel primario (Médico de Familia), hasta Hospitales Gineco Obstétricos, Consultas de Regulación Menstrual, Cuerpos de Guardia (Urgencias, para el caso de los Ectópicos) y Policlínicos de Tipo I.

Se evaluó el desempeño del producto mediante el procedimiento “Ensayo de Funcionalidad **HeberFast Line® Embarazo**” (PPO 2.06.427.96). El ensayo se ejecutó siguiendo el procedimiento descrito en la literatura interior y evaluando los resultados con las muestras de orinas utilizadas para liberar los lotes de producto final. Se consideró que el diagnosticador mantiene sus características de desempeño, siempre que las muestras positivas y negativas evaluadas en cada intervalo de tiempo, sean correctamente clasificadas, según los resultados del ensayo correspondiente.

Las muestras de suero evaluadas en paralelo con las muestras de orina, fueron obtenidas por extracción de sangre venosa, según metodología establecida para esta técnica en los Bancos de Sangre del país.

3.4 Desarrollo del estudio de estabilidad acelerada con muestras de orina y suero.

El estudio se planificó para realizarse desde el día cero hasta el fallo en el desempeño del diagnosticador. Se evaluó la estabilidad acelerada del ensayo mejorado, almacenando las determinaciones en sus estuches acorde a como son distribuidas comercialmente (5 tiras envasadas en bolsas de aluminio con material desecante), bajo un estrés de temperatura de 60 °C de acuerdo al manual Biodot. Este estudio contempló dos experimentos independientes, abarcando cada uno tres réplicas de cada condición por cada día muestreado, o sea se analizaron las señales obtenidas por el diagnosticador frente a una muestra de orina negativa (0 mUI/ml de hCG) y dos muestras positivas conteniendo niveles estimados de 100 mUI/mL (1:8) y 200 mUI/mL (1:4) de hCG respectivamente. En cada caso se evaluaron los resultados obtenidos de las señales específicas en las tiras reactivas pasado el tiempo establecido al efecto. Para el análisis estadístico se compararon los resultados obtenidos; examinando la señal obtenida y el tiempo de migración de la reacción como pruebas no paramétricas para dos muestras independientes. Considerando como hipótesis nula la condición de estabilidad del ensayo por 10 días a la temperatura referida anteriormente.

Los datos resultantes fueron analizados mediante los estadígrafos Kruskal-Wallis y Mann-Whitney U test, empleando el programa de computación SPSS para WINDOWS versión 11.5.

3.5 Mejoras en el desempeño del diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa para el diagnóstico de la enfermedad celíaca.

En este estudio se trabajó en un nuevo formato del diagnosticador, encaminado a mejorar el desempeño del mismo. El diagnosticador **HeberFast Line® anti-transglutaminasa**, anteriormente registrado por el CECMED, para su empleo con muestras de suero o plasma solamente, limitaba el empleo del mismo a personal calificado tanto para su ejecución, así como para la lectura y análisis de los resultados. De modo que se trabajó en el empleo de materiales específicos para el análisis de muestras de sangre, suero o plasma humano para lo cual se incorporaron diferentes componentes al estuche del diagnosticador, tales como; una Lanceta estéril y un capilar

heparinizado que favorecen tanto la toma de la muestra de sangre así como su dispensado en el casete plástico. Estos componentes insertados dentro del juego diagnóstico, responden en gran medida a intereses propios del cliente final, mejoras para el desempeño del diagnosticador y su aplicación además de una nueva presentación al nivel de farmacias (auto prueba), con lo cual las bondades implícitas le confieren mayor versatilidad.

3.5.1. Evaluación del diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa con muestras de sangre y suero.

El estudio se realizó en colaboración con el Banco de Sangre Provincial de Sancti Spiritus, donde se evaluaron 54 muestras de sangre, así como las muestras de suero obtenidas de cada una de las muestras de sangre previamente evaluadas. La mayoría de las muestras provenían de donantes y una pequeña proporción fueron tomadas a niños con síntomas clásicos sugestivos de enfermedad celiaca. Los casos positivos fueron debidamente aconsejados y guiados a recibir una atención especializada.

Para la comparación del límite de detección del nuevo diseño, utilizando suero o sangre como muestra, se evaluaron las mismas muestras añadiendo un suero positivo para anticuerpos contra transglutaminasa, a una dilución final de 1:50, que resulta en una señal positiva débil con el diseño anterior. Como características de desempeño de las pruebas se evaluaron la clasificación de las muestras como positivas o negativas, la intensidad de la señal obtenida (incluyendo la línea control) y el límite de detección del ensayo comparando los resultados obtenidos con las muestras de sangre y sus correspondientes de suero. El ensayo se realizó tal y como se describe en la literatura interior de cada uno de los diseños y de acuerdo al tipo de muestra utilizada.

Para este estudio se utilizó el lote TGL8001 de diagnosticar HeberFast Line anti-transglutaminasa.

3.5.2 Desarrollo del estudio de estabilidad acelerada con el diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa empleando muestras de sangre.

Este estudio de estabilidad se realizó para predecir la estabilidad del producto después de la modificación que permite el uso de sangre como muestra, utilizando estudios acelerados, en condiciones de stress térmico (60 °C) realizados a un lote de tiras reactivas en su envase primario junto a la bolsa desecante y otro realizado a las tiras del mismo lote, almacenadas sin envase primario en condiciones de temperatura de 20 a 22 °C y humedad relativa de 50 a 60 %. El estudio de estabilidad en tiempo real de este lote de tiras reactivas está en estos momentos en curso (desde marzo del 2008) a temperaturas de 2 a 8 °C y a 30 °C, planificado para evaluar hasta los 30 meses.

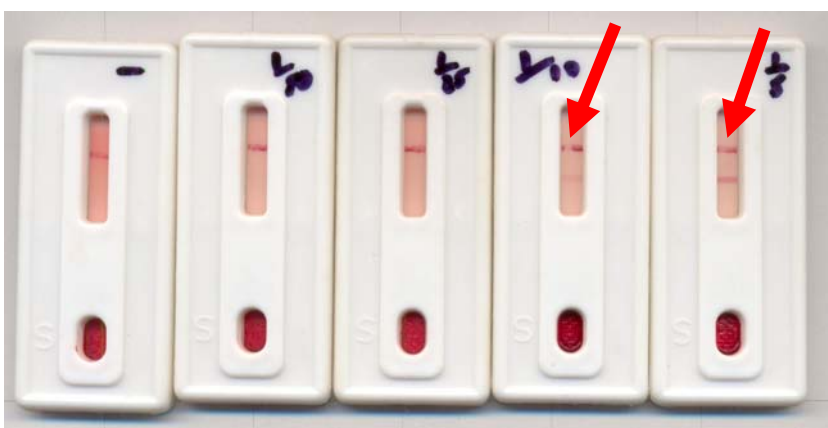
Para este estudio se evaluó el desempeño del diagnosticador mediante el procedimiento “Ensayo de Funcionalidad HeberFast Line anti-transglutaminasa” (PPO 2.06.438.05). El ensayo se realizó con un total de 18 tiras reactivas del lote TT8001C, el cual se ejecutó al día cero, uno, tres, cinco, siete y ocho, siguiendo el procedimiento descrito en la literatura interior y evaluando los resultados con muestras de sangre del panel de referencia establecido en Control de Calidad para la liberación de lotes de producción (una muestra negativa y dos muestras positivas; dilución 1:25 y dilución 1:50). Se consideró que el diagnosticador mantiene sus características de desempeño, siempre que las muestras positivas y negativas evaluadas en cada intervalo de tiempo, sean correctamente clasificadas, según los resultados del ensayo correspondiente.

En el estudio realizado al componente sin envasar, la evaluación se realizó en el tiempo cero, a los ocho y a los doce días.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

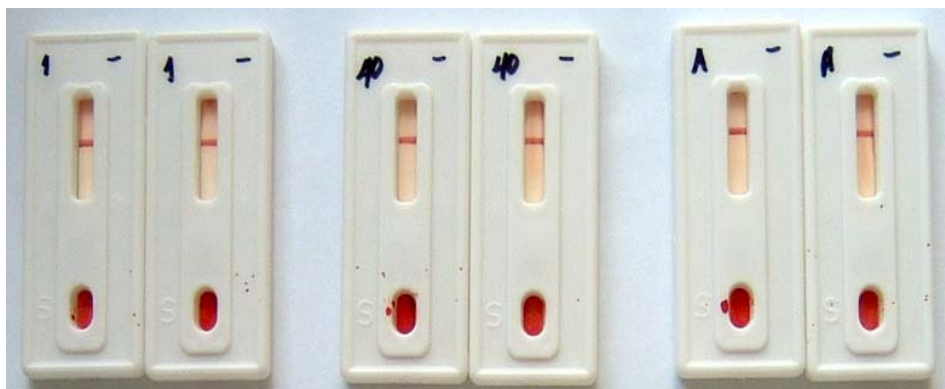
4.1. Mejoras en la producción de los diagnosticadores biomédicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos con las diferentes variantes de estudio, la mejor señal registrada en la línea control fue la correspondiente a; emplear una mezcla de 4 volúmenes de AcP (4 mg/mL) + 1 volumen de Poli L-lisina (1 mg/mL). Con esta variante definida, la línea obtenida es muy nítida, uniforme y homogénea, condición que se mantuvo en todos los estudios realizados con los diferentes soportes sólidos (membranas de NC), así como en los estudios de estabilidad acelerada (Ver figura # 5).



Antes.

Se observa señal de la Línea Control de forma Heterogénea, no reproducible



Después.

Se observa la Línea Control muy bien definida, señal homogénea.

Figura # 5. Señales homogéneas y uniformes obtenidas con la mezcla del AcPc anti – IgG de ratón y la Poli L-lisina en relación 4:1 (v: v).

Este resultado no sólo permite la mejora técnica de los sistemas diagnósticos por mejorar las señales visuales registradas, sino también un considerable ahorro por el concepto de disminución en el empleo de la Poli L-lisina, con lo cual se disminuye de 2 centavos a 0,3 centavos (CUC) por cada determinación de cualquiera de los diagnosticadores producidos.

4.1.1. Sensibilización o recubrimiento de las membranas de nitrocelulosa (tiras reactivas) en equipo Biodot.

Teniendo en consideración los datos registrados en la Hoja de Inspección (Gráfico de Tarjado) (Tabla No. IV) y empleando el análisis de Pareto, se obtiene como resultado que evidentemente dentro de los defectos registrados, el de mayor incidencia económica en el proceso productivo lo representa el rechazo de las tarjetas de NC por problemas inherentes al área de recubrimiento por presentar un ambiente no apropiado (Ver Tabla No. V).

Tabla No. IV Hoja de Inspección. Estimaciones realizadas para tamaños de Lotes de 15 000 determinaciones (200 tarjetas de NC).

Etapa	Defecto	Días de la semana					Total
		1	2	3	4	5	
Conjugación	Materias primas no aprobadas	2	2	1	0	0	5
	Errores del Operario	0	0	0	0	0	0
	Problemas con equipo de centrifugación.	0	0	0	0	0	0
Recubrimiento	Rechazo de tarjetas de nitrocelulosa por entorno no apropiado (Humedad Relativa) en la etapa de recubrimiento.	4	5	4	3	4	20
	Fallos del Equipo de bioimpresión	1	0	1	1	0	3
	Errores del Operario	0	0	1	0	1	2
Bloqueo	No homogeneidad del Bloqueo	1	0	1	0	0	2
	Errores del operario	0	1	0	0	0	1
Secado	Mala distribución de las membranas en el proceso	0	0	0	0	0	0
Ensamblaje y Etiquetado	Colocación indebida de los componentes del sistema	2	1	1	2	2	8
	Etiquetado incorrecto	0	1	1	0	1	3
Corte	Defectos del Equipo	2	1	1	1	2	7
	Programación indebida del equipo de corte.	0	1	0	0	1	2
Envase, Sellado y Etiquetado	Número indebido de tiras por bolsa	0	1	0	0	0	1
	Bolsas sin sílica gel	0	0	0	1	0	1
	Incorrecta colocación de los componentes	0	0	0	0	1	1
	Bolsas sin sellar	0	1	1	1	0	3
	Etiquetado incorrecto	0	1	0	1	0	2
Conformación	Incorrecta colocación de los componentes	0	1	1	0	0	2
	Exceso de Bolsas con tiras	2	2	1	4	3	12
	Defecto de Bolsas con tiras	1	2	3	4	4	15
	Ausencia de literatura interior	1	2	2	3	3	11
	Ausencia de sobre de nylon con zipper	2	1	1	2	2	8
	Estuches rotos	1	2	2	3	2	10
	Etiquetado incorrecto	0	0	1	0	0	1

Tabla No. V. Análisis de Pareto con datos de observaciones realizadas (estimaciones) en producciones anteriores.

No.	Defecto	Días de la semana					Total de defectos	Costo por unidad (CUC)	Costo Total (CUC)
		1	2	3	4	5			
1	Rechazo de tarjetas de nitrocelulosa por entorno no apropiado (Humedad Relativa) en la etapa de recubrimiento.	4	5	4	3	4	20	1.28	25.60
2	Colocación indebida de los componentes del sistema en la etapa de ensamblaje.	2	1	1	2	2	8	0.21	1.68
3	Tiras rechazadas por defectos del Equipo de Corte (Guillotina).	122	112	125	105	126	590	0.03	17.70
4	Exceso de Bolsas con tiras en conformación.	2	2	1	4	3	12	0.0001	0.0012
5	Defecto de Bolsas con tiras en conformación.	1	2	3	4	4	15	0.0001	0.0015
6	Ausencia de literatura interior en conformación.	1	2	2	3	3	11	0.0001	0.0011
7	Ausencia de sobre de nylon con zipper en conformación.	2	1	1	2	2	8	0.0001	0.008
8	Estuches rotos en conformación.	1	2	2	3	2	10	0.4	4.00

Se decide entonces graficar también estos resultados con Pareto, tabulando primeramente los mismos e incorporándolos en el programa **STATGRAPHICS PLUS Versión 5,0**. (Figura # 6)

Tabla No. VI. Resultados obtenidos con el análisis de Pareto (%) según el programa STATGRAPHICS PLUS Versión 5,0.

No.	Análisis de Pareto	Costo	%
1	Rechazo de tarjetas de nitrocelulosa por entorno no apropiado	25,6000	52,25
3	Tiras rechazadas por defectos del Equipo de Corte (Guillotina).	17,7000	36,13
8	Estuches rotos en conformación.	4,0000	8,16
2	Colocación indebida de los componentes del sistema en la etapa de ensamblaje.	1,6800	3,43
5	Defecto de Bolsas con tiras en conformación.	0,0015	0,00
4	Exceso de Bolsas con tiras en conformación.	0,0012	0,00
6	Ausencia de literatura interior en conformación.	0,0011	0,00
7	Ausencia de sobre de nylon con zipper en conformación.	0,0080	0,02

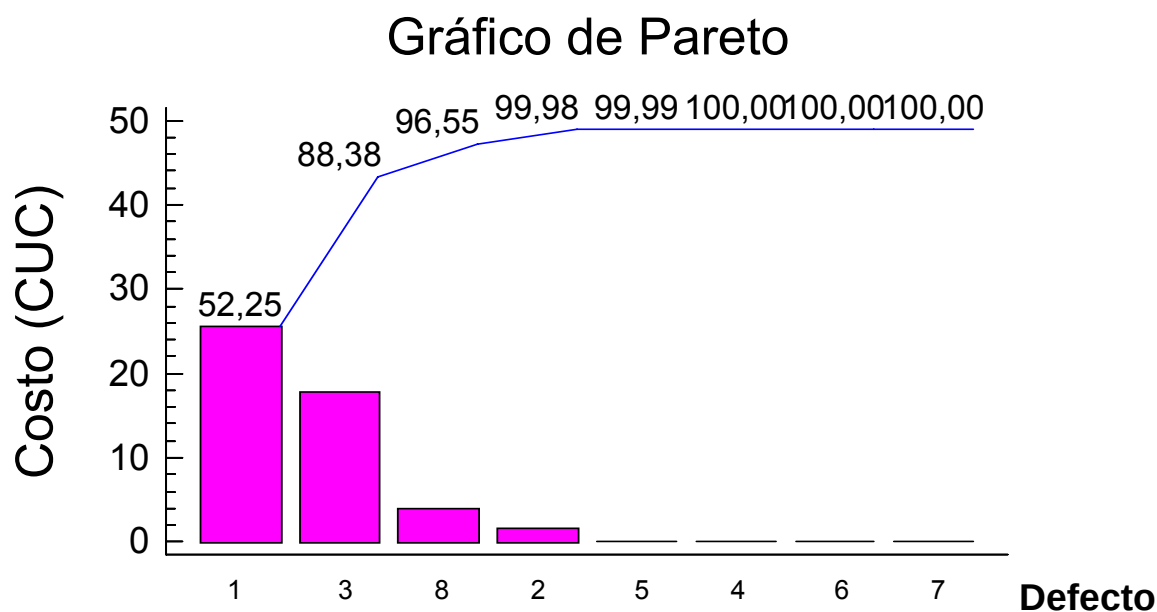


Figura # 6. Gráfico de Pareto obtenido en análisis de Defectos obtenidos en la producción.

El **diagrama de Pareto** (también llamado **curva 80-20**), nos permite organizar los datos de forma que estos queden en orden descendente, de izquierda a derecha y separados por barras. Permittiéndonos, pues, asignar un orden de prioridades, mostrándonos gráficamente, que hay muchos problemas sin importancia frente a unos

pocos graves que tenemos que solucionar (pocos vitales, muchos triviales). Mediante la gráfica identificamos los "pocos vitales" a la izquierda y los "muchos triviales" a la derecha.

Considerando todo lo anteriormente definido, arribamos a la conclusión que el rechazo de las tarjetas de nitrocelulosa por los problemas presentes con la Humedad Relativa en la etapa de recubrimiento es el principal factor que incide en las pérdidas del proceso productivo.

En la figura #7, se definen cada una de las causas y subcausas que influyen directamente en el principal problema detectado. Observándose que el rechazo por problemas inherentes a al Humedad Relativa en el área de recubrimiento, es la principal incidencia encontrada.

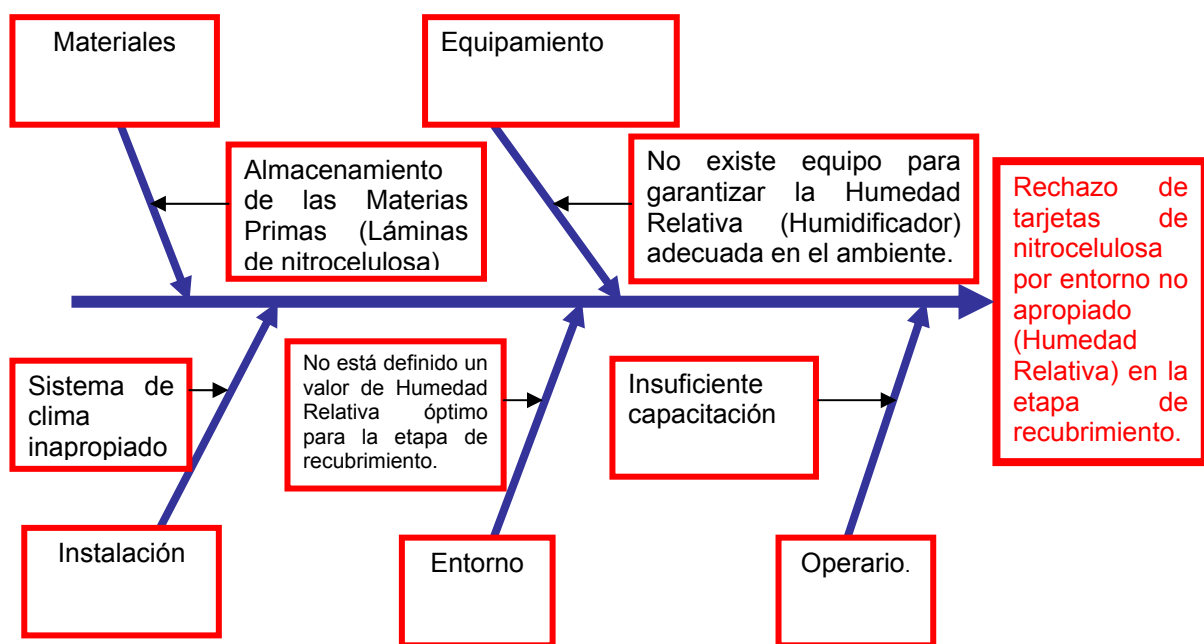


Figura # 7. Diagrama Causa – Efecto (Espina de Pescado) implícito en el análisis del principal problema de rechazos en la producción.

Conociendo la principal causa inherente a los defectos obtenidos en la producción, específicamente en el área de recubrimiento, empleamos el gráfico de correlación, para denotar cuanta correspondencia existía entre estas variables sobre los rendimientos obtenidos de tiras por una tarjeta procesada. Conociendo que el número teórico óptimo de tiras a obtener en el proceso, es de 75 tiras / tarjeta.

Tabla No. VII. Tabla de Correlación entre la Humedad Relativa (%) y el rendimiento de tiras reactivas por tarjeta procesada.

Etapa de Recubrimiento		
X = Humedad Relativa (%) Y = # de tiras óptimas / tarjeta		
No. de Observaciones	X	Y
1	45	40
2	52	63
3	66	74
4	68	74
5	72	74
6	70	75
7	68	75
8	65	74
9	50	66
10	47	32
Sum	603	647
Max	72	75
Min	45	32
Media	60,3	64,7
Desv. St. (S)	10,489	15,784
Var. (S2)	110,011	249,122
r =	0,852	

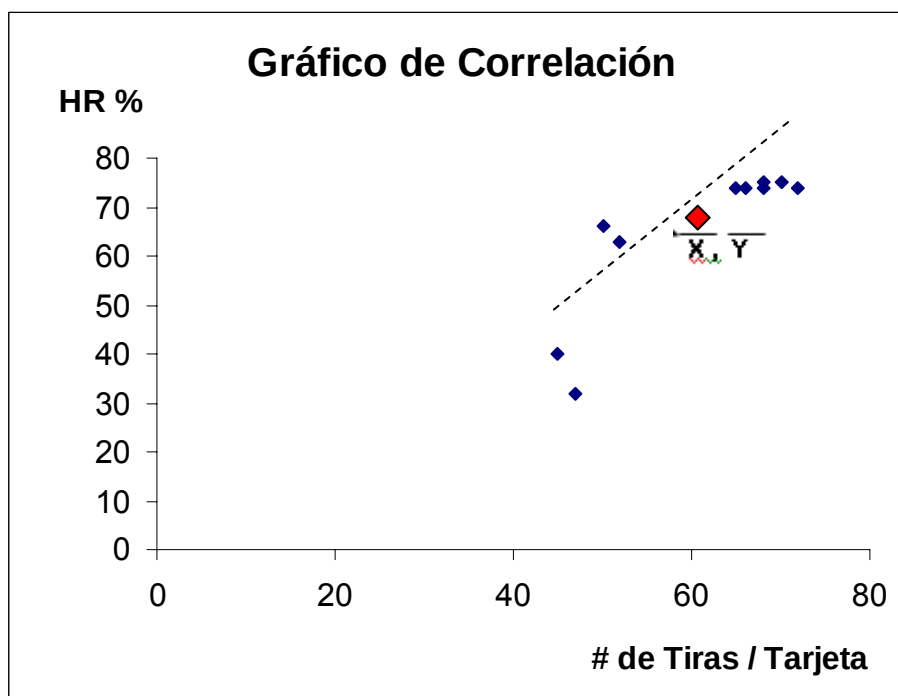


Figura #8. Gráfico de Correlación.

Como podemos apreciar en la figura # 8, el gráfico nos muestra que la nube de puntos se aproxima a una recta. Por lo que se corresponde con una correlación lineal.

Determinando el valor de correlación, según el programa EXCEL Versión 5,0, obtuvimos que este es mayor que cero (0,852), por lo que la correlación lineal es positiva. Como la correlación es más fuerte cuando más se aproxima a 1, podemos concluir entonces que en este análisis la correlación entre ambos parámetros es muy positiva. A medida que se trabaja con altos valores de Humedad Relativa, se obtiene un mayor número de tiras por tarjeta y por ende un mejor rendimiento productivo.

Con los análisis y resultados anteriores, se define entonces establecer como norma de calidad para el trabajo con las membranas de nitrocelulosa en el área de recubrimiento, un rango de Humedad Relativa en el local; de 60 ± 10 %. Asimismo se define también

como parámetro de calidad para la etapa de recubrimiento obtener rendimientos en un rango de 70 ± 10 tiras por cada tarjeta de nitrocelulosa procesada.

Todos estos resultados justifican la necesidad de instalar un equipo que permita mantener los valores de Humedad Relativa adecuados, por lo que se discute con la administración de la entidad y se recomienda trabajar en este sentido mediante la gestión de compra de un equipo a través del **Grupo de Logística y Aseguramiento de la Producción**. Alternativamente se lleva a efecto la instalación (innovación) de un sistema que permite el asperjado de agua a través de un difusor por aire (obtenido del sistema de aire a presión establecido en la institución), el cual de conjunto con el sistema de clima (SPLIT), permite mantener los niveles de humedad relativa, dentro de los parámetros de calidad establecidos para el área de recubrimiento (Figura # 9).

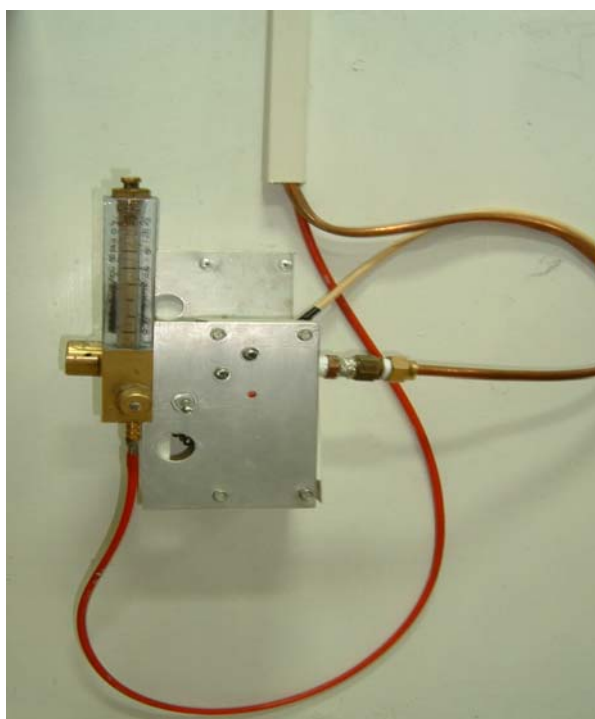


Figura # 9. Equipo asperjador, garantiza valores de HR en el área de recubrimiento entre 60 y 80 %.

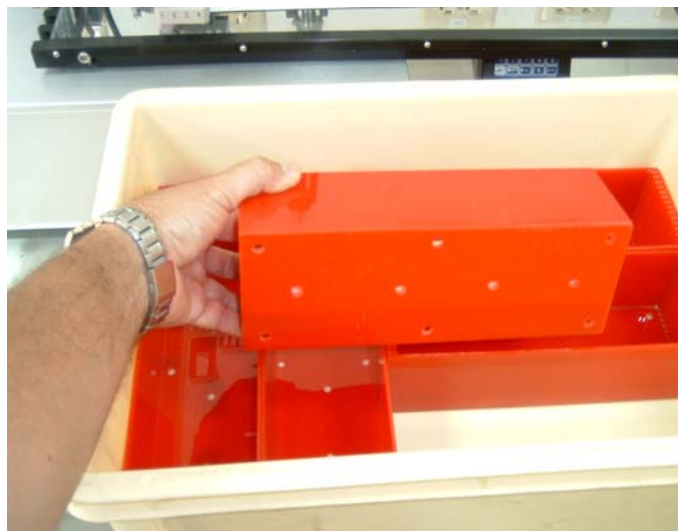
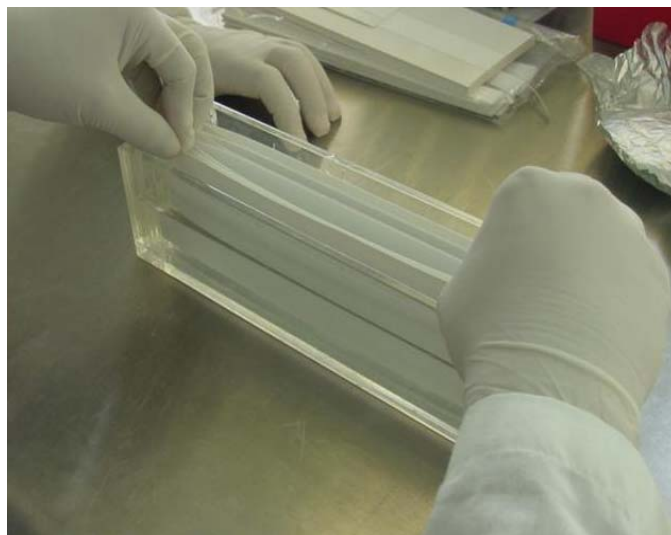
Esta acción permite desarrollar la operación relacionada con la sensibilización de los soportes sólidos (membranas de nitrocelulosa) sin implicar defectos, ni desechos, durante un período de tiempo mayor, cuando se trabajan en el área grandes cantidades de materiales debido a incrementos en la producción.

**4.1.2. Bloqueo de los sitios libres en las membranas de nitrocelulosa.
Secado.**

La adaptación desarrollada en esta etapa consistió en facilitar la inmersión múltiple de los materiales dentro de la solución de bloqueo, a través de conductos abiertos en las cubetas plásticas destinados para ello y a su vez estos dentro del recipiente plástico introducido en el proceso, todo lo cual favoreció el escalado de las producciones para grandes volúmenes de materiales (Figura # 10). Anteriormente este proceso requería de la participación de varios operarios en un período de tiempo aproximado de 30 a 40 minutos por proceso. Actualmente la operación puede realizarse por un solo operario en un tiempo menor de 15 minutos, permitiendo varios procesos por día. Esta adaptación permitió además el aprovechamiento máximo de la Solución de Bloqueo en su tiempo de utilización, ya que su vencimiento ocurre 15 días después de preparada. Por este concepto se estima un ahorro en más de 400,00 CUC por el mejor aprovechamiento de la solución de bloqueo y más de 2 500,00 pesos por concepto de ahorros en salario, depreciación y energía al emplear mejor el fondo de tiempo productivo disponible.

Antes

→
Inmersión individual de cada una de las membranas en la solución de bloqueo.



Actual

Inmersión conjunta de las membranas en la solución de bloqueo. Favorece el ahorro considerable del tiempo de operación, mejor aprovechamiento de recursos y un mayor procesamiento de materiales. **Etapas fundamentales en los incrementos productivos.**

4.1.3. Dispensado del conjugado sobre el material macroporoso. Secado.

De las variantes de soluciones estudiadas con el diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo**, la que brindó un mejor resultado, atendiendo a mejorar la molaridad de las muestras de orina a analizar y con ello disminuir la posibilidad de fondos inespecíficos, fue aquella donde se empleó Sacarosa 20 % (diluida en TRIS 2 mol/L), BSA 10 %, Tritón X-100 0.5 % y Tween 20 al 1 %, es decir a la variante D.

En la figura # 11, se pueden apreciar los resultados obtenidos con el empleo de esta solución, para favorecer la migración de los inmunoreactantes por las membranas de NC.

En Muestra Negativa hCG

En Muestra Negativa hCG

100

200 mUI/mL



Inespecificidades

A



B



Límite de detección

C

Figura # 11. Resultados obtenidos con la solución de migración de los inmunoreactantes en la variante D para el diagnosticador HeberFast Line® Embarazo.

En la imagen identificada con la letra **A**, se muestran fondos inespecíficos (“falsos positivos”) con muestras de orina de mujeres no gestantes (muestras negativas a detección de la hormona hCG. Manifestación clínica comprobada), en tiras reactivas que emplean la solución de migración en la variante A, la cual estaba establecida en la producción del diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo**. En la imagen denotada

con la letra **B**, aparecen los resultados (por duplicado) obtenidos con las mismas muestras de orina negativas a detección de hCG, pero con las tiras donde se utilizó la solución en la variante D. En la imagen señalada con la letra **C**, se evidencia que las tiras que emplean la solución en la variante D, son capaces de detectar el límite de corte establecido para el diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo**.

Las restantes soluciones ensayadas, correspondientes a las variantes B y C, no arrojaron éxitos positivos acorde con los resultados esperados, por lo que se desecharon, definiéndose el estudio de estabilidad acelerada para el **HeberFast Line® Embarazo**, con la solución de migración en la variante D.

Un resultado colateral registrado en este estudio, fue el obtener fondos inespecíficos que evidentemente afectan la especificidad del ensayo (independientemente del sistema diagnóstico que se esté empleando), cuando se emplean muestras de orina que no son la primera orina del día o son muestras muy diluidas producto de haber ingerido abundante líquido previamente, o también cuando se utilizan muestras de orina de pacientes que cursan el período menstrual. Este resultado fue demostrado en reiteradas ocasiones con diferentes muestras de orina negativas a embarazo, con todas las variantes de estudio desarrolladas con nuestro diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo** e incluso con el **hCG-STRIP** de VEDALAB. Por ello es recomendable insistir en el empleo de la primera orina de la mañana para la ejecución del diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo**.

4.1.4. Corte de las tiras reactivas

En toda la evaluación desarrollada con las tiras reactivas del diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo**, tanto en su formato registrado de 50 determinaciones por estuche y 4 mm de ancho, así como en la nueva presentación desarrollada de 200 determinaciones por estuche y tiras reactivas de 3 mm, se obtuvieron los mismos resultados de desempeño (100 % de sensibilidad y 100 % de especificidad), para un 100 % de correlación entre ambas dimensiones. Resultados similares, son reportados por Ekawong y Wiwanitkit (2008), donde obtuvieron un 100 % de correlación

empleando un mismo ensayo inmunocromatográfico para el diagnóstico precoz del embarazo (IND Diagnostic One-Step hCG Test-Strip, IND Diagnostic INC.) con dimensiones de 5 mm y 3 mm respectivamente y utilizando un panel de 50 muestras de orina.

Estos resultados de mejora alcanzados para el diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo**, permiten el establecimiento de un nuevo formato de 5 tiras reactivas por sobre de aluminio plasticado, para estuches conteniendo 40 sobres, o sea 200 determinaciones. Esto permitió disminuir los costos de producción y con ello los precios del producto por unidad, desde 0,31 a 0,11 CUC. Asimismo se disminuyeron los costos en moneda nacional desde 3,64 hasta 2,00 pesos por unidad (Ver Tabla No.VI).

Tabla No. VI. Análisis de gastos por las Materias Primas directamente relacionadas con la producción del diagnosticador HeberFast Line® Embarazo. Costo individual en CUC.

		Tira Individual 4 mm	Tira Individual 3 mm
Materias Primas directas		Costo CUC	
1	mdi membrane laminate	0,038	0,028
2	mdi Conjugate Release Matrix	0,015	0,011
3	mdi Absorbent Pad	0,006	0,005
4	Aluminium Pouch	0,050	0,050
5	Silica Gel Desiccants	0,010	0,010
6	Estuche Exterior (Poligráfico)	0,003	0,003
7	Etiqueta p/Bolsa	0,017	0,017
8	Prospecto	0,0001	0,0001
9	Anticuerpo de captura	0,017	0,013
10	Poly - L Lysine	0,009	0,007
11	BSA (25 g)	0,003	0,002
12	Sacarosa (150 g)		
15	Conjugado	0,028	0,020
16	Otras sales y reactivos	0,0002	0,0002
17	Otros Gastos Directos (Tonner, Hojas)	0,01	0,01
Costo por Determinación (1 tira por bolsa)		0,21	0,18
Costo de 5 tiras por Bolsa		0,16	0,11
Costo de 10 tiras por Bolsa		0,15	0,11
Costo de 25 tiras por Bolsa		0,15	0,11
Costo de 50 tiras por Bolsa		0,15	0,11

Se valoró con estos resultados, no sólo conocer cual variante era más económica, sino también cual era la condición más viable para la estabilidad del producto, la conservación física de las tiras y su desempeño final. Por ello resultó ser la variante B de envasar 5 determinaciones por bolsa.

A principios del año 2008 se presenta al CECMED el informe pertinente sobre la nueva presentación de 200 pruebas / estuche, conteniendo 40 bolsas de aluminio con 5

pruebas cada una. Presentación de nuevas ediciones de las especificaciones del diagnosticador y del componente, de nuevas etiquetas del envase primario y secundario, de la literatura interior y además se presenta el informe final del estudio de estabilidad de la nueva presentación.

4.2. Precisiones del Límite de Detección del ensayo HeberFast Line® Embarazo frente al Estándar Internacional de Referencia.

El diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo**, brindó resultados positivos repetidos y consistentes con el 4^{to} estándar internacional de referencia en las concentraciones de 100 mUI/mL o superiores. Con las concentraciones inferiores los resultados fueron negativos. La intensidad de las bandas positivas, obtenidas con las concentraciones de 150, 200 y 650 mUI/mL de hCG, no se correspondieron con el incremento de la concentración de la hormona. La tira hCG-STRIP de la firma VEDALAB brindó resultados positivos consistentes hasta la concentración de 12,5 mUI/mL. Ambas tiras brindaron resultados negativos con la mezcla de orina negativa utilizada para preparar las diluciones finales del estándar. La evaluación de las tiras con los correspondientes estándares para las subunidades de la hCG, manifestó que la tira **HeberFast Line® Embarazo**, no reconoce ninguna de las subunidades por separado, sino que reconoce la molécula intacta (con sus dos subunidades no disociadas). La tira **hCG-STRIP** de VEDALAB arrojó resultados positivos con la subunidad β a 100 mUI/mL (no se probaron concentraciones menores del estándar por déficit del diagnosticador). Con el estándar para la subunidad α de la hCG la tira **hCG-STRIP** de VEDALAB brindó resultados negativos.

Los resultados con las 10 orinas de mujeres con menos de 15 días de amenorrea, fueron idénticos con las tiras de ambos fabricantes (8 muestras positivas y 2 negativas). Con las 13 muestras de orina, colectadas en nuestro laboratorio por la propia interesada, se obtuvieron resultados concordantes, para ambos fabricantes, en 9 de las 13 muestras. Cuatro muestras brindaron resultados positivos con la tira **HeberFast Line® Embarazo** y negativos por la tira **hCG-STRIP** de VEDALAB. De estos cuatro resultados positivos con la tira **HeberFast Line® Embarazo**, uno fue un

resultado positivo intenso, dos fueron resultados más débiles, pero evidentemente positivos y un cuarto resultado positivo dudoso.

La Agencia Norteamericana para los Medicamentos y los Alimentos (FDA) en la "Guidance for Over-the-counter (OTC) Human Chorionic Gonadotropin (hCG) 510(k)" de Julio del 2000, establece que con la disponibilidad actual de los estándares internacionales para esta molécula y sus subunidades por separado, es ahora posible que los fabricantes puedan caracterizar y definir la especificidad de sus ensayos para la hCG intacta y/o sus subunidades, pero que no es posible obtener uniformidad en los reportes de los resultados solamente con el uso de un mismo estándar, debido a la complejidad de la molécula y a que los diferentes inmunoensayos existentes en el mercado utilizan diferentes anticuerpos que reconocen regiones distintas de la misma. De los resultados obtenidos con el uso de estos estándares internacionales se corrobora que la tira **HeberFast Line® Embarazo** detecta solamente la hormona intacta y no sus subunidades disociadas, por el uso de dos anticuerpos monoclonales, contra cada una de las diferentes subunidades, por lo que la molécula capturada y que provoca la señal positiva tiene que tener ambas asociadas. Con el uso del estándar para la molécula intacta (4th IS) el límite de detección de la tira **HeberFast Line® Embarazo** es de 100 mUI/mL. Este resultado es coherente con los reportados para otros diagnosticadores de uso profesional o autoensayo para la detección de la hCG, cuando son evaluados con este estándar (Butler 2001; Cole 2004; Stenman 2004).

Basándonos en este resultado, en la observación de la no correspondencia entre el aumento en la intensidad de la señal positiva con el aumento en la concentración de la hormona hasta 650 mUI/mL y en la comparación de los resultados con el diagnosticador **hCG-STRIP** de VEDALAB, utilizando las muestras frescas de orinas de mujeres con sospecha de embarazo, es posible que la tira **HeberFast Line® Embarazo** detecte alguna de las variantes de la hormona intacta presente en la orina, diferente a la hCG "regular" intacta, variante mayoritaria en el 4th IS. De estas variantes, las mas estudiadas son la hCG hiperglicosilada (H-hCG) y la hCG cortada o "nicked" (hCGn), presentes ambas en pequeñas proporciones en el 4th IS (15 y 10 %,

respectivamente) (Cole and Khanlian 2007). Los estudios realizados en los últimos años, han reportado a la H-hCG (o antígeno invasivo trofoblástico, como también es conocido) como la variante principal de hCG en las primeras dos a tres semanas después de la implantación del embrión (Cole and Khanlian 2007). La H-hCG tiene un origen y una función completamente diferentes a las establecidas para la hCG "regular" (Cole and Khanlian 2007), reportándose que su detección mejora el diagnóstico y manejo de los embarazos ectópicos, permite la detección de los embarazos "clínicos" y no de los llamados embarazos "bioquímicos", que se presentan con una frecuencia de un tercio o un cuarto de los embarazos totales, en los que hay fertilización y producción de hCG, pero los niveles de H-hCG son mas bajos de lo normal o no detectables y por tanto no va a ocurrir la implantación y el embarazo va a fallar (Cole and Khanlian 2007). Además esta misma molécula disminuye su concentración a niveles no detectables en el suero y la orina antes que la hCG, después de un parto normal a termino, de un aborto, del tratamiento exitoso de un embarazo ectópico o después de la evacuación de una mola hidatidiforme, pues en estos eventos se eliminan las células productoras de la H-hCG (citotrofoblastos), no así las que producen hCG "regular" (sinciotrofoblastos), que pueden permanecer fuera del útero por tiempos más prolongados (Cole and Khanlian 2007). Una de las razones por la que se escogió la combinación de anticuerpos actualmente usadas en la tira **HeberFast Line® Embarazo** fue el hecho de que la misma brindaba resultados negativos con la orina de una mujer que había sido objeto de un legrado reciente y las otras combinaciones brindaron resultados positivos, hasta 15 días después de realizada la evacuación del embarazo. Esto sugiere que posiblemente estos anticuerpos detecten principalmente la H-hCG en lugar de la hCG "regular". Durante los últimos años la OMS y la IFCC han desarrollado y establecido varios Reactivos de Referencia o preparaciones, comercialmente disponibles, para la estandarización y caracterización de los inmunoensayos que detectan la hCG y sus moléculas relacionadas, las cuales están mejor caracterizadas que los estándares anteriores. Entre estas preparaciones se encuentra el Reactivo de Referencia RR 991642 del NIBSC para hCGn.

En la actualidad un Grupo de Trabajo de la IFCC esta trabajando en el establecimiento y caracterización de un estándar internacional para la H-hCG, pero varios fabricantes ofertan preparaciones comerciales bien caracterizadas de la misma.

4.3. Nueva presentación del diagnosticador precoz del embarazo.

Actualmente, este nuevo formato del diagnosticador está ya registrado por el CECMED como estuche de 200 pruebas con fecha del 18/03/2008; Folio 000128, Tomo 02 (Ver figura # 12) y no sólo representa indudablemente un considerable ahorro de divisas al país por concepto de sustitución de importaciones, sino que además impide que en un futuro inmediato, el país pueda privarse de este producto, ya que la compañía francesa VEDALAB fue recientemente adquirida por una multimillonaria y poderosa transnacional americana (Inverness Medical Innovation), que en cualquier oportunidad bloquea este suministro desde Francia al MINSAP.

Se favorece con esta nueva presentación del diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo**, tanto la producción y distribución del mismo a nivel nacional, así como ahorros por más del 60 %, por el empleo de materiales secundarios y contar con un producto más factible operacionalmente.



Figura # 12. Nueva presentación del estuche HeberFast Line® Embarazo. Formato de 200 determinaciones.

4.4. Resultados del estudio de estabilidad acelerada con muestras de orina y suero.

Para este estudio, se emplearon las tiras del Lote ET8003-3 pero con el conjugado en la solución de migración con la variante D, que fue la variante de estudio definida en el epígrafe 4.1.3.

En la **Tabla No. VII**, se puede apreciar que al octavo día experimental comenzó a observarse la afectación física de la migración de la reacción por la membrana de NC y con ello la obtención de la señal específica (límite de detección) en el período de tiempo requerido. Estos resultados se intensificaron más al noveno día de estudio, por lo que se define que hasta el octavo día las tiras funcionaron en concordancia con su especificación de desempeño.

El diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo** es factible de emplearse tanto con muestras de orina, como de suero humano. En ambas muestras el desempeño del diagnosticador fue similar, tanto la migración de la inmunoreacción por la membrana de nitrocelulosa como en la obtención del resultado esperado en el tiempo definido. De modo que hubo 100 % de concurrencia con el empleo de ambos tipos de fluidos biológicos para todos los casos evaluados tanto positivo como negativo.

De acuerdo a estos resultados, el sistema puede ser estable a temperatura ambiente (De 2 °C a 30 °C) por un período de hasta 2 años aproximadamente según se reporta por la literatura (Gunter 1999). Por lo que se solicita en el nuevo registro sanitario, un período de validez de 19 meses.

Tabla No. VII. Resultados de las pruebas de estabilidad acelerada del ensayo HeberFast Line® Embarazo en muestras de suero y orina.

Días de almacenamiento a 60 °C	Muestra Negativa hCG	Muestra positiva hCG débil (1 : 8)	Muestra positiva hCG fuerte (1 : 4)
	0 mUI/mL	100 mUI/mL	200 mUI/mL
1	6 correctos	6 correctos	6 correctos
2	6 correctos	6 correctos	6 correctos
3	6 correctos	6 correctos	6 correctos
4	6 correctos	6 correctos	6 correctos
5	6 correctos	6 correctos	6 correctos
6	6 correctos	6 correctos	6 correctos
7	6 correctos	6 correctos	6 correctos
8	6 correctos	5 correctos	5 correctos
9	3 correctos	2 correctos	4 correctos
10	1 correctos	0 correctos	1 correctos

Debido a que los datos nuestros son no paramétricos y relativos a variables cualitativas que difieren entre los diferentes días que transcurre el experimento de estabilidad acelerada, empleamos primeramente el estadígrafo Kruskal-Wallis, para conocer si no hay diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los días en que transcurrió el estudio (del día 1^{ro} al día 10). Observándose que evidentemente existe diferencia significativa ($P = 0.000$) (Figura # 13).

Luego, empleamos entonces el estadígrafo de Mann-Whitney U, para comparaciones pareadas. En este caso comparar si no existe diferencia significativa entre el día 1^{ro} y el 8^{vo} día; corroborándose que no existe la misma (2-Tailed $P = 0.151$). No así en el análisis entre el 1^{ro} y el 9^{no} día (2-Tailed $P = 0.000$), por lo que se rechaza la hipótesis nula planteada en nuestro experimento y se fija como tiempo de estabilidad acelerada del sistema por 8 días, a esta temperatura (figura # 14).

	DIA	N	Mean Rank	Test Statistics (a, b)	
VALOR					
	1,00	18	106,00	Chi-Square 107,307 df 9 Asymp. Sig. ,000	VALOR 107,307 9 ,000
	2,00	18	106,00		
	3,00	18	106,00		
	4,00	18	106,00		
	5,00	18	106,00		
	6,00	18	106,00		
	7,00	18	106,00		
	8,00	18	76,00		
	9,00	18	61,00		
	10,00	18	26,00		
	Total	180		a Kruskal Wallis Test b Grouping Variable: DIA	

Figura # 13. Resultados del análisis estadístico por estadígrafo Kruskal-Wallis.

Test Statistics (b) (1^{ro} y 8^{vo} día)

	VALOR
Mann-Whitney U	108,000
Wilcoxon W	279,000
Z	-2,646
Asymp. Sig. (2-tailed)	,008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,091(a)

a Not corrected for ties.
 b Grouping Variable: DIA

Test Statistics (b) (1^{ro} y 9^{no} día)

	VALOR
Mann-Whitney U	81,000
Wilcoxon W	252,000
Z	-3,416
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,010(a)

a Not corrected for ties.
 b Grouping Variable: DIA

Figura #14. Resultados del análisis estadístico de Mann-Whitney U test aplicado a los datos no paramétricos obtenidos en la prueba de estabilidad acelerada.

4.5 Mejoras en el desempeño del diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa para el diagnóstico de la enfermedad celíaca.

Como parte de las mejoras desarrolladas para el diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa se obtuvo un nuevo formato, el cual fue también registrado por el CECMED con fecha del 22/05/2008, Folio 000130, Tomo 02, como modificación al diagnosticador anterior que sólo era empleado con muestras de suero. El diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa actual permite su empleo con muestras de sangre, suero o plasma humano, en estuches de 25 pruebas, contemplando además la inserción como componentes de 25 capilares heparinizados y 25 lancetas estériles (Figura # 15). De igual manera, se desarrolló en paralelo una presentación para autoprueba, la cual está más dirigida a su empleo por el propio personal interesado en conocer el diagnóstico o seguimiento de la enfermedad. Esta última presentación responde a necesidades de clientes extranjeros, interesados en el diagnosticador (Figura #16). Sistemas similares se han desarrollado por otros autores, tales como reporta Ferrer-López y colaboradores (2004) y Rashid y colaboradores (2009), que refieren significación a este tipo de sistema, fundamentalmente para su aplicación directa como primer control (screening) en los puntos de atención primaria (Point Of Care), precisamente dada la importancia que requiere el mismo por la prevalencia de la enfermedad, haciendo énfasis no obstante, en el consiguiente diagnóstico clínico definido como estándar de oro para la celiaquía, que es la biopsia intestinal.

Con los componentes incluidos en el nuevo formato del diagnosticador, se facilita la operación con el mismo y por ende su desempeño. Sólo basta con una pequeña muestra de sangre (mediante punción digital empleando una lanceta estéril proporcionada en el estuche), la cual se extrae utilizando el microcapilar heparinado y se aplica directamente en el pocillo de la muestra, en el casete plástico, garantizando que la mayor parte del contenido del microcapilar ha sido depositado, golpeando suavemente el extremo del mismo en el fondo interior del pocillo (Figura # 17). Para muestras de suero o plasma, es suficiente aplicar 3 gotas (entre 80 y 100 μ L), para lo

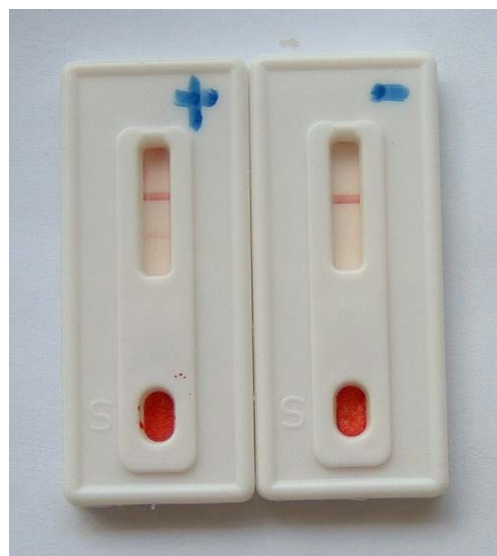
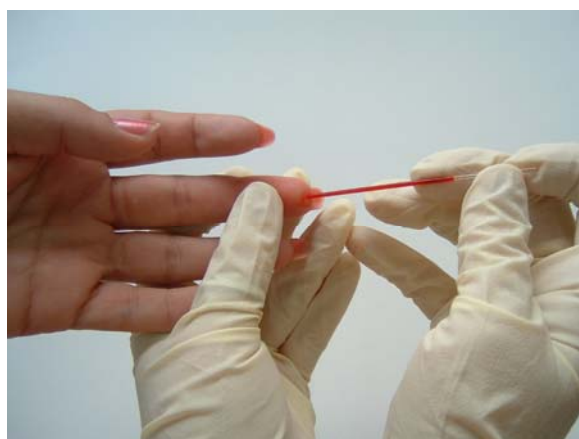
cual se puede auxiliar también de uno de los capilares suministrados. Los resultados son registrados transcurridos 15 minutos después de aplicar la muestra (Figura # 18).



Figura #15. Diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa. Estuche para 25 pruebas.



Figura # 16. Diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa. Estuche individual (Autoprueba), conteniendo; una tira reactiva, una lanceta estéril, un microcapilar heparinizado y una almohadilla con



Resultados visibles a los 15 minutos o antes.

Figura # 17. Diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa. Desempeño del ensayo.

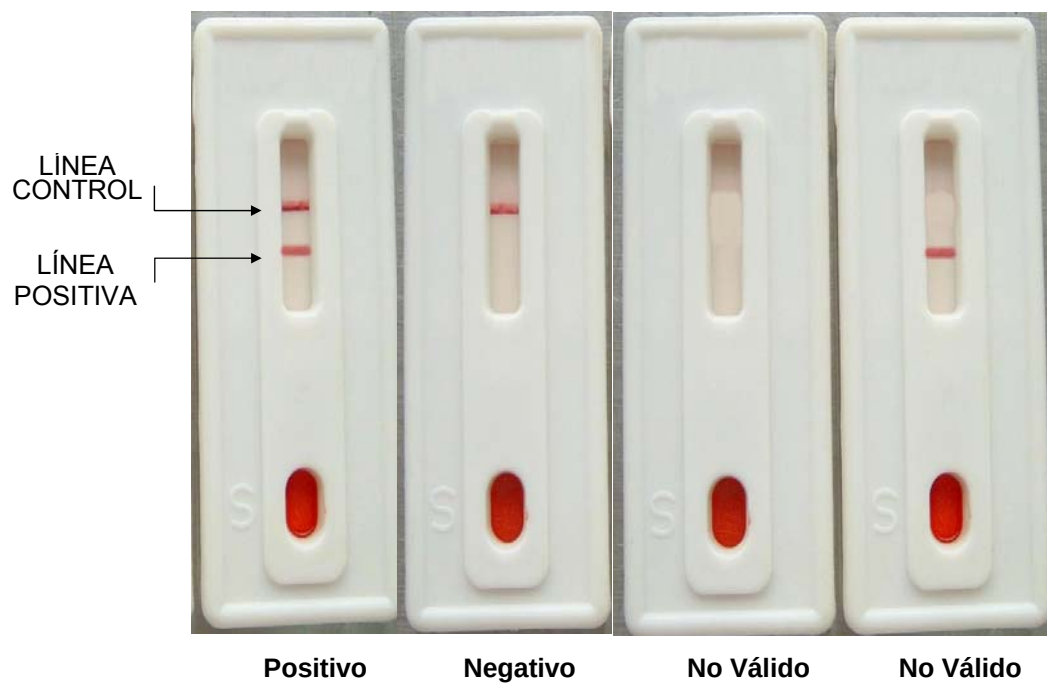


Figura # 18 HeberFast Line® anti-transglutaminasa. Posibles resultados a obtener.

4.5.1 Evaluación de desempeño del diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa, con muestras de suero y sangre.

Los resultados fueron coincidentes para las 54 muestras de sangre y las 54 correspondientes de suero, tanto con el nuevo como con el anterior diseño, para un 100 % de concordancia de los resultados. Cuarenta y ocho muestras dieron resultados negativos (88,9 %) y seis positivos (11,1 %). Los resultados de las muestras con la adición del suero positivo en dilución final 1:50 también fueron positivos débiles en todos los casos. La intensidad de la señal obtenida en las líneas positiva y de control fue similar para la muestra de suero y sangre en todos los casos.

Estos resultados corroboran los obtenidos previamente con este nuevo diseño, en la etapa de desarrollo del producto, comprobándose que las características de desempeño evaluadas son similares a la del diseño anterior y que la sangre como muestra no interfiere en el posible resultado a obtener con esta prueba, ya sea negativo o positivo (débil o fuerte).

Este nuevo formato del diagnosticador de la enfermedad celíaca; **HeberFast Line® anti-transglutaminasa** para su empleo con muestras de sangre, suero o plasma humano fue validado también por la compañía norteamericana INNOVA DIAGNOSTIC Inc. contra un panel de referencia de 39 muestras de suero humano, caracterizados previamente por diferentes sistemas analíticos, donde solamente hubo un resultado discordante, para un 97,43 % de correlación (Tabla No. VIII). Asimismo se reporta que con este diagnosticador, es muy fácil ejecutar la prueba. Los resultados positivos son fácilmente interpretados mucho antes de los 15 minutos establecidos, incluso en algunos casos con muestras de suero con altos títulos de anticuerpos anti-transglutaminasa, el resultado es obtenido en menos de 2 minutos. No se aprecian fondos inespecíficos en las membranas y el diagnosticador es capaz de detectar niveles muy bajos de anticuerpos anti-transglutaminasa, así como también detectar anticuerpos de subclase IgA en diferentes muestras de suero.

Tabla No. VIII Resultados obtenidos por INNOVA DIAGNOSTIC Inc.

sample #	Diagnosis	Lateral Flow result	INOVA tTG units	INOVA h-tTG IgA units	INOVA h-tTG IgG units	INOVA Luminex tTG IgA units	INOVA Luminex DGP IgA units
N198	normal	negative	<20	<20	<20	<20	<20
N229	normal	negative	<20	<20	<20	<20	<20
N231	normal	negative	<20	<20	<20	<20	<20
N232	normal	negative	<20	<20	<20	<20	<20
N234	normal	negative	<20	<20	<20	<20	<20
N241	normal	negative	<20	<20	<20	<20	<20
N251	normal	positive	<20	<20	<20	<20	<20
N266	normal	negative	<20	<20	<20	<20	<20
NCP	normal	negative	<20	<20	<20	<20	<20

4.5.2. Resultados del estudio de estabilidad acelerada con el diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa empleando muestras de sangre.

En el estudio acelerado con las tiras envasadas y almacenadas a 60 °C, los resultados fueron satisfactorios hasta el séptimo día, no así en el octavo día, donde la migración no ocurrió en algunas de las tiras evaluadas.

Las tiras almacenadas sin envasar y a temperatura de 20 a 22 °C y de 50 a 60 % de humedad relativa brindaron resultados satisfactorios hasta los doce días.

Los resultados obtenidos en este estudio acelerado, nos permiten predecir que el diagnosticador **HeberFast Line® anti-transglutaminasa**, en su nuevo diseño que permite el uso de sangre como muestra, es estable al menos 24 meses después de la fecha de fabricación, almacenado de 2 a 30 °C. Para esta estimación nos basamos en referencias a resultados anteriores de estudios acelerados obtenidos con otros diagnosticadores. De acuerdo a estos resultados, el sistema puede ser estable a temperatura ambiente (De 2 °C a 30 °C) por un período de hasta 2 años

aproximadamente en concordancia con lo descrito a nivel internacional (Gunter 1999). Por lo que se solicita en el nuevo registro sanitario, un período de validez de 19 meses, teniendo en cuenta un 20 % de cobertura.

En la figura # 19 se aprecia el algoritmo definido para el diagnóstico de la enfermedad celíaca, según las recomendaciones de la European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN) y la North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (NASPGHAN), es la dirección a seguir en el diagnóstico resolutorio de la EC.

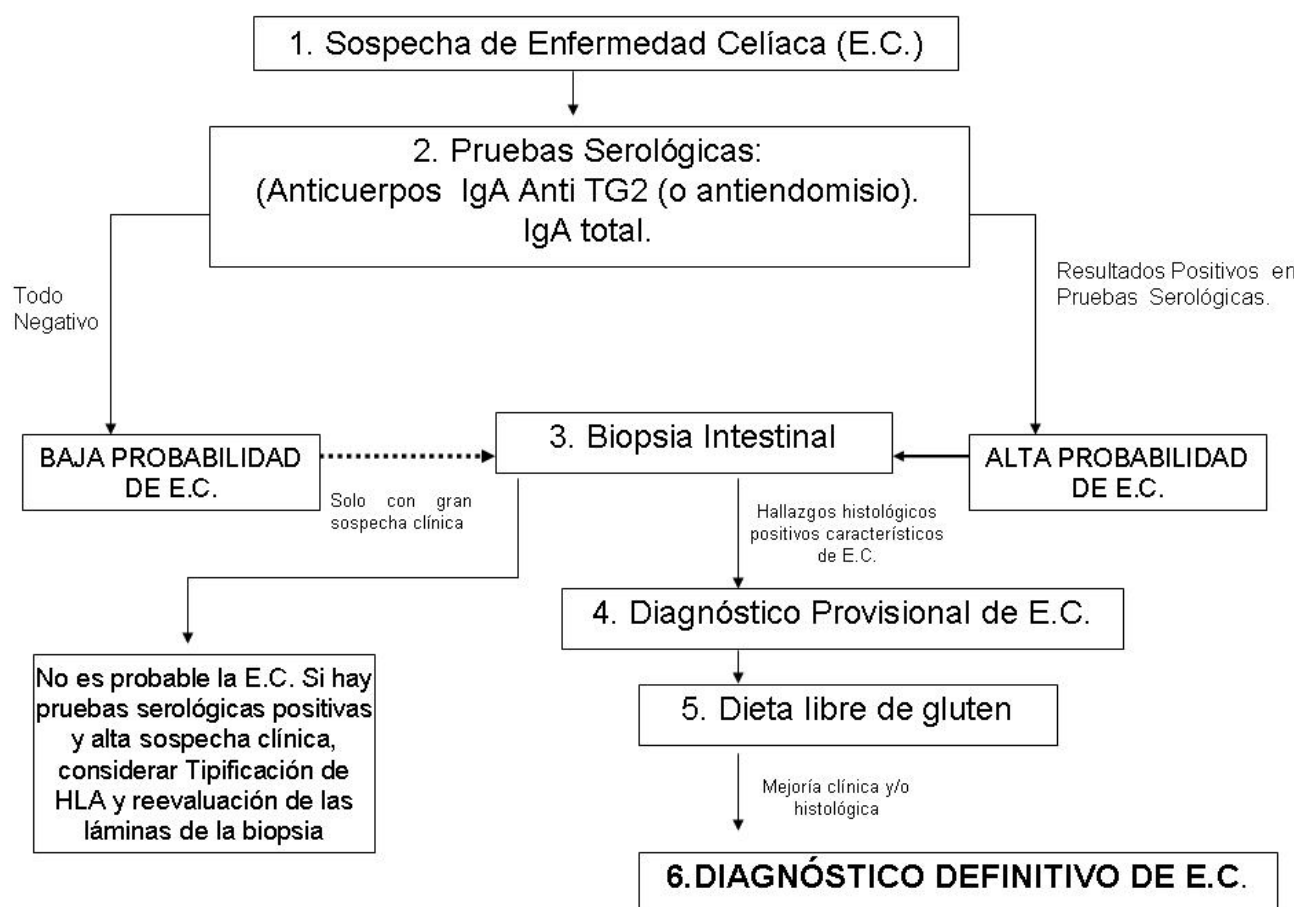


Figura # 19 Algoritmo definido para el diagnóstico de la enfermedad celíaca.

CONCLUSIONES.

1. Empleando la mezcla de anticuerpo policlonal anti – IgG de ratón y Poli L-lisina en la línea de control de los sistemas diagnósticos, se disminuye de 2 centavos a 0,3 centavos (CUC) por cada determinación.
2. El rechazo de las tarjetas de nitrocelulosa por los problemas presentes con la Humedad Relativa en la etapa de recubrimiento es el principal factor que incide en las pérdidas del proceso productivo.
3. Se define como norma de calidad para el trabajo con las membranas de nitrocelulosa en el área de recubrimiento, un rango de Humedad Relativa en el local; de 60 ± 10 % en aras de obtener rendimientos productivos en un rango de 70 ± 10 tiras por cada tarjeta de nitrocelulosa procesada.
4. Empleando la solución de Sacarosa 20 % (diluida en TRIS 2 mol/L), BSA 10 %, Tritón X-100 0.5 % y Tween 20 al 1 %, para diluir el conjugado del diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo**, se logró eliminar los fondos inespecíficos obtenidos con muestras de orina de baja molaridad.
5. Con el ajuste de las dimensiones de las tiras del diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo** a 3 mm de ancho y el envase de las mismas a razón de 5 tiras por bolsa (Estuche de 200 determinaciones), se logró disminuir los costos de producción y con ello los precios del producto por unidad, desde 0,31 a 0,11 CUC y desde 3,64 hasta 2,00 pesos por unidad.
6. Se define que la tira **HeberFast Line® Embarazo** detecta alguna de las variantes de la hormona intacta presente en la orina, diferente a la hCG "regular" intacta, fundamentalmente la hCG hiperglicosilada (H-hCG).

7. La introducción del asperjador en el área de recubrimiento para garantizar la sensibilización de los soportes sólidos (membranas de nitrocelulosa), permitió reducir considerablemente los niveles de desechos productivos, cuando se trabajan en el área grandes cantidades de materiales debido a incrementos en la producción.
8. La adaptación de los recipientes empleados en la etapa de Bloqueo de las membranas de NC, permitió un ahorro estimado en más de 400,00 CUC por concepto del mejor aprovechamiento de la solución de bloqueo y más de 2 500,00 pesos por concepto de ahorros en salario, depreciación y energía al emplear mejor el fondo de tiempo productivo disponible.
9. El estudio de estabilidad acelerada, tanto para el diagnosticador **HeberFast Line® Embarazo**, como para el diagnosticador **HeberFast Line® anti-transglutaminasa**, arrojó resultados satisfactorios hasta los 8 y 7 días respectivamente, almacenado los mismos bajo un estrés de temperatura de 60 °C. Por lo que se propone un periodo de validez para los mismos de 19 meses en su nuevo diseño, almacenándolos de 2 a 30 °C, que incluye el uso de muestras de suero y orina para el diagnóstico del embarazo y muestras de sangre, suero o plasma humano para el diagnosticador de la EC, teniendo en cuenta un 20 % de cobertura.
10. Se logró un mejor desempeño, versatilidad y competencia con el nuevo formato desarrollado del diagnosticador HeberFast Line® anti-transglutaminasa

RECOMENDACIONES.

1. Se recomienda la adquisición de un estándar de referencia que contenga la H-hCG, para evaluar si verdaderamente el sistema diagnóstico **HeberFast Line® Embarazo** detecta esta variante de la hCG.
2. Se sugiere continuar con los estudios de estabilidad a tiempo real con los lotes de tiras producidas para ambos diagnosticadores y a temperaturas desde 2 a 30 °C, con la finalidad de mejorar su distribución, post comercialización y con ello evitar gastos por concepto de mantener la cadena de frío en estos productos.
3. Formalizar ante el órgano regulador nacional (CECMED) la nueva presentación (autopueba) del diagnosticador **HeberFast Line® anti-transglutaminasa**.
4. Incorporar los resultados obtenidos en este trabajo, en los procedimientos documentales establecidos por las Buenas Prácticas de Fabricación en el CIGB SS, para la producción de estos diagnosticadores biomédicos.

BIBLIOGRAFÍA.

Åhman, Elisabeth, et al. (2002). "Unsafe abortion: Worldwide estimates for 2000." Reproductive Health Matters **10**(19): 13-17.

Alonso, T. M. and M. V. Sánchez. (2005). "Hormona Gonadotropina Corionica Humana." from <http://www.ilustrados.com/publicaciones/EEEYyFyElmWebcpes.php>.

Bergseng, E., J. Xia, et al. (2005). "Main chain hydrogen bond interactions in the binding of proline-rich gluten peptides to the celiac disease-associated HLA-DQ2 molecule. ." J Biol Chem. **280**: 21791-21796.

Bhatnagar, S., S. D. Gupta, et al. (2005). " Celiac disease with mild to moderate histologic changes is a common cause of chronic diarrhea in Indian children." J Pediatr Gastroenterol Nutr **41**: 204-209.

Bidart, J. M. and D. Bellet (1993). "Human Chorionic Gonadotrophin. Molecular Forms, Detection and Clinical Implications." Trends Endocrinol Metab **4**: 285-291.

Birken, S., M. A. Gawinowicz, et al. (1991). "Characteristics and origins of nicks in hCG reference standards. Endocrinology;." The heterogeneity of human Chorionic Gonadotrophin II. **129**: 1551-58.

Blanco, R. E., G. E. Sagaró, et al. (1980). " Demonstration of celiac disease in Cuba." Bol Med Hosp Infant Mex. **37**: 587-597.

Boime, I., M. Boothby, et al. (1982). "Expression and structure of human placental hormone genes as function of placental development." Biol. Reprod **26**: 73-91.

Bonamico, M., P. Mariani, et al. (2004). "Patchy villous atrophy of the duodenum in childhood celiac disease. ." J Pediatr Gastroenterol Nutr ; **38**: 204-207.

Braunstein, G., J. Rasor, et al. (1986). " Serum human chorionic gonadotropin levels throughout normal pregnancy." Am J Obstet Gynecol **126**: 678-681.

Braunstein, G. D., J. Rasor, et al. (1976). "Serum human Chorionic Gonadotrophin levels throughout normal pregnancy." Am J Obstet Ginecol **126**: 678-681.

Briani, C., D. Samaroo, et al. (2008). "Celiac disease: From gluten to autoimmunity." Autoimmunity Reviews **7**: 644-650.

Butler, S. A. (2001). "Detection of early pregnancy forms of human chorionic gonadotropin by home pregnancy test devices." Clin Chem **47**(12): 213 1-21 36.

Cardellà, R., L. and F. Hernández, Rolando. (1999). "Bioquímica Médica." Editorial Ciencias Médicas.

Carlsson, A., D. Agardh, et al. (2006). " Prevalence of celiac disease: before and after national change in feeding recommendation. ." Scand J gastroenterol **41**: 553-558.

Cintado, A., L. Sorell, et al. (2006). "HLA DQA1*0501 and DQB1*02 in Cuban celiac patients." Hum Immuno **67**: 639-642.

Cole, L. (2002). "Use of hCG tests for evaluating trophoblastic diseases: Choosing an appropriate hCG assay, false detection of hCG, unexplained elevated hCG, and quiescent trophoblastic disease." USA hCG Reference Service Report.

Cole, L. (2004). "Accuracy of home pregnancy tests at the time of missed menses." Am J Obstet Gynecol **190**: 100-105.

Cole, L. (2007). "Hyperglycosylated hCG Review. USA hCG Reference Service." Placenta **10**: 977-986.

Cole, L., S. A. Butler, et al. (2006). "Gestational trophoblastic diseases: 2. Hyperglycosylated hCG as a reliable marker of active neoplasia." Gynecol Oncol **102**: 151 - 159.

Cole, L., D. Dai, et al. (2005). "Gestational Trophoblastic Diseases: 1. Pathophysiology of Hyperglycosylated hCG." Gynecol Oncol

Cole, L., A. Kardana, et al. (1991b). " The occurrence biological and immunological activities of nicked hCG. Endocrinology." Birken S. The heterogeneity of hCG I **129**: 1159-1567.

Cole, L., A. Kardana, et al. (1991a). "The biological and clinical significance of nicks in human Chorionic Gonadotrophin and its free b subunit. ." The Yale Journal of Biology and Medicine **64**: 627-637.

Cole, L. and S. A. Khanlian (2007). "Hyperglycosylated hCG: a variant with separate biological functions to regular hCG." Mol Cell Endocrinol: 260-262:228-36.

Cole, L. and J. M. Sutton (2004). "Selecting an appropriate hCG test for managing gestational trophoblastic disease and cancer." J Reprod Med **49**: 545 -553.

Cole, L. A., D. B. Seifer, et al. (1993). "Selecting human chorionic gonadotropin immunoassays: Consideration of crossreacting molecules in first trimester pregnancy serum and urine." Am. J. Obstet. Gynecol. **168**: 1580-1586.

Cone, R. (1985). "Application of Monoclonal antibodies to clinical diagnostic assays." J. Med. Tech. **2**: 279-284.

Costantini, S., M. Rossi, et al. (2005). "Modelling of HLA-DQ2 and its interaction with gluten peptides to explain molecular recognition in celiac disease." J Mol Graph Model. **23**: 419-431.

Chian, R. C., W. M. Buckett, et al. (2000). " Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome." Human Reproduction **15**(1): 165-170

Dall'asta, C., G. Galaverna, et al. (2009). " Free and bound fumonisins in gluten-free food products." Mol Nutr Food Res.

Daviaud, J., D. Fournet, et al. (1993). "Reliability and feasibility of pregnancy home-use tests laboratory validation and diagnostic evaluation by 638 volunteers." Clin Chem **39**(1): 53-59.

Di Cagno, R., M. De Angelis, et al. (2002). "Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. ." Appl Environ Microbiol **68**: 623-633.

Dieterich, W., T. Ehnis, et al. (1997). "Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease." Nat Med **7**: 797-801.

Esteve, M., M. Rosinach, et al. (2006). "Spectrum of gluten-sensitive enteropathy in first-degree relatives of patients with coeliac disease: clinical relevance of lymphocytic enteritis." Gut **55**: 1739-1745.

Fernández, M. L., S. Vivas, et al. (2005). " Usefulness of anti- transglutaminase antibodies in the diagnosis of celiac disease." Gastroenterol Hepatol **8**: 437-440.

Galvan, J. A., B. Acevedo, et al. (2008). " Desarrollo, validación y registro del sistema HeberFast Line antitransglutaminasa. Contribución al diagnóstico de la enfermedad celiaca." Biotecnología Aplicada **25**: 62-65.

Gambino, R. (1996). " Human Chorionic Gonadotrophin: Multiple Degradation Products Confound Assays." A monthly Update on Laboratory Diagnosis **18**(5): 33-37.

Garrote, J. A., J. A. Galván, et al. (2004). " Celiac Disease diagnosis in patients with giardiasis: high value of antitransglutaminase antibodies. ." Am J Gastroenterol **99**(7): 1330-1332. .

Geneva (2003). Technical and policy guidance for health systems, World Health Organization (WHO).

Goldberg, A. B., D. Gillian, et al. (2004). "Manual versus electric vacuum aspiration for early first-trimester abortion:A controlled study of complication rates." American College of Obstetricians and Gynecologists **103**(1).

- Greco, L., R. Romino, et al. (2002). "The first large population based twin study of celiac disease." Gut **50**: 624-628.
- Green, P. H. R. and C. Cellier (2007). " Celiac disease." N Engl J Med **357**: 1731-1743.
- Green, P. H. R., S. N. Stavropoulos, et al. (2001). " Characteristics of adult celiac disease in the USA." Am J Gastroenterol **96**: 126-131.
- Gunter, C. (1999). Accelerated Stability Testing. BioDOT Inc. Milan Workshop, BioDOT Inc. Milan Workshop.
- Hay, D. L. (1985). " Discordant and variable production of hCG and its free a and b subunits in early pregnancy. ." Clin Endocrinol Metab **61**:: 1195-1200.
- Hussa, R. (1991). "Human chorionic gonadotropin, a clinical marker: review of its biosynthesis. ." Ligand Rev **3**(2): 6-43.
- Hussa, R. O. (1981). "Human Chorionic Gonadotrophin, a clinical marker: review of its biosynthesis." Ligand Rev **3**(2): 6-43.
- Iles, R. K., P. E. Purkis, et al. (1990). " Expression of human Chorionic Gonadotrophin by non-trophoblastic non-endocrine normal and malignant epithelial cells." Br J Cancer **61**(5): 663-6.
- Kardana, W. and L. A. Cole (1990). "Serum hCG beta core fragment is masked by associated macromolecules." J Clin Endocrinol Metab **17**: 1393-1395.
- Kaukinen, K., M. Peräaho, et al. (2005). " Small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in coeliac disease without villous atrophy: a prospective and randomized clinical study." Scand J Gastroenterol. **40**:: 564-572.
- Kurppa, K., P. Collin, et al. (2008). " Diagnosing Mild Enteropathy Celiac Disease: A Randomized, Controlled Clinical Study." Gastroenterology.
- Leeds, J. S., A. D. Hopper, et al. (2008). "Coeliac disease." Br Med Bull. **88**: 157-170.
- Llusia, J. and C. Núñez (1984). Ginecología **13**.
- Miller, E. and J. Fortney (1996). "Early vacuum aspiration. Minimizing procedures to non pregnant women." Fam Plann Perspect **8**: 33-38.
- Mitea, C., M. Moester, et al. (2006). "Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **291**(4): G621-9.

Monteiro, J. C., G. Barker, et al. (1982). " Ectopic production of human Chorionic Gonadotrophin (hCG) and human placental lactogen (hPL) by ovarian carcinoma." Eur J Clin Oncol **2**: 173-178.

Nieto, A. J. and E. R. Pérez (1988.). Método de Regulación Menstrual.

Nurit, R., M. Imbar, et al. (1984). " Monoclonal antibody especific to the beta subunit of human chorionic gonadotropin (hCG) and capable of agglutinating hCG-coated red blood cells." Hybridoma **3**(1): 49-55.

Ooi, S. D., L. S. Perkins, et al. (1989). "Serum human Chorionic Gonadotrophin levels in early pregnancy." Clin Chem Act **181**: 282-292.

Persson, L., A. Ivarsson, et al. (2002). " Breast-feeding protects against celiac disease in childhood-epidemiological evidence." Adv Exp med Biol **503**: 115-123.

Peter, B. P., R. F. Krxesicky, et al. (1984). "A kinetic comparison of the processing and secretion of alfa-beta dimer and the uncombined alpha and beta subunits of Chorionic Gonadotrophin synthesized by human choriocarcinoma cells." J Biol Chem **259**: 15123-15130.

Porstmann, T. and S. T. Kiessig (1992). " Enzyme immunoassay techniques. An overview." J Immunol Methods **150**: 5-21.

Price, C. P. and D. J. Newman (1991). Principles and practice of immunoassay, Macmillan

Rabassa, E. B., E. Sagaró, et al. (1981). "Coeliac disease in Cuban children." Arch Dis Child **56**(2): 128-231.

Rampertab, S. D., N. Pooran, et al. (2006). "Trends in the presentation of celiac disease." Am J Med **119**(4): 355.e9-14.

Ravelli, A., S. Bolognini, et al. (2005). "Variability of histologic lesions in relation to biopsy site in gluten sensitive enteropathy." Am J Gastroenterology Garrote JA, **100**: 177-185.

Rigol, R., O. (2004). Obstetricia y Ginecología: 243-50.

Rodríguez, P. B., R. D'espaux, et al. (2004). "Anticuerpos monoclonales contra la gonadotropina coriónica humana (hCG) para su uso en la detección de embarazo. ." Rev Cubana Endocrinol **15**(3.).

Sagaró, E. and N. Jimenez (1981). "Family studies of coeliac disease in Cuba." Arch Dis Child **56**: 132-133.

Seppälä, M. and M. Purhonen (1987). "The use of hCG and other pregnancy proteins in the diagnosis of ectopic pregnancy." Clin Obstet Ginecol **30**: 148-154.

Siegel, M., M. T. Bethune, et al. (2006). " Rational design of combination enzyme therapy for celiac sprue." Chem Biol **13**: 649-658.

Sollid, L. M. and B. A. Lie (2005). " Celiac disease genetics: current concepts and practical applications." Clin Gastroenterol Hepatol. **3**: 843-851.

Sorell, L., J. A. Garrote, et al. (2002). "One-step immunochromatographic assay for screening of coeliac disease." Lancet. **359**: 945-946.

Stenman, U. (2004). "Standardization of assays for hCG." Clin Chem **50**(5): 798-800.

Sugantha, S. E., S. Webster, et al. (2000). " Predictive value of plasma human chorionic gonatrophin in following assisted conception treatment." Hum Rep **15**(1).

Torres, E. and M. Muñoz (1998). "Validación clínica del inmunoensayo rápido BioLine-hCG para el diagnóstico precoz del embarazo BioLine-hCG." Cubana Med **37**(3): 131-135.

Torres, E. and R. Rosquete (1994). "Detección del síndrome de Down utilizando marcadores bioquímicos." 3 de Diciembre **8**(1).

Tursi, A. and G. Brandimarte (2003). "The symptomatic and histologic response to a gluten-free diet in patients with borderline enteropathy." J Clin Gastroenterol. **36**: 13-17.

Tursi, A., G. Brandimarte, et al. (2006). "Endoscopic and histological findings in the duodenum of adults with celiac disease before and after changing to a gluten-free diet: a 2-year prospective study." Endoscopy **38**: 702-707.

Uzandizaga, J. A. and P. De la Fuente (1998). Tratado de Obstetricia y Ginecología. Madrid, España, Editorial Interamericana S.A.

Valero, F. (1987). "Conización y Legrado Uterino." Obstet y Ginecol **46**: 409-4.

Weinans, M. J., U. Sancken, et al. (2005). "Invasive trophoblast antigen (hyperglycosylated human chorionic gonadotropin) as a first-trimester serum marker for down syndrome." Clin Chem **51**: 1276 - 1279.

Willians. and J. D. Wilson (1998). Endocrinology, Sandren Company. .

Zotta, T., P. Piraino, et al. (2006). " Proteolysis in model sourdough fermentations." J Agric Food Chem **54**: 2567-7254.

