



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 279 980**

51 Int. Cl.:
G01N 33/558 (2006.01)
G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03787825 .3**
86 Fecha de presentación : **14.08.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1538445**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2005**

54 Título: **Sistema y procedimiento inmunocromatográfico para la identificación simultánea de anticuerpos frente a AGA y t-TG, y su uso en el diagnóstico de enfermedad celiaca.**

30 Prioridad: **16.08.2002 ES 200201939**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.09.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.09.2007

73 Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Operón, S.A.**

72 Inventor/es: **Méndez Cormán, E.;**
Genzor Asín, Carlos Gustavo;
Gamén Sierra, Susana;
Corbatón Pamplona, Vicente Manuel;
Navarro Galindo, Antonio y
Villacampa Ruiz, Manuel

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 279 980 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema y procedimiento inmunocromatográfico para la identificación simultánea de anticuerpos frente a AGA y t-TG, y su uso en el diagnóstico de enfermedad celiaca.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuadra en el área de la biotecnología, y en concreto en el diagnóstico de enfermedades humanas. El objeto de esta invención es un procedimiento rápido y sencillo de identificación de anticuerpos anti-antígenos asociados con la enfermedad celiaca (EC) en muestras de suero, plasma o sangre de humanos.

Estado de la técnica

La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía caracterizada por una intolerancia a proteínas del trigo, centeno, 15 cebada y avena (gluten) en individuos genéticamente predispuestos. La lesión intestinal está inmunológicamente mediada, siendo la gliadina el disparador de una serie de cascadas que producen una activación del sistema inmune y desembocan en la producción del aplanamiento de la mucosa intestinal y la hiperplasia de las criptas (Marsh. Correlative aspects of mucosal Pathology across the spectrum of gluten-sensitivity. In. C.F.a. C.O'Farrelly de. Gastrointestinal Immunology and Gluten-sensitive disease. Dublin: Oak Tree Press, 1994: 145-157). La prevalencia de la EC, incluyendo tanto la sintomática como la silente o atípica, recientemente se ha estimado en 1/160 cuando se realiza el análisis de la misma en la población general. La mortalidad ligada al mayor riesgo de neoplasias, así como la morbilidad -que incluye abortos, osteopenia, osteoporosis, enfermedades autoinmunes, etc- asociada con la EC no tratada, clama por un diagnóstico temprano, cuyos beneficios se han demostrado después de suministrar una dieta libre de gluten. Para confirmar la enteropatía es necesaria una biopsia de intestino delgado con estudio histopatológico, así como distintas 25 pruebas serológicas frente a antígenos celulares o de los alimentos que han ganado en aceptación en los últimos años para seleccionar a los candidatos para la realización de dicha biopsia intestinal.

Desde que recientemente se identificó la transglutaminasa tisular (t-TG) como el mayor autoantígeno presente en las estructuras del endomisio (Dieterich W, Ehnis T, Bauer M *et al.*, Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nat Med 197; 3: 797-801; WO 98/03872 Immunological process for detecting antibodies directed towards tissue transglutaminase (TTG), use of TTG for diagnostic purposes and therapy control, and oral pharmaceutical agent containing TTG, Schuppan D, Dieterich W), la técnica ELISA frente a t-TG es la más aceptada universalmente para el despistaje en el diagnóstico de la Enfermedad Celiaca (EC). Otros autores propugnan un ensayo inmunológico donde los anticuerpos de los enfermos de EC reaccionarían mejor con un antígeno formado por la t-TG y un sustrato de la misma (WO01/29090, IMMCO DIAGNOSTICS, Immunological assay for detection of antibodies in celiac disease).

Por otro lado, se ha descrito un ensayo inmunocromatográfico de un paso para la detección de los anticuerpos tipo IgA y IgG frente a la t-TG en plasma o suero humano (Sorell L, Garrote JA, Acevedo b *et al.*, One-step immunocromatographic assay for screening of coeliac disease. Lancet 2002; 359: 945-946). De acuerdo con estos últimos autores el ensayo inmunocromatográfico anti t-TG presentó una sensibilidad y una especificidad del 100% en el diagnóstico de la EC, es decir, unos datos similares a los obtenidos con biopsia intestinal que constituye la prueba patrón oro en el diagnóstico de la EC. Sin embargo, hay que indicar que dicho trabajo se realizó en un pequeño grupo de pacientes con EC (n=50) por lo que estos resultados deben considerarse como excesivamente prometedores. Estos mismos autores presentaron una patente relacionada con el uso teórico de t-TG en la elaboración de un ensayo inmunocromatográfico para el diagnóstico de EC aunque no indicaron ninguna realización práctica de dicho ensayo ni resultados concretos con muestras de pacientes con EC (EP1164375, Assay for anti transglutaminase antibodies, Sorell LT, Aroya H, Acevedo, BE, Cerro, H).

Los anticuerpos antigliadina (AGA) también son indicativos de EC aunque la especificidad de los ensayos ELISA anti-AGA realizados es menor que con los otros ensayos y deben realizarse ensayos separados para la identificación de los anticuerpos IgA y IgG. También existe recientemente un ensayo visual de diagnóstico de AGA (Garrote J A, Sorell L, Alfonso P *et al* 1999. A simple visual immunoassay for the screening of coeliac disease. Eur. J Clin Invest 29; 697-699) y un inmunoensayo en fase sólida para anticuerpos específicos frente a AGA (ES 2141679). Otra patente relacionada con el diagnóstico de EC mediante la identificación de anticuerpos antigliadina es la patente WO 00/25793 (Diagnosis of coeliac disease using a gliadin epitope, Anderson R, Hill A, Jewell, D) aunque es un procedimiento laborioso al manejarse linfocitos T *in vitro*.

Bazzigaluppi *et al.* (Bazzigaluppi E. *et al.*, Journal of Autoimmunity, Vol. 12, No. 1, Feb. 1999, pp 51-56) describen un ensayo de radiounión para IgG e IgA específicas frente a t-TG; las IgA e IgG para AGA se miden mediante relaciones competitivas con métodos inmuno-enzimáticos. También se han descrito métodos ELISA para medir IgA frente a AGA e IgA frente a t-TG (Palacios eE. *et al.*, An. Esp. Pediatr. Vol. 53, Nnº 6, Julio 2000, pp 542-546).

Por todo ello, aunque la sensibilidad y especificidad de los marcadores serológicos, tales como anticuerpos antigliadina (AGA), anti-endomisio (EmA) y anti-transglutaminasa tisular (t-TG) puede ser alta, la realización de dichas técnicas de ELISA y de inmunofluorescencia requieren laboratorios bien equipados y una plantilla cualificada, que no puede estar disponible en todo el mundo, y la repetición de las técnicas para una misma muestra biológica para identificar las distintas IgA, IgG o IgM.

Por tanto, de ahí el interés en desarrollar un nuevo método de ensayo, más barato y fácil de realizar, para ser usado en el diagnóstico de la EC, especialmente en poblaciones de riesgo. Hasta ahora sólo unos pocos de estos ensayos se han desarrollado, la mayoría de los cuáles están basados en la respuesta serológica frente a la gliadina y últimamente frente a la t-TG, que se han determinado como los anticuerpos más frecuentes asociados a EC. El procedimiento que se describe en esta patente es el primer procedimiento visual que usa t-TG humana recombinante, y el primer procedimiento visual que permite detectar en un mismo ensayo, es decir, con una única tira inmunocromatográfica, anticuerpos de tipo IgA frente a t-TG y AGA.

Descripción

Descripción breve

Un objeto de la presente invención lo constituye un sistema inmunocromatográfico doble que permite la puesta en marcha del procedimiento descrito anteriormente y que incluye simultáneamente los elementos necesarios para la determinación y visualización de las reacciones inmunocromatográficas (IC) entre anticuerpos IgA (tira doble AGA/t-TG) e IgG o IgM (tira anti t-TG IgA/G/M) característicos de enfermos celíacos con al menos dos antígenos inductores de la respuesta inmune de la EC.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento de identificación de anticuerpos presentes en pacientes con enfermedad celíaca mediante un sistema inmunocromatográfico que valora de forma conjunta y simultánea la presencia en una muestra biológica de anticuerpos -IgA, IgG o IgM por separado en cada sistema- específicos de los autoantígenos característicos de la EC AGA y t-TG.

Finalmente, un objeto de la presente invención lo constituye el uso del sistema inmunocromatográfico y del procedimiento de la presente invención para la identificación de anticuerpos presentes en pacientes con enfermedad celíaca.

Descripción detallada

La presente invención se basa en que los inventores han observado que la identificación conjunta y simultánea de anticuerpos presentes en pacientes con enfermedad celíaca es posible mediante un sistema inmunocromatográfico (tiras inmunocromatográficas) con unos valores de sensibilidad y especificidad mejores que realizados por separado y similares a los obtenidos por otras técnicas inmunológicas, por ejemplo ELISA. Así, la presencia de anticuerpos frente a distintos autoantígenos de la EC, en concreto AGA y t-TG, ha podido ser determinada en una misma tira inmunocromatográfica y con las mismas condiciones de reacción; y para los casos en los que los pacientes de EC presentan ausencia de IgA se ha desarrollado otra tira inmunocromatográfica basada en el mismo autoantígeno t-TG de la anterior tira.

Un objeto de la presente invención lo constituye un sistema inmunocromatográfico doble que permite la puesta en marcha del procedimiento descrito anteriormente y que incluye simultáneamente los elementos necesarios para la determinación y visualización de las reacciones inmunocromatográficas (IC) entre anticuerpos característicos de enfermos celíacos con al menos dos antígenos inductores de la respuesta inmune de la EC. En concreto, dicho sistema inmunocromatográfico para el diagnóstico de enfermedad celíaca en humanos está formado por los siguientes elementos:

I) una tira inmunocromatográfica que permite la identificación en una muestra biológica humana de anticuerpos -tipo IgA- específicos de los autoantígenos característicos de la EC, AGA y t-TG, que comprende

- a) un sistema de visualización de la reacción, por ejemplo, partículas coloidales o microesferas coloreadas recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti IgA,
- b) antígenos AGA y t-TG inmovilizados en la misma tira, y
- c) un sistema control de las condiciones de la propia reacción inmunocromatográfica, y,

II) una tira inmunocromatográfica que permite la identificación en una muestra biológica humana de anticuerpos IgA/IgM/IgG frente al autoantígeno t-TG que comprende

- a) un sistema de visualización de la reacción, por ejemplo, partículas coloidales o microesferas coloreadas recubiertas con antígeno t-TG,
- b) antígeno t-TG inmovilizados en la misma tira, y
- c) un sistema control de las condiciones de la propia reacción inmunocromatográfica.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “muestra biológica” se refiere a una muestra biológica tipo suero, plasma, saliva o sangre de un paciente sospechoso de padecer EC.

ES 2 279 980 T3

El término “AGA” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a un extracto de proteínas obtenido de uno o de una mezcla de varios cereales pertenecientes al siguiente grupo -trigo, cebada, centeno y avena- y que induce anticuerpos en pacientes con EC.

5 Tal como se utiliza en la presente invención el término “t-TG” se refiere a la proteína transglutaminasa de origen animal o humana, sintética o recombinante y también a fragmentos de dicha t-TG que inducen una respuesta inmunológica en pacientes con EC similar a la obtenida con la t-TG completa.

10 Un objeto particular de la presente invención es un sistema inmunocromatográfico en el que el antígeno AGA se ha obtenido a partir de una variedad de cereal o mezcla de cereales como por ejemplo trigo de la variedad Triana y el antígeno t-TG es una t-TG humana recombinante (ver Ejemplo 1).

15 Así, una realización particular de la presente invención lo constituye una tira inmunocromatográfica de flujo lateral doble como soporte inerte que determina y visualiza en una única tira las reacciones IC entre IgA y AGA e IgA y t-TG realizada según el Ejemplo 1a) y que comprende un sistema de visualización de la reacción (por ejemplo, partículas coloidales o microesferas coloreadas recubiertas por un anticuerpo monoclonal frente a IgA humana), la inmovilización de los antígenos de EC, AGA y t-TG (en este caso t-TG), un soporte inerte que permite el flujo de dichos elementos reconstituidos al añadir el suero o plasma, y un sistema control de las condiciones de la propia reacción inmunocromatográfica. Por otro lado, forman parte de la presente invención cualquier otra tira IC doble que pueda ser desarrollada a partir del estado de la técnica existente en el área de las técnicas inmunocromatográficas y conocido por los expertos.

20 Además, otra realización particular de la presente invención lo constituye una tira inmunocromatográfica (tira anti t-TG IgA/IgG/IgM, ver Ejemplo 1b)) que permite la determinación de anticuerpos IgA o IgG o IgM de pacientes con EC frente al autoantígeno t-TG utilizado en la tira doble AGA/t-TG comentada anteriormente.

30 Otro objeto de la presente invención es un procedimiento de identificación de anticuerpos presentes en pacientes con enfermedad celiaca mediante un sistema inmunocromatográfico que valora de forma conjunta y simultánea la presencia en una muestra biológica de anticuerpos -IgA, además de IgM o IgG por separado en cada tira inmunocromatográfica- específicos de los autoantígenos característicos de la EC AGA y t-TG mediante dos tiras inmunocromatográficas distintas (tira doble AGA/t-TG y tira anti t-TG IgA/IgG/IgM).

35 Un objeto particular de la presente invención lo constituye un procedimiento descrito anteriormente en el que en lugar de realizarse simultáneamente la valoración de los anticuerpos específicos de EC mediante las dos tiras inmunocromatográficas se realiza en primer lugar el análisis de los anticuerpos mediante la tira inmunocromatográfica doble AGA/t-TG (Ejemplo 1a)) y en el caso de un resultado negativo se realiza una segunda valoración de la presencia de anticuerpos tipo IgA, IgG e IgM frente a t-TG mediante un sistema inmunocromatográfico sencillo (Ejemplo 1b)).

40 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye un procedimiento según esta patente en el que la reacción inmunocromatográfica desarrollada tiene lugar entre los autoantígenos de EC dispuestos en la tira inmunocromatográfica AGA y t-TG y anticuerpos IgG o IgM de la muestra biológica separadamente. En estos casos, las partículas coloidales o microesferas coloreadas de la tira doble estarían recubiertas por un anticuerpo monoclonal que reconoce IgG o IgM humana, respectivamente para cada una de las tiras.

45 Finalmente, un objeto de la presente invención lo constituye el uso del sistema inmunocromatográfico constituido por las tiras inmunocromatográficas y del procedimiento de la presente invención para la identificación de anticuerpos (IgA, IgM o IgG) presentes en pacientes con enfermedad celiaca.

Descripción de las figuras

50 Figura 1

Resultados de las tiras inmunocromatográficas doble y sencilla en el diagnóstico de EC

55 Esta figura muestra la representación de las bandas visualizadas tras los ensayos inmunocromatográficas con las tiras doble (AGA/t-TG) y sencilla (t-TG (IgA/IgG/IgM)). 1+, tira positiva frente a t-TG mediante tira sencilla; 2+, tira negativa frente a t-TG mediante tira sencilla; 3+ y 3-, comparación de una tira sencilla y doble en un paciente con deficiencia de IgA; 4-, tira negativa frente a t-TG/AGA en tira doble; 5+, tira positiva frente a AGA en una tira doble; 6+, tira positiva frente a t-TG en una tira doble; 7+, tira positiva frente a AGA/t-TG en una tira doble.

60 Ejemplos de realización

Ejemplo 1

65 *Elaboración de las tiras inmunocromatográficas*

El procedimiento desarrollado en la presente invención se basa en unas tiras inmunocromatográficas de flujo lateral producidas en la empresa Operón SA (Zaragoza, España). A continuación se presentan los dos modelos de tiras

ES 2 279 980 T3

elaboradas: a) tiras frente a AGA y t-TG tipo IgA, y b) tiras frente a t-TG IgA/IgG/IgM. Las tiras constan de varias capas que aportan todos los reactivos necesarios en cada tipo.

a) Tira doble AGA/t-TG

5 Se trata de un test de tres bandas (ver Figura 1). Las muestras de suero humano, provenientes de enfermos de EC o de casos control, se diluyen en una solución tamponadora que contiene albúmina de suero bovino (BSA) y un detergente no iónico, pudiéndose realizar dicha dilución bien en tubos “eppendorf”, bien en placas de microtitulación. La tira o stick se introduce por su región absorbente en la dilución 1/15 del suero tamponado mencionado anteriormente. Si el suero del paciente presenta anticuerpos tipo IgA frente a t-TG, gliadinas o ambos, cuando el líquido asciende por capilaridad (tira inmunocromatográfica de flujo lateral) reconstituye unas microesferas coloreadas situadas en esta región absorbente de la tira y que en este caso están recubiertas por un anticuerpo monoclonal frente a IgA humana. Una vez reconstituidas, el complejo formado por las microesferas rojas recubiertas con anticuerpo monoclonal frente a IgA humana, los anticuerpos (tipo IgA) frente a la t-TG, o a las gliadinas, o frente a ambos antígenos, asciende y reacciona de forma separada con 2 líneas distintas (separadas físicamente), que contienen inmovilizadas tanto gliadinas purificadas (en una de ellas), como t-TG humana recombinante (en la otra), lo que resulta en una o dos bandas rojas, tras la reacción inmunológica correspondiente, en distintos niveles, dependiendo de que el suero presente anticuerpos (tipo IgA) frente a la t-TG, frente a las gliadinas (AGA) o frente a ambos antígenos. En caso de inmunorreactividad, además de la banda control en este ejemplo de color azul, pasados unos 5-10 minutos se puede desarrollar una banda en este ejemplo roja correspondiente a t-TG, o a AGA, o dos bandas correspondiendo a anticuerpos frente a AGA y a t-TG de tipo IgA. La banda control de color azul aparece en lo alto de la tira validando el resultado de la prueba, la banda roja correspondiente a la presencia de anticuerpos, tipo IgA, frente a las gliadinas (AGA) aparece en el medio, y la banda roja que indica la presencia de anticuerpos, tipo IgA, frente a la t-TG aparece en la parte inferior de la tira.

25 La banda de color azul es un control interno de la tira inmunocromatográfica que indica que las condiciones necesarias para la reacción antígeno-anticuerpo y su posterior visualización han sido correctas.

30 La t-TG recombinante humana (Rt-TG) se obtuvo de Diarect (Freiburg Alemania), y la gliadina purificada fue aislada de una variedad de trigo, variedad Triana, por los propios inventores en la Unidad de Gluten del Centro Nacional de Biotecnología. Esta purificación se realizó mediante una extracción etanólica, seguida de una concentración usando ultrafiltración, y posterior liofilización del extracto. El anticuerpo monoclonal frente a IgA humana se produjo en Operón SA (Zaragoza, España).

35 Con este tipo de tiras se probaron 248 sueros, correspondiendo el 50% a pacientes con EC y el otro 50% a casos control no-EC de igual manera que las de las tiras sencillas.

b) Tira sencilla anti t-TG IgA/IgG/IgM

40 Se trata de una prueba de dos bandas. Los sticks o tiras son introducidos bien en tubos “eppendorf” o en placas de microtitulación que contienen una dilución 1:20, previamente preparada, del suero de los pacientes a estudiar, con una solución salina tamponadora a base de fosfatos (PBS) a pH y concentración salina fisiológica con un 1% de albúmina de suero bovino (BSA). Al poner la tira dentro de la muestra diluida, el líquido asciende por capilaridad y reconstituye las microesferas coloreadas en rojo que se encontraban secas y recubiertas con t-TG recombinante humana (Rt-TG) si la muestra contiene anticuerpos frente a la transglutaminasa tisular (t-TG). El complejo formado por las microesferas rojas coloreadas, la t-TG recombinante humana y los anticuerpos anti t-TG presentes en la muestra del paciente, asciende y alcanza una región que contiene una línea de t-TG recombinante humana, provocando una inmunorreacción que da como resultado una banda roja. Esa banda roja indica la presencia de anticuerpos anti t-TG, tipo IgA, IgG o IgM, en la muestra analizada. Como control del sistema, en la región absorbente de la tira también están situadas otras microesferas secas coloreadas en azul recubiertas con una proteína determinada. El complejo de las microesferas azules recubiertas de proteína, reconstituidas, asciende por la tira hasta alcanzar una región en la que están inmovilizados unos anticuerpos monoclonales frente a dicha proteína, reaccionando inmunológicamente y dando como resultado una banda azul. Cuando el suero no es inmunorreactivo sólo se desarrolla una banda de control azul, mientras que en caso de inmunorreactividad, además de la banda azul, se desarrolla una banda de resultados roja pasados uno 5-10 minutos.

55 En caso de no aparecer ninguna de las dos bandas el análisis no es válido y habría que repetirlo usando otra nueva tira. No se necesita equipamiento adicional para el desarrollo del ensayo.

Ejemplo 2

60 *Ensayos inmunocromatográficos y ELISA frente a EC*

65 Los resultados obtenidos en las pruebas con los dos tipos de tiras, doble y sencilla, se compararon con los resultados obtenidos por ELISA para anticuerpos anti-tTG y AGA.

En el caso de la tira de diagnóstico doble se encontró una sensibilidad del 92,7% y 83,2%, con una especificidad del 96,2% y del 96,7% para la t-TG y AGA, respectivamente, cuando se analizaron los resultados de t-TG y AGA por separado (Tabla I). Estos datos mostraron una concordancia frente al ELISA del 99,3% y del 99,2%, respectivamente.

ES 2 279 980 T3

Por otro lado, hay que destacar que el análisis conjunto de los resultados en una misma tira doble, es decir, número de casos positivos frente a uno de los dos antígenos AGA y t-TG por separado o ambos positivos, permitió obtener valores de sensibilidad y especificidad mayores que los observados por separado, 95,2% y 96,2% respectivamente. En concreto, se observó que tres pacientes con EC con AGA positiva en la tira doble eran t-TG negativos, quince pacientes con EC con t-TG positivo eran AGA negativos y cien pacientes con EC fueron positivos para AGA y t-TG. Es decir, que la realización de una tira doble permitió identificar tres pacientes con EC que hubieran sido posible identificar con un análisis AGA o t-TG por separado (esto es lo que incrementa la sensibilidad del 92,7% al 96,3%).

En los casos EC negativos frente a AGA/t-TG obtenidos con la tira doble se analizó la presencia de anticuerpos IgA/IgM/IgG frente a t-TG realizando un ensayo inmuno-cromatográfico con la tira sencilla, observándose un caso positivo frente a t-TG en el que se confirmó además el déficit de IgA en este paciente mediante la técnica de nefelometría. Una de las ventajas más destacables del uso combinado de ambas tiras, doble y sencilla, es que permite la detección de pacientes con déficit selectivo de IgA, y que presentan EC, cuando la banda de la t-TG es positiva en la tira sencilla, y negativa en la tira doble con lo que la sensibilidad obtenida por ambas pruebas se incrementa (en nuestro caso del 95,2% al 96%).

TABLA I

Tira Doble AGA/t-TG (IgA)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Concordancia (%)	Sueros (n)
Interpretación por separado de AGA y t-TG				
Tira t-TG (IgA)	92,7	96,2		
			99,3	248
ELISA t-TG (IgA)	93,6	95,27		
Tira AGA (IgA)	83,2	96,7		
			99,2	248
ELISA AGA (IgA)	84,8	92,8		
Interpretación combinada de AGA y t-TG				
Tira doble* AGA/t-TG (IgA)	95,2	96,7		248
			99,2	
ELISA AGA (IgA)* + ELISA t-TG (IgA)*	96,0	96,7		248

* Una sola tira doble frente a dos test ELISA.

Como se puede observar en la tabla, existe una alta correlación entre los distintos ensayos visuales y los test ELISA respectivos.

Los resultados obtenidos en los ensayos inmunocromatográficos presentados muestran estos métodos como extremadamente eficientes para el diagnóstico de la EC, lo que unido a la facilidad, no es imprescindible un operario especialmente cualificado, rapidez (no más de 10 minutos) de su realización, y la no necesidad de equipamientos tecnológicamente complejos, hacen del método una herramienta muy útil para inspeccionar poblaciones de riesgo para EC y seleccionar candidatos para la realización de una biopsia de intestino delgado.

Otra característica importante es que estas tiras presentan unos valores mayores de sensibilidad y especificidad que los ELISAs correspondientes de t-TG y AGA, siendo extremadamente eficientes para el despistaje y diagnóstico de la EC.

La tira doble AGA/t-TG determina tanto AGA como t-TG, de tipo IgA, en un único análisis, eliminando, por tanto, la necesidad de usar dos ELISAs paralelos t-TG y AGA.

Ambas tiras son significativamente más baratas que el ELISA, más simples de manejar e interpretar, y se cree que estas características le pueden hacer un test ideal para el diagnóstico de EC en grandes poblaciones, especialmente en países en desarrollo.

ES 2 279 980 T3

REIVINDICACIONES

1. Un sistema inmunocromatográfico para el diagnóstico de enfermedad celiaca (EC) en humanos, que comprende los siguientes elementos:

I) una tira inmunocromatográfica que permite la identificación en una muestra biológica humana de anticuerpos -tipo IgA- específicos de los autoantígenos característicos de la EC, AGA (antigliadina) y t-TG (transglutaminasa tisular) que comprende

a) un sistema de visualización de la reacción que comprende un anticuerpo anti-IgA, por ejemplo, partículas coloidales o microesferas coloreadas recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-IgA,

b) antígenos AGA y t-TG inmovilizados en la misma tira, y

c) un sistema control de las condiciones de la propia reacción inmunocromatográfica, y,

II) una tira inmunocromatográfica que permite la identificación en una muestra biológica humana de anticuerpos IgA/IgM/IgG frente al autoantígeno t-TG, que comprende

a) un sistema de visualización de la reacción que comprende antígeno t-TG, por ejemplo, partículas coloidales o microesferas coloreadas recubiertas con antígeno t-TG,

b) antígeno t-TG inmovilizados en la misma tira, y

c) un sistema control de las condiciones de la propia reacción inmunocromatográfica.

2. Un sistema inmunocromatográfico según la reivindicación 1, en el que la t-TG es una t-TG humana recombinante y la AGA es un extracto de proteínas obtenido de una variedad de trigo.

3. Un procedimiento inmunocromatográfico de identificación de anticuerpos presentes en pacientes con enfermedad celiaca (EC), que comprende valorar

a) la presencia simultánea en una muestra biológica de anticuerpos -tipo IgA- específicos de los autoantígenos característicos de la EC, AGA (antigliadina) y t-TG (transglutaminasa tisular), mediante una tira inmuno-cromatográfica según la reivindicación 1 I), y

b) la presencia en la misma muestra biológica de a) de anticuerpos IgA/IgM/IgG frente al autoantígeno t-TG mediante una tira inmunocromatográfica según la reivindicación 1 II).

4. Un procedimiento según la reivindicación 3, en el que la muestra biológica consiste en suero, plasma, saliva o sangre de un paciente sospechoso de padecer EC.

5. Un procedimiento inmunocromatográfico de identificación de anticuerpos presentes en pacientes con enfermedad celiaca (EC), que comprende

a) valorar la presencia en una muestra biológica de anticuerpos -tipo IgA- específicos de los autoantígenos característicos de la EC, AGA (antigliadina) y t-TG (transglutaminasa tisular), mediante una tira inmuno-cromatográfica según la reivindicación 1 I), y, en caso de que el resultado fuera negativo

b) valorar la presencia en la misma muestra biológica de a) de anticuerpos IgA, IgM e IgG frente al autoantígeno t-TG mediante una tira inmunocromatográfica según la reivindicación 1 II).

6. Uso del sistema inmunocromatográfico según las reivindicaciones 1 y 2, y del procedimiento según las reivindicaciones 3 a 5, para la identificación de anticuerpos (IgA, IgM o IgG) presentes en muestras de pacientes con enfermedad celiaca.

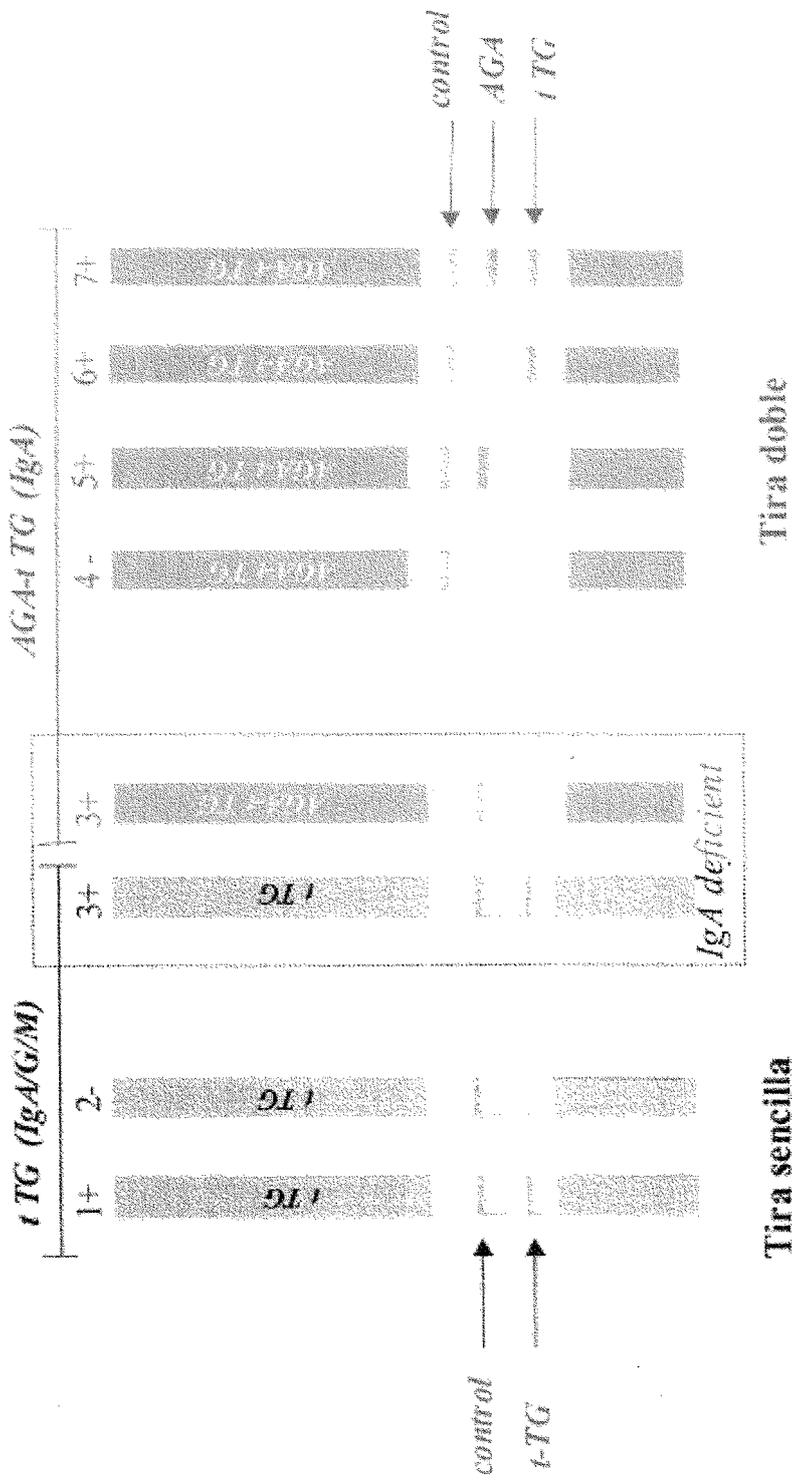


Figura 1