

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Novedoso inmunoensayo multiplex por Citometría de Flujo para la detección simultánea y discriminativa de GADA e IA-2A en pacientes con Diabetes Mellitus

Guerra, Luciano Lucas<sup>1</sup>; Faccinetti, Natalia Inés<sup>1</sup>; Bombicino, Silvina Sonia<sup>1</sup>; Rovitto, Bruno David<sup>1</sup>; Sabljic, Adriana Victoria<sup>1</sup>; Trabucchi, Aldana<sup>1</sup>; Penas Steinhardt, Alberto<sup>1</sup>; Poskus, Edgardo<sup>1</sup>; Iacono, Ruben Francisco<sup>1</sup>; Valdez, Silvina Noemí<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Microbiología, Inmunología, Biotecnología y Genética, Cátedra de Inmunología. CONICET-Universidad de Buenos Aires, Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral "Prof. Ricardo A. Margni" (IDEHU) Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (UBA), e Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral "Prof. Ricardo A. Margni" (IDEHU), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET-UBA).

**Contacto:** Valdez, Silvina Noemí. Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956, 4to piso [C1113AAD] CABA; silval@ffyb.uba.ar, valdezsilvina@gmail.com

## Resumen

La Diabetes Mellitus tipo 1 [DMT1] es un trastorno autoinmune con pérdida de tolerancia hacia antígenos de las células beta-pancreáticas y presenta autoanticuerpos en circulación dirigidos contra ellos. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un inmunoensayo basado en Citometría de Flujo (CF) para la determinación combinada y discriminativa de los principales autoanticuerpos de DMT1: anti-glutamato decarboxilasa (GADA) y anti-proteína tirosina fosfatasa IA-2 (IA-2A). Se emplearon 48 sueros de pacientes con DMT1. Para la CF, se inmovilizaron microesferas de 4 y 5 µm con cada uno de los autoantígenos recombinantes (TrxGAD y TrxIA-2<sub>ic</sub>, respectivamente). Se incubó el suero con una mezcla de ambas microesferas, y se detectaron los inmunocomplejos con una mezcla de TrxGAD-biotina/TrxIA-2<sub>ic</sub>-biotina, y luego 50,00 ng de estreptavidina-ficoeritrina. Los resultados obtenidos por la CF fueron contrastados con el ensayo de unión de radioligando (RBA). Se detectó GADA en un 52,1% de sueros empleando RBA ( $SDs_{mediana}$  3,08 y rango [-0,85] - 42,26  $SDs$ ) y un 60,9% con IA-2A ( $SDs_{mediana}$  6,39 y rango [-2,95] - 39,92  $SDs$ ), evidenciando un 77,1% de muestras con componente autoinmune y 100% de especificidad en ambos ensayos. Por CF, se detectó un 68,8% de pacientes con GADA ( $SDs_{mediana}$  5,66 y rango [-1,89] - 124,10  $SDs$ , sensibilidad analítica del 100% y especificidad de 98%) y un 41,7% de IA-2A ( $SDs_{mediana}$  0,19 y rango [-2,08] - 62,07  $SDs$ , 64,5% de sensibilidad analítica y 93,9% de especificidad). Se descubrió autoinmunidad en el 77,1% de las muestras. Se logró desarrollar un inmunoensayo por CF que permitió la detección de autoinmunidad con el mismo desempeño que dos determinaciones independientes por RBA.

**Palabras clave:** diabetes mellitus, citometría de flujo, autoinmunidad, autoanticuerpos, inmunoensayo.

## Abstract

Type 1 Diabetes Mellitus [T1DM] is an autoimmune disorder with loss of tolerance to antigens of pancreatic beta-cells and presents circulating autoantibodies directed against them. The objective of this work was to develop an immunoassay based on Flow Cytometry [FC] for the combined and discriminative determination of the main T1DM markers: GADA and IA-2A. For FC, 4- and 5-µm-microspheres were immobilized with each of the recombinant autoantigens (TrxGAD and TrxIA-2<sub>ic</sub>, respectively). The serum was incubated with a mixture of both microspheres, and the immunocomplexes were detected with a mixture of TrxGAD-biotin and TrxIA-2<sub>ic</sub>-biotin, and then 50,00 ng of streptavidin-phycoerythrin was added. The final mixture was acquired on a flow cytometer. The results obtained were compared with the reference method (RBA). GADA was detected in 52.1% of sera using RBA ( $SDs_{median}$  3.08 and range [-0.85] - 42.26  $SDs$ ) and 60.9% with IA-2A ( $SDs_{median}$  6.39 and range [-2.95] - 39.92  $SDs$ ), evidencing 77.1% of samples with autoimmunity and 100% of specificity in both assays. By FC, 68.8% of patients were detected with GADA ( $SDs_{median}$  5.66 and range [-1.89] - 124.10  $SDs$ , analytical sensitivity of 100% and specificity of 98%) and 41.7% with IA-2A ( $SDs_{median}$  0.19 and range [-2.08] - 62.07  $SDs$ , 64.5% of analytical sensitivity and 93.9% of specificity). Autoimmunity was detected in 77.1% of the samples. It was possible to develop a FC-based immunoassay that allowed the detection of autoimmunity with the same performance as two independent RBA determinations.

**Keywords:** diabetes mellitus, flow cytometry, autoimmunity, autoantibodies, immunoassay.

## Introducción

La diabetes mellitus (DM) y sus complicaciones constituyen la tercera causa de muerte en los países industrializados, después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Alrededor del 8,8 % de la población mundial padece alguna de las formas de esta enfermedad, la cual muestra una tendencia de crecimiento continuo [1]. Las estadísticas en Argentina muestran que en el país hay cerca del 7 % de la población con DM, aunque la prevalencia se eleva a un 20 % en aquellas personas mayores de 60 años. El 50 % de los afectados ignora que padece la enfermedad, lo que representa un serio problema en la salud pública nacional.

La DM constituye un grupo heterogéneo de patologías, las cuales conducen a una elevación de la glucosa en sangre. Se distinguen dos tipos principales de la enfermedad, las que requieren estudios y tratamientos diferentes: la DM Tipo 1 (DMT1) y la DM Tipo 2 (DMT2). En algunos casos es difícil diferenciar entre las dos variantes principales de la enfermedad [2]. Así, se han propuesto nuevas categorías, entre ellas, la diabetes autoinmune latente del adulto (conocida como LADA por su sigla en inglés), para identificar un subgrupo de pacientes adultos que poseen autoinmunidad e inicialmente no requieren insulina, pero pueden requerirla poco tiempo después del diagnóstico [3]. Aunque los síntomas agudos y a veces letales de la DM pueden ser controlados, las complicaciones tardías de la enfermedad exhiben alta morbilidad y reducen significativamente las expectativas de vida [4]. La aparición y progresión de las complicaciones tardías generan una pesada carga socioeconómica y de enfermedad (en términos de discapacidad y mortalidad) para la comunidad en general y para los distintos agentes del sistema de salud.

La principal causa de la DMT2 o "*DM del adulto*" es una resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la insulina, asociada a un grado variable de disfunción secretoria [5-8]. Ambas causas, a su vez, se correlacionan con la presencia de determinantes genéticos y factores ambientales, de ahí que la DMT2 haya sido definida como una enfermedad poligénica y multifactorial.

La DMT1 o "*DM infante juvenil*" es un trastorno de origen autoinmune que presenta un importante componente de autoagresión celular, acompañado de una serie de marcadores humorales que sirven principalmente para la detección prodrómica y para el apoyo diagnóstico [9-13]. Los principales marcadores de autoinmunidad asociados a DMT1 son los autoanticuerpos que reconocen a la GAD65 (denominados GADA), al dominio intracelular de IA-2 (denominados IA-2A), al transportador de zinc 8 (denominados ZnT8A) y a los productos de secreción de la célula pancreática: insulina (denominados IAA) y proinsulina (denominados PAA) [14]. Aparte de éstos, fueron identificados otros autoantígenos, pero ninguno de los anticuerpos inducidos por ellos resultó tener suficiente relevancia para el apoyo diagnóstico y la predicción de la enfermedad [15]. Analizados en conjunto, más del 90 % de los pacientes infante-juveniles debutantes con DMT1 presentan uno o más de los marcadores principales [16], siendo GADA el de mayor prevalencia (70-90 %) [17-

19], seguido por IA-2A (40-75 %) [19-24].

Los estudios prospectivos y predictivos demostraron que los cuatro marcadores de autoinmunidad se asocian a la respuesta celular autoagresiva de las células beta y se anticipan meses o incluso años a la aparición de los primeros síntomas de la DM [25-26], siendo el marcador IA-2A el que presentó el mayor valor predictivo positivo (VPP) para evaluar el riesgo de evolución a DMT1 [27]. Así, se encontró una vinculación entre el número de marcadores positivos en individuos asintomáticos dentro de grupos de riesgo (familiares directos de pacientes diabéticos), y la probabilidad de contraer la enfermedad en el transcurso de un período determinado [28]. Además, la determinación de estos marcadores de autoinmunidad en la población heterogénea, de pacientes debutantes en edad adulta, es de gran utilidad para la asignación diagnóstica precisa de aquellos individuos que padecen formas intermedias de DM autoinmune, no siempre bien caracterizadas, como por ejemplo los LADA. En este sentido, el diagnóstico preciso de las diferentes formas de DM autoinmune a través de la detección de los marcadores serológicos garantiza el inicio de un tratamiento precoz y adecuado, disminuyendo las complicaciones crónicas de la enfermedad.

El método de referencia para la detección sensible de los marcadores de autoinmunidad, dada su baja concentración sérica, es el ensayo de unión de radioligando (RBA), que emplea antígenos recombinantes marcados radiactivamente [21-29,30]. Si bien esta metodología es de gran sensibilidad y especificidad, tiene la desventaja del uso de material radiactivo, el que provoca residuos contaminantes del medioambiente que requieren de un tratamiento especial para su descarte. Además, implica la necesidad de contar con personal e infraestructura edilicia habilitados por la Autoridad Regulatoria Nuclear. Esto hace que existan limitaciones operativas importantes que dificultan la implementación del método en forma rutinaria en laboratorios de mediana/baja complejidad, incluyendo, además, el alto costo de las determinaciones debido a la importación de los isótopos radiactivos empleados en la generación de las moléculas antigénicas marcadas.

No existen en Argentina desarrollos locales de kits para el diagnóstico y seguimiento de la DM autoinmune, por lo cual el sistema de salud depende de su importación, lo que provoca sustancialmente el costo de las determinaciones.

El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de un novedoso inmunoensayo basado en Citometría de Flujo, para la detección simultánea y discriminativa de los principales marcadores de autoinmunidad asociados a DM autoinmune. Los marcadores seleccionados fueron GADA e IA-2A, ya que la combinación en la detección de ambos autoanticuerpos permite detectar la presencia del componente autoinmune en el 85-90 % de los pacientes debutantes con DMT1, y la presencia de estos dos marcadores positivos en el grupo de riesgo determina un VPP del 100 % en un período de evolución de 5 años.

## Materiales y métodos

### Colección de sueros

Pacientes argentinos con Diabetes Mellitus Tipo 1

Se colectaron muestras de suero ( $n = 48$ , edad media de 9,2 años con edad mediana de 9 años, rango etario 2 a 21 y sexo masculino/femenino: 23/37), de niños y adolescentes argentinos ingresados al Servicio de Nutrición del Hospital Nacional de Pediatría "Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina, de mayo de 2013 a marzo de 2015. Se tomaron muestras de pacientes con ayuno de 8 h, antes o dentro de las 72 h del inicio del tratamiento con insulina. La DM1 fue diagnosticada de acuerdo con los criterios de la OMS [31]. La colección de muestras y los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Pediatría "Ricardo Gutiérrez". Se obtuvo el consentimiento de los padres. Los sueros se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se ensayaron. Se sometieron al análisis del perfil de autoanticuerpos GADA e IA-2A por el método de referencia RBA. Es así que se determinó por separado la presencia de GADA e IA-2A con el objetivo de obtener 4 grupos experimentales discriminados según la presencia (+) o ausencia (-) del marcador (GADA/IA-2A): +/+; +/-; -/+ y -/-.

Individuos controles normales

Se obtuvieron sueros ( $n = 115$ , edad media de 29,7 años con mediana de 25 años, rango etario 16 a 80 y sexo masculino/femenino: 58/57) de individuos sanos argentinos sin antecedentes personales o familiares de DM o enfermedades autoinmunes, para ser utilizados como controles normales. La colección de muestras fue aprobada por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas "José de San Martín" de la Universidad de Buenos Aires (UBA), Buenos Aires, Argentina. Todos los sujetos fueron informados sobre el propósito del estudio y se obtuvo el consentimiento firmado para la participación en el mismo. Los sueros se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se ensayaron. Se realizó la evaluación de autoanticuerpos (GADA, IA-2A, IAA y ZnT8A) por RBA y todos los individuos resultaron negativos.

### Detección de GADA o IA-2A por el ensayo de unión de radioligando o Radioligand Binding Assay (RBA)

Producción de los trazadores [ $^{35}\text{S}$ ]GAD y [ $^{35}\text{S}$ ]IA-2

Los trazadores se obtuvieron con alto grado de pureza por transcripción/traducción *in vitro* del ADN codificante, ya sea para la GAD humana clonado en el vector pEX9 o el fragmento intracelular de IA-2 (IA-2<sub>ic</sub>) humano (residuos 604-979) clonado en el vector pSP64 (Promega, Madison, WI, EE.UU.), usando un sistema de lisado de reticulocitos de conejo (Promega, Madison, WI, EE.UU.) en presencia de [ $^{35}\text{S}$ ]-metionina (New England, Nuclear, Boston, MA, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de traducción se diluyeron en *buffer* RBA (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1 % V/V, pH 7,4) y se sembraron en una columna PD10 (Pharmacia-LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia) para eliminar la [ $^{35}\text{S}$ ]-Metionina libre. Típicamente, el porcentaje de incorporación de [ $^{35}\text{S}$ ]-metionina a las proteínas por este método fue de 15 % para [ $^{35}\text{S}$ ]GAD, produciendo aproximadamente  $5\text{-}10 \times 10^6$  dpm de proteína marca-

da o 5-7 % de [ $^{35}\text{S}$ ]IA-2, produciendo aproximadamente  $5\text{-}7 \times 10^6$  dpm de esta. Los trazadores se almacenaron en alícuotas a  $-40^{\circ}\text{C}$ , y tuvieron una vida útil de 5 semanas.

Protocolo de RBA para la detección de GADA o IA-2A

Los protocolos de RBA se realizaron como se describió anteriormente [21-30], con modificaciones menores [32-34]. Brevemente, se incubaron 2,5  $\mu\text{L}$  de suero humano durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  con 10.000 dpm de [ $^{35}\text{S}$ ]GAD o [ $^{35}\text{S}$ ]IA-2 en un volumen final de 60  $\mu\text{L}$  en *buffer* RBA. A continuación, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de proteína A-Sepharose 4B FF (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweeden) 40 % V/V en *buffer* RBA para aislar los inmunocomplejos y se incubaron 2 h a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, las muestras se dejaron sedimentar y los sobrenadantes se descartaron. Los *pellets* se lavaron tres veces con 200  $\mu\text{L}$  de *buffer* RBA y una vez con 200  $\mu\text{L}$  de NaCl 200 mM en *buffer* RBA. Finalmente, los *pellets* se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de SDS 1 % P/V, se dejó decantar la proteína A-Sepharose y los sobrenadantes se transfirieron cuidadosamente a viales para su lectura en un contador de centelleo líquido (Liquid Scintillation Analyzer Modelo 1600TR, Packard, Canberra, Australia) por 1 min/vial. Los resultados para cada muestra se calcularon como porcentaje de unión (B%):

$$B\% = 100 \times \left( \frac{dpm}{dpm_{\text{totales}}} \right)$$

Y se expresaron como *scores* de desvío estándar (SDs, por sus siglas en inglés, *standard deviation scores*):

$$SDs = \left( \frac{B\% - B_c\%}{DE_c} \right)$$

Donde  $B_c\%$  es el B% medio de sueros de individuos controles y  $DE_c$  su desvío estándar. Se procesaron simultáneamente sueros de individuos controles normales para calcular el *cut-off*. Las muestras se consideraron positivas cuando  $SDs > 3,0$ . El ensayo para GADA mostró un 79,6 % de sensibilidad y 98 % de especificidad en el *Diabetes Autoantibody Standardization Program* (DASP) 2007 y, el RBA para IA-2A obtuvo un 66,0% de sensibilidad, 97,8 % de especificidad y 86,43 % de precisión en el *Islet Autoantibody Standardization Program* (IASP) 2015, laboratorio 0519.

### Flow Cytometric Microsphere-based Immunoassay (FloCMIA) para la detección simultánea de GADA e IA-2A o FloCMIA multiplex

Expresión, purificación y biotilación de las proteínas recombinantes TrxGAD y TrxIA-2<sub>ic</sub>

Las proteínas recombinantes GAD e IA-2<sub>ic</sub> fueron expresadas en *E. coli* como proteínas de fusión con tiorredoxina (TrxGAD y TrxIA-2<sub>ic</sub>, respectivamente) como se describió previamente [35, 36]. Brevemente, las cepas GI698 y GI724 de *E. coli* se transformaron con los plásmidos recombinantes pTrxGAD65, que posee el ADN codificante para la isoforma de 65 kDa de la GAD humana, y pTrxIA-2<sub>ic</sub>, que codifica para el fragmento intracelular de IA-2

humana [residuos 604 a 979], respectivamente. Las bacterias se cultivaron a 30°C con casaminoácidos 0,2 % P/V, glucosa 0,5 % P/V, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y ampicilina 100 µg/mL. Se indujo la expresión proteica con 100 µg/mL de triptófano a 20°C para la cepa GI698 o 37°C para la cepa GI724. Se realizó una centrifugación de 200 mL del cultivo bacteriano, se resuspendió el pellet resultante en 2 mL de *buffer* de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0) y la suspensión resultante se sonicó en presencia de 2-mercaptoetanol (2ME) 1 mM e inhibidores de proteasa (aprotinina 0,1 % P/V y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2 mM) sobre hielo triturado (5 ciclos de 30 s). Después de la sonicación, se añadió a la suspensión resultante Triton X-100 a una concentración final de 0,1 % V/V y se incubó durante 10 min a 0°C. Luego, se separó la fracción soluble intracelular (FSI) por centrifugación a 15.000 rpm durante 10 min.

Las proteínas de fusión se purificaron por cromatografía de afinidad siguiendo el protocolo previamente descrito [36, 37]. La resina se basó en un soporte de agarosa modificado covalentemente con óxido de fenilarsina, que permitió la unión de proteínas que contenían residuos de ditiol vecinales, tal como la Trx [38]. Se añadió la FSI (4 mL), proveniente de la cepa de *E. coli* que corresponda, a dicha resina (≈4 mL), previamente equilibrada en *buffer* de lisis y activada con 4 volúmenes de columna (V<sub>C</sub>) de 2ME 20 mM en *buffer* de lisis, y se incubó la suspensión resultante durante 1,5 horas a 4°C. La resina se vertió en una columna y se lavó secuencialmente con 6 V<sub>C</sub> de *buffer* de lisis, 6 V<sub>C</sub> de 2ME 1 mM en *buffer* de lisis y con 3 V<sub>C</sub> de 2ME 5 mM en *buffer* de lisis. Las proteínas unidas se eluyeron de la resina con varias alícuotas de 2 mL de 2ME 100 mM en *buffer* de lisis. Las preparaciones típicas de TrxGAD y TrxIA-2<sub>ic</sub> proporcionaron ≈10 mg de proteína recombinante por Litro de cultivo.

Dos mililitros de cada proteína de fusión purificada por afinidad se sometieron a intercambio de *buffer* a *buffer* fosfato salino (PBS, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4) utilizando una columna de desalinización ZEBAX (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína en PBS se incubó luego durante 2 h a 0°C con 0,32 mg de sulfato-NHS-biotina (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE.UU.) y se retiró la biotina libre con una nueva columna de desalinización ZEBAX.

#### Protocolo de adsorción pasiva

Este protocolo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante con modificaciones menores. Se mezcló 28 µg de una preparación purificada de TrxGAD por cada 100 cm<sup>2</sup> de microesferas [36,4 µL de suspensión de microesferas de 4 µm 5% P/V, Spherotech, Inc., Lake Forest, IL, EE.UU.] con 60 µg de una preparación purificada de TrxIA-2<sub>ic</sub> por cada 100 cm<sup>2</sup> de microesferas [64,0 µL de suspensión de microesferas de 5 µm 5% P/V]. Se empleó una alícuota almacenada con 2ME 50 mM, glicerol 50 % y aprotinina 0,1 % P/V, en un volumen final de 220 µL en *buffer* isotónico salino (IBS, *isotonic buffered saline*) [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14,2 mM, NaCl 140 mM, KCl 3,8 mM, azida de sodio 3,1 mM]. Luego de una incubación durante la noche a 4°C en agitación, las preparaciones se centrifugaron

a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C y los sobrenadantes se descartaron. Para bloquear los sitios libres sobre la microesfera, los *pellets* se re suspendieron con 200 µL de una solución de seroalbúminabovina (BSA) 0,5% P/V en IBS y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Las preparaciones se centrifugaron de nuevo a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se desechó y el *pellet* se lavó con 400 µL de PBS. Finalmente, se añadieron otros 400 µL de PBS (resultando en 1x10<sup>5</sup> microesferas - TrxGAD o TrxIA-2<sub>ic</sub> /µL) y la suspensión se almacenó a 4°C.

#### Protocolo de FloCMA multiplex para la detección simultánea y discriminativa de GADA e IA-2A

Excepto cuando se indica de otro modo, todas las etapas de lavado se realizaron con 200 µL de PBS-Tween 20 0,05 % V/V en el *Multiscreen<sub>HTS</sub> vacuum manifold*, y las diluciones de los reactivos se prepararon utilizando BSA 0,5 % P/V, Tween 20 0,05 % V/V en PBS y se agregaron 50 µL de volumen de reactivos por pocillo en cada incubación. Veinte microlitros de suero humano puro se mezclaron con 20 µL de una suspensión conteniendo una mezcla de microesferas-TrxGAD (1,7x10<sup>3</sup> microesferas /µL) y microesferas-TrxIA-2<sub>ic</sub> (2,5x10<sup>3</sup> microesferas/µL), en una placa de filtración *Multiscreen<sub>HTS</sub>-HV* de 96 pocillos. La incubación se realizó durante la noche a 4°C en agitación. Después de ésta, la placa de filtración se lavó 5 veces. La detección de los anticuerpos GADA e IA-2A unidos requirió una incubación en dos etapas (1 h a temperatura ambiente cada una, con 5 lavados entre ellas): i), se añadió una mezcla de 1,15 ng de TrxGAD-biotina y 2,75 ng de TrxIA-2<sub>ic</sub>-biotina y ii) 50,00 ng de estreptavidina-PE (Affimetrix eBioscience, San Diego, CA, EE. UU.) para la detección simultánea de las moléculas de TrxGAD-biotina y TrxIA-2<sub>ic</sub>-biotina unidas. Después de este paso, la placa se lavó 4 veces, más 1 etapa final de lavado con 200 µL de PBS y las microesferas se resuspendieron con otros 200 µL de PBS. Se realizó la transferencia de la suspensión a tubos de Röhrer y se adquirió en un citómetro de flujo PAS III PARTEC. Las muestras se analizaron utilizando el *software Cyflogic*, se identificó la población de singletes de microesferas por *gating* en un *dot plot* de *Forward Scatter* (FSC) vs. *Side Scatter* (SSC) discriminando ambas poblaciones de microesferas por su tamaño, las señales de fluorescencia se midieron en el canal FL2 y se informaron como Media Geométrica de la Intensidad de Fluorescencia (GeoM) (Figura 1). Los resultados se expresaron como *SDs*:

$$SDs = \left( \frac{GeoM_m - GeoM_c}{DE_c} \right)$$

Donde GeoM<sub>m</sub> es la GeoM media de las muestras por duplicado, GeoM<sub>c</sub> es la GeoM media de los sueros de individuos controles normales y DE<sub>c</sub> su desvío estándar. Se consideraron como muestras GADA positivas cuando *SDs* > 2,5, e IA-2A positivas cuando *SD* > 3,0. Se calcularon los valores de CV en determinaciones por duplicado para *SDs* bajas, medias y altas. Para la determinación de GADA, el CV intraensayo fue de 9,8 % a *SDs* = 43,89. Los CV interensayo resultaron en 6,3 % a *SDs* = 8,80, 4,0 % a *SDs* = 57,30 y

**Tabla I.** Parámetros analíticos para los métodos de RBA y FloCMIA *multiplex* aplicados a la determinación del marcador humoral GADA. Los resultados se obtuvieron del análisis de una población de individuos controles normales y de pacientes infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DMT1.

Inmunoensayo	RBA	FloCMIA <i>multiplex</i>
<b>Mediana (SDs)</b>	<b>3,08</b>	<b>5,66</b>
<b>Rango (SDs)</b>	<b>(-0,85)-42,26</b>	<b>(-1,89)-124,10</b>
<b>Sensibilidad (%)<sup>a</sup></b>	<b>52,1</b>	<b>68,8</b>
<b>Sensibilidad Analítica (%)<sup>b</sup></b>	-	<b>100,0</b>
<b>Especificidad (%)<sup>c</sup></b>	<b>100,0</b>	<b>98,0</b>

► a: Porcentaje de pacientes positivos para GADA del total de pacientes estudiados

b: Porcentaje de pacientes positivos para GADA por RBA que fueron positivos por FloCMIA

c: 100% menos el porcentaje de falsos positivos

1,6 % a SDs = 122,67. Por otro lado, para la determinación de IA-2A, los CV intraensayo fueron de 2,0% a SDs = 7,36 y 9,8% a SDs = 13,16. Los CV interensayo resultaron en 2,1 % a SDs = 6,75, 11,3 % a SDs = 10,85 y 10,7 % a SDs = 57,69.

### Análisis estadístico

La distribución normal de los datos se analizó mediante el test de normalidad Omnibus de D'Agostino & Pearson. Se realizó el test de Rout con el fin de eliminar los valores *outliers* dentro de la población de individuos control normalmente distribuidos. La selección de valores óptimos de *cut-off* se basó en curvas construidas trazando la especificidad calculada y la sensibilidad de cada protocolo frente a los valores de corte correspondientes. La significación estadística se evaluó mediante tests paramétricos: test *t* de Student para muestras no pareadas con corrección de Welch; o tests no paramétricos: test U de Mann-Whitney para datos no pareados, cuando fuese aplicable. La correlación entre ensayos se evaluó mediante regresión lineal estándar y con el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman ( $r_s$ ). Los cálculos se realizaron utilizando *GraphPad Prism* versión 6.01 para Windows (*GraphPad Software*, San Diego California, EE.UU., [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .

## Resultados

### Detección de GADA e IA-2A por RBA

Mediante la determinación de GADA por el método de referencia, de los 48 sueros de pacientes con DMT1, 25 muestras resultaron positivas para la presencia de dicho marcador (52,1%), empleando un *cut-off* de SDs > 3,0 (Figura 2 (A)). Los niveles de autoanticuerpos se caracterizaron por presentar una SDs<sub>mediana</sub> = 3,08 y un rango de señales de -0,85 a 42,26 (Tabla I). Por otro lado, al analizar la presencia de IA-2A en esta misma población, 28 muestras resultaron positivas para dicho marcador (60,9%) empleando un *cut-off* de SDs > 3,0 (Figura 2 (B)). Los parámetros observados para este ensayo incluyeron una SDs<sub>mediana</sub> = 6,39 y un rango de señales de -2,95 a 39,92 (Tabla II). El análisis en paralelo de 24 sueros de individuos controles normales confirmó una especificidad del 100 % en ambos ensayos. Frente al análisis en conjunto de estos resultados puede decirse que se detectó el componente autoinmune (definido como presencia de GADA y/o IA-2A en suero) en una cantidad de 37 muestras de pacientes con reciente diagnóstico de DMT1 (77,1%). Además, se establecieron así 4 cuatros grupos experimentales (GADA/IA-2A): +/+ (n = 16), +/- (n = 9), -/+ (n = 12) y -/- (n = 11) (Figura 2 (C)); los cuales se sometieron al análisis por el método FloCMIA *multiplex*.

### Detección de GADA e IA-2A por FloCMIA *multiplex*

Mediante la determinación de GADA por FloCMIA *multiplex* (Figura 3 (A)), de los 48 sueros de pacientes con DMT1, 33 muestras resultaron positivas para la presencia de dicho marcador (68,8%) empleando un *cut-off* de SDs > 2,5. Los niveles de

**Tabla II.** Parámetros analíticos para los métodos de RBA y FloCMIA *multiplex* aplicados a la determinación del marcador humoral IA-2A. Los resultados se obtuvieron del análisis de una población de individuos controles normales y de pacientes infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DMT1.

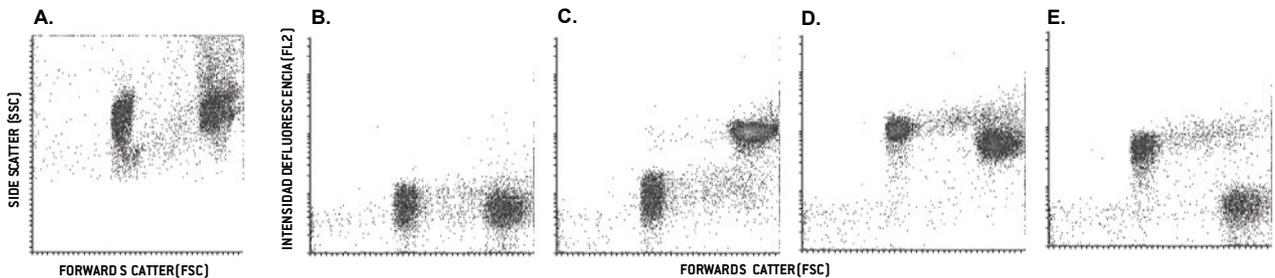
Inmunoensayo	RBA	FloCMIA <i>multiplex</i>
<b>Mediana (SDs)</b>	<b>6,39</b>	<b>0,19</b>
<b>Rango (SDs)</b>	<b>(-2,95)-39,92</b>	<b>(-2,08)-62,07</b>
<b>Sensibilidad (%)<sup>a</sup></b>	<b>60,9</b>	<b>41,7</b>
<b>Sensibilidad Analítica (%)<sup>b</sup></b>	-	<b>64,5</b>
<b>Especificidad (%)<sup>c</sup></b>	<b>100,0</b>	<b>93,9</b>

► a: Porcentaje de pacientes positivos para IA-2A del total de pacientes estudiados

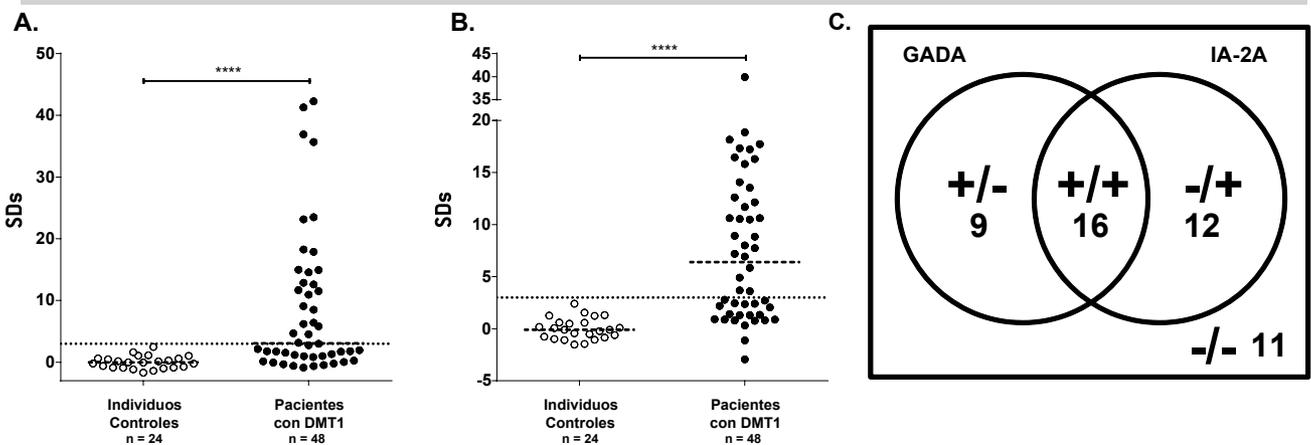
b: Porcentaje de pacientes positivos para IA-2A por RBA que fueron positivos por FloCMIA

c: 100% menos el porcentaje de falsos positivos

**Figura 1.** Evaluación de sueros por FloCMA *multiplex*. A: Poblaciones de microesferas de 4  $\mu\text{m}$ -TrxGAD (izquierda) y 5  $\mu\text{m}$ -TrxIA-2<sub>ic</sub> (derecha) observadas en el *dot plot* FSC vs. SSC para propósitos de *gating*, B-E: *dot plots* para el análisis de la intensidad de fluorescencia adquirida en el canal FL2 vs. FSC. Se muestran señales representativas para los sueros de pacientes diabéticos tipo 1 con diferente perfil de detección de autoanticuerpos. B: suero GADA-/IA-2A-, C: suero GADA-/IA-2A+, D: suero GADA+/IA-2A+ y E: suero GADA+/IA-2A-.



**Figura 2.** Resultados obtenidos por RBA para la determinación de GADA (A) e IA-2A (B) en el suero de individuos controles normales y pacientes con DMT1. El valor de *cut-off* para cada ensayo es indicado por una línea punteada y las medianas para cada población están indicadas por una línea discontinua. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  estadísticamente significativo. C: Diagrama de Venn para resultados obtenidos en la determinación de GADA e IA-2A por RBA, sobre una población de 48 pacientes infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DMT1. En este diagrama se establecen 4 grupos experimentales según la presencia (+) o ausencia (-) del marcador correspondiente.



autoanticuerpos se caracterizaron con una  $SDs_{\text{mediana}} = 5,66$  y un rango de señales de -1,89 a 124,10 [Tabla I]. La sensibilidad analítica fue del 100,0 %, mientras que el análisis en paralelo de 49 sueros de individuos controles normales determinó una especificidad de 98,0 % con la eliminación de una muestra con señal *outlier* para el cálculo del *cut-off*. Por otro lado, al analizar la presencia de IA-2A en esta misma población [Figura 3 (B)], 20 muestras resultaron positivas para dicho marcador [41,7 %] empleando un *cut-off* de  $SDs > 3,0$ . Los parámetros observados para este ensayo incluyeron una  $SDs_{\text{mediana}} = 0,19$ , un rango de señales de -2,08 a 62,07 y una sensibilidad analítica de 64,5 % [Tabla II]. El análisis en paralelo de 49 sueros de individuos controles normales confirmó una especificidad de 93,9 % con la eliminación de 3 muestras con señales *outlier* para el cálculo del *cut-off*. Frente al análisis en conjunto de estos resultados puede decirse que se detectó el componente autoinmune en una cantidad de 37 muestras de pacientes con reciente diagnóstico de DMT1 [77,1 %], discriminado en 4 grupos experimentales [Figura 3 (C)]

### Resultados integrados y análisis de correlación

El diagrama de Venn (Figura 4 (A)) ilustra los resultados integrados de la determinación de GADA por RBA y FloCMA *multiplex*. Del análisis de las 48 muestras de pacientes con DMT1, 25 sueros fueron positivos por ambos métodos [52,1 %], mientras que 15 resultaron negativos por ambos ensayos [31,3 %]. Se destaca que el método FloCMA fue capaz de determinar la presencia del marcador en 8 sueros que el RBA no pudo. Frente al análisis de regresión lineal y correlación entre las determinaciones de GADA por RBA y aquellas realizadas en paralelo por FloCMA, los parámetros estadísticos obtenidos fueron:  $R^2 = 0,6481$ ,  $r_s = 0,8137$  para RBA y FloCMA *multiplex* (Figura 5 (A)). Es así, que la regresión lineal es buena y la correlación entre métodos para determinar GADA es real y no por muestreo azaroso.

Luego del análisis de los resultados integrados de la determinación de IA-2A por RBA y FloCMA *multiplex* en las 48 muestras de pacientes con DMT1 se pudo observar que 20 sueros fueron positivos por los dos métodos [41,7 %], mientras que otros 20 resultaron negativos por ambos [41,7 %] [Figura 4 (B)]. El RBA

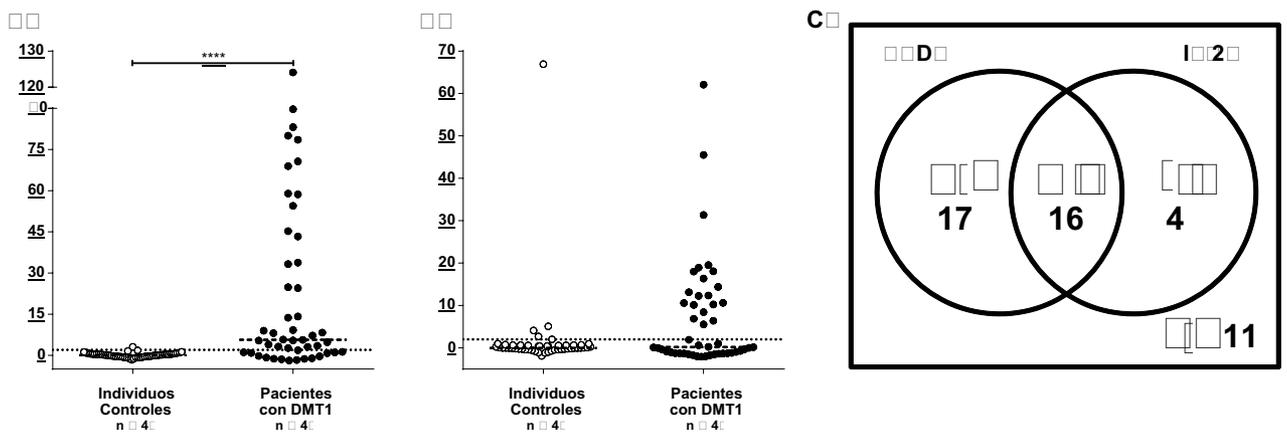
fue capaz de detectar como positivas a 8 muestras que el diseño *multiplex* de FloCMIA no pudo establecer como positivas. Cuando se analizaron la regresión lineal y la correlación entre las determinaciones de IA-2A por RBA frente a las determinaciones realizadas en paralelo por FloCMIA, los parámetros estadísticos obtenidos fueron:  $R^2 = 0,3110$ ,  $r_s = 0,7776$  para RBA y FloCMIA *multiplex* (Figura 5 (B)). Es así, que si bien la regresión lineal no es buena, la correlación entre métodos para determinar IA-2A es real (las señales obtenidas por ambos métodos tienden a aumentar paralelamente). El menor valor de  $R^2$  obtenido en la regresión lineal del FloCMIA para IA-2A puede observarse en la pérdida de linealidad a medida que aumenta el valor de las señales.

**Discusión**

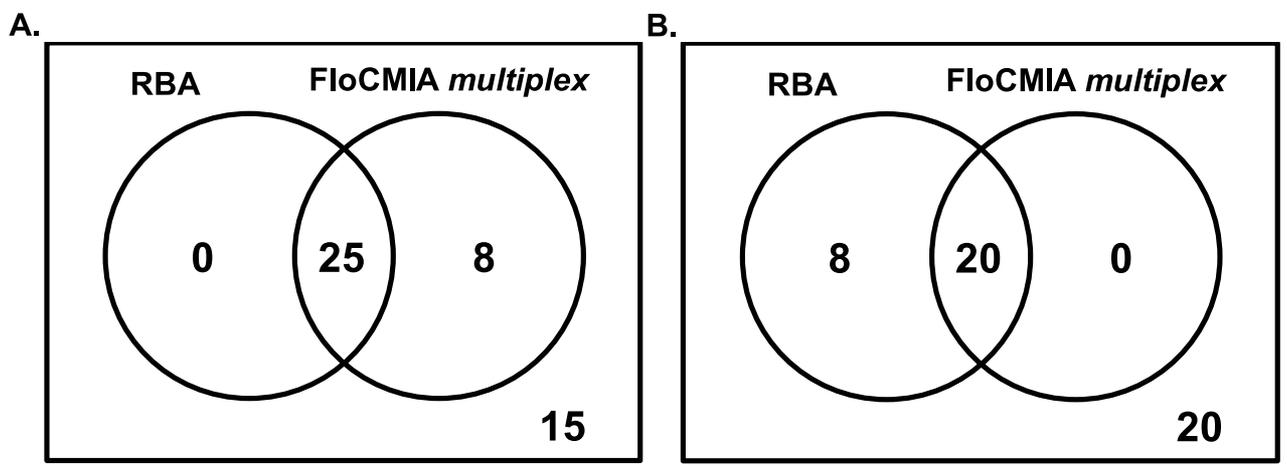
La problemática actual en el apoyo diagnóstico diabetológico se puede resumir en ciertos aspectos críticos que han podido ser subsanados en este trabajo:

- I. *Necesidad de gran cantidad de masa de antígeno*: se cuenta con dos autoantígenos expresados de manera recombinante en *E. coli* en gran cantidad, correctamente plegados, de fácil purificación y alto rendimiento; con ellos se han podido desarrollar un gran número de inmunoensayos y permite su aplicación en determinaciones rutinarias.
- II. *Metodologías radiométricas costosas*: se pudieron implementar exitosamente protocolos de FloCMIA con insumos

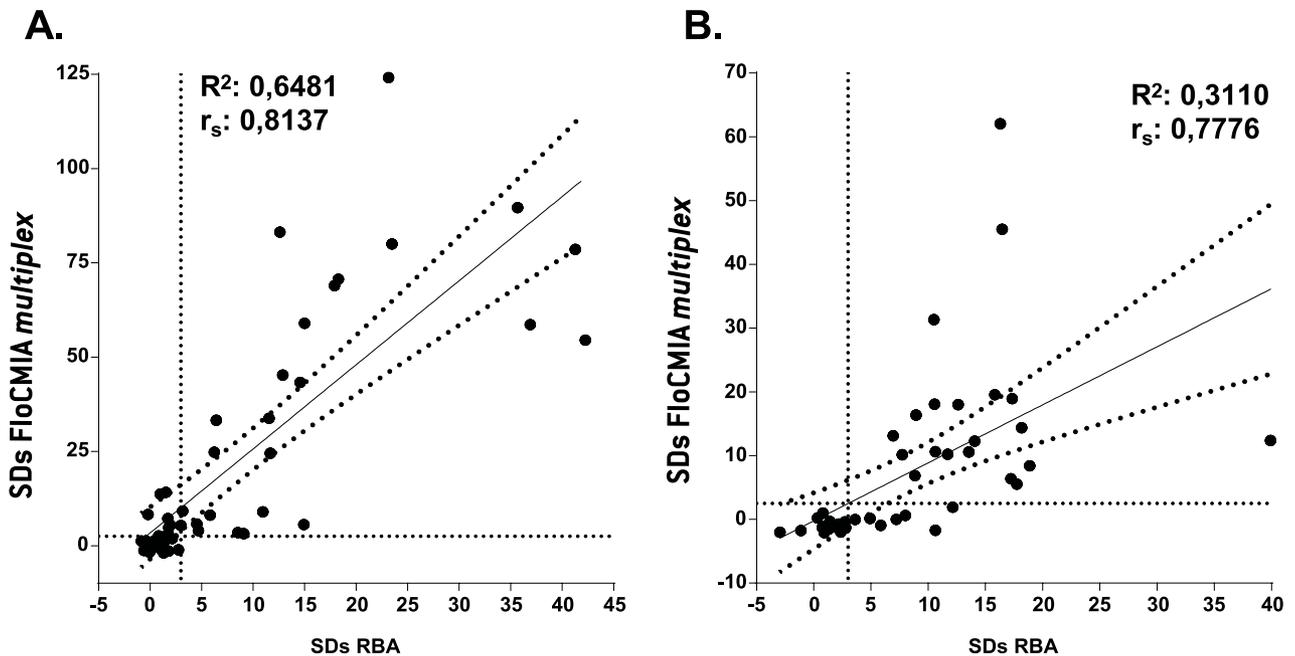
**Figura 3.** Resultados obtenidos por FloCMIA *multiplex* para la determinación de GADA (A) e IA-2A (B) en el suero de individuos controles normales y pacientes con DMT1. El valor de *cut-off* para cada ensayo es indicado por una línea punteada y las medianas para cada población están indicadas por una línea discontinua. \*\*\*\* $p < 0,0001$  estadísticamente significativo. C: Diagrama de Venn para resultados obtenidos en la determinación de GADA e IA-2A por FloCMIA *multiplex*, sobre una población de 48 pacientes infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DMT1. En este diagrama se establecen 4 grupos experimentales según la presencia (+) o ausencia (-) del marcador correspondiente.



**Figura 4.** Diagramas de Venn de los resultados integrados en la determinación de GADA (A) e IA-2A (B) en 48 sueros de pacientes infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DMT1, realizado por RBA y FloCMIA *multiplex*.



**Figura 5.** Correlación de señales obtenidas por el método FloCMA *multiplex* desarrollado para GADA (A) o IA-2A (B), y el método de referencia para el mismo marcador humoral en 48 sueros de pacientes diabéticos infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DMT1 seleccionados. La línea punteada representa el valor de *cut-off* para cada uno de los ensayos. Cada gráfico incluye los parámetros correspondientes a la regresión lineal ( $R^2$ ) y correlación determinada por el coeficiente de Spearman ( $r_s$ ).



mucho más estables y productivos para la evaluación y seguimiento de un gran número de muestras, con potencial beneficio económico del paciente y el sistema de salud.

III. *Aplicabilidad en laboratorios de baja-media complejidad:* el equipamiento más costoso es el citómetro de flujo, el cual ya ha sido adquirido en la gran mayoría de los hospitales públicos y privados de los centros urbanos más importantes del país, y no requiere mucha más infraestructura específica ni habilitaciones rigurosas.

IV. *Desafío analítico por la baja concentración de autoanticuerpos:* se desarrollaron métodos con detección de alta sensibilidad, como es la fluorescencia, que permitieron distinguir adecuadamente la diferencia en señales de pacientes e individuos normales.

Todos estos aspectos permiten considerar al FloCMA *multiplex* para la determinación de GADA e IA-2A como método de *screening* de primera línea en distintas poblaciones. Si bien no poseen una *performance* superadora con respecto al método de referencia, al ser un método combinado y discriminativo aumenta su importancia diagnóstica. Por lo tanto, teniendo en cuenta que:

- I. FloCMA GADA se desarrolló utilizando microesferas de  $4 \mu\text{m}$  como fase sólida, mientras que FloCMA IA-2A se optimizó con microesferas de  $5 \mu\text{m}$ , ambas pueden combinarse en un mismo pocillo de reacción y ser distinguidas en un citómetro de flujo gracias a la señales diferenciables que se obtienen por FSC.
- II. La detección simultánea permite realizar el *screening* y seguimiento de un gran número de pacientes [34-39-41], con

gran utilidad para predicción y prevención de la DMT1.

III. La combinación de la determinación de GADA e IA-2A ha demostrado detectar el componente autoinmune en la mayor parte de los pacientes infanto-juveniles con DMT1A (donde presentan alta prevalencia) y además posee un valor predictivo positivo  $>90\%$  al estudiar a la población de riesgo [27].

Se seleccionaron 48 muestras de pacientes con DMT1 de reciente diagnóstico para ser evaluadas por RBA y el diseño *multiplex* de FloCMA. A partir de los resultados obtenidos por el método de referencia se crearon 4 grupos experimentales según la presencia (+) o ausencia (-) de los marcadores GADA e IA-2A (+/+, +/-, -/+ y -/-), los cuales se sometieron posteriormente a la evaluación por FloCMA *multiplex*, para el análisis de la *performance* analítica con el objetivo de demostrar que los métodos radiométricos pueden ser reemplazados en la práctica clínica de apoyo diagnóstico diabetológico. Como era de esperar, empleando el RBA no todos los individuos mostraron evidencia de autoinmunidad (37 pacientes presentaron como mínimo uno de los marcadores humorales mencionados), aún siendo este el método de referencia. El análisis conjunto de los resultados supera al alcance diagnóstico de la determinación individual de cada autoanticuerpo (25 muestras positivas para GADA y 28 para IA-2A). Esto coincide con la recomendación de determinar más un marcador para disminuir la posibilidad de informar al paciente un resultado negativo para la presencia de autoinmunidad, con la consiguiente falla terapéutica. Esto es de suma importancia en pacientes adultos, donde si no se demuestra el componente autoinmune no se comienza el tratamiento sustitutivo con insulina, perjudicando así a los islotes

de Langerhans residuales al sobreexigir la liberación de dicha hormona para mantener los niveles normales de glucosa en sangre perpetuando y acelerando el daño autoinmune. Incluso, si se establece una terapia con secretagogos de insulina (como las sulfonilureas) el cuadro se agrava aún más, precipitando el debut de la DM autoinmune con cetoacidosis. Actualmente, está contraindicado el empleo de sulfonilureas en pacientes con presencia de autoanticuerpos en circulación y diagnóstico de DM no insulino-requiriente; de hecho se propone el uso de inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) o insulina para mejorar el control glucémico en ellos [42].

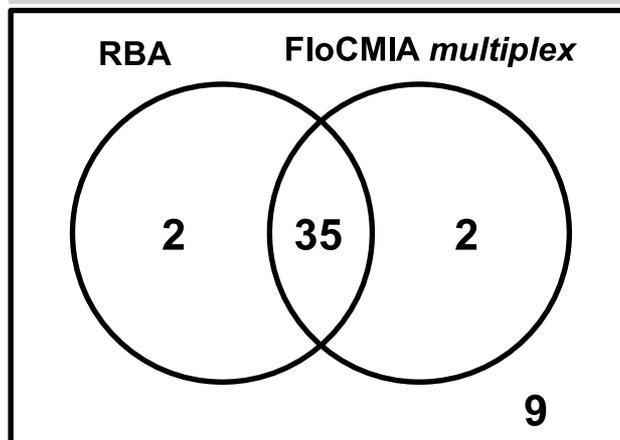
El análisis de regresión lineal y correlación entre las determinaciones de GADA por RBA y FloCMIA *multiplex* muestra que se relacionan linealmente y correlacionan de manera adecuada, rechazando la idea de que la correlación es debida a casualidad. Esto reafirma la idea de poder reemplazar el método radiométrico individual para la determinación de GADA por FloCMIA. Aunque posean principios fisicoquímicos diferentes, es evidente que el método FloCMIA posee características más cercanas a la fase fluida que los métodos en fase sólida clásicos, probablemente debido a que el pequeño tamaño de las microesferas, sumado a la incubación durante toda la noche del suero con las mismas (tiempo suficiente para alcanzar un estado cercano al equilibrio químico), podría constituir una "fase fluida virtual".

Por otro lado, al analizar la regresión lineal entre las determinaciones de IA-2A por RBA y FloCMIA *multiplex* se observa que no existe buena relación lineal evidenciada por los valores bajos de  $R^2$  obtenidos. *A priori*, esto podría deberse a que el método FloCMIA para IA-2A posee valores más altos de CV que aquellos para GADA al determinar alto títulos del marcador, lo cual produce un desvío de la linealidad. Como ambos métodos poseen principios fisicoquímicos diferentes no se esperaba una relación lineal ideal, y además el objetivo final es determinar presencia y ausencia del marcador, no tanto así su semicuantificación, por lo que no es tan crítica la falta de relación lineal entre señales sino que se detecte la presencia de IA-2A. Los métodos correlacionan de manera adecuada, indicando que cuando aumentan las señales por RBA también se observa el aumento por FloCMIA (análisis de  $r_s$ ). Si bien las determinaciones individuales por FloCMIA no superan en *performance* al RBA, cuando se analiza la cantidad de pacientes con componente autoinmune demostrado por FloCMIA GADA e IA-2A a través del diseño *multiplex* se obtiene prácticamente el mismo número que aquellos detectados por RBA (Figura 6).

Es recomendable aplicar el diseño *multiplex* de FloCMIA, ya que en un único acto analítico se puede detectar el componente autoinmune en los sueros de pacientes de manera análoga a realizar dos determinaciones independientes por el método de referencia (mediante el empleo del diseño *multiplex* se evidenció mayor número de pacientes con componente autoinmune que realizando cada RBA por separado). Esto trae como ventaja:

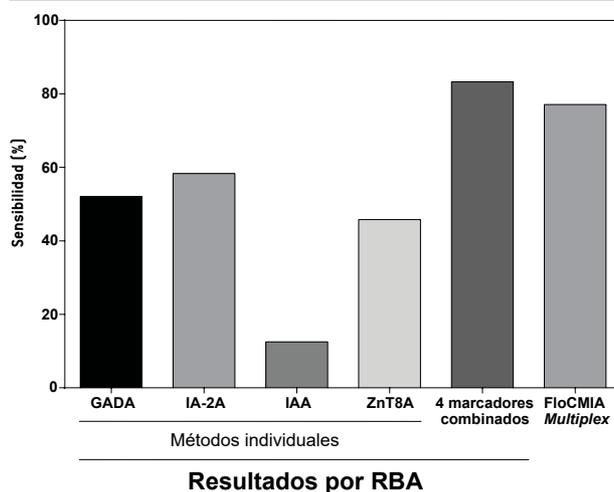
- I. Potencialmente disminuir los costos para el desarrollo e implementación de estos métodos en la clínica rutinaria,
- II. Utilizar equipamiento y procedimientos de menor complejidad,

**Figura 6.** Diagrama de Venn para los resultados integrados en la determinación de componente autoinmune (presencia de GADA y/o IA-2A) en 48 sueros de pacientes infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DMT1, realizado por RBA y FloCMIA *multiplex*.



- III. Aumentar la aplicabilidad de estos métodos en laboratorios de mediana complejidad que posean un citómetro de flujo con pocos requerimientos,
- IV. Descentralizar las determinaciones de marcadores humorales, como consecuencia del punto anterior,
- V. Lograr una mejora en el diagnóstico del componente autoinmune, análogo al método de referencia,
- VI. Mejorar la terapia una vez conocido el proceso autoinmune subyacente, ayudando incluso al médico clínico no especializado en diabetología (si no está seguro que análisis pedir al laboratorio, puede pedir la realización del FloCMIA *multiplex* y así aumentar las posibilidades de acceder a un diagnóstico correcto),
- VII. Disminuir el uso de material radiactivo eliminando la necesidad de tratar los desechos generados, pedir autorización a la autoridad regulatoria competente, formar personal con entrenamiento específico y autorizado, y disminuir los costos

**Figura 7.** Histograma de sensibilidad para los marcadores GADA, IA-2A, IAA y ZnT8A en comparación con el FloCMIA *multiplex* en 48 pacientes con DMT1.



de importación del insumo. Además, si bien el RBA es un método muy robusto, el trazador radiactivo decae rápidamente en el tiempo, afectando de manera negativa la performance analítica. Mientras tanto, los métodos FloCMIA dependen de una producción sencilla, rápida y económica de las proteínas de fusión necesarias para adsorber a las microesferas.

En la Figura 7 se re-elaboraron los resultados obtenidos con los 48 sueros de pacientes infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DMT1. En dicha figura se muestra en forma comparativa la sensibilidad obtenida para el FloCMIA *multiplex* respecto de los otros marcadores serológicos de autoinmunidad. Como puede observarse, la metodología desarrollada presentó el mayor porcentaje de positividad dentro del grupo de pacientes diabéticos evaluados en comparación a cada uno de los métodos individuales por radiometría: hasta un 77,1 % de los pacientes con diagnóstico reciente de DMT1 presentaron GADA y/o IA-2A por el FloCMIA *multiplex*, un aumento significativo en la sensibilidad respecto de los métodos de referencia individuales para GADA, IA-2A, IAA y ZnT8A con los cuales se alcanzó una sensibilidad del 52,1 %, 58,3 %, 12,5 % y 45,8 % respectivamente. Al analizar la sensibilidad combinada, la incorporación de los marcadores IAA y ZnT8A dosados por RBA sólo aportó un 6,2% extra al porcentaje de pacientes con componente autoinmune (83,3% de sensibilidad combinada entre los 4 marcadores vs. 77,1 % detectado originalmente con RBA GADA e IA-2A analizados en conjunto). De hecho, no es una gran ventaja sobre el componente autoinmune detectado con FloCMIA *multiplex* ya que en valor absoluto se detecta por RBA el proceso autoinmune subyacente en 3 pacientes más, 2 de ellos GADA (-)/IA-2A (-)/IAA (+)/ZnT8A (-) (uno de los cuales resultó GADA (+) por FloCMIA) y 1 de ellos GADA (-)/IA-2A (-)/IAA (-)/ZnT8A (+). Por lo tanto, aún teniendo en cuenta la determinación conjunta de los 4 marcadores humorales principales, el FloCMIA *multiplex* aún puede reemplazarlos con una buena *performance*. Si bien anteriormente nuestro grupo de trabajo desarrolló un método combinado para GADA e IA-2A que podía detectar el mismo número de pacientes diabéticos con etiología autoinmune que las determinaciones combinadas por RBA [34], este poseía un fundamento radiométrico por lo que no era posible su aplicación a un gran número de muestras e incluso sus costos no justificaban su aplicación rutinaria. Por otro lado, a diferencia del FloCMIA *multiplex*, no podía discriminar entre marcadores, sólo detectar componente autoinmune. Por último, puede observarse en la figura 6 (diagrama de Venn para el componente autoinmune) que hay 2 pacientes originalmente RBA negativos que “positivizaron” al analizarse por FloCMIA *multiplex*. Se considera que estos hallazgos analíticos no implican la aparición de falsos positivos debido a que:

- I. Al debutar con la patología, la clínica de estos pacientes es inequívoca para DMT1,
- II. Se acepta actualmente que el RBA por sí solo no es suficiente para descartar la presencia de autoinmunidad en pacientes diabéticos juveniles [43].
- III. El protocolo de FloCMIA combinó interacciones de fase sólida [GADA/IA-2A con TrxGAD/TrxIA-2<sub>ic</sub> inmovilizado] y fase fluida [complejo inmune microesfera- TrxGAD/TrxIA-2<sub>ic</sub>-GADA/IA-2A

con TrxGAD/TrxIA-2<sub>ic</sub> biotinilada] sumado a una incubación entre el suero y el antígeno adsorbido de ≈16 h [cercanía al equilibrio], lo que probablemente permitió una unión antígeno-GADA/IA-2A más estable.

- IV. La presencia de GADA o IA-2A de baja constante de afinidad ( $K_a$ ) dificulta su detección por RBA ya que es un ensayo que detecta muy bajas concentraciones pero es altamente dependiente de la  $K_a$ . Mientras que aquellos ensayos de fase sólida pueden detectar dichos autoanticuerpos de baja afinidad, pero presentan grandes limitaciones respecto a su sensibilidad [44-46].
- V. Hay un reconocimiento de epitopes no expuestos originalmente en la fase fluida, porque en esta se utiliza el antígeno nativo expresado en un organismo eucariota. Esto no siempre significa que sea la forma en que se presenta al sistema inmune y se genera la respuesta inmune dirigida a estos autoantígenos, por lo que la forma en que se adsorbe sobre una superficie de poliestireno puede exponer epitopes necesarios para la unión del autoanticuerpo. Por otro lado, se usan dos moléculas estructuralmente diferentes y de distinta fuente celular, potencialmente presentando epitopes diferencialmente.
- VI. Finalmente, en particular en estos casos, los 2 pacientes evidenciaron componente autoinmune ya sea por presencia de IAA o ZnT8A, dándoles un fuerte respaldo experimental a la detección del proceso autoinmune.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que el FloCMIA *multiplex* es útil para el *screening* de la DMT1 en la población infanto-juvenil.

En el futuro se pretende extender el diseño *multiplex* al resto de los marcadores humorales de mayor prevalencia, como IAA/PAA y ZnT8A, y así contar con la detección simultánea y discriminativa de los 4 autoanticuerpos claves en DM autoinmune. De hecho, se puede seleccionar un panel diferencial de analitos a analizar dependiendo de la población en estudio y la prevalencia diferencial de los marcadores en las mismas:

- I. En pacientes niños y adolescentes sería conveniente estudiar GADA e IA-2A en principio para el apoyo diagnóstico en casos de debut sospechoso.
- II. En jóvenes y adultos no obesos, con comienzo clínico de DM [clasificación como LADA o DMT2 genuino], cobraría mayor importancia sumar el uso de ZnT8A o IAA a GADA, no tanto así IA-2A ya que se demostró la relación inversa entre sus títulos y la edad, y no aportaría aumento en la prevalencia del componente autoinmune. Sin embargo, su presencia indicaría alto riesgo para la rápida progresión a la insulino-dependencia.
- III. El estudio de los títulos de anticuerpos anti-insulina (IA) producidos por la terapia insulínica sustitutiva para detectar falla en el control metabólico de pacientes diabéticos, etc.

También es útil no sólo para el apoyo diagnóstico (mejor clasificación, aplicación terapéutica adecuada en el momento oportuno y máxima preservación funcional de los islotes pancreáticos) sino también para su aplicación en:

- I. Estudios de prevalencia en la población general,
- II. Estudios de predicción en grupos de riesgo (parientes en

primer grado, sanos, de pacientes con DMT1] aguardando la disponibilidad de terapias preventivas. Aquí sería útil la combinación GADA/IA-2A,

### III. Prospección de la patología, entre otras.

Todas estas aplicaciones son posibles gracias a la posibilidad de evaluar un gran número de muestras en poco tiempo y con la posibilidad de obtener el resultado para varios marcadores en una determinación [efectuando un ahorro sustancial de muestra del paciente al evitar 4 determinaciones individuales, crítico en algunos grupos de pacientes]. También es destacable el rango dinámico amplio que posee FloCMIA, y si bien actualmente la semicuantificación de los marcadores no tiene una aplicación clínica inmediata ya que se busca presencia del mismo (priorizando la sensibilidad y especificidad), eventualmente podría correlacionarse con diferentes fenómenos consecuencia de la patología, como por ejemplo con la cercanía al debut, progreso del daño pancreático, el requerimiento de insulina [34], entre otras. En este contexto, Achenbach y col. examinaron prospectivamente el título de autoanticuerpos, la reactividad hacia ciertos epitopes y las subclases de IgG en familiares en primer grado de pacientes diabéticos con presencia de algún autoanticuerpo y determinaron cómo estos análisis pueden ser utilizados para estratificar la probabilidad de progresión hacia el debut clínico de la DMT1 [47]. De esta manera, demostraron que el riesgo de DMT1 aumenta en familiares con títulos de IA-2A e IAA por encima del umbral del percentilo 99 de individuos controles, pero que el riesgo no se relaciona con los títulos de GADA.

Como consecuencia de esto, el RBA quedaría como un método complementario o confirmatorio para ciertos casos dudosos, reemplazado por un método más adecuado para *screening* rápido, masivo y económico debido a que es más simple de ejecutar, menos costoso, aplicable a la práctica clínica y factible de ser automatizado.

Como conclusión se logró desarrollar un inmunoensayo no radiométrico basado en citometría de flujo el cual logró tanto la mayor sensibilidad analítica en la búsqueda de autoinmunidad en DMT1 como el mayor VPP en la evaluación del riesgo a desarrollar DMT1.

### Agradecimientos

Agradecemos a Liliana Trifone y Adriana Roussos del Servicio de Nutrición del Hospital Pediátrico Nacional Gutiérrez y a la División de Hemoterapia del Hospital de Clínicas José de San Martín (Buenos Aires, Argentina) por recolectar y suministrar el suero de pacientes diabéticos y de individuos controles normales, respectivamente.

Este trabajo fue financiado en parte por los subsidios del Programa FONCYT de la Agencia Nacional para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología (PICT-2008-0998), el Consejo Nacional de Investigación (CONICET) PIP 11220120100256CO y la Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina (UBA 20020110100146).

### Referencias bibliográficas

1. Group IDFDA. Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: Estimates for the year 2013. Diabetes research and clinical practice. 2015; 109(3):461-5. Epub 2015/06/30.
2. Palmer JP, Hirsch IB. What's in a name: latent autoimmune diabetes of adults, type 1.5, adult-onset, and type 1 diabetes. Diabetes care. 2003;26(2):536-8.
3. Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay IR, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M, et al. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. Diabetic Medicine : a Journal of the British Diabetic Association. 1994;11(3):299-303.
4. Jahromi MM, Eisenbarth GS. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. Cell Mol Life Sci. 2007;64(7-8):865-72.
5. Reaven GM, Bernstein R, Davis B, Olefsky JM. Nonketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance? The American Journal of Medicine. 1976;60(1):80-8.
6. DeFronzo R, Deibert D, Hendler R, Felig P, Soman V. Insulin sensitivity and insulin binding to monocytes in maturity-onset diabetes. The Journal of Clinical Investigation. 1979;63(5):939-46.
7. Turner RC, Holman RR, Matthews D, Hockaday TD, Peto J. Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. Metabolism: Clinical and Experimental. 1979; 28(11):1086-96.
8. Olefsky JM, Kolterman OG, Scarlett JA. Insulin action and resistance in obesity and noninsulin-dependent type II diabetes mellitus. The American Journal of Physiology. 1982;243(1):E15-30.
9. SEARCH for Diabetes in Youth: a multicenter study of the prevalence, incidence and classification of diabetes mellitus in youth. Controlled clinical trials. 2004;25(5):458-71.
10. Gepts W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. Diabetes. 1965; 14(10):619-33.
11. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. N Engl J Med. 1986;314(21):1360-8.
12. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. Lancet. 2014;383(9911):69-82.
13. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 2006;29 Suppl 1:S43-8.
14. Eisenbarth GS, Jeffrey J. The natural history of type 1A diabetes. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia 2008; 52(2):146-55.
15. Rabin DU, Pleasic SM, Palmer-Crocker R, Shapiro JA. Cloning and expression of IDDM-specific human autoantigens. Diabetes. 1992;41(2):183-6.
16. Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Fonte MT, et al. Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. Diabetes. 1994; 43(11):1304-10.

17. Roll U, Christie MR, Standl E, Ziegler AG. Associations of anti-GAD antibodies with islet cell antibodies and insulin autoantibodies in first-degree relatives of type I diabetic patients. *Diabetes*. 1994; 43(1):154-60.
18. Seissler J, Morgenthaler NG, Achenbach P, Lampeter EF, Glawe D, Payton M, et al. Combined screening for autoantibodies to IA-2 and antibodies to glutamic acid decarboxylase in first degree relatives of patients with IDDM. The DENIS Study Group. *Deutsche Nikotinamid Interventions-Studie. Diabetologia*. 1996;39(11):1351-6.
19. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Chase HP, et al. Number of autoantibodies (against insulin, GAD or ICA512/IA2) rather than particular autoantibody specificities determines risk of type I diabetes. *Journal of autoimmunity*. 1996;9(3):379-83.
20. Bonifacio E, Genovese S, Braghi S, Bazzigaluppi E, Lampasona V, Bingley PJ, et al. Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia*. 1995; 38(7):816-22.
21. Gianani R, Rabin DU, Verge CF, Yu L, Babu SR, Pietropaolo M, et al. ICA512 autoantibody radioassay. *Diabetes*. 1995; 44(11):1340-4.
22. Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJ, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EA. Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes*. 1997; 46(11):1701-10.
23. Gorus FK, Goubert P, Semakula C, Vandewalle CL, De Schepper J, Scheen A, et al. IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. *The Belgian Diabetes Registry. Diabetologia*. 1997; 40(1):95-9.
24. Hawa M, Rowe R, Lan MS, Notkins AL, Pozzilli P, Christie MR, et al. Value of antibodies to islet protein tyrosine phosphatase-like molecule in predicting type 1 diabetes. *Diabetes*. 1997; 46(8):1270-5.
25. Hummel M, Bonifacio E, Schmid S, Walter M, Knopff A, Ziegler AG. Brief communication: early appearance of islet autoantibodies predicts childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents. *Annals of Internal Medicine*. 2004;140(11):882-6.
26. Knip M. Can we predict type 1 diabetes in the general population? *Diabetes care*. 2002;25(3):623-5.
27. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, et al. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*. 1996; 45(7):926-33.
28. Achenbach P, Schlosser M, Williams AJ, Yu L, Mueller PW, Bingley PJ, et al. Combined testing of antibody titer and affinity improves insulin autoantibody measurement: Diabetes Antibody Standardization Program. *Clinical Immunology*. 2007;122(1):85-90. Epub 2006/10/25.
29. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*. 1983;222(4630):1337-9.
30. Grubin CE, Daniels T, Toivola B, Landin Olsson M, Hagopian WA, Li L, et al. A novel radioligand binding assay to determine diagnostic accuracy of isoform-specific glutamic acid decarboxylase antibodies in childhood IDDM. *Diabetologia*.
31. Diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group. World Health Organization Technical Report Service. 1985; 727:1-113.
32. Papouchado ML, Valdez SN, Ermacora MR, Ganan S, Poskus E. Highly-sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assays for GAD65 autoantibodies using a thioredoxin-GAD65 fusion antigen. *Journal of immunological methods*. 1997; 207(2):169-78.
33. Sica MP, Primo ME, Ermacora MR, Poskus E. High-yield expression of properly folded insulinoma-associated protein intracellular domain (IA-2ic) in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2003; 37(Pt 3):301-9.
34. Valdez SN, Sica MP, Labovsky V, Iacono RF, Cardoso AL, Krochik AG, et al. Combined measurement of diabetes mellitus immunological markers: an assessment of its benefits in adult-onset patients. *Autoimmunity*. 2001; 33(4):227-36.
35. Papouchado ML, Valdez SN, Ghiringhelli D, Poskus E, Ermacora MR. Expression of properly folded human glutamate decarboxylase 65 as a fusion protein in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*. 1997; 246(2):350-9.
36. Guerra LL, Faccinetti NI, Trabucchi A, Rovitto BD, Sabljic AV, Poskus E, et al. Novel prokaryotic expression of thioredoxin-fused insulinoma associated protein tyrosine phosphatase 2 (IA-2), its characterization and immunodiagnostic application. *BMC Biotechnol*. 2016; 16(1):84.
37. Trabucchi A, Guerra LL, Faccinetti NI, Iacono RF, Poskus E, Valdez SN. Expression and characterization of human proinsulin fused to thioredoxin in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*. 2012; 94(6):1565-76.
38. Hoffman RD, Lane MD. Iodophenylarsine oxide and arsenical affinity chromatography: new probes for dithiol proteins. Application to tubulins and to components of the insulin receptor-glucose transporter signal transduction pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(20):14005-11.
39. Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E. Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1995; 155(11):5419-26.
40. Wiest-Ladenburger U, Hartmann R, Hartmann U, Berling K, Bohm BO, Richter W. Combined analysis and single-step detection of GAD65 and IA2 autoantibodies in IDDM can replace the histochemical islet cell antibody test. *Diabetes*. 1997; 46(4):565-71.
41. Dittler J, Seidel D, Schenker M, Ziegler AG. GADIA2-combi determination as first-line screening for improved prediction of type 1 diabetes in relatives. *Diabetes*. 1998; 47(4):592-7.
42. Leslie RD, Palmer J, Schloot NC, Lernmark A. Diabetes at the crossroads: relevance of disease classification to pathophysiology and treatment. *Diabetologia*. 2016;59(1):13-20.
43. Villalba A, Iacono RF, Valdez SN, Poskus E. Detection and immunochemical characterization of glutamic acid decarboxylase autoantibodies in patients with autoimmune diabe-

- tes mellitus. *Autoimmunity*. 2008;41(2):143-53.
44. Stumpo RR, Llera AS, Cardoso AI, Poskus E. Solid versus liquid phase assays in detection of insulin antibodies. Influence of iodination site on labelled insulin binding. *Journal of immunological methods*. 1994; 169(2):241-9.
  45. Sodoyez-Goffaux F, Koch M, Dozio N, Brandenburg D, Sodoyez JC. Advantages and pitfalls of radioimmune and enzyme linked immunosorbent assays of insulin antibodies. *Diabetologia*. 1988; 31(9):694-702.
  46. Sodoyez JC, Koch M, Lemaire I, Sodoyez-Goffaux F, Rapaille A, Francois-Gerard C, et al. Influence of affinity of antibodies upon their detection by liquid phase radiobinding assay and solid phase enzyme linked immunosorbent assay. Demonstration using monoclonal antibodies raised against rDNA human proinsulin. *Diabetologia*. 1991;34(7):463-8.
  47. Achenbach P, Warncke K, Reiter J, Naserke HE, Williams AJ, Bingley PJ, et al. Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. *Diabetes*. 2004;53(2):384-92.