

## **Trabajos Seleccionados**

### **PRESENTACIONES ORALES**

#### **O18 Novedoso inmunoensayo multiplex para la detección simultánea y discriminativa de los principales marcadores de autoinmunidad en diabetes mellitus**

Adriana Victoria Sabljic<sup>1</sup>, Silvia Sonia Bombicino<sup>1</sup>, Juan Ignacio Marfía<sup>1</sup>, Aldana Trabucchi<sup>1</sup>, Liliana Trifone<sup>2</sup>, Adriana Roussos<sup>2</sup>, Rubén Francisco Iacono<sup>1</sup>, Edgardo Poskus<sup>1</sup>, Silvina Valdez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CÁTEDRA DE INMUNOLOGÍA, FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA, UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES, CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, ARGENTINA; <sup>2</sup>SERVICIO DE NUTRICIÓN, HOSPITAL DE PEDIATRÍA RICARDO GUTIÉRREZ, CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, ARGENTINA

Contacto: asabljic@hotmail.com

**Introducción:** los principales marcadores de autoinmunidad en diabetes mellitus tipo 1 (DM1) son los que presentan especificidad hacia: glutamato decarboxilasa (GADA), tirosina fosfatasa 2 asociada a insulinoma (IA-2A) y la isoforma 8 del transportador de zinc (ZnT8A). Su detección es fundamental como apoyo diagnóstico de DM1 y para establecer la presencia de diabetes autoinmune latente del adulto (LADA) a fin de garantizar el tratamiento adecuado en forma oportuna. El método de referencia para su detección (ensayo de unión a radioligando, RBA) es altamente sensible y específico, pero costoso, contaminante del medio ambiente y su ejecución se limita a centros con infraestructura y personal habilitados por la entidad regulatoria. Por ello, es imprescindible el desarrollo de métodos alternativos que facilite el acceso al diagnóstico a un mayor número de pacientes.

**Objetivos:** desarrollar un inmunoensayo basado en citometría de flujo (CF) para la determinación combinada y discriminativa de los principales marcadores de DM1: GADA, IA-2A y ZnT8A.

**Materiales y métodos:** se ensayaron 10 sueros de pacientes pediátricos con reciente diagnóstico de DM1 y 20 sueros de individuos controles normales (SHN). Se empleó un modelo de doble paratope incubando las muestras con microesferas de poliestireno de 4, 5 y 7 µm adsorbidas con los antígenos recombinantes Trx-GAD, Trx-IA-2 y Trx-ZnT8, respectivamente, y las correspondientes proteínas biotiniladas. Luego de una incubación *over night* a 4 °C, los inmunocomplejos formados se detectaron empleando estreptavidina-ficoeritrina y se adquirió en un citómetro de flujo. Todas las muestras fueron evaluadas en paralelo por RBA.

**Resultados:** de los 10 pacientes estudiados, 8 (80%) fueron positivos para GADA, 10 (100%) para IA-2A y 7 (70%) para ZnT8A. Las sensibilidades relativas al RBA fueron: 100% para GADA e IA-2A y 75% para ZnT8A. Las especificidades, calculadas como 100 menos el porcentaje de SHN detectados como positivos, fueron de 100, 95 y 90% para GADA, IA-2A y ZnT8A, respectivamente.

**Conclusiones:** los resultados preliminares obtenidos ponen en evidencia la factibilidad de emplear este novedoso inmunoensayo multiplex por CF para la detección simultánea y en un único acto analítico de los distintos marcadores de autoinmunidad en DM1, siendo necesario aumentar el número de muestras estudiadas para establecer el desempeño analítico del ensayo. Esto representa una ventaja operativa respecto de realizar cada determinación en forma individual, reduciendo costos, tiempo e impacto ambiental.

**O18 Novel multiplex immunoassay for the simultaneous and discriminative detection of the main autoimmunity markers in Diabetes Mellitus**

*Adriana Victoria Sabljic<sup>1</sup>, Silvia Sonia Bombicino<sup>1</sup>, Juan Ignacio Marfía<sup>1</sup>, Aldana Trabucchi<sup>1</sup>, Liliana Trifone<sup>2</sup>, Adriana Roussos<sup>2</sup>, Rubén Francisco Iacono<sup>1</sup>, Edgardo Poskus<sup>1</sup>, Silvina Valdez<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>CHAIR OF IMMUNOLOGY, FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY, UNIVERSITY OF BUENOS AIRES, AUTONOMOUS CITY OF BUENOS AIRES, ARGENTINA; <sup>2</sup>NUTRITION SERVICE, RICARDO GUTIÉRREZ PEDIATRIC HOSPITAL, AUTONOMOUS CITY OF BUENOS AIRES, ARGENTINA

Contacto: [asabljic@hotmail.com](mailto:asabljic@hotmail.com)

**Introduction:** The main autoimmunity markers in Type 1 Diabetes Mellitus (DM1) are those that have specificity towards: glutamate decarboxylase (GADA), insulinoma-associated tyrosine phosphatase 2 (IA-2A) and isoform 8 of the Zinc transporter (ZnT8A). Its detection is essential to support the diagnosis of DM1 and to establish the presence of Latent Autoimmune Diabetes of the Adult (LADA) to guarantee adequate treatment in a timely manner.

The reference method for its detection (Radioligand Binding Assay, RBA) is highly sensitive and specific, but expensive, polluting and its execution is limited to centers with infrastructure and personnel authorized by the regulatory entity. Therefore, it is essential to develop alternative methods that facilitate access to diagnosis to a bigger number of patients.

**Aim:** The aim of this work was to develop an immunoassay based on Flow Cytometry (FC) for the combined and discriminative determination of the main DM1 markers: GADA, IA-2A and ZnT8A.

**Materials and methods:** 10 sera from pediatric patients with a recent diagnosis of DM1 and 20 sera from normal human controls (NHC) were tested. A double paratope model was used incubating the samples with polystyrene microspheres of 4, 5 and 7 µm adsorbed with the recombinant antigens Trx-GAD, Trx-IA-2 and Trx-ZnT8, respectively, and the corresponding biotinylated proteins. After an overnight incubation at 4 °C, the immune complexes formed were detected using streptavidin-Phycoerythrin and were acquired on a flow cytometer. All samples were evaluated in parallel by RBA.

**Results:** Of the 10 patients studied, 8 (80%) were positive for GADA, 10 (100%) for IA-2A and 7 (70%) for ZnT8A. The sensitivities relative to RBA were: 100% for GADA and IA-2A and 75% for ZnT8A. The specificities, calculated as 100 minus the percentage of NHC detected as positive, were 100, 95 and 90% for GADA, IA-2A and ZnT8A, respectively.

**Conclusions:** The preliminary results obtained show the feasibility of using this novel multiplex immunoassay by FC for the simultaneous detection and in a single analytical act of the different autoimmunity markers in DM1, being necessary to increase the number of samples studied to establish the analytical performance of the test. This represents an operational advantage over making each determination individually, reducing costs, time, and environmental impact.