

ORIGINAL

Estudio de autoanticuerpos en el inicio de la diabetes autoinmune en nuestro medio mediante ELISA[☆]

María José Huici Moreno*, María Teresa Herrera del Rey, Ana Isabel Álvarez Ríos, Inmaculada Domínguez Pascual, Rocío Infante Fontán, Antonio León-Justel y Juan Miguel Guerrero Montávez

Servicio Bioquímica Clínica, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla, España

Recibido el 8 de junio de 2010; aceptado el 17 de enero de 2011

Disponible en Internet el 8 de abril de 2011

PALABRAS CLAVE

Diabetes mellitus autoinmune;
Autoanticuerpos;
Anticuerpos anti-descarboxilasa del ácido glutámico (GADA);
Anticuerpos anti-tirosina fosfatasa de membrana IA-2;
Anticuerpos anti-insulina (IAA)

Resumen

Introducción: Los auto-anticuerpos son marcadores útiles en el inicio de la diabetes mellitus autoinmune, como apoyo diagnóstico. El objetivo de este trabajo fue conocer la prevalencia de autoanticuerpos en el inicio de diabetes en nuestro medio, medidos mediante ELISA y valorar su papel diagnóstico en diabetes autoinmune.

Material y métodos: Muestra de 111 pacientes con diabetes de inicio: 61 tipo 1 (incluye 12 diabetes autoinmune latente del adulto [LADA]) y 50 tipo 2. Grupo control 64 no diabéticos. Se analizaron antidescarboxilasa del ácido glutámico GADA, anti-tirosina fosfatasa de membrana IA-2 y anti-insulina IAA, mediante enzoinmunoanálisis ELISA en microplaca. Se realizó estudio observacional descriptivo para valoración de pruebas diagnósticas. Programa estadístico PASW Statistics versión 18.

Resultados: GADA(+): 78,7% DM1; 83,3% LADA; 2,0% DM2; 1,6% control. IA-2(+): 52,2% DM1; 45,5% LADA; 16,4% DM2; 12,5% control. IAA(+): 10,3% DM1; 18% LADA; 6,0% DM2; 1,7% control. GADA e IA-2 diferenciaron significativamente ($p < 0,0001$) a los pacientes con diabetes autoinmune. No así IAA. Área bajo curva *receiver operating characteristics* (ROC): GADA = 0,90 ($p < 0,0001$); IA-2 = 0,74 ($p < 0,0001$); IAA = 0,57 ($p = 0,126$). Criterio límite GADA(+) > 5,5 U/mL (sensibilidad 79%, especificidad 98%) e IA-2(+) > 6,0 U/mL (sensibilidad 54%, especificidad 84%). Análisis de factores riesgo asociados: *Odds ratio* GADA = 51,44 e IA-2 = 4,64.

Conclusiones: En nuestro estudio, la prevalencia de GADA en el inicio de diabetes es alta y su determinación eficaz en el diagnóstico de diabetes autoinmune. IA-2 incrementó 4,6 veces la probabilidad diagnóstica. IAA medidos mediante nuestro test ELISA no han mostrado valor como marcadores en la diabetes autoinmune, aunque esto no descarta su utilidad en otras patologías.

© 2010 AEEM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

[☆] Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el III Congreso Nacional del Laboratorio Clínico celebrado en Valencia del 14 al 16 de octubre de 2009.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: behu@telefonica.net (M.J. Huici Moreno).

KEYWORDS

Autoimmune diabetes mellitus;
Autoantibodies;
Antibodies against glutamic acid decarboxylase (GADA);
Antibodies against tyrosine phosphatase IA-2;
Antibodies against insulin (IAA)

Autoantibodies: analysis of new-onset autoimmune diabetes using ELISA test**Abstract**

Introduction: Autoantibodies are useful markers for clinical onset of autoimmune diabetes, and as a diagnostic supports. The aim of this study was to determine the prevalence of autoantibodies at the onset diabetes mellitus in our environment, measured by an ELISA technique, and to assess its role as autoimmune diabetes diagnostic support.

Material and methods: A sample of 111 patients with diabetes onset was studied, which included, 61 type 1 diabetes (12 Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA) and 50 type 2 diabetes. Control group: 64 non-diabetics. Antibodies glutamic acid decarboxylase antibodies (GADA), membrane phosphatase anti-tyrosine (IA-2), and anti-insulin (IAA) were determined by enzyme immunoassay ELISA microplates. A descriptive observational study was conducted to the measure diagnostic tests using the software PASW Statistics version 18.

Results: GADA(+): 78.7% DM1; 2.0% DM2; 1.6% control. IA-2(+): 52.2% DM1; 45.5% LADA; 16.4% DM2; 12.5% control. IAA(+): 10.3% DM1; 18.0% LADA; 6.0% DM2; 1.7% control. Comparing means, autoimmune diabetics were significantly differentiated ($P<.0001$) by GADA and IA-2 values, but not with IAA. The area under the Curve using software Receiver Operating Characteristics (ROC): GADA=0.90 ($P<.0001$), IA-2=0.74 ($P<.0001$), IAA=0.57 ($P=.126$). Optimal cut off for GADA>5.5U/mL (sensitivity 79%, specificity 98%) and IA-2>6.0U/mL (sensitivity 54%, specificity 84%). On analysing risk factors associated with autoimmune diabetes diagnosis, the calculated Odds ratio gave GADA=51.44 and IA-2=4.64.

Conclusions: In this study GADA(+) prevalence is high at diabetes onset, and its calculation has been effective for autoimmune diabetes diagnosis. IA-2 increases diagnostic probability 4.6 times. Anti-insulin antibodies measured by ELISA test did not demonstrate value for autoimmune diabetes diagnosis and classification, although its usefulness is not excluded for the diagnosis support of other diseases.

© 2010 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La diabetes autoinmune se caracteriza por la destrucción de las células beta de los islotes pancreáticos a través de mecanismos de necrosis o apoptosis mediados por células T reactivas¹. Esta es la causa más común de la diabetes mellitus tipo 1 (DM1), denominada tipo autoinmune o 1A, con déficit absoluto de insulina. Durante el proceso destructivo que puede durar varios años, es posible detectar en el suero de los futuros pacientes diabéticos, inmunoglobulinas que reconocen a determinadas moléculas del islote que actúan como antígenos. Estos autoanticuerpos permiten la predicción de la DM1A y la tipificación de la diabetes autoinmune en su inicio².

Con etiología similar, la diabetes autoinmune latente del adulto (LADA) es una forma lenta y progresiva, caracterizada por la positividad de autoanticuerpos asociados con la diabetes y la necesidad de requerimientos de insulina. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la incluye en el grupo de DM1, como un tipo especial de progresión lenta. Se postula que los pacientes LADA con múltiples autoanticuerpos positivos y/o niveles altos de éstos tienen un fenotipo similar a los MD1, mientras que, aquellos con niveles bajos de GADA, tienen características clínicas similares a MD2, siendo independientes de la insulina durante varios años³. Por tanto, los autoanticuerpos servirían para diferenciar a los pacientes LADA de los DM2.

Su aplicación en la práctica clínica se ve mermada porque carecen de especificidad, y porque aún no están

disponibles las terapias de modulación del proceso de la enfermedad, con lo que los beneficios para los pacientes individuales generalmente son cuestionables⁴. No obstante, por su utilidad como apoyo diagnóstico, la Sociedad Española de Diabetes aconseja, cuando sea posible para el cribado primario de la diabetes autoinmune, la determinación combinada de GADA con IA2, siendo estos últimos sustituidos por los IAA en sujetos de corta edad (< 10 años). En caso de positividad para uno o ambos anticuerpos, puede completarse la evaluación mediante el análisis de al menos un tercero y preferiblemente también un cuarto (IAA o IA-2 en su caso, conjuntamente con ICA)⁵.

Los anti-GAD o GADA son anticuerpos específicos contra la enzima glutamato decarboxilasa. Aproximadamente el 70% de los pacientes caucásicos con DM1 de inicio los presentan y sus niveles son estables después de 10 años del diagnóstico⁶. Igualmente se encuentran porcentajes altos en pacientes con diabetes LADA.

La tirosina fosfatasa 2 es una glicoproteína transmembrana perteneciente a la familia de las proteínas tirosina fosfatasa⁷. Anticuerpos anti-tirosina fosfatasa 2 IA-2 aparecen en el 60% de los pacientes con DM1 de inicio⁸.

Los IAA se definen como anticuerpos que se unen a la insulina en individuos que no reciben tratamiento con ésta. Palmer et al los hallaron en al menos el 18% de los pacientes insulin-dependientes de reciente diagnóstico aún sin ser tratados con insulina⁹. Aguilera en el 27,9% de adolescentes y adultos con DM1 de inicio¹⁰. Su frecuencia está asociada a la

edad siendo mayor en el debut de DM1 en los niños menores de 10 años⁶.

La existencia de informes contradictorios sobre su prevalencia y su valor diagnóstico parece debida a los distintos procedimientos utilizados para su análisis. Mientras que las pruebas ELISA anti-GAD-65 han demostrado tener sensibilidad y especificidad tan alta como los ensayos radiactivos, así como buena precisión y manejo adecuado para uso rutinario^{11,12}, los resultados ELISA-IA2 han sido variables^{12,13} y los de IAA han sido cuestionados¹⁴.

La dificultad para comparar y reproducir los resultados llevó a la creación de grupos de trabajo diseñados para estandarizar los análisis¹⁵ que se encargaron de la elaboración de sueros testigo según la *Juvenile Diabetes Foundation* (JDF) y los *Immunology of Diabetes Workshops*¹⁶. Junto a numerosos estudios de grupos concretos^{8,10-14,17}, el programa internacional DASP (*Diabetes Antibody Standardization Program*), pretende evaluar y mejorar los métodos de ensayo y los reactivos de referencia internacional de la OMS¹⁸⁻²⁰.

Los objetivos del presente trabajo son conocer la prevalencia de auto-anticuerpos anti-GAD, anti-IA-2 y anti-insulina en el debut de la diabetes mellitus en nuestro medio, medidos mediante técnica ELISA y valorar su papel como apoyo en diagnóstico de diabetes autoinmune.

Material y métodos

Se realizó un estudio observacional descriptivo transversal para valoración de pruebas diagnósticas.

Se revisó a todos los pacientes de cualquier sexo o edad, estudiados en la Unidad de Endocrinología y el Servicio de Bioquímica Clínica del Área Sanitaria del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla a los que se había indicado la determinación de anti-GAD, anti-IA2 y/o anti-insulina por sospecha de inicio de diabetes, durante el año 2008. Los datos clínicos fueron extraídos prospectivamente de las historias clínicas de la aplicación de Intranet SIDCA (Sistema de Información y Documentación Clínica Avanzada).

Se incluyeron un total de 175 individuos en el estudio, distinguiendo tres grupos:

- Pacientes con DM1: en este grupo se encuentran, siguiendo los criterios de la OMS y la *American Diabetes Association* (ADA)^{21,22}, los pacientes con diabetes de autoinmunidad latente en adultos (LADA) o tipo 1 de progresión lenta.
- Pacientes con DM2.
- Grupo control de personas no diabéticas.

Se excluyeron los casos en los que no se hubiera establecido el diagnóstico de diabetes mellitus de inicio, aunque padecieran hiperglucemia objetivada o cualquier otra alteración del metabolismo de la glucosa, y aquellos en los que se desconocía el tipo de diabetes. Tampoco se consideraron los casos de diabetes gestacional y secundaria, que son objeto de otro trabajo.

En el grupo control fueron criterios de exclusión la existencia de hiperglucemia mantenida objetivada, la obesidad y ser familiares de primer grado de pacientes con DM1.

Las variables clínicas recogidas fueron: diagnóstico, edad y sexo.

Se analizaron los anticuerpos anti-GAD, IA-2 e IAA mediante enzoinmunoanálisis en microplaca: ELISA kit for the quantitative determination of autoantibodies to Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibody (GAD65) in serum RSR Limited, IA-2 Autoantibody ELISA kit RSR Limited y AESKU-LISA Insulin-G (AESKU DIAGNOSTICS), en analizador Triturus (Grifols).

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Los valores de absorbancia de blanco y patrón se hallaron siempre dentro de los límites establecidos. Para un buen control de calidad, no se admitió un coeficiente de variación intra e inter-serie superior al 20%. GADA e IA-2 fueron calibrados respecto a la preparación de referencia 97/550 según protocolo del National Institute of *Diabetes and Digestive and Kidney Diseases* (NIDDK). Los resultados se expresaron como unidades por mL (U/mL), según OMS. En el caso de IAA, debido a la inexistencia de una calibración de referencia internacional, se calibró en unidades arbitrarias U/mL y se estableció una curva estándar trazando la densidad óptica para seis calibradores entre 0-300 U/mL. Según las indicaciones del fabricante, se consideraron positivas las muestras cuyos niveles de GADA fueran superiores a 5,0 U/mL, IA-2 > 7,5 U/mL e IAA > 15,0 U/mL.

Se utilizaron como medidas de prevalencia las medianas y rango intercuartílico, ya que las variables estudiadas no seguían una distribución normal (test de Kolmogorov-Smirnov). Las variables cualitativas se expresaron como frecuencias absolutas y relativas. Para estudiar la asociación entre variables cualitativas se realizó el test Chi-cuadrado de Pearson o el test exacto de Fisher. Los diferentes marcadores, según los grupos de estudio, se compararon mediante el test de Kruskal-Wallis, así como dos a dos utilizando el test U. de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni ($p < 0,0167$). Mediante las curvas *receiver operating characteristics* (ROC) se evaluó el rendimiento de cada ensayo en la discriminación para cada uno de los grupos estudiados, observando las correspondientes áreas bajo la curva (AUC) y sus intervalos de confianza al 95% (IC 95%) y se calcularon los puntos de corte que maximicen sensibilidad y especificidad. Para valorar las variables analizadas como predictoras (factores de riesgo) de la diabetes tipo 1 realizamos un análisis de regresión logística bivalente y multivalente. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete PASW Statistics versión 18.

Resultados

Las variables clínicas analizadas y las características de cada grupo de estudio se describen en la [tabla 1](#). De un total de 175 personas analizadas, 83 (47,4%) eran hombres y 92 (52,6%) mujeres. La edad mediana global fue de 33 años y su rango de 1 a 75 años. Un 14,9% de los pacientes eran niños de 10 o menos años. En el grupo DM1 ($n = 61$) tenían 10 o menos años un 19,7%.

Se analizaron GADA en los 175 individuos, siendo positivos 54 (30,9%). De ellos 5 (7,8%) eran controles, 48 (78,8%) DM1 y 1 (2,0%) DM2. Se determinaron IA-2 en 174 personas, obteniendo un resultado IA-2 (+) en 23 (13,2%): 2 controles

Tabla 1 Características de los grupos de estudio y variables clínicas estudiadas

	Control N= 64 (36%)	DM1 N= 61 (35%)	DM2 N= 50 (29%)	p
<i>Edad*</i>	31 (2-55)	29 (1-68)	45 (7-75)	
<i>Sexo</i>				
H	28%	56%	62%	
M	72%	44%	38%	
<i>GADA*</i>	2,3 (1,6-3,8)	108,0 (7,1-309,0)	1,8 (1,5-2,4)	< 0,001 ^a < 0,001 ^{b,c} 0,041 ^d (ns)
<i>IA-2*</i>	5,1 (4,7-5,7)	6,0 (5,3-254,3)	5,2 (4,8-5,8)	< 0,001 ^a < 0,001 ^{b,c} 0,449 ^d (ns)
<i>IAA*</i>	2,2 (1,3-4,3)	3,2 (2,2-5,8)	3,6 (1,7-5,9)	0,028 ^a 0,016 ^b 0,030 ^d (ns) 0,945 ^c (ns)

DM1: diabetes mellitus tipo 1; DM2: diabetes mellitus tipo 2; GADA: anticuerpos anti-descarboxilasa del ácido glutámico; IA-2: anticuerpos anti-tirosina fosfatasa de membrana IA-2; IAA: anticuerpos anti-insulina; ns: no significativo; p: significación estadística.

^asignificativas Kruskal-Wallis; ^bMann-Whitney con corrección de Bonferroni ($p < 0,0167$) para comparación control-DM1; ^cDM1-DM2; ^dcontrol-DM2.

* Los datos de las variables cuantitativas están representadas por mediana y rango intercuartílico (25-75%).

(3,1%), 19 DM1 (31,7%) y 2 DM2 (4,0%). Fueron IAA (+) 10 personas (6,0% de $n = 168$): 1 control (1,7%), 6 DM1 (10,3%) y 3 DM2 (6,0%) (fig. 1).

Dentro del grupo DM1, los pacientes LADA tuvieron frecuencias similares al resto: fueron GADA (+) 83,3% LADA vs. un 77,6% de los diabéticos tipo 1 no LADA (DM1 no LADA) ($p = 0,661$); IA-2 (+) 18,2% LADA vs. 34,7% DM1 no LADA ($p = 0,287$) e IAA (+) 18,2% vs. 8,5% ($p = 0,343$). Tampoco fue significativa la diferencia entre menores y mayores de 10 años: GADA (+) 91,0% de menores vs. 75,5% mayores ($p = 0,209$); IA-2 (+) 41,7% vs. 29,2% ($p = 0,307$) e IAA (+) 0% vs. 13% ($p = 0,231$).

En la tabla 1 se muestran las medianas y rango intercuartílico obtenidos para cada uno de los autoanticuerpos. Se indican las significativas de Kruskal-Wallis junto a la comparación de los grupos estudiados con prueba de Mann-Whitney. Las medianas en niños menores de 10 años fueron: GADA = 210,5 (34,6-319,3) U/mL, IA-2 = 6,3 (5,7-1896,7) U/mL e IAA = 3,9 (1,9-6,2) U/mL. Las de los mayores de dicha edad: GADA = 101,0 (5,2-304,0) U/mL, IA-2 = 6,0

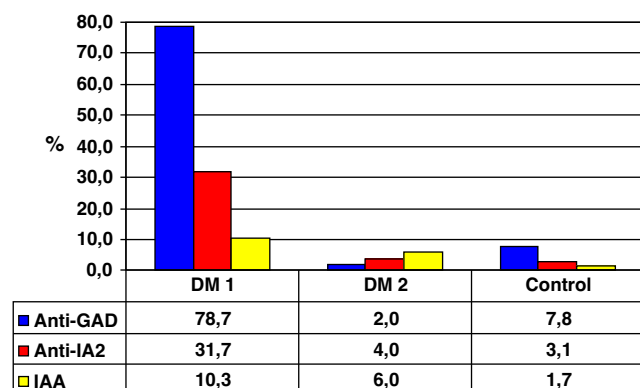
(5,1-86,0) U/mL e IAA = 3,2 (2,2-4,7) U/mL. Al compararlos, no se observan diferencias significativas entre menores y mayores de 10 años: GAD $p = 0,327$; IA-2 $p = 0,196$; IAA $p = 0,792$.

Existió diferencia ($p < 0,05$) en los valores de las medianas de GADA e IA-2 en el grupo LADA y DM1 no LADA, siendo GADA = 219,0 (16,9-328,8) U/mL en LADA vs. 108,0 (5,9-304,0) U/mL en DM1 no LADA y e IA-2 = 5,7 (4,9-6,5) U/mL vs. 6,0 (5,3-264,5) U/mL. No fueron distintas ($p = 0,838$) las medianas de IAA: 3,0 (2,2-4,1) U/mL en LADA vs. 3,4 (2,2-5,8) U/mL en DM1 no LADA.

La tabla 2 y figura 2 muestran los valores hallados de la aplicación de curvas ROC.

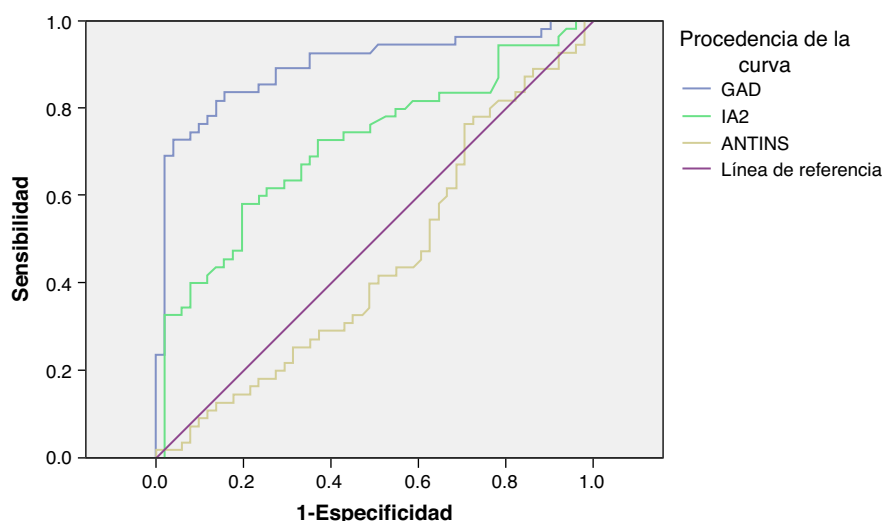
Al aplicar los nuevos criterios de positividad calculados mediante las curvas ROC, obtenemos una prevalencia de GADA 78,7% en DM1, 83,3% en LADA, 2,0% en DM2 y 1,6% en grupo control. Para IA-2: 52,5% DM1, 45,5% LADA, 16,4% DM2 y 12,5% control.

Estudiando las coordenadas de la curva, si ajustamos la especificidad al 95% obtendríamos una sensibilidad

**Figura 1** Gráfico de frecuencias.**Tabla 2** Resultados curvas Receiver Operating Characteristics (ROC)

	GADA	IA-2	IAA
AUC (IC 95%)	0,90 (0,84-0,96)	0,74 (0,65-0,82)	0,57 (0,48-0,66)
p	< 0,001	< 0,001	0,126 (ns)
Cut-off (U/ml)	> 5,5	> 6,0	
Sensibilidad %	79%	54%	
Especificidad %	98%	84%	

AUC: área bajo la curva; Cut-off (U/ml): criterio límite positividad en U/mL; GADA: anticuerpos anti-decarboxilasa del ácido glutámico; IA-2: anticuerpos anti-tirosina fosfatasa de membrana IA-2; IAA: anticuerpos anti-insulina; IC 95%: intervalo de confianza 95%; p: significación estadística; ns: no significativa.



GAD: anticuerpos anti decarboxilasa del ácido glutámico. IA-2: anticuerpos anti tirosina fosfatasa de membrana IA-2. ANTINS: anticuerpos anti insulina.

Figura 2 Curvas Receiver Operating Characteristics (ROC).

para GADA del 77,6% (para un valor de corte = 5,1 U/mL), para IA-2 de 37,9% (6,7 U/mL) y para IAA 13,8% (10,0 U/mL).

Los resultados del análisis de los factores de riesgo asociados al diagnóstico de DM1 pueden observarse en la [tabla 3](#). En primer lugar se realizó un test bivalente para analizar las relaciones de cada una de las variables estudiadas con DM1 y posteriormente se seleccionaron para su inclusión en el modelo multivariante aquellas variables independientes que habían mostrado una relación estadísticamente significativa con DM1: GADA e IA-2.

Discusión

La frecuencia de GADA (+) en DM1 de inicio en nuestro estudio es alta (79%) y supera o coincide en el nivel alto con la que recoge la literatura: desde un 59% en japoneses (Ota, 2005²³) hasta 65-80%, según los autores^{6,10,14}. Nuestro dato tiene mayor coincidencia con el obtenido por Brooking cuando utilizó métodos radiométricos (82%), que con el que tuvo mediante un test ELISA similar al nuestro y con igual línea de corte (5 U/mL): un 100% (39 de 39 seleccionados) positivos en pacientes con DM1¹¹. Palomer halló un 89% de GADA (+) mediante ELISA y un 71% con un ensayo radiométrico RBA (*radiobinding assay*)¹².

La prevalencia de IA-2 en DM1 fue del 31,7%, similar a estudio de Ota (37%) pero algo menor a la recogida en nuestro país por Aguilera (45%) en 2003¹⁰. Palomer et al no consiguieron buenos resultados con IA2-ELISA¹².

En cuanto a IAA (10%), fue inferior o muy inferior a la de otros estudios^{6,10,24}, en su mayoría realizados con RIA. El porcentaje de IAA positivo en DM1 fue significativamente superior al control (diferenciaría a los no diabéticos), pero no a DM2. El nivel de sensibilidad diagnóstica de nuestra prueba fue muy bajo, aunque mejor su especificidad, lo que sucede en general en los análisis de IAA mediante ELISA. Se ha sugerido que los IAA que se miden por medio de RIA se encuentran más vinculados a la enfermedad que los que se miden por ELISA, ya que un epitopo conformacional necesario para reconocer al IAA se perdería al revestir con insulina las placas de ELISA⁶. En cualquier caso parece que ambos métodos no miden la misma cosa. Tal vez el método ELISA detecte un subtipo dentro de los anticuerpos antiinsulina. Esto no descarta su utilidad en el diagnóstico de otras patologías y, de hecho, con esta técnica ELISA hemos observado valores altos de IAA, posiblemente asociados a hiperinsulinismo, con o sin hipoglucemia, datos presentados en el IV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico de Zaragoza, en octubre de 2010.

Como puede apreciarse en la [figura 2](#), los niveles promedios de GADA en los pacientes con DM1 (108,00 U/mL)

Tabla 3 Factores de riesgo asociados a diabetes mellitus tipo 1

	Análisis bivariante			Análisis multivariante		
	OR (crudo)	IC 95%	p	OR	IC 95%	p
GADA (+)	66,46	23,84-185,30	< 0,05	51,44	18,16-145,76	< 0,05
IA-2 (+)	12,74	4,09-39,70	< 0,05	4,64	0,97-22,18	0,055

R cuadrado de Naeglerkerk = 0,638.

GADA: anticuerpos anti-decarboxilasa del ácido glutámico; IA-2: anticuerpos anti-tirosina fosfatasa de membrana IA-2; IC 95%: intervalo de confianza del 95%; OR: *Odds ratio* o razón de probabilidades; p: significación estadística.

están muy por encima de cualquier valor encontrado en la población normal y en DM2. Parece que los niveles altos de GADA en la fase preclínica se correlacionan con una progresión más lenta hacia la instauración de la enfermedad¹⁴, lo que se corresponde con formas lentamente progresivas o tipo LADA. Se ha descrito que tanto la determinación de GADA como de IA-2 obtienen mayor prevalencia en pacientes con LADA (GADA = 86%; IA-2 = 49%), que en el resto de DM1 (GADA = 59%; IA-2 = 37%)²³. En nuestro estudio, aunque la frecuencia de GADA (+) ha sido algo superior en LADA que en el resto de DM1, no ha habido diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo fueron significativamente mayores los valores de las medianas en el grupo LADA para GADA e IA-2, lo que se corresponde con los datos consensuados en la literatura³. Lógicamente las frecuencias y niveles diferenciaron claramente al grupo LADA de DM2. Pensamos que debemos realizar estudios con una población más amplia para confirmar estos datos.

En el caso de IAA no existió diferencia entre LADA y el resto, en concordancia con su falta de sensibilidad.

Quisimos ver el comportamiento de nuestros parámetros en niños menores de 10 años, ya que la frecuencia de IAA está asociada a la edad, siendo muy superior en los niños pequeños con DM1 de inicio^{5,6}: El porcentaje de GADA (+) e IA-2 (+) fue mayor en los pequeños, aunque sin diferencias significativas, mientras que en IAA (+) tuvimos un 0% de prevalencia en menores de 10 años.

Por otra parte, cuando utilizamos el punto de corte recomendado por el fabricante (5 U/mL) un 7,8% de controles fueron GADA (+), frecuencia muy superior a la reflejada en la literatura para dichos controles, de hasta un 2%⁵, e incluso mayor que el 3,5% obtenido cuando se estudia la población general, que incluiría a los diabéticos tipo 1 y 2 y los controles¹⁷. Esto indicaría que nuestro método es poco específico. Sin embargo, hemos observado que los falsos positivos correspondían a cinco pacientes cuyos niveles de GAD eran bajos (cuatro entre 5,1 y 5,4 U/mL y uno con 9,49 U/mL). Si aplicamos nuestro nuevo criterio de positividad de 5,5 U/mL, cuatro de estos pacientes resultan negativos y por tanto la frecuencia del GADA (+) en los controles sería 1,6%. La especificidad aumenta al 98,2%, con igual sensibilidad. En este punto debemos informar que en base a nuestra experiencia, en nuestro laboratorio consideramos como valor indeterminado un GADA entre 5-10 U/mL, con lo cual ninguno de los controles se hubiera positivo. Los falsos positivos de IA-2 fueron dos casos cuyos valores de 15,6 U/mL y 9,8 U/mL también eran bajos. En principio, para el análisis de IA-2, aunque nuestro nuevo criterio límite es 6,0 U/mL, consideraremos una zona dudosa los valores entre 6-7,5 U/mL. Confirmamos la importancia de obtener criterios límites de positividad en función de los resultados propios para optimizar la especificidad de las determinaciones.

La frecuencia de GADA (+) en nuestro grupo DM2 ha coincidido con la hallada por Brooking¹¹: 2.0% vs. 1,6%.

La diferencia ($p=0,028$) en los valores de medianas de IAA en DM1 y sobre todo en DM2, que han sido superiores al control, concuerda con las observaciones de otros autores: IAA-ELISA son muy específicos, aunque poco sensibles⁶.

Nuestros resultados en las curvas ROC (AUC GADA 0,90 [0,84-0,96], AUC IA-2 = 0,74 [0,65-0,82]) son similares, aunque algo inferiores, a los obtenidos mediante ELISA en el programa DASP: AUC para GADA = 0,94 (0,91-0,95), IA2 = 0,85

(0,82-0,87) en 2005²⁰. Aunque lejos del AUC GADA = 0,99 (0,95-1,00) que informa Palomer¹², podemos decir que nuestra prueba GADA consiguió una muy buena precisión en la identificación de la enfermedad. Fue menor la de IA-2. Nuestro test ELISA anti-insulina tuvo nula capacidad diagnóstica.

La sensibilidad y especificidad halladas fueron algo menores a las reportadas por el fabricante (que atribuye a DASP 2005): para GADA especificidad 98% y sensibilidad 92% y para IA-2 especificidad 99% y sensibilidad 66%. En DASP 2005 la sensibilidad de los test ELISA-GADA fue mayor incluso que la del RIA (sensibilidad media de 8 participantes 89% (85-92%), siendo la de RIA 80% (74-82%) y especificidad media 98% (96-99%)²⁰.

La validez del modelo de regresión logística se comprobó con un coeficiente de determinación R cuadrado de Nagelkerke = 0,638, lo que indica que el 64% de la variación de la variable DM1 es explicada por las variables incluidas en dicho modelo. Considerando el total de la población estudiada, los individuos GADA (+) tuvieron 51 veces más probabilidad de tener DM1 que los GADA (-), mientras que cuando los IA-2 eran positivos el diagnóstico de DM1 era 4,5 veces más probable que si eran negativos. La obtención conjunta de GADA e IA-2 (+) aportaría 51 x 4,5 veces más riesgo de tener DM1. Recientemente se ha diseñado un método ELISA para determinación conjunta de GAD e IA-2, parece ser que con buenos resultados. Obtienen un 85% de positivos con el ensayo combinado GAD-65/IA-2^{25,26}.

Conclusiones

En nuestro estudio, la prevalencia de GADA (+) en el inicio de la diabetes es alta y su determinación ha sido muy eficaz para el diagnóstico de diabetes autoinmune. La determinación conjunta de IA-2 incrementa 4,5 veces la probabilidad del diagnóstico. Los anticuerpos anti-insulina medidos mediante nuestro test ELISA no han demostrado valor como marcadores en el diagnóstico y tipificación de la diabetes mellitus, aunque esto no descarta su utilidad para el diagnóstico de otras patologías. Establecemos un criterio de positividad para anti-GAD > 5,5 U/mL y para anti-IA-2 > 6,0 U/mL.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento al Prof. Juan Miguel Guerrero Montávez, al Dr. Manuel Conde Sánchez y a nuestro estadístico D. Juan Manuel Praena.

Bibliografía

1. Pérez F, Codner E, Ángel B, Balic I, Carrasco E. Polimorfismo +49 A/G del gen del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) en la diabetes tipo 1: Asociación con el perfil de anticuerpos y Citoquinas. *Rev Méd Chile*. 2009;137:321-8.
2. Achenbach P, Bonifacio F, Anette G. Ziegler: Predicting Type 1 diabetes. *Curte Diabetes Reports*. 2005;5:98-103.

3. Van Deutekom AW, Heine RJ, Simsek S. The islet autoantibody titres: their clinical relevance in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and the classification of diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2008;25:117–25.
4. Sacks DB, Bruns DB, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Clin Chem.* 2002;48:436–72.
5. Recomendaciones de la Sociedad Española de Diabetes sobre la evaluación del riesgo de diabetes mellitus tipo 1. *Endocrinología y nutrición.* 2002;49:209–10.
6. Greenbaum CJ, Palmer JP. Autoanticuerpos y proceso patológico de la diabetes mellitus tipo 1. En: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, editors. *Diabetes Mellitus. Fundamentos y clínica.* 2.^a ed. McGraw-Hill Interamericana; 2003. p. 465–76.
7. Saeki K, Zhu M, Kubosaki A, Xie J, Lan MS, Notkins AL. Targeted disruption of the proteína tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 results in alterations in glucosa tolerante tests and insulina secretion. *Diabetes.* 2002;51:1842–50.
8. Tiberti C, Verrienti A, Fiore B, Yu L, Eisenbarth GS, Dotta F, et al. IA-2 combined epitope assay: a new, highly sensitive approach to evaluate IA-2 humoral autoimmunity in type 1 diabetes. *Clinical Immunology.* 2005;115:260–7.
9. Palmer J, Asplin C, Clemons P. Insulin autoantibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment. *Science.* 1983;222:1337.
10. Aguilera E, Recasens M, Moríñigo R, Casamitjana R, Oriola J, Ercilla G, et al. Características clínicas, metabólicas, inmunológicas y genóticas de un grupo de adolescentes y adultos con diabetes mellitas tipo 1.^a. Inicio y pronóstico a corto plazo. *Med Clin (Barc).* 2003;120:121–4.
11. Brooking H, Ananieva-Jordanova R, Arnold C, Amoroso M, Powell M, Betterle C, et al. A sensitive non-isotopic assay for GAD₆₅ autoantibodies. *Clinica Chimica Acta.* 2003;331:55–9.
12. Palomer X, Mauricio D, Rodríguez-Espinosa J, Zapico E, Mayoral C, Francesc González-Sastre F, et al. Evaluation of Two Nonisotopic Immunoassays for Determination of Glutamic Acid Decarboxylase and Tyrosine Phosphatase Autoantibodies in Serum. *Clin Chem.* 2004;50:1378–82.
13. Bilbao JR, Busturia MA, Casamitjana R, Castaño L. Autoanticuerpos anti-GAD65 y anti IA-2 en Diabetes tipo I: valoración de kits comerciales para su detección. *Av Diabetol.* 2000;16:233–8.
14. De Luis DA, Alonso Fernández M, González Granado M, Aller R, Izaola O. Estudio descriptivo del comienzo de la diabetes mellitus tipo 1 y sus familiares de primer grado. *An Med Interna (Madrid).* 2004;21:378–81.
15. Wasserfall CH, Atkinson M. Autoantibody markers for the diagnosis and prediction of type 1 diabetes. *Autoimmunity Reviews.* 2006;5:424–8.
16. Verge CF, Stengler D, Bonifacio E, Colman PG, Pilcher C, Bingley PJ, et al. participating laboratorios. Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulina autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: combinatorial islet autoantibody Workshops. *Diabetes.* 1998;47:1857–65.
17. Davies H, Brophy S, Bain SC, Stephens JW, Lewis J, Luzio S, et al. GADA testing: the current state of knowledge. *Primary Care Diabetes.* 2009;3:189–91.
18. Bingley PJ, Bonifacio E, Mueller PW, and participating laboratories. Diabetes Antibody Standardization Program: First Assay Proficiency Evaluation. *Diabetes.* 2003;52:1128–236.
19. Achenbach P, Schlosser M, Williams AJK, 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;122:85–90.
20. Törn C, Mueller PW, Schollosser M, Bonifacio E, Bingley PJ, and participating laboratories. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. *Diabetologia.* 2008;51:846–52.
21. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classifications of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998;15:539–53.
22. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care.* 2006;29:S43–8.
23. Ota T, Takamura T, Nagai Y, Bando Y, Usuda R. Significance of IA-2 antibody in Japanese type 1 diabetes: its association with GAD antibody. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 2005;67:63–9.
24. Holmberg H, Vaarala O, Sadauskaite-Kuehne V, Clonen J, Padaiga Z, Ludvigsson J. Higher prevalence of autoantibodies to insulin and GAD65 in Swedish compared to Lithuanian children with type 1 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 2006;72:308–14.
25. Chen S, Willis J, MacLean C, Ananieva-Jordanova R, Amoroso M-A, Brooking H, et al. Sensitive non-isotopic assays for autoantibodies to IA-2 and to a combination of both IA-2 and GAD65. *Clinica Chimica Acta.* 2005;357:74–83.
26. Villalba A, Valdez SN, Iacono R, Poskus E. Development of 2 alternative enzyme-linked immunosorbent assays for routine screening of glutamic acid decarboxylase autoantibodies. *Clinica Chimica Acta.* 2007;376:82–7.