



Examensarbete, 15 hp
Kandidatexamen i Biomedicinsk laboratorievetenskap
Höstterminen 2017

**Jämförelse av två enzyme-linked
immunosorbent assays
- mätning av diabetesspecifika
autoantikroppar i en adult population**

Lauresha Gashi Krasniqi

Sektionen för lärande och miljö

Populärvetenskaplig sammanfattning

30-40 personer per 100.000 invånare drabbas av typ 1 diabetes (T1D) årligen i Sverige och idag är över 417.000 individer registrerade med diabetes, varav 20,1 % med T1D.

Typ 1 diabetes (T1D) orsakas av att kroppens eget immunförsvar attackerar insulinproducerande betaceller i bukspottkörteln och bidrar till förstörd insulinproduktion och därmed högre glukoshalt i blodet. Betacellerna förstörs under en lång tid och när över 80 % av cellerna är förstörda utvecklas T1D, det är då, ganska tätt inpå sjukdomsutbrottet, som symtomen uppstår i form av ökat behov av urinering, hög glukoshalt i blodet och trötthet. T1D är idag en folksjukdom i Sverige. Varför sjukdomen har ökat i Sverige är oklart, men det finns studier som har kunnat bevisa att ifall man ärver specifika anlag inom Human Leucocyt Antigen (HLA)-regionen kan det bidra till utveckling av sjukdomen. Dessutom kan yttre miljöfaktorer såsom infektion under fostertid eller stress samt dålig koll på kosten, i samband med ärftliga faktorer, bidra till utveckling av sjukdomen.

I nuläget finns ingen medicin som botar T1D, men det är av stor vikt att kunna identifiera de barn och vuxna som riskerar att utveckla sjukdomen genom att så tidigt som möjligt upptäcka om de bl.a. är bärare av anlagen som hjälper sjukdomen att utvecklas.

Hur kan då individerna som löper ökad risk identifieras?

Det finns fyra specifika autoantikroppar, d.v.s. kroppens egna antikroppar, vilka attackerar betaceller som står för insulinproduktionen i bukspottkörteln. De fyra autoantikroppar är insulinautoantikroppar (IAA), glutamic acid decarboxylase antibodies (GADA) tyrosinfosfatas-antikroppar, islet antigen 2-antikroppar (IA-2A) och antikroppar riktade mot zinktransportören 8, ZnT8 (ZnT8A). Det finns sedan en tid tillbaka en immunologisk metod som identifierar aktuella autoantikroppar. Metoden genomförs med hjälp av ett så kallade 2screen islet cell autoantibody ELISA-kit (RSR, Cardiff, UK) för identifikation av prover som är GADA- och IA-2A positiva. Nyligen har det utvecklats ett annat kit, 3screen islet cell autoantibody ELISA-kit (RSR, Cardiff, UK) som identifierar prover positiva för GADA, IA-2A och ZnT8A. Båda metoder bygger på en enzymkopplad immunadsorberande analys (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) där man m.h.a. framtagna antigener bundna på ytan av en platta, identifierar närvaro av antikroppar i serum från patienter och kontroller. Antikropparna detekteras därefter i en ELISA plattläsare vilken läser av ljusintensiteten vid två rekommenderade våglängder.

I denna studie jämfördes de båda metoderna för att undersöka ifall metoderna skiljer åt i sensitivitet (antalet patientprov som är positiva för minst en autoantikropp) och specificitet (antalet friska blodgivare som är negativa för samtliga autoantikroppar) i en vuxen population av nydiagnostiserade patienter med T1D och friska vuxna blodgivare. Ju högre sensitivitet och specificitet, desto bättre resultat. Resultaten visade att båda metoderna erhöll samma sensitivitet (92 %) fast RSR 2screen ELISA erhöll 1 % (98 %) högre specificitet jämfört med RSR 3screen ELISA (97 %).

Slutsatsen blev att RSR 2Screen rekommenderas i första hand för detektion av autoantikroppar i en population av vuxna patienter med ökad risk för T1D och friska vuxna kontroller.

Författare/Author
Lauresha Gashi Krasniqi

Svensk titel/Title
Jämförelse av två enzyme-linked immunosorbent assays
- mätning av diabetesspecifika autoantikroppar i en adult population

Engelsk titel
Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays
- measurement of diabetes-specific autoantibodies in an adult population

Handledare/Supervisor

Fariba Vaziri-Sani, doktor i Medicinsk Vetenskap, docent i experimentell autoimmun diabetes

Dr. Carina Törn, leg. BMA, docent i Experimentell endokrinologi

Kobra Rahmati, leg. BMA

Examinator/Examiner

Dr. Bodil Hernroth, leg. BMA, professor i biomedicinsk laboratorievetenskap

Sammanfattning

Typ- 1 diabetes (T1D) är en autoimmun sjukdom med insulinbrist orsakad av nedbrytning av insulinproducerande betaceller i pankreas. Fyra olika antikroppar har identifierats som är riktade mot betacellspecifika antigen; insulinautoantikroppar (IAA), glutamic acid decarboxylase antibodies (GADA), islet antigen2-antikroppar (IA-2A) och antikroppar riktade mot zinktransportören 8 (ZnT8A). I denna studie gjordes en jämförelse av metoderna 2screen islet cell autoantibody ELISA-kit (RSR, Cardiff, UK) och 3screen islet cell autoantibody ELISA- kit (RSR, Cardiff, UK), vars brunnar är coatade med GAD65/IA-2 antigen respektive GAD65/IA-2/ZnT8 antigen, för att undersöka ifall dessa båda kit ger jämförbar sensitivitet och specificitet i en adult population av nydebuterade patienter med T1D och friska vuxna blodgivare. RSR 2screen erhöll 1 % högre specificitet (98 %) jämfört med RSR 3screen (97 %) vid samma sensitivitet (92 %) och rekommenderas i första hand för screening av autoantikroppar i en population av vuxna patienter med ökad risk för T1D och friska vuxna blodgivare.

Ämnesord: ELISA, typ 1 diabetes, autoantikroppar, ROC- kurva, sensitivitet, specificitet

Abstract

Type- 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease with insulin deficiency caused by degradation of insulin-producing betacells in pancreas. Four different autoantibodies that target beta- cell specific antigenes have been identified: insulinautoantibodies (IAA), glutamic acid decarboxylase antibodies (GADA), islet antigen2-antibodies (IA-2A) and antibodies against zinktransporter 8 (ZnT8A). In this study, a comparison between 2screen islet cell autoantibody ELISA-kit (RSR, Cardiff, UK) coated with GAD65/IA-2 and 3screen islet cell autoantibody ELISA- kit (RSR, Cardiff, UK) coated with GAD65/IA-2/ZnT8, was performed to investigate whether results from these two kits provide comparable sensitivity and specificity in an adult population of new onset patients with T1D and healthy adults. RSR 2screen obtained 1 % higher specificity (98 %) in comparison to RSR 3screen (97 %) on the same sensitivity (92 %) and is recommended primarily for screening of autoantibodies in a population of adult patients at increased risk for T1D and healthy adults blood donors.

Keywords: ELISA, typ 1 diabetes, autoantibodies, ROC- curve, sensitivity, specificity

Innehåll

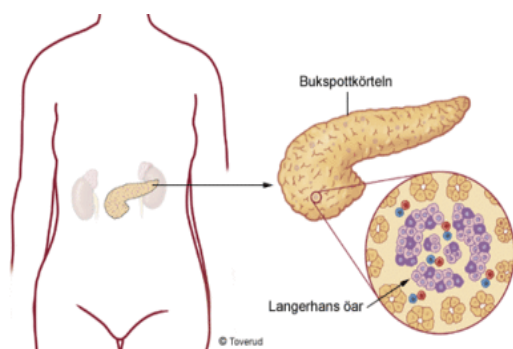
| | |
|---|----|
| 1. Inledning/bakgrund..... | 6 |
| 1.1. Typ 1 diabetes (T1D)..... | 6 |
| 1.2. Symtom..... | 7 |
| 1.3. Diagnostisering..... | 7 |
| 1.4. Pankreas..... | 8 |
| 1.5. Betaceller..... | 9 |
| 1.6. Autoantikroppar..... | 10 |
| 1.7. Behandling..... | 11 |
| 1.8. Statistik om diabetes..... | 12 |
| 1.9. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)..... | 13 |
| 1.10. Syfte..... | 13 |
| 2. Metod & material..... | 14 |
| 2.1. ELISA baserad RSR 2Screen och 3Screen metod..... | 14 |
| 2.2. Etiska övervägande..... | 15 |
| 2.3. Material..... | 15 |
| 2.4. ELISA RSR 2Screen analysmetod..... | 17 |
| 2.5. ELISA RSR 3Screen analysmetod..... | 17 |
| 2.6. Statistisk dataanalys..... | 18 |
| 3. Resultat..... | 18 |
| 3.1. Resultat RSR 2Screen ELISA..... | 18 |
| 3.2. Resultat RSR 3Screen ELISA..... | 20 |
| 4. Diskussion..... | 22 |
| 5. Slutsats..... | 24 |
| Tackord..... | 24 |
| 6. Referenser..... | 25 |

| | |
|------------------|----|
| 7. Bilagor | 30 |
|------------------|----|

1. Inledning/bakgrund

1.1. Typ 1 diabetes (T1D)

Typ 1 diabetes (T1D) orsakas av att insulinproducerande betacellerna i Langerhans öar i bukspottkörteln (pankreas) (se Figur 1 och 2.) attackeras av immunförsvaret vilket i sin tur leder till upphörd insulinproduktion och förhöjt blodglukoshalt i kroppen (Smith et al. 2017).



Figur 1. Schematisk bild över bukspottkörteln och Langerhans öar (Lindström 2005).

Vad det är som sätter igång immunförsvaret är oklart men forskarna tror att både ärftliga faktorer och/i samarbete med yttre miljöfaktorer, t.ex. en virusinfektion, bidrar till utveckling av sjukdomen (Alvarsson 2013). Skillnaden mellan T1D och typ 2 diabetes (T2D) är att T2D orsakas av otillräcklig insulinmängd p.g.a. insulinresistens då cellernas känslighet för insulin är nedsatt vilket i sin tur leder till hög glukoshalt i blodet medan hos T1D har nästintill hela insulinproduktionen upphört till följd av betacellsdestruktion (Se Figur 2, Agardh, Berne & Östman 2005).

Utveckling av T1D har bland annat kopplats till specifika varianter av gener som styr immunförsvaret hos patienter med T1D, virusinfektioner under fostertiden samt stressfaktorer som leder till ökad insulinresistens (betacellstress), autoimmuna reaktioner, uppkomsten av autoantikroppar och total upphörd insulinproduktion (Alvarsson 2013). Tidigare studier har visat att snabb tillväxt, stillasittande och snabb viktökning i samarbete med nedsatt insulinproduktion kan utveckla T1D, då betacellerna attackeras av autoantikropparna vilket leder i sin tur till utveckling av T1D (Alvarsson 2013).

1.2. Symtom

Enligt Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2017) symtom för T1D uppkommer ganska tätt inpå sjukdomens utlösning. Detta eftersom förstörelse av betaceller sker under lång tid och symtom uppkommer inte förrän en viss tid senare (CDC 2017).

Symtom för T1D och T2D karakteriseras av stor törst, hyperglykemi (hög blodglukosnivå) och att man behöver urinera ofta (polyuri). Enligt Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF 2017a), till skillnad från T1D så brukar inte T2D ge lika kraftiga symtom och det är ofta T2D utvecklas mer smygande under en längre tidsperiod. Insulin behövs för att glukos skall kunna tas upp i cellerna. Rubbning eller totalt upphörande av insulinproduktionen leder till hög blodglukosnivå vilket i sin tur är orsaken till att individen behöver urinera ofta för att glukosen skall transporteras ut från kroppen genom njurarna. I normala fall återabsorberas all glukos vid bildandet av urin och förs tillbaka in i blodcirkulationen till skillnad från T1D patienter vars överskott av glukos samlas i urinen och mer vatten absorberas för att därmed samla och släppa stora volymer urin som medför stor törst (JDRF 2017a).

Hög blodglukosnivå i kroppen kan orsaka fler komplikationer som t.ex. oklar syn, och utmattning. Vid hög blodglukosnivå under lång tid drabbas individen av diabetisk ketoacidosis (DKA). Vid DKA utvinns kroppen energi genom att bränna fett vilket i sin tur leder till utsläpp av ketoner. Ketoner är giftiga syror som, vid uppkomst i blod och urin, kan leda till diabeteskoma (JDRF 2017b).

1.3. Diagnostisering

Diagnos av T1D sker genom mätning av glukoshalten i blodplasma (millimol per liter) efter avlästa och bedömda symtom. Provet kan också tas m.h.a. ett stick i fingret, s.k. kapillärprov. Om blodsockerhalten är ≥ 7 mmol/L hos en fastande patient betyder detta att patientens insulinproduktion antingen är låg, icke effektiv eller också har rubbats och därmed ställs diagnosen diabetes (diabetesförbundet 2010). Hos icke- fastande patienter bedöms gränsen för glukoshalten i blodet till 11 mmol/liter. Om patienten är fastande mäts glukoshalten i blodet och därefter utförs s.k. glukosbelastning som är ett oralt glukostoleranstest (OGTT) där vuxna får dricka en glukoshaltig blandning som innehåller 75 gram druvsocker. När två timmar passerat mäts blodglukosnivån igen och om

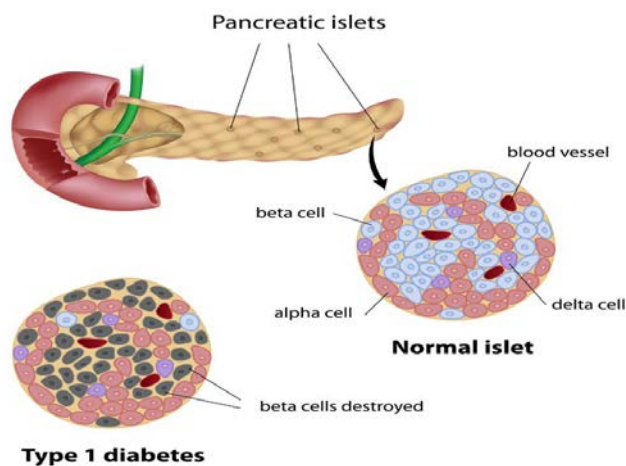
glukosvärdet ligger på 11,1 mmol/l eller högre (vid venöst blodprov) och 12,2 mmol/l eller högre (vid kapillärt blodprov) tolkas detta som diabetes (Alvarsson 2013).

Ytterligare ett mått för bedömning och diagnostisering av diabetesnivån på glykerat hemoglobin (HbA1c). Ett mått på HbA1c ger en inblick på glukosnivåerna under 6–8 veckors tid. Om testet visar ett HbA1c värde på 48 mmol/mol bedöms detta som risk för diabetes. För en frisk person ligger det normala HbA1c värdet mellan 27 och 46 mmol/mol. Vidare analys utförs för diagnos av autoantikroppar ifall T1D fastställs (Alvarsson 2013).

Som tidigare nämnt så ger inte T2D lika kraftiga symtom som T1D och beroende på bl.a. symptomen klassificeras typen av diabetes hos patienten. Vid T1D går förloppet fortare i jämförelse med T2D (Alvarsson 2013).

1.4. Pankreas

Pankreas befinner sig bakom magsäckens vänstra sida. Organet består av två delar, en exokrin del och en endokrin del. Den exokrina delen har i uppgift att genom sina akinarceller utsöndra enzyminnehållande bukspott, en matsmältningsvätska som stödjer matspjälkningen. Med hjälp av enzymerna bildas en kanal genom bukspottkörteln för att därefter tömmas i tolvfingertarmen. Den endokrina delen innehåller ca 1–2 %, d.v.s. över en miljon Langerhanska cellöar vilka i sin tur innehåller 5 typer av celler; alfaceller (upptar ca 20 % av öns vikt), betaceller (65 %), deltaceller (10 %) och PP celler (5 %) (Se Figur 2, Agardh, Berne & Östman 2005). Endokrina delen innehåller celler vilka producerar och utsöndrar signalämnen som i sin tur startar synnerligen viktiga funktioner i kroppen (Saisho 2016). Alfaceller producerar glukagon, betaceller bildar insulin, Amylin (IAPP, Islet Amyloid Polypeptide), deltaceller utsöndrar somatostatin och PP celler utsöndrar pankreaspolypeptid (Agardh, Berne & Östman 2005). Cellöarna innehar många blodkärl och tar på så sätt upp näringsämnen via blodet. Utöver detta finns nervfibrer som för nervsignalerna vidare mellan hjärnsystemet och det autonoma nervsystemet (Alvarsson 2013).

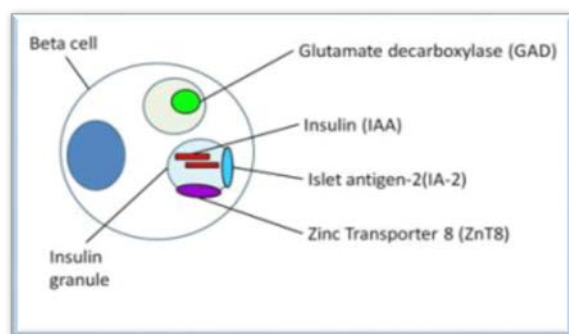


Figur 2. Schematisk bild på celltyper i Langerhans öar och skillnaden mellan normala öar och T1D öar (Agardh, Berne & Östman 2005).

1.5. Betaceller

Betacellers roll i människan är kritisk för reglering av blodglukosnivån. Genom en process så kallade exocytos kan insulin bildas och produceras. Proinsulin bildas i endoplasmatiska retiklet efter transkriptionen av insulingener i cellkärnan för att därefter föras vidare till golgiapparaten och klyvas till insulin respektive C- peptid (Agardh, Berne & Östman 2005). Insulin och C-peptid kommer i sin tur att förvaras i sekretoriska granulae. Vid förhöjd blodglukos transporteras sekretoriska granulae mot plasmamembranet för att sammansmälta med plasmamembranet och därigenom göra en öppning till extracellulära området och en transportväg som för insulinet vidare in i blodbanan (Agardh, Berne & Östman 2005).

Betacellsantigener såsom Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65), Islet Cell Antigen (ICA), Islet Antigen 2 (IA-2) och Zinktransportör 8 (ZnT8) är länkade till sekretoriska vägen och bidrar tillsammans, genom diverse roll, till reglering av glukos samt reglering, utformning och inpackning av sekretoriska granula och till omvandling av organiska aminer (Arvan et al. 2012). GAD65, IAA, IA-2 och ZnT8 antigener (se Figur 3) är kopplade till T1D men kunskapen om tillvägagångssätten av försämrad immuntolerans gentemot antigenerna är ännu oklar (Arvan et al. 2012).



Figur 3. Schematisk bild på GAD, IAA, IA-2 & ZnT8 (University of Bristol, UK u.å.).

1.6. Autoantikroppar

Autoantikroppar attackerar kroppens egna immunceller. Autoantikroppar för T1D kan förekomma långt innan sjukdomen debuterar och det har visat sig att vissa folkgrupper som ärver specifika anlag av Human Leucocyte Antigen (HLA) riskerar att utveckla T1D (Agardh, Berne & Östman 2005). Majoriteten av alla T1D-patienter är positiva för HLA-typer som DQ2- och/eller DQ8. Största risken att utveckla sjukdomen är hos människor som ärver heterozygot anlag av DQ2/DQ8 (Agardh, Berne & Östman 2005). Hittills har fyra olika autoantikroppar mot antigener i betaceller identifierats vilka uttrycks långt innan klinisk debut av sjukdomen. Dessa är Glutamic acid decarboxylase antikroppar (GADA) (Baekkeskov et al. 1990), insulinautoantikroppar (IAA) (Palmer et al. 1983), Islet antigen2- antikroppar (IA2A) (Gianani et al. 1995; Lan et al. 1994) och antikroppar mot zinktransportören ZnT8 (ZnT8A) (Wenzlau et al. 2007). Kommersiella kits ELISA RSR- 2Screen (RSR, Cardiff, UK) (Chen et al. 2005) och ELISA RSR- 3Screen (RSR, Cardiff, UK) (Amoroso et al. 2016) används för detektion av GADA och IA-2A respektive GADA, IA-2A och ZnT8A. Detektion och analys av dessa autoantikroppar bidrar till prediktion av T1D och även klassifikation av T1D och T2D.

Glutamic acid decarboxylas (GAD65)

Enzymet GAD bidrar till bildning av neurotransmittorer, g- amino byturic acid (GABA) (Wang et al. 2007). Immunrespons mot GAD identifierades i en studie av Baekkeskov et al. (1982) där en lösning av cellöar från råttor inkuberas med serum från T1D patienter varvid ett 64kDa- protein isolerades. Över 80 % T1D patienter visade immunoreaktivitet mot 64kDa- antigenet. Baekkeskov et al. (1990) kunde senare identifiera autoantikroppar mot 64kDa antigen i betaceller som identifierades som GAD. GAD65 och GAD67 är två isoformer av GAD (Erlander et al. 1991). Isoformerna skiljer

sig åt i struktur där GAD65 innehar en region i molekylen, karboxylterminal, vilken en autoimmun respons är riktad mot (Ronkainen et al. 2004, 2006).

Insulin autoantikroppar (IAA)

IAA upptäcktes i en studie av Palmer et al. (1983) där forskarna detekterade inbindning av radioinmärkt insulin (I-125) i serum från 112 nydiagnostiserade patienter. IAA förekom hos 20 % av nydiagnostiserade unga vuxna patienter (n=595, 5-34 år) (Östman et al. 2000). Enligt Andersson et al. (2011) är frekvensen av IAA 46 % hos barn (n=686, 0-18 år).

Islet Antigen-2 (IA2)

IA2 är ett membranprotein lokaliserat i insulinets sekretoriska granula membran (Solimena et al. 1996). Proteinet består av en intracellulär aminoterminaldel lokaliserad inuti granula och en extracellulär PTP del (fosfotyrosin fosfatas) på granulamembranets cytosolsida. IA2 antigen identifierades av Lan et al. (1994) och senare av Gianani et al. (1995). Antigenet identifierades genom screening av humant serum från nydiagnostiserade patienter mot ett komplementärt cDNA bibliotek. Antigenets funktion är okänd men det förmodas att den bidrar till reglering av sekretoriska granulas insulinmängd (Torii 2009; Trajkovski et al. 2008).

Zinktransportör 8 (ZnT8)

ZnT8 är en av zinktransportörens isoform som består av 369 aminosyror och lokaliserar sig i insulinsekretoriska granula (Chimienti et al. 2004, 2006). ZnT8 antigenets funktion i nuläget inte är helt kartlagt så har bevis på att ZnT8 bidrar till optimal insulinmängd och sekretion har påvisats (Smidt et al. 2009) genom bl.a. möjlig roll som transmembranförmedlare av zinkjoner till insulingranula (Wenzlau et al. 2007). Genom en radioimmunologisk utfällning av *in-vitro* translaterade produkter har Wenzlau et al. (2007) utvecklat sensitiva och specifika ZnT8A analyser där autoantikroppar mot ZnT8 har identifierats hos T1D patienter vilket har klassificerat ZnT8 som en major autoantigen.

1.7. Behandling

Patienter med T1D har nästintill helt upphörd eller ingen insulinproduktion alls vilket bör kompenseras med hjälp av insulininjektion. Mängden insulin bör övervakas med stor

noggrannhet då behandlingen inte är lika effektiv som kroppens egen insulinproduktion som konstant kontrolleras av kroppens behov av insulin (Alvarsson 2013).

Enligt Alvarsson (2013) ges utbildning om behandlingsmetod till föräldrar och skolpersonal i nära kontakt med barn och ungdomar som har drabbats av T1D. Utbildningen inkluderar att mäta blodglukos, ge injektioner och anpassa doser av insulin efter barnets aktiviteter och matintag. Utbildningen gäller även för vuxna T1D patienter.

Idag finns en behandlingsmetod som kallas *flerdosbehandling* där bestämd mängd insulin tillförs innan måltider vilket kan innebära 6–8 injektioner per dygn. Ytterligare ett behandlingssätt är genom en *insulinpump*. En insulinpump är en dosa vilken liknar en mobiltelefon till storleken och kan bäras i fickan eller i en liten väska. Pumpen har teknisk förmåga att efterlikna och ersätta mänskliga bukspottkörteln på det sätt att förse kroppen med insulin med jämna mellanrum, s.k. basinsulin, genom en tunn kateter (plastslang). Kateten byts ut vart tredje dag. Dosan överför insulin efter behov, inte mer eller mindre än nödvändigt, dessutom finns möjlighet att vid intag av mat ge extra dos av insulinet (bonusdos) vilken anpassas efter intagets innehåll av kolhydrater och fett (1177 u.å.). Mätning av glukosnivån i blod och kontroll av matintag i enlighet med pumpen gör det enklare för en diabetespatient att ha koll och följa behandling av sin diabetes.

Kolhydraträkning är ännu en metodik som rekommenderas för diabetespatienter eftersom olika typer av kolhydrater påverkar glukosnivån på olika sätt. Snabba kolhydrater har benägenheten att höja glukosnivån i blodet. Många diabetespatienter idag använder sig av kolhydraträkning för att reglera blodglukosnivåer (Alvarsson 2013).

Regelbunden motion bidrar till bättre blodglukosbalans (CDC 2016). I samband med detta är det viktigt att individen kontrollerar blodglukosnivån innan motion och räknar ut glukoshalten i blodet innan föda. Mängden insulinbehov injiceras för att minska risken av hypoglykemi vilket kan orsaka medvetslöshet och insulinkoma (CDC 2016).

1.8. Statistik om diabetes

Enligt Nationella diabetesregistret år 2017 har 417 827 personer registrerats med diabetes varav 20,1 % med T1D (NDR 2017). Det finns även människor som är omedvetna om sin diabetes. Enligt Alvarsson (2013) insjuknar 30–40 personer per 100 000 invånare i T1D årligen i Skandinavien och mellan 2,0 %-4,5 % av befolkningen i Sverige har diabetes. Enligt tidigare studier har det visat sig att antalet sjukdomsfall i T1D är högre

hos vuxna män jämfört med kvinnor i Sverige. Å andra sidan är T1D lika vanlig mellan båda könen i världen (Alvarsson 2013). I andra delar av världen finns inte samma förutsättningar för diagnos och behandling av diabetes som i Sverige. De sämre förutsättningarna leder till felaktiga tolkningar av symtom och därmed fatala påföljder hos både barn och vuxna. I andra delar av världen som t.ex. Indien och USA håller diabetes på att bli ett av de största hoten mot hälsan (Alvarsson 2013).

The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) är en internationell studie vars syfte är att hitta orsaken till utvecklingen av T1D hos barn (Sjöberg 2016). Studien startade år 2012, kostar ca 15 miljoner dollar per år och sponsras av National Institutes of Health (NIH). Studien genomförs både i Sverige (Skåne), Finland, USA och Tyskland med sammanlagt 8600 barn som deltar i studien. 30 % av barnen är från Skåne. Det är vanligare med T1D hos barn än hos vuxna (Sjöberg 2016). Enligt tidigare studier så förekommer GADA autoantikroppar lika ofta hos vuxna som hos barn (Ingemansson et al. 2013; Östman et al. 2000 & Andersson et al. 2011). Å andra sidan förekommer ICA, IA-2A, IAA, ZnT8WA, ZnT8RA och ZnT8QA autoantikropparna i högre frekvens hos barn jämfört med vuxna. Sensitivitet och specificitet av immunologiska metoderna som används för barn har visat framstående resultat i ett examensarbete från Högskolan Kristianstad utfört på TEDDY-labb, Malmö (Jovic 2016). TEDDY labbet i Malmö vill genomföra studien även hos vuxna individer då lägre sensitivitet och specificitet för RSR-2Screen och RSR3Screen förväntas i den vuxna populationen jämfört med den pediatrika populationen.

1.9. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA framställdes år 1971 av Peter Perlmann och Eva Engvall vid Stockholms universitet (Lequin 2005). Autoantikroppar kan detekteras med hjälp av specifika antigener i en ELISA-baserad metod (se avsnitt 2.1.).

1.10. Syfte

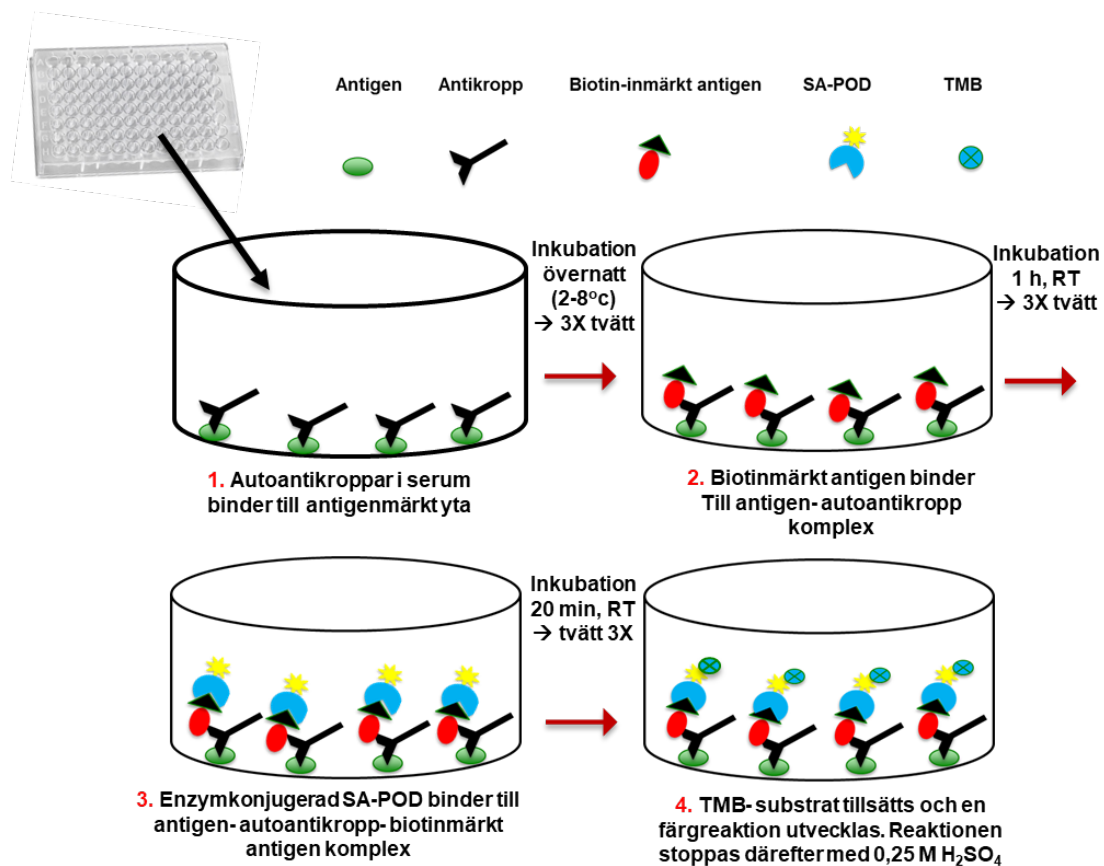
Syftet med detta examensarbete var att jämföra två kommersiellt tillgängliga kit, 2screen islet cell autoantibody ELISA-kit (RSR, Cardiff, UK) och 3screen islet cell autoantibody ELISA-kit, (RSR, Cardiff, UK) för att undersöka om analysresultaten med dessa kit är jämförbara med avseende på sensitivitet och specificitet i en adult population av nydebuterade patienter med T1D och friska vuxna blodgivare.

2. Metod & material

ELISA2screen islet cell autoantibody ELISA-kit (RSR, Cardiff, UK) (Chen et al. 2005) och ELISA3screen islet cell autoantibody ELISA-kit (RSR, Cardiff, UK) (Amoroso et al. 2016) användes för kombinerad identifiering av GADA och IA-2A respektive GADA, IA-2A och ZnT8A. Principen bygger på inkubation av sera från T1D patienter och friska vuxna blodgivare i brunnarna av en ELISA2screen islet cell autoantibody ELISA-kit platta och en ELISARSR-3screen islet cell autoantibody 96- hålsplatta som är inmärkt med både GAD65 och IA-2A antigener respektive GAD65, IA- 2A och ZnT8 antigener.

2.1. ELISA baserad RSR 2Screen och 3Screen metod

Metoden utförs på så sätt att ytan i brunnarna på plattan täcks med specifika antigener, därefter tillsätts autoantikropp som tas upp av antigenerna och därigenom bildar ett antigen-antikroppskomplex. Efter det överförs en reagens som består av specifika lösliga biotinmärkta antigener som binder till komplexet mellan antigen-autoantikropp och bildar ett antigen-autoantikropp-biotinmärkt antigen komplex. Efter tillsats av både antikroppar och även antigener så bör plattan sköljas ett antal gånger med en tvätt-lösning så att obundna antigener och antikroppar sköljs bort. Ett enzym konjugerat Streptavidin-Peroxidas (SA-POD) tillsätts följd av TMB-substrat (3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine) för att reagera med enzymet och därigenom resultera till en färgförändring (Sigma-aldrich u.å.). Slutligen överförs en 0,25 M lösning av H₂SO₄ stopplösning för att stoppa reaktionen innan avläsning av absorbansvärden i en absorbansmätare (Se Figur 4 för beskrivning av huvudprinciper i ELISA-baserade RSR 2screen- och RSR 3screen).



Figur 4. Schematisk bild över huvudprinciper i ELISA -baserade RSR 2screen- och RSR 3screen.

2.2. Etiska övervägande

Prover från friska vuxna och pseudonymiserade serumprover från patienter diagnostiserade med T1D fanns insamlade sedan tidigare för analys. Etiskt tillstånd finns för att genomföra projektet, enligt: 1. ”Biokemiska markörer av betydelse för utveckling av autoimmun diabetes i bakgrundsbefolkningen, 157/2008”. 2. ”Identifiering av gener som kodar för risk för barndiabetes i regioner som visar koppling till insulinberoende diabetes”; LU-82-99, LU508-96.

2.3. Material

Sammanlagt 150 prover användes för analys, serumprover från 50 patienter (18 kvinnor & 32 män, 15-41 år) diagnostiserade med T1D och serum från 100 (41 kvinnor & 59 män, 21-65 år) friska blodgivare i Malmö (se Tabell 1 & 2.). Patientproverna samlades in under perioden 1996-11-12 t.o.m. 2009-01-27. Sera från friska blodgivarkontroller samlades in

under perioden 2008-09-09 t.o.m. 2008-10-09 och förvarades i -20°C tills analysen utfördes.

Tabell 1. Antalet kvinnor och män hos patientprov respektive friska kontroller (se avsnitt 2.2.).

| 1=Kvinna, 2=Man | 1 (T1D) | 2 (T1D) | 1 (Friska kontroller) | 2 (Friska kontroller) |
|-----------------|---------|---------|-----------------------|-----------------------|
| Frekvens | 18 | 32 | 41 | 59 |
| Totalt | | 50 | | 100 |

Tabell 2. Minimum-, maximum-, och medianvärde för patienternas respektive friska kontrollers (FK) ålder.

| Statistics T1D | | Statistics FK | |
|----------------|---------|---------------|------|
| AGE | | | |
| N | Valid | 50 | 100 |
| | Missing | 0 | 0 |
| | Total | 50 | 100 |
| Median | | 16,6 | 42,5 |
| Minimum | | 15,1 | 21,0 |
| Maximum | | 41,0 | 65,0 |

ELISA RSR 2 Screen ICA innehåller en 96-hålls mikrotiterplatta inmärkt med GAD och IA-2 humant isolerade betacellers antigen från human pankreas, 1 negativ kontroll, 2 positiva kontroller till GADA och IA-2A, frystorkad GAD/IA-2 biotinmärkta antigen, GAD/IA-2 buffert, streptavidin peroxidase (SA-POD), en reaktions enhancer, spädningsbuffert till SA-POD, tvättlösning, peroxidase substrat (TMB, 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin) och stopplösning (0,25 M H₂SO₄) och sex kalibratorer (4, 10, 20, 70, 145, 450 Units/mL) till generation av en standardkurva.

ELISA RSR 3 Screen ICA (RSR, Cardiff, UK) innehåller en 96 hålls mikrotiterplatta inmärkt med GAD, IA-2 och ZnT8 humant isolerade betacellsantigen från pankreas, 1 negativ kontroll, 3 positiva kontroller till GADA, IA-2A och ZnT8A, 3Screen- frystorkad biotinmärkta antigen, buffert till 3 Screen-Biotin, streptavidin peroxidase (SA-POD), spädningsbuffert till SA-POD, tvättlösning, peroxidase substrat (TMB), stopplösning

(0,25 M H₂SO₄), och fem kalibratorer (5, 15, 100, 400, 2000 Units/mL) till standardkurvan.

2.4. ELISA RSR 2Screen analysmetod

Dag 1 pipetterades 200 µl serumprover från patientprov och kontrollprov som centrifugerades 5 minuter (5000 rpm) i centrifug (MiniSpin EppendorfAG, Tyskland), därefter överfördes 50 µl av dessa i duplikat till mikrotiterplattan. 50 µl av respektive standard, positiv och negativ kontroll, överfördes i duplikat till mikrotiterplattan. I nästa steg pipetterades 25 µl enhancer i varje brunn förutom blank enligt leverantörens instruktion. ELISA plattan förseglades med plastfilm, placerades på Delfia Plate Shake (PerkinElmer, Sciences, Finland) skakinstrument i 5 sekunder och inkuberades därefter i kylskåp (6–8 C) för inkubation över natten (ca.16–20 h). Dag 2 preparerades GAD/IA-2 biotin. ELISA plattan dekanterades och tvättades med 300 µl tvättlösning i 3 omgångar och 100 µl av GAD/IA-2 biotinmärkta lösliga antigen pipetterades därefter i alla brunnar exklusive blank. Plattan förseglades och inkuberades på skak i rumstemperatur (RT) under 1 timme. Brunnarna tvättades och dekanterades mot ett absorberande material. Streptavidin-Peroxidas (SA-POD) pipetterades (100 µl) till respektive brunn exklusive blank. Plattan inkuberades därefter på skak i 20 minuter (RT), följt av ett sista tvättsteg enligt ovannämnda beskrivning men med ett extra tvättsteg med destillerat H₂O. Det tillsattes 100 µl TMB (3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine) i samtliga brunnar inklusive blank. Plattan inkuberades i RT i mörker under 20 minuter. Till sist tillsattes 100 µl stopplösning i varje brunn, plattan skakades i 5 sekunder och placerades i ELISA plattläsare (MicroReader™ 4Plus, Hyperion Inc, USA) varpå absorbansen avlästes direkt vid 450 nm respektive 405 nm enligt rekommendation av tillverkarna. För samtliga värden ≥ 25 Units/ml (U/ml) användes resultaten från absorbansmätning i 405 nm. För värden < 25 U/ml användes resultaten från absorbansmätning i 450 nm enligt protokoll för ELISA-metoden från tillverkaren (RSR, UK).

2.5. ELISA RSR 3Screen analysmetod

ELISA RSR 3 Screen analysmetod utfördes på samma sätt som ELISA RSR 2Screen med enstaka skillnader. Dag 1 tillsattes samma patientprover som användes i ELISA RSR 2Screen med skillnaden att 25 µl av respektive standard, positiv och negativ kontroll samt serum från varje kontroll och patientprov användes varpå ingen enhancer lades till plattan

som inkuberades över natt i 6–8 °C. Följande dag inkuberades plattan utan skak i kyl (2–8°C) under 1 timme efter tillsättning av 3 Screen- biotinmärkta lösliga GADA, IA-2A och ZnT8A antigener i brunnarna. Samma våglängder (405 nm & 450 nm) som hos RSR 2Screen användes för absorbansläsningen i RSR 3Screen.

2.6. Statistisk dataanalys

Efter uppmätning av absorbans i ELISA plattläsare beräknades frekvens för antalet positiva och negativa prov för statistisk bearbetning av resultaten med hjälp av SPSS (IBM, SPSS Statistics 20). Sensitivitet anger antalet patienter som är positiva för T1D markör. Specificitet anger antalet kontroller som saknar markör. Receiver operating characteristics (ROC)-kurvor beräknades för att fastställa positiva och negativa värdeets gränsvärde (cut- off) samt för utvärdering av sensitivitet och specificitet för båda assays. För så bra resultat som möjligt krävs högre sensitivitet och specificitet för detektion av markörer hos patienter och friska kontroller. Area under the curve (AUC) användes för jämförelse av metoderna (Van Belle 2004).

3. Resultat

3.1. Resultat RSR 2Screen ELISA

I följande resultat som erhöles enligt SPSS analys för ELISA RSR 2Screen metod presenteras antalet patienter respektive friska kontroller som var positiva/negativa för markör. Avvikande värden rödmarkerades (se Tabell 3). Median, minimum- respektive maximumvärde beräknades för positiva patientvärden (se Tabell 4.). Information om avvikande värden demonstreras i Tabell 5. ROC- kurva resulterade i ett cut- off värde=4,4 U/mL vid specificiteten 98 % och sensitiviteten 92 % (se Figur 5 & Bilaga 1). Metodens AUC och CI- värde illustreras i Figur 5. Standardkurva för RSR 2screen vid våglängden 405 nm presenteras i Bilaga 3.

Tabell 3. Antalet positiva/negativa prov för markör i 2screen. Rödmarkering= avvikande värden.

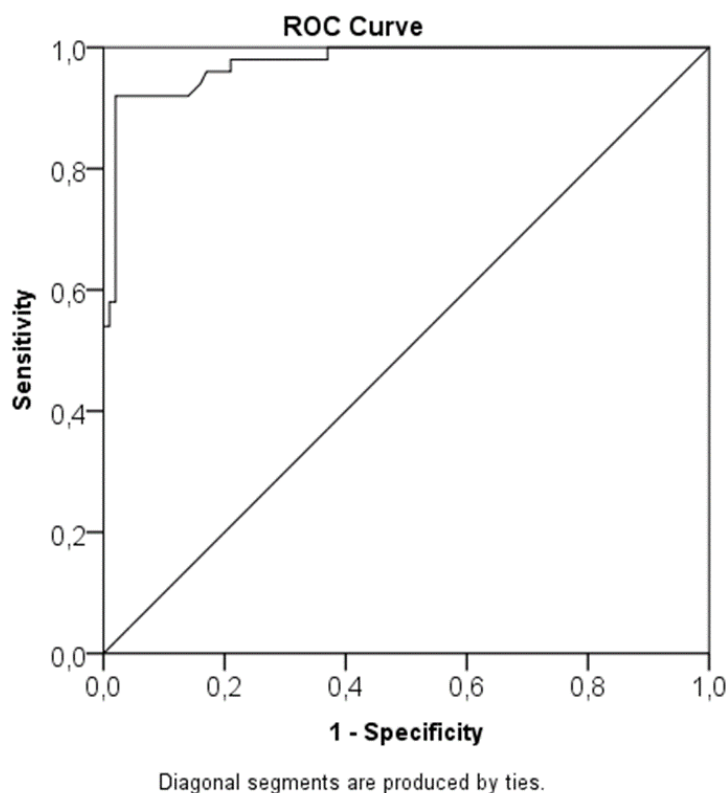
| | T1D | T1D | Friska kontroller (FK) | Friska kontroller (FK) |
|----------|----------|---------|------------------------|------------------------|
| | Frekvens | Procent | Frekvens | Procent |
| Positiva | 46 | 92 % | 2 | 2 % |
| Negativa | 4 | 8 % | 98 | 98 % |
| Total=N | 50 | 100 % | 100 | 100 % |

Tabell 4. Antalet positiv och negativ för markör samt median-, minimum- och maximumvärde för 2screen i Units/mL hos patientprov.

| | |
|--------------------|------------|
| N= Positiva | 46 |
| N= negativa | 4 |
| Median (Units/mL) | 220,1 U/mL |
| Minimum (Units/mL) | 7,4 U/mL |
| Maximum (Units/mL) | 393,9 U/mL |

Tabell 5. Mängden Units/mL hos 2 avvikande friska kontroller för 2 screen.

| | Ålder | 2screen |
|---|------------|------------|
| 1 | 26 (FK111) | 184,6 U/mL |
| 2 | 58 (FK194) | 167,3 U/mL |



| Area Under the Curve (AUC) | CI- värde (Konfidensintervall) |
|----------------------------|--------------------------------|
| 97,5 % | 95 % (0,95-1,00) |

Figur 5. ROC- kurva, AUC och CI för RSR 2screen.

3.2. Resultat RSR 3Screen ELISA

I följande resultat som erhöles enligt SPSS analys för ELISA RSR 3Screen metod presenteras antalet patienter respektive friska kontroller som var positiva/negativa för markör. Avvikande värden rödmarkerades (se Tabell 6). Median, minimum- respektive maximumvärde beräknades för positiva patientvärden (se tabell 7). Information om avvikande värden presenteras i Tabell 8. ROC-kurva resulterade i ett cut-off värde=8,9 U/mL vid specificiteten 97 % och sensitiviteten 92 % (se Figur 6 & Bilaga 2). Metodens AUC och CI- värde illustreras i Figur 6. Standardkurva för RSR 3screen vid våglängden 405 nm observeras i Bilaga 4.

Tabell 6. Antalet positiva/negativa prov för markör i 3Screen. Rödmarkering=avvikande värden.

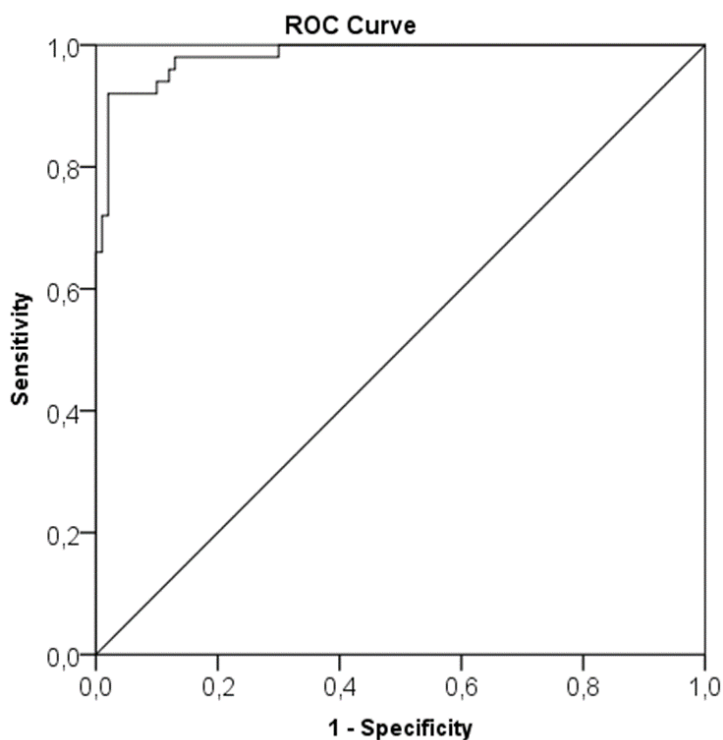
| | T1D | T1D | FK | FK |
|----------|----------|---------|----------|---------|
| | Frekvens | Procent | Frekvens | Procent |
| Positiva | 46 | 92 % | 3 | 3 % |
| Negativa | 4 | 8 % | 97 | 97 % |
| Total=N | 50 | 100 % | 100 | 100 % |

Tabell 7. Antalet positiva och negativa för arkör samt median-, minimum- och maximumvärde för 3Screen i Units/mL hos patientprov.

| | |
|--------------------|-------------|
| N= Positiva | 46 |
| N=negativa | 4 |
| Median (Units/mL) | 1786,8 U/mL |
| Minimum (Units/mL) | 32,0 U/mL |
| Maximum (Units/mL) | 3543,9 U/mL |

Tabell 8. Mängden Units/mL hos 3 avvikande friska kontroller för 3 screen.

| | Ålder | 3screen |
|---|------------|-------------|
| 1 | 26 (FK111) | 1163,1 U/mL |
| 2 | 33 (FK166) | 9,24 U/mL |
| 3 | 58 (FK194) | 943,2 U/mL |



| Area Under the Curve (AUC) | CI- värde (Konfidensintervall) |
|----------------------------|--------------------------------|
| =98,2 % | =95 % CI(0,97-1,00) |

Figur 6. ROC- kurva, AUC och CI för RSR 3screen.

4. Diskussion

Syftet med detta examensarbete var att jämföra två ELISA-baserade metoder i två kommersiella kit, RSR 2Screen och RSR 3Screen, med avseende på sensitivitet och specificitet i en adult population. Vid observation av erhållna resultat påvisar RSR 2Screen 1 % högre specificitet vid samma sensitivitet jämfört med RSR 3Screen för diverse cut-off värden (se Bilaga 1 & 2). Ett prov mer från friska kontroller detekterades som positiv för markör hos RSR 3Screen jämfört med RSR 2Screen vilket kan vara anledningen till 1 % lägre specificitet vid samma sensitivitet jämfört med RSR 2Screen.

I en studie av Chen et al. (2005) jämfördes resultat tagna från en ELISA-metod (baserade på detektion av individuella antigener IA-2A och GADA i separata analyser), med RSR 2screen. Samma sensitivitet och specificitet för båda två metoderna erhöles ($p < 0,001$). Sammanlagt 183 av 216 patientprover (85 %) med T1D hos en pediatrik population

detekterades som positiva för markör hos både individuella och RSR 2screen detektionsmetoderna i samma studie (Chen et al 2005). Resultaten som erhöles från studien bevisar att RSR 2screen är en metod som kan användas vid detektion av autoantikropparna GADA och IA-2A. Det bör även nämnas att ELISA RSR 2screen är ett bättre val ekonomiskt då två autoantikroppar kan detekteras samtidigt i en platta istället för enskilda plattor (Chen et al. 2005).

Cut-off värde för RSR 3Screen var dubbelt så högt (8.9 U/mL) som för RSR 2Screen (4.4 U/mL). Skillnaden i cut-off värde kan bero på att RSR 3Screen detekterar tre autoantikroppar (IA-2A, GAD65A och ZnT8A). Amoroso et al. (2016) demonstrerade resultat i sin studie för RSR 3screen där sensitiviteten uppnådde 97.7 % vid specificiteten 99 % med ett cut-off värde=6 U/mL. 128 av 132 (97 %) patientprover med T1D hos pediatrik population visade positivitet för T1D markör.

Något som bör nämnas angående skillnaden mellan metoderna RSR 2Screen och RSR 3Screen är att det har bevisats att ZnT8A har enorm roll inom T1D diagnostik då ZnT8A markören minskat antalet diabetesnegativa resultat från 5,8 % till 1,8 % och samtidigt ökat positiva resultat för 2 eller fler markörer, IA2-, GAD- eller också IAA markör, från 72 % till 82 % (n= 223, P=0.013) (Wenzlau et al. 2007) vilket kan bidra till ett bättre urval för screening av autoantikroppar.

Resultaten i denna aktuella studie för vuxen population resulterade i 92 % sensitivitet vid 97 % specificitet med ett cut-off värde på 8.9 U/mL där 92 % vuxna T1D patienter visade positivitet för markör. Amoroso et al. (2016) erhöil högre sensitivitet och specificitet samt lägre cut-off värde jämfört med denna studie. Skillnaderna i resultat kan bero på högre antal patientprover i studien av Amoroso et al. (2016) jämfört med denna studie. Något som bör påpekas är, som nämnts tidigare, att barn har högre andel av de flesta autoantikropparna som associeras med diabetes jämfört med vuxna vilket kan bidra till högre antal detekterade positiva T1D prover hos pediatrik population och kan därmed vara ytterligare ett skäl till skillnaden i resultat i jämförelse med vuxna populationer.

I ett tidigare examensarbete från Högskolan Kristianstad (Jovic 2016) som genomfördes på TEDDY-labbet, jämfördes sensitivitet och specificitet mellan två RSR 2Screen och RSR 3Screen i en pediatrik population. Erhållna cut-off värdet skilde mellan de båda metoderna, liksom sensitiviteten som var 2 % högre hos RSR 3Screen då de jämfördes vid samma specificitet. Resultat från Jovics studie (2016) visade en liten andel högre

specificitet hos RSR 3Screen för en pediatrik population jämfört med erhållna resultat från en adult population i denna studie. Detta kan bero på samma anledningar som nämnts vid jämförelsen mellan studien utförd av Amoroso et al. (2016) och den aktuella studien som presenteras här.

Area under ROC- kurva (AUC) uttrycker sannolikheten att en slumpmässigt vald person med sjukdomen i fråga har högre värde jämfört med en slumpmässigt vald frisk person (Van Belle 2004). AUC för RSR 2Screen och RSR 3Screen resulterade i ett värde av 97.5 % respektive 98.2 %, med en skillnad på 0.7 %. Enligt Björk (2011) ligger tumregeln för klassificeringsförmåga enligt följande; $AUC \leq 0.5$ (50 %) tolkas som att klassificeringstestet är lika bra som slumpmässig klassning och $AUC \geq 90$ % tolkas som utmärkta resultat, vilket båda metoderna uttrycker och därför klassificeras skillnaden på 0.7 % inte som en statistiskt betecknande skillnad.

Ytterligare en metodjämförelse mellan en radioimmunoassay (RIA)-metod och en kombination av GAD65/IA-2 ELISA utfördes i en studie av Törn et al. (2008) där RIA-metoden erhöll 98 % sensitivitet vid 64 % specificitet jämfört med RSR 2 Screen-ELISA som erhöll 96 % sensitivitet vid 98 % specificitet. Denna studie har bidragit till en möjlighet för detektion av autoantikroppar utan behov av radioaktiv-inmärkning av antigener. Även om det inte existerar medicin som kan bota T1D i dag så är det av stor vikt att kunna identifiera barn och vuxna som riskerar att utveckla T1D på ett tidigt stadium på grund av att de är bärare av HLA-typer som ger ökad risk för T1D.

5. Slutsats

RSR 2Screen rekommenderas i första hand för screening av autoantikroppar i en population av vuxna patienter med ökad risk för T1D och friska vuxna.

Tackord

Jag vill tacka min skrivhandledare Fariba Vaziri-Sani för hennes engagemang, snabba svar och kritik under arbetet. Jag vill även tacka min externa handledare Carina Törn som tillät mig genomföra mitt examensarbete hos TEDDY, hjälpt mig med resultaten samt visat stöd på olika sätt och min laborationshandledare Kobra Rahmati som hjälpt mig och stöttat mig under det laborativa arbetet. Sist men inte minst vill jag tacka personalen på TEDDY för deras varma välkomnande och positiva bemötande.

6. Referenser

Agardh, C. D., Berne, C., Östman, J. (2005). *Diabetes*. 3 uppl., Stockholm: Liber AB

Alvarsson, M., Brismar, K., Viklund, G., Wolk, A., Örtqvist, E., Östenson, C. G., Ericson, M. (2013). *Diabetes*. 3 uppl., Stockholm: Karolinska institutet universi.

Amoroso, M., Achenbach, P., Powell, M., Coles, R., Chlebowska, M., Carra, L., Furmaniaka, J., Scholz, M., Bonifacio, E., Ziegler, A., Smith R. B. (2016). 3 Screen islet cell autoantibody ELISA: A sensitive and specific ELISA for the combined measurement of autoantibodies to GAD65, to IA-2 and to ZnT8. *CLINICA CHIMICA ACTA*, 462, ss. 60-64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.08.013>

Andersson, C., Larsson, K., Vaziri-Sani, F., Lynch, K., Carlsson, A., Cedervall, E., Jönsson, B., Neiderud, J., Månsson, M., Nilsson, A., Lernmark, Å., Elding Larsson, H., Ivarsson, S-A. (2011). The three ZnT8 autoantibody variants together improve the diagnostic sensitivity of childhood and adolescent type 1 diabetes. *Autoimmunity*, 44(5), ss. 394-405. DOI: 10.3109/08916934.2010.540604

Arvan, P., Pietropaolo, M., Ostrov, D., Rhodes, C. (2012). Islet Autoantigens: Structure, Function, Localization, and Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8), ss.1-20. DOI: 10.1101/cshperspect.a007658

Bækkeskov, S., Aanstoot, H. J., Christgau, S., Reetz, A., Solimena, M., Cascalho, M., Folli, F., Richter-Olesen, H., De Camilli, P. (1982). Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*, 347, ss. 151-156. DOI: 10.1038/347151a0

Björk, J. (2011). *Praktisk statistik för medicin och hälsa*. 1 uppl., Stockholm: Liber.

Centers for Disease Control and Prevention, CDC. (2016). Be Active! www.cdc.gov [2017-11-12]

Centers for Disease Control and Prevention, CDC (2017). Type 1 Diabetes. www.cdc.gov [2017-11-11]

Chen, S., Willis, J., Maclean, C., Ananieva-Jordanova, R., Amoroso, M. A., Brooking, H., Powell, M., Collins, A., Bennett, S., Mitchell, S., Burne, P., Furmaniak, J., Smith, B. R. (2005). Sensitive non-isotopic assays for autoantibodies to IA-2 and to a combination of both IA-2 and GAD₆₅. *CLINICA CHIMICA ACTA*, 357, ss.74-83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.02.006>

Chimienti, F., Devergnas, S., Favier, A., Seve, M. (2004). Identification and cloning of a b-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes*, 53(9), ss. 2330–2337. DOI: <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.9.2330>

Chimienti, F., Devergnas, S., Pattou, F., Schuit, F., Garcia-Cuenca, R., Vandewalle, B., Kerr-Conte, J., VanLommel, L., Grunwald, D., Favier, A., Seve, M. (2006). *In vivo* expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *Journal of cell science*, 119, ss. 4199–4206. DOI: 10.1242/jcs.03164

Creative- diagnostics (u.å.). ELISA Guide.

<https://www.creative-diagnostics.com/ELISA-guide.htm> [2018-01-02]

Diabetesförbundet. (2017). Hur ställs diagnosen? www.diabetes.se [2017-11-11]

Erlander, M. G., Tillakaratne, N. J., Feldblum, S., Patel, N., Tobin, A. J. (1991). Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron*, 7(1), ss.91–100. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90077-D](http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273(91)90077-D)

Gianani, R., Rabin, D. U., Verge, C. F., Yu, L., Babu, S. R., Pietropaolo, M., Eisenbarth, G. S. (1995). ICA512 autoantibody radioassay. *Diabetes*, 44, ss. 1340-1344. DOI: <https://doi.org/10.2337/diab.44.11.1340>

Ingemansson, S., Vaziri-Sani, F., Lindblad, U., Gudbjornsdottir, S., Törn, C., and the DISS-study Group. (2013). Long-term sustained autoimmune response to beta cell specific zinc transporter (ZnT8, W,R,Q) in young adult patients with preserved beta cell function. *Autoimmunity*, 46(1), ss.50-61. DOI: 10.3109/08916934.2012.730585

Jovic, S. (2016). Jämförelse av två enzyme-linked immunosorbent assays för mätning av diabetespecifika autoantikroppar i en pediatrik population. Kristianstad: Högskolan Kristianstad, ss. 25. DiVA: diva2:1075484

Juvenile Diabetes Research Foundation, JDRF. (2017a). Polyuria and Type 1 Diabetes. www.jdrf.org [2017-11-11]

Juvenile Diabetes Research Foundation, JDRF. (2017b). Type 1 Diabetes High Blood Sugar Symptoms. www.jdrf.org [2017-11-11]

Lan, M. S., Lu, J., Goto, Y., Notkins, A. L. (1994). Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *DNA and Cell Biology*, 13(5), ss. 505-514. DOI: 10.1089/dna.1994.13.505

Lequin, R. (2005). Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical chemistry*, 51(12), ss. 2415–2418. DOI:10.1373/clinchem.2005.051532

Lernmark, Å., Sundkvist, G. (2007). Orsaker till typ 1-diabetes: In: Agardh CD, Berne C, Östman J, eds. *Diabetes*, 3. uppl., ss. 58-67. Stockholm: Liber.

Lindström, G. B. (2005). Hormonsystemet. <https://www.1177.se/Skane/Tema/Kroppen/Hormonella-systemet/Hormonsystemet/> [2017-11-12]

NATIONELLA DIABETESREGISTRET, NDR. (2017). Personer med diabetes som registrerats i NDR senaste 12 mån. www.ndr.nu [2017-11-12]

Palmer, J. P., Asplin, C. M., Asplin, C. M., Clemons, P., Lyen, K., Tatpati, O., Raghu, P. K., Paquette, T. L. (1983). Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*, 222, ss. 1337-1339. DOI: 10.1126/science.6362005

Ronkainen, M. S., Savola, K., Knip, M. (2004). Antibodies to GAD65 epitopes at diagnosis and over the first 10 years of clinical type 1 diabetes mellitus. *Scand J Immunol*, 59(3), ss.334–340. DOI: 10.1111/j.0300-9475.2004.01402.x

Saisho, Y. (2016). Pancreas Volume and Fat Deposition in Diabetes and Normal Physiology: Consideration of the Interplay Between Endocrine and Exocrine Pancreas. *The Review of DIABETIC STUDIES*, 13(2-3), ss.132–147. DOI: 10.1900/RDS.2016.13.132

Sigma-Aldrich (u.å.b). 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA. www.sigmaaldrich.com [2017-10-20]

Smidt, K., Jessen, N., Petersen, A. B., Larsen, A., Magnusson, N., Jeppesen, J. B., Stoltenberg, M., Culvenor, J. G., Tsatsanis, A., Brock, B., Schmitz, O., Wogensen, L., Bush, A. I., Rungby, J. (2009). SLC30A3 responds to glucose- and zinc variations in b-cells and is critical for insulin production and in vivo glucose-metabolism during b-cell stress. *PLoS ONE*, 4(5), e5684, DOI: 10.1371/journal.pone.0005684

Smith, M., Simmons, K., Cambier, J. (2017). B cells in type 1 diabetes mellitus and diabetic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, 13(11), ss. 712-720. DOI: 10.1038/nrneph.2017.138

Solimena, M., Dirx, R. J., Hermel, J. M., Pleasic-Williams, S., Shapiro, J. A., Caron, L., Rabin, D. U. (1996). ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *EMBO Journal*, 15(9), ss. 2102–2114.

TEDDY studien Lunds Universitet. (2016). Bakgrund och historik. <https://www.med.lu.se/teddy/studien> [2017-11-20]

Torii, S. (2009). Expression and function of IA-2 family proteins, unique neuroendocrine-specific protein-tyrosine phosphatases. *Endocrine Journal*, 56(5), ss. 639–648. DOI: <https://doi.org/10.1507/endocrj.K09E-157>

Trajkovski, M., Mziaut, H., Schubert, S., Kalaidzidis, Y., Altkruger, A., Solimena, M. (2008). Regulation of insulin granule turnover in pancreatic b-cells by cleaved ICA512. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 283(48), ss. 33719–33729. DOI: 10.1074/jbc.M804928200

Törn, C., Mueller, P. W., Schlosser, M., Bonifacio, E., Bingley, P. J. (2008). Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. *Diabetologia*, 51(5), ss. 846-852. DOI: 10.1007/s00125-008-0967-2

University of Bristol. (u.å.). Islet cell autoantibodies. <https://www.bristol.ac.uk/translational-health-sciences/research/diabetes/research/autoantibodies/> [2017-12-10]

Van Belle, G., Fisher, L. D., Heagerty, P. J. & Lumley, T. (2004). *Biostatistics. A methodology for the Health Sciences*. 2. uppl., Washington: University of Washington

Wenzlau, J. M., Juhl, K., Yu, L., Moua, O., Sarkar, S. A., Gottlieb, P., Rewers, M., Eisenbarth, G. S., Jensen, J., Davidson, H. W., Hutton, J. C. (2007). The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, ss. 17040-17045. DOI: 10.1073/pnas.0705894104

Östman, J., Landin-Olsson, M., Törn, C., Palmer, J., Lernmark, Å., Arnqvist, H., Björk, E., Bolinder, J., Blohmé, G., Eriksson, J., Littorin, B., Nyström, L., Scherstén, B., Sundkvist, G., Wibell, L. (2000). Ketoacidosis in young adults is not related to the islet antibodies at diagnosis of Type 1 diabetes mellitus – a nationwide study. *Diabetic Medicine*, 17(4), ss. 269-274. DOI: 10.1046/j.1464-5491.2000.00265.x

1177. (u.å.). Läkemedel vid typ-1 diabetes. <https://www.1177.se/Skane/Fakta-och-rad/Rad-om-lakemedel/Lakemedel-vid-typ-1-diabetes/> [2017-11-13]

7. Bilagor

Bilaga 1. Cut-off- värde samt specificitet och sensitivitet för bestämd cut-off värde för ELISA RSR 2Screen.

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): 2Screen

| Positive if Greater Than or Equal To ^a | Sensitivity | 1 - Specificity |
|---|-------------|-----------------|
| -1,0000 | 1,000 | 1,000 |
| ,0050 | 1,000 | ,620 |
| ,0150 | 1,000 | ,460 |
| ,0250 | 1,000 | ,430 |
| ,0350 | 1,000 | ,410 |
| ,0450 | 1,000 | ,380 |
| ,0510 | 1,000 | ,370 |
| ,0610 | ,980 | ,370 |
| ,0750 | ,980 | ,350 |
| ,0850 | ,980 | ,340 |
| ,0950 | ,980 | ,320 |
| ,1050 | ,980 | ,300 |
| ,1150 | ,980 | ,290 |
| ,1250 | ,980 | ,250 |
| ,1350 | ,980 | ,240 |
| ,1500 | ,980 | ,230 |
| ,1650 | ,980 | ,220 |
| ,2000 | ,980 | ,210 |
| ,2350 | ,960 | ,210 |
| ,2550 | ,960 | ,200 |
| ,2850 | ,960 | ,180 |
| ,3300 | ,960 | ,170 |
| ,3650 | ,940 | ,160 |
| ,3750 | ,920 | ,140 |
| ,3850 | ,920 | ,120 |
| ,4000 | ,920 | ,110 |
| ,4200 | ,920 | ,100 |
| ,4650 | ,920 | ,090 |
| ,6050 | ,920 | ,070 |

| | | |
|----------------------|--------------------|--------------------|
| ,8050 | ,920 | ,060 |
| ,9500 | ,920 | ,050 |
| 1,2400 | ,920 | ,030 |
| <u>4.4350</u> | <u>.920</u> | <u>.020</u> |
| 13,3197 | ,900 | ,020 |
| 28,8647 | ,880 | ,020 |
| 41,1000 | ,860 | ,020 |
| 46,6775 | ,840 | ,020 |
| 53,1575 | ,820 | ,020 |
| 58,3304 | ,800 | ,020 |
| 67,2104 | ,780 | ,020 |
| 78,0617 | ,760 | ,020 |
| 83,3667 | ,740 | ,020 |
| 101,7018 | ,720 | ,020 |
| 119,9597 | ,700 | ,020 |
| 125,8929 | ,680 | ,020 |
| 131,6350 | ,660 | ,020 |
| 138,0850 | ,640 | ,020 |
| 153,3422 | ,620 | ,020 |
| 164,7124 | ,600 | ,020 |
| 166,6002 | ,580 | ,020 |
| 168,7321 | ,580 | ,010 |
| 170,6666 | ,560 | ,010 |
| 177,9145 | ,540 | ,010 |
| 188,2550 | ,540 | ,000 |
| 196,8750 | ,520 | ,000 |
| 205,0000 | ,500 | ,000 |
| 212,5100 | ,480 | ,000 |
| 220,1450 | ,460 | ,000 |
| 227,4650 | ,440 | ,000 |
| 234,8200 | ,420 | ,000 |
| 242,9218 | ,400 | ,000 |
| 252,6324 | ,380 | ,000 |
| 262,9256 | ,360 | ,000 |
| 277,3550 | ,340 | ,000 |
| 297,2700 | ,320 | ,000 |
| 311,9163 | ,300 | ,000 |
| 318,0963 | ,280 | ,000 |
| 324,2500 | ,260 | ,000 |
| 341,3499 | ,240 | ,000 |

| | | |
|----------|------|------|
| 356,1099 | ,220 | ,000 |
| 359,0139 | ,200 | ,000 |
| 362,2139 | ,180 | ,000 |
| 365,0421 | ,160 | ,000 |
| 367,2471 | ,140 | ,000 |
| 374,3894 | ,120 | ,000 |
| 381,6225 | ,080 | ,000 |
| 383,9280 | ,060 | ,000 |
| 387,8350 | ,040 | ,000 |
| 392,2500 | ,020 | ,000 |

Bilaga 2. Cut-off värde samt specificitet och sensitivitet för bestämd cut-off värde för ELISA RSR
3Screen

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): 3Screen

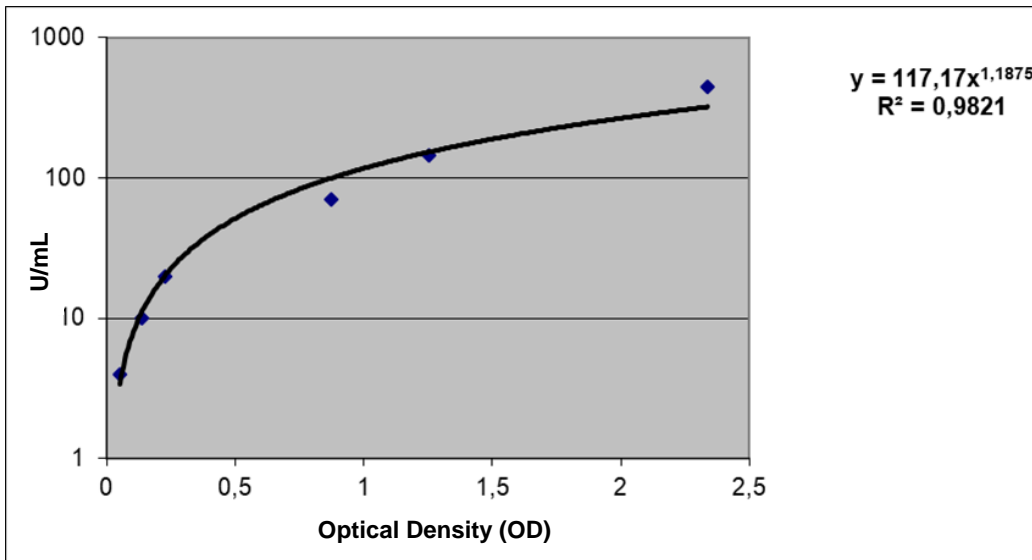
| Positive if Greater Than or Equal To ^a | Sensitivity | 1 - Specificity |
|---|-------------|-----------------|
| -1,0000 | 1,000 | 1,000 |
| ,0200 | 1,000 | ,700 |
| ,0595 | 1,000 | ,690 |
| ,0895 | 1,000 | ,680 |
| ,1500 | 1,000 | ,670 |
| ,2500 | 1,000 | ,650 |
| ,3150 | 1,000 | ,640 |
| ,3350 | 1,000 | ,630 |
| ,3450 | 1,000 | ,620 |
| ,3750 | 1,000 | ,610 |
| ,4100 | 1,000 | ,600 |
| ,5000 | 1,000 | ,580 |
| ,5900 | 1,000 | ,570 |
| ,6200 | 1,000 | ,560 |
| ,6450 | 1,000 | ,530 |
| ,6750 | 1,000 | ,520 |
| ,7150 | 1,000 | ,500 |
| ,7400 | 1,000 | ,490 |
| ,7800 | 1,000 | ,480 |
| ,8150 | 1,000 | ,470 |
| ,8700 | 1,000 | ,460 |

| | | |
|--------|-------|------|
| ,9300 | 1,000 | ,440 |
| ,9500 | 1,000 | ,430 |
| ,9700 | 1,000 | ,420 |
| ,9900 | 1,000 | ,410 |
| 1,0150 | 1,000 | ,400 |
| 1,0350 | 1,000 | ,390 |
| 1,0500 | 1,000 | ,380 |
| 1,0700 | 1,000 | ,350 |
| 1,1000 | 1,000 | ,340 |
| 1,1600 | 1,000 | ,330 |
| 1,2200 | 1,000 | ,310 |
| 1,2500 | 1,000 | ,300 |
| 1,2850 | ,980 | ,300 |
| 1,3150 | ,980 | ,290 |
| 1,3750 | ,980 | ,280 |
| 1,4600 | ,980 | ,270 |
| 1,5150 | ,980 | ,260 |
| 1,5600 | ,980 | ,240 |
| 1,6400 | ,980 | ,230 |
| 1,7150 | ,980 | ,220 |
| 1,7750 | ,980 | ,210 |
| 1,8600 | ,980 | ,200 |
| 1,9500 | ,980 | ,190 |
| 2,0650 | ,980 | ,180 |
| 2,1600 | ,980 | ,160 |
| 2,2150 | ,980 | ,150 |
| 2,3050 | ,980 | ,140 |
| 2,3800 | ,980 | ,130 |
| 2,5250 | ,960 | ,130 |
| 2,6700 | ,960 | ,120 |
| 2,9600 | ,940 | ,120 |
| 3,3050 | ,940 | ,110 |
| 3,9150 | ,940 | ,100 |
| 4,5350 | ,920 | ,100 |
| 4,6300 | ,920 | ,090 |
| 5,0300 | ,920 | ,080 |
| 5,7700 | ,920 | ,070 |
| 6,2600 | ,920 | ,060 |
| 6,4300 | ,920 | ,050 |
| 7,4900 | ,920 | ,040 |

| | | |
|----------------------|--------------------|--------------------|
| <u>8,8750</u> | <u>.920</u> | <u>.030</u> |
| 20,6150 | ,920 | ,020 |
| 40,7100 | ,900 | ,020 |
| 89,2700 | ,880 | ,020 |
| 160,1000 | ,860 | ,020 |
| 299,6600 | ,840 | ,020 |
| 432,8800 | ,820 | ,020 |
| 552,5550 | ,800 | ,020 |
| 699,2750 | ,780 | ,020 |
| 755,1800 | ,760 | ,020 |
| 823,0000 | ,740 | ,020 |
| 914,9150 | ,720 | ,020 |
| 1009,0500 | ,720 | ,010 |
| 1095,7350 | ,700 | ,010 |
| 1139,8450 | ,660 | ,010 |
| 1183,3350 | ,660 | ,000 |
| 1291,9400 | ,640 | ,000 |
| 1453,5500 | ,620 | ,000 |
| 1534,4050 | ,600 | ,000 |
| 1560,9950 | ,580 | ,000 |
| 1584,6300 | ,560 | ,000 |
| 1609,9150 | ,540 | ,000 |
| 1632,7100 | ,520 | ,000 |
| 1649,4800 | ,500 | ,000 |
| 1676,2150 | ,480 | ,000 |
| 1786,7800 | ,460 | ,000 |
| 1923,2450 | ,440 | ,000 |
| 1979,4100 | ,420 | ,000 |
| 2002,4550 | ,400 | ,000 |
| 2040,6050 | ,380 | ,000 |
| 2077,4800 | ,360 | ,000 |
| 2101,0200 | ,340 | ,000 |
| 2126,5750 | ,320 | ,000 |
| 2168,6950 | ,300 | ,000 |
| 2207,5150 | ,280 | ,000 |
| 2210,8800 | ,260 | ,000 |
| 2236,8550 | ,240 | ,000 |
| 2283,6600 | ,220 | ,000 |
| 2326,8550 | ,200 | ,000 |
| 2364,5550 | ,180 | ,000 |

| | | |
|-----------|------|------|
| 2405,0750 | ,160 | ,000 |
| 2462,8550 | ,140 | ,000 |
| 2505,9500 | ,120 | ,000 |
| 2586,1600 | ,100 | ,000 |
| 2669,6650 | ,080 | ,000 |
| 2746,4850 | ,060 | ,000 |
| 2894,0100 | ,040 | ,000 |
| 3260,7200 | ,020 | ,000 |
| 3544,9400 | ,000 | ,000 |

Bilaga 3. Standardkurva för RSR 2screen vid våglängden 405 nm.



Bilaga 4. Standardkurva för RSR 3screen vid våglängden 405 nm.

