



Självständigt arbete (examensarbete), 15 hp, för  
examensbenämning: Kandidatexamen i Biomedicinsk  
laboratorievetenskap

Höst termin 2016

## Jämförelse av två enzyme-linked immunosorbent assays för mätning av diabetesspecifika autoantikroppar i en pediatrisk population

Silvija Jovic

Sektion för lärande och miljö

**Författare**

Silvija Jovic

**Titel**

Jämförelse av två enzyme-linked immunosorbent assays (RSR-2screen islet cell autoantibody ELISA-kit, RSR och RSR-3screen islet autoantibody ELISA kit, RSR) för mätning av diabetespecifika autoantikroppar i en pediatrik population.

**Handledare**

Fariba Vaziri-Sani, Doktor i Medicinsk Vetenskap, Docent i experimentell autoimmun diabetes  
Dr. Carina Törn, leg. BMA, Docent, Experimentell endokrinologi  
Kobra Rahmati, leg. BMA

**Examinator**

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

**Sammanfattning**

Typ 1 diabetes (T1D) är en autoimmunsjukdom som ökar för varje år och är den vanligaste typen av diabetes bland barn och unga (98 %). Vid T1D bildar kroppen autoantikroppar mot beta celler som finns i bukspottskörteln. Betacellerna förstörs i en immunologisk process och då kan inte cellerna producera hormonet insulin. Följderna blir att individen inte kan tillgodogöra glukos i blodet. De autoantikroppar som har identifierats är mot de Langerhanska ö-cellerna är följande: ö-cellantikroppar (Islet Cell Antibodies, ICA), insulinantikroppar (Insulin Auto Antibody, IAA), glutaminsyradekarboxylas-antikroppar (glutamic acid decarboxylase antibodies, GADA), tyrosinfosfatas-liknande proteinet IA-2 antikroppar (tyrosine phosphatase-related islet antigen 2 antibodies, IA-2A) samt zinktransportör 8 antikroppar (zinc transporter 8 autoantibody, ZnT8A). I den här studien jämfördes två kommersiella ELISA kit för detektion av autoantikroppar i serum. RSR-2screen islet cell autoantibody (ELISA-kit, RSR, Cardiff, UK) identifierar IA-2 och GAD antikroppar och RSR-3screen islet cell autoantibody identifierar (ELISA-kit, RSR,) IA-2, GAD och ZnT8 antikroppar. I studien deltog en kontrollgrupp (n=100) och en grupp av nyligen diagnostiserade T1D-patienter (n=50). Resultaten för studien behandlades statistiskt för att bestämma ett positivt tröskelvärde för båda kiten (RSR-2screen: 2,7 Units/mL och RSR-3screen:15 Units/mL). Vid specificiteten 97,5% gav RSR-2screen sensitivitet 92 % och RSR-3screen sensitiviteten 94 %. Eftersom RSR-3screen gav högre sensitivitet drogs slutsatsen att den rekommenderas i första hand för screening i en frisk population samt bland individer som löper ökad risk att utveckla T1D.

**Nyckelord:** Diabetes typ 1, RSR-2screen, RSR-3screen, specificitet, sensitivitet

**Author**

Silvija Jovic

**Title**

Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays (RSR-2screen islet cell autoantibody ELISA-kit, RSR and RSR-3screen islet autoantibody ELISA kit, RSR) for measuring diabetes-specific autoantibodies in the pediatric population.

**Supervisor**

Fariba Vaziri-Sani, PhD at Medical Science, Associate Professor at Experimental Autoimmune Diabetes  
Dr. Carina Törn, Registered Biomedical Scientist, Associate Professor, Unit for diabetes and celiac disease.

Kobra Rahmati, Registered Biomedical Scientist

**Examiner**

Dr. Bodil Hernroth, Registered Biomedical Scientist, professor at Microbiology

**Abstract**

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disorder that is increasing every year and is the most common type of diabetes among children and young people (98%). The immune system of T1D patients produce autoantibodies against beta cells in the pancreas.–These autoantibodies participate in the immune process that destroy beta cells in a way that these cells will not be able to produce insulin. The consequences are that the glucose cannot be absorb from the blood. The autoantibodies that have been identified are the Langerhans islet cells antibodies: Islet Cell Antibodies (ICA), the  $\beta$ -cell-specific antigen insulin autoantibody (IAA),  $\beta$ -cell associated glutamic acid decarboxylase antibodies (GADA), tyrosine phosphatase protein antibodies (IA -2A) and autoantibodies against the zinc transporter 8 (ZnT8). In this study, two commercial ELISA kits for detection of the autoantibodies in sera was compered. RSR-2screen islet cell autoantibody (ELISA kit, RSR, Cardiff, UK) identifies the IA-2 and GAD antibodies and RSR-3screen islet cell autoantibody (ELISA kit, RSR), identifies IA-2, GAD and ZnT8 autoantibodies. The participants in the present study was a control group (n = 100) and a group of newly diagnosed T1D patients (n=50). The results of the study were statistically evaluated-to determine a positive cut-off for both kits (2screen: 2.7 Units/ml and RSR-3screen: 15 Units/ml). At the specificity 97.5% RSR-2screen achieved sensitivity 92% and RSR RSR-3screen achieved sensitivity 94%. The results from RSR-3screen showed higher sensitivity. Therefore, it was concluded that it is the preferred assay for screening in a healthy population and also among populations at high risk to develop T1D.

**Keywords:** Diabetes type 1, RSR-2screen, RSR-3screen, specificity, sensitivity

# Innehåll

1. Inledning .....	5
1.1 Typ 1 diabetes .....	5
1.2 Insulin.....	6
1.3 Langerhanska öar .....	7
1.4 Autoantikroppar .....	7
1.5 Etiska övervägande .....	10
1.6 Syfte .....	10
2. Material och metod .....	11
2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay .....	11
2.2. Metod .....	11
2.3. Statistiska beräkningar .....	13
3. Resultat.....	13
3.1 RSR 2-screen.....	13
3.2. RSR 3-screen.....	14
4. Diskussion.....	16
5. Slutsats .....	17
6. Referenser .....	18
7. Bilagor.....	22

# 1. Inledning

Diabetes är en sjukdom där kroppen inte kan producera eller tillgodogöra sig glukos. Det finns olika typer av diabetes, mest kända är typ 1 diabetes (T1D) och typ 2 diabetes (T2D). Vid typ T1D slutar kroppen att producera hormonet insulin (Bendt 2016). Vid T2D bildar kroppen inte tillräckligt med insulin eller så kan inte kroppen ta upp insulinet. I detta examensarbete kommer jag fokusera på T1D (Carlsson 2014). Den internationella studien ”The Environmental Determinants of Diabetes in the Young”, (TEDDY) är en studie som utförs i Sverige (Skåne), Finland, USA och Tyskland. Tillsammans omfattar TEDDY studie 8600 barn, varav 30 % är från Skåne. Det är ett forskningsprojekt som arbetar för att ta reda på vad som gör att barn utvecklar T1D. Studien utförs i ett tvåstegs program, urval och uppföljning. Alla barn som föds på någon TEDDY engagerad klinik i Skåne mellan 2004 och 2010 kan vara med i studien som analyserar den ärftliga risken för utveckling av T1D (Lunds Universitet 2016). Barn följs upp vart tredje månad från att de blivit 4 månader fram tills de fyllt 4 år och sedan görs återbesök vart sjätte månad fram tills de fyllt 15 år (Steck et al. 2015).

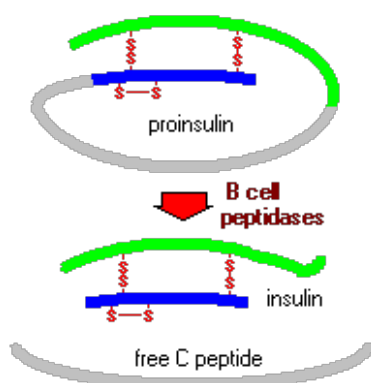
## 1.1 Typ 1 diabetes

T1D är den vanligaste typen av diabetes bland barn och unga och utgör ca 98 % av diabetes hos barn i Sverige. Sjukdomen kan antingen utlösas tidigt eller ligga latent under flera år. Kännetecknen för sjukdomen är stora urinmängder (polyuri), onormal stor törst (polydipsi), viktminskning och trötthet. Obehandlad T1D leder till dehydrering och metabol ketoacidosis som kan leda till koma (Sjöblad 2008). Det som karakteriserar T1D är de låga eller helt frånvarande halterna av insulin som istället måste tillföras kroppen för att förhindra ketoacidosis dvs. en syraförgiftning som kan uppstå vid höga glukosvärden (Harris 1995). Orsakerna till utveckling av T1D är inte helt kartlagda men det finns en stor sammankoppling mellan arvet och yttre skadliga faktorer. Om personer som löper risk för att utveckla T1D utsätts för virusinfektioner så som röda hund, enterovirus, trauma, svåra livsförändringar m.fl. kan detta utlösa en autoimmun beta-cells förändring som kan leda till diabetes (Sjöblad 2008). Vid friskt tillstånd producerar betacellerna insulin, men vid T1D utsätts betacellerna för inflammationer vilket leder

till att de förstörs och det uppstår insulinbrist. T1D är en autoimmunsjukdom där kroppens immunförsvar attackerar och förstör betacellerna (Lan et al. 1994). Det bildas autoantikroppar riktade mot de Langerhanska ö-cellerna (Islet Cell Antibodies, ICA), Insulin (Insulin Auto Antibody, IAA), beta-cell associerade glutaminsyra dekarboxylas (glutamic acid decarboxylase antibodies, GADA), protein tyrosinfosfatas-liknande protein (IA-2) samt antikroppar mot zinktransportören 8 (ZnT8) (Sjöblad 2008). T1D kan räknas som en tvåstegs sjukdom. I det första steget startar en autoimmunitet mot bukspottskörtelns ö-celler och i det andra steget bildas det så mycket ö-cells autoantikroppar att >80% av beta-cellerna förstörts vilket leder till att insulinbristen blir kliniskt manifesterad (La Torre & Lernmark 2007). Genetiska undersökningar har visat kopplingar mellan en genregion på kromosom sex kallad human leukocyt antigen (HLA) med uppkomsten av T1D. Individer med ökade risker för T1D är heterozygoter för HLA DQ8 och DQ2 och är bärare av dessa HLA klass II proteiner (40 % respektive 30 %) till skillnad från friska där förekomsten är ca 15 % respektive 10 % (Mulder 2008).

## 1.2 Insulin

Proinsulin består av en A och B kedja som är hopbundna med hjälp av disulfidbindningar. Två disulfidbindningar mellan A och B kedjorna samt en disulfidbindning i A kedjan (Fu et al. 2013). Insulin bildas i beta-celler och reglerar blodsockernivån. Insulin syntetiseras i form av preproinsulin som bildas i betacellerna i bukspottskörteln och därefter omvandlas till proinsulin. Proinsulinet klyvs till insulin och C-peptid som sedan lagras i de sekretoriska granulae (Figur 1) (Malmquist u.å.). Insulingenen ligger på kromosom 11 i cellkärnan och består av totalt 1355 baspar (Mulder 2008).



**Figur 1.** Schematisk bild av proinsulinets klyvning till insulin (Bowen 1999).

### 1.3 Langerhanska öar

Bukspottskörteln är ett organ som väger ca 100 g hos en vuxen människa. Bukspottskörteln består av en exokrin del och en endokrin del. Den exokrina delen utsöndrar bl.a. enzymer som bryter ner kolhydrater, lipider och protein medan den endokrina delen av bukspottskörteln insöndrar insulin, glukagon och somatostatin (Hörnblad 2012). Den endokrina vävnaden utgör ca 1 % av dess totala massa hos en vuxen människa. Det finns ungefär 1 miljon Langerhanska öar varav varje ö innehåller upp till 5000 endokrina celler (Mulder 2008). Öarnas diameter varierer mellan 50-1000 µm. Öarna består av 4 celltyper:  $\beta$ -celler,  $\alpha$ -celler,  $\delta$ -celler och PP-celler. Som tidigare nämnts producerar och frisätter  $\beta$ -cellerna insulin och utgör 60-85% av totala antalet celler i bukspottskörteln (Mulder 2008).  $\alpha$ -celler utgör 10-25% av ö-cellerna och innehåller glukagon,  $\delta$ -cellerna utgör 5-10% av ö-cellerna och frisätter somatostatin.  $\delta$ -celler hämmar insöndringen av de övriga ö-hormonerna. PP-celler finns också i öarna och utgör 1-5% av den totala massan och producerar pankreas polypeptid (PP) men har i övrigt ingen säkerställd hormonell funktion vad man vet idag (Mulder 2008).  $\beta$ -cellen innehåller synapslika vesiklar som lagrar  $\gamma$ -aminosmörtsyra (Gamma-Amino Butyric acid; GABA). GABAS funktion har inte bestämts helt ännu men det finns en stor möjlighet att GABA hämmar glukagonfrisättningen. Enzymet glutaminsyra dekarboxylas (GAD) tillverkar GABA och är det vanligaste antigenet för den vanligast förekommande autoantikroppen, GAD65A vid T1D (Agardh 2009). I en studie av Baekkeskov et al. (1990) hade nästan alla patienter som visat sig vara positiva för autoantikroppar mot GABA sekreterande neuroner också varit positiva för islet cell cytoplasmatiska antikroppar (ICA) och en stor andel av dessa patienter hade T1D. Studien demonstrerades med hjälp av immunofluorescence av pankreassekretion.

### 1.4 Autoantikroppar

Autoantikroppar kan upptäckas i höga koncentrationer långt före diagnos av T1D. De autoantikroppar som är kända idag är riktade mot insulin (IAA), glutaminsyra

dekarboxylas (GAD). Dessa båda autoantikroppar bidrar till den reaktivitet som mäts som Islet cell autotibodies (ICA) autoantikroppar. Det finns ytterligare två kända autoantikropparna riktade mot protein tyrosinfosfatas-liknande protein (IA-2) (Verge et al. 1998) och mot zink transportören 8 (Znt8) (Wenzlau et al. 2008), (se Figur 2, Skärstrand 2014). Antikroppar mot de Langerhanska ö-cellerna upptäcktes av Bottazzo et al. (1976) genom att de analyserade pankreas på nyligen avlidna människor med immun-fluorescens. Även råttors och marsvins pankreas analyserades. Serum testades med antihuman-IgG fluorescens-isothiocynate konjugerat med IgG, A och M. Resultaten visade att antikropparna endast var av IgG klass. År 1974 beskrevs autoantikroppar mot bukspottskörtelns ö-celler för första gången. Med hjälp av indirekt immunofluorescens på frysta bukspottskörtels preparat lyckades forskarna påvisa cirkulerande ö-cells antikroppar (ICA) hos T1D patienter med polyendokrin sjukdom (Bottazzo et al. 1974). Identifiering av autoantikropparna GADA och IA-2A utförs inte endast på forskningslaboratorium utan har blivit vanligare i den kliniska verksamheten. Autoantikroppar har en viktig roll för den kliniska klassifikationen. Närvaron av autoantikroppar förutsäger behovet av insulinbehandling (prediction of the need for insulin treatment), identifierar personer med risk att utveckla T1D och som mål/slutpunkter i observationsstudier (Törn et al. 2008).

## **IA-2**

Antigenet ICA512 identifierades av Lan et al. (1994). Nydiagnostiserade patienters serum screenades mot ett konstruerat, komplementärt cDNA bibliotek. Det utfördes en studie på ICA512 av Gianani et al. (1995) varav det fick namnet Insulinoma antigen-2 (IA-2). Antigenet tillhör tyrosinfosfataser som är membranbundna receptorer.

## **IAA**

Insulinautoantikroppar identifierades av Palmer et al. (1983) med en immunoprecipitationsmetod i patientserum för analys av insulinbindning. Radioaktivt insulin ( $^{125}\text{I}$ ) inkuberades med IAA-behandlat serum. Antikroppar i patienternas serum



bands till det radioaktivt inmärkt insulinet. På så sätt kunde antikroppar mot insulin påvisas hos patienterna med T1D.

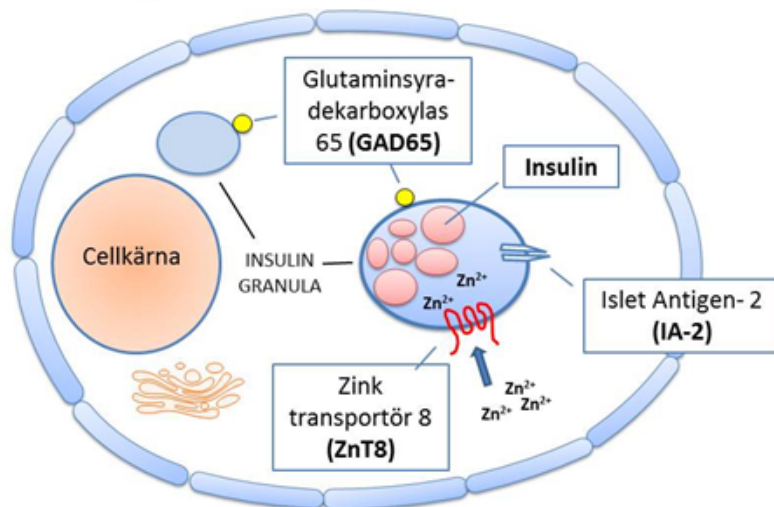
### **GAD**

De molekylära ö-cellsautoantigenens egenskaper var okända fram till år 1982. Då demonstrerade Baekkeskov et al. (1982) att serum från nydiagnostiserade T1D-patienter hade ö-cellsautoantikroppar genom att utföra en immunoprecipitationsmetod av ett 64kDa protein isolerat i ö-cellerna. När Baekkeskov et al. (1990) utförde analysmetoden upptäcktes att proteinet hade gamma-amino-butyric acid (GABA)-syntetiserande enzymatisk aktivitet. Vidare studier visade att beta-cells autoantigen med molvikten 64kDa var en isoform av GAD65. Det har visat sig att GAD65 autoantikroppar finns hos  $\geq 80\%$  nydiagnostiserade T1D-patienter.

### **ZnT8**

På senare tid har Wenzlau et al. (2007) upptäckt autoantikroppar mot zinktransportörens isoform ZnT8. ZnT8 förmedlar Zn<sup>2+</sup> katjon transporten in till insulinets granula, vilket underlättar bildandet av insulinkristaller. En radioimmunoprecipitationsanalys utfördes. Studien visade att kombination av ZnT8, INS, GAD och IA2 antikroppsanalys höjde sensitiviteten vid detektion av T1D-autoreaktivitet. Serum från 223 nydiagnostiserade diabetespatienter utvärderades för antikroppar mot INS, GAD, IA2 och ZnT8. Den kombinerade mätningen av INS, GAD och IA2 detekterade 94,2% av reaktiviteten. När ZnT8 analysen inkluderades som ett fjärde mått ökade detektionen till 98,2% (Wenzlau et al. 2008). ZnT8 har visat sig vara ett stort mål för autoantikropparna hos T1D-patienter. I en studie av Vaziri-Sani et al. (2008) analyserades ZnT8 och dess isoformer, arginin (ZnT8-R), tryptofan (ZnT8-A) och glutamin (ZnT8-Q). En trippelmix av ZnT8-isoformer utvecklades och analyserades med radiobinding assay (RBA) vilket bekräftade att trippelmixen gav en ökad sensitivitet och specificitet vid diagnostisering av T1D.

## Autoantigen i insulinproducerande celler



**Figur 2.** Schematisk bild över beta-cellen och dess autoantigen som kroppen bildar autoantikroppar mot (Skärstrand 2014).

### 1.5 Etiska övervägande

Pseudonymiserade serumprover från patienter diagnosticerade med T1D och prover från friska barn fanns redan insamlade för analys. Etiskt tillstånd finns ("Förekomst av olika antikroppar i populationen före och efter vaccination mot påssjuka, röda hund och mässling (MPR)"; LU339-1988), och ("Identifiering av gener som kodar för risk för barndiabetes i regioner som visar koppling till insulinberoende diabetes"), LU-82-99, LU508-96), för att genomföra projektet.

### 1.6 Syfte

Målet med projektet var att jämföra två kommersiellt tillgängliga kit, RSR-2screen islet cell autoantibody (ELISA-kit, RSR, Cardiff, UK) och RSR-3screen islet cell autoantibody (ELISA-kit, RSR, Cardiff, UK) för att undersöka om dessa kit ger jämförbar sensitivitet och specificitet i en pediatrik population av nydebuterade patienter med T1D och friska barn. Idag finns det ingen prevention som kan förhindra eller fördröja uppkomsten av T1D men om en sådan prevention blir tillgänglig så är det av yttersta värde att kunna identifiera de individer med en hög risk för att utveckla T1D.

Det kit som ger högst sensitivitet, specificitet och bäst prestanda skulle kunna användas i framtiden för att screena individer med ökad risk för utveckling av T1D.

## 2. Material och metod

### 2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) används vid detektering av antikroppar eller antigen och har visat sig ha hög specificitet och sensitivitet enligt Diabetes Antibody standardization program (DASP) (Rahmati et al. 2008). Tidigare studier har rapporterat att RSR-ELISA-kit för GADA och IA-2 ger hög sensitivitet och specificitet (Rahmati et al. 2008). Nackdelen med RSR-ELISA kit är att endast serum kan användas eftersom att EDTA-plasma tenderar att ge falskt positiva resultat. RSR-2screen islet cell autoantibody (ELISA-kit, RSR, Cardiff, UK) är coatade med GAD65 och IA-2A och RSR-3screen islet cell autoantibody (ELISA-kit, RSR) är coatade med GAD65, IA-2A och ZnT8. De två kommersiella kiten är uppbyggda enligt samma princip.

### 2.2. Metod

Totalt 50 nydiagnostiserade T1D patienter deltog i studien. Medianåldern var 8 år, med intervallet 3-15 år (23 flickor, 27 pojkar). Blodprov samlades mellan åren 1989-2005. Blodprov till kontrollgruppen (n=100) samlades från friska skolbarn i samband med det nationella vaccinationsprogrammet för mässling, påssjuka och röda hund (MPR). Medianåldern var 12 år med intervallet 12-13 år (50 kvinnor, 50 män). Blod samlades år 1989 under två månaders tid (se Tabell 1).

**Tabell 1.** Frekvensfördelningen av kön samt ålder för kontroller och patienter.

Kön/ålder	Frekvens	
	<i>kontroll</i>	<i>patient</i>
<b>Kvinnor</b>	50	23
<b>män</b>	50	27

<b>Median (år)</b>	12,6	8,8
<b>Min (år)</b>	11,9	2,9
<b>Max (år)</b>	13,6	14,7

### **RSR-2screen & RSR-3screen analysmetod**

Två olika varianter av RSR-Elisa kit användes, RSR-2screen och RSR-3screen (ELISA-kit, RSR, Cardiff, UK). RSR-2screen Kit består av en mikrotiter 96-hålsplatta som är coatade med renade betacellsantigen från bukspottskörteln, 2 positiva kontroller (GAD65 och IA-2 antikropp), 1 negativ kontroll, vars innehåll skyddas av tillverkaren, 6 standard prover (kalibratorer) (4, 10, 20, 70, 145 och 450 Units/mL), GAD65/IA-2 biotinmix, streptavidinperoxid, TMB, stopplösning och tvättlösning. RSR-3screen kit bestod av 96-hålsplatta, 3 positiva kontroller (GAD65 IA-2 och ZnT8 antikropp), 1 negativ kontroll, vars innehåll skyddas av tillverkaren, 5 stycken standard prover (kalibratorer) (5, 15, 100, 400 och 2000 Units/mL), GAD65/IA-2 biotinmix, streptavidinperoxid, TMB, stopplösning och tvättlösning. Lösningarna späddes enligt tillverkarens anvisningar.

Analysmetoden för RSR-2screen islet cell autoantibody utfördes under två dagar. Den första dagen tillsattes 50 µL av respektive standard prover, positiva och negativa kontrollen samt patientprov till brunnarna i duplikat. Därefter pipetterades 25 µL enhancer i respektive brunn förutom blanken (enligt tillverkarens rekommendationer) som endast bestod av TMB och stopplösning enligt tillverkarnas instruktioner. Plattan täcktes med plastfilm, skakades i 5 sekunder på skak (mini-shaker, PSU-2T Biosan, Ltd., Riga, Lettland) och inkuberades över natten (18 h) i 4°C. Dag två dekanterades plattan och tvättades tre gånger med 300 µL tvättlösning. GAD/IA-2 biotin förbereddes och 100 µL pipetterades till respektive brunn förutom blanken. Plattan täcktes med plastfilm och inkuberades för 1 h på skak i rumstemperatur. Därefter tvättades plattan enligt tidigare beskrivning ovan och 100 µL SA-POD tillsattes i alla brunnar förutom i blank. Plattan inkuberades i 20 min på skak i rumstemperatur, dekanterades och tvättades därefter. 100 µL TMB tillsattes till samtliga brunnar. ELISA plattan inkuberades i 20 min i mörker i rumstemperatur. Plattan tvättades, 100 µL stopplösning tillsattes till alla brunnar och skakades försiktigt i 5 sekunder (på skak). Absorbansen avlästes i ELISA plattläsare (MicroReader™ 4Plus, Hyerion, Inc, USA) vid 405 nm

samt 450 nm (enligt tillverkarens rekommendationer). Analysmetoden för RSR-3screen islet cell autoantibody utfördes enligt samma metod som RSR-2screen islet autoantibody med ett mindre antal justeringar. Skillnaden mellan RSR-2screen och RSR-3screen var att i RSR-3screen kit fanns 5 standard prover (5, 15, 100, 400 och 2000 Units/mL), tre positiva kontroller (GAD65, IA-2A och ZnT8), en referens och ingen enhacer (25 µL av vardera). 25 µL patientprov och kontrollprov tillsattes till de givna brunnarna. Absorbansen avlästes vid 405 nm och 450 nm och för alla resultat under 25 Units/mL användes resultaten från avläsningen vid 450 nm enligt informationen som stod i manualen (RSR, UK).

### **2.3. Statistiska beräkningar**

För de statistiska utvärderingarna användes SPSS (IBM, SPSS Statistics 20). Först togs frekvensen fram för antalet positiva och negativa patienter samt kontrollbarn. Sensitiviteten angav hur många av patienterna som var positiva för markören och specificiteten angav hur många av kontrollerna som saknade markören. Receiver Operating Characteristic (ROC)-kurvor användes för att fastställa cut-off (tröskelvärdet) för positiva och negativa värden och för att utvärdera sensitivitet och specificitet för båda analyserna. Area under the curve (AUC) användes för att jämföra metoderna.

## **3. Resultat**

### **3.1 RSR 2-screen**

Medianvärdet för positiva patienter var 185,3 Units/mL (intervall=3,4-247,9) (Tabell 2). Frekvensen för antal positiva/negativa patient och kontrollprov analyserades statistiskt, resultaten fördelades i positiva och negativa svar. Av totalt 50 patientprov som analyserade med RSR 2-screen var 46 positiva (92%) och 4 negativa (8%) (Tabell 3). Cut-off för ett positiv test bestämdes till  $\geq 2.7$  Units/mL med specificiteten 97.5% ( $P_{97.5}$ ) där sensitivitet uppnådde 92%. ROC-kurva användes för att bestämma separationsförmågan mellan sant och falskt värde. Area under kurva (AUC) bestämdes till 0,985 (confidence interval, CI=0,967-1,000) (Figur 4A). Det utformades en

bedömningstabell för ROC-kurvan (Tabell 4). Standardkurva för RSR-2screen vid våglängden 405 nm och 450 nm visas i Bilaga 3 och 4.

**Tabell 2.** Median, min och max värde för de positiva patientproven i Units/mL.

	<b>RSR-2screen</b>	<b>RSR-3screen</b>
<b>Median (Units/mL)</b>	185,3	1066,9
<b>Minimum (Units/mL)</b>	3,4	32,9
<b>Maximum (Units/mL)</b>	247,9	1229,2

**Tabell 3.** Frekvensen av positiva patienter i RSR-2screen.

	<b>Frekvens (antal)</b>	<b>Procent (%)</b>
<b>Negativ</b>	4	8
<b>Positiv</b>	46	92
<b>Totalt</b>	50	100

**Tabell 4.** Bedömning av ROC-kurvan för RSR-2screen.

<b>Värde för ROC</b>	<b>Bedömning av ROC</b>
0,9-1	Mycket bra
0,8-0,9	Bra
0,7-0,8	Accepterad
0,6-0,7	Dålig
0,5-0,6	Misslyckad

### **3.2. RSR 3-screen**

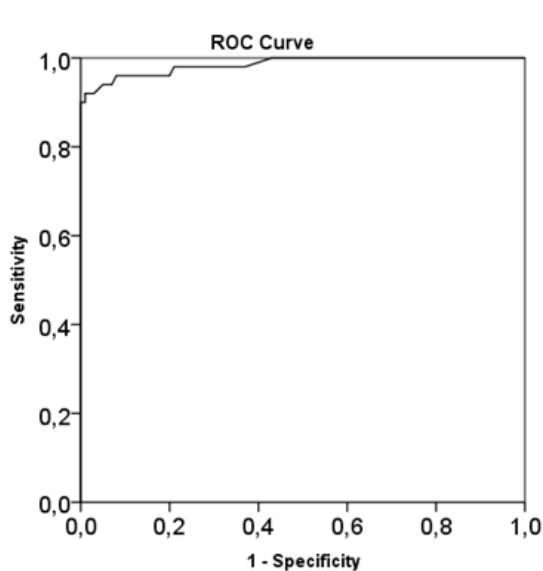
Medianvärdet för positiva patienter var 1066,9 Units/mL (intervall=32,9-1229,2). Frekvensen för antal positiva/negativa patient och kontrollprov analyserades statistiskt, resultaten fördelades i positiva och negativa svar. Av totalt 50 patientprov analyserade med RSR-3screen var 47 positiva (94 %) och 3 negativa (6 %) (Tabell 5). Av totalt 100

kontrollprov analyserade med RSR-3screen var 97 negativa (97 %) och 3 positiva (3 %) (Tabell 6). Standardkurva för RSR-3screen vid våglängden 405 nm och 450 nm visas i Bilaga 5 och 6.

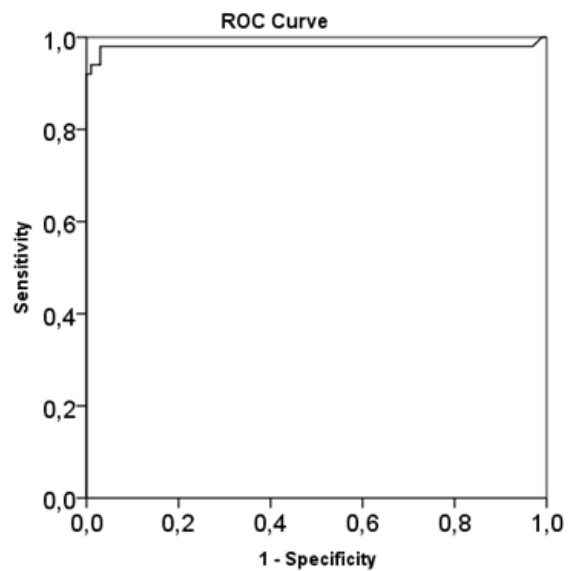
**Tabell 5.** Frekvensen av positiva patienter i RSR-3screen.

	Frekvens (antal)	Procent (%)
<b>Negativ</b>	3	6
<b>Positiv</b>	47	94
<b>Totalt</b>	50	100

Tröskelvärdet för ett positivt test bestämdes till  $\geq 15$  Units/mL med specificiteten 97,5% ( $P_{97.5}$ ) och sensitiviteten uppnådde 94%. ROC-kurva användes och Area under kurva (AUC) bestämdes till 0,985 (CI=0,967-1,000) för RSR-2screen (Figur 4A-Vänster) och 0,979 (CI=0,941-1,000) för RSR-3screen (Figur 4B-Höger).



AUC=98,5 95%CI 96,7-1,00



AUC=97,9 95%CI 94,1-1,00

**Figur 4A och 4B.** ROC-kurva, AUC-värde samt konfidensintervall för RSR-2screen (A-Vänster) och RSR-3screen (B-Höger).

Det framkom avvikande värden för RSR-2screen, 3 av 100 kontroller blev positiva och 1 av 50 patientprover blev negativt. Av totalt 100 kontroll prover analyserade med RSR-3screen var 3 positiva och 97 negativa. Ett patientprov blev positivt för RSR-3screen men inte i RSR-2screen (Tabell 6).

**Tabell 6.** Avvikande värden för kontroller samt en patient (Units/mL) i RSR-2screen och RSR-3screen.

	<b>RSR-2Screen <math>\geq 2,7</math> Units/mL cut-off</b>	<b>RSR-3Screen cut-off <math>\geq 15</math> Units/mL</b>
Kontroll	4,5	19,7
Kontroll	2,7	24,0
Kontroll	7,7	37,8
Patient	2,2	452,1

## 4. Diskussion

Studien utfördes för att jämföra sensitivitet och specificitet mellan RSR-2screen och RSR-3screen. De tydligaste resultaten visar att vid samma specificitet (97,5%) ger RSR-3screen 2% högre sensitivitet. Detta kan bero på att RSR-3screen identifierade en positiv patient mer än vad RSR-2screen gjorde. RSR-3screen identifierar autoantikroppar mot ZnT8 utöver IA-2 och GAD65 vilken kan ha bidragit till att cut-off värdena skiljde sig åt mellan dessa två kiten.

Studien visar ingen statistisk signifikant skillnad mellan fördelningen av antikroppar beroende av kön vilket bekräftas även av Prázný et al. (2005) som inte heller påvisade någon skillnad mellan könen och antikropparnas fördelning. För att uppskatta metodens detektionsgräns för att skilja mellan positiva och negativa värden användes ROC-kurva. AUC för RSR-2screen gav ett värde som var 0,8 % högre än för RSR-3screen vilket inte räknas som en statistiskt signifikant skillnad (Tabell 5). Ett AUC=1 resultat indikerar att analysen uppnår 100 % -ig precision vid identifiering av sjukdom samtidigt som ett AUC=0 resultat visar på att analysen visar att analysen inte identifierar de prediktiva värdena. Analysmetoderna RIA och ELISA har tidigare jämförts för



kombinerad GAD65 och IA-2 autoantikroppsidentifiering. Resultat med RIA för GAD/IA-2 uppnådde sensitiviteten 98 % och specificiteten 64 % medan ELISA uppnådde sensitiviteten 96 % och specificiteten 98 % (Törn et al. 2008). I denna studie gav tre kontroller positivt utslag med båda analyserna, RSR-2screen och RSR-3screen. Eftersom det var samma kontroller som blev positiva är det svårt att sammankoppla orsaken till den mänskliga faktorn. Dessa positiva värden var dock mycket lägre jämfört med patienternas positiva värden. I en tidigare forskningsstudie deltog barn med T1D som följdes upp fram till 13 års ålder och det rapporterades att 64% av barnen utvecklade autoantikroppar innan 2 års ålder och 82% före 3 års ålder. Tidiga autoantikroppar visade sig vara IAA följt av GADA medan IA-2 och ZnT8 autoantikroppar utvecklades närmare sjukdomsdebuten (Rønningen 2015). Enligt Lernmark et al. (2005) bildar 1-2% av den friska populationen IgG antikroppar GAD65, vilket kan förklara varför 3 kontrollprov blev positiva. Eftersom att alla prov kördes i replikat och samma resultat erhöles så kan inte slumpen ha haft någon inverkan på resultaten. Den analysen om ger bäst resultat kan komma att användas i framtiden för att screena barn som är i riskzonen att utveckla T1D men även friska barn kan komma att screenas för att utesluta sjukdom. Eftersom resultaten visade att RSR-3screen identifierade 1 patient mer än RSR-2screen detekterade kan det vara så att RSR-3screen blir mer eftertraktad som analys.

## **5. Slutsats**

RSR-3screen uppnådde högre sensitivitet jämfört med RSR-2screen vid likvärdig specificitet. RSR-3screen är den metod som rekommenderas i första hand för screening i en frisk population och för att detektera individer som visar ökad risk att utveckla T1D.

## **6. Tackord**

Jag vill tacka min huvudhandledare Fariba Vaziri-Sani för all hjälp, stöd, bra och snabb feedback. Jag vill tacka Carina Törn för all hjälp med de statistiska beräkningarna, och så vill jag tacka min laboratorie-handledare på Wallenbergs laboratorium, Kobra

Rahmati för allt stöd kring det laborativa utförandet. Jag vill även tacka alla som jobbar på laboratoriet för att de fått mig att känna mig hemma på ett forskningslaboratorium.

## 7. Referenser

Agardh, D., Berne, C., Östman, J. (2009). *Diabetes*. Liber AB.

Baekkeskov, S., Aanstoot, H.J., Christgau, S., Reetz, A., Solimena, M., Cascalho, M., Folli, F., Richter-Olesen, H. & De Camilli, P. (1990). Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*, 347, ss. 151-156.

Baekkeskov, S, Nielsen, J.H., Marnier, B., Bilde, T., Ludvigsson, J., Lernmark, A. (1982). Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature*, 298, ss.167–169. Bent, A. (2016). *Diabetes typ 1 hos barn*. [www.1177.se](http://www.1177.se)

Bottazzo, G.F., Florin-Christensen, A., Doniach, D. (1974). Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*; 2, ss. 1279–1283.

Bowen, R. (1999). *Insulin Synthesis and Secretion*. [www.vivo.colostate.edu](http://www.vivo.colostate.edu) [2016-12-05]

Carlsson, M. (2014). *Autoantikroppar*. [www.vardriktlinjer.se](http://www.vardriktlinjer.se) [2016-12-14]

Fu, Z., Gilbert, E.R. & Liu, D. (2013). Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Curr Diabetes*, 9(1), ss. 25–53.

Harris, M. I. (1995). *Diabetes in America*. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. <https://www.niddk.nih.gov/about-niddk/strategic-plans-reports/Pages/diabetes-america-2nd-edition.aspx> [2016-12-16]

Hörnblad, A. (2012). *Imaging the Pancreas*. Diss., Umeå University, Umeå: Studentlitteratur.

La Torre, D., Lernmark Å. (2007). *Immunology of  $\beta$ -Cell Destruction*. Lund: Studentlitteratur.

Lan, M. S., Lu, J., Goto, Y., Notkins, A. L. (1994). Molecular cloning and identification of receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *DNA AND CELL BIOLOGY*, 13(5), ss. 505-514.

Lernmark, Å. & Sundkvist, G. (2007). *Orsaker till typ 1-diabetes: Diabetes* Stockholm: Liber AB.

Lunds Universitet. (2016). *Bakgrund och Historikne. TEDDY-studien*. <http://www.med.lu.se/teddy/studien>. [2016-12-28]

Malmquist, J.H. & Nordlund, J.S. (u.å.). *Insulin*. [www.NE.se](http://www.NE.se) [2016-12-09]

Mulder, H. (2008). *Diabetes mellitus - ett metabolt perspektiv på en växande folksjukdom*. Lund: Studentlitteratur.

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.

PRÁZNÝ, M., ŠKRHA, J., LÍMANOVÁ, Z., VANÍČKOVÁ, Z., HILGERTO VÁ, J., PRÁZNÁ, J., JAREŠOVÁ, M & STRÍŽ, I. (2005). Screening for Associated Autoimmunity in Type 1 Diabetes Mellitus With Respect. *Physiol. Res*, 54, ss. 41-48.

Rahmati, K., Lernmark, Å., Becker, C., Foltynzadura, A., Larsson, K., Ivarsson, S., Törn, C. (2008). A comparison of serum and EDTA plasma in the measurement of glutamic acid decarboxylase autoantibodies (GADA) and autoantibodies to islet antigen-2 (IA-2) using the RSR radioimmunoassay (RIA) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits. *Clin Lab*, 54, ss.227-235.

Rønningen, K.S. (2015). Environmental Trigger(s) of Type 1 Diabetes: Why So Difficult to Identify? *Biomed Res International*, 2015, ID 321656, ss.1-10. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/3216562015:10>.

Sjöblad, S. (2008). *Barn och ungdomsdiabetes*. Lund: Studentlitteratur.

Skärstrand, H. (2014). Aspects of autoantibody epitopes in type 1 diabetes. Diss., Lunds Universitet, Lund: Studentlitteratur.

Steck, A K., Vehik, K., Bonifacio, E., Lernmark, Å., Ziegler, A., Hagopian, W.A., She, J., Simell, O., Akolkar, B., Krischer, J., Schatz, D., Rewers, M.J. (2015). Predictors of Progression From the Appearance of Islet Autoantibodies to Early Childhood Diabetes. *Diabetes Care*, 38(5), ss. 808-813.

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.

Verge, C.F., Stenger, D., Bonifacio, E., Colman, P.G., Pilcher, C., Bingley, P.J., Eisenbarth, G.S. (1998). Combined use of autoantibodies (IA-2 autoanitbody, GAD autoantibody, Insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes. *Diabetes*, 47(12), ss. 1857-1866.

Vaziri-Sani, F., Delli, A.J., Elding-Larsson, H., Lindblad, B., Carlsson, A., Forsander, G., Ivarsson, S.A., Ludvigsson, J., Marcus, C., Lernmark, Å. (2011). A novel triple mix radiobindning assay for the thre Znt8 (ZnT8-RWQ) autoantibody variants in children with newly diagnosed diabetes. *Journal of immunological methods*, 371, ss. 25-37.

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.

## Populärvetenskaplig sammanfattning

Typ 1 diabetes (T1D) är den vanligaste typen diabetes bland barn och unga och utgör ca 98% av diabetes hos barn i Sverige. T1D är en sjukdom där kroppen inte kan producera eller tillgodogöra sig glukos. Hos friska personer bildar betaceller i bukspottskörteln hormonet insulin. Bukspottskörteln är ett körtelorgan som utsöndrar enzymer för att bryter ner kolhydrater, proteiner och fett. Bukspottskörteln består av 4 olika celltyper: Beta-celler som producerar insulin och sänker glukos i blodet, alfa-celler som producerar glukagon och höjer glukos i blodet, delta-celler som bildar hormonet somatostin och motverkar utsöndringen av insulin och glukagon, PP-celler som producerar pankreaspolypeptid och motverkar utsöndringen av kolhydrater, protein och fett. Vid T1D förstörs de insulinproducerande betacellerna vilket leder till att insulin inte bildas och kan inte sänka glukosen i blodet. T1D är en autoimmun sjukdom där immunsystemet bildar autoantikroppar mot betaceller i bukspottskörteln, när mer än 80% av betacellerna har förstörts så har T1D utvecklats. Idag känner vi till olika autoantikroppar såsom insulin (IAA), glutaminsyradekarboxylas (GADA), tyrosinfosfatasliknande protein (IA-2) och zinktransportören 8 (ZnT8). Autoantikroppsbestämning är ytterst viktig vid diagnostisering av T1D. I denna studie analyserades serum från 50 patienter och 100 friska barn med hjälp av två olika analyskit. Undersökningen genomfördes för att testa vilken av dessa två-kit har bäst förmåga att detektera friska från sjuka personer och vilken metod som kan separera bäst mellan T1D-positiva- och negativa prov från deltagarna i denna studie. En kit, RSR-2screen, användes för att identifiera autoantikroppar mot IA-2A samt GAD65 och den andra kit, RSR-3screen, användes för att identifiera autoantikroppar mot IA-2A, GAD65 och ZnT8. Studiens resultat visade att båda kiten hade samma förmåga att avslöja friska individer men RSR-3screen hade bättre förmåga att avslöja patienter med T1D. I framtiden skulle RSR-3screen rekommenderas i första hand vid autoantikropps undersökning i en pediatrik population med ökad risk att utveckla T1D.

## 7. Bilagor

### Bilaga 1. Förberedelser och förfarande för ELISA RSR™ 2Screen ICA™

#### ELISA RSR™ 2Screen ICA™

##### Förberedelser

###### Tvättlösning (späds 1:10)

50 ml koncentrerad tvättlösning + 450 ml dH<sub>2</sub>O.

Hållbar en månad i kyl.

###### Streptavidin-peroxidase (späds 1:20)

0,5 mL SA-POD koncentrat + 9,5 mL SA-POD-spädningslösning

Hållbar 4 månader i kyl.

###### GAD65/IA-2

En flaska frystorkat autoantigen-biotin löses upp med 5,5 mL autoantigen-biotin-spädningslösning.

Hållbar i ett dygn – blanda direkt före användning.

##### Förfarande

1. 50 µL kalibrator 1-5
2. 50 µL positiv kontroll GAD65
3. 50 µL positiv kontroll IA-2A
4. 50 µL negativ kontroll
5. 50 µL patientprover  
25 µL enhacer → alla brunnar förutom blank.  
Täck med plastfilm, skaka, inkubera över natt i kyl (4°C).
6. Dekantera, tvätta 3 gånger med 300 µL tvättlösning.
7. 100 µL GAD65/IA-2A screen biotin → alla brunnar förutom blank.
8. Täck med plastfilm, inkubera 1 h på skak i rumstemperatur (RT).
9. Dekantera, tvätta 3 gånger med 300 µL tvättlösning.
10. 100 µL streptavidin-peroxidase (SA-POD) → alla brunnar förutom blank.
11. Täck med plastfilm, inkubera 20 min på skak i rumstemperatur (RT).
12. Dekantera, tvätta 3 gånger med 300 µL tvättlösning.
13. 100 µL TMB → alla brunnar OBS! även blank.
14. Inkubera 20 min i mörker i RT.

15. 100 µL stopplösning skaka 5 sek → alla brunnar.
16. Avläs absorbansen vid 405 nm och sedan vid 450 nm.  
OBS! blank ska bestå av 100 µL TMB substrat och 100 µL stopplösning.

## Bilaga 2. Förberedelser och förfarande för ELISA RSR™ 3Screen ICA™

### ELISA RSR™ 3Screen ICA™

#### Förberedelser

##### Tvättlösning (späds 1:10)

50 ml koncentrerad tvättlösning + 450 ml dH<sub>2</sub>O.

Hållbar en månad i kyl.

##### Streptavidin-peroxidase (späds 1:20)

0,6 mL SA-POD koncentrat + 11,4 mL SA-POD-spädningslösning

Hållbar 4 månader i kyl.

##### 3screen-biotin

En flaska frystorkat 3-autoantigen-biotin löses upp med 5,5 mL 3screen-autoantigen-biotin-spädningslösning.

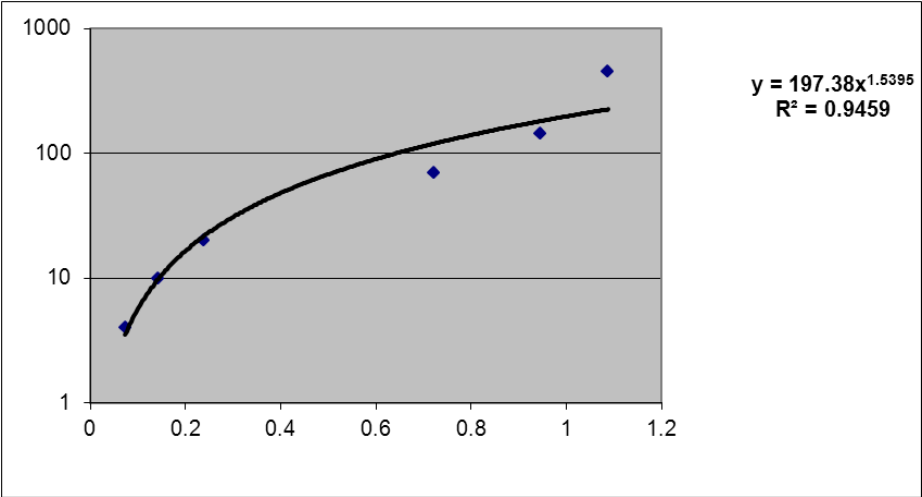
Hållbar i ett dygn – blanda direkt före användning.

#### Förfarande

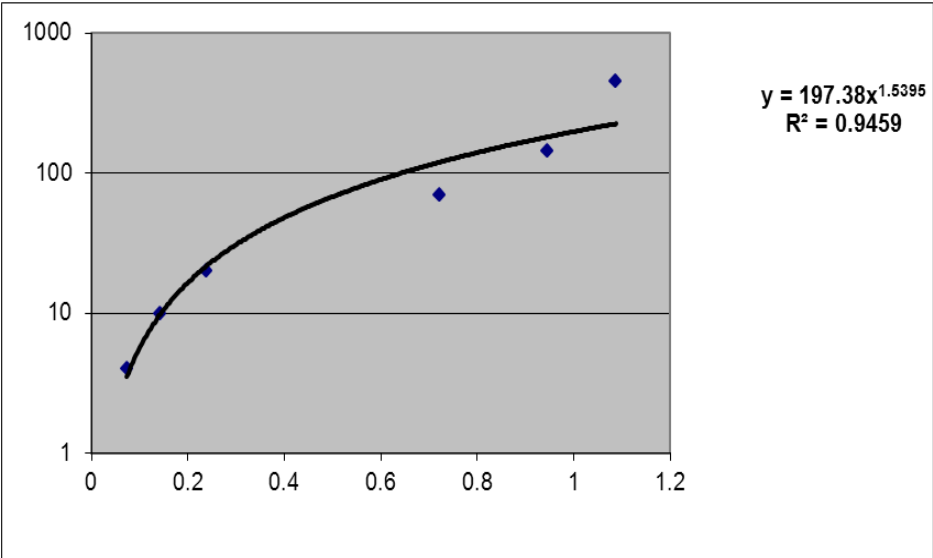
1. 25 µL kalibrator 1-5
2. 25 µL positiv kontroll GAD65
3. 25 µL positiv kontroll IA-2A
4. 25 µL positiv kontroll ZnT8
5. 25 µL negativ kontroll
6. 25 µL patientprover  
25 µL referens preparation  
Täck med plastfilm, skaka, inkubera över natt i kyl (4°C).
7. Dekantera, tvätta 3 gånger med 300 µL tvättlösning.
8. 100 µL 3screen biotin → alla brunnar förutom blank.
9. Täck med plastfilm, inkubera 1 h i kyl (4°C).
10. Dekantera, tvätta 3 gånger med 300 µL tvättlösning.
11. 100 µL streptavidin-peroxidase (SA-POD) → alla brunnar förutom blank.

12. Täck med plastfilm, inkubera 20 min på skak i RT.
13. Dekanterar, tvätta 3 gånger med 300 µL tvättlösning. 14. 100 µL TMB → alla brunnar OBS! även blank. 15. Inkubera 20 min i mörker i RT.
16. 100 µL stopplösning skaka 5 sek → alla brunnar. 17. Avläs absorbansen vid 405 nm och sedan vid 450 nm. OBS! blank ska bestå av 100 µL TMB substrat och 100 µL stopplösning.

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

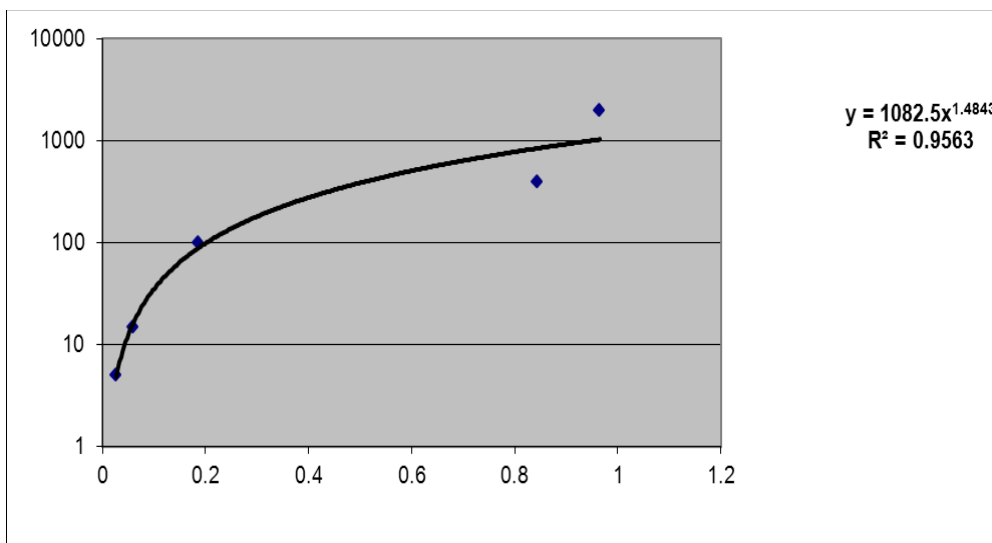


**Bilaga 4.** Standardkurva för RSR-screen vid våglängden 450 nm





**Bilaga 5.** Standardkurva för RSR-3screen vid våglängden 405 nm.



**Bilaga 6.** Standardkurva för RSR-3screen vid våglängden 450 nm.

