

# Autoanticorpi anti-insula pancreatica nel Diabete Mellito di Tipo 1 e nel latent autoimmune diabetes in adults (LADA)

A. Falorni

per il Gruppo di Studio intersocietario SIBioC-SIMeL Diabete mellito

Dipartimento di Medicina Interna, Sezione di Medicina Interna e Scienze Endocrine e Metaboliche, Università di Perugia

## Riassunto

L'autoimmunità insulare è caratterizzata dalla comparsa di autoanticorpi anti-insulari diretti contro l'insulina (IAA), la decarbossilasi dell'acido glutammico (GADA), la proteina tirosin-fosfatasi IA-2 (IA-2A) ed altri autoantigeni. Gli autoanticorpi anti-insula pancreatica non sono patogenetici, ma sono marcatori utili per l'identificazione del processo autoimmune anti-insulare. IAA ed IA-2A sono più frequentemente riscontrati in bambini con diabete di tipo 1 (DMT1), mentre la frequenza dei GADA in pazienti diabetici non è influenzata dall'età all'esordio della malattia. In pazienti con DMT1 ad esordio nell'età adulta, i GADA rappresentano il marcatore immunologico con maggiore sensibilità diagnostica. In pazienti diabetici adulti che non richiedono terapia insulinica per almeno 6 mesi dopo la diagnosi, la presenza di GADA identifica quella forma di diabete nota come "Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA)". In oltre l'80% dei casi, i pazienti LADA sviluppano insulino-dipendenza entro pochi anni dalla diagnosi. Inoltre nel LADA vi è un'umentato rischio di sviluppare altre malattie autoimmuni organo-specifiche. Un alto titolo GADA caratterizza un sottogruppo di pazienti LADA con basso indice di massa corporea (BMI), bassi livelli di peptide C ed un'umentata frequenza di aplotipi HLA di classe II associati allo sviluppo di DMT1. Il dosaggio dei GADA dovrebbe essere eseguito in pazienti diabetici adulti per identificare i casi con autoimmunità latente, ed, in caso di positività, lo screening per altre malattie autoimmuni dovrebbe essere effettuato. Sono attualmente disponibili kit commerciali per la determinazione dei GADA e degli IA-2A. La scelta del kit da utilizzare deve tenere in considerazione i risultati dello specifico dosaggio in workshops internazionali di standardizzazione, come il Diabetes Antibody Standardization Program (DASP).

## Summary

### Anti-Pancreatic islet cell antibodies in type I diabetes mellitus and in latent autoimmune diabetes in adults (LADA)

Islet autoimmunity is made evident by the appearance of islet cell antibodies directed against insulin (IAA), glutamic acid decarboxylase (GADA), protein tyrosine phosphatase IA-2 (IA-2A) and other autoantigens. Islet autoantibodies are not pathogenic, but they are useful markers of the ongoing autoimmune process. IAA and IA-2A are predominantly detected in childhood type 1 diabetes mellitus (T1DM), while frequency of GADA is not affected by age at disease onset. In adult-onset T1DM patients, GADA is the immune marker at higher diagnostic sensitivity. In adult diabetic patients who do not require insulin treatment for at least 6 months after diagnosis, GADA identify the so-called latent autoimmune diabetes in adults (LADA). In over 80% of cases, LADA patients develop insulin dependency within a few years after the diagnosis and have an increased risk for development of other organ-specific autoimmune diseases. High GADA titres identify a subgroup of LADA patients with low body mass index (BMI), low C-peptide levels and increased frequency of T1DM-related HLA class II haplotypes. Therefore, GADA assay should be offered to adult diabetic patients to identify cases with latent autoimmunity, and in case of positivity, screening for other autoimmune diseases should be carried out. Commercial kits for GADA and IA-2A are currently available. The choice of the specific assay should take into consideration the proficiency in international workshops of standardization, such as the Diabetes Antibody Standardization Program (DASP).

*Key-words:* Autoimmunity, ELISA, Glutamic Acid Decarboxylase, Insulin, Islet-cell antibodies, RIA.

## Introduzione

Il diabete mellito di tipo 1 (DMT1) è la conseguenza della distruzione autoimmune delle cellule beta pancreatiche. Numerose evidenze sperimentali e cliniche confermano l'ipotesi che la eliminazione selettiva delle cellule beta pancreatiche sia un processo immuno-mediato. Un processo infiammatorio infiltrativo, noto come insulite, è stato documentato in molti (anche se non in tutti) gli organi di pazienti diabetici deceduti in coincidenza con l'esordio clinico della malattia<sup>1</sup>. Il rischio di sviluppare la malattia è significativamente aumentato in presenza di specifici aplotipi HLA (*Human Leukocyte Antigen*), quali -DRB1\*03-DQA1\*0501-DQB1\*0201 (DR3-DQ2) e DRB1\*04-DQA1\*0301-DQB1\*0302 (DR4-DQ8)<sup>2,3</sup>, e in presenza di specifiche varianti alleliche o aplotipiche di altri geni che modulano la funzione del sistema immunitario<sup>4,5</sup>. La malattia può essere trasferita da individui affetti a soggetti non affetti in conseguenza di un trapianto di midollo osseo<sup>6,7</sup>. Il DMT1 è più frequente in soggetti affetti da altre malattie autoimmuni, quali tiroidite di Hashimoto, morbo di Graves-Basedow, gastrite atrofica o morbo di Addison, rispetto alla popolazione generale. Modelli sperimentali animali sviluppano una forma di malattia diabetica spontanea a patogenesi autoimmune. Tuttavia, la prova definitiva della natura autoimmune del DMT1 è stata fornita dalla dimostrazione dell'esistenza, nel siero di pazienti affetti, di autoanticorpi anti-insula pancreatica (*islet cell antibodies*, ICA), determinati tramite immunofluorescenza indiretta su sezioni criostatiche di pancreas umano<sup>8,9</sup>.

L'identificazione degli ICA sollevò nuovi quesiti, soprattutto legati al ruolo patogenetico degli autoanticorpi nello sviluppo di DMT1. Infatti, gli ICA sono diretti contro antigeni intracellulari (citoplasmatici) e questo è apparentemente in contrapposizione con un loro possibile ruolo patogenetico, poiché si ritiene che gli anticorpi non possano attraversare la barriera posta dalla membrana cellulare. Una considerevole serie di evidenze sperimentali sembra supportare l'ipotesi che gli autoanticorpi presenti in pazienti con DMT1 non abbiano un ruolo patogenetico (Tab. I). La loro produzione potrebbe essere la conseguenza della distruzione cellulo-mediata delle cellule beta e successiva processazione di numerosi autoantigeni con autoreattività T-cellulare, attivazione di linfociti B e conseguente produzione di autoanticorpi. Secondo questa ipotesi, oggi

largamente accettata, lo sviluppo di autoanticorpi sembrerebbe essere un fenomeno che accompagna il processo autoimmune, ma con limitata importanza patogenetica. Tuttavia, la dimostrazione della presenza di autoanticorpi circolanti riveste un importante ruolo clinico e diagnostico, come marcatore del processo autoimmune anti-insulare.

## ICA

Gli ICA, descritti per la prima volta nel 1974, tramite immunofluorescenza indiretta<sup>8,9</sup>, hanno rappresentato il gold standard per la determinazione di anticorpi anti-insula per oltre 15 anni, fino all'inizio degli anni '90. Ciononostante, durante i primi 10 anni dalla scoperta degli ICA, numerosi studi hanno utilizzato metodiche non standardizzate, generando dati spesso contraddittori. Il Primo *Immunology of Diabetes Serum Exchange Workshop* è stato condotto nel 1985<sup>10</sup> ed, in grazie a successivi workshop internazionali, è stato identificato uno standard internazionale (denominato Juvenile Diabetes Foundation, JDF, ICA), che ha permesso l'espressione degli ICA in unità comuni a tutti i laboratori. Questo ha determinato una marcata riduzione della variabilità inter-laboratorio, malgrado la persistenza di numerosi fattori che possono influenzare il risultato finale, quali la soggettività dell'interpretazione della reattività ICA all'immunofluorescenza e la variabilità della reazione ICA in relazione alla qualità del pancreas utilizzato quale substrato<sup>11</sup>.

In bambini ed adolescenti con DMT1, la sensibilità diagnostica degli ICA al momento dell'esordio clinico della malattia è pari a 70-90%<sup>12-15</sup> (Tab. II). Nel DMT1 ad esordio in età adulta, gli ICA hanno invece una sensibilità diagnostica inferiore<sup>12</sup>. La specificità diagnostica degli ICA per DMT1 è approssimativamente pari a 97-98%, dal momento che questi autoanticorpi possono essere presenti nel 2-3% della popolazione sana<sup>14,15</sup>. A causa della bassa prevalenza della malattia nella popolazione generale (0.15-0.30%), il valore predittivo degli ICA per lo sviluppo futuro di DMT1 è relativamente basso (<10%). Anche in familiari di primo grado di pazienti diabetici, che condividono parte del background genetico predisponente lo sviluppo della malattia, il valore predittivo degli ICA non supera il 20-30%. Inoltre, tale valore è fortemente influenzato da numerose variabili, in quanto è maggiore in presenza di alti titoli anticorpali ed in soggetti positivi

**Tabella I.** Prove a sostegno dell'assenza di ruolo patogenetico per gli autoanticorpi anti-insula.

- Circa l'1% della popolazione generale non diabetica è positiva per autoanticorpi anti-insula pancreatica
- Il passaggio transplacentare di autoanticorpi anti-insula non determina la malattia nel neonato
- Esperimenti di plasmaferesi in pazienti diabetici non hanno modificato sostanzialmente il quadro clinico o la storia naturale della malattia
- Il diabete di tipo 1 si può manifestare anche in soggetti con agammaglobulinemia congenita
- Il trattamento di topi Non-Obesi-Diabetici (NOD) con anticorpi anti- $\mu$  per sopprimere la funzione dei linfociti B ha dimostrato che l'attivazione di cloni autoreattivi B è una risposta secondaria e non direttamente responsabile della distruzione  $\beta$ -cellulare

**Tabella II.** Frequenza di autoanticorpi anti-insula pancreatica in soggetti con DMT1 di recente insorgenza, in relazione all'età di esordio clinico della malattia.

|       | 0-9 anni | 10-19 anni | 20-39 anni |
|-------|----------|------------|------------|
| IAA   | 70-80%   | 30-50%     | 20-30%     |
| ICA   | 85-90%   | 80-85%     | 55-65%     |
| GADA  | 65-70%   | 75-80%     | 75-80%     |
| IA-2A | 70-80%   | 60-70%     | 35-45%     |

per altri autoanticorpi anti-insulari, e drammaticamente basso in soggetti positivi solo per ICA a basso titolo<sup>16-18</sup>.

E' noto che il DMT1 si può manifestare in associazione con altre malattie autoimmuni. La frequenza degli ICA è aumentata in pazienti con patologie autoimmuni tiroidee o con sindromi poliendocrine autoimmuni<sup>8,19</sup>, ma la progressione verso il DMT1 clinico è estremamente lenta in soggetti adulti positivi per ICA<sup>20</sup>.

Dopo l'esordio clinico del DMT1, gli ICA sono transitori e scompaiono entro pochi anni, come dimostrato da numerosi studi prospettici<sup>21</sup>. La scomparsa degli ICA potrebbe essere legata alla scomparsa di uno o più autoantigeni, in conseguenza della distruzione delle cellule beta. Tuttavia, la persistenza degli ICA sembra predire un aumentato tasso di perdita della produzione endogena di insulina. Elevati titoli ICA sembrano predire una più rapida perdita della secrezione di C-peptide in pazienti diabetici, mentre non sembrano essere necessariamente associati ad una ridotta funzione beta-cellulare nei soggetti sani<sup>22,23</sup>. Tuttavia, concentrazioni sieriche aumentate di proinsulina sono state documentate in familiari di primo grado di pazienti DMT1, positivi per ICA, a supporto dell'ipotesi di una disfunzione beta cellulare nelle fasi iniziali del processo autoimmune<sup>24</sup>. A causa della complessità dell'analisi all'immunofluorescenza e dell'influenza di molteplici fattori quali soggettività dell'interpretazione del risultato e qualità del substrato pancreatico, gli ICA non rappresentano più da svariati anni il test di riferimento per la determinazione di autoanticorpi nella malattia diabetica. Inoltre, il tipo di metodica non rende possibile l'automazione della procedura e quindi l'analisi di un grande numero di campioni in un limitato periodo di tempo, per cui gli ICA trovano oggi spazio limitato nella routine clinica. L'identificazione di numerosi autoantigeni, bersaglio degli ICA, ha permesso di sviluppare metodiche antigene-specifiche, che trovano oggi applicazione nella routine clinica, nonché in progetti di screening di popolazione allo scopo di identificare soggetti ad alto rischio per lo sviluppo della malattia diabetica. Questi autoanticorpi rappresentano oggi i test di riferimento nella pratica clinica e saranno quindi discussi più in dettaglio.

### Anticorpi anti-decarbossilasi dell'acido glutammico (GADA)

Il primo autoantigene descritto è stata la proteina 64K, rilevata tramite immunoprecipitazione di protei-

ne insulari umane marcate con 35S-metionina con siero umano<sup>25</sup>.

L'autoantigene 64K è stato identificato come l'enzima decarbossilasi dell'acido glutammico (*glutamic acid decarboxylase*, GAD) che catalizza la sintesi di acido gamma-aminobutirrico (GABA), il principale neurotrasmettitore a funzione inibitoria<sup>26</sup>. Sono stati identificati due diversi isoenzimi della GAD: GAD65 e GAD67, rispettivamente di 65<sup>27</sup> e 67 kDa<sup>28,29</sup>. GAD65 e GAD67 sono codificati da due diversi geni localizzati, rispettivamente, sul cromosoma 10<sup>27,29</sup> e sul cromosoma 2<sup>28,29</sup>.

Entrambi gli isoenzimi sono espressi nel sistema nervoso centrale nell'uomo ed in altri animali<sup>30</sup>. Tuttavia, nelle insule umane, solo la GAD65 è espressa ad alti livelli<sup>30</sup>. Anche la localizzazione subcellulare differisce tra GAD65 e GAD67, in quanto la prima è predominantemente idrofobica ed ancorata a vescicole sinapto-simili, mentre la seconda è citoplasmatica e preferenzialmente accumulata in sede perinucleare<sup>31</sup>. La differente localizzazione subcellulare dipende da sequenze segnale localizzate all'estremità NH2-terminale dei due isoenzimi<sup>32</sup>.

La clonazione della GAD65 umana<sup>27</sup> ha permesso lo sviluppo di numerosi dosaggi per la determinazione degli anticorpi anti-GAD65 (GADA) nel siero umano<sup>33-42</sup>. GADA sono dimostrabili nel 70-75% dei pazienti con DMT1 di recente insorgenza e nell'1-2% di soggetti sani di controllo<sup>35-42</sup> (Tab. II). Anticorpi anti-GAD67 sono presenti in circa il 15-20% dei pazienti con DMT1<sup>12,35-37,41,42</sup>, ma rappresentano un sottogruppo di anticorpi anti-GAD65 che cross-reagiscono con ambedue gli isoenzimi<sup>41</sup>. A differenza di altri autoanticorpi anti-insulari, la frequenza dei GADA in pazienti con DMT1 di recente diagnosi non è influenzata dall'età e i GADA rappresentano il marker immunologico a più alta sensibilità diagnostica in pazienti con esordio clinico della malattia diabetica in età adulta<sup>12</sup>.

Malgrado l'alta specificità diagnostica (99%), la frequenza di soggetti GADA-positivi nella popolazione generale è 10 volte superiore alla prevalenza della malattia. Ne consegue che il valore predittivo dei GADA per lo sviluppo futuro di DMT1 (7-8%) non è migliore di quello degli ICA o di altri autoanticorpi<sup>43</sup>. Tuttavia, la simultanea presenza di GADA e di altri autoanticorpi anti-insulari si associa ad un alto rischio per DMT1<sup>43-46</sup>.

Anticorpi monoclonali umani anti-GAD65<sup>47,48</sup> sono stati utilizzati per localizzare gli epitopi riconosciuti dagli autoanticorpi nella regione centrale e COOH-ter-

minale dell'autoantigene. L'uso di molecole chimeriche GAD65/GAD67, costruite per preservare la conformazione tridimensionale dell'autoantigene, ha confermato questa specifica localizzazione degli epitopi associati allo sviluppo di DMT1<sup>49-52</sup>. Più precisamente, un epitopo conformazionale è localizzato nella parte centrale e due epitopi sono localizzati nella parte COOH-terminale dell'enzima, mentre un epitopo lineare minore (meno frequentemente riconosciuto da GADA umani) è localizzato nella regione NH2-terminale. Sebbene l'analisi della sequenza aminoacidica abbia evidenziato un'alta omologia tra un frammento della parte centrale della GAD65 ed un antigene virale (Coxsackie B5)<sup>51</sup>, i GADA umani non sembrano reagire con lo stesso frammento che presenta tale potenziale cross-reattività<sup>53</sup>. Inoltre, mutazioni del sito attivo della GAD65 umana non modificano l'immunoreattività dell'enzima con il siero umano di pazienti diabetici<sup>54</sup>.

GADA possono essere frequentemente identificati in pazienti con altre malattie autoimmuni, quali la sindrome della persona rigida (*stiff-person syndrome*)<sup>55</sup>, la sindrome poliendocrina autoimmune di tipo 1<sup>56,57</sup> o il morbo di Graves-Basedow<sup>58</sup>. Tuttavia, i GADA presenti in pazienti con sindrome della persona rigida o con sindrome poliendocrina autoimmune di tipo I differiscono da quelli presenti in pazienti diabetici, sia per la specificità epitopica, sia per il titolo anticorpale<sup>55,56</sup>.

Il profilo isotipico degli autoanticorpi umani può fornire informazioni sull'equilibrio T-helper 1 (Th1)/T-helper 2 (Th2) delle risposte immunitarie<sup>59</sup>. Si ritiene che lo sviluppo di DMT1 in persone geneticamente predisposte sia il risultato di uno sbilanciamento del rapporto Th1/Th2, con predominanza dell'immunità di tipo Th1. I GADA sono prevalentemente delle IgG1 (ed in misura minore IgG2 ed IgG4) sia in pazienti con DMT1 di recente insorgenza, sia in soggetti prediabetici<sup>60,61</sup>. Sulla base dei sottotipi IgG degli autoanticorpi anti-insulari osservati durante la storia naturale della malattia, è stato ipotizzato che un'iniziale risposta immunitaria di tipo Th2 lasci il posto ad un processo distruttivo di tipo Th1 in soggetti che progrediscono verso la malattia diabetica clinicamente manifesta<sup>60</sup>. In alternativa, si può ipotizzare che il processo autoimmune sia di tipo Th1 fin dall'inizio e che il viraggio verso una risposta di tipo Th2 si verifichi nei soggetti che non progrediscono verso la malattia conclamata<sup>62</sup>.

### Autoanticorpi anti-insulina (IAA)

L'insulina è stato il primo autoantigene insulare caratterizzato a livello molecolare, tramite immunoprecipitazione di insulina radiomarcata con siero di pazienti DMT1 di recente insorgenza, prelevato prima dell'inizio della terapia insulinica<sup>63</sup>.

Autoanticorpi anti-insulina (IAA) possono essere dimostrati nel siero del 50-70% di bambini con DMT1<sup>12,14</sup>. Essi devono essere distinti dagli anticorpi anti-insulina (IA) che compaiono a seguito dell'inizio della terapia insulinica. Pertanto gli IAA possono esse-

re determinati solo in sieri prelevati entro 10-15 giorni dall'inizio della terapia sostitutiva. La frequenza degli IAA in pazienti diabetici è influenzata dall'età all'esordio clinico della malattia, essendo alta in bambini e molto bassa in pazienti adulti<sup>12</sup> (Tab. II). I motivi per cui gli IAA siano frequenti in età infantile-giovanile e più rari in pazienti adulti non sono stati ancora completamente delucidati. È possibile che gli IAA siano un marcatore di rapida distruzione beta cellulare e quindi più frequentemente presenti in pazienti che presentano una rapida progressione dell'insulite distruttiva. A supporto di questa ipotesi vi è l'evidenza sperimentale che gli IAA correlano con il tasso di perdita della funzione beta cellulare<sup>64</sup>. Inoltre, la presenza degli IAA si associa alla presenza dell'allele HLA-DR4<sup>65</sup>, probabilmente per un *linkage disequilibrium* di quest'ultimo con -DQ8<sup>66</sup>. È stato ipotizzato che la velocità di distruzione beta cellulare sia aumentata in pazienti DQ8-positivi, con conseguente preferenziale formazione di IAA.

Durante la storia naturale della malattia, gli IAA sono il marcatore che più spesso compare come primo marker del processo autoimmune anti-insulare<sup>67</sup>. Gli epitopi riconosciuti dagli IAA sono localizzati nelle regioni aminoacidiche B1-B3 e A8-A13 dell'insulina umana<sup>68</sup>, e sono altamente conservati tra i pazienti con DMT1. La specificità diagnostica degli IAA per DMT1 è pari a circa 99%<sup>69</sup> ed il valore predittivo per DMT1 (<10%) non è significativamente diverso da quello di altri autoanticorpi anti-insulari. Questo valore aumenta solo in presenza di altri autoanticorpi anti-insulari.

### Autoanticorpi anti-IA-2 (IA-2A)

Studi di digestione proteolitica degli immunoprecipitati dell'autoantigene 64K portarono alla dimostrazione dell'esistenza di tre distinti frammenti, tra cui il frammento a Mr 50.000 che si dimostrò essere derivato dalla GAD65. D'altra parte, una distinta classe di autoanticorpi risultò essere responsabile della immunoprecipitazione dei frammenti Mr 37.000 e Mr 40.000, derivati da proteine di membrana distinte dalla GAD65<sup>70</sup>. Nello stesso periodo, screening di librerie cDNA insulari con siero di pazienti diabetici portarono all'identificazione di un nuovo autoantigene, denominato *islet cell antigen 512* (ICA512)<sup>71</sup>. Alcune delle proprietà dell'ICA512 risultarono molto simili a quelle degli antigeni 37/40K, specialmente l'esistenza di sequenze compatibili con domini transmembrana e siti di N-glicosilazione, potenzialmente compatibili con la natura idrofobica del precursore dei frammenti proteolitici 37/40K. Successivamente, fu isolato un clone di maggiore lunghezza, denominato IA-2<sup>72</sup>. La sequenza nucleotidica di questo clone dimostrò che ICA512 rappresenta una sequenza parziale di tale antigene, di peso molecolare complessivo pari a 105 KDa<sup>72</sup>. Studi di competizione con IA-2 ed estratti di cellule di insulino-ma di ratto dimostrarono inequivocabilmente che IA-2 è il precursore del frammento 40K<sup>73-75</sup>. Nel tentativo di dimostrare che anche il frammento 37K risulta cor-

relato all'IA-2, una nuova proteina ad alto grado di omologia con IA-2 è stata identificata e denominata IA-2 $\beta$ <sup>76</sup> o *phogrin*<sup>77</sup>. IA-2 $\beta$  è espressa soprattutto in linee b-cellulari.

Le sequenze aminoacidiche di IA-2 e IA-2 $\beta$  sono identiche per oltre l'80% a livello delle regioni di tipo proteina-tirosina fosfatasi (PTP), che contengono gli epitopi degli autoanticorpi<sup>76,78</sup>. Altri epitopi autoanticorpi sono localizzati nella regione juxtamembrana, che mostra un minor grado di identità di sequenza tra IA-2 e IA-2 $\beta$ . Gli autoanticorpi associati allo sviluppo di DMT1 sono prevalentemente diretti contro IA-2, e la costruzione di molecole chimeriche tra IA-2 and IA-2 $\beta$  ha permesso di identificare due principali regioni epitopiche specifiche dell'IA-2 nelle regioni aminoacidiche 611-620 (epitope JM1) e 621-630 (JM2)<sup>79</sup>.

E' interessante notare che sia IA-2 che IA-2 $\beta$  presentano due modificazioni aminoacidiche nella sequenza del dominio PTP, che annullano l'attività enzimatica di tipo fosfatase<sup>80</sup>. In effetti, IA-2 e IA-2 $\beta$  non sembrano essere enzimaticamente attive<sup>72,81</sup>, ed il loro ruolo nelle cellule b non è ancora stato completamente elucidato. La localizzazione intracellulare nei granuli secretori porta ad ipotizzare che IA-2 e IA-2 $\beta$  siano coinvolte nel processo di esocitosi, piuttosto che agire come recettori di superficie e modulatori della crescita cellulare, funzioni tipiche delle proteina-tirosina fosfatasi transmembrana.

Dosaggi radioimmunologici hanno dimostrato che autoanticorpi anti-IA-2 (IA-2A) sono presenti nel siero del 70-80% dei bambini con DMT1 di recente insorgenza. Analogamente agli IAA, anche IA-2A sono meno frequenti in pazienti con esordio di DMT1 in età adulta che in età infantile (Tab. II)<sup>82</sup>, e si associano alla presenza dell'allele HLA-DRB1\*04<sup>83</sup>.

Analogamente a quanto osservato per i GADA, anche gli IA-2A associati allo sviluppo di DMT1 sono prevalentemente IgG1, e meno frequentemente IgG2 ed IgG4.

### Altri autoanticorpi

L'autoantigene p69 (ICA69) fu isolato mediante screening di una libreria cDNA di insule di ratto con il siero di soggetti positivi per ICA<sup>84</sup>. ICA69 ha un peso molecolare di 54.600, ma migra a Mr 69.000 su gel di SDS-poliacrilamide, a causa di modificazioni post-traduzionali. Sebbene sia stato inizialmente riportato che l'80% dei pazienti con DMT1 e il 50% di individui pre-diabetici fosse positivo per anticorpi anti-ICA69<sup>84</sup>, l'interesse per questo marcatore è successivamente sfumato a causa della non riproducibilità di questi risultati in studi successivi<sup>85</sup> e non esiste al momento alcuna applicazione pratica per gli anti-ICA69.

Più recentemente, un altro autoantigene pancreatico beta cellulare è stato clonato e denominato ICA12<sup>86</sup>. Analogamente ad altri autoantigeni finora identificati, la localizzazione di ICA12 è intracellulare. Oltre alle insule pancreatiche, ICA12, come ICA69, è espresso

anche nel tessuto esocrino. ICA12 è codificato dal gene *SOX13*<sup>86</sup>. Studi sulla frequenza degli anticorpi anti-ICA12 indicano che approssimativamente il 10-20% di soggetti con DMT1 di recente insorgenza è positivo per questo marcatore<sup>86-88</sup>. Oltre ad una bassa sensibilità diagnostica, gli anti-ICA12 presentano anche una bassa specificità, in quanto sono presenti in circa il 5% della popolazione generale ed in pazienti con altre malattie autoimmuni. Di conseguenza, questo marcatore non ha applicazione pratica nella diagnosi di DMT1 o nell'identificazione di soggetti a rischio per lo sviluppo della malattia<sup>88</sup>.

Autoanticorpi contro CD38 sono dimostrabili in circa il 4-20% dei pazienti con DMT1 e l'8-19% dei pazienti con diabete di tipo 2 (DMT2)<sup>89-93</sup>. CD38 è un recettore espresso sulla superficie cellulare ed è considerato uno dei mediatori fisiologici della secrezione insulinica. Gli anti-CD38 mostrano un'attività agonistica che media il rilascio di Ca<sup>++</sup> nelle cellule bersaglio<sup>90</sup> e, *in vitro*, il rilascio di insulina da insule umane<sup>89</sup>. La presenza di anti-CD38 in pazienti con DMT2 è più frequente in quei soggetti che presentano altri autoanticorpi anti-insulari, quali soprattutto i GADA<sup>91</sup>. I pazienti positivi per anti-CD38 presentano normale funzione beta cellulare in risposta al carico orale di glucosio (OGTT) e caratteristiche fenotipiche tipiche del DMT2<sup>91</sup>. Il significato dell'autoimmunità anti-CD38 resta da chiarire.

Il più recente autoantigene insulare identificato è il trasportatore dello zinco ZnT8 (Slc30A8)<sup>93</sup>. Anticorpi anti-ZnT8 (ZnTA) sono stati rilevati nel 60-80% di pazienti DMT1 di recente insorgenza, ed in meno del 2% di soggetti sani di controllo<sup>93</sup>. Più precisamente, ZnTA sono stati identificati nel 26% di soggetti diabetici classificati come negativi per autoanticorpi anti-insulari<sup>93</sup>. Studi su ampie casistiche di soggetti diabetici e soggetti sani di controllo sono attualmente in corso per determinare con accuratezza la sensibilità e specificità diagnostica di questo marcatore e la sua potenziale applicabilità alla routine clinica.

### Diabete autoimmune latente dell'adulto (LADA)

Oltre 30 anni or sono, Irvine e colleghi riportarono per la prima volta la presenza di ICA in una frazione di pazienti diabetici diagnosticati come di tipo 2<sup>94</sup>. In quello studio, la presenza degli ICA si associava ad un aumentato rischio di sviluppare fallimento secondario alle sulfoniluree e ad un'aumentata frequenza di altri autoanticorpi organo-specifici, quali anticorpi anti-tiroide. Questa osservazione fu successivamente confermata in studi successivi, condotti in pazienti con diagnosi clinica di DMT2<sup>95,96</sup>. Il diabete autoimmune non sembra quindi essere necessariamente associato in tutti i pazienti ad insulino-dipendenza al momento della diagnosi clinica. Più recentemente, varie denominazioni sono state utilizzate per definire questo sottotipo di diabete mellito caratterizzato da non-insulino-dipendenza al momento della diagnosi clinica e dalla presen-

za di autoanticorpi, fra cui *latent autoimmune diabetes in the adult* (LADA), diabete tipo 2 con autoanticorpi anti-insula, diabete tipo 1 lentamente progressivo, *non-insulin-requiring autoimmune diabetes* (NIRAD) o diabete tipo 1.5. Ci riferiremo a questa particolare forma di diabete utilizzando l'acronimo LADA, in quanto questa denominazione è quella che trova maggiore consenso nella letteratura scientifica.

LADA è definito come una forma di diabete mellito che non richiede terapia insulinica per mantenere un adeguato controllo glico-metabolico per almeno 6 mesi dalla diagnosi clinica, in presenza di autoanticorpi anti-insulari, e più specificamente di GADA<sup>97</sup>.

Nel corso degli ultimi 15 anni, numerosi studi hanno testato la frequenza di GADA in pazienti con una diagnosi clinica di DMT2, al fine di stimare la frequenza e le caratteristiche cliniche del LADA. Nella maggior parte degli studi, GADA sono stati rinvenuti nel 9-12% di pazienti diabetici inizialmente diagnosticati come di tipo 2<sup>98-107</sup>. Tuttavia, la frequenza del LADA nei diversi studi varia da un minimo di 2-5%<sup>108-111</sup> ad un massimo di 20% in diabetici tipo 2<sup>112</sup>.

L'eterogeneità etnica delle popolazioni studiate e la diversa numerosità dei pazienti analizzati nei diversi studi possono in parte spiegare le discrepanze sulla frequenza osservate per i LADA. Tuttavia, la principale variabile è il tipo di popolazione presa in considerazione. La maggior parte degli studi è stata effettuata con soggetti con diagnosi nota di DMT2, in studi condotti su pazienti seguiti da centri diabetologici specializzati. Questi studi, che hanno fornito stime di frequenza del LADA pari a 9-12% dei soggetti con DMT2, tendono inevitabilmente a sovrastimare l'attuale frequenza del fenomeno data la maggiore concentrazione di casi clinicamente più complessi e la minore rappresentanza di pazienti con forme lievi di DMT2 spesso seguiti soltanto dal medico di medicina generale. I risultati di studi di popolazione<sup>108-110</sup>, che includono anche forme lievi di DMT2 e casi non precedentemente noti di malattia, riportano una prevalenza di LADA non superiore al 3-5% nei pazienti diabetici clinicamente classificati come di tipo 2. Tuttavia, la prevalenza stimata del LADA nella popolazione generale è pari approssimativamente a 0.15-0.25%, frequenza non dissimile a quella del tipico DMT1. Ne consegue che la reale frequenza del diabete mellito autoimmune è verosimilmente almeno doppia di quella stimata del classico DMT1.

Nello studio UKPDS 25<sup>101</sup>, oltre il 50% dei pazienti con DMT2 risultati positivi per GADA sono stati convertiti alla terapia insulinica entro 6 anni dalla diagnosi, contro solo il 10% dei pazienti negativi per autoanticorpi anti-insulari. Più specificamente, tra i pazienti con diagnosi di diabete mellito entro i 45 anni di età, oltre il 70% dei soggetti GADA-positivi ha iniziato la terapia insulinica entro 6 anni dalla diagnosi. Nello stesso studio<sup>101</sup>, il valore predittivo dei GADA per futura insulino-dipendenza entro 6 anni di follow-up è variato tra

il 34% in pazienti di età superiore a 55 anni e l'84% in pazienti di età inferiore a 34 anni. La presenza simultanea dei GADA e degli ICA si è associata ad un più alto valore predittivo, soprattutto in soggetti di età superiore a 45 anni.

Nello studio UKPDS 25<sup>101</sup>, la presenza di autoanticorpi anti-insula pancreatica identificava una popolazione di pazienti con indice di massa corporea (BMI) significativamente minore di quello di soggetti anticorpo-negativi di simile età, specialmente nella classe di età 25-34 anni.

Nel Botnia Study<sup>102</sup>, pazienti LADA finlandesi (rappresentanti circa il 9% della popolazione di pazienti con diagnosi di DMT2) risultarono avere caratteristiche fenotipiche leggermente diverse da quelli del classico DMT1 rispetto ai pazienti dell'UKPDS 25. I pazienti finlandesi positivi per GADA avevano un BMI medio di 26, in confronto ad un BMI medio di 27.6 dei pazienti negativi per autoanticorpi, e le concentrazioni basali di C peptide risultarono di 0.46 nmol/l tra i pazienti GADA-positivi e di 0.62 nmol/l tra i pazienti GADA-negativi. D'altra parte, la presenza di GADA identificò una sottopopolazione di pazienti diabetici con valori pressori sistolici e diastolici, rapporto fianchivita e trigliceridemia significativamente inferiori rispetto ai pazienti negativi per autoanticorpi<sup>102</sup>.

Numerosi altri studi hanno confermato l'associazione tra presenza di GADA ed aumentato rischio di sviluppare insulino-dipendenza entro pochi anni, in pazienti con una diagnosi clinica di DMT2. Una caratteristica comune a tutti questi studi è l'eterogeneità di questa forma di diabete. Sebbene la maggior parte dei pazienti LADA progredisca verso l'insulino-dipendenza, circa il 10-30% dei casi non richiede terapia insulinica per numerosi anni, e presenta caratteristiche cliniche molto simili a quelle del DMT2.

Nel LADA Perugia Study, GADA sono stati rinvenuti nel 10.5% dei pazienti (n=811) con diagnosi di DMT2. Solo l'1.4% dei soggetti studiati è risultato positivo per IA-2A, una frequenza non significativamente superiore a quella osservata nei soggetti sani di controllo (e quindi nella popolazione generale) (1-1.5%)<sup>106,107</sup>. Più specificamente, solo lo 0.2% dei pazienti DMT2 è risultato positivo per IA-2A, in assenza di GADA. La sensibilità diagnostica degli IA-2A per LADA è quindi estremamente bassa, e questi autoanticorpi non possono essere proposti nello screening iniziale di pazienti con diagnosi di DMT2. Tuttavia, in un recente studio condotto nell'ambito del progetto multicentrico italiano NIRAD (*Non-Insulin Requiring Autoimmune Diabetes*), l'uso di un frammento dell'IA-2 (aminoacidi 256-760) ha permesso di identificare un maggior numero di soggetti LADA positivi per autoanticorpi, fino al 40.5% dei soggetti GADA-positivi ed al 3.4% dei soggetti diabetici di tipo 2 negativi per GADA<sup>113</sup>. Studi futuri permetteranno di chiarire con certezza se questo frammento potrà sostituire la molecola di IA-2 nella determinazione di autoanticorpi nel-

la routine clinica.

Lo studio NIRAD<sup>111</sup> ha dimostrato che, oltre ad un BMI significativamente più basso, a livelli di C peptide significativamente ridotti ed un aumentato tasso di progressione verso l'insulino-dipendenza, la presenza di GADA si associa ad una circonferenza vita minore, a livelli di trigliceridemia, colesterolemia ed uricemia minori, e ad una ridotta frequenza di casi con sindrome metabolica (Tab. III).

E' interessante notare che sia il LADA Perugia Study<sup>106</sup>, il Botnia Study<sup>102</sup> e lo studio NIRAD<sup>111</sup>, hanno tutti rilevato una correlazione tra il titolo anticorpale GADA ed il rischio di sviluppare insulino-dipendenza. Nel Botnia Study<sup>102</sup>, i soggetti con titolo GADA superiore al terzile maggiore avevano un C peptide basale medio inferiore a 0.3 nmol/l, un BMI alla diagnosi inferiore a 25 ed un'alta frequenza dei genotipi HLA-DQB1\*0201/\*0302 e DQB1\*0302/X. I soggetti con livelli medio-bassi di GADA avevano BMI e concentrazioni di C peptide non statisticamente diversi da quelli dei pazienti DMT2 anticorpo-negativi<sup>102</sup>. Analogamente, nello studio NIRAD<sup>111</sup>, la presenza di alti titoli GADA si associava a BMI inferiore, circonferenza vita minore, emoglobina glicosilata (HbA1c) più alta ed uricemia minore rispetto ai pazienti con titolo medio-basso di autoanticorpi. Inoltre, la frequenza di altri autoanticorpi organo-specifici è significativamente aumentata in pazienti con LADA<sup>107</sup>, a conferma della natura autoimmune della malattia.

L'uso di molecole chimeriche ottenute per sostituzione di regioni della GAD65 umana con omologhe regioni della GAD67, ha permesso, nel LADA Perugia Study, di dimostrare che le regioni epitopiche dei GADA osservate nei pazienti LADA sono simili a quelle riconosciute nei campioni di bambini con DMT1<sup>106</sup>. Sulla base della specificità epitopica i pazienti LADA furono suddivisi in due sottogruppi: soggetti positivi per anticorpi contro la regione COOH-terminale (GAD65-CAb) (82% dei pazienti LADA) e soggetti negativi per GAD65-CAb (e positivi esclusivamente per anticorpi contro la regione centrale - GAD65-MAb) (18% dei pazienti LADA). Solo i pazienti positivi per GAD65-CAb risultarono significativamente diversi dai pazienti GADA-negativi, per quanto riguarda BMI,

percentuale di pazienti in terapia insulinica e concentrazioni basali di C peptide<sup>106</sup>. Inoltre, i pazienti positivi per GAD65-CAb avevano titoli GADA significativamente maggiori rispetto ai soggetti positivi solo per GAD65-MAb<sup>106</sup>.

Al momento, i GADA rappresentano il miglior marcatore per lo screening di pazienti con DMT2 per identificare soggetti con LADA. Il titolo anticorpale, la specificità epitopica e la simultanea presenza di altri autoanticorpi (quali ICA o IA-2A) permette la classificazione dei soggetti LADA in due sottogruppi con diverse caratteristiche cliniche e diverso rischio di progressione verso l'insulino-dipendenza. Probabilmente, i soggetti con bassi titoli GADA, non associati alla presenza di altri autoanticorpi, comprendono anche "falsi positivi", peraltro riscontrabili anche nella popolazione generale, e pertanto con tipico DMT2. Viceversa, alti titoli GADA e/o la concomitante presenza di altri autoanticorpi indicano un attivo processo autoimmune che progredisce verso l'insulino-dipendenza entro mesi o pochi anni.

### Considerazioni generali sull'uso della determinazione di autoanticorpi anti-insulina nella pratica clinica

Malgrado gli autoanticorpi anti-insulari siano più frequentemente presenti in bambini ed adolescenti con classico DMT1, non vi è una precisa indicazione all'analisi di routine del siero di bambini diabetici per la determinazione di autoanticorpi. Infatti, malgrado oltre il 95-96% dei bambini con DMT1 sia positivo per uno o più marcatori autoanticorpali, la coesistenza di iperglicemia, chetoacidosi e segni clinici di insulino-deficienza non pone in genere dubbi sulla diagnosi e sul tipo di terapia da instaurare. L'eventuale assenza di autoanticorpi in un bambino con diagnosi clinica di DMT1 non modifica la diagnosi e soprattutto non modifica il tipo di terapia. Diverso è il caso del DMT1 ad esordio in età adulta (Tab. IV). Nell'adulto, il DMT1 si può manifestare in maniera lentamente progressiva o con quadro clinico non necessariamente conclamato, e solo la determinazione degli autoanticorpi permette in molti casi di discriminare un diabete autoimmune dal DMT2. Pertanto, malgrado l'assenza di autoanti-

**Tabella III.** Caratteristiche cliniche e fenotipiche di più frequente riscontro tra i pazienti LADA.

- 
- Indice di massa corporea (BMI) non elevato (<27 kg/m<sup>2</sup>)
  - Bassi livelli di C peptide (<0.4 nmol/l)
  - Rapida progressione verso chiara insulino-dipendenza (in circa l'80% dei pz <45 anni di età e 50% dei pz. più anziani, entro 5-6 anni dalla diagnosi)
  - Presenza di altri autoanticorpi organo-specifici (anti-tireoperossidasi ed anti-21-idrossilasi)
  - Colesterolemia normale/bassa
  - Trigliceridemia normale/bassa
  - Pressione arteriosa diastolica e sistolica più bassa rispetto ai pazienti con DMT2 GADA-negativi
  - Età più giovanile rispetto ai pazienti con DMT2 GADA-negativi
-

**Tabella IV.** Uso clinico degli autoanticorpi anti-insula pancreatica.

| Popolazione   | Utilità clinica   |
|---|---|
| Soggetti con DMT1 ad esordio in età adulta  | Conferma della natura autoimmune della malattia e quindi della diagnosi clinica                                 |
| Soggetti con diagnosi clinica di DMT2   | Identificazione di pazienti LADA  |
| Pazienti con altre malattie autoimmuni organo-specifiche  | Identificazione di soggetti a rischio per lo sviluppo di DMT1   |
| Donne con diabete gestazionale  | Identificazione di donne con DMT1 latente e con aumentato rischio di sviluppare DMT1 conclamato successivamente |
| Familiari di primo grado di pazienti con DMT1   | Identificazione di soggetti a rischio per lo sviluppo di DMT1   |
| Trial clinici di prevenzione primaria o secondaria (applicazione solo sperimentale)   | Monitoraggio della risposta autoimmunitaria anti-insulare   |
| Trial clinici di immunomodulazione in pazienti con DMT1 di recente insorgenza, finalizzati alla preservazione della residua massa beta-cellulare (applicazione solo sperimentale) | Monitoraggio della risposta autoimmunitaria anti-insulare   |

corpi non possa permettere l'esclusione certa della natura autoimmune della malattia, la loro presenza conferma la diagnosi di DMT1 e permette di avviare le scelte terapeutiche più idonee. Il caso del diabete autoimmune lentamente progressivo noto come LADA è significativo in tal senso, perché solo la determinazione anticorpale permette di riconoscerlo e di porre una diagnosi corretta. La diagnosi differenziale tra LADA e DMT2 ha importanti ripercussioni terapeutiche e di gestione clinica, data la necessità di anticipare la terapia insulinica, la frequente associazione con altre malattie autoimmuni ed il minor rischio di complicanze macrovascolari osservata nei pazienti con LADA. A prescindere dall'importanza dell'analisi anticorpale per la corretta diagnosi del diabete autoimmune dell'adulto (in particolare dei GADA), data la bassa sensibilità diagnostica degli altri marcatori nell'adulto, si pone però il problema delle dimensioni della popolazione da sottoporre ad analisi anticorpale. Per quanto sia scientificamente corretto proporre di effettuare almeno una volta l'analisi GADA a tutti i pazienti con diabete dell'adulto, dato che il LADA si può nascondere anche fra soggetti con caratteristiche tipiche del DMT2, non esistono al momento precise linee guida in tal senso. E' d'altra parte vero che la probabilità di identificare un paziente LADA si riduce drasticamente in presenza di soggetti con obesità franca, segni clinici e biochimici di sindrome metabolica e con forte familiarità per DMT2, per cui nella pratica clinica è forse raccomandabile effettuare l'analisi in una sottopopolazione di soggetti con diagnosi clinica di DMT2. Questa sottopopolazione comprende senz'altro tutti i soggetti con indice di massa corporea normale o solo modestamente aumentata (<30 kg/m<sup>2</sup>), soggetti con altre patologie autoimmuni associate (esempio tiroidite cronica, vitiligine od altre), e soggetti senza chiari segni di sindrome metabolica. La probabilità di identificare LADA è inoltre maggiore per pazienti di età inferiore a 50 anni; nell'anziano, le scelte terapeutiche sono poi spesso fortemente influen-

zate da altre patologie concomitanti (soprattutto cardiache, renali od epatiche) e da considerazioni di costo-beneficio che devono tenere in considerazione anche la qualità della vita e l'autosufficienza del soggetto, che inevitabilmente limitano l'utilità pratica della determinazione anticorpale.

Un'altra importante applicazione pratica dei dosaggi anticorpali è rappresentata dal diabete gestazionale (Tab. IV), nel quale la presenza di autoanticorpi permette di svelare una forma di diabete di tipo 1 latente che si può manifestare inizialmente solo come malattia associata alla gravidanza, ma che successivamente può sfociare in forma conclamata. La presenza di autoanticorpi anti-insula pancreatica identifica in questa patologia donne ad altissimo rischio di presentare un DMT1 in futuro, o un grave scompenso del controllo glicometabolico in occasione di successive gravidanze. E' da ricordare che l'analisi anticorpale in donne in gravidanza non ha lo scopo di stimare il rischio di sviluppo di diabete nel nascituro, in quanto è noto che il rischio per DMT1 è pari a solo a 2-3% nei figli di madre diabetica ed è significativamente minore di quello osservato nei figli di padre diabetico. Inoltre, il passaggio transplacentare di autoanticorpi anti-insula pancreatica non determina alcun danno al neonato e solo una successiva analisi di autoanticorpi circolanti in età pre-scolare o scolare permetterà di stimare il rischio futuro di DMT1 in un figlio di madre diabetica.

Non vi è dubbio che l'analisi autoanticorpale riveste un ruolo centrale, ed al momento irrinunciabile, nell'identificazione di soggetti ad alto rischio per lo sviluppo futuro di DMT1 (Tab. IV), per quanto lo screening di soggetti a rischio per diabete ed eventuali studi di immunomodulazione restano al momento solo pratiche sperimentali da non utilizzare nella pratica clinica al di fuori di trial clinici controllati e randomizzati.

La disponibilità di numerosi dosaggi per autoanticorpi anti-insulari antigene-specifici ha permesso di pianificare strategie accurate per la stima del rischio di

sviluppare DMT1, permettendo così l'identificazione di soggetti da arruolare in studi clinici di prevenzione secondaria. Studi genetici in neonati e trial clinici pilota di prevenzione primaria hanno utilizzato (e stanno utilizzando) la comparsa di GADA, IAA e/o IA-2A come *end-points* del processo autoimmune insulare. Analogamente, l'analisi delle specificità anticorpali e degli isotipi degli autoanticorpi fa parte integrante delle analisi immunologiche condotte in corso di terapie di immunomodulazione in soggetti con DMT1 di recente insorgenza finalizzate alla preservazione della residua massa beta cellulare.

Più specificamente, il numero di differenti autoanticorpi antigene-specifici, piuttosto che non il tipo di autoanticorpo o il suo titolo, correla positivamente con il rischio di sviluppare DMT1 sia in familiari di primo grado di pazienti con DMT1 che nella popolazione generale. Infatti, in familiari di primo grado di pazienti diabetici, il rischio è pari al 20% entro 5 anni, in presenza di uno solo dei tre maggiori marcatori autoanticorpali (IAA, GADA o IA-2A), ma sale al 50% e al 90% in presenza di 2 o di 3 autoanticorpi, rispettivamente<sup>46</sup>.

### Considerazioni tecniche sulla determinazione degli autoanticorpi anti-insula pancreatica

La determinazione degli autoanticorpi anti-insula pancreatica deve tenere in considerazione le caratteristiche specifiche della risposta autoimmune che li genera onde consentire una corretta analisi, mirata a scopi clinici di diagnosi o predizione (Tab. V). Si deve, infatti, ricordare che gli autoanticorpi si sviluppano a seguito di numerosi cicli di riattivazione, con produzione di molecole a sempre maggiore affinità per l'autoantigene. In secondo luogo, studi di *immunoblotting* hanno chiaramente dimostrato che gli autoanticorpi associati allo sviluppo di DMT1 sono dipendenti dalla struttura conformazionale tridimensionale dell'autoantigene e non solo dalla struttura primaria (sequenza aminoacidica) della molecola target. In ultima analisi, il titolo degli autoanticorpi anti-insula è in genere basso e l'isotipo è più spesso IgG1.

Al fine di confrontare l'accuratezza diagnostica delle diverse metodiche per la determinazione di autoanticorpi antigene-specifici (quali GADA, IA-2A ed IAA), sono stati effettuati numerosi workshop di standardiz-

zazione basati sull'uso di sieri di soggetti DMT1 e soggetti sani di controllo scambiati fra diversi laboratori. Nel Combinatorial Autoantibody Workshop, realizzato nel 1996, ed i cui dati sono stati pubblicati nel 1998<sup>14</sup>, sono state analizzate le *performance* di vari laboratori relativamente alle determinazioni GADA, IA-2A ed IAA con metodiche immunoradiometriche (RIA) o immunoenzimatiche (ELISA). Per quanto riguarda le determinazioni GADA ed IA-2A, solo metodiche RIA basate sulla immunoprecipitazione di autoantigeni prodotti tramite trascrizione e traduzione *in vitro* della proteina bersaglio si sono dimostrate sufficientemente accurate in termini di sensibilità e specificità diagnostica. Nello stesso workshop, alcune metodiche ELISA per GADA ed IA-2A hanno dimostrato sensibilità e specificità diagnostiche così basse da renderle di fatto inapplicabili ed inaffidabili<sup>14</sup>. Malgrado sia stata osservata una buona concordanza tra le metodiche RIA per GADA e IA-2A, si è invece osservata una scarsa confrontabilità dei risultati tra le metodiche RIA per gli IAA. Analoghi risultati sono stati osservati nel Diabetes Autoantibody Standardization Program (DASP) del 2000, i cui dati sono stati pubblicati nel 2003<sup>15</sup>, in cui si confermava la superiorità delle metodiche RIA verso le metodiche ELISA per la determinazione dei GADA e degli IA-2A, così come una scarsa concordanza dei risultati delle determinazioni IAA in diversi laboratori. Importanti sviluppi nelle metodiche per la determinazione GADA, ed in misura minore anche IA-2A, si sono osservati nei successivi workshop DASP del 2002, 2003 e 2005<sup>16</sup>. Per la prima volta, nel 2002 metodiche RIA commerciali basate sulla immunoprecipitazione di GAD65 o IA-2A marcate con 125I si sono dimostrate confrontabili con metodiche RIA *in-house* messe a punto da laboratori di ricerca e basate sul principio della trascrizione e traduzione *in vitro* dell'autoantigene marcato con 35S, sviluppato alla metà degli anni '90<sup>37,38,42</sup>. Nel DASP 2002 tuttavia, le metodiche ELISA che parteciparono al workshop riportarono ancora risultati scadenti, con accuratezza diagnostica significativamente minore di quella osservata con metodiche RIA<sup>16</sup>. Anche nel DASP 2003 le metodiche ELISA per IA-2A non dimostrarono un significativo miglioramento della *performance*<sup>16</sup>. Nel 2003, per la prima volta, una metodica ELISA per GADA ottenne risultati di *performance* non solo paragonabili a quelle delle

**Tabella V.** Caratteristiche degli autoanticorpi anti-insula associati allo sviluppo di DMT1.

- 
- Sono ad alta affinità
  - Sono diretti soprattutto contro epitopi conformazionali
  - Sono a titolo non elevato
  - Sono preferenzialmente IgG1
  - Variano al variare della durata di malattia
  - Compaiono prima (anche anni prima) dell'esordio clinico della malattia
  - Sono preferenzialmente diretti contro autoantigeni diversi a seconda dell'età d'esordio clinico della malattia e della rapidità di distruzione delle cellule beta
-

metodiche RIA *in-house* o commerciali, ma addirittura superiori nel caso di un laboratorio<sup>116</sup>. Questi risultati furono successivamente confermati anche nel DASP 2005, in cui anche alcune metodiche ELISA per IA-2A dimostrarono *performance* paragonabili a quelle delle metodiche RIA. La concordanza dei dosaggi RIA per IAA rimane al momento ancora inadeguata, anche se tentativi di standardizzazione, basati sull'uso di metodiche che determinano l'affinità degli IAA, hanno recentemente prodotto risultati promettenti<sup>117</sup>. I recenti risultati del DASP 2003 e DASP 2005, in cui un ELISA commerciale per GADA ed un dosaggio combinato IA-2A/GADA dello stesso produttore hanno dimostrato alti livelli di sensibilità e specificità diagnostiche, aprono la via alla diffusione di metodiche non radioimmunologiche nella routine clinica. Questo sviluppo è di particolare importanza per la sempre più capillare diffusione di questi dosaggi in diversi laboratori e la loro crescente applicazione clinica. Tuttavia, è importante ricordare che, al momento, le *performance* delle metodiche ELISA commerciali sono molto variabili ed, in alcuni casi, ancora ben al di sotto di quelle delle ormai consolidate ed altamente riproducibili metodiche RIA commerciali e non. Il miglioramento della metodica ELISA per GADA si deve unicamente allo specifico disegno di un unico kit ELISA, mentre altre metodiche ELISA per GADA o per IA-2A restano inaffidabili. Ne consegue che l'utilizzazione di metodiche RIA commerciali (pur sempre se validate nei workshop DASP) garantisce un'adeguata accuratezza diagnostica, mentre l'utilizzazione di metodiche ELISA richiede necessariamente un'approfondita analisi della *performance* dello specifico kit nei programmi DASP, e al momento attuale solo un kit commerciale ELISA per GADA (o combinato IA-2A/GADA) garantisce risultati paragonabili a quelli delle metodiche RIA.

Sulla base delle caratteristiche della risposta autoanticorpale si possono quindi formulare alcune considerazioni tecniche generali:

- 1) L'analisi ICA con immunofluorescenza indiretta deve necessariamente essere effettuata utilizzando sezioni criostatiche di pancreas umano di gruppo 0, con almeno due osservatori indipendenti ed utilizzando lo standard JDF ICA per la corretta titolazione.
- 2) Il dosaggio GADA deve utilizzare unicamente GAD65 umana ricombinante come molecola bersaglio.
- 3) Le determinazioni di autoanticorpi antigene-specifiche devono preferibilmente essere effettuate con metodiche atte a selezionare anticorpi ad alta affinità.
- 4) La disponibilità di kit RIA commerciali basati su GAD65 umana o IA-2A umana marcate con <sup>125</sup>I, che garantiscono alta sensibilità e specificità diagnostica, testati in workshop internazionali di validazione (DASP), permette l'utilizzo di routine di queste determinazioni anche a laboratori radioimmunolo-

gici non specializzati e permette quindi la diffusione clinica di questa analisi secondo le considerazioni generali più sopra riportate.

- 5) Sebbene metodiche ELISA siano state proposte per la determinazione di IAA, GADA ed IA-2A, le determinazioni radioimmunologiche continuano al momento a rappresentare il gold standard per l'analisi di autoanticorpi anti-insula pancreatica. Tuttavia, un singolo kit commerciale ELISA per GADA ed un kit ELISA per IA-2A/GADA dello stesso produttore garantiscono adeguata accuratezza diagnostica (paragonabile a quella dei dosaggi RIA).
- 6) Le metodiche ELISA per IA-2A, per quanto nettamente migliorate rispetto al passato presentano ancora un'ampia variabilità di risultati, anche se in alcuni casi hanno dimostrato *performance* paragonabili a quelle dei kit RIA.
- 7) Le metodiche IAA non sono ancora standardizzate, e le metodiche ELISA per IAA devono essere evitate.
- 8) In ogni caso, la scelta del kit commerciale da utilizzare deve innanzitutto tenere presente la *performance* della specifica metodica in programmi internazionali di validazione (quali il DASP).
- 9) Non esiste al momento spazio pratico all'uso di routine di metodiche finalizzate alla caratterizzazione degli isotipi o degli epitopi dei GADA, IAA o IA-2A. Queste metodiche sono al momento limitate a laboratori specializzati a scopo di ricerca.

### Componenti del GdS intersocietario SIBioC-SIMeL Diabete mellito

- *Componenti SIBioC*: Andrea Mosca (Milano) (coordinatore), Graziella Bonetti (Brescia), Anna Caldini (Firenze), Ferruccio Ceriotti (Milano), Franco Ghiara (Genova), Maristella Graziani (Verona), Annunziata Lapolla (Padova), Agostino Ognibene (Firenze), Renata Paleari (Milano), Cristina Pellegrini (Arco di Trento), Alessandro Terreni (Firenze).
- *Componenti SIMeL*: Roberto Testa (Ancona) (coordinatore), Mariarosa Carta (Venezia) (vice-coordinatore), Paolo Andreani (Terni), Antonio Ceriello (Birmingham), Alberto Falorni (Perugia), Grazia Ferrai (Treviso), Daniela Foti (Cosenza), Gabriella Lavallo (Roma), Giuseppe Lippi (Verona), Claudia Lo Cascio (Verona), Italiano Maccaroni (Recanati), Lucia Malloggi (Pisa), Maurizio Marra (Ancona), Massimo Massi Benedetti (Kuwait), Martina Montagnana (Verona), Cristina Peirone (Perugia), Maria Letizia Tomassoni (Terni), Marina Vitillo (Roma).
- *Delegati AMD*: Carlo Giorda (Torino), Augusto Lovagnini Scher (Monza).
- *Delegati SID*: Mauro Cignarelli (Foggia), Paola Fiorretto (Padova).

### Bibliografia

1. Gepts W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile

- diabetes mellitus. *Diabetes* 1965; 14:619-33.
2. Platz P, Jakobsen BK, Morling M, Ryder LP, Svejgaard A, Thomsen M, et al. HLA-D and DR-antigens in genetic analysis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 1981; 21:108-15.
  3. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA DQb gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987; 329:599-604.
  4. Gambelunghe G, Ghaderi M, Cosentino A, Falorni A, Brunetti P, Falorni A, et al. Association of MHC Class I chain-related A (MIC-A) gene polymorphism with type I diabetes. *Diabetologia* 2000; 43:507-14.
  5. Gambelunghe G, Ghaderi M, Tortoioli C, Falorni A, Santeusano F, Brunetti P, et al. Two distinct MICA gene markers discriminate major autoimmune diabetes types. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3754-60.
  6. Lampeter EF, Homberg M, Quabeck K, Schaefer UW, Wernet P, Bertrams J, et al. Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation. *Lancet* 1993; 341:1243-4.
  7. Vialettes B, Maranichi D. Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation. *Lancet* 1993; 342:174.
  8. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974; 2:1279-83.
  9. MacCuish AC, Barnes EW, Irvine WJ, Duncan LJP. Antibodies to pancreatic islet-cells in insulin-dependent diabetics with coexistent autoimmune disease. *Lancet* 1974; 2:1529-31.
  10. Bottazzo GF, Gleichmann H. Workshop report: Immunology an diabetes workshops: report of the first international workshop on the standardisation of cytoplasmic islet cell antibodies. *Diabetologia* 1986; 29:125-6.
  11. Landin-Olsson M. Precision of the islet cell antibody assay depends on the pancreas. *J Clin Lab Anal* 1990; 4:289-94.
  12. Vandewalle CL, Falorni A, Svanholm S, Lernmark Å, Pipeleers DG, Goris FK. High diagnostic sensitivity of glutamate decarboxylase autoantibodies in T1DM with clinical onset between age 20 and 40 years. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:846-51.
  13. Marner B, Agner T, Binder C, Lernmark Å, Nerup J, Mandrup-Poulsen T, et al. Increased reduction in fasting C-peptide is associated with islet cell antibodies in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1985; 28:875-80.
  14. Landin-Olsson M, Palmer JP, Lernmark Å, Blom L, Sundkvist G, Nyström L, et al. Predictive value of islet cell and insulin autoantibodies for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based study of newly diagnosed diabetic and matched control children. *Diabetologia* 1992; 35:1068-73.
  15. Levy-Marchal C, Tichet J, Fajardy I, Gu XF, Dubois F, Czernichow P. Islet cell antibodies in normal French school-children. *Diabetologia* 1992; 35:577-82.
  16. Bonifacio E, Bingley PJ, Shattock M, Dean BM, Dunger D, Gale EA, et al. Quantification of islet cell antibodies and prediction of insulin dependent diabetes. *Lancet* 1990; 335:147-9.
  17. Ziegler AG, Ziegler R, Vardi P, Jackson RA, Soeldner JS, Eisenbarth GS. Life-table analysis of progression to diabetes of anti-insulin autoantibody positive relatives of individuals with type I diabetes. *Diabetes* 1989; 38:1320-5.
  18. Dean BM, Becker F, McNally JM, Tarn AC, Schwartz G, Gale EA, et al. Insulin autoantibodies in the prediabetic period. Correlation with islet cell antibodies and development of diabetes. *Diabetologia* 1986; 29:339-42.
  19. Bosi E, Becker F, Bonifacio E, Wagner R, Collins P, Gale EA, et al. Progression to type 1 diabetes in autoimmune endocrine patients with islet cell antibodies. *Diabetes* 1991; 40:977-84.
  20. Wagner R, Genovese S, Bosi E, Becker F, Bingley PJ, Bonifacio E, et al. Slow metabolic deterioration towards diabetes in islet cell antibody positive patients with autoimmune polyendocrine disease. *Diabetologia* 1994; 37:365-71.
  21. Wallensteen M, Dahlquist G, Persson B, Landin-Olsson M, Lernmark Å, Sundkvist G. Factors influencing the magnitude, duration, and rate of fall of B-cell function in type 1 (insulin-dependent) diabetes children followed for two years from their clinical diagnosis. *Diabetologia* 1988; 31:664-9.
  22. McCulloch DK, Klaff LJ, Kahn SE, Schoenfeld SL, Grenbaum CJ, Mauseth RS, et al. Nonprogression of sub-clinical beta-cell dysfunction among first degree relatives of IDDM patients: 5-yr follow-up of the Seattle family study. *Diabetes* 1990; 39:549-56.
  23. Bärmeier H, McCulloch DK, Neifing JL, Warnock G, Rajotte RV, Palmer JP, et al. Risk for developing type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and the presence of islet 64K antibodies. *Diabetologia* 1991; 34:727-33.
  24. Spinass GA, Snorgaard O, Hartling SG, Oberholzer M, Berger W. Elevated proinsulin levels related to islet cell antibodies in first-degree relatives of IDDM patients. *Diabetes Care* 1992; 15:632-7.
  25. Baekkeskov S, Nielsen JH, Marner B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark Å. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 1982; 298:167-9.
  26. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990; 347:151-6.
  27. Karlsen AE, Hagopian WA, Grubin CE, Dube S, Distche CM, Adler DA, et al. Cloning and primary structure of a human islet isoform of glutamic acid decarboxylase from chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:8337-41.
  28. Michelsen BK, Petersen JS, Boel E, Møldrup A, Dyrberg T, Madsen OD. Cloning, characterization and autoimmune recognition of rat islet glutamic acid decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:8754-8.
  29. Bu D-F, Erlander MG, Hitz BC, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Wagner-McPherson CB, et al. Two human glutamate decarboxylase, 65-kDa and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:2115-9.
  30. Petersen JS, Russel S, Marshall MO, Kofod H, Buschard K, Cambon N, et al. Differential expression of glutamic acid decarboxylase in rat and human islets. *Diabetes* 1993;

- 42:484-95.
31. Solimena M, Aggularo D, Muntzel C, Dirx R, Butler M, De Camilli P, et al. Association of GAD-65, but not of GAD-67, with the Golgi complex of transfected Chinese Hamster Ovary cells mediated by the N-terminal region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:3073-7.
  32. Solimena M, Dirx R, Radzynski M, Mundigl O, De Camilli P. A signal located within amino acids 1-27 of GAD65 is required for its targeting to the Golgi complex region. *J Cell Biology* 1994; 126:331-41.
  33. Rowley MJ, McKay IR, Chen Q, Knowles WJ, Zimmet PZ. Antibodies to glutamic acid decarboxylase discriminate major types of diabetes mellitus. *Diabetes* 1992; 41:548-51.
  34. Hagopian WA, Michelsen B, Karlsen AE, Larsen F, Moody A, Grubin CE, et al. Autoantibodies in insulin-dependent diabetes primarily recognize the Mr 65,000 rather than the Mr 67,000 isoform of glutamic acid decarboxylase. *Diabetes* 1993; 42:631-6.
  35. Velloso LA, Kämpe O, Hallberg A, Christmansson L, Betsholtz C, Karlsson FA. Demonstration of GAD-65 as the main immunogenic isoform of glutamate decarboxylase in type I diabetes and determination of autoantibodies using a radioligand produced by eukaryotic expression. *J Clin Invest* 1993; 91:2084-90.
  36. Seissler J, Amann J, Mauch L, Haubruck H, Wolfahrt S, Bieg S, et al. Prevalence of autoantibodies to the 65- and 67-kDa isoforms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993; 92: 1394-9.
  37. Grubin CE, Daniels T, Toivola B, Landin-Olsson M, Hagopian WA, Li L, et al. A novel radioligand binding assay to determine diagnostic accuracy of isoform-specific glutamic acid decarboxylase antibodies in childhood IDDM. *Diabetologia* 1994; 37:344-50.
  38. Petersen JS, Hejnaes KR, Moody A, Karlsen AE, Marshall MO, Høier-Madsen M, et al. Detection of GAD65 antibodies in diabetes and other autoimmune diseases using a simple radioligand assay. *Diabetes* 1994; 43: 459-67.
  39. Pfützner A, Seydlitz F, Ambrosch A. Serological study for the occurrence of antibodies to human glutamic acid decarboxylase in patients with type I diabetes mellitus. *Diab Nutr Metab* 1994; 7:3-8.
  40. Aanstoot H-J, Sigurdsson E, Jaffe M, Shi Y, Christgau S, Grobbee D, et al. Value of antibodies to GAD65 combined with islet cell cytoplasmic antibodies for predicting IDDM in a childhood population. *Diabetologia* 1994; 37:917-24.
  41. Falorni A, Grubin CE, Takei I, Shimada A, Kasuga A, Maruyama T, et al. Radioimmunoassay detects the frequent occurrence of autoantibodies to the Mr 65,000 isoform of glutamic acid decarboxylase in Japanese insulin-dependent diabetes. *Autoimmunity* 1994; 19: 113-25.
  42. Falorni A, Örtqvist E, Persson B, Lernmark Å. Radioimmunoassays for glutamic acid decarboxylase (GAD65) and GAD65 autoantibodies using 35S or 3H recombinant human ligands. *J Immunol Methods* 1995; 186: 89-99.
  43. Hagopian WA, Sanjeevi CB, Kockum I, Landin-Olsson M, Karlsen AE, Sundkvist G, et al. Glutamate decarboxylase-, insulin- and islet cell- antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children. *J Clin Invest* 1995; 95: 1505-11.
  44. Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Fonte MT, et al. Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. *Diabetes* 1994; 43:1304-10.
  45. Genovese S, Bingley PJ, Bonifacio E, Christie MR, Shattock M, Bonfanti R, et al. Combined analysis of IDDM-related autoantibodies in healthy schoolchildren. *Lancet* 1994; 344:756.
  46. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, et al. Prediction of Type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 1996; 45:926-33.
  47. Richter W, Schi Y, Baekkeskov A. Autoreactive epitopes defined by diabetes-associated human monoclonal antibodies are localized in the middle and C-terminal domains of the smaller form of glutamate decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:2832-6.
  48. Richter W, Seissler J, Wolfahrt S, Scherbaum WA. Human monoclonal islet specific autoantibodies share features of islet cell and 64 kDa antibodies. *Diabetologia* 1993; 36:785-90.
  49. Ujihara N, Daw H, Gianani R, Boel E, Yu L, Powers AC. Identification of glutamic acid decarboxylase autoantibody heterogeneity and epitope regions in type I diabetes. *Diabetes* 1994; 43:968-75.
  50. Daw K, Powers AC. Two distinct glutamic acid decarboxylase auto-antibody specificities in IDDM target different epitopes. *Diabetes* 1995; 44:216-20.
  51. Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992; 89:283-92.
  52. Falorni A, Ackefors M, Carlberg C, Daniels T, Persson B, Robertson J, et al. Diagnostic sensitivity of immunodominant epitopes of glutamic acid decarboxylase (GAD65) autoantibodies in childhood IDDM. *Diabetologia* 1996; 39:1091-8.
  53. Richter W, Mertens T, Schoel B, Muir P, Ritzkowski A, Scherbaum WA, et al. Sequence homology of the disease-associated autoantigen glutamate decarboxylase with Cocksackie B4-2C protein and heat shock protein 60 mediates no molecular mimicry of autoantibodies. *J Exp Med* 1994; 180:721-6.
  54. Hampe CS, Hammerle LP, Falorni A, Robertson J, Lernmark Å. Site-directed mutagenesis of K396R of the 65 kDa glutamic acid decarboxylase active site obliterates enzyme activity but not antibody binding. *FEBS Lett* 2001; 488:185-9.
  55. Kim J, Namchuk M, Bugawan T, Fu Q, Jaffe M, Shi Y, et al. Higher autoantibody levels and recognition of a linear NH2-terminal epitope in the autoantigen GAD65, distinguish stiff-man syndrome from insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1994; 180:595-606.
  56. Velloso LA, Winqvist O, Gustafsson J, Kämpe O, Karlsson FA. Autoantibodies against a novel 51 kDa islet antigen and glutamate decarboxylase isoforms in autoimmune polyendocrine syndrome type I. *Diabetologia* 1994;

- 37:61-9.
57. Tuomi T, Björnses P, Falorni A, Partanen J, Perheentupa J, Lernmark Å, et al. Antibodies to glutamic acid decarboxylase and insulin-dependent diabetes in patients with autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:1488-94.
  58. Hallengren B, Falorni A, Landin-Olsson M, Lernmark Å, Papadopoulos KI, Sundkvist G. Islet cell and glutamic acid decarboxylase antibodies in hyperthyroid patients - at diagnosis and following treatment. *J Intern Med* 1996; 239:63-8.
  59. Toellner KM, Luther SA, Sze DM, Choy RK, Taylor DR, MacLennan IC, et al. T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during the T cell priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching. *J Exp Med* 1998; 187:1193-204.
  60. Petersen JS, Kulmala P, Clausen JT, Knip M, Dyrberg T; Childhood Diabetes in Finland Study Group. Progression to type 1 diabetes is associated with a change in the immunoglobulin isotype profile of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase. *Clin Immunol* 1999; 2: 276-81.
  61. Bonifacio E, Scirpoli M, Kredel K, Fuchtenbusch M, Ziegler AG. Early autoantibody responses in prediabetes are IgG1 dominated and suggest antigen-specific regulation. *J Immunol* 1999; 163:525-32.
  62. Nicholson LB, Kuchroo VK. Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 1996; 8:837-42.
  63. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetes mellitus before insulin treatment. *Science* 1983; 222:1337-9.
  64. Vardi P, Ziegler AG, Matthews JH, Dib S, Keller RJ, Ricker AT, et al. Concentration of insulin autoantibodies at onset of type I diabetes: inverse log-linear correlation with age. *Diabetes Care* 1988; 9:736-9.
  65. Pugliese A, Bugawan R, Moromisato R, Awdeh ZL, Alper CA, Jackson RA, et al. Two subsets of HLA-DQA1 alleles mark phenotypic variation in levels of insulin autoantibodies in first-degree relatives at risk for insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1994; 93:2447-52.
  66. Gorus FK, Vandewalle CL, Dorchy H, Van Crombrugge P, Schuit FC, Pipeleers DG, et al. Influence of age on the associations among insulin autoantibodies, islet cell antibodies, and HLA DQA1\*0301-DQB1\*0302 and siblings of patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 1172-8.
  67. Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes* 1999; 48:460-8.
  68. Castaño L, Ziegler A, Ziegler R, Shoelson S, Eisenbarth GS. Characterization of insulin autoantibodies in relatives of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1993; 42:1202-9.
  69. Eisenbarth GS, Jackson GS, Pugliese A. Insulin autoimmunity: the rate limiting factor of pre-type 1 diabetes. *J Autoimmunity* 1992; 5:241-6.
  70. Christie MR, Hollands JA, Brown TJ, Michelsen BK, Delovitch TL. Detection of pancreatic islet 64,000 Mr autoantigens in insulin-dependent diabetes distinct from glutamate decarboxylase. *J Clin Invest* 1993; 92:240-8.
  71. Rabin DU, Pleasic S, Palmer-Crocker R, Shapiro J. Cloning and expression of IDDM-specific human autoantigens. *Diabetes* 1992; 41:183-6.
  72. Lan MS, Lu J, Goto Y, Notkins AL. Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *DNA Cell Biol* 1994; 13:505-14.
  73. Payton MA, Hawkes CJ, Christie MR. Relationship of the 37,000- and 40,000- M(r) tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512). *J Clin Invest* 1995; 96:1506-11.
  74. Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E. Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA-2 (Islet Cell Antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J Immunol* 1995; 155:5419-26.
  75. Passini N, Larigan JD, Genovese S, Appella E, Sinigaglia F, Rogge L. The 37/40-kilodalton autoantigen in insulin-dependent diabetes is the putative tyrosine phosphatase IA-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 2:9412-6.
  76. Lu J, Li Q, Xie H, Chen ZJ, Borovitskaya AE, Maclaren NK, et al. Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:2307-11.
  77. Wasmeier C, Hutton JC. Molecular cloning of phogrin, a protein tyrosine phosphatase homologue localised to insulin secretory granule membranes. *J Biol Chem* 1996; 271:18161-70.
  78. Lampasona V, Bearzatto M, Genovese S, Bosi E, Ferrari M, Bonifacio E. Autoantibodies in insulin-dependent diabetes recognize distinct cytoplasmic domains of the protein tyrosine phosphatase-like IA-2 autoantigen. *J Immunol* 1996; 157:2707-11.
  79. Bearzatto M, Naserke H, Piquer S, Koczwara K, Lampasona V, Williams A, et al. Two distinctly HLA-associated contiguous linear epitopes uniquely expressed within the islet antigen 2 molecule are major autoantibody epitopes of the diabetes-specific tyrosine phosphatase-like protein autoantigens. *J Immunol* 2002; 168:4202-8.
  80. Stone RL, Dixon JE. Protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 1994; 269:31323-6.
  81. Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoo-Warren H, Oles J, Hicks JM, et al. Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* 1994; 152:3183-8.
  82. Gorus FK, Goubert P, Semakula C, Vandewalle CL, De Schepper J, Scheen A, et al. IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. The Belgian Diabetes Registry. *Diabetologia* 1997; 40:95-9.
  83. Genovese S, Bonfanti R, Bazzigaluppi E, Lampasona V, Benazzi E, Bosi E, et al. Association of IA-2 autoantibodies with HLA DR4 phenotypes in IDDM. *Diabetologia* 1996; 39:1223-6.
  84. Pietropaolo M, Castaño L, Babu S, Buelow R, Kuo YL,

- Martin S, et al. Islet cell autoantigen 69 kD (ICA69). Molecular cloning and characterization of a novel diabetes-associated autoantigen. *J Clin Invest* 1993; 92: 359-71.
85. Lampasona V, Ferrari M, Bosi E, Pastore MR, Bingley PJ, Bonifacio E. Sera from patients with IDDM and healthy individuals have antibodies to ICA69 on western blots but do not immunoprecipitate liquid phase antigen. *J Autoimmun* 1994; 7:665-74.
  86. Kasimiotis H, Myers MA, Argentaro A, Mertin S, Fida S, Ferraro T, et al. Sex-determining region Y-related protein SOX13 is a diabetes autoantigen expressed in pancreatic islets. *Diabetes* 2000; 49:555-61.
  87. Steinbrenner H, Lohmann T, Ostendorf B, Scherbaum WA, Seissler J. Autoantibodies to ICA12 (SOX-13) are not specific for Type I diabetes. *Diabetologia* 2000; 43:1381-4.
  88. Lampasona V, Scirpoli M, Bosi E, Bonifacio E. ICA12 (SOX13) autoantibodies are unlikely to be a useful marker for pre-clinical Type I diabetes. *Diabetologia* 2001; 44:267.
  89. Pupilli C, Giannini S, Marchetti P, Lupi R, Antonelli A, Malavasi F, et al. Autoantibodies to CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) in Caucasian patients with diabetes: effects on insulin release from human islets. *Diabetes* 1999; 48:2309-15.
  90. Mallone R, Ortolan E, Baj G, Funaro A, Giunti S, Lillaz E, et al. Autoantibody response to CD38 in Caucasian patients with type 1 and type 2 diabetes. Immunological and genetic characterization. *Diabetes* 2001; 50:752-62.
  91. Antonelli A, Tuomi T, Nannipieri M, Fallahi P, Nesti C, Okamoto H, et al. Autoimmunity to CD38 and GAD in type I and Type II diabetes: CD38 and HLA genotypes and clinical phenotypes. *Diabetologia* 2002; 45:1298-306.
  92. Mallone R, Ortolan E, Pinach S, Volante M, Zanone MM, Bruno G, et al. Anti-CD38 autoantibodies: characterisation in new-onset type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes of the adult (LADA) and comparison with other islet autoantibodies. *Diabetologia* 2002; 45:1667-77.
  93. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:17040-5.
  94. Irvine WJ, McCallum CJ, Gray RS, Campbell CJ, Duncan LJ, Farquhar JW, et al. Pancreatic islet-cell antibodies in diabetes mellitus correlated with the duration and type of diabetes, coexistent autoimmune disease, and HLA type. *Diabetes* 1977; 26:138-47.
  95. Groop LC, Bottazzo GF, Doniach D. Islet cell antibodies identify latent type I diabetes in patients aged 37-75 years at diagnosis. *Diabetes* 1986; 35:237-41.
  96. Hagopian WA, Karlsen AE, Gottsaeter A, Landin-Olsson M, Grubin CE, Sundkvist G, et al. Quantitative assay using recombinant human islet glutamic acid decarboxylase (GAD65) shows that 64K autoantibody positivity at onset predicts diabetes type. *J Clin Invest* 1993; 91:368-74.
  97. Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay IR, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M, et al. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabetic Med* 1994; 11:299-303.
  98. Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Knowles W, Mackay IR. Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. *Diabetes* 1993; 42:359-62.
  99. Niskanen LK, Tuomi T, Karjalainen J, Groop LC, Uusitupa MI. GAD antibodies in NIDDM. *Diabetes Care* 1995; 18:1557-65.
  100. Kasuga A, Maruyama T, Ozawa Y, Takei I, Falorni A, Lernmark Å, et al. Antibody to the Mr 65,000 isoform of glutamic acid decarboxylase are detected in non-insulin-dependent diabetes in Japanese. *J Autoimmunity* 1996; 9:105-11.
  101. Turner R, Stratton I, Horton V, Manley S, Zimmet P, Mackay IR, et al. UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. *Lancet* 1997; 350:1288-93.
  102. Tuomi T, Carlsson A, Li H, Isomaa B, Miettinen A, Nilsson A, et al. Clinical and genetic characteristics of type 2 diabetes with and without GAD antibodies. *Diabetes* 1999; 48:150-7.
  103. Thai AC, Ng WY, Loke KY, Lee WR, Lui KF, Cheah JS. Anti-GAD antibodies in Chinese patients with youth and adult-onset IDDM and NIDDM. *Diabetologia* 1997; 40:1425-30.
  104. Zhou Z, Ouyang L, Peng J, Yang W, Wang J, Zhu X, et al. Diagnostic role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in latent autoimmune diabetes mellitus in adults. *Chin Med J* 1999; 112:554-7.
  105. Pietropaolo M, Barinas Mitchell E, Pietropaolo SL, Kuller LH, Trucco M. Evidence of islet cell autoimmunity in elderly patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2000; 49:32-8.
  106. Falorni A, Gambelunghe G, Forini F, Kassi G, Cosentino A, Candeloro P, et al. Autoantibody recognition of COOH-terminal epitopes of GAD65 marks the risk for insulin requirement in adult-onset diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:309-16.
  107. Gambelunghe G, Forini F, Laureti S, Murdolo G, Tordolo G, Santeusano F, et al. Increased risk for endocrine autoimmunity in type 2 diabetic patients with GAD65 autoantibodies. *Clin Endocrinol* 2000; 52:565-73.
  108. Bosi EP, Garancini MP, Poggiali F, Bonifacio E, Gallus G. Low prevalence of islet autoimmunity in adult diabetes and low predictive value of islet autoantibodies in the general adult population of northern Italy. *Diabetologia* 1999; 42:840-4.
  109. Davis TM, Zimmet P, Davis WA, Bruce DG, Fida S, Mackay IR. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in diabetic patients from a multi-ethnic Australian community: the Fremantle Diabetes Study. *Diab Med* 2000; 17:667-74.
  110. Soriguer-Escofet F, Esteva I, Rojo-Martinez G, Ruiz de Adana S, Català M, Merelo MJ, et al. Prevalence of latent autoimmune diabetes of adults (LADA) in Southern Spain. *Diabetes Res Clin Pract* 2002; 56:213-20.
  111. Buzzetti R, Di Pietro S, Giaccari A, Petrone A, Locatelli M, Suraci C, et al. High titer of autoantibodies to GAD identifies a specific phenotype of adult-onset autoimmune diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30:932-8.
  112. Schiel R, Muller UA. GAD autoantibodies in a selection-

- free population of insulin-treated diabetic patients: indicator of a high prevalence of LADA? *Diabetes Res Clin Pract* 2000; 49:33-40.
113. Tiberti C, Giordano C, Locatelli M, Bosi E, Bottazzo GF, Buzzetti R, et al. Identification of tyrosine phosphatase 2<sub>(256-760)</sub> construct as a new, highly sensitive marker for detection of islet autoimmunity in type 2 diabetic patients (The NIRAD Study). *Diabetes* 2008; 57:1276-83.
  114. Verge CF, Stenger D, Bonifacio E, Colman PG, Pilcher C, Bingley PJ, et al. Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, Insulin autoantibody, Cytoplasmic Islet Cell Antibodies) in type 1 diabetes. *Diabetes* 1998; 47:1857-66.
  115. Bingley PJ, Bonifacio E, Mueller PW. Diabetes Antibody Standardization Program: First Assay Proficiency evaluation. *Diabetes* 2003; 52:1128-36.
  116. Törn C, Mueller PW, Schlosser M, Bonifacio E, Bingley PJ; Participating Laboratories. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. *Diabetologia* 2008; 51:846-52.
  117. Achenbach P, Schlosser M, Williams AJ, Yu L, Mueller PW, Bingley PJ, et al. Combined testing of antibody titer and affinity improves insulin autoantibody measurement: Diabetes Antibody Standardization Program. *Clin Immunol* 2007; 122:85-90.