

Slutrapport Agria och SKK:s forskningsfond för forskningsåren 2010 och 2011

Jag hade glädjen att få anslag av Agrias och SKK:s forskningsfond under åren 2010-2012. På grund av föräldraledighet har tidsplanen förskjutits cirka 8 månader. Jag vill här lämna min ekonomiska redogörelse och slutrapport för forskningsåren 2010 och 2011. De två återstående projekten (IGF-I hos katt med leversjukdom och IGF-I hos katt med diabetes mellitus) kommer att redovisas i slutrapporten för forskningsåret 2012.

Utvärdering av ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) specifik för kattinsulin (slutrapport forskningsåret 2010)

Syftet med studie var att utvärdera en ny analysmetod specifik för kattinsulin, utvärdera hållbarheten hos kattinsulin och ta fram referensvärden.

Mercodias ELISA, som är optimerad för att mäta kattinsulin, var lätt att hantera och kan användas för att mäta insulin i serum från katt. Inom- och mellankörningsvariationen varierade beroende på provets koncentration och var det sattes på plattan. Total variationskoefficient låg mellan 10 och 20% vilket är ett acceptabelt resultat för en immunologisk analysmetod av den här typen.

Vi fann signifikanta skillnader beroende var på ELISA-plattan som provet applicerats (kolumneffekt). Även om det var en signifikant skillnad var variationen så liten att den sannolikt inte påverkar den kliniska bedömningen av en patient. Vid forskningsprov måste man dock vara medveten om denna variation när man planerar hur proven skall sättas på plattan. Om man inte tänker på hur proven pipetteras på plattan kan man få felaktiga signifikanta resultat i studier. Om analysmetoden används för att beräkna referensvärden bör största möjliga variation eftersträvas vilket innebär att prov bör sättas på olika plattor och på olika positioner för att få en verklighetstrogen spridning. Om man istället vill undersöka koncentration av insulin hos exempelvis katter före och efter en måltid bör prov från samma katt sättas på samma platta i närheten av varandra. Detta för att minska variationen orsakad av analysmetoden. Vi har med dessa resultat visat hur viktigt det är att utvärdera plattvariationen när man utvärderar en ELISA och vi anser att detta alltid bör ingå i en validering av denna typ av analysmetod.

Våra resultat visar vidare att serumprover kan förvaras 24 timmar i 20°C och 4 dagar i 2-8°C utan att få signifikant skillnad i insulinkoncentration. Kattserum går att frysa och tina minst fyra gånger och kan förvaras i -80°C i minst 15 månader utan påverkan av insulinkoncentrationen.

I en studie från Japan tillsatte forskare en lösning med rent kattinsulin till kattserum från friska katter. I det rena kattserumet kunde deras ELISA mäta insulin men när de tillsatte sitt uppenade kattinsulin till proverna fick de falskt låga nivåer. Deras konklusion var att katter har antikroppar mot insulin som kan störa vid analys. Detta har orsakat många diskussioner bland forskare som studerar kattdiabetes. Vi har upprepat deras experiment och tillsatt uppenat kattinsulin och får tillbaka förväntade värden. Vår slutsats är att antingen störs inte Mercodias ELISA av eventuella anti-insulin antikroppar eller så har inte de svenska katter vi studerade dessa antikroppar.

Manuskript accepterat för publicering i Journal of Veterinary Clinical Pathology. En kopia av artikeln kommer att skickas till er när den är publicerad.

Validering av analysmetod för IGF-I hos hund (slutrapport för forskningsåret 2010 och 2011):

Hos hund analyseras insulin-like growth factor I (IGF-I) framför allt vid utredning av dvärgväxt och akromegali (onormalt stor tillväxt på grund av för hög insöndring av tillväxthormon). Tillväxthormon hos hund analyseras idag inte vid något kommersiellt laboratorium och utsöndringen är pulsartad varför man ofta väljer att analysera IGF-I vid diagnos av dessa sjukdomar. IGF-I är i blodet bundet till bindarproteiner som stör vid analys. Studier har visat att dessa bindarproteiner kan ge både falskt låga och falskt höga värden beroende på vilken analys som används. För att undvika att bindarproteinerna stör i analysen har man inom veterinärmedicinen framför allt använt sig av en speciell teknik där man avlägsnar proteinerna med alkohol under sura förhållanden (acid-ethanol extraction). Studier på människa, gris, får och råttor har visat att denna extraktionsmetod inte alltid får bort alla bindarproteiner vilka då gör att vi kan få falska provsvar på patienterna. En nyare metod har utvecklats på humansidan där man använder sig av IGF-II som binder upp bindarproteinerna och gör att de inte stör i analysen. Denna metod är inte validerad för hund. För att kunna gå vidare och mäta IGF-I hos hund har vi för dessa djurslag validerat en ELISA för att mäta humant IGF-I som bygger på den nya metoden.

Inomvariationen fastställdes genom att analysera serumprover med låg, medelhög och hög koncentration av IGF-I i 16-20 replikat. Mellanvariationen beräknades genom att analysera samma prov under 6 dagar. För att avgöra interferens av bindarproteiner tillsatte vi IGF-I bindarproteiner till en koncentration av 8 mg/L och 30 mg/L. För att utvärdera linjäriteten späddes prover ner till 10% av ursprunglig koncentration. Vi tillsatte även rekombinant humant IGF-I till serumprover. Plattvariationen utvärderades genom att analysera samma kalibrator i alla brunnar.

Resultaten visade en låg inom- och mellankörningskoncentration med en variationskoefficient under 10 %. Analysmetoden var linjär och gav tillbaka 95-113% av förväntade värden. Addition av IGF-I gav tillbaka 103 % av förväntade värden. Tillsats av bindarproteiner till koncentrationen 8 mg/L gav ingen interferens. När 30 mg/L tillsattes sågs falskt låga värden. Koncentrationen 30 mg/L är dock mycket över dem som ses fysiologiskt. På humansidan anses tillsats av 5 mg/L vara hög koncentration och har använts vid validering av analysmetod för IGF-I på människa. Exogent insulin (Caninsulin) och porcint insulin korsreagerade inte i analysmetoden. Det fanns en signifikant variation över plattan men när proverna pipetterades i duplikat över två kolumner var inte denna variation signifikant. Sammanfattningsvis så visar våra resultat att metoden fungerade bra för att analysera IGF-I hos hund.

Resultaten presenterades via ett abstract och muntlig presentation vid European Congress of Veterinary Clinical Pathology (ECVCP) i Dublin under september 2011. Detta abstract har publicerats i Journal of Veterinary Clinical Pathology (2011, vol. 40, Issue 4, p. 567-594). Resultaten kommer även att publiceras som en del av manuskriptet för studien om IGF-I hos tikar av rasen jämthund provtagna under efterlöpsperioden (se nedan). Valideringen av analysmetoden för djurslaget katt kommer att skrivas in i manuskriptet till studien "IGF-I hos katt med diabetes mellitus" och rapporteras för forskningsåret 2012.

Mätning av IGF-1 hos hund korrelerat till tillväxthormon och C-peptid hos tikar av högriskras för utveckling av progesteroninducerad diabetes mellitus (slutrapport för forskningsåret 2011).

Hos hund ses akromegali nästan uteslutande hos tikar efter löp och beror på juvervävnadens produktion av hormoner som svar på progesteronstimulering. Diagnosen brukar baseras på ett högt IGF-I-värde tillsammans med kliniska symptom. En del hundar med akromegali utvecklar också diabetes eftersom tillväxthormon (GH) gör att kroppen inte svarar bra på insulin. Jämthundar är en ras predisponerad för att utveckla diabetes efter löp och vi ville undersöka nivåerna av IGF-I hos tikar av denna ras för att se om det fanns ett samband mellan IGF-I och vilka sjukdomar tikarna utvecklade. Ett annat syfte var att studera korrelation mellan IGF-I och andra variabler såsom ålder, hull, vikt, C-peptid (mäter insulinproduktionen hos bukspottskörteln) och GH. Detta är studerat hos människa men inte hos hund. Finns tydliga samband mellan dessa faktorer kan det vara viktigt att ta det i beaktande vid diagnos av akromegali och vid bestämning av referensvärden.

Ägare till jämthundstikar ombads ta sin hund till veterinär 2-8 veckor efter löp. Ett blodprov togs i samband med en standardiserad veterinärundersökning och enkätfrågor till ägaren och skickades till Universitetsdjursjukhuset SLU. Totalt inkluderades 122 älghundar i studien. Proverna analyserades på SLU och Universitetsdjursjukhuset i Utrecht, Nederländerna. Efter 2 år gjordes en uppföljande enkätstudie där djurägarna fick svara på frågor om sina hundar. Enkätstudien gav en mycket hög svarsfrekvens på 90 %.

Vår studie visade ett positivt samband mellan ålder och IGF-I. I en nyligen publicerad studie hos hund och i tidigare studier hos människa har man sett negativa samband. Vid analys av IGF-I är det viktigt att ta hänsyn till tikarnas löpstatus vilket inte gjorts i tidigare studier. Det finns beskrivet att äldre tikar kan utveckla symptom på akromegali efter upprepade löpcykler men vad vi vet finns det inte tidigare publicerade resultat där man visar positivt samband mellan IGF-I och ålder under efterlöpsperioden. IGF-I var signifikant associerat med C-peptid och denna association var delvis oberoende av GH. På humansidan diskuterar man om insulinproduktion i bukspottskörteln krävs för normal syntes av IGF-I från levern. Vår studie tyder på att det finns en tydlig koppling mellan dessa bägge hormoner även hos hund. Vår statistiska modell förklarar 55 % av variationen av IGF-I hos jämthundarna. Detta är mycket hög förklaringsnivå för att vara biologiska data.

Tikar med nybildningar i juvren hade högre GH och IGF-I än friska tikar. Tidigare studier har visat olika resultat när man analyserat GH hos tikar med juvertumörer. Högt GH och IGF-I kunde dock inte förutsäga vilka tikar som utvecklade juvertumörer eller pyometra. Endast en hund av de som ingick i studien (två hundar med diabetes exkluderades på grund av inklusion och exklusionskriterier) utvecklade diabetes vilket gjorde att det var för litet statistiskt underlag för att dra några slutsatser angående den sjukdomen.

Manuskript är under bearbetning och kommer att skickas in till tidskrift under 2012.

Ekonomisk redogörelse forskningsåret 2010

Erhållit 100 000:-

Resor inkl. kongress	10 388:-
Laboratoriematerial och utrustning	67417:-
Frakt (inkl. frakt av laborationsmaterial)	4477:-
Provtagning	17719:-
<hr/>	
Totalt	100 001:-

Ekonomisk redogörelse forskningsåret 2011

Erhållit 100 000:-

Laboratoriematerial och utrustning	87 111:-
Frakt (inkl. frakt av laborationsmaterial)	1254:-
Provtagning	11635:-
<hr/>	
Totalt	100 000:-

Ett stort tack för de erhållna medlen vilka haft stor betydelse för detta doktorandprojekt.

Uppsala 2012-06-25

Med vänlig hälsning



Emma Strage

Leg. Veterinär, doktorand

Härmed intygas att redovisningen är korrekt



Mikael Rosenius

Institutionsekonom