

G.J. Vaandrager
J.L. Molenaar
G.J. Bruining
A.D. Plantinga
E.J. Ruitenber

ONDERZOEK NAAR EEN VERBAND TUSSEN
BOFVACCINATIE EN BOFINFECTIE, EN DE VORMING VAN
ANTISTOFFEN TEGEN BETACELLEN VAN
HET PANCREAS (ICA)

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR PRAEVENTIEVE GEZONDHEIDSZORG/TNO
Leiden
Januari, 1987

INHOUD

blz.

VOORWOORD.	I
1. HET DOEL VAN HET ONDERZOEK.	1
1.1 Inleiding.	1
1.2 Aetiologie en pathogenese van insuline-afhankelijk- ke diabetes.	1
1.3 Bofvirus en de vorming van ICA	3
1.4 Vraagstellingen.	6
2. METHODE EN UITVOERING	7
2.1 Bepalingsmethoden.	7
2.2 Uitvoering en resultaten	9
3. BESPREKING.	12
4. SAMENVATTING.	15
LITERATUUR	17
BIJLAGEN	19
- "Letter to the editor" van Diabetologia	
- "Response from the authors"	

Afkortingen

IDDM	=	insulin-dependent diabetes mellitus
ICA	=	islet cell antibodies
ICCA	=	islet cell cytoplasmatic antibodies
CF-ICCA	=	complement-fixing islet cell cytoplasmatic antibodies
ICSA	=	islet cell surface antibodies
GCA	=	glucagon cell antibodies
IAA	=	insulin-(auto)antibodies

VOORWOORD

Het onderzoek naar de oorzaken van diabetes bij jeugdigen raakte de laatste jaren in een zodanige stroomversnelling dat primaire preventie in zicht lijkt te komen. Veel is echter nog onbekend. Zo is niet duidelijk wat de oorzaak is van de grote verschillen in de incidentie van juveniele diabetes tussen verschillende westelijke landen. Evenmin is bekend wat de oorzaak (oorzaken) zou(den) kunnen zijn van de toename van de incidentie die in verscheidene westelijke landen wordt gevonden. Het Nederlandse incidentieonderzoek dat vanuit het NIPG in 1981-1983 werd verricht leverde voor beide onbekenden bouwstenen op.

De oorzaak van diabetes-type 1 wordt thans vooral gezocht in het immunologische proces in de insuline-producerende betacellen in de alvleesklier dat, bij bepaalde predispositie, kan worden uitgelokt door factoren uit de omgeving. Met name zouden dat virale infecties zijn; bofinfectie wordt daarbij vaak vermeld. Ook vaccinatie tegen bof, actueel door het advies van de Gezondheidsraad in 1984 om deze inenting op te nemen in het Rijksvaccinatieprogramma, wordt als mogelijke 'trigger' van diabetes genoemd.

Reeds geruime tijd voor de aandoening klinisch manifest wordt zijn bij jeugdigen met diabetes antistoffen tegen de betacellen aan te tonen. Het onderzoek waarvan in dit rapport verslag wordt gedaan, was speciaal gericht op deze 'markers', zowel in serum van bofpatiënten als van tegen bof gevaccineerden. Vaandrager legde hiermee een verbinding met het eveneens onder zijn ressort vallende vaccinatieonderzoek dat in de sector Jeugd van het NIPG in samenwerking met het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne (RIVM) wordt verricht (medeauteurs dr. Plantinga en Prof. Ruitenbergh). Internationale contacten waren daarbij van belang: Vaandrager en medeauteur Bruining zijn reeds verschei-

dene jaren lid van de International Study Group of Diabetes in children and adolescents.

Het leeuwendeel van het onderzoek bestaat uit de moeilijke immunologische bepalingen die, op internationaal getoetste wijze, werden bepaald door dr. J.L. Molenaar op de afdeling immunopathologie van de Stichting Samenwerkende Delftse Ziekenhuizen. Van bofpatiënten werden serummonsters verkregen in samenwerking met het RIVM en met de GGD te Rotterdam (hoofd van de afd. Virologie tot eind 1985 dr. G.J.P. Schaap). Voor het vaccinatiedeel van het onderzoek werd het veldonderzoek verricht op consultatiebureaus in Aalsmeer en Uithoorn. Alle genoemde instanties danken wij hierbij zeer.

In het bijzonder zijn wij dank verschuldigd aan het Praeventiefonds, dat aan dit onderzoek een financiële bijdrage heeft verleend.

Dr. A. Dijkstra,
onderdirecteur.

1. HET DOEL VAN HET ONDERZOEK

1.1 Inleiding

Als uitwendige factoren welke bij de pathogenese van insuline-afhankelijke diabetes (IDDM) bij jeugdigen een rol spelen, worden vooral virale infecties vermeld, waaronder zeer frequent bofinfectie¹⁾. Als mogelijke verklaring voor een toeneming van de incidentie van IDDM in westelijke landen - in Nederland vormt de stijging van de prevalentie bij gekeurden voor de dienstplicht een argument daarvoor²⁾ - wordt wel een verband geopperd met de massavaccinatie met levend virus³⁾. Gezien het opnemen van bofvaccinatie in het Rijksvaccinatieprogramma (per 1.1.1987) werd onderzoek naar een mogelijke diabetogene werking van bofvaccinatie meer van belang geacht.

Onderzoek werd verricht bij een aantal jeugdigen, voor en na bofvaccinatie, naar het optreden van antistoffen tegen betacellen van het pancreas (ICA): deze laatste vormen een goede predictie voor IDDM⁴⁾. Onderzoek in dit opzicht is ons uit de literatuur niet bekend.

Voorts werd de mate van ICA-vorming na bofinfectie bepaald; hiervan zijn in de literatuur enkele onderzoeken bekend, met tegenstrijdige bevindingen⁵⁾⁶⁾⁷⁾.

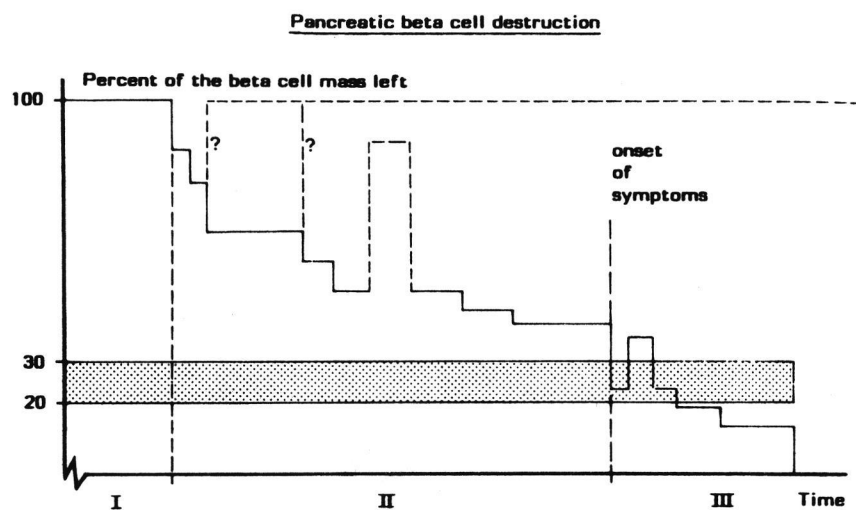
1.2 Aetiologie en pathogenese van insuline-afhankelijke diabetes

Diabetes mellitus bij jeugdigen is een ernstige ziekte, vooral door de complicaties op langere termijn. Het betreft als regel insuline-afhankelijke diabetes (type 1; IDDM). Er is hierbij een aantasting van de insuline-producerende betacellen in de eiland-

jes van Langerhans in de alvleesklier. Indien meer dan 70-80% van de betacelfunctie is uitgevallen treedt klinisch-manifeste diabetes op.

Vooraf de laatste jaren ontstond meer inzicht in de aetiologie en de pathogenese. Naast erfelijke aanleg en autoimmunitet blijken uitwendige factoren bij het ontstaan van de ziekte een belangrijke rol te spelen. Dit werd vooral duidelijk uit onderzoek van identieke tweelingen, waarbij minder dan de helft van degenen waarvan er één voor het 40e jaar diabetes kreeg, concordant bleek⁸⁾.

Een autoimmuunproces in de pathogenese blijkt onder meer uit de aanwezigheid van antistoffen tegen betacellen (ICA) bij meer dan 2/3 van alle jongeren met recente diabetes; in de totale populatie jeugdigen komt ICA in minder dan 1% voor⁹⁾. Voorts treedt reeds geruime tijd (soms jaren) vóór het optreden van diabetes ICA-vorming op¹⁰⁾. Het schema volgens Bruining in figuur 1 verduidelijkt dit destructieproces in de loop van de tijd¹¹⁾.



Figuur 1. Schematische voorstelling van de destructie van betacellen bij IDDM naar Bruining (1984)

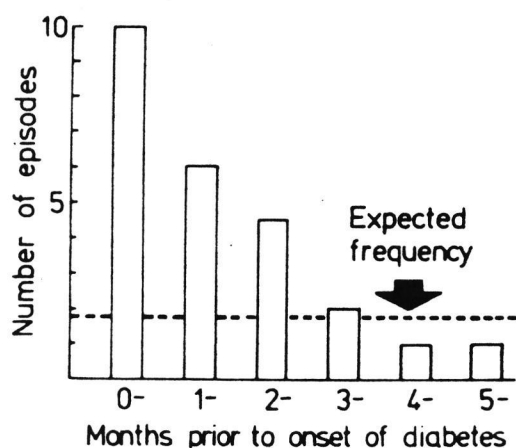
- I. Genetische predispositie
- II. Subklinische expressie met ICA-vorming
- III. Klinisch manifest.

Als **exogene factoren** die tot IDDM aanleiding geven zijn vooral virale infecties bekend, waarbij speciaal het bofvirus en het coxsackievirus in de literatuur worden vermeld¹⁾.

1.3 Bofvirus en de vorming van ICA

Bofinfectie

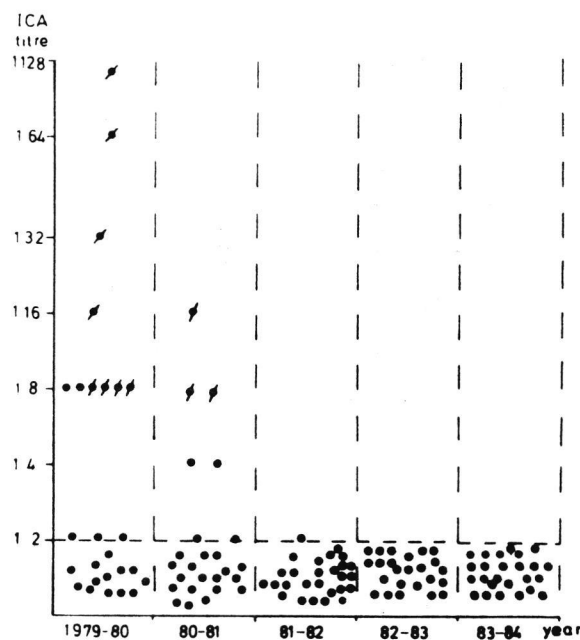
Van bof zijn er sinds meer dan 100 jaar regelmatig casuïstische mededelingen van diabetes die manifest wordt enkele weken na het optreden van bof. Soms betreft het meerdere gevallen: Bij een bofepidemie in een dorp in Zweden kregen 4 van de 40 kinderen binnen een jaar na bofinfectie diabetes; dit is het 500-voudige van de jaarlijkse Zweedse diabetes-incidentie op deze leeftijd¹²⁾. Het grootste onderzoek op dit gebied is van Gamble (1980)¹³⁾. Deze suggereert dat de associatie bof - diabetes causaal is: Aan 1663 jeugdigen met recent opgetreden diabetes werd tussen 1972 en 1974 gevraagd naar ziekten waarvoor de huisarts werd geconsulteerd in de 6 maanden vóór het manifest worden van de diabetes. Er was meer dan 2 maal het aantal verwachte episoden aan bof in die maanden; in de laatste maand zelfs 5x het verwachte aantal (zie figuur 2).



Figuur 2. Aantal bofepisoden gedurende de 6 maanden voor het manifest worden van diabetes bij 1663 jeugdigen (0-15 jaar) in het Verenigd Koninkrijk. De gebroken lijn geeft de verwachte frequentie aan op grond van huisartsen-peilstations. (Gamble, Epidemiol.Rev. 2 (1980) 49-70).

De totale invloed van bofinfectie op de incidentie van IDDM is blijkens dit onderzoek echter gering: Van de 1663 gevallen van IDDM waren er 15 meer bofepisoden dan te verwachten was; dit is minder dan 1% van alle gevallen. De associatie van diabetes met bof is derhalve zeldzaam.

Helmke et al. (1980) vonden bij 14 van 30 kinderen die in 1979/1980 werden opgenomen wegens complicaties van bof ICA¹⁴⁾. In het volgend jaar vonden de onderzoekers ICA in 7 van 25 gevallen, de daaropvolgende jaren in 0 gevallen (zie fig. 3); de verschillen tussen de eerstgenoemde jaren en de latere werden bevestigd door wederom alle sera te onderzoeken met dezelfde techniek, met ook eenzelfde pancreas⁵⁾.



Figuur 3. ICA (o) en CF-ICA (◐) bij kinderen met bofinfectie tussen 1979 en juni 1984 (Helmke et al., 1986; Diabetologia 29: 31).

De bevindingen in de eerste jaren van de Helmke-groep zijn in overeenstemming met die van Ratzmann et al. (1984) (ICA bij 67 van 86 gevallen van bof)⁶⁾, die van de laatste jaren met die van Richens en Jones (1981; 0/25)⁷⁾. Als verklaring voor de gevonden verschillen wordt wel geopperd dat die veroorzaakt worden door verschillen tussen diverse bofstammen ("strains"), zoals die blijken te bestaan bij toepassing van monoclonale antilichamen¹⁵⁾. De positieve ICA-bevindingen waren zowel bij de groep van Helmke als bij die van Ratzmann grotendeels van tijdelijke aard. In de groep bofpatiënten van Helmke (125) kreeg er één na ruim 3 jaar vervolgonderzoek diabetes, in die van Ratzmann (127) geen.

Bofvaccinatie

Ook na bofvaccinatie worden gevallen van IDDM beschreven. Helmke, Otten et al. (1986) verzamelden 7 gevallen waarbij diabetes optrad⁵⁾. De ICA-bepaling was, bij de 4 kinderen waarbij dit bepaald werd, positief. Drie van deze gevallen waren uit de regio Giessen, de overige vier werden, na een oproep hiertoe, gemeld uit Hamburg en uit Bern. Het is niet bekend hoe groot de totale populatie jeugdigen met bof was waaruit de IDDM patiënten afkomstig zijn; de noemer is niet bekend.

1.4 Vraagstellingen

Het onderzoek wil antwoord geven op de volgende vraagstellingen:

1. Worden na inenting met het in Nederland toegepaste bofvaccin antistoffen gevormd tegen betacellen van het pancreas? Zo ja, in welke mate?
2. Worden bij een Nederlandse groep jeugdigen na bofinfectie antistoffen gevormd tegen betacellen van het pancreas? Zo ja, in welke mate?

2. METHODE EN UITVOERING

2.1 Bepalingsmethoden

ICA-bepaling

De serummonsters worden onderzocht op antistoffen gericht tegen cytoplasmatische antigenen van de eilandjescellen (ICCA). Van evt. positieve sera volgt onderzoek naar het complementbindende karakter en naar de titer van de gedetecteerde ICCA's¹⁶⁾.

Normaal humaan pancreasweefsel, dat verkregen is van nierdonoren met bloedgroep O en dat verzameld is zo kort mogelijk na operatie, vormt het substraat voor het aantonen van ICCA's.

Het weefsel wordt onmiddellijk in kleine stukjes ingevroren in isopentaan wat gekoeld is door vloeibare stikstof, waarna het bewaard wordt bij -80° C. Vervolgens worden $4\text{ }\mu\text{m}$ coupes gesneden met behulp van een cryotoom bij -20° C. De coupes worden aan de lucht gedroogd gedurende $\frac{1}{2}$ uur.

De sera, welke worden getest op het voorkomen van ICCA's, worden geïncubeerd met de aan de lucht gedroogde ongefixeerde coupes. Volgens een indirecte immunofluorescentiemethode worden ICCA's vervolgens aangetoond. Voor de detectie van IgG-ICCA's wordt een konijn-antihumaan IgG gebruikt in een verdunning van 1:80.

Of de antistoffen complementbindend zijn, wordt getest met een anti-C3 conjugaat (1:80), nadat vers AB serum als complementbron met de gebonden ICCA's heeft gereageerd. In die gevallen waar in eerste instantie geen complementbinding waarneembaar is, blijkt het complementbindend karakter pas, nadat de concentratie aan IgG-ICCA op de coupe door herhaalde patiëntenserumincubatie is verhoogd.

Voor de bepaling van de titer aan antistoffen worden de verdunningen in negatief normaal serum uitgevoerd. Dit ter voorkoming

van weefseldestructie, waardoor beoordeling bemoeilijkt wordt. De resultaten worden tenslotte dubbelblind afgelezen.

GCA-bepaling

Evenals bij de ICA-bepaling wordt bij het aantonen van antistoffen tegen glucagonproducerende cellen uitgegaan van hetzelfde pancreasweefsel, dat op dezelfde wijze is bewerkt. Na incubatie met onverdund serum worden de coupes vervolgens nageïncubeerd met een rat-antihumaan glucagon, gevolgd door een zwijn-antirat Ig, gelabeld met TRITC. Tenslotte volgt nog een incubatie met een rat-antihumaan IgG, dat met FITC is gemerkt. Indien rood fluorescerende cellen ook groen fluoresceren, dan is het humane serum positief voor GCA.

IAA-bepaling

Insuline-(auto)antistoffen worden als volgt aangetoond: Humaan- dan wel varkensinsuline wordt volgens standaardprocedures aan ELISA-platen gecoat bij 37⁰ C en vervolgens gedurende één uur bij 37⁰ C met de te testen sera geïncubeerd en na wassen geïncubeerd met een geit-antihumaan IgG, dat met peridoxane was gelabeld en na reactie met orthophenylenediamenie (OPD) zichtbaar wordt gemaakt.

In een controlegroep van 27 sera van pas gediagnostiseerde nog niet met insuline behandelde IDDM-patiënten was 30% positief, hetgeen overeenkomstig is met de bevindingen uit de recente literatuur¹⁷⁾.

2.2 Uitvoering en resultaten

1. Onderzoek voor en na bofvaccinatie

Aan ± 400 ouders van kinderen die in 1981 en 1982 de consultatiebureaus voor zuigelingen bezochten in Aalsmeer en Uithoorn werd op de leeftijd van 14 maanden gevraagd hun kinderen aan een bofvaccinatie-onderzoek te laten meedoen. Hiertoe werden tijdens de mazelenvaccinatie informatiefolders uitgereikt.

152 kinderen namen deel aan het onderzoek op een leeftijd tussen 16 en 21 maanden in 1981 en 1982.

Voor en 8 weken na vaccinatie met MSD-monovaccin (^R Mumpsvox; Merck, Sharp en Dohme) werd bloed afgenomen. Van 149 van hen werd op de leeftijd rond 4 jaar ($2\frac{1}{4}$ - $2\frac{3}{4}$ jaar na de vaccinatie) wederom bloed verkregen.

Vóór vaccinatie waren 151 kinderen seronegatief, één was positief. 8 weken na vaccinatie was er seroconversie (ELISA en hemagglutinatiereactie) bij 149 van de 152; bij 11 was dit 8 weken na revaccinatie het geval.

Op de leeftijd van 4 jaar meldden 35 van hen een bofcontact in gezin of op school. Geen van de kinderen toonde tekenen van bofinfectie. Geen van de kinderen had op die leeftijd diabetes gekregen.

Tabel 1 toont de uitslagen van de ICA-bepalingen. Het onderzoek was bij allen negatief.

Tabel 1. ICA-bepaling na bofvaccinatie bij 152 kinderen, 16-21 maanden oud (1981/1982).

serumafname	aantal sera	ICA +
vóór vaccinatie	152	0
8 weken	152	0
na vaccinatie		
2½ jaar	149	0

Wat het onderzoek op GCA betreft werden vóór vaccinatie twee van de 152 sera positief bevonden. 8 weken na vaccinatie was serum van deze twee kinderen nog positief. Ook twee andere sera bleken 8 weken na vaccinatie voor GCA positief te zijn geworden. Na 2½ jaar waren alle sera GCA-negatief.

In een latere fase van het onderzoek zijn de sera voorts op IAA onderzocht; ook deze autoantistoffen kunnen, evenals ICA, aanwijzingen geven ten aanzien van te verwachten insuline-afhankelijkheid¹⁸⁾¹⁹⁾. Het optreden van IAA, zowel vóór als na vaccinatie, bleek niet hoger dan in de 'normale' populatie ($\pm 5\%$).

1a. Onderzoek vóór en na mazelenvaccinatie

Bij 105 kinderen in Bilthoven, Den Haag en Utrecht werd vóór en 6 weken na mazelenvaccinatie op de leeftijd van 14-15 maanden serum verkregen. Alle serummonsters waren negatief op ICA.

De serummonsters van deze groep zijn niet op GCA en IAA onderzocht.

2. Onderzoek na bofinfectie

Van 184 jeugdigen (0 t/m 19 jaar; m/v 127/57) werden 242 serummonsters verkregen van 1 tot 6 weken na bofinfectie. Het waren alle serummonsters met positieve reacties (complementfixatie en/of immunofluorescentietest) welke in 1984 en 1985 naar de afdeling Virologie van de GGD Rotterdam en naar de afdeling Virologie van het RIVM te Bilthoven waren ingestuurd wegens verdenking op bofinfectie. Het betrof veelal complicaties van bof bij ten tijde van de bloedafname in een ziekenhuis opgenomen kinderen. De voornaamste redenen van inzending waren verdenking op bof bij meningoencefalitis (78;m/v 56/22), febris (17; 10/7), orchitis (13;13/0), klierzwellings (11; 7/4), pancreatitis (11; 7/4), buikpijn (4; 1/3), myalgie (3; 1/2), lymfocytose (3; 2/1), grote milt (1; 0/1), onbekend (43; 30/13).

In tabel 2 worden de resultaten van de ICA-bepalingen weergegeven, met vermelding van het aantal weken na bofinfectie.

Tabel 2. ICA-bepaling in 242 sera van 184 patiënten met bofinfectie (1984/1985)

aantal weken na begin van de aandoening	aantal sera	ICA+
1	112	0
2	57	0
3	58	0
4	8	0
5	5	0
6	2	0

Alle sera waren op ICA negatief. Het is niet bekend of één van deze jeugdigen diabetes kreeg. Ook in deze serummonsters werd onderzoek verricht op GCA en op IAA: van één patiënt bleken twee opeenvolgende sera (met 14 dagen tijdsverschil) positief voor GCA. De frequentie IAA bleek niet hoger dan in de controlepopulatie (5%).

3. BESPREKING

Bij geen van de tegen bof gevaccineerde kinderen werd ICA gevonden. Het betrof 149 kinderen bij wie dit werd nagegaan 8 weken en 2½ jaar na de inenting op de leeftijd van 16-21 maanden. (Evenmin was dit het geval bij 105 kinderen van ±15 maanden 6 weken na inenting met verzwakt levend virus tegen mazelen). Het onderzoek, met genoemde beperking in leeftijd, tijdstip van bepaling en aantal onderzochte personen, leverde geen aanwijzing op dat bofvaccinatie een verhoogd risico geeft op ICA-vorming. Het aantal kinderen is relatief klein. De kans op vorming van ICA is met 95% betrouwbaarheid gelegen tussen 0 en 2.0% (Poissonverdeling). Om bij dezelfde mate van betrouwbaarheid dit interval te verkleinen tot 0-0.5% zouden bij tenminste 600 in plaats van bij 149 gevaccineerde kinderen alle uitslagen op ICA negatief moeten zijn.

Het is duidelijk dat de onderzoeksbevindingen alleen geldig zijn voor de bofstam waarmee werd gevaccineerd, in casu de Jeryl Lynnstam (Mumpsvox; M.S.D.). In het licht van de in het voorgaande genoemde verschillende bevindingen op het punt van ICA-vorming bij verschillende patiëntengroepen met bofinfectie, is het zeer wel denkbaar dat vaccinatie met een andere dan de Jeryl Lynnstam wél ICA-positieven zou opleveren. Dit betekent dat alvorens een ander vaccin zou worden geïntroduceerd, hernieuwd onderzoek naar mogelijke ICA-vorming noodzakelijk is.

Wat het onderzoek van sera van jeugdigen met bofinfectie betreft: In geen van de serummonsters werd ICA gevonden. Deze negatieve bevinding verschilt van de bevindingen van Helmke et al. in de jaren 1979-1981 en met die van Ratzmann, doch komt overeen met de latere bevindingen van Helmke (1982-1984) en met die van Richens en Jones⁵⁾⁶⁾⁷⁾.

De oorzaak van de negatieve bevinding kan gelegen zijn in het vroege tijdstip van bloedafname; de meeste serummonsters waren

van 1-2 weken na het manifest worden van de bofaandoening, in tegenstelling tot het interval in het onderzoek van Ratzmann dat meerdere maanden bedroeg. Het tijdstip van bloedafname verschilde echter niet van dat in het onderzoek van de Helmke-groep (zowel in de jaren 1979-1981, als in 1982-1984) en van dat van Richens en Jones. Het verschil in bevinding kan zeer zeker berusten op verschillen in methodiek van de ICA-bepaling. Zo kan de discrepantie met het onderzoek van Ratzmann et al. worden verklaard door het feit dat deze groep werkte met in formaleine gefixeerd inplaats van met vers ingevroren pancreas. Bij het onderzoek van Helmke et al. is dat niet het geval. Bovendien vond deze groep bij heronderzoek met ééNZelfde pancreas een bevestiging van hun resultaten over de genoemde jaren.

De verschillen in ICA-positiviteit in de verschillende onderzoeken zou inderdaad veroorzaakt kunnen worden door verschillen in diverse bofstammen zoals die ook blijken te bestaan bij gebruik van monoclonale antilichamen¹⁵⁾.

Ten aanzien van de tijdelijk positieve bevindingen wat betreft GCA bij twee van de 152 gevaccineerde jeugdigen (bij twee anderen waren er vóór vaccinatie reeds GCA aanwezig), is er geen conclusie mogelijk²⁰⁾.

Wat de IAA betreft werd dus noch bij de gevaccineerde groep, noch bij de groep met bofinfectie in verhoogde mate IgG-IAA gevonden. Verder onderzoek op dit punt is gewenst. Blijkens zeer recent onderzoek vonden Bodansky et al. in sera van patiënten met diverse virale infecties n.l. wel verhoogde IAA van de IgM-klasse. Zij postuleren dat de verandering van IgM-IAA naar IgG-IAA een belangrijke factor kan zijn in de pathogenese van IDDM-21).

Samenvattend werden in het onderzoek noch bij de jeugdigen die tegen bof werden gevaccineerd, noch bij de met bofvirus geïnfecteerden, aanknopingspunten gevonden voor een directe betacelbeschadiging. De bevindingen zijn in overeenstemming met de opvat-

ting dat virale infectie het proces van metabole decompensatie in de betacel niet zozeer initieert, danwel kan bevorderen ²²⁾
²³⁾. Bij kinderen in een prediabetisch stadium, veelal met ICA, kan bofvaccinatie diabetes manifest doen worden. Gezien de incidentiecurve naar leeftijd is de kans hierop op de leeftijd van 15 maanden (vanaf 1.1.'87 wordt rond deze leeftijd in het Rijksvaccinatieschema de eerste BMR-vaccinatie toegediend) beduidend kleiner dan die op de leeftijd van 9 jaar (2e BMR vaccinatie). Hier staat tegenover dat bofinfectie eveneens het manifest worden van IDDM kan bevorderen, en dat, gezien het optreden van meer diabetogene stammen, in hogere mate dan de thans hierop onderzochte Jeryl Lynnstam.

Bofinfectie en vaccinatie met levend bofvirus zouden een factor zijn in de pathogenese van insuline-afhankelijke diabetes bij jeugdigen.

242 sera van 184 patiënten met bof (< 20 jr.) werden verzameld tussen 1 en 6 weken na de eerste ziektesymptomen. Alle sera waren negatief op antilichamen tegen betacellen van het pancreas (ICA). Deze bevindingen zijn verschillend van die in de groep van Helmke in 1979-1981, en van die van anderen, doch komen overeen met latere bevindingen van de Helmkegroep en eveneens met die van anderen. De verschillen in ICA-vorming zijn waarschijnlijk het gevolg van verschillen tussen diverse bofvirusstammen. In een prospectief onderzoek van 149 kinderen die in 1982 werden gevaccineerd met verzwakt levend bofvirus (MSD-mono-vaccin; Jeryl Lynnstam) werden sera verkregen vóór vaccinatie (op de leeftijd van 16 tot 21 maanden) en 8 weken resp. 2½ jaar hierna. In geen van de sera werden ICA aangetoond. Evenmin was dit het geval bij 105 kinderen voor en 6 weken na mazelenvaccinatie op de leeftijd van 14 tot 15 maanden. Bij de groep met bofinfectie en bij die voor en na bofvaccinatie was onderzoek op glucagoncelantistoffen en op insuline-antistoffen (IgG-klasse) negatief.

Noch bij de geïnfecteerden, noch bij de gevaccineerden werden in het onderzoek aanknopingspunten gevonden voor directe betacelbeschadiging. Gezien de verschillen in bofvirusstammen is het van belang dat, alvorens massavaccinatie met levend bofvirus wordt toegepast, onderzoek op ICA-vorming van het toe te passen vaccin is verricht.

LITERATUUR

1. JENSON, A.B., S. ROSENBERG. Multiple viruses in diabetes mellitus. *Prog. Med. Virol.* 29: (1984) 197-217
2. VAANDRAGER, G.J., G.J. BRUINING, F.J. VEENHOF, et al. Incidence of childhood diabetes in the Netherlands; a decrease from north to south over North-Western Europe? *Diabetologia* 27 (1984) 203-6
3. NORTH, A.F., K. GORWITZ, A. SULTZ. A secular increase in the incidence of juvenile diabetes mellitus. *J. Pediatr.* 91 (1977) 706-10
4. GALE, E., A.C. TARN, J.D. BAUM, et al. Family studies of childhood diabetes in the U.K. *Diabetes* 34 (1985) Suppl. 1, p.79A
5. HELMKE, K., A. OTTEN, W.R. WILLEMS, et al. Islet cell antibodies and the development of diabetes mellitus in relation to mumps infection and mumps vaccination. *Diabetologia* 29 (1986) 30-3
6. RATZMANN, K.P., J. STRESE, S. WITT, et al. Mumps infection and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) *Diabetes Care* 7 (1984) 170-3
7. RICHENS, E.R., W.G. JONES. Islet cell antibodies and mumps. *Lancet* 1 (1981) 507-8 (Letter)
8. TATTERSALL, R.B., D.A. PYKE. Diabetes in identical twins. *Lancet* II (1972) 1120-5
9. MAC LAREN, N.K., G. HORNE, R.P. SPILLAR, R.P. et al. Islet cell antibodies (ICA) in US school children. *Diabetes* 34 (1985) Suppl. 1, p. 84A
10. GORSUCH, A.N., K.M. SPENCER, J. LISTER, et al. Evidence for a long pre-diabetic period in Type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus. *Lancet* II: (1981) 1363-5
11. BRUINING, G.J. Studies on childhood diabetes mellitus. Rotterdam, 1984. Thesis
12. MELIN, K., B. URSUING. Diabetes mellitus som komplikation till parotitis epidemica. *Nord. Med.* 60: (1958) 1715-7

13. GAMBLE, D.R. The epidemiology of insulin-dependent diabetes, with particular reference to the relationship of virus infection to its etiology. *Epidemiol. Rev.* 2: (1980) 49-70
14. HELMKE, K., A. OTTEN, W. WILLEMS. Islet cell antibodies in children with mumps infection. *Lancet* II: (1980) 211-2 (Letter)
15. ÖRVELL, C. The reactions of monoclonal antibodies with structural proteins of mumpsvirus. *J. Immunol.* 132: (1984) 2622-8
16. MARNER, B., A. LENMARK, J. NERUP et al. Analysis of islet cell antibodies on frozen sections of human pancreas. *Diabetologia* 25: (1983) 93-6
17. PLUM, A., L.G. HEDING, P. HOUGAARD. Insulin antibodies in newly diagnosed diabetes. Fact or fiction? *Diabetologia* 29: (1986) 583 A
18. SRIKANTA, S., A.T. RICKER, D.K. McCULLOCH et al. Autoimmunity to insulin, beta cell dysfunction and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 35: (1986) 139-42
19. BEAUFORT, C.E. DE, C. BINDER, N.C. BOER DEN et al. Insulin antibodies in diabetic children before treatment: a marker for B-cell destruction? *Diabetologia* 29: (1986) 532 A
20. CUDWORTH, A.F., G.F. BOTTAZZO, D. DONIACH. Genetic and immunological factors in type 1 diabetes. In: J. Irvine, (ed). *The immunology of diabetes*, Edinburgh, 1980. Pp. 67-99
21. BODANSKY, H.J., B.M. DEAN, G.F. BOTTAZZO. Islet-cell antibodies and insulin autoantibodies in association with common viral infections. *Lancet* II: (1986) 1351-3
22. HELMKE, K., K. FEDERLIN, A. OTTEN, et al. *Diabetologia* 29: (1986) 407 (Letter).
23. BOTTAZZO, G.F., R. PUJOL-BORREL, E. GALE. Autoimmunity and diabetes; progress, consolidation and controversy. In: K.G.M.M. Alberti, L.P. Krall, (eds.). *The Diabetes Annual* 2. Amsterdam, Elsevier. (1986) Pp. 13-29

Islet cell antibodies, mumps infection and mumps vaccination

Sir,

In relation to the recent paper by Helmke et al. [1], we would like to communicate our findings on the same subject.

Two hundred and forty-two sera from 184 patients (<20 years of age) with proven mumps infection (immunofluorescence, complement fixation) were collected between 1 and 6 weeks after the first symptoms of disease and their sera tested for the presence of islet cell antibodies (ICA) [2]. The sera were collected in 1984 and 1985 in the cities of Rotterdam and Utrecht, The Netherlands. Most of the patients were hospitalized with complications of mumps, such as meningo-encephalitis, orchitis or pancreatitis. Within this time period the sera of all these patients appeared to be negative for ICA. Only two of them were positive for antibodies against glucagon-producing cells. From 149 other children (aged 16-21 months) sera were obtained before, and 8 weeks and 2.5 years after, mumps vaccination. (The vaccination was carried out in 1981 and 1982 by means of Mumpsax, Jeryl Lynn strain, live, Merck, Sharp & Dohme). All those sera were also tested for the presence or absence of ICA. In none of the sera could ICA be detected. None of the vaccinated children developed insulin dependency to date. It should be noted, however, that in this group 2 sera obtained before vaccination and 4 sera obtained 8 weeks after vaccination contained antibodies toward glucagon-producing cells of the islets. Of the 4 positive sera drawn 8 weeks after vaccination, two came from the same children who had already been positive for these antibodies before vaccination. Of the sera obtained 2.5 years after vaccination, no antibodies toward glucagon-producing cells were found. The significance of these findings related to antibodies against glucagon-producing cells, occurring in less than 0.5% of the random population, is unknown [3].

Our findings with regard to the children with mumps infection are at variance with the previous data of Helmke et al. (in 1979-1980, 13 out of 26 ICA positive; in 1980-1981, 7 out of 25 ICA positive) and of Ratzmann et al. (67 out of 86 ICA positive), but agree with the present

results of Helmke et al. (1981-1982, 1 out of 27, in 1982-1984, 0 out of 49 ICA positive) and also with those of Richens & Jones (0 out of 25 ICA positive) [5]. A definite conclusion can be drawn when the international standardization according to the recent Monaco conference is completed [2]. The differences in ICA-positivity in the study of Helmke et al. [1], performed with the same methods and confirmed by retesting, may indeed be due to differences between various mumps-virus strains as shown by the use of monoclonal antibodies [6]. Our findings are not in agreement with explanations which relate an increasing incidence of Type 1 (insulin-dependent) diabetes during recent decennia with mumps infection or vaccination [7], nor do they offer an explanation for the big differences in incidence in western countries [8].

Helmke et al. [1] postulate that mumps vaccination may provoke diabetes, and they suggest that it would be of interest to make a prospective study to find out the incidence of ICA following mumps vaccination [9]. (In their study all the 4 vaccinated children with Type 1 diabetes who were tested had ICA, but a definite causal relationship has not been established; furthermore, the type of vaccine used was not stated in their paper). In none of the sera of the vaccinated children in our prospective study could ICA be detected. All the children were, however, vaccinated with the Jeryl Lynn strain. In view of the foregoing it is conceivable that vaccination with a live attenuated mumps virus other than the Jeryl Lynn strain might yield ICA-positivity more frequently. This implies that, before mass vaccination with any other strain is considered, a study for possible ICA formation would be necessary.

Yours sincerely,

G.J. Vaandrager, J.L. Molenaar, G.J. Bruining, A.D. Plantinga and E.J. Ruitenberg

References

- Helmke K, Otten A, Willems WR, Brockhaus R, Mueller-Eckhardt G, Stief T, Bertrams J, Wolf H, Federlin K (1986) Islet cell antibodies and the development of diabetes mellitus in relation to mumps infection and mumps vaccination. *Diabetologia* 29: 30-33
- Marnier B, Lernmark A, Nerup J, Molenaar JL, Tuk CV, Bruining GJ (1983) Analysis of islet cell antibodies on frozen sections of human pancreas. *Diabetologia* 25: 93-96
- Cudworth AF, Botazzo GF, Doniach D (1980) Genetic and immunological factors in type 1 diabetes. In: Irvine J (ed) *The immunology of diabetes*, Edinburgh, pp 67-99
- Ratzmann KP, Strese J, Witt S, Berling H, Keilacker H, Michaelis D (1984) Mumps infection and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Diabetes Care* 7: 170-73
- Richens ER, Jones WG (1981) Islet cell antibodies and mumps. *Lancet* i: 507-08 (Letter)
- Orvell C (1984) The reactions of monoclonal antibodies with structural proteins of mumps virus. *J Immunol* 132: 2622-28
- North AF, Gorwitz K, Sultz A (1977) A secular increase in the incidence of juvenile diabetes mellitus. *J Pediatr* 91: 706-10
- Vaandrager GJ, Bruining GJ, Veenhof FJ, Drayer NM (1984) Incidence of childhood diabetes in the Netherlands: a decrease from north to south over North-Western Europe? *Diabetologia* 27: 203-06
- Otten A, Helmke K, Stief T, Mueller-Eckhardt G, Willems WR, Federlin K (1984) Mumps, mumps vaccination, islet cell antibodies and the first manifestation of diabetes mellitus type 1. *Behring Inst Mitt* 75: 83-88

Dr. G.J. Vaandrager
National Institute
for Preventive Health Care
NIPG/TNO
Postbus 124
NL-2300 AC Leiden
The Netherlands

Response from the authors

Sir,

With reference to our recent paper [1], Vaandrager et al. report that they were unable to detect islet cell antibodies in 242 patients with proven mumps infection nor in 149 children before and after mumps vaccination. Taking our observations into consideration, this finding is not surprising. We reported that the children investigated post mumps infection did not show positive islet cell antibody (ICA) results over the past years up to now. The seven children who developed diabetes mellitus after mumps vaccination - at least five cases with the Jeryl Lynn strain (Behring Werke AG, Marburg), four cases with proven ICA - were just seen by chance out of many thousands of children who had been vaccinated in the same period of time in different areas. Therefore, we would not expect positive findings by testing several hundred vaccinated children. As we stated in our paper, it would involve a prospective study of considerable dimensions to prove or disprove a relationship between the viral infection or vaccination and the development of diabetes mellitus.

Vaandrager et al. make some interesting suggestions in connection with their observations. We would like to comment on them as follows: We did not "postulate" that mumps vaccination may cause diabetes nor that the reported mild virus infections cause the disease. In contrast, we stated that we did not believe that the cases observed by us, as well as those described by other authors in connection with recent viral infections, were caused by such a preceding infection. It might, however, be one final insult during ongoing autoimmune processes which were induced years before - probably in utero - by contact with similar viral antigens. Thus, we hypothesized that those observations possibly point towards one of the pathogenic mechanisms rather than being pathogenic themselves.

We agree that technical differences could be the reason for the discrepancy of results between our time-limited observation on unfixed frozen sections of human pancreas and that of Ratzmann et al. [2], who used formalin fixed sections and subsequently reported a high incidence of positive ICA after mumps infection. However, the discrepancies between our study group and the groups of Vaandrager et al. and Richens et al. [3] are in our opinion more likely due to different environmental factors than to technical reasons.

One observation we made during our mumps control study could illustrate our point of view concerning the relationship between mumps infection and development of Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. Figure 1 shows the ICA in a 10-year-old boy who developed mumps infection. He had suffered from diabetes mellitus since his second year of life. Investigations for islet cell antibodies over 15 months before mumps infection repeatedly showed borderline or negative results. After mumps infection the ICA increased very strongly up to 1:128 with transient complement fixation in the higher titre ranges over 7 month. After this period of time the titre decreased, complement fixation disappeared, and the borderline ICA concentration persisted again. Although this is only a single case, it could be interpreted as a further indication that certain viruses could reactivate immune reactions probably by triggering sensitized lymphocytic cell clones with specific receptor sites even in the absence of specific antigens. Since there was no indication of a polyclonal stimulation, it

could be an example of an immune reaction against endogenous agents induced by an exogenous factor.

In conclusion, we feel that the observations of Vaandrager et al. fit our concept very well. Virus infections observed shortly, i.e. a few weeks, before onset of overt diabetes mellitus seem highly unlikely to be the main cause for the onset of diabetes. Even if autoimmune reactivity against islet cells is detectable, it does not necessarily lead to islet cell destruction in diabetes mellitus. The initial insult which led to autoaggression against islets of Langerhans took place probably years before diabetes manifestation. Thus, the observed autoimmune phenomenon at the time of manifestation could just give some indication of the inducing mechanisms without necessarily being pathogenic itself.

We agree with the statement of Vaandrager et al. that, before mumps vaccination with any other strain is considered, a study for possible induction of anti-islet-cell immune reactivity would be necessary.

Yours sincerely,

K. Helmke, K. Federlin, A. Otten and W. R. Willems

References

1. Helmke K, Otten A, Willems WR, Brockhaus, Mueller-Eckhardt G, Stief T, Bertrams J, Wolf H, Federlin K (1986) Islet cell antibodies and the development of diabetes mellitus in relation to mumps infection and mumps vaccination. *Diabetologia* 29: 30-33
2. Ratzmann KP, Strese J, Witt S, Berling H, Keilacker H, Michaelis D (1984) Mumps infection and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Diabetes Care* 7: 170-173
3. Richens ER, Jones WG (1981) Islet cell antibodies and mumps. *Lancet* 2: 507-508 (Letter)

Dr. K. Helmke
Department of Internal Medicine
University of Giessen
6300 Giessen
FRG

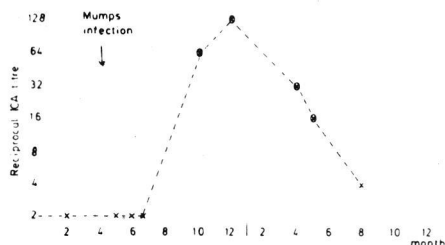


Fig. 1. x = ICA; o = F-ICA

INCREASING PREVALENCE OF DIABETES IN MALE ARMY CONSCRIPTS IN THE NETHERLANDS

G.J. VAANDRAGER,
Netherlands Institute for
Preventive Health Care,
Leiden

M. van ORMONDT,
Department Medical Affairs
National Service Medical
Examination, Kerkrade

G.J. BRUINING,
Department of Pediatrics
Erasmus University/Sophia
Children's Hospital, Rotterdam

An increase in the incidence of childhood diabetes during recent decennia has been reported in a number of western countries Yet no definite proof has so far been submitted.

AIM OF STUDY: Is the prevalence of diabetes mellitus among army conscripts increasing?

METHODS:

The prevalence of D.M. in all 18-years old Dutch males could be ascertained from the nationwide medical examination of the army conscripts between 1960 and 1987.

Although the medical examinations were not held under strict standardized conditions:

- The protocol of medical examination has not changed since 1955;
- Neither have the mortality rates in 0-19 year old boys from 1950 - 1984.

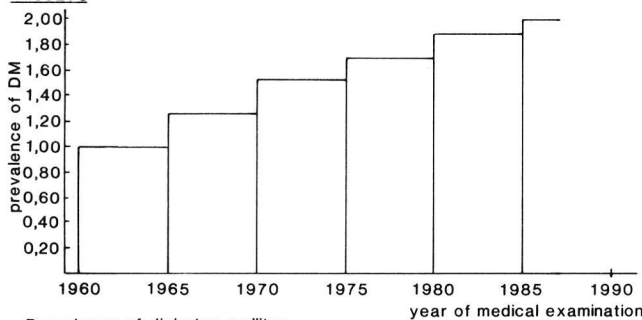
The registration 'diabetes mellitus' was based

- 1) on the evidence signed by a physician (the greater part) and
- 2) on glucosuria found by the medical examination and following evidence of an internist (in some)

Mortality rates of diabetes Mellitus (primary and secondary causes) 0-19 years, 1950-1985 (The Netherlands Bureau of Statistics)

year groups	death rate per 1,000,000 population
1950 - 1954	2,6
1955 - 1959	2,1
1960 - 1964	2,0
1965 - 1969	2,7
1970 - 1974	2,4
1975 - 1979	1,5
1980 - 1984	1,3

RESULTS



Prevalence of diabetes mellitus per 1000 medically examined male army conscripts aged 18 1960 - 1986

Number of cases of diabetes mellitus per 1000 medically examined male army conscripts aged 18

year groups	medically examined per 5 year	cases of diabetes per year number	%
1960 - 1964	453.907	90	(0,99%)
1965 - 1969	530.670	134	(1,26%)
1970 - 1974	498.865	155	(1,55%)
1975 - 1979	541.490	186	(1,72%)
1980 - 1984	589.282	218	(1,85%)
1985 - 1986	233.709	231	(1,98%)

CONCLUSION

THE INCREASING PREVALENCE IS AN INDICATION OF CONFIRMING AN INCREASING INCIDENCE OF IDDM IN YOUNGSTERS BORN BETWEEN 1942 AND 1970

ANOTHER, AND MORE SPECULATIVE, INDICATION FOR DIABETES ON THE INCREASE IN LATER YEARS MAY BE GAINED BY COMPARING THE PREVALENCE RATE CALCULATED FOR 18-YEAR OLD MALES BY SUMMATION OF THE ANNUAL INCIDENCE RATES (1978-1980) POPULATION BORN 1960-1980) WITH THE ACTUAL PREVALENCE RATE FOUND AT THE RECRUITING EXAMINATION OF THE POPULATION BORN 1960-1962. THE DIFFERENCE, RESPECTIVELY 1,96% VERSUS 1,72%, IS PROBABLY A COHORT PHENOMENON BETWEEN 1960 AND 1980.

FUTURE RESEARCH

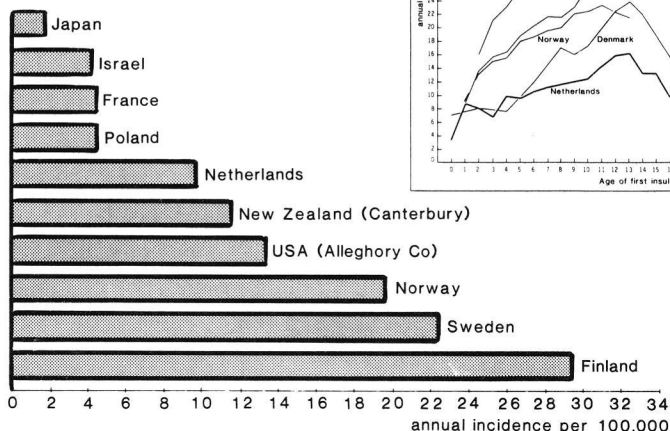
In the future increasing (or decreasing) incidence of IDDM in the Netherlands can be determined with greater certainty by comparing incidence data then obtained (1988-1990) - by the same ascertainment methods - with the data now available (1978-1980)

A rising incidence of IDDM in youngsters and the worldwide large geographic differences in the distribution - with in N-W Europe a north-south gradient - may be due to changes in exogenous factors

LITERATURE

- 1) Reunanen et al., Acta Paediat Scand 1982; 71: 893-909
- 2) Patterson et al., Diabetologia 1983; 24: 238-43
- 3) Dahlquist et al., Diabetologia 1985; 28: 802-08
- 4) Rewers et al., Diabetes 1987; 36: 106-13
- 5) Vaandrager et al., Diabetologia 1984; 27: 203-06
- 6) Christau et al., Acta Endocrin 1981; suppl. 245: 68-88
- 7) DERI-group, Diabetes 1988; 37: 1113-19

The incidence of IDDM in different countries 0-14 Yr between 1978 and 1984



Comparison of age of 1st insulin injection in the Scandinavian countries and in the Netherlands between 1978-1980

