



Universitetet
i Stavanger

DET TEKNISK-NATURVITENSKAPELIGE FAKULTET

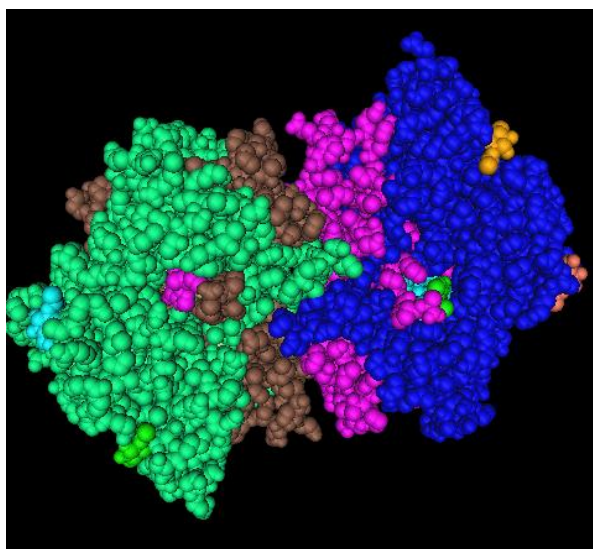
MASTEROPPGAVE

Studieprogram/spesialisering: Biologisk kjemi	Vårsemesteret, 2012. Åpen
Forfatter: Mette Figenschou (signatur forfatter)
Fagansvarlig: Grete Jonsson Veileder(e): Kåre B. Jørgensen, Grete Jonsson	
Tittel på masteroppgaven: Validering og anvendelse av metode for å måle myeloperoksidase i plasma Engelsk tittel: Validation and application of a method for measurements of myeloperoxidase in plasma	
Studiepoeng: 60	
Emneord: Myeloperoksidase Oksidativt stress Systemisk lupus erythematosus Primært Sjøgrens syndrom ELISA Metodevalidering	Sidetall: 57 + vedlegg: 26 Stavanger, 1.6.2012 dato/år

Validering og anvendelse av ELISA- metode for å måle myeloperoksidase i plasma

Mette Figenschou

Masteroppgave i biologisk kjemi



Institutt for Matematikk og Naturvitenskap

Vår 2012

Sammendrag

Myeloperoksidase (MPO) er et enzym som spiller en viktig rolle for immunforsvarets bekjempelse av bakterier. Enzymet frigjøres fra hvite blodceller under en inflammasjonsreaksjon og katalyserer dannelsen av det bakteriedrepende stoffet underklorosyrlig (HOCl). Under produksjon av HOCl dannes det også reaktive oksygenforbindelser (ROS) som har evne til å oksidere, og dermed gjøre skade på, ulike cellekomponenter. Oksidativt stress er en tilstand der produksjonen av ROS er større enn kroppens evne til å nøytralisere dem. Oksidativt stress kan måles ved å kvantifisere oksiderte cellekomponenter. Det er foreslått at økt utslipp av MPO under en inflammasjon vil kunne føre til økt produksjon av ROS som igjen kan føre til oksidativt stress. Det har blitt påvist oksidativt stress hos pasienter med kroniske inflammasjonssykdommer som primært Sjøgrens syndrom (PSS) og systemisk lupus erythematosus (SLE).

Formålet med oppgaven er å validere en metode for å måle konsentrasjon av MPO i plasma og deretter anvende metoden for å finne ut om konsentrasjonen er høyere hos pasienter med SLE og PSS enn hos friske personer.

Metoden som ble validert er ELISA-kit fra BioVendor. Kitet ble validert med hensyn på følgende parametere: Prøvemateriale, kalibreringskurve, deteksjonsgrense, variasjon (CV) og gjenfinning. Anbefalt prøvemateriale er EDTA-plasma med kraftig sentrifugering (minst 2280 G). Fire-parameter logistisk kalibreringskurve ble brukt. Deteksjonsgrensen for metoden er 0,5 ng/ml, CV 16,2 % og gjenfinningen 62 %.

Konsentrasjon av MPO i plasma ble målt på 17 friske personer, 21 pasienter med SLE og 26 pasienter med PSS. Pasientene med PSS hadde fått betennelsesdempende medisin i fire uker og blodprøver ble tatt ved start (uke 0) og etter fire uker. MPO ble målt på alle pasientene i uke 0 og i uke 4. Statistiske tester viste at konsentrasjon av MPO, i forhold til hos den friske gruppen, var signifikant høyere hos SLE-pasientene ($P = 0,039$). Hos pasientene med PSS var konsentrasjon av MPO ikke signifikant høyere enn hos de friske, hverken i uke 0 ($P = 0,353$) eller uke 4 ($P = 0,569$).

Metodens spredning er forholdsvis høy og en må regne med å måtte analysere prøver flere ganger for å få et pålitelig resultat. Konsentrasjon av MPO hadde steget hos SLE-pasientene, men ikke hos PSS-pasientene. Uten informasjon av sykdomsaktivitet eller grad av oksidativt stress for alle pasientene er det vanskelig å si noe om sammenheng mellom dette og konsentrasjon av MPO.

Forord

Dette prosjektet ble utført som en del av mastergraden i biologisk kjemi ved Institutt for matematikk og naturvitenskap ved Universitetet i Stavanger. Det er en 60 studiepoengs masteroppgave og arbeidet har foregått over studieåret 2011-2012. Oppgaven er skrevet ved Avdeling for Medisinsk biokjemi ved Stavanger Universitetssykehus (SUS). Det praktiske arbeidet har foregått på forskningslaboratoriet på SUS.

Først og fremst vil jeg takke Grete Jonsson ved SUS for god veiledning under hele arbeidet med oppgaven. Hun har kommet med mange gode idéer og har hjulpet meg når jeg har stått fast. Grete gir gode og konstruktive tilbakemeldinger, både på laboratoriearbeidet og på det skriftlige, noe jeg setter stor pris på.

Jeg vil også takke min veileder ved Universitetet i Stavanger, Kåre B. Jørgensen for gode forslag og tilbakemeldinger underveis i skriveprosessen.

Til slutt vil jeg rette en takk til alle på forskningslaboratoriet ved SUS som har vist meg rundt på laboratoriet, kommet med praktiske tips og sørget for mye latter og et godt arbeidsmiljø. Jeg har satt pris på den tiden jeg har vært på laboratoriet og føler jeg har lært mye om det å jobbe med et forskningsprosjekt.

Mette Figenschou, Stavanger 2012

Innholdsfortegnelse

Sammendrag.....	I
Forord	II
Innholdsfortegnelse	III
Forkortelser	VI
1 Innledning	1
1.1 MPO som markør for inflammasjon og oksidativt stress.....	1
1.2 ELISA som kvantitativ analysemetode.....	2
1.3 Oppgavens formål.....	2
2 Teori.....	3
2.1 Immunologi og autoimmune sykdommer	3
2.1.1 Immunforsvaret og antistoffer	3
2.1.2 Autoimmune sykdommer	3
2.1.3 Systemisk lupus erythematosus (SLE).....	4
2.1.4 Primært Sjøgrens syndrom (PSS)	4
2.1.5 Fatigue	5
2.2 Myeloperoksidase	5
2.2.1 Enzymatisk funksjon	6
2.2.2 Oksidativt stress	8
2.2.3 MPO i humant plasma	9
2.3 Analyseprinsipp for ELISA.....	10
2.3.1 Metodebeskrivelse.....	10
2.3.2 Prinsipp for spektrofotometri.....	12
2.4 Validering av metode.....	13
2.4.1 Prøvemateriale	13
2.4.2 Kalibreringskurve.....	14
2.4.3 Deteksjonsgrense	15
2.4.4 Analysevariasjon.....	16
2.4.5 Shewhart kontrollkort.....	17
2.4.6 Gjenfinning	18
3 Materialer og metode.....	20
3.1 Kjemikalier og utstyr	20
3.2 Biologisk materiale	20

Validering og anvendelse av ELISA-metode for å måle myeloperoksidase i plasma

3.3 Prøvetaking og sentrifugering	21
3.4 Analyseprosedyre.....	22
3.5 Validering	22
3.5.1 EDTA vs. heparin og 1 vs. 2 sentrifugeringer	22
3.5.2 Kalibreringskurve.....	22
3.5.3 Deteksjonsgrense	23
3.5.4 Analysevariasjon.....	23
3.5.5 Etablering av Shewhart kontrollkort	23
3.5.6 Gjenfinning	24
3.6 Anvendelse av metoden	24
3.7 Statistikk.....	25
4 Resultater	26
4.1 Prøvemateriale og sentrifugeringer	26
4.1.1 Betydning av antall sentrifugeringer	27
4.2 Validering av ELISA metode	28
4.2.1 Kalibreringskurve.....	28
4.2.2 Deteksjonsgrense	29
4.2.3 Etablering av kontrollkort.....	30
4.2.4 Gjenfinning	30
4.2.5 Innen plate- og mellom plate-variasjon.....	31
4.3 Anvendelse av ELISA-metode	32
4.3.1 Kalibreringskurver til anvendelsen av metoden.	32
4.3.2 Anvendelse av kontrollkort.....	33
4.3.3 MPO hos friske kontrollpersoner	35
4.3.4 MPO hos SLE-pasienter	37
4.3.5 MPO hos PSS-pasienter	39
4.3.6 Sammenligning av friske personer med hver av pasientgruppene ved bruk av statistiske tester.....	43
5 Diskusjon	45
5.1 Validering av metoden	45
5.2 Anvendelse av metoden	47
5.3 Oppsummering	49
6 Konklusjon	51
7 Referanser	52

Validering og anvendelse av ELISA-metode for å måle myeloperoksidase i plasma

8 Tabeller	54
9 Figurer.....	56
Vedlegg	58
Vedlegg A. ELISA MPO kit	58
Vedlegg B. Prosedyre for ELISA MPO kit.....	59
Vedlegg C. EDTA vs. Heparin og 1 vs. 2 sentrifugeringer	65
Vedlegg D. Shewhart kontrollkort.....	66
Vedlegg E. Gjenfinning	69
Vedlegg F. Beregning av CV	72
Vedlegg G. Kalibreringskurvene.....	74
Vedlegg H. MPO hos FK.....	80
Vedlegg I. MPO hos SLE	81
Vedlegg J. MPO hos PSS.....	82

Forkortelser

Abs	Absorbans
AOPP	Oksiderte protein produkter (Advanced oxidation protein products)
Br ⁻	Bromid
Cl ⁻	Klorid
CV	Variasjonskoeffisient (Coefficient of Variation)
DNA	Deoxyribonuleinsyre
EDTA	Etylendiamintetraacetat
E1	EDTA-blod sentrifugert én gang
E2	EDTA-blod sentrifugert to ganger
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Fe ³⁺	Jern(III)
Fe ⁴⁺ =O	Jern(IV)oksid
FK	Frisk kontrollperson
Gj.snitt	Gjennomsnitt
H1	Heparinblod sentrifugert én gang
H2	Heparinblod sentrifugert to ganger
H ₂ O ₂	Hydrogenperoksid
HOB _r	Underbromsyrling
HOCl	Underklorsyrling
HOI	Underjodsyrling
HOSCN	Undertiocyanidsyrlig
I ⁻	Jodid
KDa	Kilodalton
Kons.	Konsentrasjon
LOD	Deteksjonsgrense (Limit of Detection)
MPO	Myeloperoksidase
nm	Nanometer
O ₂ ^{·-}	Superoksid
OH [·]	Hydroksylradikal
PC	Protein karbonyl
pmol/L	Pikomol per liter
PSS	Primært Sjøgrens syndrom
R ²	Regresjonskoeffisient
ROS	Reaktiv oksygenforbindelse (Reactive Oxygen Species)
SCN ⁻	Thiocyanid
SD	Standardavvik
SLE	Systemtisk lupus erythematosus
TMB	Tetrametylbenzidin

1 Innledning

Denne oppgaven omhandler validering og anvendelse av en kvantitativ immunologisk analysemetode for å detektere konsentrasjon av myeloperoksidase i plasma. Metoden er anvendt for å måle myeloperoksidase hos pasienter med kroniske inflammasjonssykdommer og friske personer.

1.1 MPO som markør for inflammasjon og oksidativt stress

Myeloperoksidase (MPO) er et enzym som spiller en viktig rolle for kroppens immunforsvar og brukes som en markør for inflammasjon ved ulike sykdomstilstander. Blant annet har enzymet blitt studert i sammenheng med hjertesyke pasienter der det har vist seg at økte konsentrasjoner av MPO i plasma kan være en markør for økt risiko for å få hjerteinfarkt [1]. Pasienter med nyresvikt, som gjennomgår dialysebehandling, har økt konsentrasjon av oksiderte proteiner (AOPP) som trolig skyldes økt MPO aktivitet [2]. Enzymet er allerede en markør for inflammasjon, men det er også ønskelig å benytte MPO som en markør for oksidativt stress hos ulike pasientgrupper.

MPO finnes naturlig i to typer hvite blodceller som er spesielt viktige for uskadeliggjørelsen av bakterier: Nøytrofile granulocytter og monocytter. Under en infeksjon vil de hvite blodcellene strømme til området der infeksjonen er og sette i gang immunprosessen. MPO blir frigjort fra blodcellene for å produsere en bakteriedrepende forbindelse som kalles underklorsyrling (HOCl). Dannelsen av HOCl er altså bra for kroppen for å dempe infeksjonen. Men HOCl kan også reagere videre med andre molekyler og danne reaktive oksygenforbindelser (ROS) [3]. ROS er forbindelser som har oksiderende evner, det vil si at de kan ta opp elektroner fra andre molekyler. Oksidering av for eksempel et protein kan føre til skade på proteinet. Skade på DNA, lipider og proteiner som følge av oksidering kan igjen føre til sykdom [4]. Oksidativt stress er en tilstand der dannelsen av ROS er større en kroppens evne til å nøytralisere dem. For å nøytralisere ROS, og dermed forhindre eller dempe skadevirkningene, produserer kroppen antioksidanter [5]. Oksidativt stress kan måles ved ulike markører som for eksempel økte nivåer av oksiderte lipider eller proteiner [6].

En autoimmun sykdom er en tilstand der kroppen danner antistoffer som angriper dens egne vev og organer. To eksempler på autoimmune sykdommer er systemisk lupus erythematosus (SLE) og primært Sjøgrens syndrom (PSS) som gir kroniske inflammasjonsreaksjoner i ulike organer [7, 8]. Immunforsvaret får signaler om å gå til angrep på et område i kroppen selv om det ikke er en bakteriell infeksjon tilstede og en inflammasjonsreaksjon oppstår. Kan de stadige inflammasjonsreaksjonene føre til økte konsentrasjoner av MPO i plasma hos disse pasientene?

Hos pasienter med PSS og SLE oppstår det ofte en sykdomstilstand som kalles fatigue. Fatigue er en tilstand der pasienten føler seg konstant utmattet, uavhengig av hvor mye hvile han/hun får. Tilstanden er svært invalidiserende fordi pasienten ikke har krefter til å kunne gå

på arbeid eller være med på sosiale aktiviteter [6]. Årsakene til at fatigue oppstår er fortsatt ikke helt kjent, men det er funnet sammenhenger mellom oksidativt stress og fatigue.

Både oksidativt stress og fatigue har blitt observert hos pasienter med PSS og SLE [6, 9, 10]. Kan det være en sammenheng mellom konsentrasjon av MPO og grad av fatigue hos disse pasientene? Det er ønskelig å finne ut om økt konsentrasjon av MPO hos pasienter med kroniske inflammasjonssykdommer kan være med å forklare forekomsten av fatigue.

1.2 ELISA som kvantitativ analysemetode

ELISA er en enkel og manuell metode som kan benyttes for å måle konsentrasjonen av MPO i plasma. Fordeler med metoden er at den er spesifikk og vil kun detektere analytten en er interessert i. Analyseprinsippet baserer seg på at antistoffer vil binde seg til MPO og det er dermed konsentrasjonen av enzymet som måles. Enzymaktiviteten vil ikke spille noen rolle for resultatet. Metoden er kommersielt tilgjengelig og kjøpes i kit der alle reagenser følger med. Ulemper med slike metoder er at prosedyren inneholder mange manuelle steg som kan føre til store variasjoner mellom hver analyseserie. Det finnes både seriøse og useriøse aktører på markedet for slike produkter og det er ønskelig å finne en pålitelig og god metode for å analysere MPO i plasma. Metoden skal brukes i forskning og ikke til diagnostisk arbeid.

1.3 Oppgavens formål

Formålet med denne oppgaven er å få svar på om konsentrasjon av MPO øker hos pasienter med kronisk inflammasjon. En ønsker å finne dette ut ved å gjøre følgende:

- Validere et kommersielt ELISA-kit for å måle MPO i plasma.
- Anvende metoden til å analysere konsentrasjon av MPO hos to pasientgrupper som har kronisk inflammasjon og fatigue (SLE og PSS) og i tillegg hos en gruppe friske personer som en referansegruppe.

2 Teori

2.1 Immunologi og autoimmune sykdommer

2.1.1 Immunforsvaret og antistoffer

Immunforsvaret er kroppens forsvar mot alt den oppfatter som fremmed eller skadelig. Det kan være bakterier, virus, sopp, implantater eller uforlikelig blod og organer. Når en fremmed mikroorganisme kommer inn i kroppen startes det vanligvis en betennelsesreaksjon for å bekjempe bakteriens skadelige funksjon. En betennelse i et område kan gjenkjennes ved flere tegn som varme, hevelse, rødhet, nedsatt funksjon og smerte.

Immunforsvaret deles inn i to hoveddeler: Det uspesifikke og det spesifikke immunforsvaret. Det uspesifikke består av et ytre forsvar som hud og slimhinner og et indre som består av hvite blodceller som spiser mikroorganismer (fagocytter). Det uspesifikke angriper alt det ser på som skadelig og fremmed [11]. Det spesifikke immunforsvaret består av en type hvite blodceller som kalles lymfocytter og som deles inn to hovedgrupper; T-celler og B-celler. T-celler som blir presentert for den aktuelle mikroben formerer seg raskt og kan drepe andre celler som er infisert, eller den kan gå til angrep på den spesifikke mikroben. B-celler som oppdager den aktuelle mikroben blir aktivert og formerer seg ved å danne to nye ulike celler: Plasmaceller som danner antistoffer og hukommelsesceller som kan aktivere immunresponsen raskere ved neste infeksjon av den samme mikroben.

Antistoffene som produseres av B-cellene er spesifikke mot ett antigen, det vil si at de kan kun binde seg til for eksempel én type bakterie eller virus. Når de frigjøres under en infeksjon kan de enten gå til angrep på selve mikroben og deaktivere eller ødelegge den, eller de kan aktivere hvite blodceller som tilhører det uspesifikke immunforsvaret og dermed starte en betennelsesreaksjon [12].

2.1.2 Autoimmune sykdommer

En autoimmun sykdom er en tilstand der kroppen danner antistoffer som er spesifikke mot dens eget vev og celler. Autoantistoffer er antistoffer som retter seg mot "seg selv". Når vev og celler angripes av autoantistoffer kan det oppstå betennelsesreaksjoner og skader. Dette kan føre til det som kalles autoimmune sykdommer. Det finnes mange ulike autoimmune sykdommer og følgende av dem avhenger av hvilket type vev som blir angrepet.

Autoantistoffene kan være rettet mot spesifikke celler som for eksempel β -celler type 1 fra pankreas, som gir diabetes I, eller oligodendrocytter i det sentrale nervesystemet som fører til multippel sklerose (MS). I andre sykdomstilstander er autoantistoffene rettet mot et bredere spekter av celler eller vevstyper som for eksempel ved systemisk lupus erythematosus (SLE) [13]. Andre eksempler på autoimmune sykdommer er primært Sjøgrens syndrom (PSS) der tåre- og spyttkjertel angripes, revmatoid artritt (også kjent som leddgikt) og psoriasis som gir eksem og betennelse i huden.

Årsaken til at autoimmune sykdommer oppstår er ukjent. Det er kjent at enkelte familier har hyppigere forekomst enn andre, noe som indikerer at genetiske forhold kan ha noe å si. Det er

likevel ikke bevist at det er direkte arvelig og en tror dermed at ytre faktorer fra miljø også har betydning. Grad av sykdomsaktivitet varierer veldig fra person til person og hvilken type sykdom en har. Autoantistoffer kan påvises i en blodprøve [14].

2.1.3 Systemisk lupus erythematosus (SLE)

Systemisk lupus erythematosus (SLE) er en autoimmun sykdom som gir kroniske betennelsesreaksjoner i bindevev i sentrale systemer i kroppen. Symptomer på sykdommer kan komme fra mange ulike organer som hud, ledd, blodkar, nyrene, det sentrale nervesystemet og hjerte- og lungesystemet. I ansiktet kan det oppstå et utslett som kalles sommerfuglutslett og går fra det ene kinnbeinet til det andre over nesen. Det kan oppstå symptomer på leddgikt. Pasienter kan få betennelser i nervesystemet som kan gi svimmelhet, tretthet eller epileptiske anfall. Det finnes ikke en enkel test for å diagnostisere sykdommen, men den påvises ved å sammenligne tegn og symptomer hos pasienten med blodprøver. SLE kan være livstruende, men gir oftest en dårlig helse over lang tid [7]. Sykelig tretthet er en tilstand som ofte forekommer hos pasienter med SLE.

Forekomsten av sykdommen er 15-50 personer per 100 000 innbyggere og 90 % som blir rammet er kvinner. Den rammer hovedsakelig middelaldrende og yngre kvinner. Selv om det ikke er bevist at SLE er arvelig er det funnet en genetisk sammenheng med sykdommen. Den opptrer oftere hos familier der en eller flere familiemedlemmer har denne sykdommen eller en annen autoimmun sykdom [15]. Det kan også skyldes hormonelle forhold eller infeksjoner [7].

Det finnes enda ikke en kur mot sykdommen, men lindrende behandling kan gis. Det kan være smertestillende og betennelsesdempende medisiner, i tillegg til kremer som lindrer utslett. Ved livstruende tilstander kan det av og til brukes cellegift [7].

2.1.4 Primært Sjøgrens syndrom (PSS)

Primært Sjøgrens syndrom (PSS) er en kronisk betennesssykdom som gir betennelse i kjertler. Det er som regel tåre- og spyttkjertlene som rammes og det fører til tørrhet i munn og øyne. Andre kjertler kan også bli angrepet av sykdommen og mange ulike symptomer kan oppstå. Primært Sjøgrens syndrom er når sykdommen ikke oppstår i forbindelse med andre sykdomstilstander. Sekundært Sjøgrens syndrom er når sykdommen opptrer hos pasienter som allerede har revmatiske sykdommer som leddgikt. Forekomsten av sykdommen er ca. 0,5 % av befolkningen og 90 % som rammes er kvinner. Sykdommen rammer vanligvis i alderen 15-35 eller fra 55 år og oppover.

Symptomene er i hovedsak tørrhet i øyne og munn. I øynene kan en føle en tretthet og blinking kan være smertefullt. Øynene blir veldig følsomme for røyk eller trekk og det kan i tillegg være vanskelig å lese i mer enn korte perioder av gangen. I munnen kan mangel på spytt gjøre det vanskelig å holde tennende friske og rene. Det kan også være problematisk å svelge, særlig tørr mat. Kvinner med Sjøgrens syndrom kan oppleve tørrhet i skjeden. Luftveisinfeksjoner er vanlig på grunn av nedsatt slimproduksjon i luftrørene. Andre litt mer generelle symptomer som tretthet og smerter i muskler og ledd kan også inntreffe. Sykdomsaktiviteten og grad av symptomer varierer i perioder. I tillegg får Sjøgrenpasienter

ofte fatigue som er en sykkelig tretthetstilstand og kan gjøre pasienten ute av stand til å arbeide eller leve et normalt liv.

Det kan være vanskelig å diagnostisere sykdommen fordi symptomene kan være vage og gjelde for mange ulike sykdomstilstander. Siden symptomene også kan komme og gå i perioder kan det ta lang tid før tilstanden er så typisk at en kan stille diagnosen. En del av tegn og symptomer overlapper med dem for SLE. For å diagnostisere Sjøgrens syndrom kan det tas blodprøver der en kan påvise autoantistoffer, vevsprøver av spyttkjertel og testing av tåreproduksjon. Som for SLE finnes det ingen kur mot PSS, bare lindrende og smertestillende behandlinger [8].

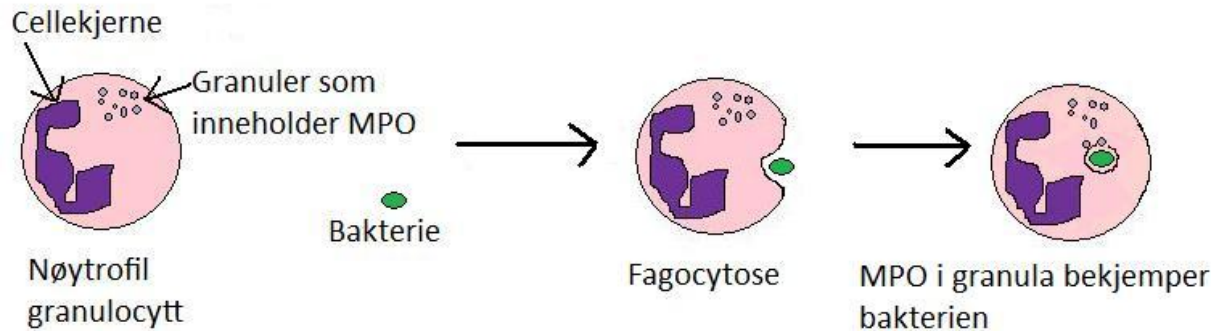
2.1.5 Fatigue

Fatigue er en tilstand der en føler seg konstant trett og utmattet. Det skiller seg fra den normale følelsen av tretthet som man får etter fysiske anstrengelser eller lite søvn. Konsentrasjonsvansker og muskelsmerter er også vanlige symptomer. En person med fatigue vil føle seg like sliten og utmattet uansett om han/hun har fått nok søvn og hvile. Det kalles kronisk fatigue når tilstanden varer i mer enn seks måneder [16]. Fatigue opptrer ofte i sammenheng med andre sykdomstilstander, for eksempel kroniske inflammasjonssykdommer som PSS og SLE, psykiatriske sykdommer og kreft. Noen pasienter har ikke krefter til å arbeide eller å være sosial som kan føre til nedsatt livskvalitet. Symptomene er svært uspesifikke og subjektive. Målinger av fatigue baserer seg i hovedsak på hvordan pasienten selv føler seg noe som gjør det vanskelig å diagnostisere tilstanden. Fatigue kan forveksles med andre tilstander som gir lignende symptomer som for eksempel depresjon eller søvnmangel [6].

Årsakene til utvikling av fatigue er enda ikke fullstendig kartlagt. Det er gjort studier som viser at proinflammatoriske cytokiner kan spille en viktig rolle for utviklingen av sykdommen. Cytokiner er proteiner som fungerer som signalmolekyler og er viktige for kommunikasjon mellom celler. Under en inflammasjon frigjøres proinflammatoriske cytokiner og de kan påvirke hjernen til å indusere ”sykdomsoppførsel”. Sykdomsoppførsel vil blant annet si tap av energi, tilbaketrekking fra sosiale aktiviteter, og økt behov for søvn til tross for at en sover normalt om natten [17]. Fatigue kan være indusert av de samme proinflammatoriske cytokiner som induserer ”sykdomsoppførsel”. Det er også funnet sammenhenger mellom fatigue og oksidativt stress hos pasienter med kroniske inflammasjonssykdommer [6].

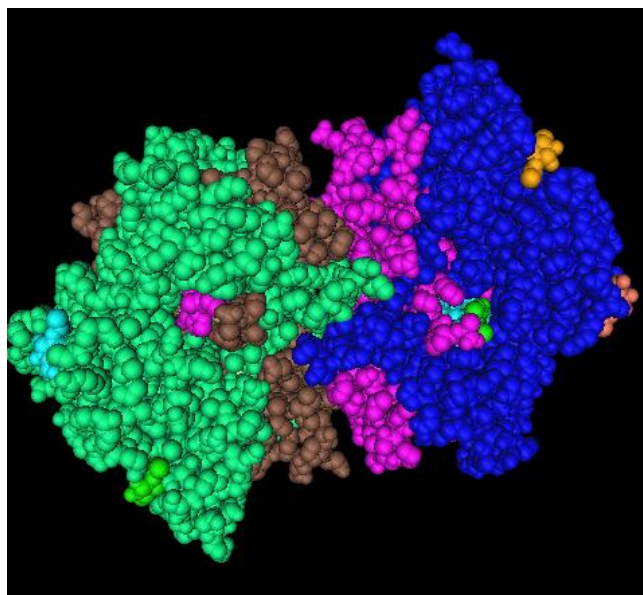
2.2 Myeloperoksidase

Myeloperoksidase (MPO) er et peroksidaseenzym som finnes i nøytrofile granulocytter og i andre typer hvite blodceller, som for eksempel monocytter. De hvite blodcellene er en del av kroppens immunforsvar. Nøytrofile granulocytter inneholder granuler og inne i granulene finnes MPO i høye konsentrasjoner (Figur 1). Enzymet spiller en rolle i bekjempelsen av potensielt farlige bakterier som fagocytteres (spises opp) av nøytrofile granulocytter [18, 19].



Figur 1. Nøytrofil granulocyt fagocytterer (spiser opp) en bakterie. MPO i granula deltar i bekjempelsen av bakterien.

MPO (Figur 2) har en molekylvekt på 150 kDa og er en dimer, det vil si at den består av to subenheter. Subenhetene er to identiske monomerer på 73 kDa hver som er bundet sammen av en cysteinbro ved Cys153. Hver monomer består av en lett og en tung kjede. Det er funnet tre isoformer av MPO. Variasjonen ligger i den tunge kjeden som har molekylvekt på henholdsvis 60, 59 og 57 kDa. Den lette kjeden er lik for alle isoformene og har en masse på 15 kDa [3, 20].



Figur 2. Struktur av myeloperoksidase med to tunge kjeder (blå og grønn) og to lette kjeder (brun og lilla) [21]. Figuren er modifisert i dataprogrammet Cn3D for å få en god illustrasjon.

MPO er et kationisk protein og har isoelektrisk punkt på ca. 10 som betyr at ved pH 10 har det en total ladning på null. Under fysiologisk pH (7,4) har proteinet en positiv ladning og kan binde seg til negativt ladde molekyler. Proteinets aktive sete er en hemgruppe som er bundet til de tunge kjedene. Hemgruppen er en modifisert jern protoporfyrin IX [22]. Den sitter dypt nede i en smal åpning som gjør at kun hydrogenperoksid (H_2O_2) og små anioner har adgang til jernatomet i hemgruppen.

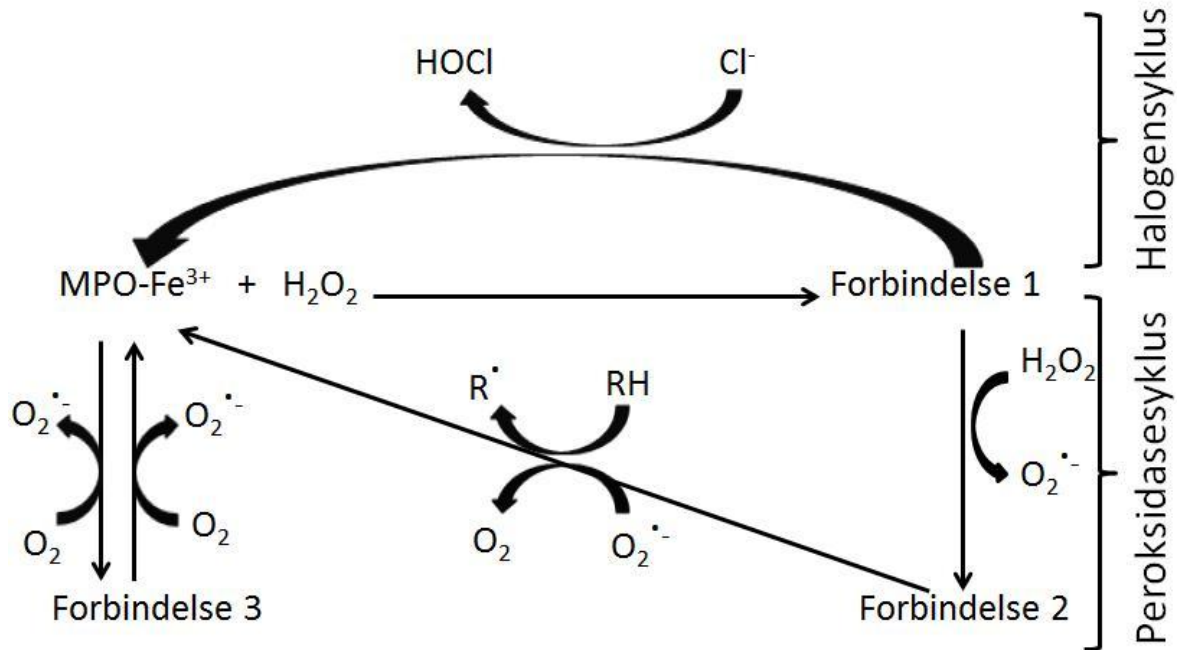
2.2.1 Enzymatisk funksjon

MPO deltar i bekjempelsen av bakterier ved å katalysere reaksjoner mellom H_2O_2 og halider

(Cl⁻, Br⁻, I⁻) og pseudohalid (SCN⁻) og danne hypohalidsyrer som underklorosyring (HOCl, formel 1), underbromsyrlig (HOBr), underiodosyring (HOI) og underthiocyanidsyring (HOSCN). HOCl er svært viktig for de nøytrofile granulocyttenes bekjempelse av bakterier.



Den enzymatiske aktiviteten til MPO er en syklus som deles inn i to undersykluser; peroksidasesyklusen og halogensyklusen (Figur 3).

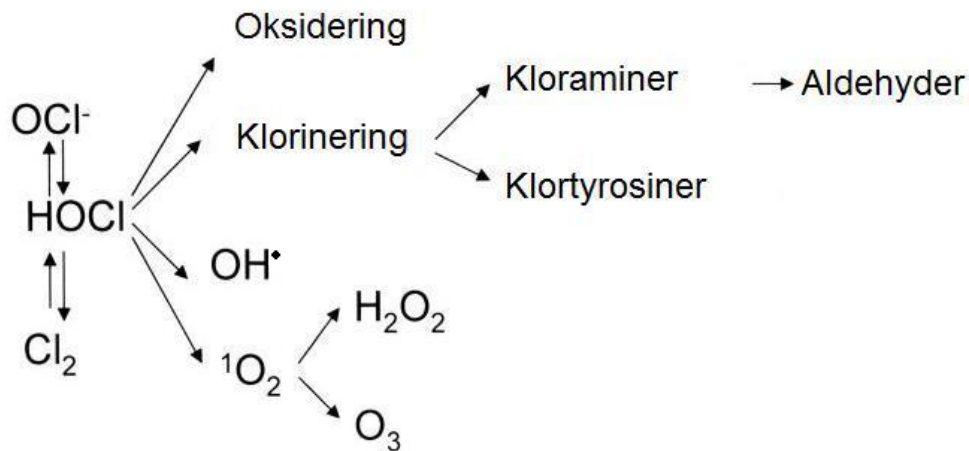


Figur 3. MPOs enzymatiske reaksjonssyklus [3].

Begge syklusene starter med at MPO-Fe³⁺ (som er den opprinnelige formen av MPO) reagerer med H₂O₂ og danner Forbindelse 1 (en jernoksidforbindelse; Fe⁴⁺=O med en porfyrin π-kationradikal) og H₂O. Herfra er det to veier tilbake til MPO-Fe³⁺. Gjennom halogensyklusen blir et halid (X) oksidert ved at det donerer to elektroner til Forbindelse 1 og danner HOX. Forbindelse 1 har blitt redusert og gått tilbake til MPO-Fe³⁺-formen. MPO produserer hovedsakelig HOCl og HOSCN under fysiologisk pH.

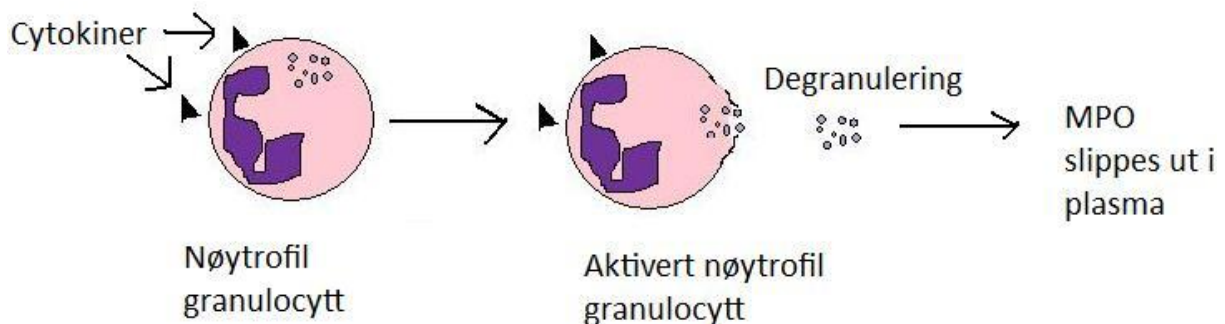
Gjennom peroksidasesyklusen går Forbindelse 1 tilbake til MPO-Fe³⁺ formen via to ett-elektron reduksjonsreaksjoner og et mellomstadium kalt Forbindelse 2. Forbindelse 1 reagerer med H₂O₂ og reduseres til Forbindelse 2 (Fe⁴⁺=O). Videre reduseres Forbindelse 2 tilbake til MPO-Fe³⁺ av O₂^{•-} eller andre reduserende molekyler. MPO kan altså katalysere dannelsen av både hypohalidsyrer og reaktive oxygenforbindelser. Halider og peroksidasesubstrater konkurrerer om å reagere med Forbindelse 1 [3, 18]. MPO-Fe³⁺ kan danne en tredje forbindelse (Forbindelse 3) ved å gjennomgå en reduksjon der O₂^{•-} blir oksidert. Forbindelse 3 kan gå tilbake til MPO-Fe³⁺ ved å bli oksidert av O₂, som blir redusert til O₂^{•-}.

HOCl har oksiderende evner, men den er ikke fullt så reaktiv som frie radikaler. Molekylet kan derimot reagere videre og danne reaktive oksygenforbindelser (ROS) som igjen kan føre til skade i vevet på grunn av oksidering (Figur 4).



Figur 4. HOCl kan danne reaktive oksygenforbindelser (ROS) [18].

Under en inflammasjon aktiveres granulocytene ved at de blir stimulert av for eksempel signalmolekyler (cytokiner) eller av patogene mikroorganismer (Figur 5). Aktivering fører til degranulering som vil si at innholdet i granula, blant annet MPO, slippes ut i det ekstracellulære rommet. Ved kroniske inflammasjonssykdommer kan MPO bli stimulert til å danne oksidanter til feil tid, på feil sted eller i for stor grad, som kan det føre til oksidativt stress [3].



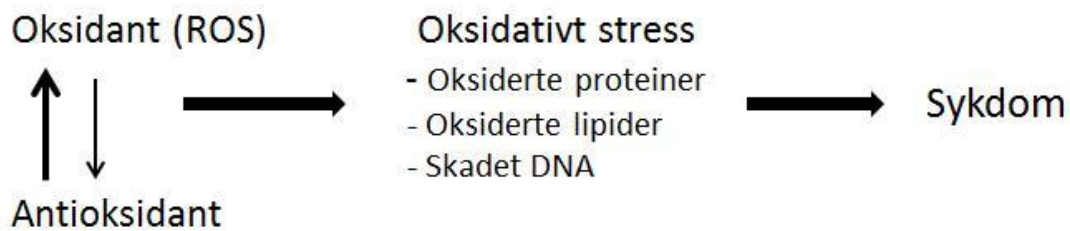
Figur 5. Cytokiner stimulerer nøytrofile granulocytter som fører til aktivering og degranulering.

2.2.2 Oksidativt stress

Oksidativt stress er en tilstand der det er ubalanse mellom nivået av reaktive oksygenforbindelser (ROS) og antioksidanter (Figur 6). Denne tilstanden oppstår når dannelsen av ROS er høyere enn kroppens evne til å nøytralisere dem.

ROS har evne til å oksidere andre molekyler og er svært reaktive. Det vil si at de er lite spesifikke og kan reagere med nesten hvilket som helst molekyl. OH^\cdot er en av de mest reaktive oksygenforbindelsene. Oksidering av proteiner, lipider eller DNA kan føre til skade

på cellekomponenter som igjen fører til sykdomstilstander[4]. Antioksidanter er molekyler som har evne til å nøytralisere oksidantene slik at de ikke lenger er oksidative. De kan også reparere skader som allerede har skjedd og dermed hindre skadevirkningene. Tre eksempler på viktige antioksidanter, som produseres naturlig i kroppen, er enzymene katalase (CAT), superoksid dismutase (SOD) og glutation peroksidase (GPX) [5]. Oksidativt stress kan måles ved ulike markører, som for eksempel oksiderte proteiner eller lipider, skadet DNA eller økt aktivitet av antioksidanter.



Figur 6. Oksidativt stress er en tilstand der konsentrasjonen av oksidanter øker i forhold til antioksidanter.

2.2.3 MPO i humant plasma

Normalt finnes MPO kun i svært lave konsentrasjoner i plasma. Konsentrasjonene øker ved aktivering av nøytrofile granulocytter og monocytter, Figur 5. MPO kan fungere som en biomarkør for ulike sykdomstilstander. I studier på personer med brystmerter og hjertesykdom er det vist at MPO kan fungere som en markør for økt risiko for å få hjerteinfarkt. Inflammasjon og aktivering av nøytrofile granulocytter og monocytter har blitt sett i sammenheng med diverse hjertesykdommer [1]. Pasienter med nyresvikt, som gjennomgår dialysebehandling, har økt konsentrasjon av oksiderte proteiner (AOPP) som trolig skyldes økt MPO aktivitet [2]. Økte nivåer av MPO kan gi økt konsentrasjon av oksiderte proteiner og lipider. MPO kan derfor fungere som en oksidativt stress-markør.

Det er gjort flere studier der MPO er analysert i plasma hos friske personer og ved ulike sykdommer (Tabell 1).

Tabell 1. MPO målt med ELISA hos friske kontrollpersoner og pasienter med SLE.

Forfatter	Plasmatype	Friske personer [MPO] ng/ml	SLE [MPO] ng/ml
Scheffer et al. [23]	EDTA	48,15 (37,5-58,35) ^a n=48	
Wendland et al. [24]	EDTA	51,4 ± 15,5 ^b n=15	
Brennan et al. [1]	Ikke oppgitt	18 (14,6-21,9) ^a n=115	
Telles et al. [25]	Heparin	5,00 (3,33-7,08) ^a n=70	5,99 (4,38-8,64) ^a n=71

^aMedian (interkvartil spredning)

^bGjennomsnitt ± standardavvik (SD)

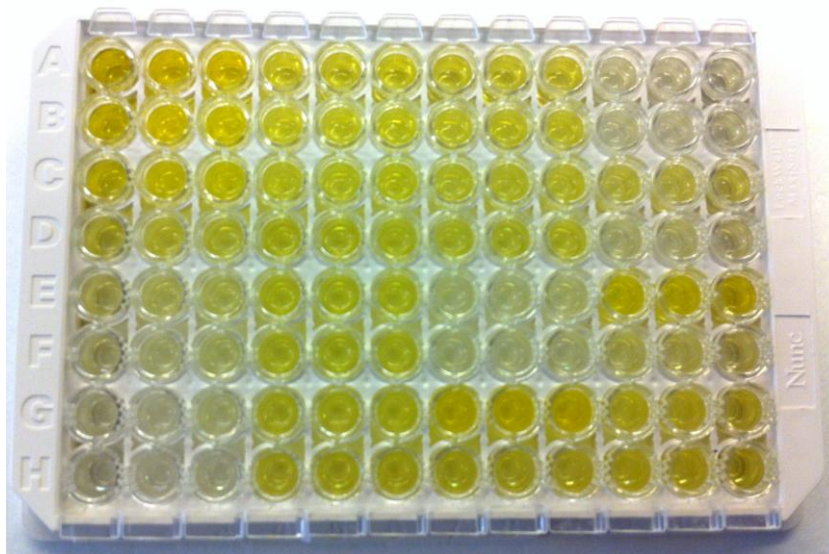
^cOmregnet fra pmol/L

2.3 Analyseprinsipp for ELISA

ELISA står for Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay og er en immunologisk analysemetode der en benytter antistoffer som er spesifikke mot det proteinet en ønsker å detektere. Metoden brukes for å bestemme konsentrasjonen av MPO i plasma og tar ikke hensyn til enzymaktiviteten.

2.3.1 Metodebeskrivelse

En ELISA-plate består av en ramme og tolv rekker med åtte brønner i hver rekke som kan plasseres på platen etter hvor mange prøver som skal analyseres (Figur 7).

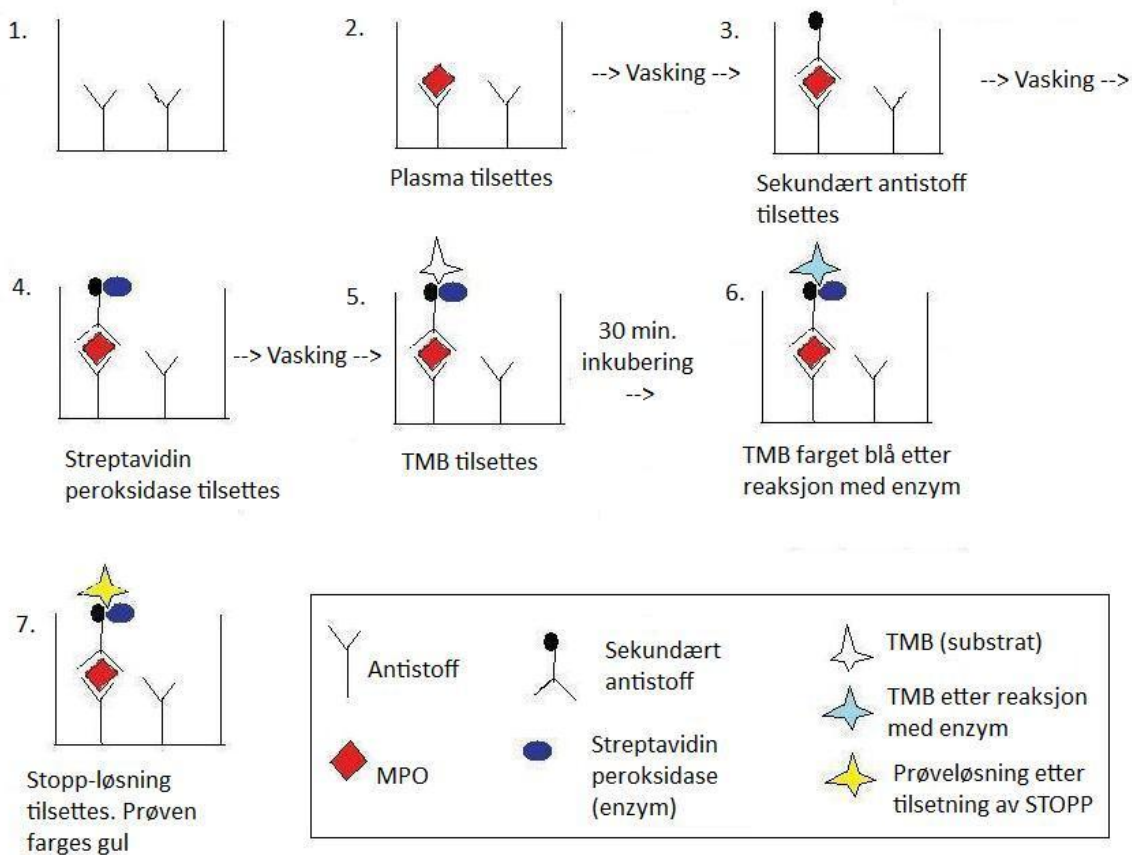


Figur 7. ELISA-plate med 96 brønner. Brønnene er fylt med prøveløsning av varierende konsentrasjoner som gir varierende fargeintensitet [26].

Validering og anvendelse av ELISA-metode for å måle myeloperoksidase i plasma

På en plate kan det maksimalt være 96 mikrobrønner. Alle kjemiske reaksjoner foregår i brønnene. Ved følgende beskrivelse av analyseprinsippet steg for steg henvises det samtidig til nummerering i Figur 8.

1. Hver brønn er på forhånd dekket med antistoff som er spesifikke mot MPO.
2. Plasma tilsettes brønnen og MPO som er til stede i prøven vil binde seg til antistoffene. Det er viktig at antistoffene er i overskudd i forhold til MPO for at alle MPO i prøven skal kunne binde seg. Brønnen blir så vasket for å fjerne alle komponenter som ikke er bundet.
3. Et sekundært antistoff, som er merket med biotin, tilsettes i overskudd og vil binde seg til MPO. Brønnen vaskes igjen slik at alle ubundne antistoffer blir fjernet.
4. Et enzym som kalles streptavidin peroksidase tilsettes brønnen i overskudd og vil kunne binde seg til alle biotinmerkede, sekundære antistoff som er tilstede. Alle ubundne enzymer blir fjernet ved vasking.
5. Nest siste steg er tilsetning av substratet tetrametylbenzidin (TMB).
6. Når TMB reagerer med streptavidin peroksidase omdannes det til et farget molekyl og løsningen vil dermed skifte farge fra blankt til blått. Jo flere enzymer som er bundet i brønnen, jo flere TMB vil reagere og skifte farge og dermed gi en kraftigere blåfarge.
7. Etter inkubasjon i 30 minutter stoppes reaksjonen mellom TMB og enzym ved å tilsette en stoppløsning som består av oksalsyre. Løsningen i brønnen skifter farge fra blått til gult. Jo kraftigere blåfarge det er i en brønn, jo kraftigere vil gulfargen bli.

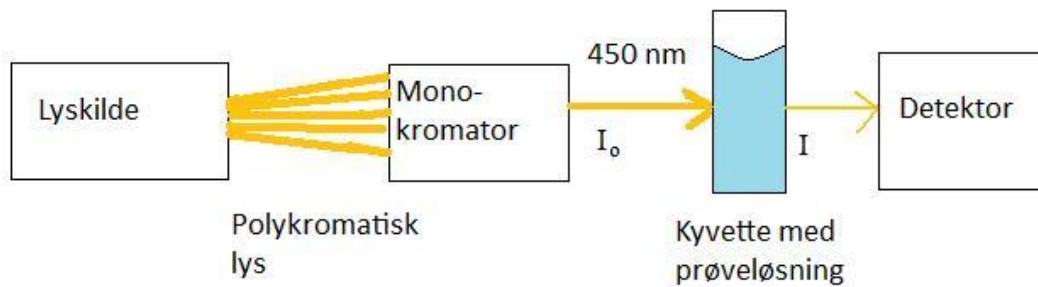


Figur 8. Prinsipp for deteksjon av MPO med ELISA-metode.

Prinsippet går ut på at jo høyere konsentrasjon av MPO det er i en prøve, jo høyere vil fargeintensiteten i brønnen bli. Fargeintensiteten leses av fotometrisk i en plateleser med en bølgelengde på 450 nm. En kalibreringskurve brukes for å beregne konsentrasjon av MPO i hver brønn [27].

2.3.2 Prinsipp for spektrofotometri

Spektrofotometri er en metode som brukes for å måle grad av lysabsorpsjon i en prøveløsning.



Figur 9. Prinsipp for spektrofotometri.

Prinsippet, vist skjematisk i Figur 9, går ut på å sende en lysstråle med én bestemt bølgelengde gjennom en transparent kyvette som inneholder prøveløsningen. På andre siden av kyvetten er det plassert en detektor som registrerer intensiteten av transmittert lys (lys som har gått gjennom kyvetten). Siden noe av lyset blir absorbert av prøveløsningen er intensiteten av transmittert lys svakere enn intensiteten til den opprinnelige lysstrålen. Intensiteten av transmittert lys beregnes ut fra formel 2.

$$T = I/I_0 \quad (2)$$

T = Transmisjon

I_0 = Intensitet av opprinnelig lysstråle

I = Lysstråle som går igjennom kyvetten.

Absorbans beregnes ved formel 3.

$$A (\text{absorbans}) = -\log T \quad (3)$$

Absorbansen er proporsjonal med konsentrasjon av analytt i prøveløsningen [28]. I plateleseren for ELISA-platen blir lyset sendt gjennom hver brønn vertikalt og absorbans for hver brønn blir beregnet. Beer-Lamberts lov (4) brukes for å beregne konsentrasjon:

$$A = b * c * \epsilon \quad (4)$$

A = Absorbans

b = Bredde på kyvetten

c = Konsentrasjon

ϵ = Ekstingsjonskoeffisient

2.4 Validering av metode

Når en analysemetode skal valideres gjøres dette med hensyn på flere parametere. Validering av metoden før den tas i bruk gjøres for å finne ut hvor pålitelig den er, om den er stabil over en lengre periode og om resultatene en får ligger nær prøvenes sanne verdi. Noen av de viktigste parameterne er:

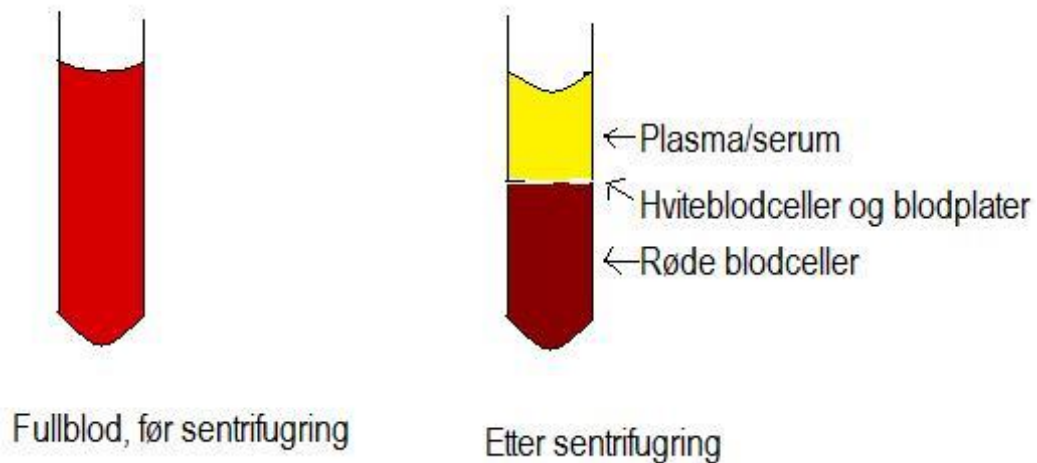
- Valg av prøvemateriale
- Kurvetilpasning for kalibreringskurve
- Deteksjonsgrense
- Analysevariasjon
- Stabilitet over tid (ved bruk av Shewhart kontrollkort)
- Gjenfinning

2.4.1 Prøvemateriale

Hvilket prøvemateriale som er best egnet avhenger av hvilken analytt som skal detekteres. Til analyser av proteiner i blod er det vanlig å bruke enten plasma eller serum. Blod består av røde og hvite blodceller, blodplater og plasma. Plasma er en proteinrik væske som alle blodkomponentene flyter rundt i. For å skille plasma fra blodceller og blodplater sentrifugeres prøveglasset slik at alle komponentene i blodet separeres etter tyngde. Jo kraftigere sentrifugering, jo bedre skilles blodkomponentene fra hverandre. Plasma vil havne på toppen fordi det veier minst og dermed kan det pipetteres av fra resten av blodet (Figur 10). For å fjerne MPO har lekket ut i plasma *in vitro*, det vil si i prøverøret etter tapping, kan plasma sentrifugeres på nytt etter at det er skilt fra blodcellene. Hvis blodet koagulerer (blodplater og røde blodceller klotter seg sammen) før sentrifugering fjernes blant annet proteinet fibrinogen fra plasma og det letteste sjiktet kalles da serum [29].

Målet er å kvantifisere MPO som flyter fritt i plasma og ikke det som er inne i blodcellene (de nøytrofile granulocytene og monocytene). Under prøvetaking og i den preanalytiske fasen er det derfor viktig å unngå lekkasje av MPO fra blodceller i størst mulig grad. Plasma er et foretrukket prøvemateriale fremfor serum fordi MPO slippes ut av de nøytrofile granulocytene under koaguleringen av blodet [27].

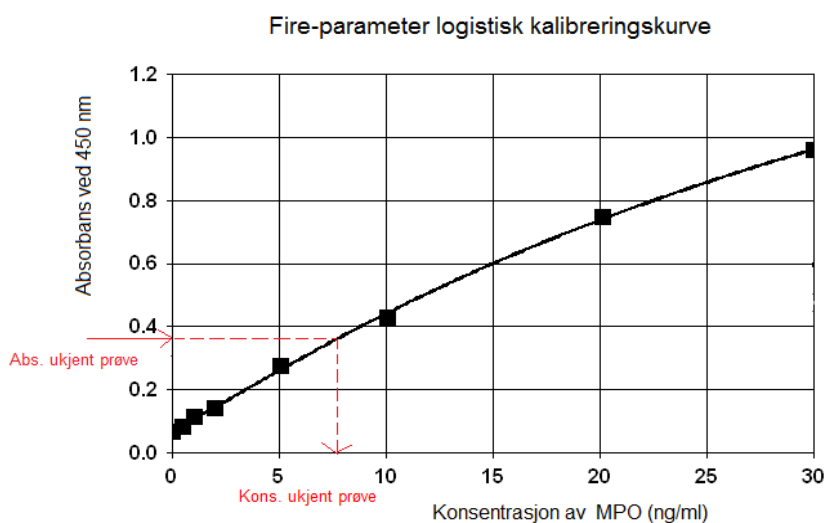
Hvis blodprøven tappes i et glass uten tilsetning av en antikoagulerende forbindelse vil det koagulere. For å kunne få plasma og ikke serum må blodet blandes med en slik tilsetning. To eksempler på en slik forbindelse som er vanlig å bruke til blodanalyser er etyldiamintetraacetat (EDTA) og litium-heparin. EDTA hindrer koagulasjon ved å binde blodets Ca^{2+} -ioner som er nødvendige for å kunne starte koagulering [30]. Heparin hemmer koaguleringen ved å aktivere og forsterke en av blodets egne koagulasjonshemmere; antitrombin III [31]. Det er tidligere gjort studier der MPO ble kvantifisert i EDTA- og heparinplasma med ELISA-metode og konsentrasjonene ble signifikant høyere i heparinplasma. I flere av studiene ble det konkludert med at EDTA-plasma anbefales for måling av MPO [23, 32], mens andre har anbefalt heparinplasma [24, 27].



Figur 10. Prøveglass med fullblod før sentrifugering (til høyre) og etter sentrifugering (til venstre).

2.4.2 Kalibreringskurve

I en immunologisk analysemetode som ELISA måles absorpsjonen av et lyssignal for hver brønn. For å kunne finne ut hvilken konsentrasjon av MPO hver absorbans tilsvare brukes en kalibreringskurve. En serie kalibreringsløsninger med kjente konsentrasjoner av MPO blir analysert på samme måte som prøvene. I et diagram plottes de målte absorbansene mot den kjente konsentrasjonen av hver kalibrator. Langs x-aksen plottes konsentrasjonene, mens absorpsjonene plottes langs y-aksen (Figur 11). Det trekkes en kurve mellom alle punktene og ligningen for kurven blir regnet ut i et dataprogram. For å finne ut konsentrasjonen av en ukjent prøve brukes ligningen for kurven til å beregne hvilken konsentrasjon den målte absorbansen tilsvare. Prinsippet er demonstrert i Figur 11 der den røde pilen på y-aksen viser målt absorbans av en ukjent prøve. Den stiplede linjen viser hvilken konsentrasjon av MPO som den målte absorbansen tilsvare.



Figur 11. Fire-parameter logistisk kalibreringskurve.

For at en skal få riktig resultat når en beregner konsentrasjonene av MPO er det viktig at kurven ligger nært alle punktene og at det ikke er for store avvik mellom hvert målepunkt og kurven. Jo bedre kurvetilpasning, jo mer pålitelig blir resultatene. Det finnes ulike kurvetilpasninger og to som er mye brukt er lineær og logistisk kurvetilpasning. Ved lineær kurvetilpasning trekkes en rett linje gjennom alle målepunktene og ligningen for kurven blir:

$$y = ax + b \quad (5)$$

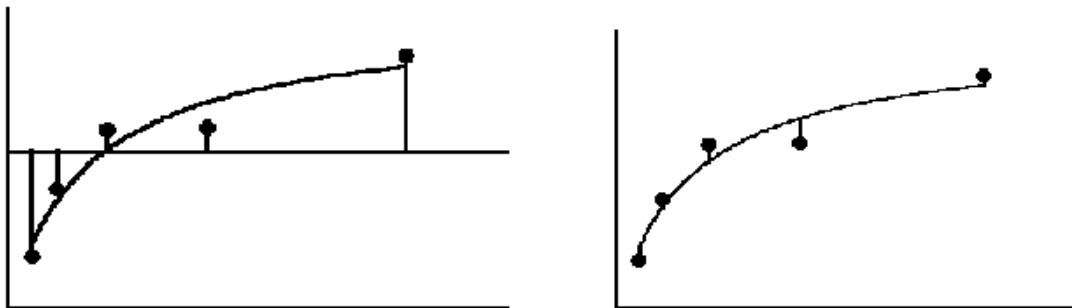
Kurven som vises i Figur 11 er en fire-parameter logistisk kalibreringskurve og ligningen for kurven er:

$$y = b + (a - b) / (1 + xc)^d \quad (6)$$

For å finne ut om kurvetilpasningen er god kan en se på avstanden mellom hvert enkelt målepunkt og kurven. Denne avstanden kalles residual og skal være så liten som mulig (Figur 12). R^2 brukes også som et mål på hvor god kurvetilpasningen er. R^2 beregnes ut fra følgende formel:

$$R^2 = 1,0 - \frac{SS_{reg}}{SS_{tot}} \quad (7)$$

SS_{reg} er summen av kvadratet av alle residualene. SS_{tot} beregnes ved å måle avstanden fra gjennomsnitt av y (den horisontale linjen i bildet til venstre i Figur 12) og summere kvadratene av disse avstandene.



Figur 12. Bildet til venstre viser hvordan en måler avstand fra gjennomsnitt av y (den horisontale linjen midt på y -aksen) til hvert målepunkt. Bildet til høyre viser hvordan en måler hver residual; avstanden fra hvert målepunkt til kurven [33].

R^2 er et tall mellom 1 og 0 og har ingen benevnning. Jo bedre kurven treffer på målepunktene, jo nærmere vil R^2 bli 1,0 [34].

2.4.3 Deteksjonsgrense

Deteksjonsgrensen (LOD) er den laveste konsentrasjonen av analytt i en prøve som metoden klarer å detektere. Blir konsentrasjonen lavere enn deteksjonsgrensen vil ikke metoden klare å skille mellom signal fra analytten og bakgrunnsstøy. Deteksjonsgrensen er bestemt som den laveste konsentrasjonen som gir en absorbans som er 2 ganger standardavvik (SD) høyere enn gjennomsnittet for seks blankprøver [35].

$$LOD = Gj. snitt abs + (2 * SD) \quad (8)$$

Andre steder brukes gjennomsnitt + 3*SD for å beregne LOD [36]. I dette tilfellet blir avstanden mellom blank og deteksjonsgrensen større som fører til at sikkerheten rundt deteksjonsgrensen blir høyere.

2.4.4 Analysevariasjon

En metode vil alltid variere noe fra analyse til analyse fordi en ikke klarer å utføre prosedyren helt identisk for hver gang. For at variasjonen skal bli minst mulig må alle trinnene utføres like presist og nøyaktig ved hver analysering. Variasjonen vil være mindre mellom prøver som analyseres på samme plate enn prøver som analyseres på to ulike plater. Prøver som analyseres på samme plate har lik tid på inkubering, samme konsentrasjon på alle reagenser og konsentrasjonene regnes ut fra samme kalibreringskurve.

Årsaker til variasjon mellom prøver på samme plate kan være:

- Unøyaktig fortykning av plasma ved dårlig pipettering som fører til konsentrasjonen blir ulik.
- At brønnene i platen ikke inneholder lik mengde antistoff (ikke homogene plater).
- At reagensene tilsettes i ulike mengder til hver brønn ved bruk av unøyaktige multipipetter.

Faktorer som kan føre til variasjon mellom to analyseplater:

- Unøyaktig tilberedelse av reagenser og kalibratorløsninger som fører til varierende konsentrasjoner.
- Varierende inkuberingstid: Om alle prøvene på en plate får reagere for lenge/for lite med reagensene i brønnene vil det kunne føre til for høyt eller for lavt resultat.
- Varierende temperatur: Kjemiske og enzymatiske reaksjoner er temperaturavhengige. For at alle reaksjoner skal gå like fort hver gang er det viktig at temperaturen i rommet er stabil.

En instrumentell metode vil som regel ha mindre variasjon enn en manuell metode fordi utførelsen av hvert trinn blir gjort mer presist og nøyaktig, noe som minsker graden av tilfeldige feil. Jo flere manuelle trinn i en metode, jo større usikkerhet blir knyttet til resultatene. For å få et tall på variasjonen beregnes variasjonskoeffisient, CV. CV er relativt standardavvik (SD) og beregnes fra gjennomsnittet og SD av resultatene (formel 9). Lav spredning av paralleller gir lav CV.

$$CV = \frac{SD}{Gj.snitt} * 100 \% \quad (9)$$

SD = Standardavvik for måleparalleller eller prøveparalleller

Gj.snitt = Gjennomsnitt av måleparalleller eller prøveparalleller

Måleparalleller: Når en prøve skal analyseres lages det en prøvefortynning.

Prøvefortynningen pipetteres ut i tre brønner og hver brønn er én måleparallell. Deretter beregnes gjennomsnittet, SD og CV.

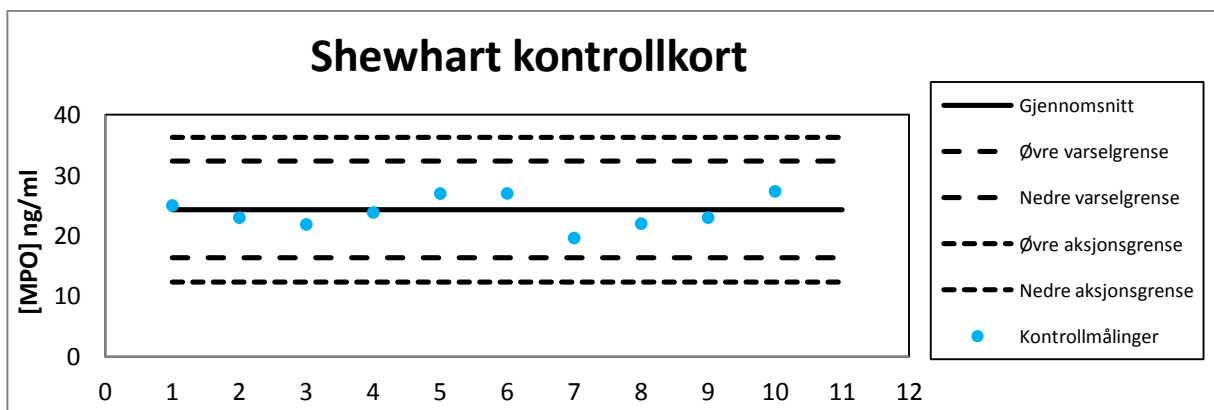
Prøveparallell: En prøve som analyseres to eller flere ganger ved at det lages to eller flere prøvefortynninger ut fra samme plasma. Hver prøvefortynning analyseres deretter i tre måleparalleller.

Innen plate-variasjon: En kan beregne innen plate-variasjon for å få et mål på hvor stor spredningen er innen en plate. Innen en plate kan en både beregne CV for tre måleparalleller og CV for flere prøveparalleller. For å kunne godkjenne senere prøveresultater skal spredningen mellom måleparallellellene/prøveparallellellene være lavere enn den CV 'en som er bestemt. Om spredningen er høyere enn bestemt den bestemte CV 'en er usikkerheten rundt resultatet for stor og påliteligheten er ikke god nok [37].

Mellom plate-variasjon: En kan beregne «mellom plate-variasjon» for prøver som er målt på ulike plater for å få et tall på variasjonen mellom platene. Det beregnes CV for gjennomsnitt av prøver som er analysert på flere ulike plater.

2.4.5 Shewhart kontrollkort

Et kontrollkort (Figur 13) kan brukes for å se om analysemetoden er under kontroll over tid og til å se om en kan godkjenne ett analysesett (analyse av én plate). Shewhart kontrollkort er et diagram der en plotter inn resultatet av kontrollmålinger som er gjort over tid. Langs y-aksen er målt konsentrasjon av analytt (her MPO) og langs x-aksen er analyseplatene. Ved etablering av kontrollkortet analyseres en kontrollprøve mange ganger på ulike plater og et gjennomsnitt av alle målingene beregnes. Den hele horisontale linjen i kortet er gjennomsnitt, første linje over og under gjennomsnitt er varselgrenser, mens de to ytterste linjene er aksjonsgrenser. De blå punktene er resultatet av en kontrollmåling per analyseplate.



Figur 13. Shewhart kontrollkort.

Poenget med et kontrollkort er å vurdere om man kan godkjenne eller må forkaste et analysesett og å vurdere om analysemetoden er under kontroll over en periode. Verdiene av kontrollmålingene skal være normalfordelt og ligge innenfor varselgrensene, litt over og litt under gjennomsnittet. Om alle målepunktene havner på den ene siden av gjennomsnittet er det en indikasjon på en systematisk feil der samtlige verdier blir for lave eller for høye. Om det er mange tilfeldige feil blir det stor spredning mellom målepunktene. Om resultatene av to

kontrollprøver som er målt på to ulike plater har for stort avvik kan det indikere at pasientprøvene som analyseres på disse platene ikke er sammenlignbare.

Det finnes to typer feil en kan gjøre når en vurderer om et analysesett kan godkjennes eller må forkastes.

Type 1 feil: Forkaster et analysesett som egentlig kunne vært godkjent.

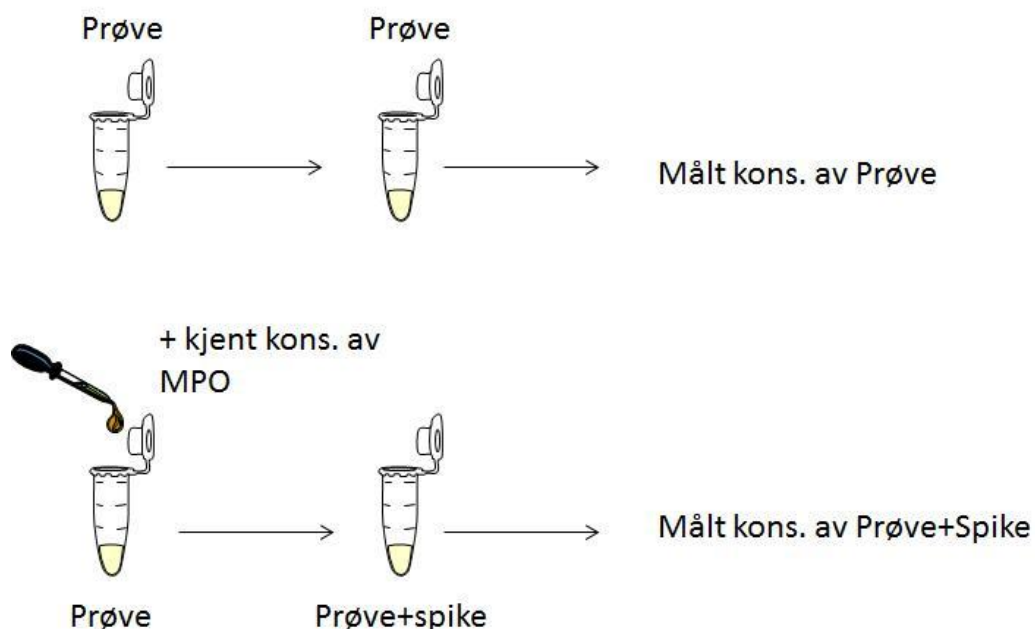
Type 2 feil: Godkjenner et analysesett som er mislykket.

Hvis en bruker to ulike kontrollprøver i hvert analysesett øker sannsynligheten for at en gjør type 1 feil, mens sannsynligheten for å gjøre type 2 feil minkes. Det er derfor nyttig å ha med to kontrollprøver i hvert analysesett [38].

Kontrollmaterialet bør ha de samme egenskapene som pasientprøvene og analyseres på samme måte. En kontrollprøve kan være en vanlig plasmaprøve fra en frisk person eller en pasient som er analysert mange ganger tidligere og har en kjent verdi.

2.4.6 Gjenfinning

Gjenfinning er et mål på metodens nøyaktighet. Den målte konsentrasjonen av MPO i en prøve stemmer ikke alltid med den «sanne» konsentrasjonen i prøven. En kan gjøre forsøk der man tilsetter en kjent mengde MPO til en prøve (prøven blir «spiket») og når prøven er analysert beregnes forholdet mellom målt konsentrasjon og den tilsatte konsentrasjonen (Figur 14). Hvis gjenfinning er på hundre prosent vil den målte konsentrasjonen være lik den tilsatte konsentrasjonen. Formel 10 brukes for å beregne gjenfinning.



Figur 14. «Spiking» av en plasmaprøve for å beregne gjenfinning.

Validering og anvendelse av ELISA-metode for å måle myeloperoksidase i plasma

$$\text{Målt mengde analytt} = \text{Kons. Prøve+Spike} - \text{Kons. Prøve}$$

$$\text{Gjenfinning} = \frac{\text{Målt mengde analytt}}{\text{Tilsatt mengde analytt}} * 100 \% \quad (10)$$

Gjenfinningen viser hvor stor prosent av prøvens sanne verdi som metoden klarer å «finne igjen». For å beregne en prøves sanne verdi multipliseres den målte konsentrasjonen med en faktor som regnes ut ved følgende formel:

$$\text{Faktor} = \frac{100 \%}{\text{Beregnet gjenfinning \%}} \quad (11)$$

Analytten som tilsettes bør ha de samme egenskapene som den allerede eksisterende analytten i prøven for at gjenfinningen skal bli riktig. Om tilsatt analytt for eksempel har en dårligere reaksjonsevne enn originalen, kan den beregnede gjenfinningen bli for lav og faktoren en skal multiplisere resultatene opp med blir for høy [39].

3 Materialer og metode

3.1 Kjemikalier og utstyr

ELISA MPO kit (BioVendor, LOT-nummer XII-155). For detaljert innholdsliste henvises det til vedlegg A og til brukermanualen [27]. Alle reagenser ble oppbevart i kjøleskap (4 °C).

Destillert vann ble brukt til fortykning av reagensene.

Til avlesning av platene ble det brukt en plateleser fra Thermo: Multiscan Ascent. Alle avlesningene ble gjort ved bølgelengde 450 nm. Data ble bearbeidet i dataprogrammet Ascent Software Version 2.6.

Øvrig laboratorieutstyr som ble brukt: Enkle automatpipetter og multipipetter, Pasteur pipetter, glassflasker, begerglass, målesylindre og små titreringsrør.

3.2 Biologisk materiale

Testing av prøvemateriale

Det ble tatt blodprøver på EDTA- og heparinglass fra to friske personer. Plasma ble separert fra blodcellene etter 1 eller 2 sentrifugeringer. Fra hver person er det fire typer plasma, se Tabell 2.

Tabell 2. Fire plasma typer ble testet.

	EDTA	Heparin
1 sentrifugering	E1	H1
2 sentrifugeringer	E2	H2

Kontrollmateriale

Til validering og overvåking av metoden ble det brukt kontrollplasma. Det er EDTA-plasma fra to personer; K1 og K2.

Pasientprøver og friske personer

Plasma fra to pasientgrupper og en gruppe friske kontrollpersoner (FK) ble analysert for MPO (Tabell 3). Plasma fra FK-gruppen er ikke den samme som K1 og K2. Det var pasienter med systemisk lupus erythematosus (SLE) og med primært Sjøgrens syndrom (PSS). Alle gruppene har gitt samtykke til å delta i prosjektet.

Tabell 3. Informasjon om pasientgruppene og gruppen med friske kontrollere.

	FK	SLE	PSS
Antall deltakere, n	17	21	26
Alder, år (gjennomsnitt ± SD)	48,2 ± 13,6	40,1 ± 1,8	54,7 ± 12,3
Menn/kvinner	4/13	4/17	7/19

Pasientene med PSS har tidligere vært med i en studie der virkningen av en betennelsesdempende medisin kalt Kineret ble testet [10]. Halvparten av pasientene fikk medisinen og den andre halvparten fikk placebo (Tabell 4). Blodprøver ble tatt før de fikk medisin (uke 0) og etter fire uker (uke 4). I dette prosjektet ble MPO målt på alle sjøgrenpasientene i uke 0 og i uke 4.

Tabell 4. Oversikt over hvilke PSS-pasienter som fikk Kineret og hvilke som fikk placebo. Hver pasient er merket med hvert sitt tresifret «ID»-nummer.

Kineret	Placebo
301	302
304	303
307	305
308	306
310	309
312	311
313	316
315	317
318	320
319	321
323	322
324	326
325	327

3.3 Prøvetaking og sentrifugering

Alt blod er samlet inn i henhold til prosedyre for venøs blodprøvetaking [40].

Testing av prøvemateriale:

To 9 ml K₃EDTA-glass og fire 5 ml litium-heparin glass ble tappet fra Person 1 og Person 2. Blodet ble sentrifugert umiddelbart etter tapping i 10 min ved 4 °C på 1500 G i henhold til anbefaling fra produsenten [27]. Etter sentrifugering ble plasma fra samme person og av samme type homogenisert og fordelt på to glass hver. Plasma i det ene glasset ble alikvotert og merket med "1 sentrifugering". Plasma i det andre glasset ble sentrifugert på nytt, deretter alikvotert og merket med "2 sentrifugeringer". Volum på alikvotene: 200 µl.

Kontrollmateriale:

Fire 9 ml K₃EDTA-glass ble tappet fra hver av K1 og K2 og deretter sentrifugert i 10 min ved 4 °C på 1500 G. Fordelt i alikvoter på 150 µl.

Pasienter og friske kontrollpersoner:

Blodet ble tappet på et 9 ml K₃EDTA-glass og sentrifugert i 10 min ved 4 °C på 2280 G. Etter sentrifugering ble plasma fordelt i alikvoter på 150 µl. Alikvotene ble fryst ned og lagret ved -72 °C.

3.4 Analyseprosedyre

Utførelsen av analysen og tillaging av løsningene ble gjort som beskrevet i vedlegg B. For mer informasjon om metoden henvises det til brukermanualen [27].

Forberedelser

Før hver analyse ble alle reagenser satt ut på benk slik at de hadde romtemperatur når de skulle brukes. Plasmaprøvene ble tatt opp fra frysen og tint på is. De var fullstendig tint før de ble fortynnet.

Tillaging av reagenser og kalibreringsstandarder

Alle reagensene ble laget i henhold til prosedyren i Vedlegg B1. Kalibratorene ble laget ved å fortynne MPO-stamløsningen med fortynningsbuffer. Stammløsningens konsentrasjon var 375 ng/ml og de åtte fortynningene varierte fra 0-30 ng/ml.

Fortynning av plasmaprøvene

Alle plasmaprøvene ble fortynnet 1:10 med fortynningsbuffer som beskrevet i vedlegg B1.

3.5 Validering

3.5.1 EDTA vs. heparin og 1 vs. 2 sentrifugeringer

EDTA- og heparinplasma ble analysert på flere plater. Konsentrasjonene av MPO i EDTA og heparin med samme sentrifugering ble sammenlignet for å se om det var signifikant forskjell mellom type antikoagulas. MPO-konsentrasjonen i EDTA og heparin med både 1 og 2 sentrifugeringer ble sammenlignet for å se om antall sentrifugeringer har stor betydning for resultatet.

3.5.2 Kalibreringskurve

For hver plate som ble analysert ble åtte kalibrаторer målt samtidig. Avlest absorbans for hver kalibrатор ble plottet mot den kjente konsentrasjonen av MPO og det ble laget en kalibreringskurve. Fire-parameter logistisk kurvetilpasning ble valgt. Kurvetilpasningen ble utført i dataprogrammet Ascent Software Version 2.6. Ligningen for hver kurve ble oppgitt og konsentrasjonene av MPO ble beregnet av programmet.

Til å vurdere kurvetilpasningen ble regresjonskoeffisient og residualer for seks kurver sammenlignet. Residualene for hver kurve er differansen mellom den teoretiske

konsentrasjonen av hver kalibrator og den beregnede konsentrasjonen. Teoretisk konsentrasjon er den «sanne» konsentrasjon av en kalibrator dersom den er laget riktig. Konsentrasjonen av MPO for hver kalibrator er beregnet ved å bruke ligningen for den aktuelle kalibreringskurven.

3.5.3 Deteksjonsgrense

For å beregne deteksjonsgrense (LOD) brukes avlest absorbanse fra seks blankprøver (kalibrator 8, 0 ng/ml). Det ble beregnet et gjennomsnitt og standardavvik (SD) av absorbansene. Deteksjonsgrensen er definert som gjennomsnittet pluss to ganger SD. Konsentrasjonen som tilsvarer denne absorbansen er laveste konsentrasjon av analytten som kan måles.

$$LOD = Gj.snitt\ abs + 2*SD \quad (12)$$

Produsenten av metoden har oppgitt at LOD er 0,4 ng/ml [27].

3.5.4 Analysevariasjon

Variasjon mellom måleparalleller

På en plate er det analysert 30 ulike prøver i tre måleparalleller. For hver prøve er CV beregnet for de tre måleparallellene.

Innen plate-variasjon

På en plate er det analysert åtte prøveparalleller. Gjennomsnitt, SD og CV ble beregnet for de åtte prøvene. Beregnet CV er et mål for innen plate-variasjon.

Mellom plate-variasjon

To eller flere paralleller av K1 og K2 ble analysert på 6 ELISA-plater (de samme målingene som ble brukt for å etablere 2 kontrollkort). Gjennomsnitt, SD og CV for alle målingene ble beregnet. Beregnet CV er et mål for mellom plate-variasjon.

3.5.5 Etablering av Shewhart kontrollkort

Kontrollprøvene K1 og K2 ble analysert i 8 prøveparalleller på 6 plater. Innen samme plate ble hver kontrollprøve målt i prøveparalleller. Det vil si at det ble laget åtte prøvefortynninger av hver kontrollprøve og hver fortynning ble pipettert ut i hver sin. To av platene (21.10 og 3.11) hadde seks prøveparalleller, mens de fire neste (9., 11., 15. og 17.11) hadde åtte.

For hver plate ble de åtte målte konsentrasjonene sammenlignet og mistenkelige verdier ble testet for å se om de kunne være uteliggere ved bruk av Dixons Q-test [41]. De som var uteliggere ble fjernet.

Etter at uteliggere var fjernet var det 42 målinger av hver kontrollprøve. For hver kontrollprøve ble det beregnet gjennomsnitt, standardavvik (SD) og CV.

I kontrollkortene er det satt en senterlinje, to varselgrenser og to aksjonsgrenser.

Senterlinje: Gjennomsnitt (\bar{x})

Øvre/nedre varselgrense: Gjennomsnitt $\pm 2*SD$

Øvre/nedre aksjonsgrense: Gjennomsnitt $\pm 3*SD$

3.5.6 Gjenfinning

Det ble laget to fortyndinger av en kontrollprøve som ble merket K1 og K1+Sp.

K1 ble fortynnet på vanlig måte. K1+Sp ble tilsatt humant MPO slik at konsentrasjonen ble 12,5 ng/ml høyere enn i K1. Begge prøvene ble analysert og MPO-konsentrasjonene beregnet. Differansen mellom K1+Sp og K1 er definert som ”målt mengde analytt”. ”Tilsatt mengde analytt” er 12,5 ng/ml.

$$Gjenfinning = \frac{\text{Målt mengde analytt}}{\text{Tilsatt mengde analytt}} * 100 \% \quad (12)$$

Det ble utført ti forsøk der gjenfinning ble beregnet. Metodens gjenfinning er bestemt som gjennomsnittet av alle ti gjenfinningene.

3.6 Anvendelse av metoden

Metoden ble anvendt på friske kontrollpersoner, en gruppe med lupuspasienter og to grupper med Sjøgrenpasienter. Hver prøve ble analysert i tre måleparallelleler der gjennomsnittet av de tre ble bestemt som prøvens verdi. SD og CV ble beregnet for måleparallellelene og brukt til å vurdere om prøven var pålitelig nok til å kunne godkjennes. På hver plate med pasientprøver ble det også analysert to prøveparallelleler av hver kontrollprøve (K1 og K2).

Shewhart kontrollkort ble brukt for å vurdere kontrollmålingene. Kriterier for å kunne påstå at analysen er ute av kontroll:

- Minst to av fire målepunkt havner utenfor aksjonsgrensen.
- Alle fire målepunkter havner utenfor varselgrensen på samme analyseplate.
- I ett kontrollkort: Dagens to målepunkt og de to forrige målepunktene havner utenfor varselgrensen.
- I ett kontrollkort: Ni etterfølgende målepunkter havner på samme side av gjennomsnittslinjen.

For å godkjenne én prøve skal CV for måleparallellelene være mindre enn 15 %.

For å godkjenne to prøveparallelleler (en prøve analysert to ganger på ulike dager) skal avviket mellom dem være mindre enn 30 % [27].

Friske kontrollpersoner

Alle personene ble analysert to ganger på ulike dager bortsett fra FK 3, FK 14 og FK 15, som ble analysert tre ganger.

Pasienter med SLE

Alle pasientene ble analysert to ganger på ulike dager, bortsett SLE 1 som kun ble analysert en gang.

Pasienter med PSS uke 0 og uke 4

Alle pasientene fra uke 0 ble analysert to ganger bortsett fra PSS 308, 309, 311, 312, 319 og 320 som ble analysert tre ganger.

For pasientene fra uke 4 er PSS 301 til og med PSS 320 analysert to ganger, mens 321 til 327 analysert kun en gang.

3.7 Statistikk

Ved etablering av kontrollkortet ble Dixons Q-test brukt for å bestemme om det var noen uteliggere i rekken av kontrollmålinger. Det ble valgt en tosidig test med 95 % signifikansnivå.

For å sammenligne pasientgruppene med den friske kontrollgruppen ble det brukt tosidig t-test med 95 % signifikansnivå. Tosidig F-test med 95 % signifikansnivå er brukt for å bestemme om gruppene har ulik varians [41].

For å sammenligne PSS uke 0 med PSS uke 4 er det brukt en parett t-test med 95 % signifikansnivå [41].

Alle statistiske tester ble utført i Microsoft Excel, unntatt Dixons Q-test.

4 Resultater

4.1 Prøvemateriale og sentrifugeringer

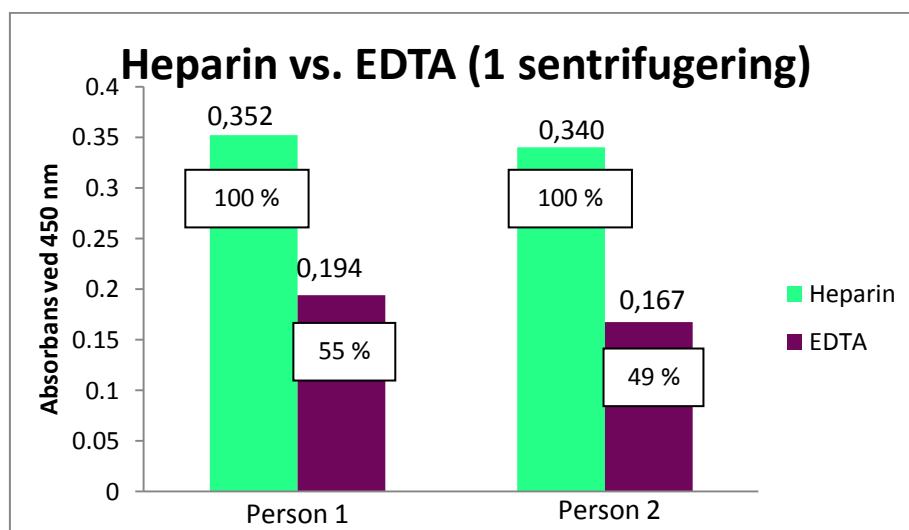
Konsentrasjon av MPO ble analysert i fire ulike plasmatyper fra to personer: EDTA og heparin med 1 og 2 sentrifugeringer. Konsentrasjonen er gitt i absorbans fordi det ikke var etablert en kalibreringskurve på det tidspunktet målingene ble gjort. Gjennomsnittlig absorbans, SD og CV for målingene er regnet ut (Tabell 5). Avlest absorbans for alle målingene er gitt i Vedlegg C.

Tabell 5. Målte konsentrasjoner av MPO (gitt i absorbans) på EDTA- og heparinplasma med 1 sentrifugering.

	Person 1				Person 2			
	Heparin		EDTA		Heparin		EDTA	
Sentrifugeringer	1	2	1	2	1	2	1	2
Gj.snitt	0,352	0,215	0,194	0,152	0,340	0,258	0,167	0,145
SD	0,046	0,018	0,053	0,012	0,036	0,025	0,020	0,018
CV, %	13,0	8,6	27,3	7,9	10,7	9,6	12,1	12,7

Gjennomsnittene viser at heparinplasma generelt gir en høyere absorbans enn EDTA-plasma (Figur 15). CV for alle plasmatype er < 15 %, unntatt for EDTA med 1 sentrifugering fra Person 1 (27,3 %). Den høye CV'en skyldes mest sannsynlig en feil ved fortykning av plasma. Videre ble det regnet ut hvor stor andel absorbansen til EDTA-plasma utgjør av absorbansen til heparinplasma ved å bruke formel 13. Hos Person 1 og Person 2 utgjør absorbansen til EDTA-plasma henholdsvis 55,1 % og 49,0 % av absorbansen til heparinplasma.

$$(absorbans_{EDTA}/absorbans_{heparin}) * 100 \% \quad (13)$$



Figur 15. Gjennomsnittlig absorbans til heparin- og EDTA-plasma fra Person 1 og Person 2 med 1 sentrifugering. Tallene over søylene viser gjennomsnittlig absorbans. Prosentavvik mellom heparin og EDTA vises inne i de hvite boksene i hver søyle.

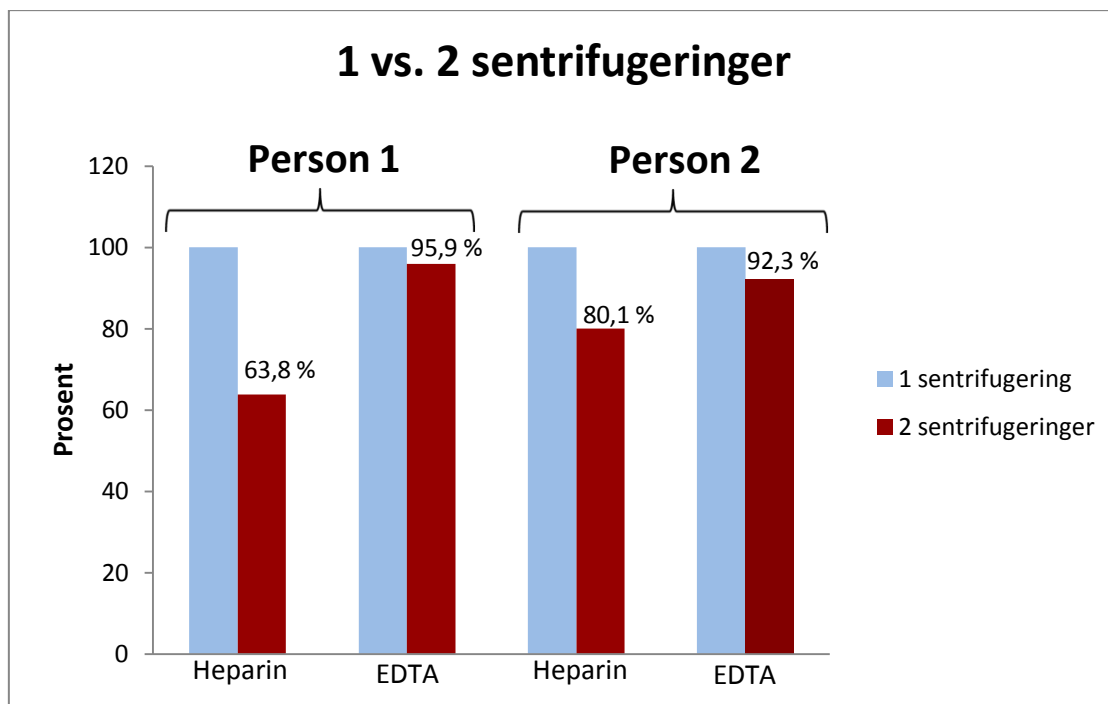
4.1.1 Betydning av antall sentrifugeringer

Hver plasmatype som er sentrifugert 1 gang ble sammenlignet med tilsvarende plasmatype som er sentrifugert 2 ganger. Det var ønskelig å se om nivået av MPO var signifikant lavere i plasma som er sentrifugert 2 ganger. Forholdet mellom 1 og 2 sentrifugeringer ble beregnet der absorbans ved 1 sentrifugering er satt som 100 % (formel 14). Verdiene er gitt i Tabell 6 og forholdene mellom absorbansene er vist i Figur 16. Målingene med 1 og 2 sentrifugeringer er gjort på to plater.

$$(\text{absorbans}_2 \text{ sentrifugeringer} / \text{absorbans}_1 \text{ sentrifugering}) * 100 \% \quad (14)$$

Tabell 6. Forhold mellom plasma sentrifugert 1 gang og plasma sentrifugert 2 ganger. Absorbans ved 1 sentrifugering er satt som 100 %.

	Person 1, %		Person 2, %	
	Heparin	EDTA	Heparin	EDTA
Plate 1	63,9	100,6	77,2	93,5
Plate 2	63,7	91,1	83,0	91,0
Gj.snitt	63,8	95,9	80,1	92,3
SD	0,14	6,72	4,10	1,77
CV	0,2	7,0	5,1	1,9



Figur 16. Forhold mellom absorbans til plasma som er sentrifugert 1 gang (blå søyler) og plasma som er sentrifugert 2 ganger (røde søyler). Tallet i prosent over de røde søylene angir hvor mye de utgjør av de blå søylene. Absorbansen av plasma med 1 sentrifugering er 100 %.

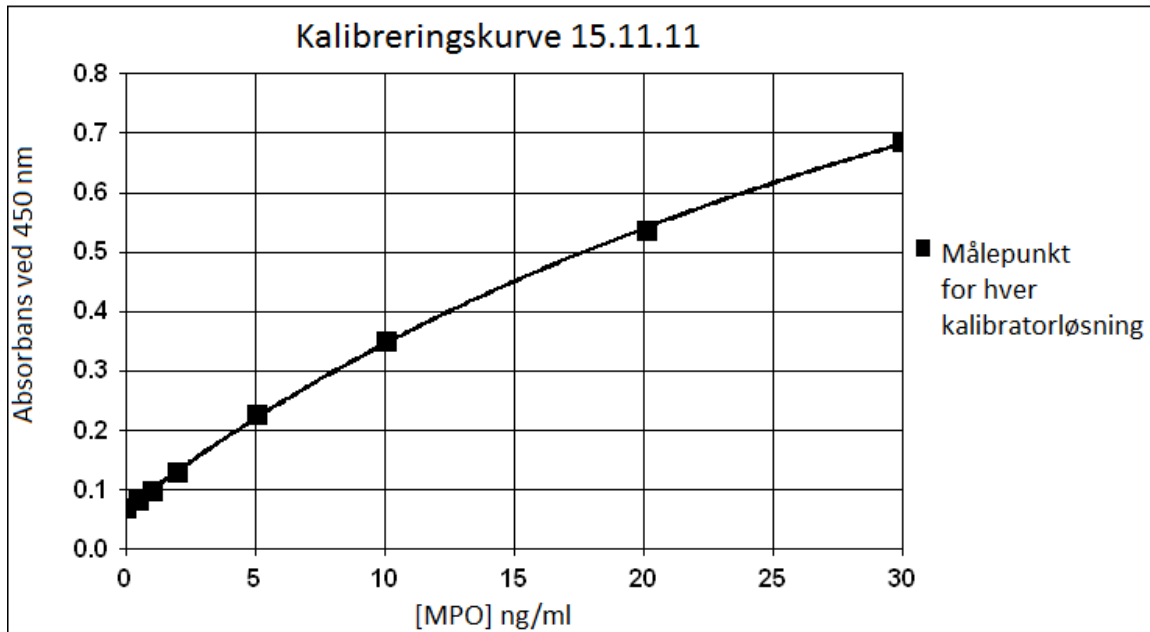
Absorbansen til EDTA får en liten nedgang etter 2 sentrifugeringer. De røde søylene i Figur 16 viser at absorbans for E2 utgjør 95,9 % (Person 1) og 92,3 % (Person 2) av absorbans for E1.

For heparinplasma er nedgangen av MPO høyere enn for EDTA-plasma etter to sentrifugeringer. Absorbansen til H2 utgjør 63,8 % (Person 1) og 80,1 % (Person 2) av absorbansen til H1.

4.2 Validering av ELISA metode

4.2.1 Kalibreringskurve

For hver plate er det laget en fire-parameter logistisk kalibreringskurve (Figur 17).



Figur 17. Eksempel på kalibreringskurven for en plate.

Ligningene for kalibreringskurvene fra de seks platene som ble analysert 21.10.11-17.11.11. er sammenlignet i Tabell 7.

Tabell 7. Ligningene og R^2 for seks kalibreringskurver.

Dato	R^2	a	b	c	d
21.10.2011	0,999	0,072	1,844	0,023	1,098
03.11.2011	0,999	0,068	2,837	0,015	1,006
09.11.2011	0,993	0,074	1,225	0,042	1,192
11.11.2011	0,994	0,069	1,114	0,042	1,123
15.11.2011	1	0,066	1,595	0,023	1,006
17.11.2011	0,998	0,075	1,264	0,022	1,114

Kurven fra 21.10, 3.11 og 15.11 fikk best tilpasning da R^2 er henholdsvis 0,999, 0,999 og 1. R^2 for kurvene fra 9.11, 11.11 og 17.11 ble henholdsvis 0,993, 0,994 og 0,998. Det er godt nok til å regnes som pålitelig.

Residualene for hver kurve ble sammenlignet (Tabell 8). Gjennomsnittavvikene er beregnet med absoluttverdier og tar ikke hensyn til om beregnet konsentrasjon er høyere eller lavere enn teoretisk konsentrasjon. I Vedlegg G1 vises alle residualene for hver kurve.

Tabell 8. Gjennomsnittsresidualer for seks kalibreringskurver.

Kalibrator nr.	Teoretisk kons. (ng/ml)	Gj.snittlig avvik (ng/ml)	Gj.snittlig avvik (%)
1	30	0,413	1,38
2	20	0,701	3,51
3	10	0,472	4,72
4	5	0,191	3,84
5	2	0,168	8,40
6	1	0,057	5,67
7	0,5	0,099	19,73

Kalibrator 1 (30 ng/ml) og 7 (0,5 ng/ml) fikk henholdsvis lavest og høyest prosentavvik. For de andre kalibratorene varierer prosentavvikene.

4.2.2 Deteksjonsgrense

Målt absorbens av kalibrator 8 (blank) og kalibrator 7 (0,5 ng/ml) som er analysert på seks ulike plater er gitt i Tabell 9.

Tabell 9. Målt absorbens for kalibrator 7 og kalibrator 8 på seks plater.

Dato	Abs. Kalibrator 8 (blank)	Abs. kalibrator 7 (0,5 ng/ml)
21.10.2011	0,068	0,090
03.11.2011	0,064	0,093
09.11.2011	0,068	0,083
11.11.2011	0,071	0,093
15.11.2011	0,067	0,082
17.11.2011	0,077	0,080
Gj.snitt	0,069	0,085
SD	0,0044	0,0051

$$\text{LOD}_{(2*\text{SD})} = 0,069 + (2*0,0044) = 0,078$$

$$\text{LOD}_{(3*\text{SD})} = 0,069 + (3*0,0044) = 0,082$$

Absorbansen til kalibrator 7 må være høyere enn 0,078 for at den skal kunne detekteres. Gjennomsnittlig absorbens for kalibrator 7 er 0,085. T-test med 95 % signifikansnivå ble utført for å teste om absorbansen til kalibrator 7 er

a) signifikant forskjellig fra absorbansen til blankprøven:

Tosidig test, P = 0,000178

b) signifikant høyere enn 0,078:

Ensidig test, P = 0,00846

c) signifikant høyere enn 0,082 ($LOD_{(3*SD)}$):
Ensidig test, $P = 0,0859$

Med 95 % sikkerhet kan det påstås at gjennomsnittlig absorbans for kalibrator 7 er signifikant høyere enn deteksjonsgrensen på 0,078. En konsentrasjon på 0,5 ng/ml er dermed over deteksjonsgrensen. Gjennomsnittlig absorbans for kalibrator 7 er derimot ikke signifikant forskjellig fra 0,082 som er gjennomsnitt for blank $\pm 3*SD$.

Metodens deteksjonsgrense er bestemt som 0,5 ng/ml.

4.2.3 Etablering av kontrollkort

Alle målte konsentrasjoner av MPO i K1 og K2 er gitt i Vedlegg D. Gjennomsnittlig konsentrasjon med beregnet SD og CV er gitt i Tabell 10.

Tabell 10. Beregnede verdier for etablering av kontrollkortene til kontrollprøvene K1 og K2. Alle verdiene er oppgitt i ng/ml bortsett fra CV som er oppgitt i %.

	Kontrollprøve 1 (K1), ng/ml	Kontrollprøve 2 (K2), ng/ml	Linje i kontrollkortet
Gj.snitt (x)	24,28	39,50	Senterlinjen
SD	4,00	6,27	
CV, %	16,49	15,88	
2*SD	8,01	12,55	
3*SD	12,01	18,82	
x - 2*SD	16,27	26,95	Øvre varselgrense
x + 2*SD	32,28	52,04	Nedre varselgrense
x - 3*SD	12,27	20,68	Øvre aksjonsgrense
x + 3*SD	36,29	58,31	Nedre aksjonsgrense

Når en kontrollprøve analyseres skal den havne innenfor sitt intervall for å kunne godkjennes

Intervall for K1: 16,27-32,28 ng/ml.

Intervall for K2: 26,95-52,04 ng/ml.

Etablerte kontrollkort for K1 og K2 er vist i Vedlegg D.

4.2.4 Gjenfinning

Det ble gjort fem gjenfinningsforsøk der kontrollprøvene K1 og K2 ble "spiket" med 12,5 ng/ml MPO. MPO-konsentrasjonen av hver prøve ble regnet ut. Utregningen av alle gjenfinningene er vist i Vedlegg E. Tabell 11 viser beregnet gjenfinning for K1 og K2 fra de fem forsøkene.

Tabell 11. Beregnet gjenfinning i prosent hos kontrollprøvene K1 og K2 fra fem forsøk.

Dato	K1, %	K2, %
3.11.11	55,44	66,72
9.11.11	49,76	55,28
11.11.11	61,68	61,76
15.11.11	57,60	72,96
17.11.11	70,88	66,96
Gj.snitt	59,07	64,74

Gjennomsnittlig gjenfinning: $(59,07 + 64,74)/2 = 61,91 \approx 62 \%$

Faktor: $100 \% / 62 \% = 1,61$

Gjenfinning for metoden er 62 %. For å finne den «sanne» verdien av en prøve multipliseres resultatet med faktoren 1,61.

4.2.5 Innen plate- og mellom plate-variasjon

Variasjon mellom måleparalleller

På tre plater ble det analysert totalt 90 prøver i tre måleparalleller. CV for måleparallellene er beregnet (Tabell 12. Tabeller med verdiene av 30 CV'er på alle tre platene er lagt i Vedlegg F.

Tabell 12. CV for måleparalleller av 30 prøver på tre plater. Alle verdiene er gitt i prosent.

	Plate 1 n=30	Plate 2 n=30	Plate 3 n=30
Gj.snitt	9,1	9,7	9,0
SD	7,6	6,7	4,9
CV	84,0	68,5	54,5
Laveste	1,2	2,4	1,5
Høyeste	29,0	35,0	20,2
Antall $\leq 15,0 \%$	26	26	26
Antall $> 15,0 \%$	4	4	4

Gjennomsnittlig CV for hver plate ble forholdsvis like. Standardavviket og CV viser at det er stor variasjon i CV-verdiene. Kun fire av 30 prøver fikk CV på mer enn 15 % for alle tre platene.

Innen plate-CV (repeterbarhet)

For å beregne CV for prøver som er analysert i flere prøveparalleller på en plate med ble det tatt utgangspunkt i målepunktene til kontrollprøve 1 ved etablering av kontrollkort. Alle målinger for hver plate er gitt i en tabell i Vedlegg F. For hver plate er det beregnet gjennomsnitt, SD og CV (Tabell 13). Til slutt er det beregnet en gjennomsnittlig CV for alle platene.

Tabell 13. Sammenligning av CV for flere prøveparalleller. Tallene er gitt i prosent.

Gj.snitt	11,1
SD	3,4
CV	30,6
Laveste	8,4
Høyeste	17,7
Antall \leq 15,0 %	1
Antall $>$ 15,0 %	5

Mellom plate-CV

Ved etablering av kontrollkortet ble kontrollprøvene K1 og K2 analysert flere ganger på samme plate og på seks ulike plater. CV for totalt 42 målinger av K1 og K2 ble regnet ut:

K1: 16,49 %

K2: 15,88 %

Mellom plate-CV: $(16,49 + 15,88) / 2 = 16,2$ %

Tabell 14 oppsummerer beregnet CV.

Tabell 14. Beregnet CV for ELISA MPO kit.

	Gj.snittlig CV, %
Mellom 3 måleparalleller	9,3
Innen en plate	11,0
Mellom plater	16,2

4.3 Anvendelse av ELISA-metode

Analysene av pasientprøvene og de friske personene er fordelt på ti analyseplater.

Kalibreringskurven og resultatene fra kontrollmålingene ble vurdert for å bestemme om hver plate kunne godkjennes. Den enkelte prøve ble vurdert med hensyn på CV for måleparalleller og prosentavvik mellom to eller tre prøveparalleller. Der CV var over 15 % eller prosentavviket over 15 % ble enkeltprøvene forkastet.

4.3.1 Kalibreringskurver til anvendelsen av metoden.

For å vurdere kvaliteten på kalibreringskurvene for de ti analyseplatene ble residualene for hver kalibrator og R^2 sammenlignet (Tabell 15). Alle kurvene for analyseperioden er gitt i Vedlegg G.

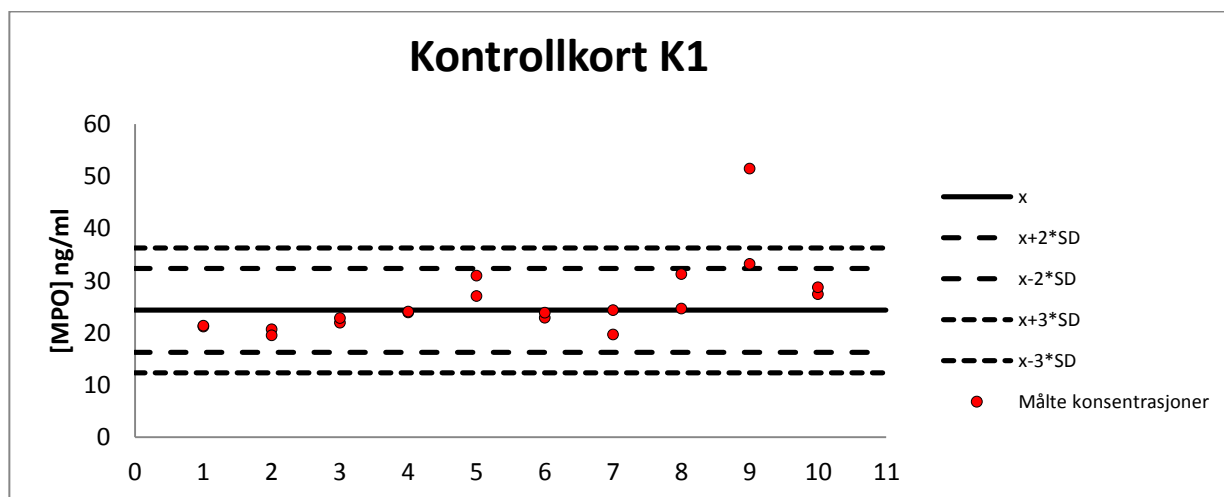
Tabell 15. R^2 for hver kalibreringskurve for ti plater og residualene i prosent for hver kalibrator.

Std. Nr ([MPO] ng/ml)	28.11.	2.12.	5.12.	7.12.	12.12.	14.12.	20.12.	21.12.	4.1.	8.1.	Gj.snitt
1 (30)	-0,21	-0,16	-0,57	0,18	-0,01	-0,75	-0,45	-0,24	-0,40	0,39	0,34
2 (20)	0,70	0,43	1,71	-0,41	-0,02	2,49	1,44	0,45	1,56	-1,38	1,06
3 (10)	-1,73	-0,33	-1,67	0,26	0,53	-1,84	-1,79	2,13	-2,15	4,25	1,67
4 (5)	2,83	-0,76	-4,44	1,08	-2,31	-8,08	-0,14	-6,69	-3,19	-7,63	3,71
5 (2)	-3,00	1,20	10,76	-2,20	5,01	9,56	-5,36	-13,21	5,91	2,85	5,91
6 (1)	2,60	-0,50	<u>24,52</u>	-10,21	10,41	13,11	4,80	<u>24,12</u>	4,80	<u>17,72</u>	11,28
7 (0,5)	-5,21	11,62	<u>-49,30</u>	9,42	<u>-35,67</u>	13,43	16,83	<u>36,87</u>	9,22	<u>25,45</u>	21,30
R^2	1	1	0,999	1	1	0,999	1	0,999	1	0,999	

Regresjonskoeffisienten, R^2 , for seks av kurvene er 1 bortsett fra 5.12., 14.12, 21.12 og 8.1 som er 0,999. Gjennomsnittlig avvik for hver kalibrator stiger med synkende konsentrasjon av MPO. For kalibrator 6 og 7 er det henholdsvis tre og fire residualer som er høyere enn 15 %.

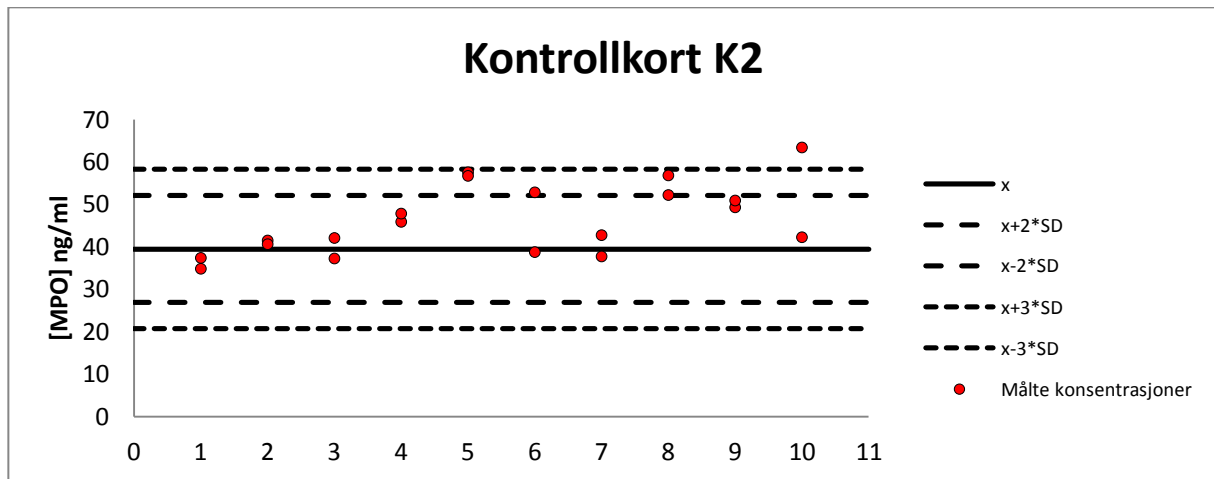
4.3.2 Anvendelse av kontrollkort

For hver plate med pasientprøver som ble analysert, ble det samtidig analysert fire kontrollprøver; to av K1 og to av K2. De målte konsentrasjonene for begge kontrollprøvene er plottet inn i hvert sitt Shewhart kontrollkort (Figur 18 og Figur 19). I Vedlegg D finnes tabell med alle de målte konsentrasjonene av K1 og K2.



Figur 18. Shewhart kontrollkort for K1 med målte konsentrasjoner av MPO på ti plater.

De åtte første målepunktene (plate 1 – 4) i kontrollkortet for K1 ligger på en relativt fin rekke rett under senterlinjen og varierer svært lite. Fra plate 5 til plate 10 blir variasjonen større og punktene havner på begge sider av senterlinjen.



Figur 19. Shewhart kontrollkort for K2 med målte konsentrasjoner av MPO på ti plater.

Variasjonen i kontrollkortet for K2 er liten på fire første platene. Fra plate 6 blir spredningen mellom to målepunkter større og verdiene blir høyere. Gjennomsnittet for kontrollkortet er 39,5 ng/ml, mens gjennomsnittet for alle de målte kontrollprøvene fra dag 1 til dag 10 er 46,5 ng/ml.

Ut i fra kriteriene som er gitt i kapittel 3.6 er alle målingene av K1 og K2 godkjent.

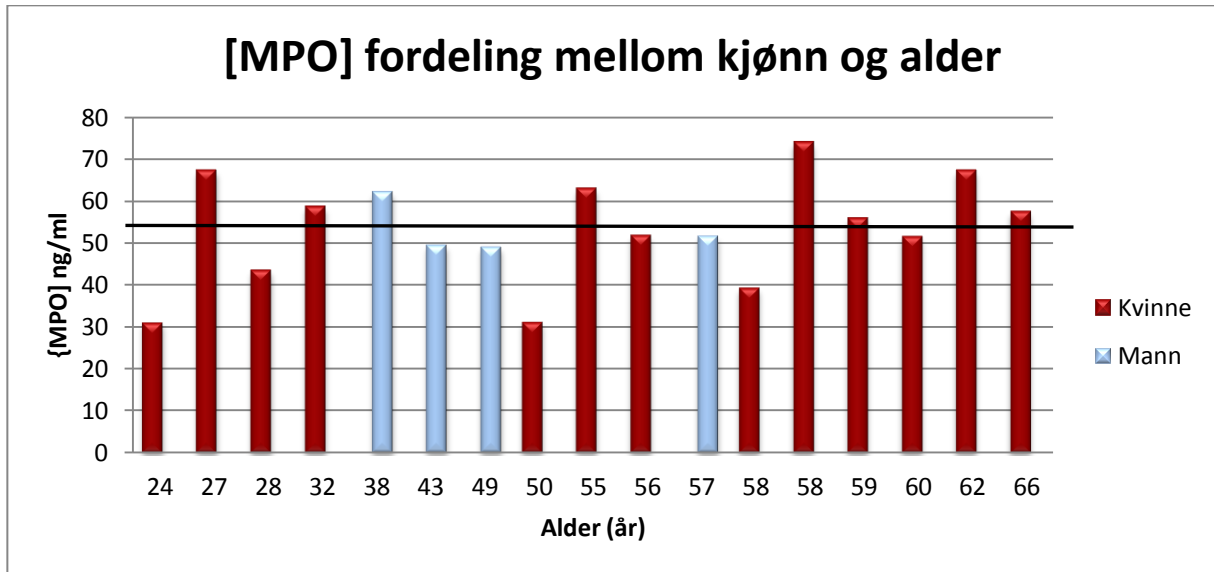
4.3.3 MPO hos friske kontrollpersoner

Tabell som viser en oversikt over alle resultatene er lagt i Vedlegg H. Prøvene som ble forkastet på grunn av for høy CV er FK 3a, FK 4a, FK 11a, FK 14a og 14b og FK 15a. Resten er godkjente og vist i Tabell 16 og Figur 20. Resultatene er multiplisert med 1,61 for å korrigere for at gjenfinningen er 62 %.

Tabell 16. Resultatene av målt MPO hos friske kontrollpersoner som er godkjente. Verdiene er gitt i ng/ml.

Kjønn/alder (år)	FK nr.	Gjennomsnitt	Korrigert for gjenfinning
Kvinne/50	FK 1	19,36	31,16
Kvinne/59	FK 2	34,67	55,81
Kvinne/62	FK 3	41,74	67,19
Mann/43	FK 4	30,75	49,51
Kvinne/60	FK 5	31,92	51,38
Kvinne/24	FK 6	19,26	31,00
Kvinne/56	FK 7	32,10	51,68
Mann/57	FK 8	32,02	51,55
Kvinne/28	FK 9	27,02	43,49
Kvinne/32	FK 10	36,40	58,60
Kvinne/58	FK 11	24,37	39,24
Mann/49	FK 12	30,44	49,00
Mann/38	FK 13	38,63	62,19
Kvinne/58	FK 14	45,88	73,87
Kvinne/55	FK 15	39,06	62,89
Kvinne/66	FK 16	35,65	57,39
Kvinne/27	FK 17	41,76	67,23
	Gj.snitt	33,00	53,13
	SD	7,54	12,13
	CV, %		22,8

Gjennomsnitt av MPO-konsentrasjon målt hos friske kontrollpersoner er 33,00 ng/ml (SD = 7,54 ng/ml). Med korrigeringsfaktor for gjenfinning er gjennomsnittet 53,13 ng/ml (SD = 12,13 ng/ml). Nivået av MPO varierte jevnt over alle personene og det var ingen tydelige tegn til at alder eller kjønn hadde betydning for konsentrasjonen (Figur 20).



Figur 20. Fordeling av MPO mellom kjønn og alder hos friske kontrollpersoner. Hver søyle representerer gjennomsnittlig konsentrasjon av MPO for én person. Den sorte horisontale linjen er gjennomsnitt av alle konsentrasjonene.

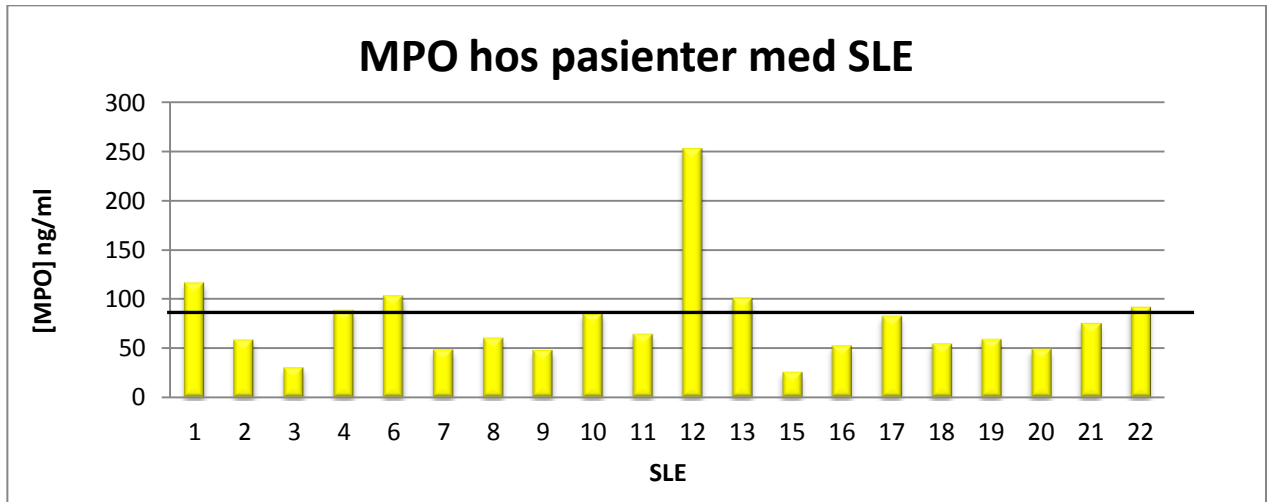
4.3.4 MPO hos SLE-pasienter

Resultatene fra analysene av pasienter med SLE er gitt i en tabell i Vedlegg I. Prøvene som ble forkastet på grunn av høy CV er SLE 5, SLE 10a, SLE 15a, SLE 20a og SLE 22b. De godkjente prøveresultatene er vist i Tabell 17 og Figur 21.

Tabell 17. Resultatene av MPO målt hos SLE-pasienter som er godkjent. Verdiene er gitt i ng/ml.

Pasient-ID	Gjennomsnitt	Korrigert for gjenfinning
SLE 1	72,70	116,32
SLE 2	36,44	58,30
SLE 3	18,92	30,26
SLE 4	55,10	88,16
SLE 6	64,52	103,22
SLE 7	30,12	48,18
SLE 8	37,71	60,34
SLE 9	30,05	48,07
SLE 10	53,18	85,09
SLE 11	39,93	63,88
SLE 12	157,75	252,40
SLE 13	63,00	100,79
SLE 15	16,01	25,62
SLE 16	32,58	52,13
SLE 17	51,54	82,46
SLE 18	33,91	54,25
SLE 19	36,81	58,89
SLE 20	30,49	48,78
SLE 21	47,15	75,43
SLE 22	57,14	91,42
Gj.snitt	48,25	77,20
SD	29,92	47,87
CV, %		62,0

Med korrigerings for gjenfinning er gjennomsnittet for alle de godkjente målingene 77,20 ng/ml (SD = 47,87 ng/ml). Konsentrasjonene varierer fra 25,62 til 252,40 ng/ml og spredningen for lupuspasientene er høyere enn for de friske kontrollpersonene. Den høyeste verdien er mer enn dobbelt så høy som den nest høyeste (116,32). Uten den høyeste verdien (SLE 12) blir SD nesten halvert til 24,98 ng/ml.



Figur 21. Korrigerte verdier av målt MPO-konsentrasjon hos pasienter med SLE. Den sorte horisontale linjen viser gjennomsnittet av alle konsentrasjonene.

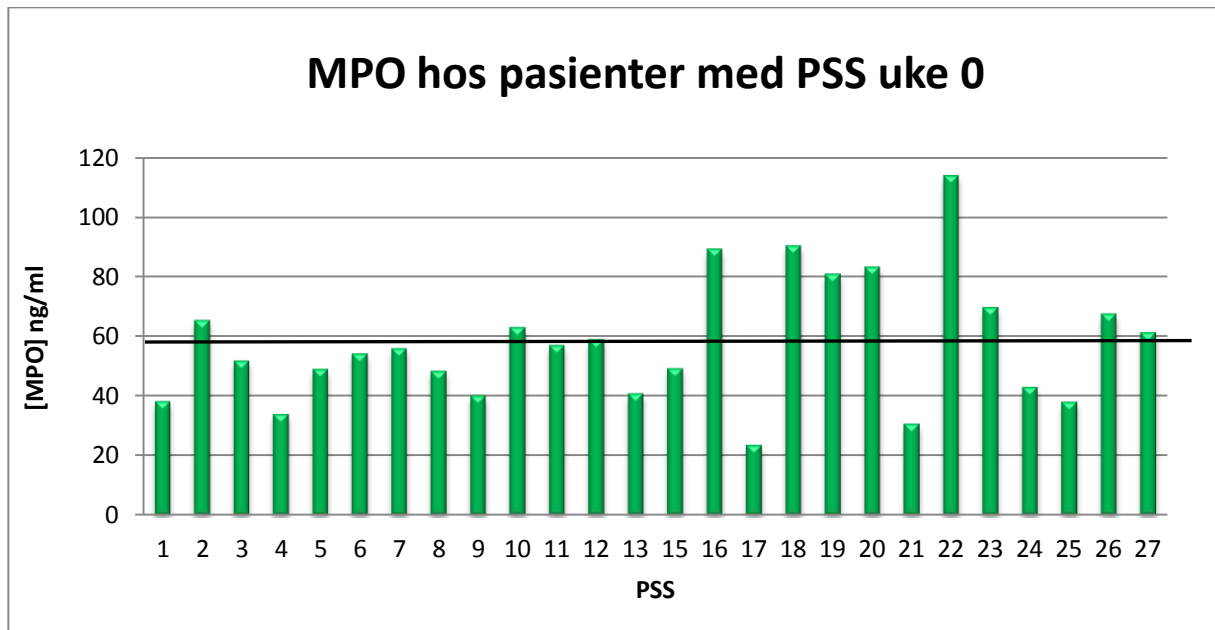
4.3.5 MPO hos PSS-pasienter

Resultatene fra alle analysene av PSS er gitt i Vedlegg J. Fra uke 0 er PSS 305a, 306a, 309c, 311a, 312c, 319a, 320a, 322b, 323b, 325b og 326a forkastet. Fra uke 4 er 304a, 309a og 309b, 311a og 311b, 317a, 319a og 319 b, 326 og 327 forkastet. De godkjente resultatene fra uke 0 er gitt i Tabell 18 og Figur 22. Resultatene fra uke 4 vises i Tabell 19.

Tabell 18. Godkjente resultater av målt MPO hos pasienter med PSS i uke 0. Verdiene er gitt i ng/ml.

Pasient-ID	Gjennomsnitt	Korrigert for gjenfinning
PSS 301	23,91	38,26
PSS 302	40,86	65,38
PSS 303	32,41	51,86
PSS 304	21,20	33,92
PSS 305	30,54	48,86
PSS 306	33,84	54,14
PSS 307	34,89	55,82
PSS 308	30,24	48,38
PSS 309	25,03	40,05
PSS 310	39,37	62,99
PSS 311	35,56	56,90
PSS 312	36,85	58,96
PSS 313	25,42	40,66
PSS 315	30,78	49,25
PSS 316	55,71	89,13
PSS 317	14,67	23,46
PSS 318	56,48	90,36
PSS 319	50,58	80,93
PSS 320	51,95	83,11
PSS 321	19,11	30,57
PSS 322	71,17	113,87
PSS 323	43,52	69,63
PSS 324	26,87	42,99
PSS 325	23,79	38,06
PSS 326	42,18	67,49
PSS 327	38,32	61,31
Gj.snitt	35,97	57,55
SD	13,16	21,05
CV, %		36,6

For PSS-pasienter i uke 0 er gjennomsnitt 35,9 ng/ml (SD = 13,16 ng/ml). Korrigert for gjenfinning er gjennomsnitt 57,55 ng/ml (SD = 21,05 ng/ml). Verdiene sprer seg fra 23,46 til 113,87 ng/ml.



Figur 22. Korrigerte nivåer av MPO hos pasienter med PSS. Den sorte, horisontale linjen viser gjennomsnittet av alle konsentrasjonene.

Tabell 19. Godkjente resultater av målt MPO hos pasienter med PSS i uke 4. Verdiene er gitt i ng/ml.

Pasient-ID	Gjennomsnitt	Korrigert for gjenfinning
PSS 301	32,34	51,74
PSS 302	30,55	48,88
PSS 303	28,44	45,50
PSS 304	17,00	27,20
PSS 305	27,96	44,73
PSS 306	34,96	55,93
PSS 307	32,97	52,75
PSS 308	29,29	46,86
PSS 310	30,44	48,70
PSS 312	27,10	43,36
PSS 313	24,24	38,78
PSS 315	34,57	55,31
PSS 316	46,10	73,76
PSS 317	12,32	19,71
PSS 318	49,27	78,83
PSS 320	46,53	74,44
PSS 321	25,63	41,01
PSS 322	47,69	76,30
PSS 323	26,08	41,73
PSS 325	22,82	36,51
Gj.snitt	31,31	50,10
SD	9,89	15,82
CV, %		31,6

Gjennomsnitt for Sjøgrenpasienter fra uke 4 er 31,32 (SD = 9,89 ng/ml). Korrigert for gjenfinning er gjennomsnitt 50,10 ng/ml (SD = 15,82 ng/ml). Verdiene går fra 19,71 til 78,83 ng/ml.

Differanse mellom uke 0 og 4

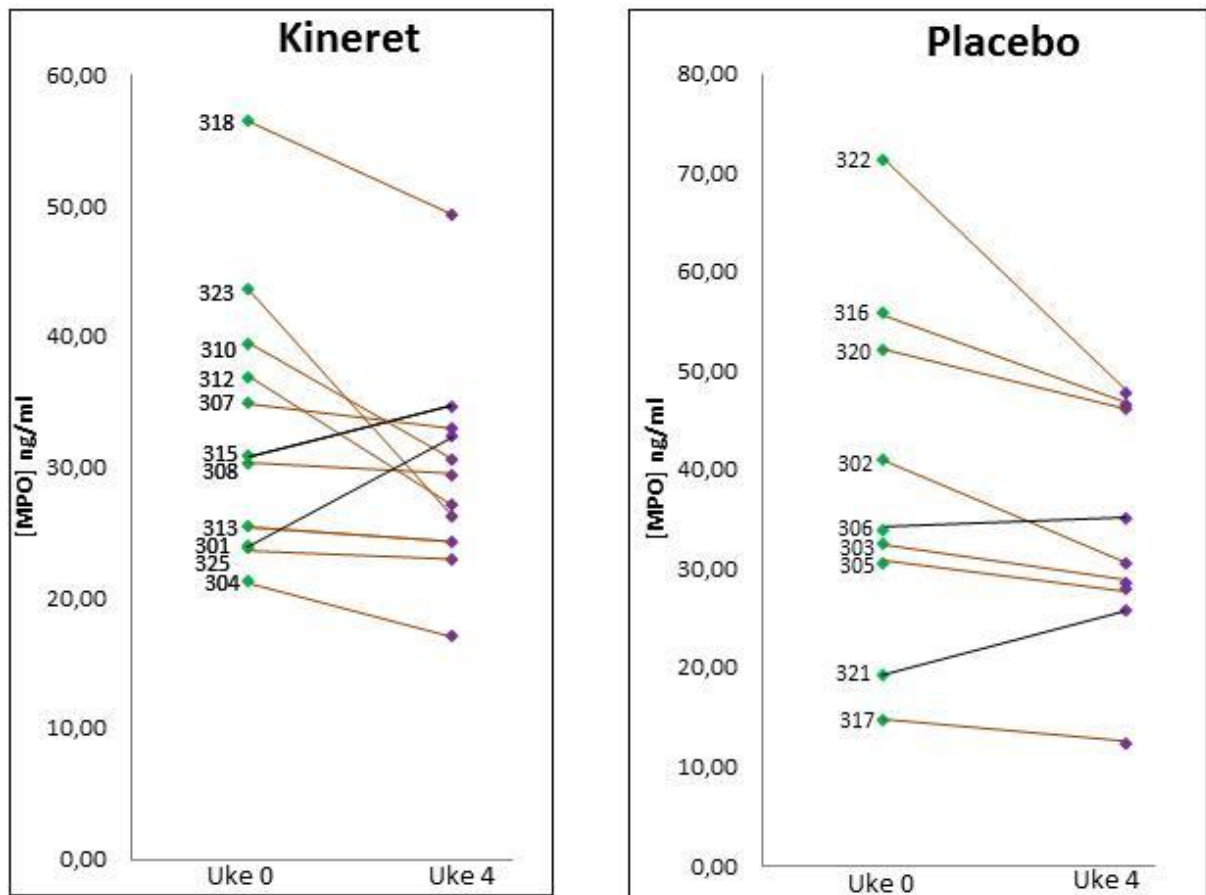
Halvparten av Sjøgrenpasientene har fått en betennelsesdempende medisin (Kineret) i fire uker, mens den andre halvparten har fått placebo. Differansen i MPO-konsentrasjon mellom uke 0 og uke 4 ble beregnet for hver pasient (Tabell 20). På grunn av at ikke alle prøveresultatene ble godkjent er ikke alle pasientene tatt med i sammenligningen. Pasientene som ikke er tatt med i sammenligningen er 309, 311, 324, 326 og 327. Av de pasientene som er tatt med har 11 fått medisin i fire uker, mens 9 har fått placebo. I sammenligningen er det de målte verdiene av MPO som er tatt med og ikke de som er korrigert for gjenfinning fordi forholdet mellom tallene er det samme.

$$\text{Differanse i prosent} = (\text{Differanse i konsentrasjon/konsentrasjon uke 0}) * 100 \% \quad (15)$$

Tabell 20. Differanse i MPO-konsentrasjon mellom uke 0 og uke 4.

	Uke 0, ng/ml	Uke 4, ng/ml	Uke 4 - uke 0, ng/ml	Differanse, %	Kineret /Placebo
PSS 301	23,91	32,34	8,43	35	Kineret
PSS 302	40,86	30,55	-10,31	-25	Placebo
PSS 303	32,41	28,44	-3,97	-12	Placebo
PSS 304	21,20	17,00	-4,20	-20	Kineret
PSS 305	30,54	27,96	-2,58	-8	Placebo
PSS 306	33,84	34,96	1,12	3	Placebo
PSS 307	34,89	32,97	-1,92	-6	Kineret
PSS 308	30,24	29,29	-0,95	-3	Kineret
PSS 310	39,37	30,44	-8,93	-23	Kineret
PSS 312	36,85	27,10	-9,75	-27	Kineret
PSS 313	25,42	24,24	-1,18	-5	Kineret
PSS 315	30,78	34,57	3,79	12	Kineret
PSS 316	55,71	46,10	-9,61	-17	Placebo
PSS 317	14,67	12,32	-2,35	-16	Placebo
PSS 318	56,48	49,27	-7,21	-13	Kineret
PSS 320	51,95	46,53	-5,42	-10	Placebo
PSS 321	19,11	25,63	6,52	34	Placebo
PSS 322	71,17	47,69	-23,48	-33	Placebo
PSS 323	43,52	26,08	-17,44	-40	Kineret
PSS 325	23,79	22,82	-0,97	-4	Kineret
Gj.snitt	35,97	31,32			
SD	13,16	9,89			

Av de 11 pasientene som hadde fått Kineret har 9 stykker en nedgang i MPO konsentrasjon etter fire uker, mens 2 pasienter har en økning. Av de som hadde fått placebo har 7 pasienter nedgang i MPO, mens 2 pasienter har en økning (Figur 23).



Figur 23. Pasienter som har fått Kineret (til venstre) og placebo (til høyre). De grønne punktene representerer målte konsentrasjoner i uke 0 og de lilla representerer målte konsentrasjoner i uke 4. De oransje linjene viser nedgang av MPO, mens de sorte viser en økning.

Tosidig paret t-test med 95 % signifikansnivå ble brukt for å teste om uke 4 hadde signifikant forskjellig nivå av MPO enn uke 0. Dersom $P < 0,05$ kan en med 95 % sikkerhet påstå at det er signifikant forskjell mellom to grupper. P-verdier større enn 0,05 angir at en ikke kan påstå signifikant forskjell med 95 % sikkerhet.

Kineret:

$P = 0,37$.

En kan ikke påstå at det er en signifikant forskjell i MPO-konsentrasjon mellom uke 0 og uke 4 hos pasienter som fikk medikamentet Kineret.

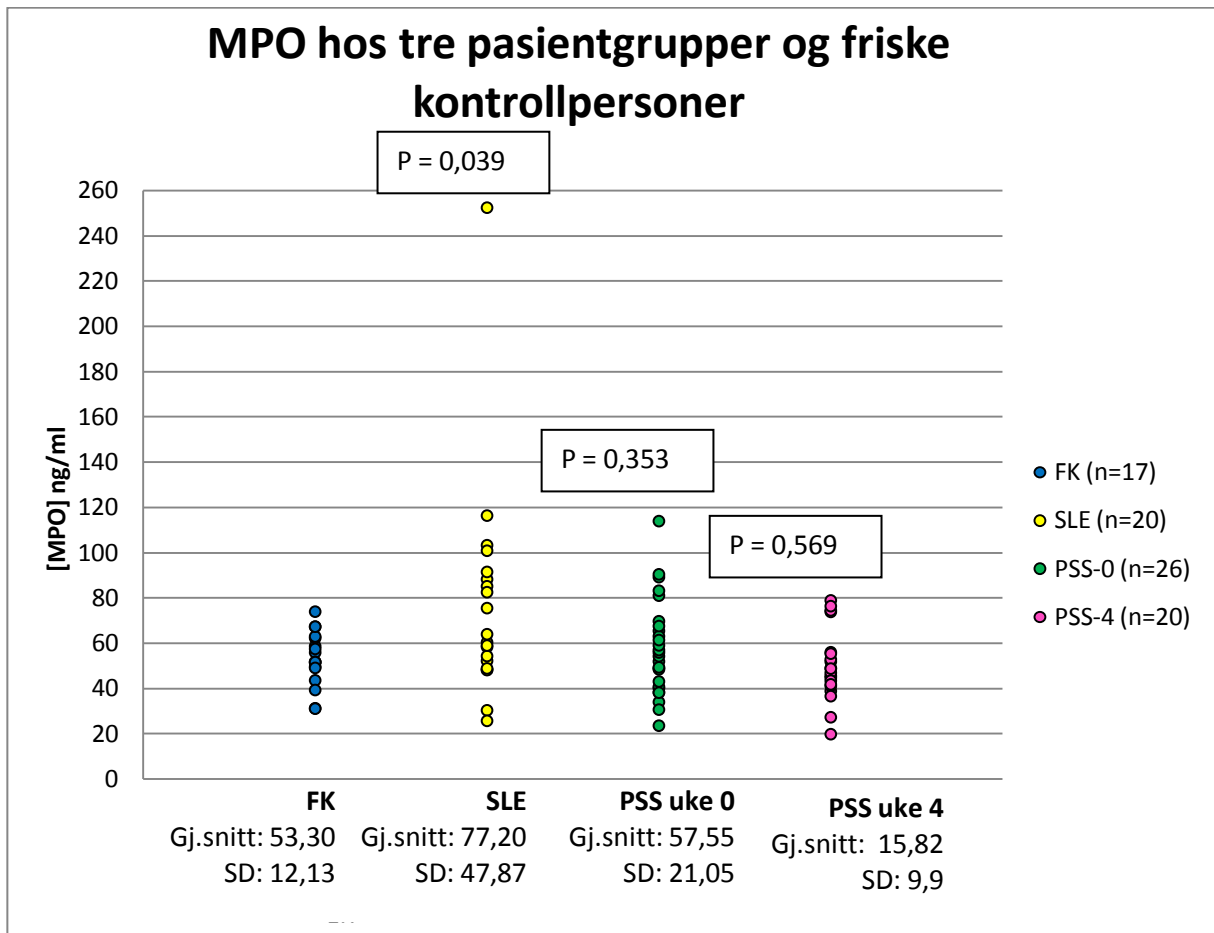
Placebo:

$P = 0,084$.

En kan ikke påstå at det er en signifikant forskjell i MPO-konsentrasjon mellom uke 0 og uke 4 hos pasienter som fikk placebo.

4.3.6 Sammenligning av friske personer med hver av pasientgruppene ved bruk av statistiske tester

Målt konsentrasjon av MPO i hver gruppe er presentert i Figur 24.



Figur 24. Alle godkjente målepunkter fra hver gruppe. $P < 0,05$ angir at gruppen er signifikant forskjellig fra kontrollgruppen (FK).

Avstand fra høyeste til laveste målepunkt er forholdsvis lik for pasientgruppene, bortsett fra ett målepunkt hos SLE-gruppen (157,75 ng/ml). En kan tydelig se at FK har lavest spredning mellom høyeste og laveste målepunkt. Det er gjort t-tester for å sammenligne måleseriene mot hver andre. Testene gjort både med og uten den høyeste verdien til SLE-gruppen.

Tosidig t-test ble brukt for å sammenligne om gjennomsnittene er signifikant forskjellige fra hverandre med 95 % signifikansnivå (Tabell 21). Tosidig F-test er brukt for å teste om de empiriske variansene for hver måleserie er signifikant ulike med 95 % signifikansnivå.

Tabell 21. P-verdier beregnet med tosidig t-test for å teste om det er signifikant forskjell mellom gruppene konsentrasjoner av MPO. Konklusjonene gjelder for både med og uten den høyeste SLE-verdien.

Gruppe	Inkludert alle målepunkter	Høyeste SLE-verdien fjernet	Konklusjon
FK vs. SLE	0,039	0,026	Signifikant forskjellig
FK vs. PSS-0	0,353		Ikke signifikant forskjellig
FK vs. PSS-4	0,569		Ikke signifikant forskjellig
SLE vs. PSS-0	0,067	0,137	Ikke signifikant forskjellig
SLE vs. PSS-4	0,025	0,011	Signifikant forskjellig

Det er kun SLE-pasientene som er signifikant forskjellig fra FK-gruppen. PSS-pasientene i uke 0 og i uke4 ligger for nær FK til at en kan påstå en signifikant forskjell. SLE-pasientene fikk signifikant forskjellig nivå av MPO fra PSS-pasientene i uke 4, men ikke i uke 0. Konklusjonene ble de samme selv om den høyeste verdien hos SLE-pasientene ble fjernet.

5 Diskusjon

Hensikten med denne oppgaven var å validere en ELISA-metode for å måle MPO-konsentrasjon i plasma og å anvende metoden på friske kontrollpersoner og to pasientgrupper. Det var interessant å undersøke om MPO stiger hos pasienter med kroniske inflammasjonssykdommer. Først omtales valideringen av metoden. Deretter diskuteres resultatene av målt MPO på friske kontrollpersoner, pasienter med systemisk lupus erythematosus og pasienter med primært Sjøgrens syndrom.

5.1 Validering av metoden

Prøvematerialet

Det første som ble testet ut var om EDTA-plasma kunne brukes i stedet for heparinplasma, selv om heparin er anbefalt av produsenten. Heparinplasma fikk en høyere absorbanse enn EDTA-plasma i samtlige målinger (Tabell 5). Tidligere studier har vist at det vil være noe lekkasje av MPO fra blodcellene til plasma som fører til økt absorbanse [23]. Det ser ikke ut til at EDTA-plasma blir like mye påvirket av denne lekkasjen som heparinplasma. Med unntak av E1 fra Person 1 (CV = 27,3 %) har alle en forholdsvis lav CV (< 15 %), noe som viser at både heparinplasma og EDTA-plasma gir stabile resultater fra plate til plate. Jo høyere CV, jo mer usikkerhet er knyttet til prøveresultatet. Produsenten anbefaler også at plasma skal sentrifugeres 2 ganger for å unngå påvirkning av MPO-lekkasje fra blodceller i størst mulig grad. To sentrifugeringer hadde størst betydning for heparinplasma (Figur 16) der nedgangen av MPO er større enn for EDTA-plasma etter andre sentrifugering. Dette støtter mistanken om at blodceller lekker MPO *in vitro* i heparinplasma. Absorbans til heparinplasma med 2 sentrifugeringer (H2) blir likevel høyere enn absorbanse til EDTA-plasma med 1 sentrifugering (E2). Selv med to sentrifugeringer kommer ikke heparinplasma ned på samme nivå som EDTA-plasma. Med disse resultatene ser det ut til at EDTA-plasma er mer stabilt siden det ikke lot seg påvirke så mye av antall sentrifugeringer. 1 sentrifugering bør være tilstrekkelig hvis den er kraftig nok. I brukermanualen er det anbefalt å sentrifugere med 1500 G, mens 2280 G er normal styrke på sentrifugeringer av pasientprøver på Avdeling for medisinsk biokjemi ved Stavanger Universitetssykehus.

På bakgrunn av målingene gjort i denne studien kan det påstås EDTA-plasma er å foretrekke fremfor heparinplasma. Hvis konsentrasjon av MPO skal sammenlignes mellom flere personer er det hensiktsmessig å bruke samme prøvemateriale på alle personene. En bør derfor alltid oppgi hvilket prøvemateriale som er brukt fordi konsentrasjonene blir høyere i heparinplasma enn i EDTA-plasma. Dersom heparin skal brukes bør plasma sentrifugeres 2 ganger. Til analyse av pasientgruppene i denne studien er det samlet inn EDTA-plasma med 1 sentrifugering og til kontrollgruppen ble det derfor brukt samme type prøvemateriale.

Kalibreringskurven

Tabell 7 viser oversikt over ligningene for kalibreringskurvene som er brukt til validering av metoden. Regresjonskoeffisienten, R^2 , sier noe om hvor godt kurven treffer på alle målepunktene og skal bli så nær 1 som mulig. R^2 ble god nok ($\geq 0,993$) for alle kurvene.

Ligningene for kurvene varierer en noe fra plate til plate, noe som viser at det ikke er så lett å gjenskape en nøyaktig lik kalibreringskurve fra analyse til analyse. Tabell 8 viser gjennomsnittlige residualer i prosent for hver kalibrator. I likhet med R^2 sier residualene noe om hvor godt kurven treffer målepunktene. Selv om $R^2 = 1$ betyr det ikke at kurven treffer perfekt på alle punktene. Med dårlig kurvetilpasning blir usikkerheten rundt resultatene større. Tendensen en kan se i tabellen er at jo lavere konsentrasjon, jo større blir residualene. Kalibrator 7 er den eneste som fikk et gjennomsnittlig residual på over 15 %. Den relative usikkerheten er altså størst for de laveste konsentrasjonene som måles.

Deteksjonsgrense

Den laveste konsentrasjonen som kan skilles fra blankprøven skal tilsvare en absorbans på 0,078. Kalibrator 7 (0,5 ng/ml), som er den nest laveste kalibratoren før blankprøven, har en gjennomsnittlig absorbans som er signifikant høyere enn 0,078. En kan påstå at deteksjonsgrensen dermed er lavere enn 0,5 ng/ml. Formelen for å beregne deteksjonsgrensen i denne studien er hentet fra en brukermanual for et ELISA-kit som benytter samme type kalibreringskurve [35]. Andre steder beregnes deteksjonsgrense ved å bruke gjennomsnitt av blankprøven + $SD \cdot 3$ [36]. Den gjennomsnittlige absorbansen for kalibrator 7 er derimot ikke signifikant høyere enn 0,082, som er beregnet deteksjonsgrense ved å bruke $3 \cdot SD$ i stedet for $2 \cdot SD$. Ved å se på Tabell 8 ser en at avvikene er høyest ved kalibrator 7. En kan altså påstå at deteksjonsgrensen er 0,5 ng/ml og det er ikke hensiktsmessig å bruke en lavere kalibrator enn det. Produsenten oppgir 0,4 ng/ml som deteksjonsgrense, noe som ville gitt svært stor usikkerhet.

Kontrollkort og variasjon i metoden (CV)

I hvert kontrollkort ble det bestemt et intervall som fremtidige målepunkter skal ligge innenfor for å bli godkjent. Jo større variasjon det er i målingene, jo bredere blir intervallet. Et smalere intervall vil gi en strengere kontrollering av resultatene og en vil kunne stole mer på resultatene som faller innenfor. CV for hver serie av K1 og K2 er henholdsvis 16,5 og 15,9 %. Gjennomsnittet av dem er 16,2 % som er bestemt som metodens mellom plate-CV. I forhold til automatiserte analysemetoder på medisinske laboratorier, der CV ofte er mindre enn 5 %, er dette relativt høyt. En lavere metodevariasjon ville ført til mindre usikkerhet rundt resultatene. Når produsenten har oppgitt en CV på 15 % kan en likevel ikke forvente å få en mindre variasjon. Etter samtaler med personer i forskningsmiljøet på Stavanger Universitetssykehus har det kommet frem at oppgitt CV for ELISA kit ofte er 15 % og den CV'en som beregnes ligger på omtrent det samme.

CV for tre måleparalleller på tre plater ble sammenlignet (Tabell 12) og varierte fra 1,2 % til 35,0 %. På hver plate var det 4 av 30 CV-verdier som lå over 15 %. Det vil si at fire prøver måtte forkastes per plate. En kan altså ikke forvente at alle prøver på en plate blir godkjent og en bør regne med at noen prøver må analyseres om igjen. CV for prøveparalleller analysert på samme plate er vist i Tabell 13 og varierte fra 8,4 til 17,7 %. Når en prøve analyseres to eller flere ganger på samme plate kan en ikke forvente at resultatene alltid blir like nok til å kunne godkjennes.

Gjenfinning

Gjenfinningen ble 62 % som vil si at når en tilfeldig prøve analyseres vil den målte konsentrasjonen bli kun 62 % av den «sanne» konsentrasjonen i prøven. Gjenfinning er et mål på metodens nøyaktighet og med en gjenfinning på 62 % er nøyaktigheten forholdsvis lav. Til å beregne gjenfinning ble plasmaprøver tilsatt en kjent mengde humant MPO for så å se hvor mye av den tilsatte mengden som kunne måles. MPO som ble tilsatt var humant MPO fra standardløsningen som fulgte med kitet. Det som ikke kan vites med sikkerhet er om MPO som tilsettes vil oppføre seg likt som MPO som allerede finnes i plasmaprøven. Analyseprinsippet baserer seg på affinitet mellom antistoff mot MPO og MPO. Om antistoffene ikke har lik affinitet til tilsatt MPO som til naturlig MPO vil gjenfinningen kunne bli for lav. Når det målte resultatet multipliseres opp med faktoren på 1,6 kan det endelige resultatet bli for høyt i forhold til «sann» verdi.

5.2 Anvendelse av metoden

Kalibreringskurvene

Kalibreringskurvene fra anvendelsen av metoden ble vurdert for å se om de er pålitelige nok til å kunne stole på prøveresultatene fra denne analyseperioden. Tabell 15 viser residualene for hver kalibrator for alle analyseplatene. For hver kalibrator er gjennomsnittlig residual lavere enn ved validering av metoden, bortsett fra kalibrator 6 og 7. Regresjonskoeffisienten er 1 for seks av platene og 0,999 for fire av dem. Det tyder på at kurvetilpasningene er relativt gode og konsentrasjonene som beregnes fra kurven er pålitelige. Kurvetilpasningene for disse ti analyseplatene så ut til å være bedre enn for de seks platene som ble brukt til validering (Tabell 8). Det kan ha sammenheng med økt presisjon ved utførelsen av metoden ettersom erfaringen øker utover i arbeidet med prosjektet.

Kontrollmålingene

Når en skal overvåke analysemetoden over tid er det viktig å se at kontrollprøvene får verdier som ligger rundt det gjennomsnittet som er bestemt for kontrollkortet. Hvis alle punktene hadde ligget på samme side av gjennomsnittet ville det vært et tegn på at metoden gir systematisk for lave eller for høye verdier.

K1:

Dette kontrollkortet viser at metoden har stor variasjon både innen-dag og dag-til-dag. På grunn av metodens naturlige variasjon blir konsentrasjonene både høyere og lavere enn gjennomsnittet. De tre siste dagene havner alle målingene over gjennomsnittet, men det ser ikke ut til å være en jevn stigning og kortet viser ingen tegn til systematiske feil. Den ekstremt høye verdien på plate 9 skyldes en fabrikkasjonsfeil med platen og ikke analysemetodens variasjon.

K2:

K2 har en jevn stigning av verdiene gjennom analyseperioden og ser ut til å være systematisk for høye de tre siste dagene. Det er fortsatt en naturlig variasjon som gjør at punktene havner litt høyere den ene dagen og litt lavere den andre dagen, men variasjonen ligger ikke lenger

rundt senterlinjen i kontrollkortet. Hva som er årsaken til stigningen er ukjent, men kun sett ut fra dette ene kontrollkortet ser det ut som en systematisk feil ved analysene.

Det er større avvik mellom to kontroller målt på samme plate hos K2 enn hos K1. På plate 5 og plate 8 havnet begge målepunktene for K2 over øvre varselgrense. Når begge målepunktene på samme plate havner over øvre varselgrense kan det tyde på at alle verdiene på den aktuelle platen har blitt for høye. Målepunktene til K1 på plate 5 og plate 8 ligger derimot innenfor varselgrensene og er godkjente. Plate 5 ble forkastet på grunn av svært høye verdier på alle pasientprøvene, mens plate 8 ble godkjent. I følge kriteriene under punkt 3.6 kan alle analyseplaten godkjennes. Hadde det vært flere plater tilgjengelig burde plate 8 blitt analysert på nytt for å få et mer pålitelig resultat.

Friske kontrollpersoner

Gjennomsnittlig konsentrasjon av MPO for FK-gruppen er 53,30 ng/ml og verdiene varierer fra 31,00 ng/ml til 73,87 ng/ml. Sammenlignet med MPO analysert i EDTA-plasma i tidligere studier (Tabell 1) stemmer verdiene godt med Wendland og Scheffer, mens i studiene til Brennan og Telles ble konsentrasjonene av MPO mye lavere. Samme metode er brukt i alle studiene, men fra ulike produsenter. Det er ikke funnet noen god forklaring på de store variasjonene. Blant personene i denne studien ser det ikke ut til nivået av MPO har en direkte sammenheng med hverken kjønn eller alder (Figur 20). Hvis en skulle ha funnet ut om kjønn er av vesentlig betydning burde gruppen med forsøkspersoner vært større og fordelingen av kvinner og menn mer jevn. Ingen av de friske kontrollene er fastende. I en studie er det vist at det bare er en liten forskjell i MPO-konsentrasjon hos fastende og ikke-fastende personer [23]. Derfor har det trolig liten betydning for resultatene i denne studien.

Systemisk lupus erythematosus

Alle godkjente resultater av SLE-pasientene er gitt i Tabell 17. Nivåene av MPO ligger jevnt spredt mellom 25,62 til 116,32 ng/ml, mens én pasient ligger svært høyt i forhold til de andre; SLE 12 med 252,40 ng/ml. Gjennomsnittet er høyere enn for FK. FK-gruppen og SLE-pasientene ble testet mot hverandre, både med og uten den høyeste verdien til SLE-pasientene, og i begge tilfeller er MPO-konsentrasjonen hos SLE-pasientene signifikant forskjellig fra FK-gruppen (Tabell 21). Det er tidligere gjort studier der oksidativt stress og MPO er målt hos SLE. Morgan et al. [15] har funnet økte nivåer av markører for oksiderte proteiner som korrelerte med sykdomsaktiviteten. Konsentrasjonen av MPO var derimot lavere enn den friske kontrollgruppen og forfatteren har foreslått at MPO ikke er ansvarlig for proteinoksidering. Dette er imidlertid en litt eldre artikkel (2005) og nyere studier har fått motsatte resultater. Telles et al. [25] fant økte MPO konsentrasjoner hos SLE i forhold til friske personer. I deres studie ble pasientene inndelt etter grad av sykdomsaktivitet (høy og lav), men konsentrasjonen av MPO var ikke signifikant forskjellig mellom gruppene. I studien viste de at MPO var høyere hos lupuspatientene som også hadde artritt. De foreslår at konsentrasjonen av MPO kan være avhengig av hvilke type organer som rammes av sykdommen.

Det er ikke gitt informasjon om sykdomsaktiviteten til SLE-pasientene i dette prosjektet. Det kunne vært interessant å se om MPO-konsentrasjonen stiger med økt sykdomsaktivitet hos

disse pasientene. Analysing av markører for oksidativt stress, som produkter av oksiderte proteiner (AOPP) og protein karbonyl (PC) av de samme pasientene kunne vært interessant for å vise en eventuell sammenheng mellom oksidativt stress og MPO.

Primært Sjøgrens syndrom

PSS-pasientene i uke 0 hadde høyere gjennomsnitt (57,55 ng/ml) og større spredning mellom målepunktene enn FK-gruppen (CV er henholdsvis 36,6 % og 22,9 %). Gjennom t-test ble det imidlertid vist at hverken PSS-pasientene i uke 0 eller i uke 4 hadde signifikant forskjellig konsentrasjon fra FK (Tabell 21). I en tidligere studie med de samme PSS-pasientene ble det påvist økt oksidativt stress ved måling av AOPP og PC [9]. Konsentrasjonene av AOPP og PC var betydelig høyere hos PSS-gruppen enn hos den friske kontrollgruppen, P er henholdsvis <0,002 og 0,0005. AOPP er produkter av proteinoksidering som delvis skyldes økt MPO-aktivitet. Oksidativt stress hos kroniske inflammasjonssykdommer oppstår hovedsakelig som følge av økt produksjon av ROS [9]. Økte konsentrasjoner av inflammasjonsmarkører indikerer at pasientgruppen hadde inflammasjon da prøvene ble tatt. Særlig konsentrasjonen av nøytrofile granulocytter er økt og det var derfor forventet at konsentrasjonen av MPO også ville være høyere hos disse pasientene i forhold til FK-gruppen. Det hadde vært interessant å se om sykdomsaktiviteten til den enkelte pasient har sammenheng med konsentrasjon av MPO, men den informasjonen er ikke gitt.

Sammenligning mellom PSS uke 0 og PSS uke 4 er gitt vist i Figur 23. Gruppen som fikk medikamentet Kineret og gruppen som fikk Placebo er vist i hvert sitt plott. Hos begge gruppene kan en tydelig se at konsentrasjon av MPO har hatt nedgang hos alle unntatt to pasienter. Likevel ble var det ikke signifikant forskjell mellom uke 0 og uke 4 hos noen av gruppene. Det er interessant å se at resultatene for begge gruppene ble så like når kun den ene gruppen har fått medisin.

5.3 Oppsummering

Forskjellen mellom kalibreringskurvene viser at det kan bli store variasjoner fra plate til plate. Absorbansene for platene varierer mye, men så lenge forholdene mellom absorbans for kalibreringskurven og absorbans for prøvene er det samme skal det ikke ha stor betydning for konsentrasjonene som beregnes. Etableringen av kontrollkortet viste derimot at variasjonen mellom platene er stor og resultatene av prøvene som analyseres senere vil ha en viss usikkerhet knyttet til seg, selv om de faller innenfor kriteriene for hva som kan godkjennes. Hadde metodens variasjon vært lavere, ville kanskje spredningen av målepunktene for hver gruppe blitt mindre, og det kunne vært lettere å skille de ulike grupper fra hverandre med sikkerhet. PSS-pasientene lå litt høyere enn FK-gruppen, men ikke nok til å kunne påstå en signifikant forskjell fordi mange av konsentrasjonene lå på samme nivå. Det er likevel ikke sikkert at en mer presis metode ville gjort det lettere å skille gruppene fra hverandre når variasjonen innen hver gruppe er så stor.

Underveis i studiet ble det gjort endringer i utførelsen av metoden for å optimalisere egen presisjon og metodens nøyaktighet. Det at flere trinn måtte endres underveis viser at metoden ikke var så godt beskrevet på forhånd. Brukermanualen [27] ga mindre opplysninger om

Validering og anvendelse av ELISA-metode for å måle myeloperoksidase i plasma

metoden enn ønskelig. ELISA-metoden inneholder mange manuelle steg som alle kan føre til økt variasjon mellom resultatene. På grunn av den lave gjenfinningen (62 %) bør metoden kun brukes til sammenligning av ulike grupper, men ikke til diagnostisk arbeid.

6 Konklusjon

Et ELISA-kit for å kvantifisere MPO i plasma ble validert og anvendt på to grupper pasienter og en frisk kontrollgruppe. Prosedyren for ELISA-metoden inneholder mange manuelle steg som fører til økt variasjon. Ulike parametere ble testet ut for å bestemme metodens nøyaktighet, variasjon og pålitelighet.

Resultatene viste at både heparin- og EDTA-plasma kan benyttes som prøvemateriale, men for alle prøver som skal sammenlignes må det brukes samme type plasma. EDTA-plasma foretrekkes fordi det ser ut til å bli mindre påvirket av lekkasje av MPO fra blodceller *in vitro*. Metoden ble validert med hensyn på ulike parametere og resultatene ble som følger:

- Kalibreringskurve: Fire parametere logistisk med 7 kalibratorer (0,5 – 30 ng/ml) og blankprøve (0 ng/ml).
- Deteksjonsgrense = 0,5 ng/ml.
- Mellom plate-CV = 16,2 %.
- Gjenfinning = 62 %.

Metoden er pålitelig nok for det formål som er gitt i denne studien, men bør ikke brukes til diagnostisering.

Det var forventet at konsentrasjonen av MPO ville stige noe hos pasienter med kroniske inflammasjonssykdommer fordi aktiveringen av nøytrofile granulocytter øker ved en betennelsesreaksjon. MPO-konsentrasjonen var signifikant forskjellig fra FK-gruppen hos SLE-pasientene, men ikke hos noen av PSS-pasientene, hverken i uke 0 eller i uke 4.

Etter fire uker med medisin hadde ikke konsentrasjon av MPO sunket signifikant, verken hos gruppen som fikk Kineret eller hos placebogruppen.

7 Referanser

1. Brennan, M.-L., et al., *Prognostic Value of Myeloperoxidase in Patients with Chest Pain*. The New England Journal of Medicine, 2003. **349**: s. 1595-1604.
2. Capeillère-Blandin, C., et al., *Respective role of uraemic toxins and myeloperoxidase in the uraemic state*. Nephrol. Dial. Transplant, 2006. **21**(6): s. 1555-1563.
3. Davies, M.J., *Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention*. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2010. **48**: s. 8-19.
4. Blomhoff, R., *Antioksidanter og oksidativt stress*. Tidsskrift for Den norske lægeforening, 2004. **124**: s. 1643-1645.
5. Lü, J.-M., et al., *Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems*. J Cell Mol Med., 2010. **14**: s. 840-860.
6. Norheim, K.B., G. Jonsson, and R. Omdal *Biological mechanisms of chronic fatigue*. 2011.
7. Norsk Helseinformatikk. *Systemisk lupus erytematosus (SLE)*. 10.2.2010 15.3.2012]; Nedlastet fra: <http://nhi.no/sykdommer/muskel-skjelett/ulike-muskelsykdommer/systemisk-lupus-erytematosus-3186.html?page=all>.
8. Norsk Helseinformatikk. *Sjøgrens syndrom*. 15.1.2010 19.3.2012]; Nedlastet fra: <http://nhi.no/sykdommer/muskel-skjelett/giktsykdommer/sjogrens-syndrom-3185.html?page=all>.
9. Norheim, K.B., et al., *Oxidative stress, as measured by protein oxidation, is increased in primary Sjögren's syndrome*. Free Radical Research, 2012. **46**: s. 141-146.
10. Norheim, K.B., et al., *Interleukin-1 Inhibition and Fatigue in Primary Sjögren's Syndrome - A Double Blind, Randomised Clinical Trial*. PLoS ONE, 2012. **7**(1).
11. Norsk Helseinformatikk. *Generelt om immunsystemet*. 26.10.2009 19.3.2012]; Nedlastet fra: <http://nhi.no/foreldre-og-barn/ungdom/kroppen-var/immunsystemet-generelt-30594.html>.
12. Norsk Helseinformatikk. *Det ervervede immunsystemet*. 26.10.2009 19.3.2012]; Nedlastet fra: <http://nhi.no/foreldre-og-barn/ungdom/kroppen-var/immunsystemet-ervervet-30600.html?page=all>.
13. Lettre, G. and J.D. Rioux, *Autoimmune diseases: insights from genome-wide association studies*. Human Molecular Genetics, 2008. **17**: s. 116-121.
14. Norsk Helseinformatikk. *Autoimmune sykdommer*. 9.11.2009 19.3.2012]; Nedlastet fra: <http://nhi.no/sykdommer/allergi/diverse/autoimmune-sykdommer-2527.html?page=all>.
15. Morgan, P.E., A.D. Sturgess, and M.J. Davies, *Increased Levels of Serum Protein Oxidation and Correlation With Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus*. Arthritis & Rheumatism, 2005. **52**: s. 2069-2079.
16. Fernández, A.A., et al. *Chronic fatigue syndrome: aetiology, diagnosis and treatment*. 2009.
17. Kelley, K., et al. *Cytokine-induced sickness behavior*. 2003. **17**, 112-118.
18. Klebanoff, S.J., *Myeloperoxidase: friend and foe*. Journal of Leukocyte Biology, 2005. **77**: s. 598-625.
19. Lea, T., *Immunologi og immunologiske teknikker*. 2006, Bergen: Fagbokforl. 400 s.
20. Mathy-Hartert, M., et al., *Purification of myeloperoxidase from equine polymorphonuclear leucocytes*. Canadian Journal of Veterinary Research, 1998. **62**: s. 127-132.
21. Madej, T., et al., *MMDB: 3D structures and macromolecular interactions.*, 2012, Nucleic Acids Res.

22. Blair-Johnson, M., T. Fiedler, and R. Fenna, *Human Myeloperoxidase: Structure og a Cyanide Complex and Its Interaction with Bromide and Thiocyanate Substrates at 1,9 Å Resolution*. *Biochemistry*, 2001. **40**: s. 13990-13997.
23. Scheffer, P.G., et al., *Myeloperoksidase concentrations in EDTA-plasma of healthy subjects are discordant with concentrations in heparin-plasma and serum*. *Clinical Biochemistry*, 2009: s. 1490-1492.
24. Wendland, A.E., J.L. Camargo, and C.A. Polanczyk, *Effect og preanalytical variables on myeloperoxidase levels*. *Clinica Chimica Acta*, 2010: s. 1650-1655.
25. Telles, R.W., et al., *Increased plasma myeloperoxidase levels in systemic lupus erythematosus*. *Reumathol Int*, 2009. **30**: s. 779-784.
26. Johnsen, R.S., *ELISA deteksjon av NGAL i plasma og urin. Evaluering, etablering og anvendelse av metode.*, in *Institutt for matematikk og naturvitenskap 2012*, Universitetet i Stavanger: Stavanger.
27. BioVendor, *Human MPO ELISA, Product Data Sheet*, 2011, BioVendor.
28. Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*. 7. ed. 2007, New York: W. H. Freeman and Company.
29. Rodak, B.F., G.A. Fritsma, and K. Doig, *Hematology: clinical principles and applications*. 2007, St. Louis, Mo.: Saunders Elsevier. XIII, 816 s.
30. Store norske leksikon. *EDTA*. 12.9.2011 9.4.2012]; Nedlastet fra: http://snl.no/.sml_artikkel/EDTA.
31. Store norske leksikon. *heparin*. 15.02.2009 9.4.2012]; Nedlastet fra: <http://snl.no/heparin>.
32. Shih, J., et al., *Effect of Collection Tube Type and Preanalytical Handling on Myeloperoxidase Concentrations*. *Clinical Chemistry*, 2008: s. 1076-1079.
33. GraphPad Software. *Goodness of fit*. [cited 2012 10.4.2012]; Nedlastet fra: http://graphpad.com/curvefit/goodness_of_fit.htm.
34. Motulsky, H.J. and A. Christopoulos, *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting.*, 2003, GraphPad Software Inc.
35. BioPorto Diagnostics, *NGAL ELISA Kit KIT 036*. 2011: BioPorto.
36. MacDougall, D. and W.B. Crummett, *Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry*. *Anal. Chem.*, 1980. **52**(14): s. 2242-2249.
37. Rustad, P., *Validering av analysekvalitet, Del 2*. *Klinisk Kjemi i Norden*, 2001. **2**: s. 12-15.
38. Thompson, M. and R. Wood, *Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories*. *Pure & Applied Chemistry*, 1995. **67**: s. 649-666.
39. Burns, D.T., K. Danzer, and A. Townshend, *Use of the terms "recovery" and "apparent recovery" in analytical procedures*. *Pure & Applied Chemistry*, 2002. **74**: s. 2201-2205.
40. Husøy, A.-M., *Blodprøvetaking i praksis*. 2005, Oslo: Akribe.
41. Helbæk, M., *Statistikk for kjemikere*. 2001, Trondheim: Tapir Akademisk Forlag.

8 Tabeller

Tabell 1. MPO målt med ELISA hos friske kontrollpersoner og pasienter med SLE.	10
Tabell 2. Fire plasma typer ble testet.....	20
Tabell 3. Informasjon om pasientgruppene og gruppen med friske kontroller.....	21
Tabell 4. Oversikt over hvilke PSS-pasienter som fikk Kineret og hvilke som fikk placebo. Hver pasient er merket med hvert sitt tresifret «ID»-nummer.	21
Tabell 5. Målte konsentrasjoner av MPO (gitt i absorbans) på EDTA- og heparinplasma med 1 sentrifugering.....	26
Tabell 6. Forhold mellom plasma sentrifugert 1 gang og plasma sentrifugert 2 ganger. Absorbans ved 1 sentrifugering er satt som 100 %.	27
Tabell 7. Ligningene og R^2 for seks kalibreringskurver.....	28
Tabell 8. Gjennomsnittsresidualer for seks kalibreringskurver.	29
Tabell 9. Målt absorbans for kalibrator 7 og kalibrator 8 på seks plater.	29
Tabell 10. Beregnede verdier for etablering av kontrollkortene til kontrollprøvene K1 og K2. Alle verdiene er oppgitt i ng/ml bortsett fra CV som er oppgitt i %.	30
Tabell 11. Beregnet gjenfinning i prosent hos kontrollprøvene K1 og K2 fra fem forsøk.....	31
Tabell 12. CV for måleparallelleler av 30 prøver på tre plater. Alle verdiene er gitt i prosent. ...	31
Tabell 13. Sammenligning av CV for flere prøveparallelleler. Tallene er gitt i prosent.....	32
Tabell 14. Beregnet CV for ELISA MPO kit.....	32
Tabell 15. R^2 for hver kalibreringskurve for ti plater og residualene i prosent for hver kalibrator.	33
Tabell 16. Resultatene av målt MPO hos friske kontrollpersoner som er godkjente. Verdiene er gitt i ng/ml.	35
Tabell 17. Resultatene av MPO målt hos SLE-pasienter som er godkjent. Verdiene er gitt i ng/ml.	37
Tabell 18. Godkjente resultater av målt MPO hos pasienter med PSS i uke 0. Verdiene er gitt i ng/ml.	39
Tabell 19. Godkjente resultater av målt MPO hos pasienter med PSS i uke 4. Verdiene er gitt i ng/ml.	40
Tabell 20. Differanse i MPO-konsentrasjon mellom uke 0 og uke 4.	41

Tabell 21. P-verdier beregnet med tosidig t-test for å teste om det er signifikant forskjell mellom gruppens konsentrasjoner av MPO. Konklusjonene gjelder for både med og uten den høyeste SLE-verdien.....44

9 Figurer

Figur 1. Nøytrofil granulocyt fagocytterer (spiser opp) en bakterie. MPO i granula deltar i bekjempelsen av bakterien.	6
Figur 2. Struktur av myeloperoksidase med to tunge kjeder (blå og grønn) og to lette kjeder (brun og lilla) [21]. Figuren er modifisert i dataprogrammet Cn3D for å få en god illustrasjon.	6
Figur 3. MPOs enzymatiske reaksjonssyklus [3].	7
Figur 4. HOCl kan danne reaktive oksygenforbindelser (ROS) [18].	8
Figur 5. Cytokiner stimulerer nøytrofile granulocytter som fører til aktivering og degranulering.	8
Figur 6. Oksidativt stress er en tilstand der konsentrasjonen av oksidanter øker i forhold til antioksidanter.	9
Figur 7. ELISA-plate med 96 brønner. Brønnene er fylt med prøveløsning av varierende konsentrasjoner som gir varierende fargeintensitet [26].	10
Figur 8. Prinsipp for deteksjon av MPO med ELISA-metode.	11
Figur 9. Prinsipp for spektrofotometri.	12
Figur 10. Prøveglass med fullblod før sentrifugering (til høyre) og etter sentrifugering (til venstre).	14
Figur 11. Fire-parameter logistisk kalibreringskurve.	14
Figur 12. Bildet til venstre viser hvordan en måler avstand fra gjennomsnitt av y (den horisontale linjen midt på y-aksen) til hvert målepunkt. Bildet til høyre viser hvordan en måler hver residual; avstanden fra hvert målepunkt til kurven [33].	15
Figur 13. Shewhart kontrollkort.	17
Figur 14. «Spiking» av en plasmaprøve for å beregne gjenfinning.	18
Figur 15. Gjennomsnittlig absorbans til heparin- og EDTA-plasma fra Person 1 og Person 2 med 1 sentrifugering. Tallene over søylene viser gjennomsnittlig absorbans. Prosentavvik mellom heparin og EDTA vises inne i de hvite boksene i hver søyle.	26
Figur 16. Forhold mellom absorbans til plasma som er sentrifugert 1 gang (blå søyler) og plasma som er sentrifugert 2 ganger (røde søyler). Tallet i prosent over de røde søylene angir hvor mye de utgjør av de blå søylene. Absorbansen av plasma med 1 sentrifugering er 100 %.	27
Figur 17. Eksempel på kalibreringskurven for en plate.	28

Figur 19. Shewhart kontrollkort for K1 med målte konsentrasjoner av MPO på ti plater.	33
Figur 20. Shewhart kontrollkort for K2 med målte konsentrasjoner av MPO på ti plater.	34
Figur 21. Fordeling av MPO mellom kjønn og alder hos friske kontrollpersoner. Hver søyle representerer gjennomsnittlig konsentrasjon av MPO for én person. Den sorte horisontale linjen er gjennomsnitt av alle konsentrasjonene.	36
Figur 22. Korrigerte verdier av målt MPO-konsentrasjon hos pasienter med SLE. Den sorte horisontale linjen viser gjennomsnittet av alle konsentrasjonene.	38
Figur 23. Korrigerte nivåer av MPO hos pasienter med PSS. Den sorte, horisontale linjen viser gjennomsnittet av alle konsentrasjonene.	40
Figur 24. Pasienter som har fått Kineret (til venstre) og placebo (til høyre). De grønne punktene representerer målte konsentrasjoner i uke 0 og de lilla representerer målte konsentrasjoner i uke 4. De oransje linjene viser nedgang av MPO, mens de sorte viser en økning.	42
Figur 25. Alle godkjente målepunkter fra hver gruppe. $P < 0,05$ angir at gruppen er signifikant forskjellig fra kontrollgruppen (FK).	43

Vedlegg

Vedlegg A. ELISA MPO kit

Produsent: BioVendor

LOT-nummer: XII-155

Innholdsliste:

Komponent	Kvantitet
Vaskebuffer 20x	2 flasker á 20 ml
Fortynningsbuffer A 5x	1 flaske á 20 ml
Fortynningsbuffer B 10x	2 flasker á 5 ml
MPO Standard	2 flasker á 0,5 ml (når rekonstituert)
Biotinylert sekundært antistoff	2 flasker á 1 ml (når rekonstituert)
Streptavidin-peroxidase	1 flaske á 1 ml (når rekonstituert)
TMB substrat	1 flaske á 20 ml
Stoppløsning	1 flaske á 20 ml
Plate med 96 mikrobrønner, dekket med antistoff	2
Plastramme	1
Klebende kontaktfolie	4
Brukermanual	1
Sertifikant for kvalitetskontroll	1

Vedlegg B. Prosedyre for ELISA MPO kit

B1 Tillaging av løsninger og prøvefortynning

Alle løsninger: Oppbevar løsningene i kjøleskap (2-8 °C) når de ikke er i bruk. De løsningene som skal brukes i analysen må først komme opp i romtemperatur (stå en time på benk før bruk). Når flaskene i kitet er åpnet må de resterende væskene som ikke brukes overføres til tette polypropylenrør. Hvis de skal brukes opp innen 1-2 dager kan de oppbevares i originalflaskene, men da må korken tettes med parafilm. Homogeniser alle løsninger før bruk.

Vaskebuffer:

WASH buffer 20x

Hel plate (tot. 400 ml):

20 ml vaskebuffer + 380 ml destillert vann.

Halv plate (tot. 200 ml):

10 ml vaskebuffer + 190 ml destillert vann.

Andre volumer: 1 del vaskebuffer blandes med 19 deler destillert vann.

Fortynningsbuffer:

Dilution buffer A 5x

Dilution buffer B 10x

Hel plate (tot. 50 ml):

10 ml fortynningsbuffer A + 15 ml destillert vann.

5 ml fortynningsbuffer B + 20 ml destillert vann.

Halv plate (tot 25 ml):

5 ml fortynningsbuffer A + 7,5 ml destillert vann.

2,5 ml fortynningsbuffer B + 10 ml destillert vann.

Bland fortynningsbuffer A og B hver for seg og deretter sammen med hverandre.

Kalibratorløsninger:

Stamløsningen til kalibratoren er i pulverform og må løses opp i 0,5 ml destillert vann. På grunn av vakuüm i flasken bør vannet tilsettes med sprøyte som stikkes gjennom gummikorken. Åpnes korken før vannet er tilsatt kan noe av pulveret fly ut.

Ut i fra stamløsningen skal det lages en serie på åtte bruksløsninger med synkende konsentrasjoner. Tabellen under viser hvilke konsentrasjoner de åtte løsningene skal ha og forholdet mellom stamløsning og fortynningsbuffer.

Validering og anvendelse av ELISA-metode for å måle myeloperoksidase i plasma

Kalibreringsstandard	[MPO] ng/ml	µl buffer	µl*	Totalt volum
1	30	322	28 (staml.)	350
2	20,1	662,5	37,5 (staml.)	350
3	10,05	350	350 (std. 2)	350
4	5	350	350 (std. 3)	421,5
5	2	421,5	278,5 (std. 4)	350
6	1	350	350 (std. 5)	350
7	0,5	350	350 (std. 6)	700
8	0	350	0	350

*µl stamløsning eller kalibrator

Restene av den stamløsningen fryses ned i alikvoter på 100 µl. Den er holdbar i 24 timer i kjøleskap og en måned i -20 °C.

Biotinylert sekundært antistoff (tracer):

Det sekundære antistoffet er i pulverform og må løses opp i 1 ml destillert vann. Bruk en sprøyte til å tilsette vannet, eventuelt stikk en kanyle gjennom korken for å fjerne vakuum og deretter tilsett vann. Påse at alt pulveret er blitt løst opp.

Hel plate (tot. 12 ml):

1 ml tracer løsning + 11 ml dilution buffer.

Halv plate (tot. 6 ml):

0,5 ml tracer + 5,5 ml dilution buffer.

Ellers: 1 del ferdig oppløst tracer løsning + 11 deler ferdig laget fortynningsbuffer.

Løsningen er holdbar en måned i kjøleskap etter at den er løst ut i vann og korken tettes med parafilm.

Streptavidin-peroxidase (konjugat):

Streptavidin-peroxidase er i pulverform og må løses opp i 1 ml destillert vann. Bruk en sprøyte til å tilsette vannet, eventuelt stikk en kanyle gjennom korken for å fjerne vakuum og deretter tilsett vann. Påse at alt pulveret er blitt løst opp.

Hel plate (tot. 12 ml):

0,5 ml konjugat løsning + 11,5 ml fortynningsbuffer.

Halv plate (tot. 6 ml):

0,25 ml konjugatløsning + 5,750 ml fortynningsbuffer.

Andre volumer: 1 del oppløst konjugat + 23 deler ferdig laget fortynningsbuffer.

Løsningen er holdbar en måned i kjøleskap etter at den er løst ut i vann. Korken må tettes med parafilm.

TMB (substrat):

Substratet pipetteres rett fra flasken.

Hel plate: 12 ml.

Halv plate: 6 ml.

Resten som blir igjen i plastkaret etter tilsetning må overføres tilbake til flasken. Det er kun 20 ml totalt av TMB og dermed kan kun 5 ml brukes per halve plate.

Løsningen er holdbar en måned i kjøleskap etter åpning. Korken må tettes med parafilm.

Stoppløsning:

Stoppløsningen pipetteres rett fra flasken.

Hel plate: 12 ml

Halv plate: 6 ml

Resten som blir igjen i plastkaret etter tilsetning må overføres tilbake til flasken. Det er kun 20 ml totalt av TMB og dermed kan kun 5 ml brukes per halve plate.

Løsningen er holdbar en måned i kjøleskap etter åpning. Korken må tettes med parafilm.

Prøvefortynning:

Plasma må være fullstendig tint. Homogeniser ved å knipse lett på prøverøret og vende det opp ned gjentatte ganger.

400 µl prøvefortynning til tre måleparaleller:

40 µl plasma

360 µl fortynningsbuffer.

Restene av prøvefortynningen etter tilsetning til platen bør kastes.

A2 Utførelse av metoden

På forhånd, før hele analyseprosessen starter:

Skriv ned på et skjema over 96 brønner hvilke prøver som skal hvor på platen.

Beregn hvor mange alikvoter en trenger av hver prøve.

Finn frem små PP-rør til fortynning av prøver, kontroller og kalibratorer. Merk alle rørene med innhold og gjerne dato. Merk små titreringsrør til å pipettere prøvene fra.

Finn frem alt utstyr en trenger til oppmåling av væsker, saks, pinsett og nåler til å stikke hull i reagensene som er i vakuum.

1. Sette alle reagenser i romtemperatur:

Alle reagenser som skal brukes må settes frem i romtemperatur (20 – 25 °C) 1 time før de skal brukes. Sett frem alt det en trenger for en halv eller en hel plate og sett resten tilbake i kjøleskap.

Skriv dato og initialer på alt som settes frem i romtemperatur og som skal åpnes samme dag.

TMB er lysømfintlig og må settes inn i et skap eller pakkes inn i aluminiumsfolie.

Bruk en stålpinsett for å opp forseglingen på flaskene.

2. Finne frem platerammen og strips for en halv/hel plate:

Hel plate: Ta ut hele platen. Finn frem to hele kontaktfolier.

Halv plate: Ta ut 6 strips, fest de på plastrammen og legg resten tilbake i aluminiumsposen.

Finn frem kontaktfolie til en halv plate (må ha to stk for en analyse, klipp en hel folie i to).

3. Finne frem utstyr til oppbevaring og tillaging av løsninger:

Finn frem og merk plastkar som en skal pipettere med multipipette fra; vaskebuffer, tracer, streptavidin-peroxidase, TMB og stoppløsning.

Finn frem og merk 50 ml PP-rør til å lage dilutionbuffer A og B (2 stk). 2 x 15 ml PP-rør; 1 til

tracer og 1 til streptavidin. Finn frem og merk glassflaske til vaskebuffer (200 ml halv plate, 400 ml hel plate).

4. Finne frem riktig antall alikvoter av hver prøve som skal analyseres.

Finn frem en isoporeske og ha i is. Hent ut riktig antall prøver fra fryseren og la prøvene stå til tining på isen i romtemperatur mens andre løsninger tilberedes.

5. Lage vaskebuffer:

Bruk en glassflaske, enten 200 ml eller 400 ml for å ha vaskeløsningen i. Sett restene tilbake i kjøleskapet og tett igjen med parafilm. Med mindre det er mer enn en mnd til neste analyse, lag 400 ml med en gang for å spare tid ved neste analyse.

6. Lage fortynningsbuffer:

Lag fortynningsbufferne slik det står beskrevet i ”Tillaging av løsninger”.

Hel plate (50 ml): Bruker opp halve buffer A og en hel buffer B. Tett buffer A med parafilm og sett den tilbake i kjøleskapet.

Halv plate (25 ml): Bruker opp $\frac{1}{4}$ av buffer A og en halv buffer B. Sett begge tilbake i kjøleskapet med parafilm.

7. Rekonstituere kalibreringsstandard:

Gjør som beskrevet i ”Tillaging av løsninger”. Bruk en sprøyte for å tilsette nøyaktig 500 μ l destillert vann ved å stikke sprøyten ned gjennom gummilokket. Bland godt slik at alt pulveret løses i vann. Unngå å riste flasken.

8. Lage 8 kalibratorløsninger:

Lag kalibratorløsningene slik det står beskrevet i ”Tillaging av løsninger”. Det skal alltid være 3 paralleller og dermed må det lages minst 350 μ l av hver løsning. Brukt rotmikser til å blande løsningene godt.

9. Fortynne prøver/kontroller 1:10:

Sett alle prøvene på et stativ i romtemperatur slik at de tiner helt før de skal fortynnes.

Homogeniser prøven. Totalvolumet på en prøvfortynning som skal måles en gang i tre paralleller bør være 400 μ l:

40 μ l plasma + 360 μ l fortynningsbuffer = 400 μ l prøveløsning.

Lag prøveløsningene i PP-rørene med lokk slik at de kan blandes godt. Overfør deretter løsningene til titeringsrørene som er merket på forhånd.

10. Tilsette 100 μ l av alle prøvene til platen og start inkubering:

Hver prøveløsning skal tilsettes i tre brønner for å få tre måleparalleller per prøve. Bruk en åttekanals multipipette til å tilsette åtte prøveløsninger samtidig til analyseplaten. Pipetten skal være innstilt på 100x3 μ l. Hold alle spissene over hver sin brønn og slipp ut 100 μ l. Flytt pipetten slik at alle spissene står over neste rekke med åtte brønner og slipp ut 100 μ l. Gjenta og slipp ut de siste 100 μ l med prøveløsning. Nå er åtte prøveløsninger tilsatt platen i tre paralleller. Tilsett de resterende prøvene og kalibratorene på samme måte. Ha alltid kontroll på hvilke prøver som ble tilsatt hvor.

Når alle prøveløsningene og kalibratorene er kommet i brønnene, start en stoppeklokke på 60 min. Legg kontaktfolien forsiktig over og se at den er tett over platen. Sett platen til inkubering på et sted den kan stå uforstyrret. Skriv ned klokkeslett for start og stopp av inkuberingen.

FØRSTE INKUBASJON – 60 min 20-25 °C

11. Rekonstituere Tracer-solution

Under første inkubasjon lages tracer-solution til som beskrevet i ”Tillaging av løsninger”.

12. Vaskeprosess 1:

Hell vaskebufferen i et plastkar og legg frem tørt celloststoff på forhånd. Når stoppeklokken har talt ned er inkuberingen ferdig. Dra kontaktfolien forsiktig av platen og pass på så ingen løsninger skvetter over i andre brønner. Tøm ut alle prøveløsningene i vasken ved å snu platen opp ned og bank den mot tørt celloststoff for å få ut restene.

Tilsett 200 µl vaskebuffer i alle brønner. Når siste rad med brønner er fylt skal det gå 20 sekunder før en tømmer det ut i vasken på samme måte som med prøveløsningene. Bank platen skikkelig mot celloststoff for å få ut alle restene av vaskebufferen.

13. Tilsette 100 µl Tracer og inkuber:

Overfør all tracerløsningen en trenger til et plastkar. Tilsett 100 µl tracerløsning til hver brønn. Se at spissene er nedi alle brønnene så ingen væske havner utenfor. Sett på samme kontaktfolie som brukt tidligere. Inkuber på samme måte som i punkt 10.

ANDRE INKUBASJON – 60 min 20-25 °C

14: Rekonstituere streptavidin-peroxidase:

Under andre inkubasjon lages streptavidin-peroxidase som beskrevet i ”Tillaging av løsninger”.

15. Vaskeprosess 2:

På samme måte som i punkt 12 (vaskeprosess 1).

16. Tilsette 100 µl streptavidin-peroxidase og inkubasjon:

Overfør all streptavidin-peroxidase en trenger til et plastkar. Tilsett 100 µl i hver brønn på samme måte som i punkt 13. Ha tilstrekkelig med løsning (6 ml for en halv plate, 12 ml for hel plate). Sett på samme kontaktfolie som tidligere. Inkuber på samme måte som i punkt 10.

TREDJE INKUBASJON – 60 min 20-25 °C

16. Slå på ELISA plateleseren og klargjør dataprogrammet for avlesning av platen:

Skru på plateleseren først, deretter dataprogrammet. Lagre en ny fil med et filnavn som du vet hva betyr og som du ikke kan misforstå. I dataprogrammet skal det fylles inn:

- Bølgelengde platen skal avleses av ved (450 nm).
- Markere hvilke brønner som skal avleses under ”Area definition”.
- Skrive inn hvilke brønner som inneholder blankprøve (BLANK).
- Hvilke brønner som inneholder kalibratorløsningene (CALIBRATOR) og hvilken

konsentrasjon de har.

- Skrive inn hva prøvene (SAMPLE) heter og hvilken fortykning de har. En prøve som for eksempel er fortennet 1:10 har 10 som fortykning

De tre siste punktene går under "layout" i dataprogrammet og gir en oversikt over hele platen om hvilke typer prøver som befinner seg hvor.

17. Klargjøring av TMB-løsning:

Ta av forseglingen og klargjør en enkeltpipette slik den man raskt kan måle opp riktig volum av substratet (6 ml for halv plate, 12 ml for hel plate).

18. Vaskeprosess 3:

Se vaskeprosess 1, punkt 12.

19: Tilsette 100 µl TMB:

Still den store multipipetten inn på 6 eller 12 x 100 µl. Fest spissese til pipetten og kontroller at de sitter godt inntil kanalåpningene. Overfør riktig volum av TMB til et plastkar og tilsett 100 µl i hver brønn. Ha klar en stoppeklokke som settes på 30 min. Legg et lokk av aluminiumsfolie over plastkaret så lyset ikke skader TMB-restene. Legg på en ny kontaktfolie på platen. Sett platen til inkubasjon under en aluminiumsfolie og pass på at det er lystett. Overfør restene av TMB tilbake til glasset. Unngå mest mulig eksponering for lys.

FJERDE INKUBASJON – 30 min 20-25 °C

20: Klargjøre stoppløsning:

Mot slutten av inkubasjonstiden (ca 10 min igjen), mål opp riktig mengde stoppløsning (6 eller 12 ml) og overfør til et plastkar. Legg plastkaret under folie for å unngå forurensing.

21: Tilsette 100 µl stoppløsning:

Se på stoppeklokken. Når det er 1 min igjen, hent frem platen og ta forsiktig av kontaktfolien. Gjør klar multipipetten med alle spissene godt inntil pipetten. Når klokken piper, tilsett 100 µl stoppløsning i hver brønn. Bland forsiktig ved å bruke apparatet for plateblanderen eller ved å riste lett på platen.

22: Avlesning:

Sett platen i sporet på plateleseren, sjekk at den sitter rett og riktig. Kontroller for siste gang at "layout" er riktig utfylt og at bølgelengden er satt til 450 nm. Trykk "START" for å starte avlesningen. Platen skal avleses innen 30 min etter at reaksjonen er stoppet.

Etter avlesning må filen lagres slik at alle de avleste dataene ikke forsvinner.

Vedlegg C. EDTA vs. Heparin og 1 vs. 2 sentrifugeringer

Målte konsentrasjoner av MPO (gitt i absorbans) i EDTA- og heparinplasma fra personene S1 og S2 som er sentrifugert 1 og 2 ganger.

Forsøk A – 21.9.2011

Forsøk A - 21.09.2011	S1H1 n = 10	S1E1 n = 6	S2H1 n = 4	S2E1 n = 2
Gj.snitt	0,414	0,189	0,373	0,182
SD	0,017	0,012	0,024	0,007
CV, %	4,2	6,4	6,3	3,9

Forsøk B – 1.10.2011

Forsøk B - 01.10.11	S1H1 n = 2	S1H2 n = 4	S1E1 n = 2	S1E2 n = 4	S2H1 n = 2	S2H2 n = 4	S2E1 n = 2	S2E2 n = 4
Gj.snitt	0,357	0,228	0,159	0,160	0,356	0,275	0,169	0,158
SD	0,006	0,028	0,015	0,014	0,032	0,035	0,008	0,013
CV, %	1,8	12,4	9,4	8,9	9,0	12,9	5,0	8,0

Forsøk C – 4.10.2011

Forsøk C - 4.10.11	S1H1 n = 6	S1E1 n = 6	S2H1 n = 6	S2E1 n = 6
Gj.snitt	0,318	0,270	0,340	0,159
SD	0,009	0,010	0,018	0,012
CV, %	2,7	3,8	5,1	7,4

Forsøk D – 6.10.2011

Forsøk D - 6.10.11	S1H1 n = 6	S1H2 n = 6	S1E1 n = 6	S1E2 n = 6	S2H1 n = 6	S2H2 n = 6	S2E1 n = 6	S2E2 n = 6
Gj.snitt	0,317	0,202	0,157	0,143	0,289	0,240	0,145	0,132
SD	0,022	0,027	0,012	0,005	0,015	0,054	0,012	0,006
CV, %	6,8	13,2	7,5	3,4	5,0	22,6	8,3	4,6

Vedlegg D. Shewhart kontrollkort

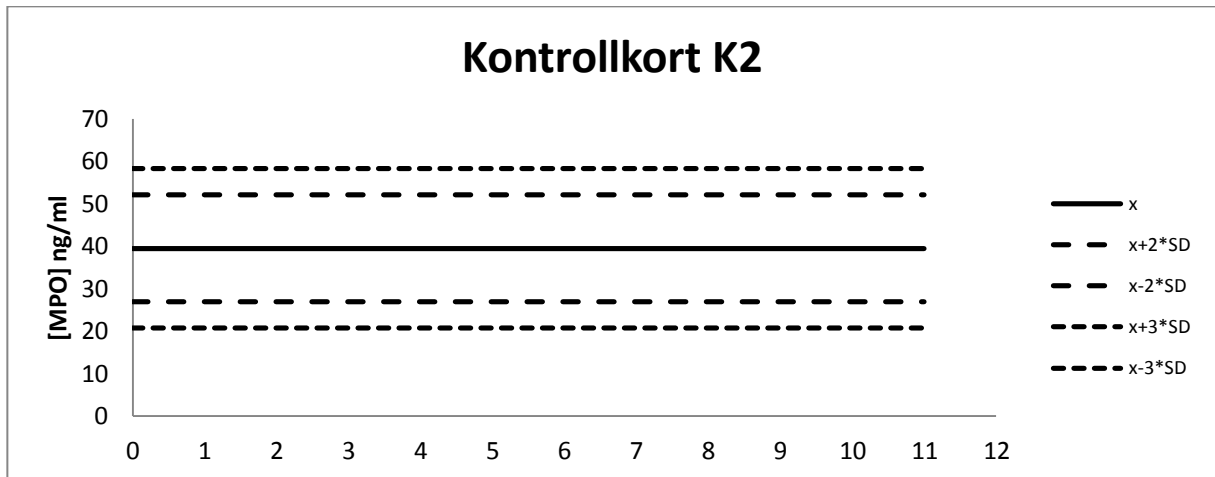
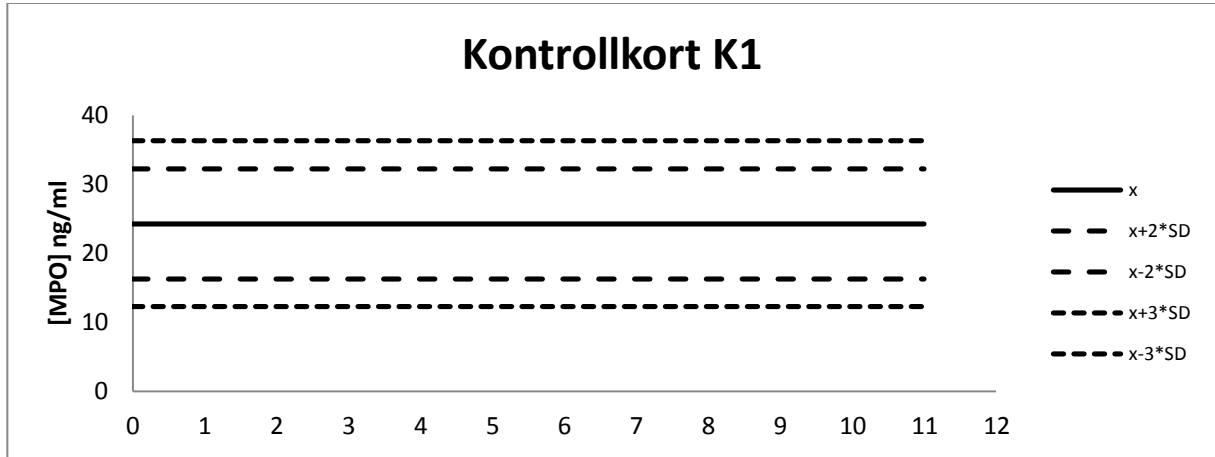
Etablering av kontrollkort

Alle de målte absorbansene og beregnede konsentrasjoner av kontrollprøvene K1 og K2.

Dato	Kontrollprøve K1	Kontrollprøve K2
	[MPO] (ng/ml)	[MPO] (ng/ml)
21.10.2011	29,64	32,39
21.10.2011	24,38	41,67
21.10.2011	27,47	45,29
21.10.2011	27,06	41,25
21.10.2011	33,47	41,70
21.10.2011	28,33	39,80
03.11.2011	14,26	30,46
03.11.2011	24,44	35,78
03.11.2011	20,65	38,67
03.11.2011	21,26	29,25
03.11.2011	20,47	35,48
03.11.2011	17,42	37,51
09.11.2011	28,89	40,25
09.11.2011	23,04	39,06
09.11.2011	22,91	38,26
09.11.2011	27,43	42,37
09.11.2011	23,16	42,37
09.11.2011	26,24	46,75
09.11.2011	25,30	38,14
11.11.2011	18,28	25,13
11.11.2011	19,99	33,21
11.11.2011	19,90	37,38
11.11.2011	21,83	33,11
11.11.2011	20,55	31,62
11.11.2011	22,70	40,40
11.11.2011	20,58	38,09
11.11.2011	24,13	44,65
15.11.2011	22,27	40,36
15.11.2011	21,37	43,75
15.11.2011	24,77	52,05
15.11.2011	23,57	46,69
15.11.2011	21,43	38,32
15.11.2011	26,31	41,51
15.11.2011	24,61	41,96
15.11.2011	26,34	31,45
17.11.2011		29,65
17.11.2011	24,43	43,20
17.11.2011	24,07	48,00
17.11.2011	27,52	50,92
17.11.2011	32,09	33,25
17.11.2011	30,67	46,72
17.11.2011	29,20	
17.11.2011	27,17	50,92
Gj.snitt	24,28	39,50

Validering og anvendelse av ELISA-metode for å måle myeloperoksidase i plasma

SD	4,00	6,27
CV, %	16,49	15,88
2 * SD	8,01	12,55
3 * SD	12,01	18,82



Validering og anvendelse av ELISA-metode for å måle myeloperoksidase i plasma

Anvendelse av kontrollkort

Dato	Analyseplate	K1 [MPO] ng/ml	K2 [MPO] ng/ml
28.11.2011	1	21,13	37,42
	1	21,30	34,86
2.12.2011	2	20,61	41,52
	2	19,45	40,65
5.12.2011	3	21,87	37,28
	3	22,76	42,11
7.12.2011	4	23,84	45,91
	4	24,00	47,86
12.12.2011	5	26,98	57,58
	5	30,89	56,74
14.12.2011	6	22,82	38,79
	6	23,79	52,86
20.12.2011	7	19,61	42,78
	7	24,28	37,76
21.11.2011	8	24,58	52,23
	8	31,19	56,85
4.1.2012	9	51,40	49,33
	9	33,14	50,94
8.1.2012	10	27,34	42,29
	10	28,66	63,43

Vedlegg E. Gjenfinning

Målte konsentrasjoner av MPO i normale prøver (K1 og K2) og ”spikete” prøver.

Forsøk 1 - 03.11.11

	K1 n = 6	K2 n = 6	K1+Sp n = 6	K2+Sp n = 6
Gj.snitt	19,75	34,53	8,91	11,79
SD	3,50	3,82	0,61	0,80
CV, %	8,81	10,66	8,81	5,69

Differanse mellom snittene av kontrollprøve og spikeprøve

K1+Sp – K1:

8,91 ng/ml – 1,98 ng/ml = 6,93 ng/ml

Tilsatt konsentrasjon = 12,5 ng/ml

Gjenfinning: $(6,93/12,5)*100\% = 55,44\%$

K2+Sp – K2:

11,79 ng/ml – 3,45 ng/ml = 8,34 ng/ml

Gjenfinning: $(8,34/12,5)*100\% = 66,72\%$

Forsøk 2 - 09.11.11

	K1 n = 7	K2 n = 7	K1+Sp n = 4	K2+Sp n = 4
Gj.snitt	25,28	41,03	8,74	11,01
SD	2,37	3,08	1,44	0,35
CV, %	9,4	7,5	16,5	3,1

Differanse mellom snittene av kontrollprøve og spikeprøve:

K1+Sp – K1:

8,74 ng/ml – 2,52 ng/ml = 6,22 ng/ml

Tilsatt konsentrasjon = 12,5 ng/ml

Gjenfinning: $(6,22/12,5)*100\% = 49,76\%$

K2+Sp – K2:

11,01 ng/ml – 4,10 ng/ml = 6,91 ng/ml

Gjenfinning: $(6,91/12,5)*100\% = 55,28\%$

Forsøk 3 – 11.11.11

	K1 n = 8	K2 n = 8	K1+Sp n = 4	K2+Sp n = 4
Gj.snitt	21,00	35,45	9,82	11,27
SD	1,83	5,99	1,23	0,71
CV, %	8,7	16,9	12,5	6,3

Differanse mellom snittene av kontrollprøve og spikeprøve:

K1+Sp – K1:

$$9,82 \text{ ng/ml} - 2,10 \text{ ng/ml} = 7,71 \text{ ng/ml}$$

$$\text{Tilsatt konsentrasjon} = 12,5 \text{ ng/ml}$$

$$\text{Gjenfinning: } (7,71/12,5) * 100 \% = 61,68 \%$$

K2+Sp – K2:

$$11,27 \text{ ng/ml} - 3,55 \text{ ng/ml} = 7,72 \text{ ng/ml}$$

$$\text{Gjenfinning: } (7,72/12,5) * 100 \% = 61,76 \%$$

Forsøk 4 - 15.11.11

	K1 n = 8	K2 n = 8	K1+Sp n = 4	K2+Sp n = 4
Gj.snitt	23,83	42,01	9,58	13,32
SD	2,01	6,02	1,75	0,96
CV	8,4	14,3	18,3	7,2

Differanse mellom snittene av kontrollprøve og spikeprøve:

K1+Sp – K1:

$$9,58 \text{ ng/ml} - 2,38 \text{ ng/ml} = 7,20 \text{ ng/ml}$$

$$\text{Teoretisk differanse} = 12,5 \text{ ng/ml}$$

$$\text{Gjenfinning: } (7,20/12,5) * 100 \% = 57,6 \%$$

K2+Sp – K2:

$$13,32 \text{ ng/ml} - 4,20 \text{ ng/ml} = 9,12 \text{ ng/ml}$$

$$\text{Gjenfinning: } (9,12/12,5) * 100 \% = 72,96 \%$$

Forsøk 5 - 17.11.11

	K1 n = 7	K2 n = 7	K1+Sp n = 4	K2+Sp n = 4
Gj.snitt	27,88	43,24	11,65	12,69
SD	3,01	8,54	0,38	1,13
CV	10,8	19,7	3,2	8,9

Differanse mellom snittene av kontrollprøve og spikeprøve:

K1+Sp – K1:

$$11,65 \text{ ng/ml} - 2,79 \text{ ng/ml} = 8,86 \text{ ng/ml}$$

$$\text{Teoretisk differanse} = 12,5 \text{ ng/ml}$$

$$\text{Gjenfinning: } (8,86/12,5) * 100 \% = 70,88 \%$$

K2+Sp – K2:

$$12,69 \text{ ng/ml} - 4,32 \text{ ng/ml} = 8,37 \text{ ng/ml}$$

$$\text{Gjenfinning: } (8,37/12,5) * 100 \% = 66,96 \%$$

Vedlegg F. Beregning av CV

CV for tre måleparalleller

CV mellom tre måleparalleller av 30 prøver som er analysert på tre ulike ELISA-plater; 2.12.11, 21.12.11 og 4.1.12.

CV % mellom tre måleparalleller - 2.12.11				
11,56	6,18	5,51	3,2	24,59
4,64	5,69	4,03	6,66	2,26
1,24	3,5	3,5	10,07	11,1
8,47	1,48	22,79	1,44	13,65
29,02	11,18	6,39	9,48	5,28
26,11	11,79	3,15	14,42	3,55

Gjennomsnitt CV: 9,1 %

CV % mellom tre måleparalleller - 21.12.11				
6,64	13,4	4,59	6,77	17,68
6,21	7,31	15,87	6,91	21,66
8,02	9,39	3,19	4,89	3,62
34,95	2,47	9,37	6,87	14,83
7,04	2,38	5,05	9,64	5,2
12,95	11,39	8,87	12,73	11,77

Gjennomsnitt CV: 9,7 %

CV % mellom tre måleparalleller - 4.1.12				
2,35	17,02	7,76	8,51	1,46
7,09	1,48	4,38	4,99	10,39
11,2	15,21	3,21	4,31	14,81
8,17	12,76	14,38	10,05	7,19
20,18	10,75	6,89	5,06	9,93
15,08	12,82	7,89	2,83	12,83

Gjennomsnitt CV: 9,0 %

Innen plate-CV:

Konsentrasjon av MPO målt i flere prøveparalleller på seks analyseplater:

	21.10.2011	03.11.2011	09.11.2011	11.11.2011	15.11.2011	17.11.2011	CV_{Gj.snitt}
	29,64	14,26	28,89	18,28	22,27	24,43	
	24,38	24,44	23,04	19,99	21,37	24,07	
	27,47	20,65	22,91	19,90	24,77	27,52	
	27,06	21,26	27,43	21,83	23,57	32,09	
	33,47	20,47	23,16	20,55	21,43	30,67	
	28,33	17,42	26,24	22,70	26,31	29,20	
			25,30	20,58	24,61	27,17	
				24,13	26,34		
<i>Gj.snitt</i>	28,39	19,75	25,28	21,00	23,83	27,88	
SD	3,04	3,50	2,37	1,83	2,01	3,01	
CV, %	10,7	17,7	9,4	8,7	8,4	10,8	11,0

Innen plate-CV = 11 %.

Vedlegg G. Kalibreringskurvene

G1. Sammenligning av kalibreringskurvene fra 21.10.11-17.11.12.

Tabell A. Sammenligning av ligningen og R^2 for hver kurve.

Dato	R^2	a	b	c	d
21.10.2011	0,999	0,072	1,844	0,023	1,098
03.11.2011	0,999	0,068	2,837	0,015	1,006
09.11.2011	0,993	0,074	1,225	0,042	1,192
11.11.2011	0,994	0,069	1,114	0,042	1,123
15.11.2011	1	0,066	1,595	0,023	1,006
17.11.2011	0,998	0,075	1,264	0,022	1,114

Tabell B. Residualer i konsentrasjon (differanse mellom oppgitt konsentrasjon og beregnet konsentrasjon ved bruk av ligningen for hver kurve). Der den beregnede konsentrasjonen er større enn den oppgitte blir differansen negativ.

Kalibrator nr.	Gitt kons., ng/ml	21.10.11, ng/ml	3.11.11, ng/ml	9.11.11, ng/ml	11.11.11, ng/ml	15.11.11, ng/ml	17.11.11, ng/ml
1	30	-0,066	-0,166	0,919	-0,787	-0,243	-0,297
2	20	0,17	0,361	-1,467	1,224	0,395	0,586
3	10	-0,279	-0,306	0,811	-0,955	-0,116	-0,365
4	5	0,276	0,087	-0,01	0,451	-0,162	-0,158
5	2	-0,049	0,014	-0,595	-0,043	0,043	0,264
6	1	-0,038	0,01	0,086	0,04	0,068	-0,098
7	0,5	-0,16	-0,126	0,084	-0,009	0,03	0,183
8	0	0,001	0,001	0,001	-0,094	-0,029	-0,135

Tabell C. Differanse i tabell B er regnet ut i prosent. Gjennomsnittlig avvik for hver kalibrator er regnet ut med absoluttverdier (ingen negative verdier).

Kalibrator nr. ([MPO] ng/ml)	21.10.11, %	3.11.11, %	9.11.11, %	11.11.11, %	15.11.11, %	17.11.11, %	Gj.snitt, %
1 (30)	-0,22	-0,55	3,06	-2,62	-0,81	-0,99	1,38
2 (20)	0,85	1,81	-7,34	6,12	1,98	2,93	3,51
3 (10)	-2,79	-3,06	8,11	-9,55	-1,16	-3,65	4,72
4 (5)	5,52	1,74	-0,20	9,02	-3,24	-3,16	3,84
5 (2)	-2,45	0,70	-29,75	-2,15	2,15	13,20	8,40
6 (1)	-3,80	1,00	8,60	4,00	6,80	-9,80	5,67
7 (0,5)	-32,00	-25,20	16,80	-1,80	6,00	36,60	19,73

G2. Sammenligning av kalibreringskurvene fra 28.11.11 til 8.1.12.

Tabell D. Sammenligning av ligningen og R^2 for hver kurve.

Dato	R^2	a	b	c	d
28.11.2011	1	0,069	1,646	0,024	1,049
2.12.2011	1	0,065	1,777	0,018	0,978
5.12.2011	0,999	0,075	2,618	0,017	1,059
7.12.2011	1	0,073	1,478	0,034	1,183
12.12.2011	1	0,068	1,952	0,019	1,031
14.12.2011	0,999	0,062	4,179	0,005	0,892
20.12.2011	1	0,081	3,108	0,011	1,006
21.12.2011	0,999	0,063	3,657	0,006	0,938
4.1.2012	1	0,067	12,264	0,003	0,955
8.1.2012	0,999	0,072	2,231	0,024	1,114

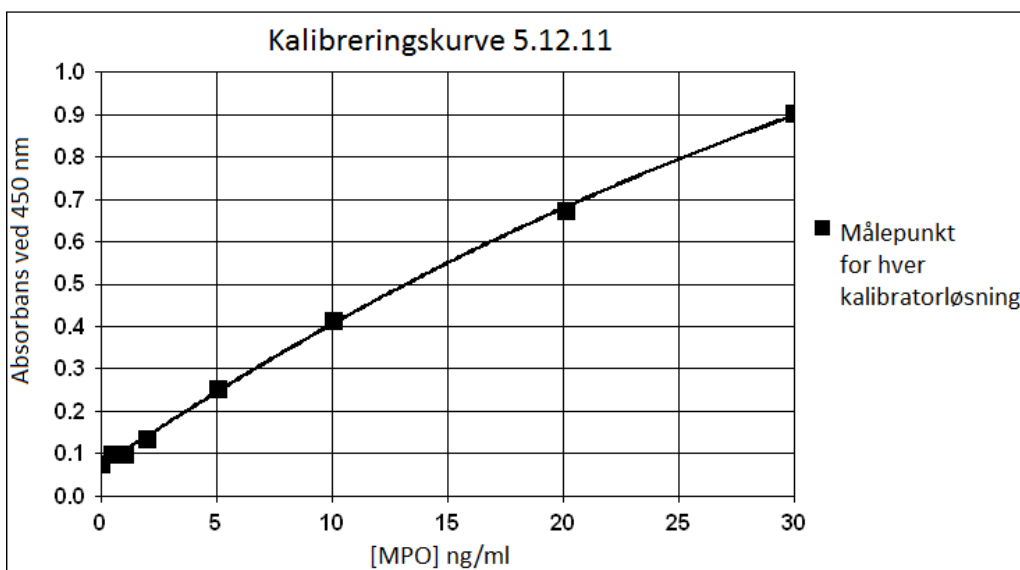
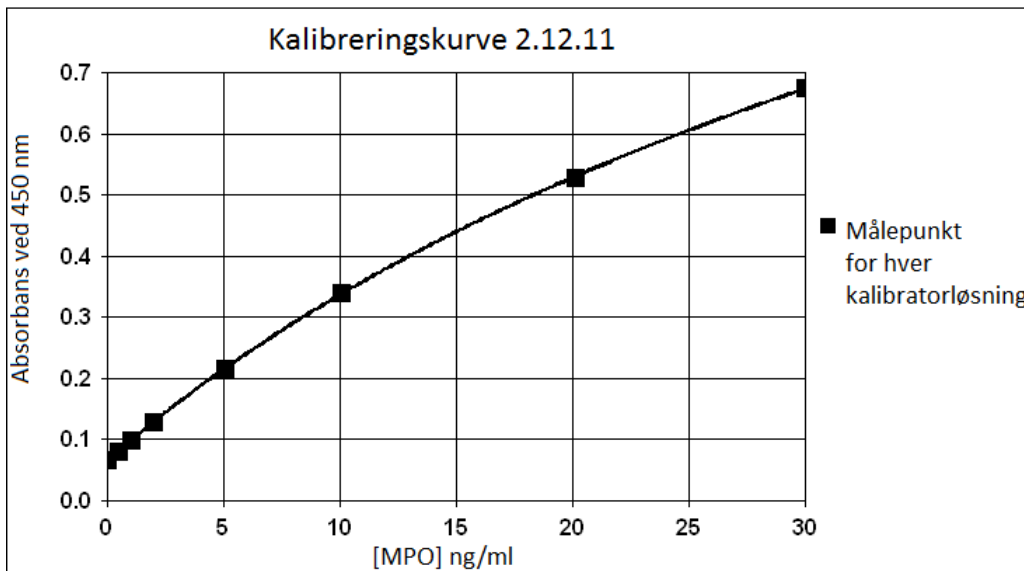
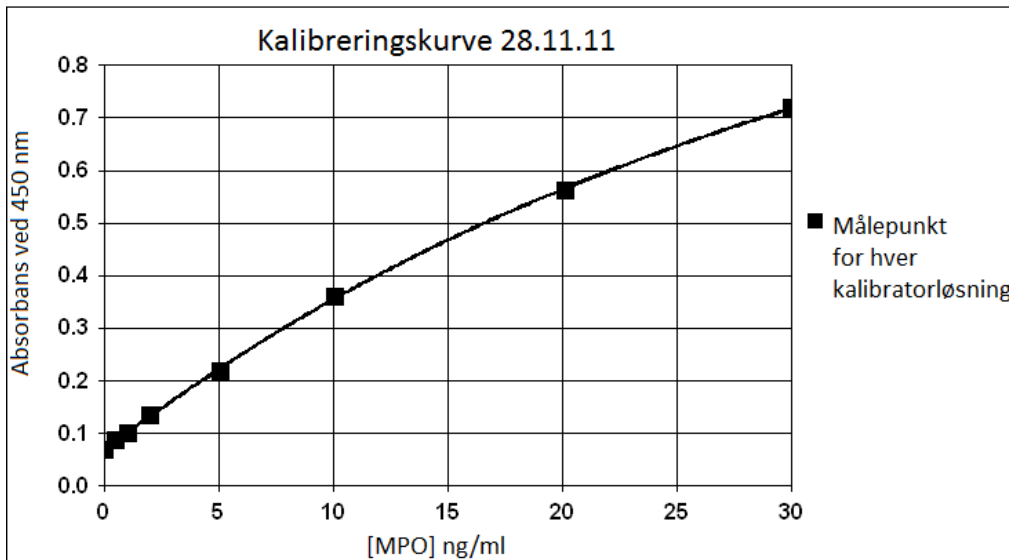
Tabell E. Residualer i konsentrasjon (differanse mellom oppgitt konsentrasjon og beregnet konsentrasjon ved bruk av ligningen for hver kurve). Der den beregnede konsentrasjonen er større enn den oppgitte blir differansen negativ.

Std. Nr	Gitt kons.	28.11.11	2.12.11	5.12.11	7.12.11	12.12.11	14.12.11	20.12.11	21.12.11	4.1.12	8.1.12
1	30	-0,063	-0,049	-0,170	0,055	-0,003	-0,226	-0,136	-0,071	-0,120	0,118
2	20	0,141	0,086	0,343	-0,083	-0,005	0,501	0,289	0,091	0,314	-0,277
3	10	-0,174	-0,033	-0,168	0,026	0,053	-0,185	-0,180	0,214	-0,216	0,427
4	5	0,142	-0,038	-0,223	0,054	-0,116	-0,406	-0,007	-0,336	-0,160	-0,383
5	2	-0,060	0,024	0,215	-0,044	0,100	0,191	-0,107	-0,264	0,118	0,057
6	1	0,026	-0,005	0,245	-0,102	0,104	0,131	0,048	0,241	0,048	-0,177
7	0,5	-0,026	0,058	-0,246	0,047	-0,178	0,067	0,084	0,184	0,046	0,127
8	0	0,001	-0,043	0,001	0,001	0,001	-0,073	0,001	-0,070	-0,031	0,001

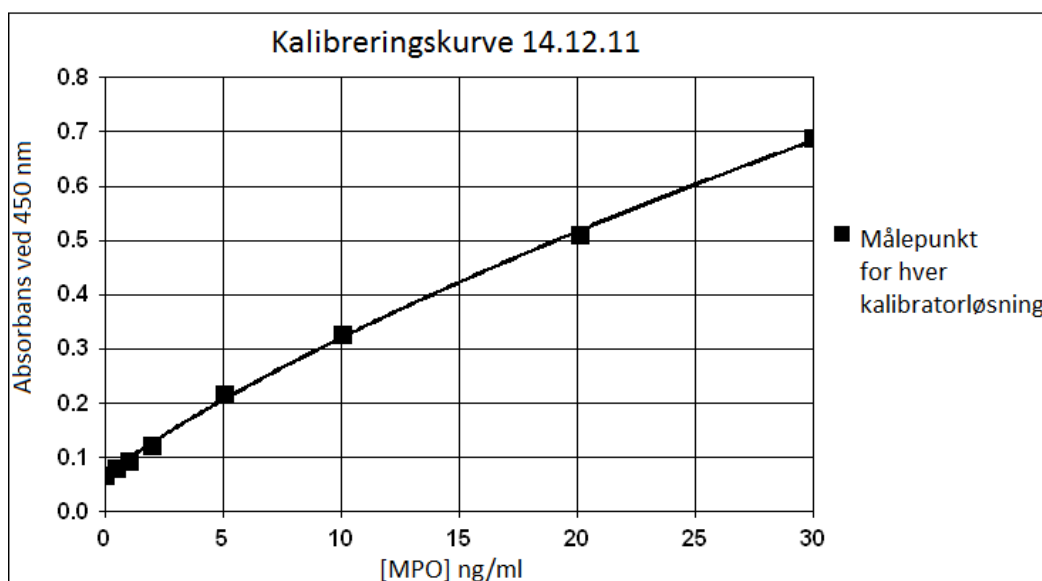
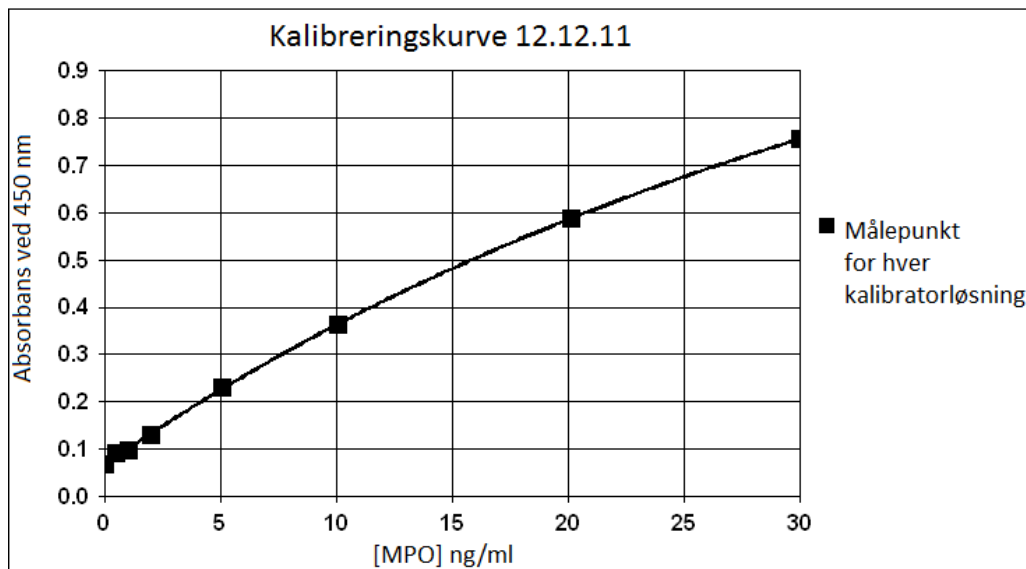
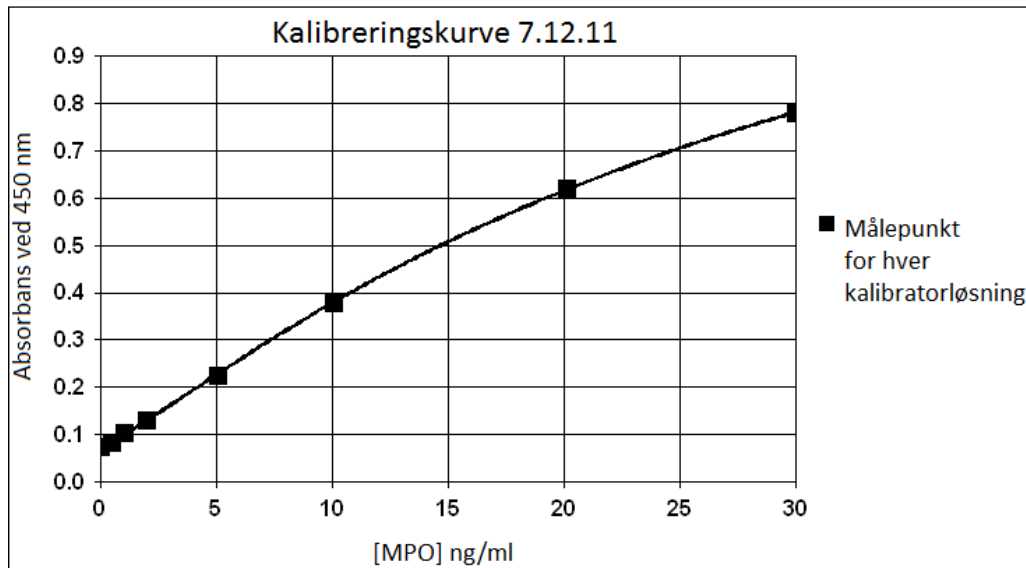
Tabell F. Differanse i tabell E er regnet ut i prosent. Gjennomsnittlig avvik for hver kalibrator er regnet ut med absoluttverdier (ingen negative verdier).

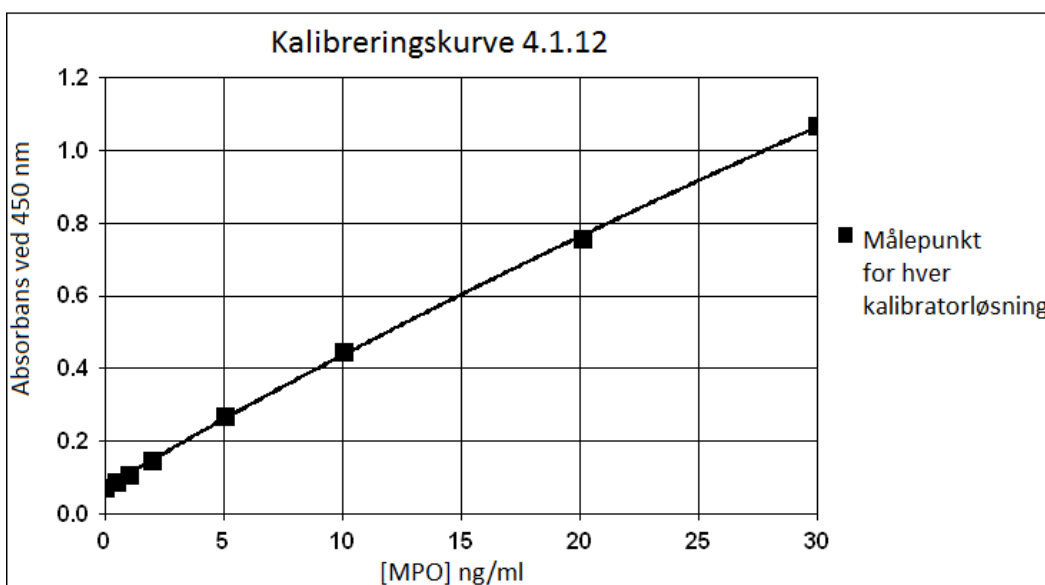
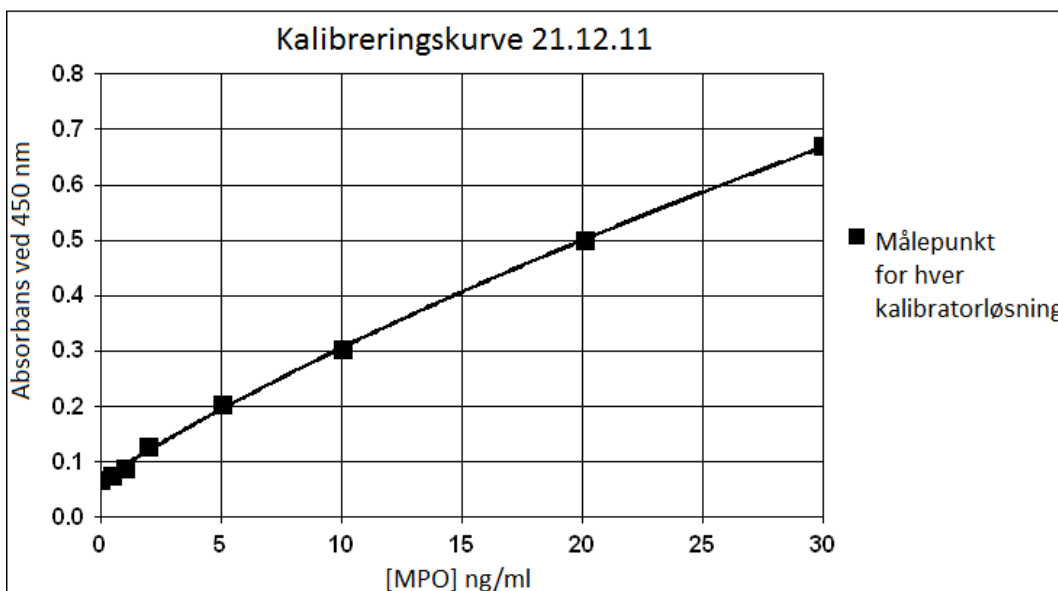
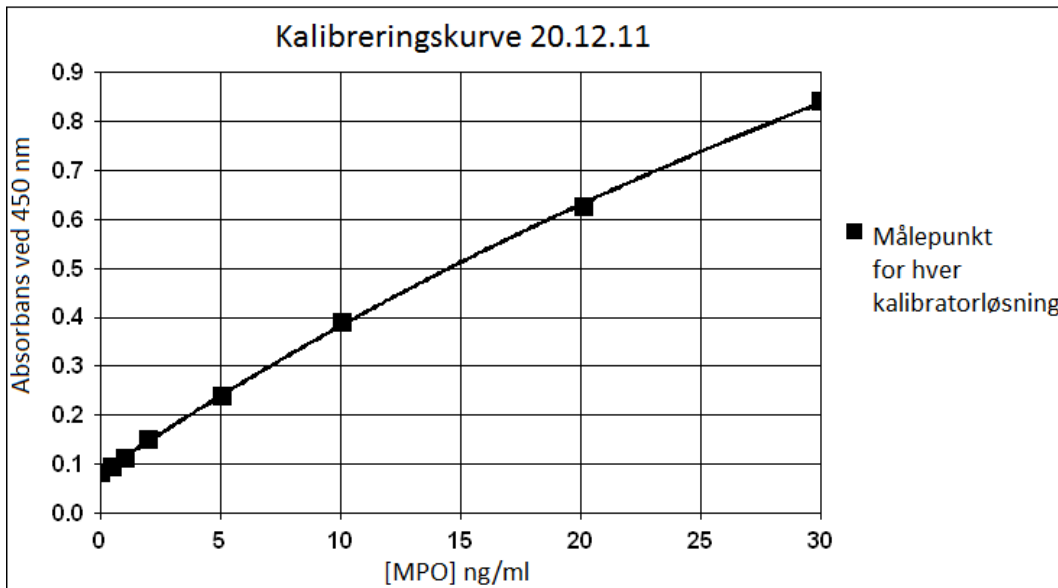
Std. Nr ([MPO] ng/ml)	28.11.11	02.12.11	5.12.11	7.12.11	12.12.11	14.12.11	20.12.11	21.12.11	4.1.12	8.1.12	Gj.snitt
1 (30)	-0,21	-0,16	-0,57	0,18	-0,01	-0,75	-0,45	-0,24	-0,40	0,39	0,34
2 (20)	0,70	0,43	1,71	-0,41	-0,02	2,49	1,44	0,45	1,56	-1,38	1,06
3 (10)	-1,73	-0,33	-1,67	0,26	0,53	-1,84	-1,79	2,13	-2,15	4,25	1,67
4 (5)	2,83	-0,76	-4,44	1,08	-2,31	-8,08	-0,14	-6,69	-3,19	-7,63	3,71
5 (2)	-3,00	1,20	10,76	-2,20	5,01	9,56	-5,36	-13,21	5,91	2,85	5,91
6 (1)	2,60	-0,50	24,52	-10,21	10,41	13,11	4,80	24,12	4,80	17,72	11,28
7 (0,5)	-5,21	11,62	-49,30	9,42	-35,67	13,43	16,83	36,87	9,22	25,45	21,30

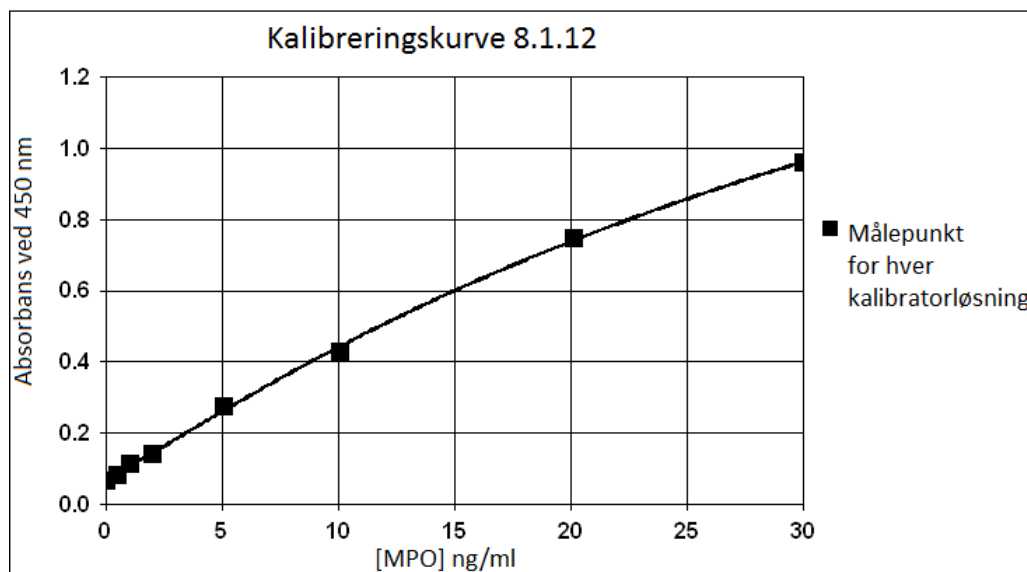
Validering og anvendelse av ELISA-metode for å måle myeloperoksidase i plasma



Validering og anvendelse av ELISA-metode for å måle myeloperoksidase i plasma







Vedlegg H. MPO hos FK

Alle resultatene fra analysering av MPO hos friske kontrollpersoner (FK). Alle tallene er gitt i ng/ml bortsett fra beregnet CV som er gitt i prosent. MPO-verdiene i kursiv har en høyere CV mellom parallellene enn 15 % (røde). De verdiene av prosentavviket som står i kursiv er høyere enn 30 % (blå).

	1. analyse (a), ng/ml	2. analyse (b), ng/ml	3. analyse (c), ng/ml	Avvik (1. og 2.), %	Avvik (2. og 3.), %
FK 1	16,81	21,90		26,3	
FK 2	30,67	38,66		23	
FK 3	27,25	39,96	43,51	<i>37,8</i>	8,5
FK 4	<i>24,26</i>	30,75		23,6	
FK 5	29,15	34,68		17,3	
FK 6	18,90	19,61		3,7	
FK 7	31,01	33,19		6,8	
FK 8	32,56	31,48		3,4	
FK 9	26,51	27,52		3,7	
FK 10	37,87	34,92		8,1	
FK 11	<i>25,49</i>	24,37		4,5	
FK 12	30,79	30,08		2,3	
FK 13	37,23	40,03		7,2	
FK 14	32,33	<i>51,35</i>	45,88	<i>45,5</i>	11,3
FK 15	26,09	39,06	<i>38,06</i>	<i>39,8</i>	2,6
FK 16	34,24	37,05		7,9	
FK 17	39,08	44,44		12,8	

Vedlegg I. MPO hos SLE

Alle resultatene fra analysering av MPO hos pasienter med systemisk lupus erythematosus (SLE). Alle tallene er gitt i ng/ml bortsett fra beregnet CV som er gitt i prosent. MPO-verdiene i kursiv har en høyere CV mellom parallellene enn 15 % (røde). De verdiene av prosentavviket som står i kursiv er høyere enn 30 % (blå).

	1. analyse (a), ng/ml	2. analyse (b), ng/ml	Avvik (1. og 2.), %
SLE 1	72,70		
SLE 2	33,62	39,26	15,5
SLE 3	16,60	21,23	24,5
SLE 4	47,76	62,44	26,6
SLE 5	48,82	67,52	<i>32,1</i>
SLE 6	60,35	68,68	12,9
SLE 7	25,93	34,3	27,8
SLE 8	32,36	43,06	28,4
SLE 9	28,75	31,34	8,6
SLE 10	<i>48,56</i>	53,18	9,1
SLE 11	45,92	33,93	<i>30,0</i>
SLE 12	168,21	147,29	13,3
SLE 13	67,76	58,23	15,1
SLE 15	16,01	<i>17,68</i>	9,9
SLE 16	32,76	32,4	1,1
SLE 17	49,47	53,61	8,0
SLE 18	35,51	<i>32,3</i>	9,5
SLE 19	36,86	36,75	0,3
SLE 20	<i>24,49</i>	<i>30,49</i>	21,8
SLE 21	43,34	50,95	16,1
SLE 22	57,14	<i>71,81</i>	22,8

Vedlegg J. MPO hos PSS

Alle resultatene fra analysering av MPO hos pasienter med primært sjøgrens syndrom (PSS). Alle tallene er gitt i ng/ml bortsett fra beregnet CV som er gitt i prosent. MPO-verdiene i kursiv har en høyere CV mellom parallellene enn 15 % (røde). De verdiene av prosentavviket som står i kursiv er høyere enn 30 % (blå).

UKE 0

	1. analyse (a), ng/ml	2. analyse (b), ng/ml	3. analyse (c), ng/ml	Avvik (1. og 2.), %	Avvik (2. og 3.), %
PSS 301	24,61	23,21		5,9	
PSS 302	44,05	37,67		15,6	
PSS 303	34,34	30,48		11,9	
PSS 304	20,31	22,09		8,4	
PSS 305	26,03	30,54		15,9	
PSS 306	35,40	33,84		4,5	
PSS 307	35,40	34,38		2,9	
PSS 308	27,41	31,74	31,57	14,6	0,5
PSS 309	22,71	27,35	38,4	18,5	33,6
PSS 310	35,55	43,19		19,4	
PSS 311	24,31	33,96	37,16	33,1	9,0
PSS 312	31,90	41,80	57,71	26,9	32,0
PSS 313	24,47	26,36		7,4	
PSS 315	28,48	33,08		14,9	
PSS 316	49,67	61,74		21,7	
PSS 317	15,39	13,94		9,9	
PSS 318	53,22	59,73		11,5	
PSS 319	36,92	53,35	47,81	36,4	11,0
PSS 320	36,92	51,62	52,27	33,2	1,3
PSS 321	20,99	17,22		19,7	
PSS 322	71,17	60,09		16,9	
PSS 323	43,52	34,13		24,2	
PSS 324	26,21	27,53		4,9	
PSS 325	23,79	27,25		13,6	
PSS 326	34,19	42,18		20,9	
PSS 327	39,28	37,36		5,0	

Validering og anvendelse av ELISA-metode for å måle myeloperoksidase i plasma

UKE 4

	1. analyse (a), ng/ml	2. analyse (b), ng/ml	Avvik (1. og 2), %
PSS 301	31,88	32,79	2,8
PSS 302	28,55	32,55	13,1
PSS 303	27,60	29,27	5,9
PSS 304	17,00	20,28	17,6
PSS 305	26,03	29,88	13,8
PSS 306	32,22	37,69	15,6
PSS 307	28,31	37,63	28,3
PSS 308	24,94	33,63	29,7
PSS 309	19,46	28,82	38,8
PSS 310	27,44	33,44	19,7
PSS 311	22,03	35,24	46,1
PSS 312	24,46	29,74	19,5
PSS 313	24,26	24,21	0,2
PSS 315	36,75	32,39	12,6
PSS 316	43,39	48,81	11,8
PSS 317	14,58	12,32	16,8
PSS 318	44,23	54,31	20,5
PSS 319	34,69	48,55	33,3
PSS 320	46,03	47,02	2,1
PSS 321	25,63	-	
PSS 322	47,69	-	
PSS 323	26,08	-	
PSS 324	---	-	
PSS 325	22,82	-	
PSS 326	34,64	-	
PSS 327	37,02	-	