



Universitetet
i Stavanger

DET TEKNISK-NATURVITENSKAPELIGE FAKULTET

MASTEROPPGAVE

| | |
|--|---|
| Studieprogram/spesialisering: Biologisk Kjemi | Vårsemesteret, 2014 Åpen / Konfidensiell |
| Forfatter: Maombi Mirindi Mongane | (signatur forfatter) |
| Fagansvarlig: Grete Jonsson Veileder(e): Kåre B. Jørgensen, Grete Jonsson | |
| Tittel på masteroppgaven: Elektrokjemiluminescensmåling av plasma myeloperoksidase: Utvikling og anvendelse av immunologisk metode | |
| Studiepoeng: 60 | |
| Emneord: Meso Scale Discovery Myeloperoksidase Nyresvikt Psoriasis Oksidativt stress AOPP Metodevalidering Metodeutvikling | Sidetall: 49 + vedlegg/annet: 44 Stavanger, 21.12.2014 dato/år |

Elektrokjemiluminescensmåling av plasma myeloperoksidase: Utvikling og anvendelse av immunologisk metode

Masteroppgave i biologisk kjemi

MAOMBI MONGANE

2014

Forord

Denne oppgaven er en del av masterprogrammet i Biologisk kjemi ved Universitet i Stavanger (UIS). Oppgaven ble utført i samarbeid med Stavanger Universitets Sykehus (SUS). Jeg takker mine veiledere, Grete Jonson (SUS) og Kåre B. Jørgensen (UIS) for lærerik veiledning og alle ved forskningslabben som har bidratt med gode tips og støtte under hele arbeidsprosessen.

Sammendrag

Myeloperoksidase (MPO) er et enzym som hovedsakelig produseres i aktiverte nøytrofile granulocytter. MPO er involvert i produksjon av underklorsyrling (HOCl), som er et bakteriedrepende stoff og en sterk oksidant. HOCl har evnen til å reagere med andre molekyler og forårsake oksidativt stress.

Oksidativt stress oppstår ved ubalanse mellom produksjon av oksidanter og kroppens evne til å nøytralisere dem. Advanced oxidation protein products (AOPP) har blitt brukt som mål på graden av oksidativt stress hos nyrepasienter og pasienter med kroniske inflammasjonssykdommer. Det er rapportert at økt MPO-aktivitet i aktiverte nøytrofile granulocytter under oksidativt stress kan bidra til produksjon av AOPP.

MPO måles hovedsakelig ved hjelp av ulike ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) tester, men de kommersielle settene er kostbare i innkjøp. Formålet med denne oppgaven var først å utvikle et elektrokjemiluminescens immunoassay, hvor man coater plate med MPO antistoff og leser av signalet med mesoscale discovery (MSD) sector imager 2400 instrument. Deretter var målet å sammenlikne egen metode med et tilgjengelig kommersielt sett for analyse av MPO. Til slutt skulle både MPO og AOPP hos nyre-og psoriasispatientgrupper måles for å se om det er sammenheng mellom konsentrasjonene.

MSD-sett til metodeutviklingen viser sannsynligvis deteksjon av primært- eller deteksjonsantistoffer, men ikke deteksjon av MPO. Derfor bør metoden utvikles videre. Det kommersielle MSD-settet ble validert med hensyn på kalibreringskurve, mellomplatevariasjon (CV), deteksjonsgrense, linearitet og gjenfinning. Kalibreringskurvene fikk best kurvetilpasning med $R^2 \geq 0,995$ og residualer $\leq 15\%$. CV var 6,5 %, deteksjonsgrensen 69 pg/ml, linearitet $R^2 \geq 0,995$ og gjenfinning på 81 %.

MPO-konsentrasjon i plasma hos friske kontroller uten psoriasis (PS-K 12,5 ng/ml) er signifikant lavere, sammenliknet med pasienter med andre hudlidelser enn psoriasis (PS-A, 16,0 ng/ml, $p=0,0100$). Hos psoriasispatienter (PS-P, 14,3 ng/ml), var plasma MPO-konsentrasjon ikke signifikant høyere enn hos PS-K ($p=0,0733$). MPO-konsentrasjon hos friske kontroller (REN-K, 14,3 ng/ml) er signifikant lavere i forhold til nyretransplanterte (RTX, 18,1 ng/ml, $p=0,048$) og pasienter med moderat nedsatt nyrefunksjon (REN 3, 17,6

ng/ml, $p= 0,036$). Gjennomsnittlig MPO-konsentrasjon hos REN-K er ikke signifikant lavere sammenliknet med pasienter med alvorlig nedsatt nyrefunksjon (REN 4, 17,9 ng/ml, $p= 0,118$), dialysepasienter (REN 5, 18,6 ng/ml, $p= 0,068$) og nyre donorer (REN-D, 16,0 ng/ml, $p= 0,347$).

Det ble ikke observert sammenheng mellom plasma MPO- og AOPP-konsentrasjon hos REN-5 ($R^2 = 0,0159$) og PS-P ($R^2 = 0,0055$). Derfor kan man ikke påstå at økning i MPO-konsentrasjon påvirker økning i plasma AOPP.

Innholdsfortegnelse

| | |
|---|-----------|
| Forord..... | II |
| Sammendrag..... | iii |
| Forkortelser..... | vii |
| 1 Innledning | 1 |
| 2 Teori..... | 3 |
| 2.1 Inflammasjon og nyresvikt..... | 3 |
| 2.1.1 Inflammasjon | 3 |
| 2.1.2 Psoriasis | 3 |
| 2.1.3 Nyresvikt..... | 4 |
| 2.2 Oksidativt stress | 6 |
| 2.3 Myeloperoksidase | 7 |
| 2.3.1 MPO-kompleksformering | 8 |
| 2.4 Mesoscale discovery MPO-analyseprinsipp | 9 |
| 2.4.1 MSD MPO-metodebeskrivelse | 9 |
| 2.4.2 MSD Sector imager 2400 avlesningsprinsipp | 11 |
| 2.5 AOPP | 11 |
| 2.6 Metodevalidering | 12 |
| 2.6.1 Kalibreringskurve | 12 |
| 2.6.2 Analytisk variasjon | 13 |
| 2.6.3 Deteksjonsgrense | 14 |
| 2.6.4 Linearitet..... | 14 |
| 2.6.5 Gjenfinning..... | 15 |
| 2.6.6 Kontrollkort..... | 15 |
| 3 Materiale og metode | 16 |
| 3.1 Prøvemateriale..... | 16 |
| 3.1.1 Kontrollprøver..... | 16 |
| 3.1.2 Pasientprøver og friske kontroller | 16 |
| 3.2 Måling av MPO..... | 17 |
| 3.2.1 Reagenser og utstyr..... | 17 |
| 3.2.2 MSD MPO-metodeutvikling..... | 18 |
| 3.2.3 Anvendelse av MSD-MPO-metode | 18 |
| 3.2.4 Validering av MSD-MPO-metode | 18 |
| 3.3 Metode advanced oxidation protein products | 20 |
| 3.3.1 Reagenser og utstyr..... | 20 |
| 3.3.2 Tillaging av kalibratorløsninger | 21 |
| 3.3.3 AOPP Kvalitetskontroll | 21 |
| 3.4 Statistikk | 21 |
| 4 Resultater | 22 |
| 4.1 MSD-metode | 22 |
| 4.1.1 MSD MPO-metodeutvikling..... | 22 |
| 4.1.2 Validering av kommersielt MPO-Kit | 25 |
| 4.2 Anvendelse av MPO-metode | 31 |
| 4.2.1 Sammenligning av MPO-konsentrasjon hos PS-P, PS-A og PS-K | 31 |
| 4.2.2 MPO hos nyrepasienter | 32 |
| 4.3 AOPP-metode..... | 33 |
| 4.3.1 AOPP kvalitetskontroll..... | 33 |

| | | |
|----------------|---|-----------|
| 4.3.2 | AOPP-kontroll- og pipettetest..... | 33 |
| 4.3.3 | AOPP målt hos pasient- og friskekontrollgrupper..... | 35 |
| 4.3.4 | Sammenheng mellom MPO og AOPP | 36 |
| 5 | Diskusjon | 37 |
| 5.1 | Metodeutvikling..... | 37 |
| 5.1.1 | Kalibreringskurve | 39 |
| 5.1.2 | Kontrollkort..... | 39 |
| 5.1.3 | Innen- og mellom platevariasjon..... | 40 |
| 5.1.4 | Deteksjonsgrense | 40 |
| 5.1.5 | Linearitet..... | 41 |
| 5.1.6 | Gjenfinning..... | 41 |
| 5.2 | Anvendelse av metoden | 42 |
| 5.2.1 | MPO hos PS-K og REN-K..... | 42 |
| 5.2.2 | Psoriasis | 42 |
| 5.2.3 | Nyresvikt..... | 43 |
| 5.3 | AOPP kontrollkort..... | 44 |
| 5.4 | AOPP-konsentrasjon hos pasient- og kontrollgrupper | 44 |
| 5.5 | Sammenheng mellom MPO- og AOPP-konsentrasjoner | 45 |
| 6. | Konklusjon | 46 |
| 7. | Referanser | 47 |
| Vedlegg | | 50 |
| Vedlegg A | MSD MPO metodeutvikling..... | 50 |
| Vedlegg B | MPO kommersielt sett..... | 57 |
| Vedlegg C | Advanced oxidation protein products (AOPP) | 61 |
| Vedlegg D | MSD MPO-kalibrator og residualer | 63 |
| Vedlegg E | Etablering av MPO kontrollkort..... | 70 |
| Vedlegg F | innen- og mellomplatevariasjon for alle plater | 71 |
| Vedlegg G | Linearitet | 72 |
| Vedlegg H | MPO hos PS-K..... | 73 |
| Vedlegg I | MPO hos PS- A..... | 74 |
| Vedlegg J | MPO hos PS-P | 75 |
| Vedlegg K | MPO hos friske kontroller og nyrepasienter..... | 76 |
| Vedlegg L | AOPP kontrollkort | 83 |
| Vedlegg M | AOPP hos PS-K..... | 85 |
| Vedlegg N | AOPP hos PS-P | 86 |
| Vedlegg O | AOPP hos PS-A..... | 87 |
| Vedlegg P | AOPP hos REN-K | 88 |
| Vedlegg Q | AOPP REN-D..... | 89 |
| Vedlegg R | AOPP hos RTX..... | 90 |
| Vedlegg S | AOPP hos REN-3 | 91 |
| Vedlegg T | AOPP hos REN-4..... | 92 |
| Vedlegg U | AOPP hos REN-5..... | 93 |

Forkortelser

| | |
|------------------------------------|---|
| AOPP | Advanced oxidation protein products |
| Br ⁻ | Bromid |
| Cl ⁻ | Klorid |
| CV | Variasjonskoeffisient |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetat |
| ELISA | Enzym-linked immuno sorbent assay |
| Fe ²⁺ | Jern (II) |
| Fe ³⁺ | Jern (III) |
| GFR | Glomerulær filtrasjonshastighet |
| H ₂ CO ₃ | Karbonsyre |
| H ₂ O ₂ | Hydrogen peroksid |
| HK | Huskontroll |
| HOBr | Underbromsyrling |
| HOCl | Underklorsyrling |
| HOI | Underjodsyrling |
| HOSCN | Undertiocyanidsyrling |
| HSA | Human serum albumin |
| I ⁻ | Jodid |
| KDa | Kilodalton |
| LOD | deteksjonsgrense |
| LOQ | kvantifiseringsgrense |
| MPO | Myeloperoksidase |
| MSD | Meso Scale Discovery |
| NGAL | Neutrophil gelatinase-associated lipocalin |
| O ₂ | Superoksid |
| R ² | Regresjonskoeffisient |
| ROS | Reaktiv oxygen forbindelse |
| Ru(bpy) ₃ ²⁺ | Ruthenium tris bipyridine kompleks |
| SCN ⁻ | Thiocyanid |
| SD | Standardavvik |
| TPA | Tripropylamin |
| P1 | EDTA-plasma fra en frivillig person nummer 1 |
| P2 | EDTA-plasma fra en frivillig person nummer 2 |
| P3 | EDTA-plasma fra en frivillig person nummer 3 |
| PS-A | Pasienter med annen hudlidelser enn psoriasis |
| PS-P | Psoriasis pasienter |
| PS-K | Friske kontroller uten psoriasis |
| REN-D | Nyredonor |
| REN-3 | Pasienter med moderat nedsatt nyrefunksjon |
| REN-4 | Pasienter med alvorlig nedsatt nyrefunksjon |
| REN-5 | Pasienter med nyresvikt |
| RTX | Nyretransplanterte |
| REN-K | Friske Kontroller |

1 Innledning

Denne oppgaven har hatt som hovedmål å utvikle og validere en immunologisk metode til deteksjon av myeloperoksidase (MPO) i plasma.

MPO er et peroksidase-enzym som hovedsakelig produseres i nøytrofile granulocytter. Nøytrofile granulocytter er en type hvite blodceller med fagocytose og ødeleggelse av mikroorganismer som primærfunksjon [1]. Ved infeksjon eller inflammasjonstilstand aktiveres immunsystemet slik at nøytrofile granulocytter migrerer til inflammasjonsstedet, hvor de skiller ut MPO samtidig som reaktive oksygenforbindelser (ROS) dannes [2, 3]. Myeloperoksidase har blitt målt som markør for oksidativt stress og inflammasjon i en del studier [4, 5].

Ved bakteriell infeksjon spiller MPO en viktig rolle i immunforsvaret i kraft av sin evne til å katalysere reaksjonen mellom hydrogenperoksid (H_2O_2) og klorid (Cl^-), som danner underklorsyring (HOCl) [6]. HOCl kan reagere med andre molekyler og dermed inngå i produksjon av klorerte oksidanter som kan lede til oksidativt stress [7]. Oksidativt stress er ubalanse mellom produksjon av oksidanter (ROS) og kroppens evne til å produsere antioksidanter som nøytraliserer disse [8]. Oksidativt stress assosieres med en del inflammasjonssykdommer og har blitt målt ved bruk av metoder som måler lipid-, protein- og DNA-oksidering [9].

Aktivering av nøytrofile granulocytter utgjør den viktigste kilden til dannelse av oksidanter, på grunn av deres høye innhold av MPO. HOCl dannet fra MPO-katalysert reaksjon har blitt rapportert som hovedoksidant ved dannelse av advanced oxidation protein products (AOPP) [7]. AOPP har blitt brukt i en del studier som mål til å indikere oksidering av plasmaproteiner [10, 11]. Det er ikke kjent om pasienter med høy MPO-konsentrasjon i plasma samtidig har økt AOPP-konsentrasjon i plasma. Derfor er det ønskelig å måle både MPO og AOPP i to pasientgrupper; nyrepasienter og pasienter med kronisk inflammasjonssykdom (psoriasis). Når man måler verdier i den enkelte av disse pasientgruppene, må man samtidig måle friske kontrollgrupper. Da vil man forvente et bredere konsentrasjonsområde av begge verdiene. MPO har tidligere blitt målt ved hjelp av ulike ELISA-analysemetoder basert på absorbansavlesning. Noen eksempler er QUANTA lite™ MPO, Bioxytech® MPO-EIA™ og BioVendor ELISA MPO-sett. [5, 12, 13].

I dette studiet ble MPO målt ved hjelp av en elektrokjemiluminescens immunoassay fra Meso Scale Discovery (MSD).

MSD-analysemetoden for å måle myeloperoksidase følger samme analyseprinsipp som sandwich ELISA. Spesifikt antistoff binder tilsvarende antigen (MPO) i prøven, et spesifikt merket deteksjonsantistoff tilsettes og enzymkonsentrasjonen måles ut fra hvor mye deteksjonsantistoff som er bundet.

MPO-MSD-metoden har en del fordeler i forhold til ELISA-metoder brukt tidligere til måling av MPO: Man får minimalt bakgrunnssignal, på grunn av at stimulasjonsmekanismen (elektrisitet) er uavhengig av signalet (lys). Sulfo-tag er stabile og emitterer lys ved 620 nm, noe som eliminerer problemer med fargeinterferens. Flere stimuleringscykluser av sulfo-tag forsterker lysnivået og forbedrer sensitiviteten. Det er færre forbindelser som interferer med elektrokjemiluminescens sulfo-tag, noe som gir større analysemuligheter.

Ulempen med MSD er at kommersielle sett er kostbare i innkjøp. Derfor var det ønskelig å teste muligheten for å kjøpe plater som ikke er forhåndsscoated med antistoff, for å utvikle en mindre kostbar, men reproducerbar metode.

Oppgaven har tre delmål. Det første målet er utvikling og validering av en immunologisk metode for deteksjon av MPO i plasma. Det andre målet er å sammenligne egen metode med tilgjengelige kommersielle kit. Det tredje målet er å måle MPO og AOPP hos nyrepasienter, pasienter med kronisk inflammatorisk sykdom og friske kontroller for å se om det er sammenheng mellom MPO- og AOPP- konsentrasjonene.

2 Teori

2.1 Inflammasjon og nyresvikt

2.1.1 Inflammasjon

Inflammasjon er kroppens forsvar mot skadelig stimuli. Inflammasjonsreaksjoner kan settes i gang av faktorer som virus, bakterier, skadet vev, immunreaksjon ved autoimmune sykdommer eller allergier. Inflammasjonsreaksjoner er nyttig for kroppen fordi de reparerer skader og beskytter kroppen mot infeksjoner. Inflammasjon kan være akutt eller kronisk. Akutt inflammasjon er kortvarig og karakteriseres ved smerte, varme, hevelse og tap av funksjon. Dersom akutt inflammasjon er forårsaket bakteriell infeksjon vil kroppen prøve å kvitte seg med disse bakteriene ved å aktivere immunsystemet. Aktiveringen utføres ved at proinflammatoriske cytokiner slik som for eksempel tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin -1 β (IL-1 β), IL-6 og IL-8, produseres av nøytrofile granulocytter og monocytter. Interleukiner sørger for at immunceller transporteres fra blodstrømmen til inflammasjonsstedet. TNF- α produseres av forskjellige immunceller og har som hovedfunksjon å hindre vekst av mikroorganismer ved å aktivere antimikrobiell effekt av nøytrofile granulocytter [14]. Nøytrofile granulocytter inneholder MPO, som er involvert i produksjon den bakteriedrepende oksidanten HOCl [10]. Tidligere studier har rapportert at HOCl og kloraminer produsert av myeloperoksidase i aktiverte nøytrofile granulocytter er involvert i dannelse av AOPP [15, 16]. Dersom kroppen ikke klarer å fjerne bakteriene som forårsaket infeksjonen vil akutt inflammasjon gradvis utvikles til en kronisk inflammasjon. Kronisk inflammasjon er langvarig og karakteriseres ved ødeleggelse og utskifting av skadede celler på inflammasjonsstedet [17].

Inflammasjonsindikatorer er høy senkningsreaksjon, økt C-reaktivt protein, forhøyet antall leukocytter, MPO og AOPP [18].

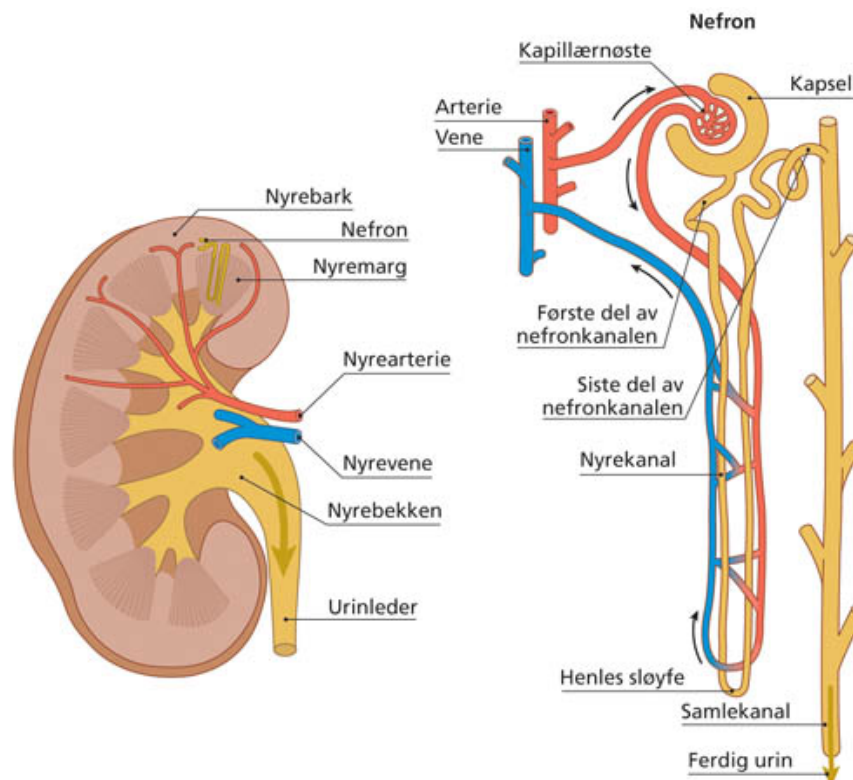
2.1.2 Psoriasis

Psoriasis er en kronisk inflammasjon i hud, karakterisert ved rask oppvekst av en type hudceller som kalles keratinocytter. Keratinocytter befinner seg i det ytre hudlaget og er ansvarlig for produksjon av keratin og antimikrobielle peptider. Ved psoriasis skjer det en infeksjon i hudceller som medfører ufullstendig keratinocytmodning og kortere levetid.

Døde hudceller hoper seg opp og utvikler tykke lag utenpå huden som kalles psoriasisutslett. Årsaken til psoriasis er ukjent, men utløsende faktorer kan være genetikk eller infeksjoner, hjertemedisiner (betablokkere), klorokin mot malaria eller litium [19]. Det har blitt rapportert økning i reaktive oksygen forbindelser, produsert av aktiverte nøytrofile granulocytter, keratinocytter og fibroblast under inflammasjonsprosess ved psoriasis. Disse forbindelsene kan føre til lipid og proteinoksidering og dermed forårsake vevskade [20]. Psoriasis oppfattes som en autoimmun sykdom. Autoimmune sykdommer oppstår ved at kroppens immunsystem angriper egne friske celler og vev [21]. Årsaksfaktorer til autoimmune sykdommer er ikke kjent, men kan for eksempel skje ved at cellene har endret seg slik at de ikke kjennes igjen av immunforsvaret.

Psoriasis rammer begge kjønn og er mer vanlig hos voksne enn barn. Symptomer er røde flekker, kalt plakk, som kan oppstå over hele hudområdet. De hyppigst affiserte områdene er albuer, knær, rygg, mage, hode-bunn, legger og føtter. Det fins ingen kur mot psoriasis, men det finnes lindringstiltak mot hudplagene [19].

2.1.3 Nyresvikt



Figur 2.1 Nefron, nyrens funksjonelle enhet [22].

Nyrer er bønneformede ekskresjonsorganer som befinner seg på hver side av ryggspylen. Nyrenes hovedfunksjon er å rense blodet og fjerne avfallsstoffer. Alt foregår i nefronene, som er en sammensetning av glomerulus(et nøste av veldig små blodårer) og tubuli (rørsøyler) (Figur 2.1).

Den første blodfiltreringen skjer i glomeruluskapillærene, hvor avfallsstoffer og vann filtreres over til tubuli, mens blodceller, proteiner og store molekyler holdes tilbake [23].

Væskemengden som filtreres fra glomeruluskapillærene til nyretubuli er avhengig av glomerulær filtrasjonsrate (GFR). GFR gir et mål på samlet filtrasjonsvolum for alle nefronene. Derfor betyr redusert GFR en reduksjon i antall funksjonelle nefroner.

Tubuli er dekket med spesielle epitelceller dekket med mikrovilli som sørger for at viktige stoffer som proteiner, glukose og aminosyrer reabsorberes til blodet. Avfallsstoff dannet i metabolismen og substanser som organismen ikke har behov for, skilles ut i urinen. Mengden urin reguleres til 1-2 liter per døgn [24].

Nyrene er også ansvarlige for regulering av væske-, syre/base- og elektrolyttbalanse.

Væskebalansen kontrolleres blant annet av antidiuretisk hormon (ADH) dannet i hypofysen. ADH øker permeabilitet av membranen i tubuli og bidrar dermed til å stabilisere blodvolumet. Syre/base-balansen er kroppens evne til å kontrollere konsentrasjoner av hydrogenioner (H^+). Store mengder H^+ dannes fra ionisering av karbonsyre (H_2CO_3). H_2CO_3 dannes fra reaksjonen mellom karbondioksid fra cellenes metabolisme og vann i erytrocytter. Nyrenes regulering av H^+ er nødvendig for å holde blodets pH stabil [24].

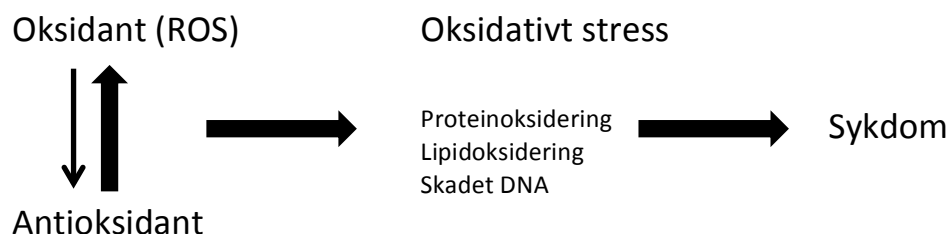
Nyresvikt oppstår når nyrene slutter å virke helt eller delvis. Dette medfører oppsamling av avfallsstoffer i blodet, som kan føre til alvorlige sykdommer. Akutt nyresvikt er en rask nyreskade, utgjør ca. 1 % av innlagte pasienter på sykehus og er ofte resultat av komplikasjoner ved andre sykdommer.

Kronisk nyresvikt er en gradvis ødeleggelse av nyrene som konsekvens av en annen sykdom over lang tid. Vanlige symptomer er tretthet, kløe, kvalme, ødem i hender og føtter, blod i urinen og muskelkrampe.

Kreatinin, nedbrytningsproduktet av muskelkreatin og GFR har lenge blitt brukt som markør for nyresvikt. Nyerestudier har gitt oss en ny markør for akutt nyresvikt, neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) [25, 26]. NGAL er et lite polypeptid fra nyretubuli, som kan detekteres i urin på grunn av sin resistans mot proteaseenzym. NGAL utskilles tidlig under utvikling av nyresvikt og anses derfor som markør til deteksjon av tidlig nyresvikt [26].

2.2 Oksidativt stress

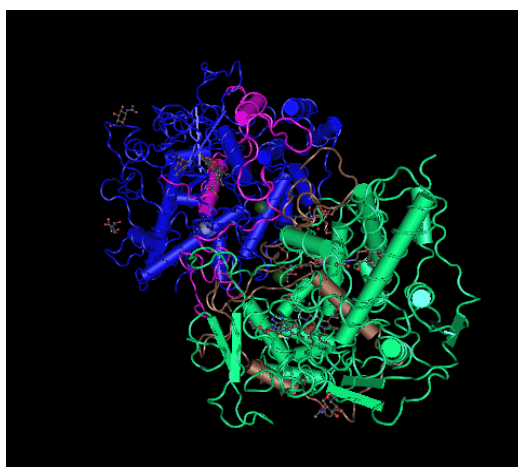
Fysiologisk oksidativt stress oppstår ved ubalanse mellom produksjon av reaktive oksygenforbindelser (ROS) og kroppens evne til å nøytralisere dem [11, 27] (Figur 2.2). ROS kan produseres av fagocytterende celler, som har til hensyn å drepe mikroorganismer som har kommet seg inn i organismen. ROS produseres også av mitokondrier under normal oksidativ metabolisme. Faktorer som røyking, medisiner, alkohol, stråling og en rekke sykdommer kan også bidra til dannelse av disse forbindelsene. ROS er veldig reaktive og kan lett reagere med andre molekyler og endre dem. Dersom ROS ikke fjernes, som for eksempel ved en kronisk inflammasjonstilstand, vil struktur eller funksjoner av en del viktige komponenter som DNA, RNA, lipider og proteiner skades [28]. Kroppen har eget antioksidantforsvar for å fjerne ROS og reparere påført skade. Forsvaret innebærer produksjon av enzymer med antioksidantfunksjon, superoksididismutase (SOD) og glutation. Oksidativt stress har blitt assosiert med en rekke sykdomstilstander som AIDS, inflammasjon, kreft, pre-eklampsi, psoriasis og primært Sjøgrens syndrom [9, 20, 29]. Graden av oksidativt stress kan måles ved hjelp av ulike metoder. To hyppig anvendte metoder for å detektere oksiderte proteiner i plasma er AOPP og protein karbonyl (PC).



Figur 2.2. Ubalanse mellom oksidanter og antioksidanter fører til oksidativt stress

2.3 Myeloperoksidase

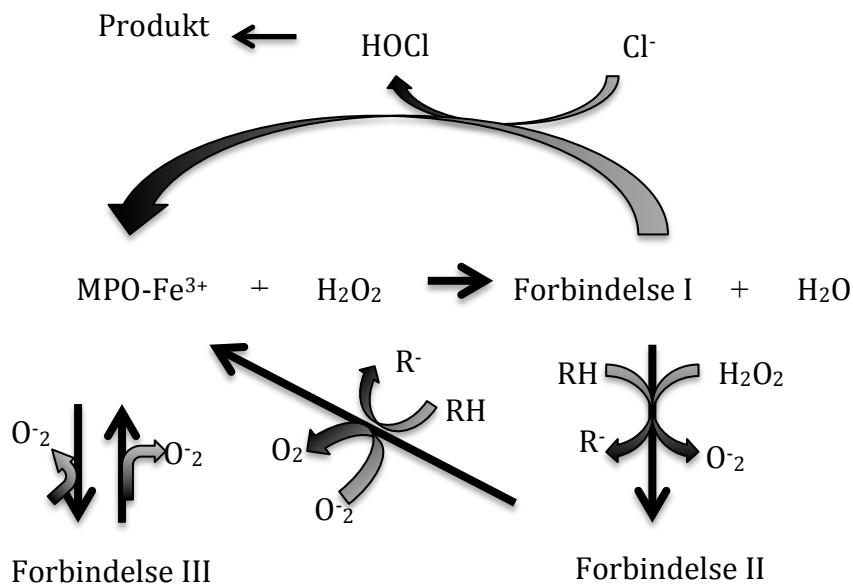
MPO er involvert i cellens forsvar mot bakterielle infeksjoner. Enzymet lagres hovedsakelig i nøytrofile granulocytter, men små mengder kan også finnes i monocytter. MPO i seg selv har liten effekt på mikroorganismer, men ved å katalysere reaksjonen mellom hydrogenperoksid og halider (Cl^- , Br^- , I^-) eller pseudohalid (SCN^-) dannes antioksidantene underklorosyring (HOCl), underbromsyring (HOBr), underiodosyring (HOI) og underthiocyanidsyring (HOSCN), som bidrar i bekjempelsen av mikroorganismer hos nøytrofile granulocytter [30].



Figur 2.3 3D struktur av human MPO med to tunge kjeder (blå og grønn) og to lette kjeder (brun og lilla) [31].

MPO er et positivt ladet protein som veier omtrent 150 kDa. Proteinet har to identiske 73 kDa monomerer, bundet ved hjelp av en disulfidbro ved cys 153 (Figur 2.3). Hver monomer har en tung kjede (58,5 kDa, 467 aminosyre) og en lett kjede (14,5 kDa, 106 aminosyre). Den tunge kjeden inneholder det enzymatisk aktive setet, modifisert jern protoporfyrin IX, som kun tillater adgang til hydrogen peroksid og små anioner [1, 30].

2.3.1 MPO-kompleksformering



Figur 2.4 MPO-forbindelser laget ved reaksjon med ROS [30]

MPO lager tre komplekser (forbindelse I, II og III) ved å reagere med ROS:

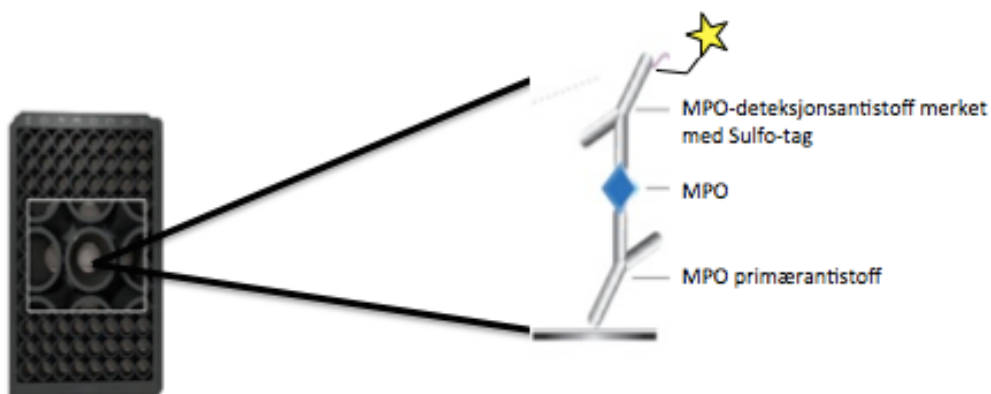
H₂O₂ kan reagere med jernet i den opprinnelige formen av MPO (MPO-Fe³⁺) og danne forbindelse I (Figur 2.4). Forbindelse I er ustabil og kan enten reagere med klorid (Cl⁻) og danne HOCl eller reduseres til den opprinnelige formen (MPO-Fe³⁺). Når hydrogen peroksid dannes i overskudd, omdannes forbindelse I til forbindelse II som også kan reduseres til MPO-Fe³⁺ av O₂⁻ eller andre reduserende molekyler. Forbindelse III dannes ved etterreaksjonen mellom MPO-Fe²⁺ og oksygen eller reaksjonen mellom MPO-Fe³⁺ og O₂⁻. Forbindelse III er ustabil og kan dermed lett reagere med både elektrondonorer og -reseptorer. Derfor har flere studier antatt at forbindelse III kan være den aktive katalytiske formen av MPO hos nøytrofile granulocytter [1, 30].

2.4 Mesoscale discovery MPO-analyseprinsipp

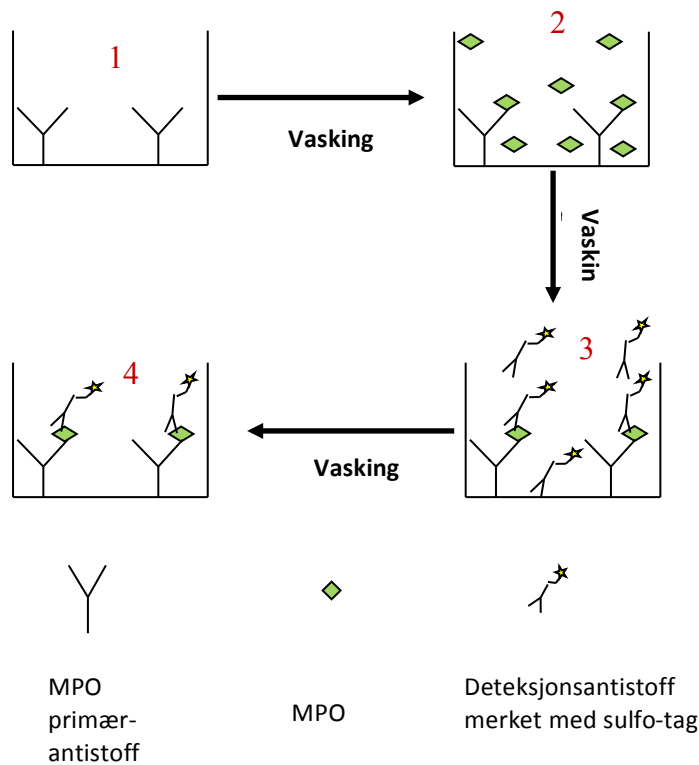
MSD-analysemetoden til måling av MPO i plasma karakteriseres som en elektrisk drevet kjemisk reaksjon som produserer lys (elektrokjemiluminescens). Metoden følger samme prinsipp som sandwich ELISA. Det vil si at MPO-spesifikt antistoff festet i bunnen av analyseplaten binder seg til MPO-(antigen) i prøven. Deretter tilsettes et merket deteksjonsantistoff som emitterer lys ved tilførsel av elektroner i bunnen av platen. Mengden lys regnes proporsjonal med konsentrasjon av MPO i prøven.

2.4.1 MSD MPO-metodebeskrivelse

En MSD 96-brønnsplate er bygd opp med 96 brønner fordelt på tolv kolonner og åtte rader. Hver brønn er dekket med MPO-spesifikt antistoff (Figur 2.5).



Figur 2.5 MSD MPO reaksjonsprinsipp [32].



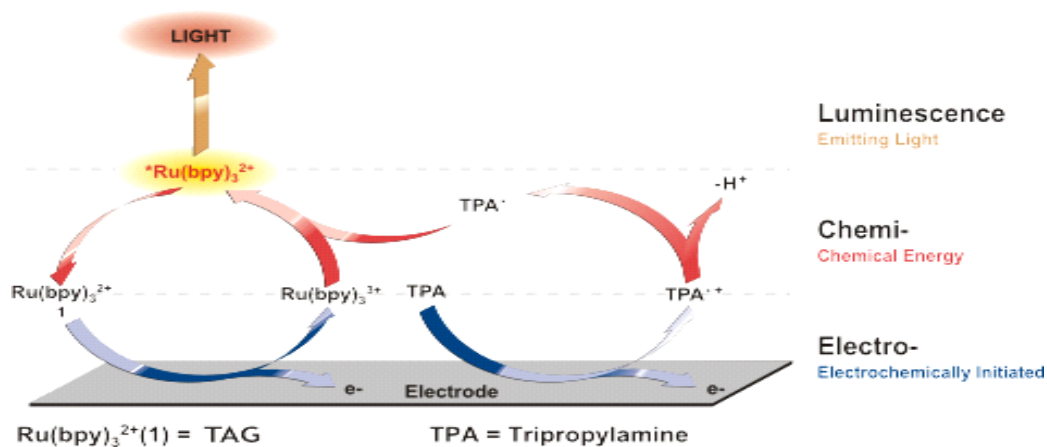
Figur 2.6 MSD MPO-analyseprinsipp. MPO primærantistoff og deteksjonsantistoff merket med sulfo-tag lager sandwich-kompleks med MPO-(antigen) i prøven.

MSD –analyse av MPO utføres som vist i figur 2.6. Figuren illustrerer reaksjonene som foregår i hver av brønnene på 96-brønnplaten til deteksjon av MPO i plasma. Her følger en forklaring av de illustrerte reaksjonsprinsippene:

1. Hver brønn i platen er på forhånd dekket med MPO-primærantistoff. Før tilsetning av plasmaprøver tilsettes blokker A bufferløsning. Blokker A er en proteinløsning laget av bovin serum albumin (BSA), hvor funksjonen er å blokkere ledige bindingssteder på platen og hindre uspesifikke bindinger som kan gi falsk forhøyet signal. Platen vaskes før tilsetning av plasmaprøver.
2. Plasma tilsettes hver av brønnene, og MPO-(antigen) i prøven binder seg spesifikt til primærantistoff. Platen vaskes for å fjerne det som er ubundet.
3. Tilsatt deteksjonsantistoff merket med sulfo-tag ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) binder seg til MPO i prøven. Etter inkubering vaskes platen for å fjerne overskudd av deteksjonsantistoff.
4. Avlesningsbuffer tilsettes og platen føres umiddelbart inn i MSD sector imager 2400 til avlesning.

2.4.2 MSD Sector imager 2400 avlesningsprinsipp

Når platen føres i maskinen og strømmen settes på, oksideres sulfo-tag ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) og TPA fra avlesningsbuffer til henholdsvis $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ og TPA^+ . TPA^+ gir fra seg sitt proton og reduserer $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ til sin opprinnelige form, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, samtidig som det emitteres lys ved 620 nm. (Figur 2.7). Emittert lys tilsvarende konsentrasjon av MPO i prøven.



Figur 2.7 MSD Imager 2400 avlesnings prinsipp [33].

2.5 AOPP

AOPP defineres som en gruppe av dityrosin-, pentosidin- og karbonyl-holdige proteinprodukter, produsert ved oksidativt stresstilstand [16]. Fibrinogen er nylig rapportert som hovedprotein ansvarlig i produksjonen av AOPP i humant plasma, i motsetning til albumin rapportert tidligere [16, 34].

Oksidering av proteiner som danner AOPP-akkumulering assosieres med MPO-aktivitet i aktiverte nøytrofile granulocytter [9]. AOPP fungerer også som inflammatoriske mediatorer på grunn deres evne til å stimulere ROS produksjon i immunceller [35].

To hovedgrupper AOPP, basert på molekylær masse (høy- og lav molekylær AOPP), ble identifisert ved hjelp av "size exclusion chromatografi" hos hemodialysepasienter.

Høymolekylær AOPP (600 kDa) dannes fra HSA-proteinaggregater, mens lavmolekylær AOPP (70 kDa) dannes fra HSA- og γ - globuliner [16].

AOPP måles spektrofotometrisk ved hjelp av mikroplateavleser. Kloramin T tilsatt kaliumjodid (KI) brukes som standardløsninger og absorberer lys ved 340 nm. AOPP-konsentrasjon i ukjente prøver rapporteres som kloramin T ekvivalenter [9].

2.6 Metodevalidering

Metodevalidering er definert som en vurdering for å bekrefte om en analytisk metode brukt for en spesifikk test er egnet til formålet. Metodevalidering er nødvendig ved for eksempel introduksjon av nye rutiner, nytt instrument eller ved bytting av type prøvemateriale. Viktige parametere som inngår i metodevalidering er:

- Kalibreringskurven
- Analysevariasjon
 - Presisjon
 - Nøyaktighet
 - Repeterbarhet
 - Reproduserbarhet
- Deteksjonsgrense
- Linearitet
- Gjenfinning
- Kontrollkort

2.6.1 Kalibreringskurve

Kalibratoren inneholder en kjent mengde av den forbindelsen man ønsker å måle. Målt kalibratorkonsentrasjoner (x-aksen) og tilsvarende signal (y-aksen) plottes i et koordinatsystem, og en kurve tegnes mellom alle målepunktene. Regresjonskoeffisienten (R^2) sier noe om kurvetilpasningen og korrelasjon mellom signal, eller absorbans, og konsentrasjoner av kalibrator. R^2 forteller om hvor godt målepunkter samler seg rundt kurven og er alltid et tall som ligger mellom 0 og 1 [36]. R^2 lik 1 gir den beste kurvetilpasningen og indikerer en positiv sammenheng mellom signal eller absorbans, og kalibratorkonsentrasjoner (stigendekurve). R^2 lik 0 indikerer at det er ingen korrelasjon mellom variablene.

Residualer er avstanden mellom hvert målepunkt og kurven. Residualer uttrykker usikkerhet i hvert målepunkt.

MSD bruker en fire-parameter kalibreringskurve til beregning av MPO-konsentrasjoner i ukjente prøver, mens AOPP-metoden bruker en lineær kalibreringskurve. Maskinen beregner likningen for kurven og bruker den til å måle konsentrasjoner av ukjente prøver [37].

For å få riktig beregning av MPO i ukjente prøver må alle punktene ligge så nær kurven som mulig, samtidig som avstanden mellom hvert målepunkt og kurven er liten.

2.6.2 Analytisk variasjon

Når en prøve analyseres flere ganger får man ikke nøyaktig samme svar hver gang. Denne usikkerheten kalles analytisk variasjon. Analytisk variasjon forårsakes av systematisk- eller tilfeldig feil og uttrykkes henholdsvis som % bias (avvik fra forventningsverdi) og CV.

Systematisk feil er en feil som påvirker prøvesvar slik at de blir for høye eller for lave [37].

Systematisk feil må identifiseres og fjernes. Tilfeldige feil er en type feil som påvirker resultater på en tilfeldig måte slik at noen blir for høye eller for lave, sammenliknet med sannverdien. Små endringer i analyse som for eksempel temperatur, pH, pipettering, kan bidra til tilfeldig feil. Tilfeldige feil kan ikke elimineres helt, derfor er det nødvendig å sette opp mål for å redusere dem til et minimum, for å oppnå bedre presisjon [37, 38].

Variasjonskoeffisient regnes ut etter formelen:

$$CV = (SD/gjennomsnitt) * 100\%$$

Gjennomsnitt: Middelvei av måleparallelleller.

Presisjon

Presisjon forteller i hvilken grad man får samme svar ved utførelse av en analyse flere ganger.

Presisjon er et mål på overstemmelse mellom to eller flere målepunkter. Relativt like målepunkter gir god presisjon mens veldig forskjellige gir dårlig presisjon. Presisjon uttrykkes ved SD og CV. [38, 39].

Nøyaktighet

Nøyaktighet er et mål på overstemmelse mellom hvert målepunkt og forventet eller sann verdi. Nøyaktighet er indikasjon på systematisk feil som oppstår under en analyse og kan uttrykkes kvantitativt som bias [37, 40].

Repeterbarhet (variasjon innenfor plate)

Repeterbarhet er et uttrykk for analysevariasjonen innenfor en plate. Repeterbarhet måles ved å analysere samme prøve flere ganger på platen under samme betingelser (samme dag, samme person, samme metode, samme instrument). Repeterbarhet uttrykkes ved SD og CV.

Reproduserbarhet (variasjon mellom plater)

Reproduserbarhet er et uttrykk for analysevariasjon mellom plater. Reproduserbarhet måles ved å sammenlikne overstemmelse mellom middelveidier av en prøve analysert på forskjellige plater. Reproduserbarhet uttrykkes ved CV og SD.

2.6.3 Deteksjonsgrense

Deteksjonsgrense (LOD) er den laveste konsentrasjon av analytt som med en viss grad av sikkerhet kan detekteres av metoden, det vil si den laveste konsentrasjonen som gir signal signifikant forskjellig fra blank. Kvantifiseringsgrense (LOQ) er laveste konsentrasjon av analytten som kan kvantifiseres med god presisjon [39, 41].

2.6.4 Linearitet

Linearitet er et mål på proporsjonal sammenheng mellom to datasett (x , y) i et koordinatsystem. Linearitet kan kontrolleres ved fortykning av en prøve innenfor et visst konsentrasjonsområde, etterfulgt av en måling av deres konsentrasjoner i paralleller. Målte konsentrasjonsverdier (x) plottes mot signal (y) i et regresjonsdiagram. Ved lineær sammenheng skal R^2 være nær 1 eller -1 [39].

2.6.5 Gjenfinning

Et gjenfinningsforsøk utføres for å teste om analysen reagerer likt på eksogent (syntetisert) og endogent (in vivo) stoff [37]. Forsøket utføres for eksempel ved å tilsette en kjent mengde MPO (spike) i en prøve med kjent MPO-konsentrasjon. Deretter analyseres prøven tilsatt MPO for å se om analysen reagerer likt på endogent og eksogent MPO. Det er viktig at endogent og eksogent stoff har samme egenskaper for å oppnå en riktig beregning av gjenfinning. Gjenfinning måles ved bruk av formelen:

$$\text{Gjenfinning} = [(P3 + \text{spike}) - P3] / \text{spike} * 100$$

P3: er kontrollprøve med kjent MPO-konsentrasjon

2.6.6 Kontrollkort

Kontrollkort etableres for å følge med om en analyseprosess er stabil over tid og er under kontroll. For å lage et kontrollkort måles det en kontrollprøve i prøveparalleller. Deretter velges det bestemte målinger for å beregne gjennomsnittsverdi og SD. De beregnede SD og gjennomsnittsverdi brukes til å bestemme øvre/nedre varsel- og alarmgrenser. Et kontrollkort har to varselgrenser (gjennomsnitt \pm 2SD), to alarmgrenser (gjennomsnitt \pm 3SD) og en senterlinje (gjennomsnitt). Shewhart kontrollkort er et x-y koordinatsystem med y-aksen som målt konsentrasjon av analytt (MPO) og x-aksen som analyseplatene. Man kan si at en analyseprosess er stabil og under kontroll når alle målepunkter av en kontrollprøve ligger innenfor varselgrenser, og jevnt fordelt rundt senterlinjen. Dersom målingen begynner å havne utenfor varselgrenser og mot alarmgrenser, for eksempel ved systematisk feil, kan det påstås at analysen er i ferd med å komme ute av kontroll [37, 38].

3 Materiale og metode

3.1 Prøvemateriale

3.1.1 Kontrollprøver

Til metodeutvikling, validering og kontroll av reproduserbarhet ble det samlet inn ethylenediaminetetraacetat (EDTA)-blod fra fire frivillige personer. Det ble samlet tre prøverør à 9 ml per person. Etter sentrifugering (2200 G ved 4 °C i 15 min) ble plasma umiddelbart separert fra blodlegemer, blandet, alikvotert (100 µl i hver alikvot) og lagret ved -70 °C. Plasma fra de fire kontrollpersonene var merket henholdsvis huskontroll (HK), P1, P2 og P3.

3.1.2 Pasientprøver og friske kontroller

EDTA-blod ble samlet fra pasienter og friske kontroller i et psoriasisprosjekt (PS-FTG). Alle prøvene ble tatt av fastende. Det vil si at det var minimum fire timer mellom forrige måltid og prøvetaking. Det ble også samlet EDTA-blod fra pasienter med ulik grad av nyresvikt (prosjekt REN-BM), nyredonorer (prosjekt REN-BM), nyretransplanterte (prosjekt RTX) og deres kontroller. Disse prøvene ble tatt av ikke fastende. Plasma ble separert fra blodceller rett etter sentrifugering (2500 G ved 4 °C i 15 min) og lagret i 300 µl alikvoter ved -70 °C. Konsentrasjonene av MPO og AOPP ble målt i plasma fra alle deltakerne i prosjekt PS-FTG, REN-BM, og RTX (Tabell 3.1).

Tabell 3.1 Oversikt over pasientgrupper og friske kontrollere

| Prosjektkode | Gruppekode | Antall deltakere, n | Forklaring | *F/**IF |
|--------------|------------|---------------------|---|---------|
| PS-FTG | PS- K | 40 | Kontroller uten psoriasis | *F |
| PS-FTG | PS- P | 41 | Psoriasispatienter | *F |
| PS-FTG | PS- A | 27 | Andre. Pasienter med annen hudlidelse enn psoriasis eller med tilleggs sykdom | *F |
| REN-BM | REN- K | 35 | eGFR ^{***} >60. Normal eller lett nedsatt nyrefunksjon | **IF |
| REN-BM | REN- 3 | 22 | eGFR ^{***} 30-44, Moderat nedsatt nyrefunksjon | **IF |
| REN-BM | REN- 4 | 18 | eGFR ^{***} 15-29, Alvorlig nedsatt nyrefunksjon | **IF |
| REN-BM | REN- 5 | 20 | eGFR ^{***} < 15 Nyresvikt | **IF |
| REN-BM | REN- D | 40 | Nyre donorer | **IF |
| RTX | RTX | 43 | Nyretransplanterte med eGFR ^{***} 45-59 | **IF |

*F = Fastende (minimum fire timer fra siste måltid til prøvetaking)

**IF = Ikke fastende

eGFR^{***} = Estimert glomerulær filtrasjonshastighet

3.2 Måling av MPO

MPO konsentrasjon i EDTA plasma ble målt ved bruk av MSD sector imager 2400.

3.2.1 Reagenser og utstyr

To MPO-sett fra MSD ble anvendt under masteroppgaven. Det ble brukt et for utvikling og optimalisering av egen metode (lotnummer: K15A01-1, vedlegg A1) og et ferdig sett klar for analyse av plasmaprøver (to ulike lotnummer: K0050592 og K0050626, vedlegg B).

Reagensene ble laget og oppbevart som anbefalt av produsenten (vedlegg A2). Destillert vann eller fosfatbuffer (PBS-buffer – 0,1M natrium fosfat, 0,15M natrium klorid, pH 7,2) ble brukt til fortykning av reagensene.

3.2.2 MSD MPO-metodeutvikling

Første steg i metodeutviklingen var å teste forskjellige konsentrasjoner av antistoffer og MPO for å finne optimale konsentrasjoner som skulle brukes videre i prosjektet. Tre screeningforsøk ble utført, hvor ulike kombinasjoner av følgende parametere ble testet: 1) primært antistoff (MPO light chain (A-5): SC 365436) til platecoating 2) umerket deteksjonsantistoff (Kanin polykonalt antistoff, ABIN 655507) 3) MPO-kalibrator (lyophilized fra 50mM Na acetat, pH= 6,0 med 100mM NaCl) og 4) deteksjonsantistoff merket med Sulfo-tag (vedlegg A3.2). Dette ble utført etter MSD sitt forslag for initial screening ved metodeutvikling [42]. Detaljert beskrivelse av plateoppsett, antistoff, MPO-kalibratorfortynninger og alle screeningforsøkene er beskrevet i vedlegg A2 og A3.2.

3.2.3 Anvendelse av MSD-MPO-metode

Prinsippet for metoden er beskrevet i teoridelen (2.4.1), og en detaljert beskrivelse av hvordan analysen utføres er beskrevet i vedlegg B2. Informasjonen finnes også på Mesoscale discovery sin hjemmeside [43]. Kalibreringsstandarder ble laget i konsentrasjoner fra 0-50000 pg/ml.

Pasientprøver og plasmakontroller (HK, P1, P2, og P3) ble fortynnet 1:10 med diluent 27 før analyse.

3.2.4 Validering av MSD-MPO-metode

MSD sin ferdige MPO-metode ble validert med hensyn på kalibreringskurven, presisjon, deteksjonsgrense, linearitet og gjenfinning. Kriteriene for å godkjenne hver 96-brønnsplate var at kurvetilpasning, R^2 , skulle være $\geq 0,99$, residualene for hvert målepunkt skulle være $\leq 15\%$ og variasjonskoeffisient for tre paralleller av samme plasmaprøver eller kalibratorløsning, skulle være $\leq 15\%$. Beregninger av residualer for hver kurve finnes i vedlegg D.

Kalibreringskurve

For hver plate ble det laget åtte ferske kalibratorløsninger med kjente konsentrasjoner (0-50000 pg/ml). Hver av disse ble analysert i triplikater. Etter plateavlesning genererte MSD programvare en fire-parameter kalibreringskurve ved å plote signal av hver kalibrator mot sin

konsentrasjon. Kalibreringskurven ble så brukt til beregning av MPO-konsentrasjonen i de ukjente plasmaprøvene.

Presisjon

Repeterbarhet

Til undersøkelse av repeterbarhet ble HK analysert i seks paralleller på hver plate.

Kravet satt til variasjon mellom parallellene var $\leq 15 \%$

Reproduserbarhet

Reproduserbarheten ble undersøkt ved å sammenlikne variasjon av HK-måleparalleller mellom platene. Kravet til mellom platevariasjon var $\leq 15 \%$.

Deteksjonsgrense

Blankprøver ($n = 3$) ble analysert på alle platene (Lot K0050592 og Lot K0050626).

Gjennomsnittlig signal av blank og SD ble brukt til å beregne deteksjonsgrense.

$$LOD = \text{gjennomsnittlig signal av blank} + 2,5 SD$$

$$LOQ = \text{gjennomsnittlig signal av blank} + 5 SD$$

Linearitet

For å teste om fortynning av prøver hadde betydning for analyserespons ble to pasientprøver PS-FTG 2 (MPO: 23 ng/ml) og PS-FTG 9 (MPO:23 ng/ml) fortynnet 1:5, 1:10, 1:20 og 1:40 ng/ml MPO. Prøvefortynningene ble analysert og konsentrasjonene ble plottet mot signaler i et x-y koordinatsystem. Regresjonskoeffisient $R^2 \geq 0,99$ var kriteriet for linearitet.

Informasjon om prøvefortynning og beregninger finnes i vedlegg G.

Gjenfinning

For å teste om metoden klarer å finne igjen en tilsatt mengde MPO i prøven, ble kontrollprøve P3 tilsatt MPO (2500 pg/ml). MPO ble målt i både P3 og P3 + spike.

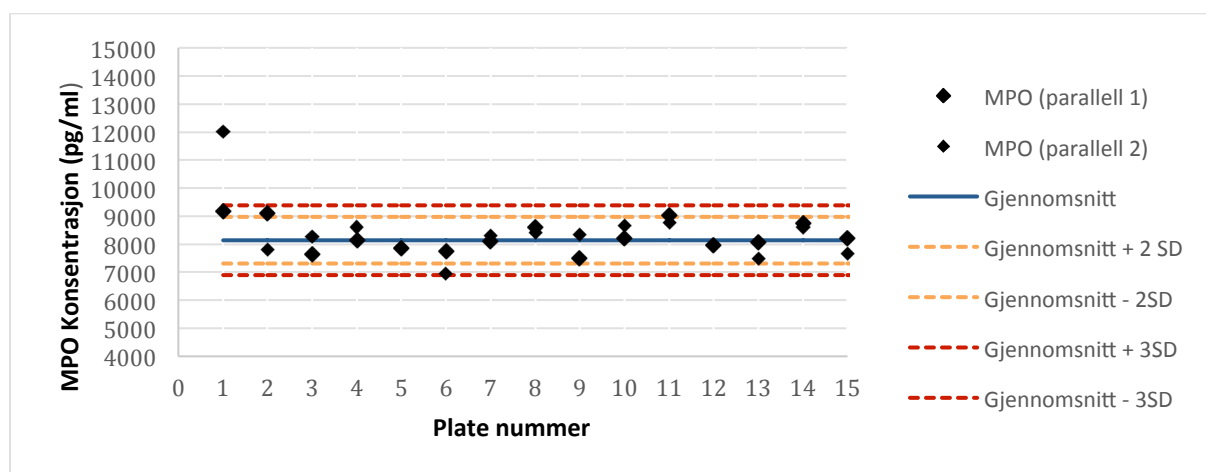
$$\text{Gjenfinning} = [(P3 + \text{spike}) - P3] / \text{spike} * 100$$

Spike: den tilsatte MPO-konsentrasjonen.

Kontrollkort

Kontrollkortet ble etablert for å følge med på om analysen er stabil over tid. Kontrollkortet ble laget fra atten målepunkter av HK analysert på tre plater. Gjennomsnitt av de atten målepunktene er senterlinjen. ± 2 SD er de øvre/nedre varselgrensene og ± 3 SD er de øvre/nedre alarmgrensene. Alle målte HK-konsentrasjonene for hver plate ble plottet i kontrollkortet. Målepunkter må fordeles jevnt rundt middelverdien og mellom ± 2 SD for at en analyseplate skal godkjennes. Dersom noen punkter havner tilfeldig mellom 2 og 3SD kan dette tyde på tilfeldigfeil. Hvis punktene viser tendens til å havne mot alarmgrenser over en periode, kan dette skyldes systematisk feil. I dette tilfelles kan analysesettet ikke godtas, og den systematiske feilen må oppdages og elimineres.

En oversikt over alle målte MPO av HK-verdier finnes i vedlegg E.



Figur: 3.1 Eksempel på et kontrollkort

3.3 Metode advanced oxidation protein products

Til måling av AOPP-konsentrasjon i plasma ble det brukt Spektrofotometer Multiscan Ascent V1.24. Detaljer om analyseutførelsen er beskrevet i vedlegg C2.

3.3.1 Reagenser og utstyr

Kloramin T ($C_7H_7CINNaO_2S \cdot 3H_2O$, Mw 281,69 g/mol, Sigma – Aldrich), kalium-jodid (KI, Mw 166 g/mol, pH 6,2 Sigma), Fosfat buffer Saline (PBS buffer – 0,1M natrium fosfat, 0,15 M natrium klorid, pH 7,2; Pierce) og sitronsyre ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, Mw 210,14 g/mol, Merck). Destillert vann og PBS ble brukt til fortynning av reagenser.

3.3.2 Tillaging av kalibratorløsninger

Kloramin T stamløsning 1 (100 mmol/l) ble laget ved å løse 84,5 mg kloramin T i 3 ml destillert vann. Kloramin T stamløsning 2 (1 mmol/l) ble laget daglig ved å blande 30 μ l stamløsning 1 med 2970 μ l destillert vann. Stamløsning 2 ble brukt i tillaging av åtte kalibratorløsninger med konsentrasjoner fra 0-95 μ mol/l (vedlegg C1).

Sitronsyre (0,20 mol/l) ble laget ved å løse 4,2 g sitronsyre med 100 ml destillert vann.

KI (1,16 mol/l) ble laget ved å løse 0,48 g KI i 2,5 ml PBS.

Pasient- og kontrollprøver ble analysert uforynnet.

3.3.3 AOPP Kvalitetskontroll

Til overvåkning av AOPP-metoden ble HK analysert i ni paralleller på hver plate. Det vil si at innen samme plate ble tre HK-prøver målt for AOPP i tre paralleller hver, på tre forskjellige steder på platen. Det ble beregnet gjennomsnitt og SD av 24 HK målinger analysert på plate 3-5 for å lage kontrollkort. Alle målte HK-konsentrasjonene for alle platene ble plottet i kontrollkortet. På grunn av begrenset HK-plasma ble det samlet plasmaprøver fra tre frivillige personer (P1,P2 og P3). Disse prøvene ble brukt til å teste om pipettene fungerer som de skal, men det ble også utført en test som undersøkte om platene var homogene i alle brønner. Til pipettetest ble automat- og manuell pipette sammenliknet ved å bruke hver av disse til å overføre en blåbærfargestoffløsning til hver sin respektive plate. Variasjon i absorbans innenfor platene (CV) ble sammenliknet.

For å teste om platen var homogen i alle brønnene, ble P-kontrollene (P1,P2 og P3), pipettert i åtte paralleller hver. Variasjon i AOPP-konsentrasjonene mellom parallellene (CV) måtte være $> 15 \%$ for å bekrefte at brønnene var homogene.

3.4 Statistikk

Microsoft Excel ble brukt til utførelse av alle statistikktester. Tosidig t-test med 95% signifikansnivå ble brukt for å sammenlikne pasientgrupper og friske kontroller. En tosidig t-test med 95 % signifikansnivå undersøker om gruppene har gjennomsnittsverdier som er signifikant forskjellige. Ved $P < 0,05$ kan det påstås med 95 % sikkerhet at det er signifikant forskjell mellom gruppene. P-verdier $> 0,05$ tilsier ingen forskjell mellom gruppene. F-test ble brukt for å teste om gruppene hadde lik varians.

4 Resultater

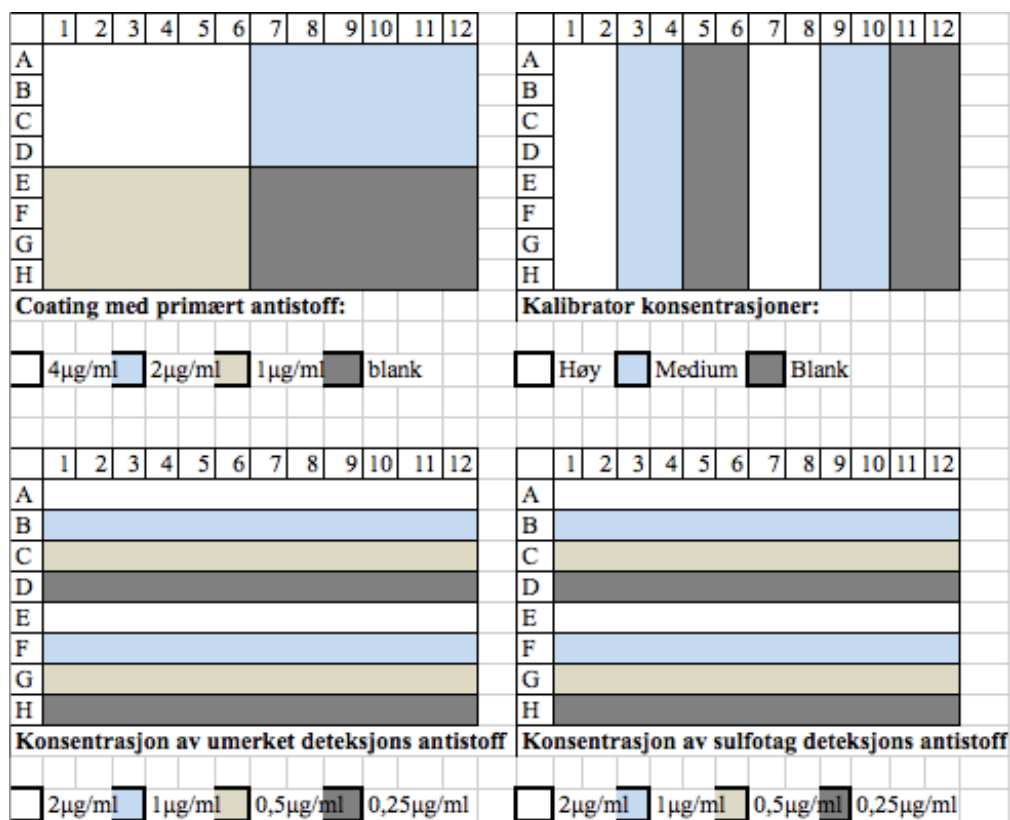
4.1 MSD-metode

4.1.1 MSD MPO-metodeutvikling

Kombinasjoner av ulike konsentrasjoner av primærantistoff, MPO, umerket deteksjonsantistoff og sulfo-tag deteksjonsantistoff ble undersøkt ved hjelp av tre screeningforsøk. Dette ble utført for å finne optimale konsentrasjoner som skulle brukes videre i prosjektet.

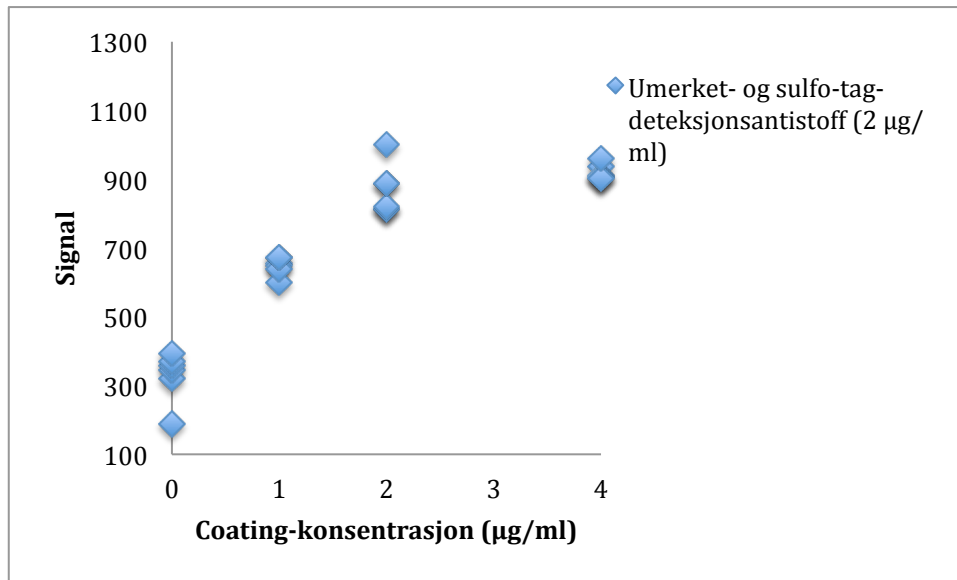
I første og andre screeningforsøk ble det undersøkt 48 kombinasjoner av primærantistoff, MPO, umerket deteksjonsantistoff og sulfo-tag deteksjonsantistoff. Det vil si at på en 96-brønnsplate var det to paralleller av hver kombinasjon (Figur 4.1).

Figurene i denne delen av oppgaven er representative, alle kombinasjonene er ikke vist.



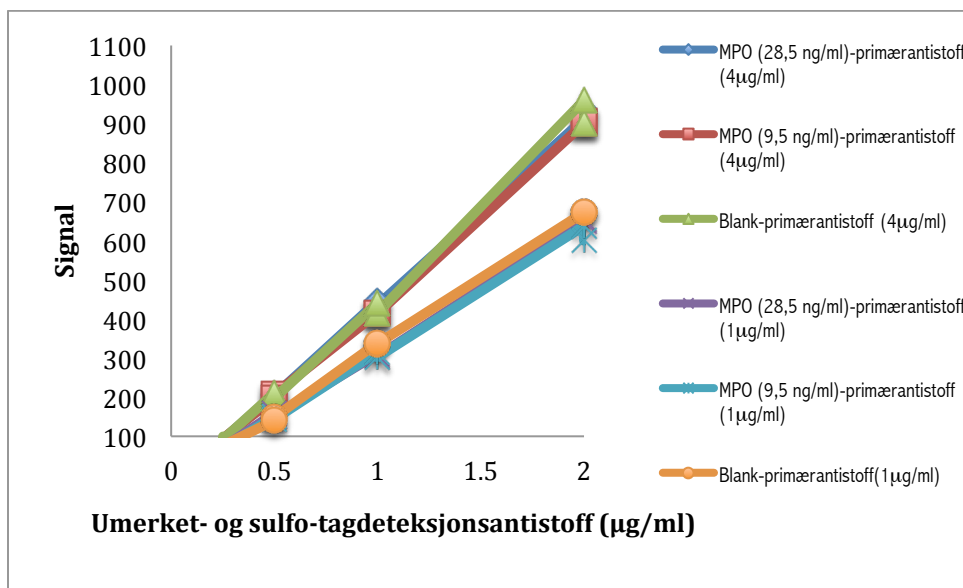
Figur 4.1 screeningforsøksoppsett. Platen fordeles på fire, og hver del coates henholdsvis med 4,2 og 1µg/ml primærantistoff. Høy, medium MPO-kalibrator og forskjellige konsentrasjoner av umerket- og sulfo-tag deteksjonsantistoff tilsettes platen som vist.

Det ble laget tre primærantistoffløsninger med konsentrasjoner: 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml og blank. Platen ble fordelt i fire deler der den siste delen ikke var coatet med noe antistoff (Figur 4.1). Avlest signal på delene av platen som var tilsatt 2 µg/ml umerket- og sulfo-tag deteksjonsantistoff ble brukt for å vise effekten av primærantistoff (Figur 4.2).



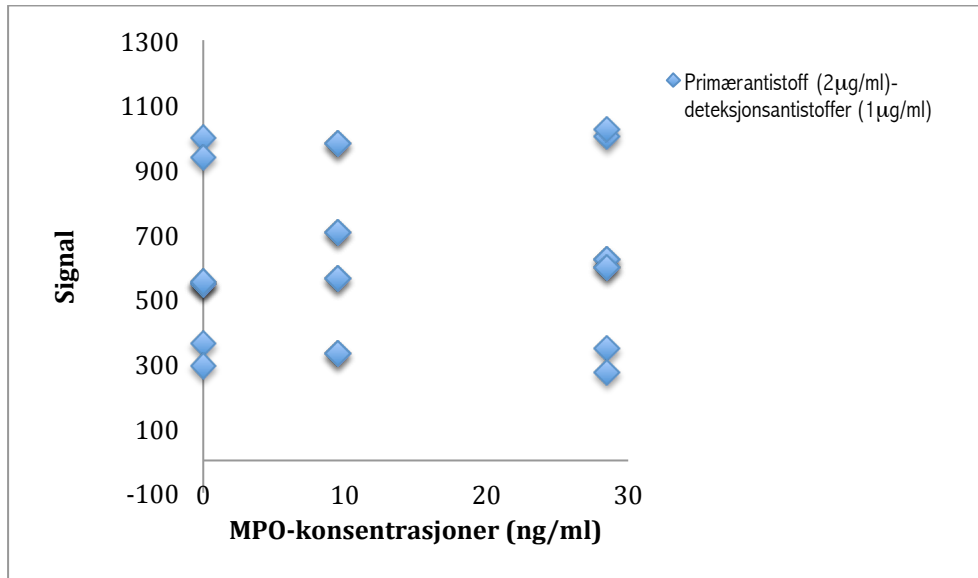
Figur 4.2 Effekt av primærantistoff til platecoating, når platen tilsettes 2 µg/ml umerket- og sulfo-tag deteksjonsantistoff.

På samme plate ble det tilsatt MPO med konsentrasjoner 28,5 ng/ml, 9,5 ng/ml og blank som vist i figur 4.1. Effekten av merket- og sulfo-tag deteksjonsantistoffene ble undersøkt ved hjelp av avlest signal på delene av platen som var coatet med 4 og 1 µg/ml primærantistoff (Figur 4.3).



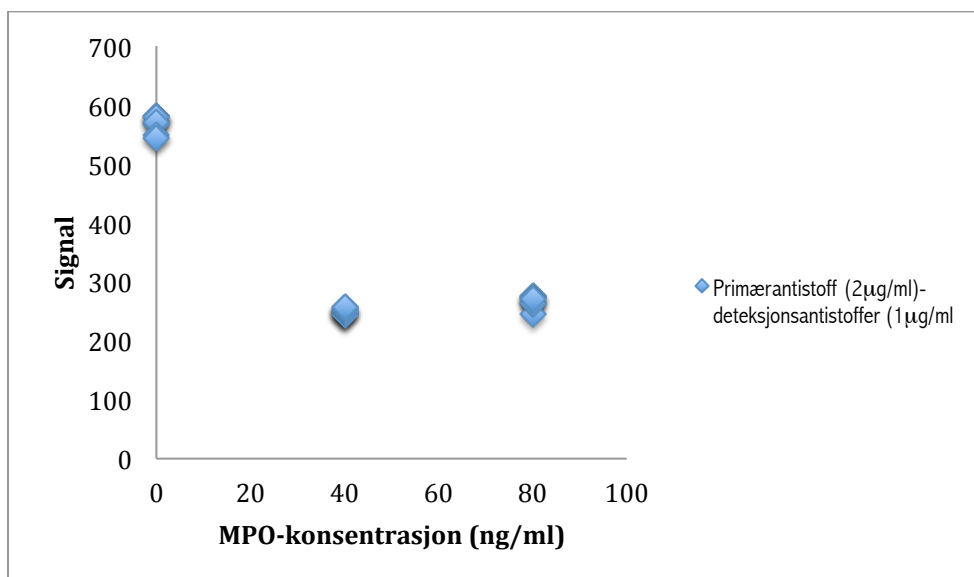
Figur 4.3 Effekt av umerket- og sulfo-tag deteksjonsantistoff ved bruk av høy/lav MPO-konsentrasjoner og blank, når deler av platen coates med 4 og 1 µg/ml konsentrasjoner av primærantistoff.

Avlest signal på delene av platen som var coatet med 2 µg/ml og tilsatt 1 µg/ml merket-og umerket deteksjonsantistoffer ble brukt for å teste deteksjon av MPO. Signal virker uavhengig av MPO-konsentrasjon.



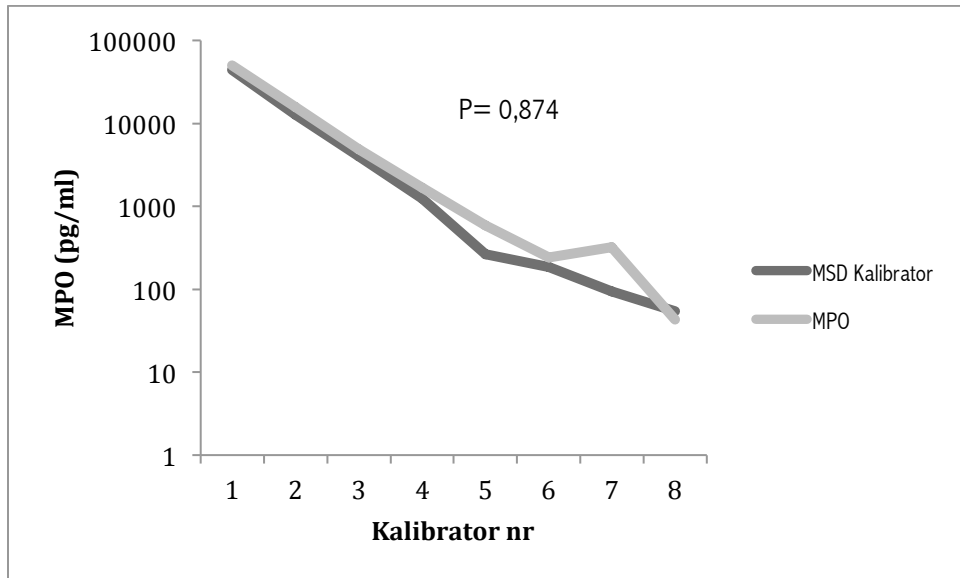
Figur4.4 Test av MPO signaldeteksjon, ved bruk av 2 µg/ml primærantistoff til platecoating og 1 µg/ml umerket- og sulfo-tag deteksjonsantistoffer.

Et tredje screeningforsøk undersøkte nærmere deteksjon av MPO ved bruk av en pasientprøve med kjent MPO-konsentrasjon. Dette for å finne ut om det ikke var noe galt med MPO brukt i metodeutviklingen (Figur 4.5).



Figur 4.5 Test av MPO-signal deteksjon i en lupusprøve (MPO: 160 ng/ml), fortynnet til 40 og 80 ng/ml MPO, mens platen coates med 2 µg/ml og tilsettes 1 µg/ml umerket- og sulfo-tag deteksjonsantistoff.

Et fjerde screeningforsøk ble gjort for å bekrefte at det ikke var noe galt med MPO brukt i metodeutviklingen. Dette ble gjort ved sammenlikning mellom MPO brukt i metodeutvikling og MSD MPO kalibrator som følger med det kommersielle settet. (Figur 4.6).



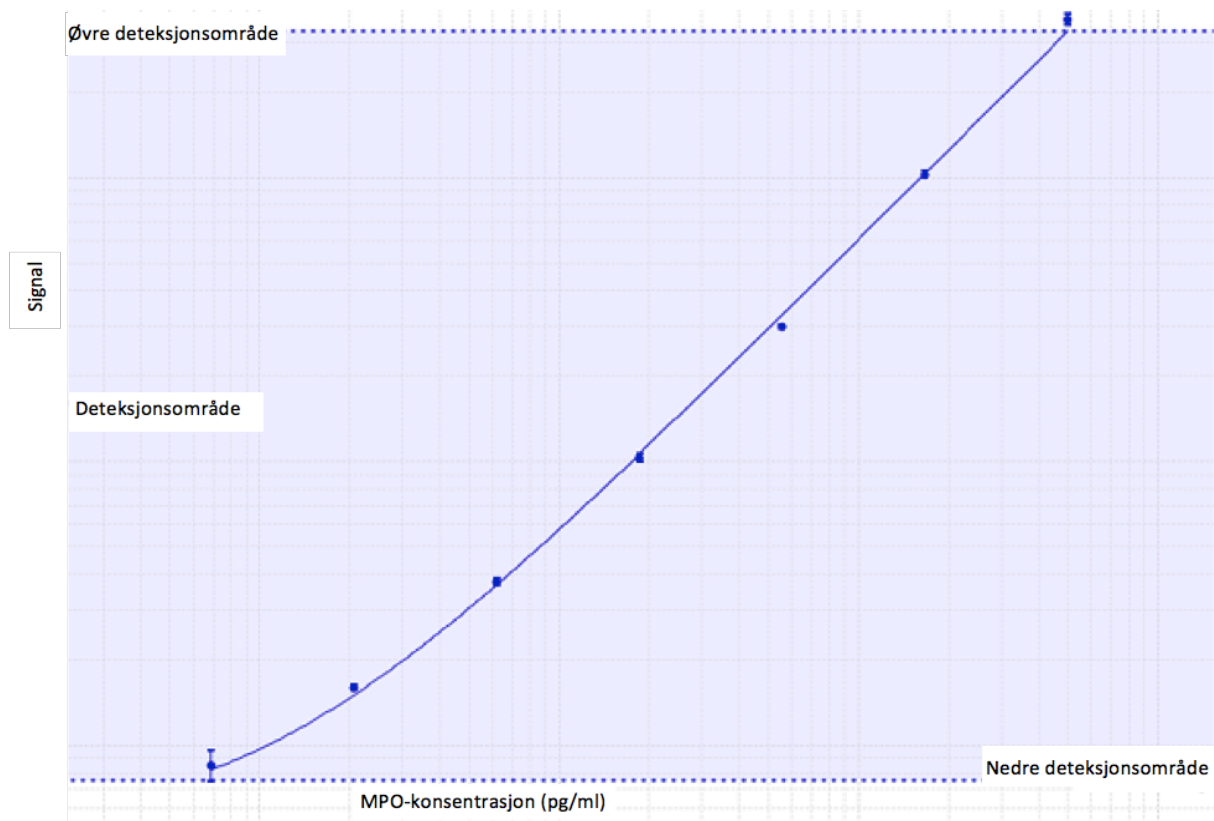
Figur 4.6 Sammenlikning av MPO brukt i screeningforsøk og MSD-calibrator analysert på MSD kommersielt-sett.

4.1.2 Validering av kommersielt MPO-Kit

Kalibreringskurven

Kalibreringskurven ble validert med hensyn til følgende parametere: Kurvetilpasning, usikkerhet i hvert målepunkt og residualer for hvert målepunkt.

Et eksempel på kalibreringskurve laget av MSD sector imager 2400 for hver analyserte plate er vist i Figur 4.7.



Figur 4.7. Eksempel på MPO kalibreringskurve for en tilfeldig plate.

Regresjonskoeffisientene for syv kalibreringskurver analysert i tidsrommet 21.11.2013 – 19.02.2014 er vist i Tabell 4.1.

Tabell 4.1 Regresjonskoeffisient for syv kalibreringskurver

| Dato | R ² |
|------------|----------------|
| 21.11.2013 | 0,998 |
| 03.12.2013 | 0,999 |
| 10.12.2013 | 0,998 |
| 13.12.2013 | 0,999 |
| 17.12.2013 | 1 |
| 15.12.2014 | 0,999 |
| 19.02.2014 | 1 |

Residualer for kalibreringskurvene er vist i tabellene 4.2 og 4.3, og gjennomsnittsavvik ble beregnet i absoluttverdier. Det vil si at det ikke ble tatt hensyn til negative fortegn der den målte konsentrasjonen er større enn den teoretiske.

Tabell 4.2 MPO Gjennomsnittsresidualer for syv plater (Kit Lot nr: K0050592)

| Kalibrator | Teoretisk konsentrasjon (pg/ml) | Gjennomsnitt (<i>n</i> = 7) SD (pg/ml) | Gjennomsnitt (<i>n</i> = 7) CV (%) |
|-------------------|--|---|---|
| Kal 1 | 50000 | 4903 | 10 |
| Kal 2 | 16667 | 480 | 3 |
| Kal 3 | 5556 | 325 | 6 |
| Kal 4 | 1852 | 78 | 4 |
| Kal 5 | 617 | 8 | 1 |
| Kal 6 | 206 | 25 | 12 |
| Kal 7 | 69 | 13 | 19 |

Tabell 4.3 MPO Gjennomsnittsresidualer for fire plater (Kit Lot nr: K0050626)

| Kalibrator | Teoretisk konsentrasjon (pg/ml) | Gjennomsnitt (<i>n</i>=4) SD (pg/ml) | Gjennomsnitt (<i>n</i>=4) CV % |
|-------------------|--|---|---------------------------------------|
| Kal 1 | 50000 | 352 | 1 |
| Kal 2 | 16667 | 909 | 5 |
| Kal 3 | 5556 | 352 | 6 |
| Kal 4 | 1852 | 42 | 2 |
| Kal 5 | 617 | 36 | 6 |
| Kal 6 | 206 | 16 | 8 |
| Kal 7 | 69 | 9 | 13 |

Innenfor og mellom platevariasjon

Variasjon innen og mellom plater ble undersøkt ved analyse av en HK (*n* = 6) på forskjellige områder (eller plasser) på platen. Usikkerhet i hvert målepunkt ble uttrykk ved hjelp av CV og SD (Tabell 4.4).

Tabell 4.4 Innenfor platevariasjon (*n*=7) for måleparalleller av HK analysert på fem plater for MPO (Lot nr: K0050592).

| | Plate 3 n=6 | Plate 5 n=6 | Plate 6 n=6 | Plate 7 n=6 | Plate 8 n=6 | Plate 9 n=6 | Plate 10 n=6 |
|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Gjennomsnitt (ng/ml) | 8,28 | 8,21 | 8,59 | 8,99 | 8,97 | 7,28 | 7,82 |
| SD (ng/ml) | 0,43 | 0,57 | 0,75 | 0,65 | 0,54 | 0,43 | 0,87 |
| CV% | 5 | 7 | 9 | 7 | 6 | 6 | 11 |

Mellomplate CV (n=7) Lot nr: K0050592

| | |
|---------------------|------|
| Gjennomsnitt(ng/ml) | 8,32 |
| SD (ng/ml) | 0,67 |
| CV (%) | 8 |

Mellomplate CV (n= 4) Lot nr: K0050626

| | |
|----------------------|------|
| Gjennomsnitt (ng/ml) | 5,31 |
| SD (ng/ml) | 0,26 |
| CV (%) | 4,9 |

Deteksjonsgrense

LOD og LOQ er henholdsvis 111 og 163 (Tabell 4.5). Dette vil si at kalibrator 7 må ha et signal høyere enn 111 for å kunne detekteres. For at en prøve skal kvantifiseres med god presisjon må den ha et signal signifikant høyere enn 163.

Tabell 4.5 Målt gjennomsnittlig signal for kalibrator 7 (69 pg/ml) og kalibrator 8 (0 pg/ml) og beregnet LOD og konsentrasjon av kalibrator 7 for syv plater.

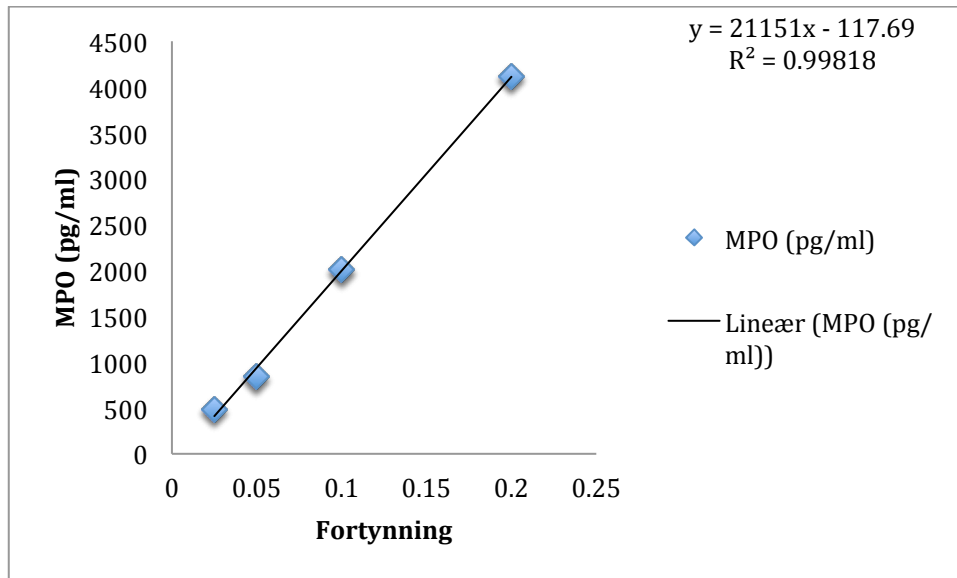
| Dato | Plate nummer | Gjennomsnittlig signal Kalibrator 7 | Gjennomsnittlig signal Kalibrator 8 | SD kalibrator 8 | LOD (pg/ml) beregnet av sector imager 2400 | Gjennomsnittlig konsentrasjon av kalibrator 7 (pg/ml) |
|--------------|--------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|--|---|
| 21.11.2013 | Plate 3 | 86 | 57 | 2,1 | 62.2 | 81 |
| 03.12.2013 | Plate 5 | 94 | 48 | 3,8 | 55.2 | 67 |
| 10.12.2013 | Plate 6 | 86 | 49 | 3,4 | 50.9 | 71 |
| 13.12.2013 | Plate 7 | 85 | 49 | 4,3 | 55.2 | 75 |
| 17.12.2013 | Plate 8 | 82 | 55 | 22 | 112 | 82 |
| 19.12.2013 | Plate 9 | 183 | 106 | 0 | 51.9 | 122 |
| 15.01.2014 | Plate 10 | 93 | 53 | 0 | 58 | 83 |
| Gjennomsnitt | 101 | 60 | | 55.6 | 64 | 83 |
| SD | | 36 | 21 | | 31 | 18 |

$$\text{LOD} = (\text{gjennomsnittlig signal av kal 8} + 2,5 \text{ SD}) = 60 + 2 * 21 = 111$$

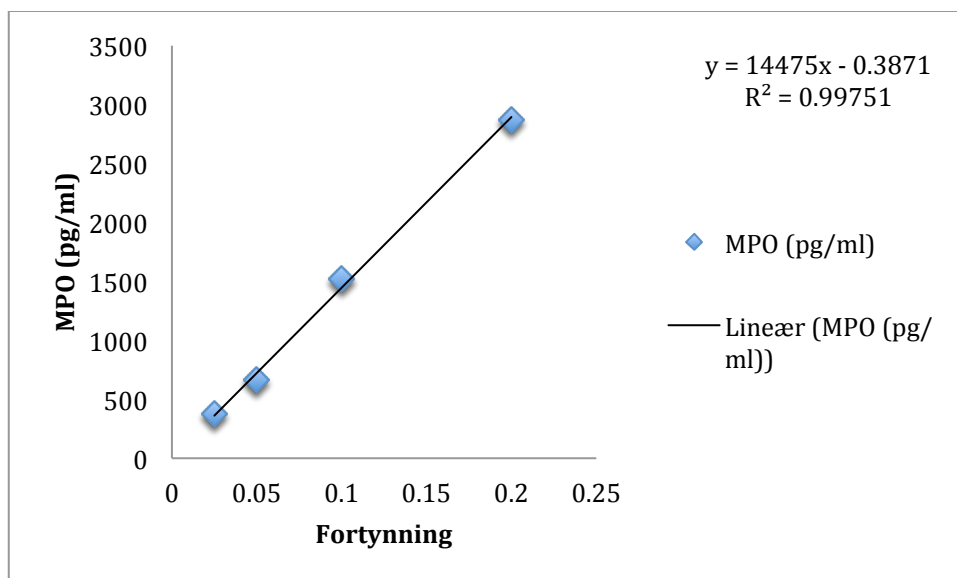
$$\text{LOQ} = (\text{gjennomsnittlig signal av kal 8} + 5 \text{ SD}) = 60 + 5 * 21 = 163$$

Linearitet

Linearitetstest ble utført for å undersøke om fortynning av prøven ville påvirke signalresponsen. Testen ble utført ved å lage fortynninger av hver av psoriasis pasientprøvene, PS-FTG 2 (MPO: 23 ng/ml) og PS-FTG 9 (MPO: 23 ng/ml), som beskrevet i materiale og metode (3.2.4-linearitet). Fortynningene av hver prøve ble analysert, og sammenheng med konsentrasjoner ble analysert ved brukt i regresjonsanalyse. (Figur 4.8 og 4.9).



Figur 4.8 Fortynning av PS-FTG 2 for å teste linearitet.



Figur 4.9 Fortynning av PS-FTG 9 for å teste linearitet.

Gjenfinning

Gjenfinningsforsøk ble utført for å teste om metoden ville klare å finne igjen konsentrasjonen av et eksogent MPO tilsatt i en plasmaprøve. Gjenfinningsforsøk hvor kontrollprøve P3 ble tilsatt 2500 pg/ml MPO er vist i tabell 4.6.

Tabell 4.6 Gjenfinningsforsøk

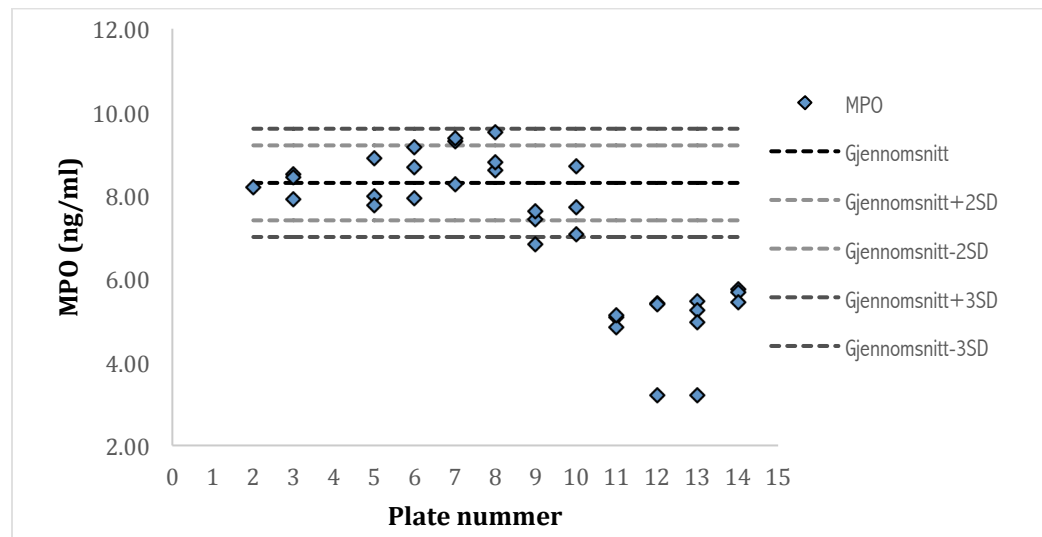
| | P3 <i>n</i>=5 | P3 + Sp <i>n</i>=5 |
|---------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Gjennomsnitt (pg/ml) | 5370 | 7407 |
| SD (pg/ml) | 200 | 419 |
| CV (%) | 4 | 6 |

Gjenfinning for metoden er 81 %

Faktor: 100 % /81 % = 1,2

Kontrollkort

Alle HK målepunkter ($n=35$) analysert for MPO ble plottet inn i kontrollkortet (Figur 4.10).



Figur 4.10 Kontrollkort for HK med målte konsentrasjoner av MPO på 14 plater.

4.2 Anvendelse av MPO-metode

Det ble målt MPO hos alle psoriasis-, nyrepasienter og deres kontroller. Hver pasient- og kontrollprøve ble analysert i to paralleller. Prøvene som fikk høy CV ble reanalysert.

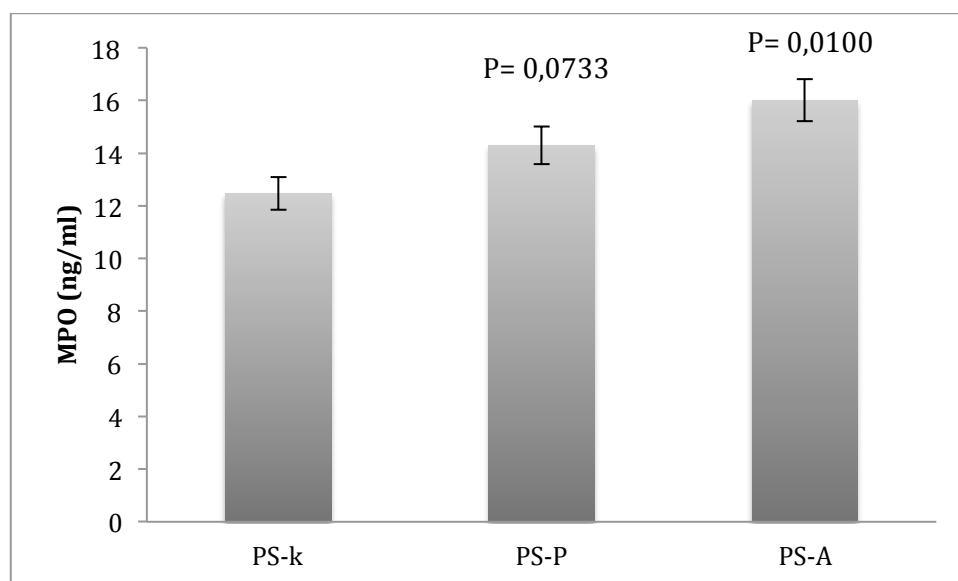
Gjennomsnittlig MPO-konsentrasjon, beregnet SD og CV hos alle kontroll- og pasientgrupper er illustrert i tabell 4.7.

Tabell 4.7 Gjennomsnittlig MPO hos alle pasientgrupper

| Pasient ID | Gjennomsnitt (ng/ml) | SD (ng/ml) | CV (%) |
|--------------|----------------------|------------|--------|
| PS-F (n=40) | 12.5 | 4.4 | 35 |
| PS-P (n=41) | 14.3 | 4.7 | 33 |
| PS-A (n=27) | 16.0 | 5.8 | 36 |
| REN-K (n=35) | 14.3 | 6.4 | 45 |
| REN-D (n=40) | 16.0 | 9.1 | 57 |
| RTX (n=43) | 18.1 | 9.5 | 53 |
| REN 3 (n=22) | 17.6 | 5.2 | 30 |
| REN 4 (n=18) | 17.9 | 8.2 | 46 |
| REN 5 (n=20) | 18.6 | 10.9 | 59 |

4.2.1 Sammenligning av MPO-konsentrasjon hos PS-P, PS-A og PS-K

Målt MPO-konsentrasjon hos psoriasispatientgrupper og friske kontroller uten psoriasis er vist i Figur 4.11. Tosidig t-test ble brukt for å teste om gjennomsnittene mellom hver pasientgruppe og frisk kontrollgruppe viste signifikante forskjeller fra hverandre.

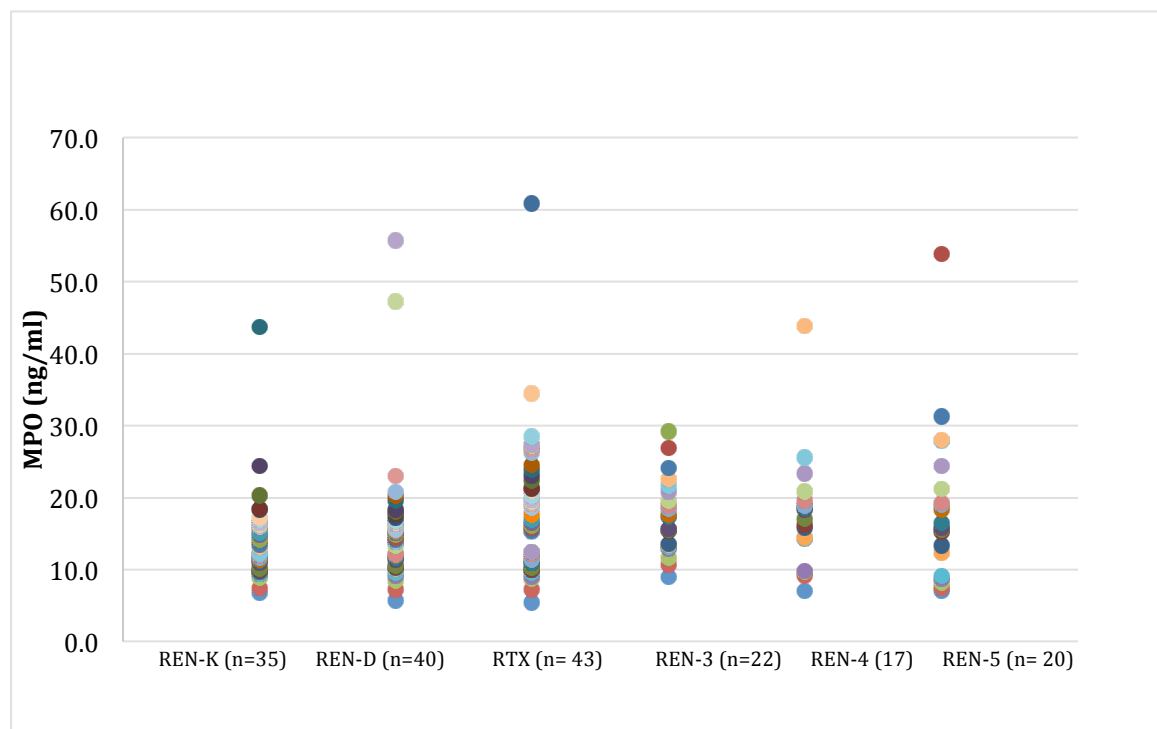


Figur 4.11 sammenligning av målte MPO-konsentrasjoner hos PS-K og PS-P og PS-A

MPO-verdier målt hos PS-P varierer mellom 6,20 ng/ml og 30,65 ng/ml, med gjennomsnittlig konsentrasjon på 14,3 ng/ml. PS-A har en gjennomsnittlig MPO-konsentrasjon på 16,02 ng/ml, med konsentrasjoner som varierer fra 5,47 ng/ml til 33,17 ng/ml.

4.2.2 MPO hos nyrepasienter

Målt konsentrasjon av MPO hos nyrepasienter og deres kontroller er vist i figur 4.12, sammenlikning mellom gruppene ved hjelp av tosidig t-test er illustrert i tabell 4.8.



Figur 4.12 MPO hos nyrepasientgrupper og friske kontroller .

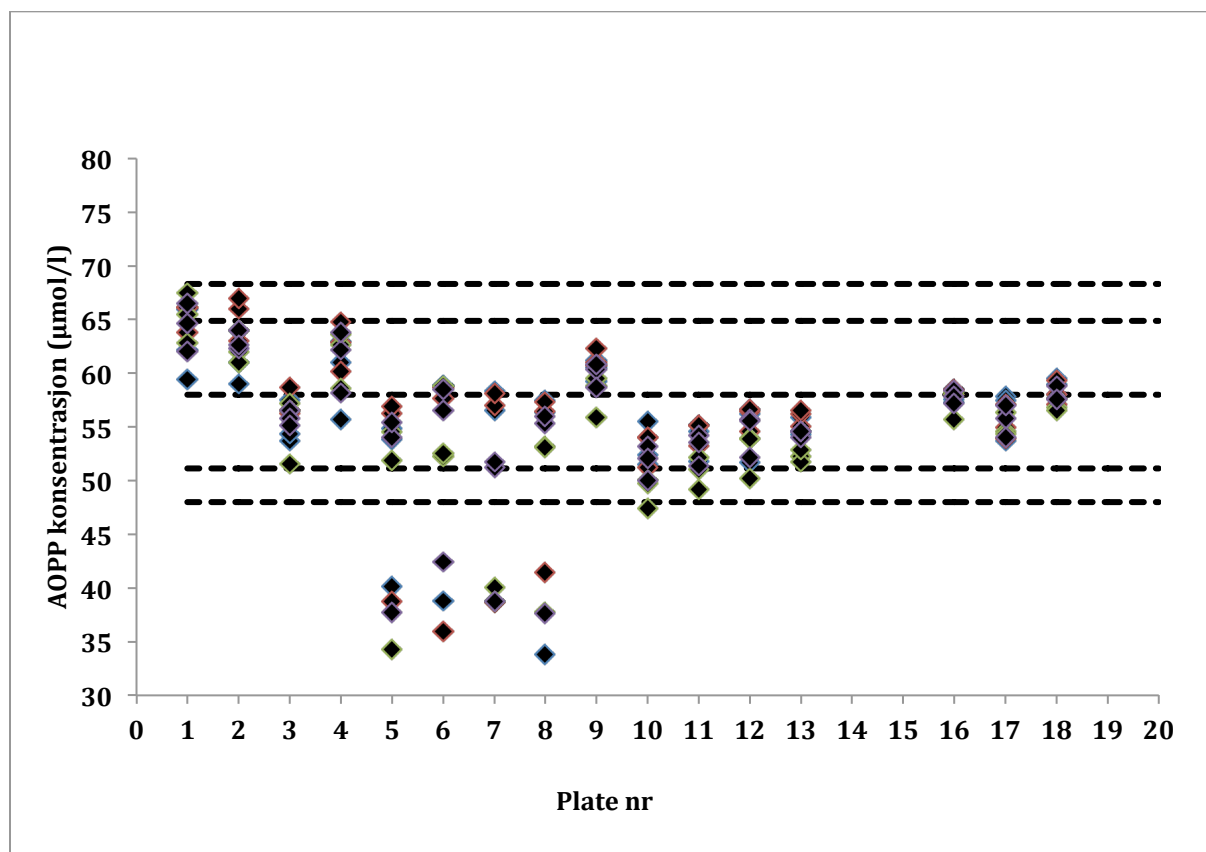
Tabell 4.8 P-verdier fra tosidig t-test mellom friske kontroller (REN-K) og nyrepasientgrupper

| | P-verdier | Forklaring |
|-----------------|------------------|------------------------------|
| REN-K vs. REN-D | 0,347 | Ikke signifikant forskjellig |
| REN-K vs. RTX | 0,048 | Signifikant forskjellig |
| REN-K vs. REN 3 | 0,036 | Signifikant forskjellig |
| REN-K vs. REN 4 | 0,118 | Ikke signifikant forskjellig |
| REN-K vs. REN 5 | 0,068 | Ikke signifikant forskjellig |

4.3 AOPP-metode

4.3.1 AOPP kvalitetskontroll

AOPP-konsentrasjoner målt hos HK ($n=54$) ble plottet i kontrollkort (Figur 4.13).



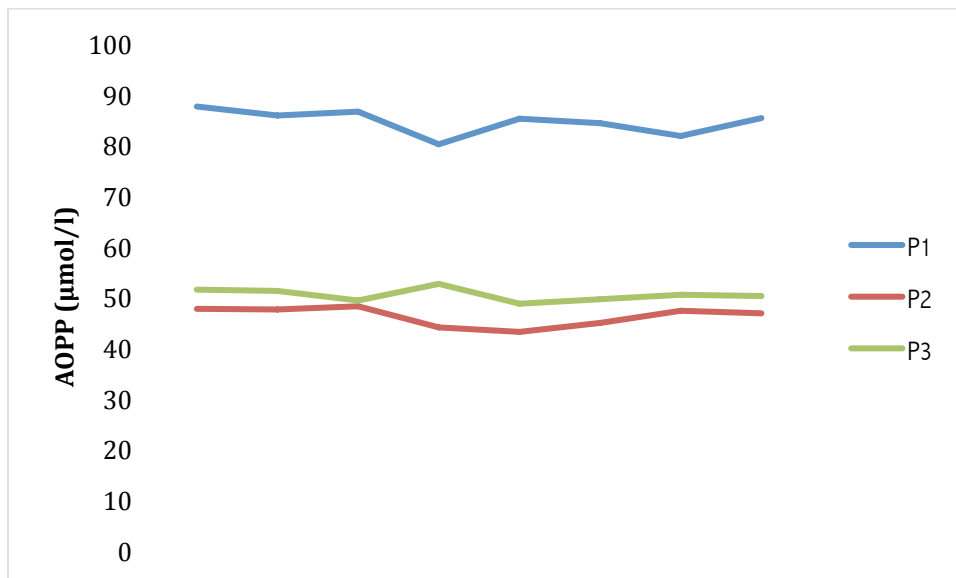
Figur 4.13 AOPP-kontrollkort med AOPP målepunkter av HK for alle plater.

4.3.2 AOPP-kontroll- og pipettetest

Plate 5-8 fikk mistenkelige lave AOPP-konsentrasjoner ved måling av HK prøveparalleller (Figur 4.13). For å finne ut årsaken til den systematisk feilen, ble det analysert kontrollprøver fra tre frivillige individer (P1,P2 og P3) som forklart i materiale og metoder (3.3.3). Plate-homogenitetstest er vist i tabell 4.9 og figur 4.14. pipettetestresultatene er vist i Tabell 4.10.

Tabell 4.9 AOPP plate-homogenitetstest ved bruk P1,P2 og P3 kontrollene.

| | P1 ($\mu\text{mol/l}$) | P2 ($\mu\text{mol/l}$) | P3 ($\mu\text{mol/l}$) |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 87,56 | 47,56 | 51,39 |
| | 85,77 | 47,43 | 51,20 |
| | 86,52 | 48,09 | 49,18 |
| | 80,07 | 43,99 | 52,55 |
| | 85,17 | 43,01 | 48,55 |
| | 84,25 | 44,87 | 49,50 |
| | 81,73 | 47,16 | 50,37 |
| | 85,26 | 46,67 | 50,18 |
| Gjennomsnitt ($\mu\text{mol/l}$) | 84,54 | 46,10 | 50,37 |
| SD ($\mu\text{mol/l}$) | 2,49 | 1,88 | 1,31 |
| CV% | 2,95 | 4,09 | 2,60 |



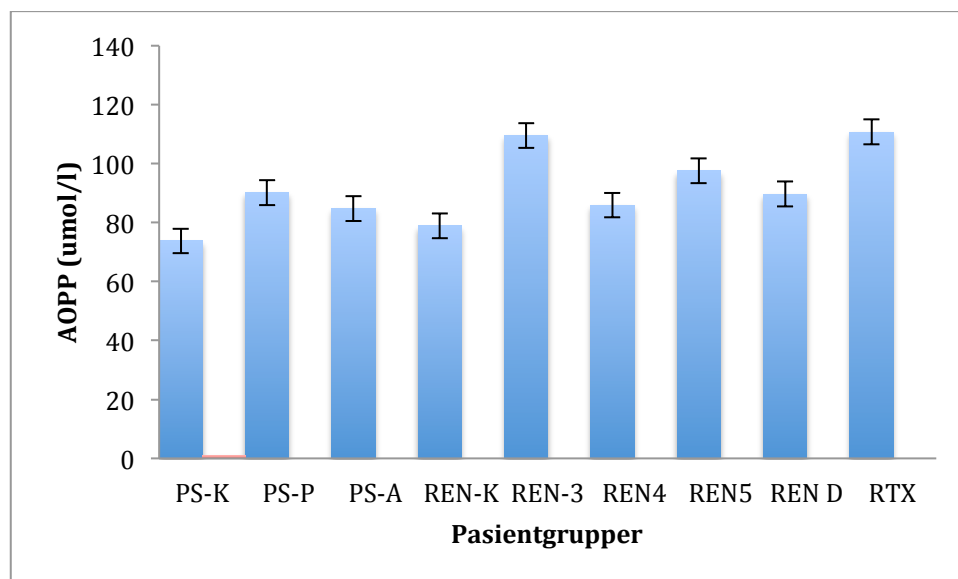
Figur 4.14 Kontrollprøver (P1,P2 og P3) analysert på tre forskjellige steder på platen for å teste om platen er homogen i alle brønner.

Tabell 4.10 Manuell Multipipette vs Automat Multipipette

| | Manuell Multipipette | Automat Multipipette |
|------------------------|----------------------|----------------------|
| Gjennomsnitt absorbens | 0,1192 | 0,1157 |
| SD | 0,0028 | 0,0058 |
| CV% | 2,4 | 5 |

4.3.3 AOPP målt hos pasient- og friskekontrollgrupper

Det ble målt AOPP hos alle pasientgrupper og begge friske kontrollgruppene (Figur 4.15). Innenfor hver gruppe ble det beregnet gjennomsnittlig AOPP-konsentrasjon, SD og CV (Tabell 4.11).



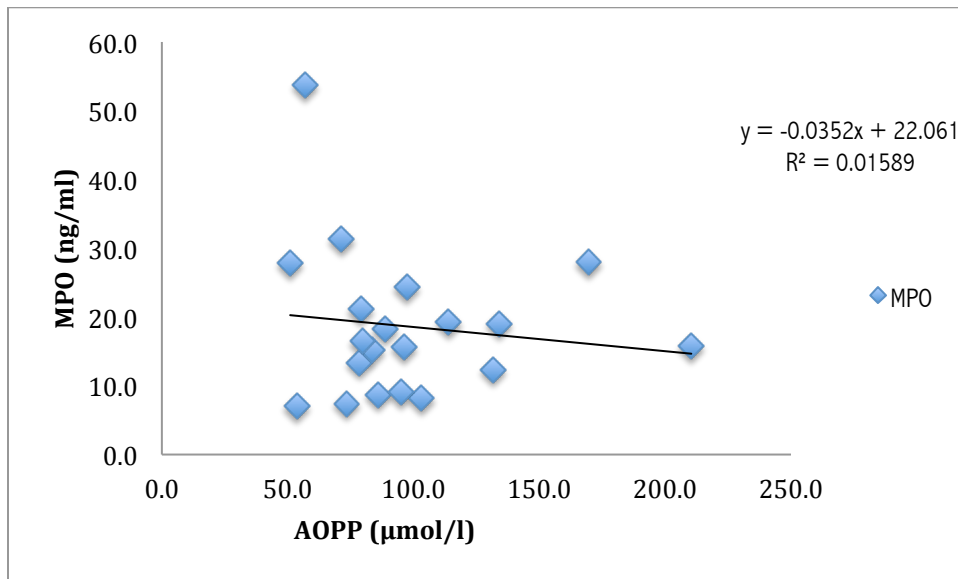
Figur 4.15 Målt AOPP hos både pasient- og kontrollgrupper. Hver søyle er middelerdi for hver gruppe.

Tabell 4.11 AOPP-konsentrasjoner for alle gruppene

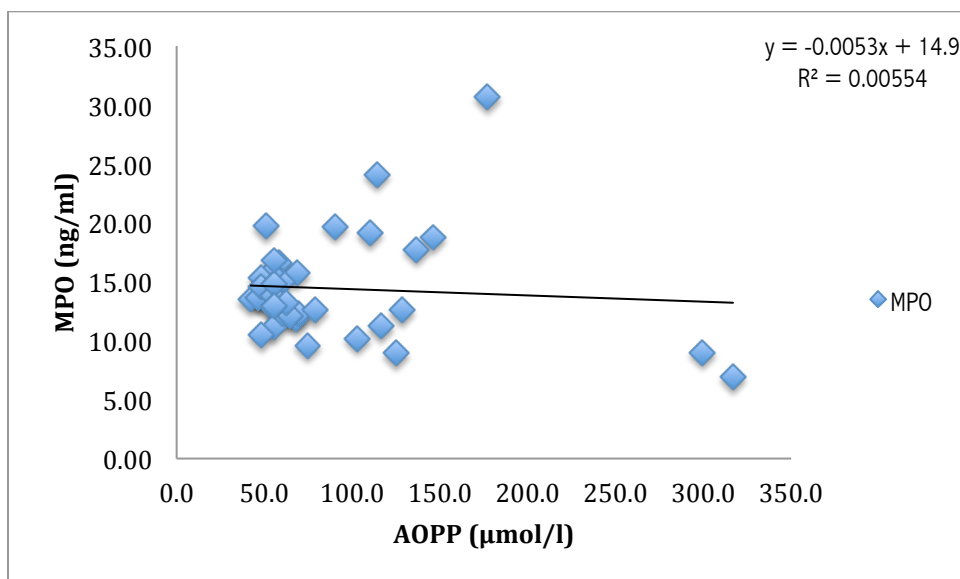
| Pasientgruppe | Gjennomsnitt (µmol/l) | SD (µmol/l) | CV % |
|---------------|-----------------------|-------------|------|
| PS-K (n=40) | 74 | 65,0 | 88 |
| PS-P (n=36) | 90 | 63,3 | 70 |
| PS-A (n=27) | 85 | 73,9 | 87 |
| REN-K (n=35) | 79 | 55,4 | 70 |
| REN-3 (n=21) | 110 | 64,1 | 58 |
| REN-4 (n=18) | 86 | 35,0 | 41 |
| REN-5 (n=20) | 98 | 39,2 | 40 |
| REN-D (n=40) | 90 | 61,3 | 68 |
| RTX (n=43) | 111 | 76,4 | 69 |

4.3.4 Sammenheng mellom MPO og AOPP

For å undersøke om det er sammenheng mellom MPO- og AOPP-konsentrasjonene ble det målt både AOPP og MPO hos pasientgrupper REN-5 og PS-P. Resultatene ble sammenliknet i x-y koordinatsystem (Figur 4.16 og 4.17).



Figur 4.16 Sammenheng mellom MPO- og AOPP-konsentrasjoner hos REN-5-pasientgruppe.



Figur 4.17 Sammenheng mellom MPO- og AOPP-konsentrasjoner hos PS-P-pasientgruppe.

5 Diskusjon

Hensikten med denne oppgaven var å forsøke å utvikle og validere en immunologisk metode for å måle MPO i plasma ved bruk av MSD. Denne metoden ble anvendt på grupper av friske kontroller, psoriasispatienter og nyrepasienter. Deretter ble MPO- og AOPP-metodene anvendt på de samme gruppene for å teste om det var sammenheng i konsentrasjon mellom disse metodene.

5.1 Metodeutvikling

Målet med denne delen av oppgaven var å utvikle en immunologisk metode, basert på MSD sitt måleprinsipp, for å kunne måle MPO i plasma. Utviklingssett fra MSD [43] ble brukt til metodeutviklingen. Målet var å ende opp med en like god metode som den kommersielle MSD-metoden med tanke på sensitivitet, spesifisitet og reproduserbarhet, men den skulle også være mindre kostbar.

Det ble utført tre screeningsforsøk hvor kombinasjoner av primærantistoff, umerket deteksjonsantistoff, sulfo-tag deteksjonsantistoff og MPO ble testet. Hensikten med forsøkene var å finne egnede konsentrasjoner som skulle brukes til plateoptimalisering.

Første screeningforsøk tester effekt av primærantistoff til platecoating, umerket- og sulfo-tag deteksjonsantistoff og signal deteksjon av MPO. Resultatene viser at signal påvirkes av primær- og deteksjonsantistoffene (umerket og sulfo-tag) Figur 4.2. Dette betyr at platecoatingen sannsynligvis er vellykket. Signalet virker å være uavhengig av MPO-konsentrasjon. Bakgrunnsignalet ser derimot ut til å være avhengig av deteksjonsantistoffene (Figur 4.3). Grunnen til at MPO ikke ble detektert var ukjent, men det ble antatt at test av for mange parametere kunne være årsaken. Produsenten har foreslått at bruk av 2x avlesningsbuffer istedenfor 1x kan redusere bakgrunnsstøy, og dermed øke sensitiviteten [43]. Dette ble undersøkt i neste forsøk (data ikke vist), samtidig som antall testparametere ble redusert.

Andre screeningforsøk ble utført ved å holde konsentrasjonene av alle de andre parameterne konstante og kun bruke MPO-konsentrasjoner som variabel, dette for å se tydelig om signalet endrer seg i forhold til MPO-konsentrasjon. Grafen viser vertikale linjer for hver MPO-konsentrasjon (Figur 4.4). Man kan tydelig se at økning i signal er uavhengig av MPO-

konsentrasjon, men mest sannsynlig avhengig av uspesifikk bakgrunn. Det ble derfor ønskelig å finne ut hvorfor MPO ikke ble detektert. To mulige grunner kunne føre til mangel på MPO signaldeteksjon. Enten var den testede MPO ikke god nok eller så var det inkompatibilitet mellom MPO-(antigen) og primærantistoff, eller umerket deteksjonsantistoff.

En pasientprøve med kjent MPO konsentrasjon (160 ng/ml) ble analysert for å se om man skulle få detektert MPO. Dersom MPO skulle bli detektert i den prøven, ville det bety at MPO brukt i metodevalidering ikke var god nok. Prøven ble fortynnet til 80 ng/ml og 40 ng/ml MPO og analysert sammen med blank på platen. Resultater viser fortsatt at signalet ikke er avhengig av MPO-konsentrasjon, men uttrykker bakgrunnssignal. Man kan se på figuren at signalet er høyere ved analyse av blank sammenliknet med prøvfortynningene (Figur 4.5). For å være helt sikker på at MPO brukt i metodeutvikling var god nok ble det fortynnet i samme konsentrasjonsområdet som MSD-kalibrator og analysert på en plate fra MSD kommersielt sett. MPO og MSD-kalibrator ga identiske resultater (Figur 4.6). Utført t-test gir en p-verdi ($P=0,874$), noe som viser at disse ikke var signifikant forskjellige med 95 % sikkerhet. Dette betyr at MPO som ble brukt til metodeutvikling var god nok. Mangel på signal deteksjon er sannsynligvis forårsaket av inkompatibilitet mellom MPO og tilsvarende antistoffer. Det som kan gjøres videre er å teste flere typer primære- og umerkede deteksjonsantistoffer. Til metodeutvikling, utga produsenten tre sulfo-tag deteksjonsantistoffer: Sulfo-tag streptavidin-, anti-mus-, og anti-kanin deteksjonsantistoff. Ingen av disse er spesifikke til MPO, og derfor var det ønskelig å finne umerket MPO deteksjonsantistoff i tillegg til MPO primærantistoff. Det umerkede deteksjonsantistoffet må være spesifikk til MPO-(antigen), men også må det kunne binde seg til et av de tre nevnte sulfo-tag deteksjonsantistoffene. I tillegg skal primærantistoff og det umerkede deteksjonsantistoffet komme fra forskjellige dyrearter. Eneste monoklonal antistoff som ble funnet til platecoating var fra mus. Monoklonale antistoffer foretrekkes til platecoating på grunn av at de gir mer spesifikke bindinger. Ut ifra de tilgjengelige sulfo-tag deteksjonsantistoffene, var eneste alternativ til umerket deteksjonsantistoff kanin antistoff, når man coater platen med mus antistoff.

5.1.1 Kalibreringskurve

Kalibreringskurvene ble vurdert med hensyn til tre parameter; regresjonskoeffisient, residualer for hvert målepunkt i prosent og CV for tre paralleller av samme kalibratorløsning. Regresjonskoeffisienter for syv plater har $R^2 \geq 0,995$ (Tabell 4.1). Dette forteller at kurvetilpasningen er god nok. Residualer for de fleste kalibratorene har prosentavvik $\leq 15 \%$, men residualer for kalibrator 7 har prosentavvik $\geq 15 \%$ (Tabell 4.2). Dette forteller at usikkerheten i analysemetoden ligger i det laveste målområdet (69 pg/ml). CV for tre paralleller av hver kalibratorløsning 1-6 er $\leq 15 \%$, bortsett fra to plater som fikk en CV $\geq 15 \%$ for kalibrator 6 (Vedlegg D). Dette kunne skyldes tilfeldige feil under analyse. Kalibrator 7 fikk en CV $\geq 15 \%$ for alle plater.

5.1.2 Kontrollkort

Kontrollkort ble laget som forklart i materiale og metode del (3.2.4), deretter brukt til overvåkning av metoden. Kontrollkort er nødvendig fordi det forteller om metoden er under kontroll. Kontrollkortet kan også brukes for å identifisere eventuelle endringer i analyseprosess, det vil si det vil fortelle om metoden forbedrer seg eller blir dårligere med tid. Etter analyse ble alle HK MPO målepunkter plottet i kontrollkortet (Figur 4.10). Kortet viser at de fleste målepunkter på plate 3-10 ligger mellom ± 2 SD. Analysene utført på disse platene ble godkjent, selv om noen av punktene viser en spredning mellom ± 2 og ± 3 SD, noe som sannsynligvis kunne være forårsaket av tilfeldige feil. Analyse av plate 11-14 med nytt lotnummer, viser en systematisk feil. Dette vises på kontrollkort ved at HK-målepunkter på disse platene ga lavere konsentrasjoner sammenliknet med målepunktene fra tidligere plater. Alle HK målepunktene havnet langt under $-3SD$. Dette forteller at mest sannsynligvis fikk pasientprøvene analysert på disse platene, lavere MPO-konsentrasjoner enn de egentlige konsentrasjonene i plasma. For å kunne sammenlikne prøver analysert på plater med ulike lotnummer ble alle pasientprøver analysert på platene med nytt lotnummer ganget med en faktor på 1,6. Denne faktoren ble funnet ved å dele gjennomsnittlig MPO-konsentrasjon av HK målt på de platene med gammelt lotnummer med gjennomsnittlig MPO-konsentrasjon av HK målt på platene med nytt lotnummer.

5.1.3 Innen- og mellom platevariasjon

Det ble beregnet CV for de seks HK paralleller målt for MPO på hver plate (Tabell 4.4). Innenfor samme platen var $CV \leq 15\%$ for alle platene. Dette viser at om man analyserer samme prøve flere ganger på forskjellige steder på samme plate av samme sett, er variasjonen mellom målte konsentrasjoner liten. Dette er en indikasjon på at repeterbarheten er god nok. Variasjon mellom plater ble undersøkt ved å sammenlikne CV for de seks HK måleparalleller analysert på de syv platene vist i Tabell 4.4 og CV av HK-parallellene analysert på de fire platene med nytt lotnummer er vist i vedlegg F. CV verdiene var henholdsvis 8,1 % og 4,9 %. Gjennomsnittsverdi av disse to CV-ene er 6,5 %, som ble bestemt som metodens mellomplatevariasjon.

5.1.4 Deteksjonsgrense

LOD er et mål for sensitivitet. Sensitivitet er testens evne til å påvise om en analytt er til stedet i en prøve [37]. I alle ELISA-tester er det nødvendig å bestemme LOD og LOQ for hver plate, fordi disse kan fortelle om to plater analysert ved hjelp av samme metode er sammenliknbare. LOD og LOQ også kan fortelle om analysemetoden er stabil over en lengre periode. LOD er avhengig av signal-variasjon av blank fra dag til dag og varierer i forhold til det. Dette vil si at platen som får høyere SD (signal) også får høyere LOD. I dette studiet ble LOD beregnet etter formelen hentet fra MSD brukermanual [44]. Resultatene viser at SD er forholdsvis lik for alle plater bortsett fra plate 8, som fikk høyere SD (22) sammenliknet med de andre platene (Tabell 4.5). For at en prøve skal detekteres må den ha en konsentrasjon som tilsvarer signal høyere enn 111 (5.1.2 -deteksjonsgrense). LOD for metoden ble beregnet av MSD sector imager 2400 for hver plate. Gjennomsnittlig LOD for alle platene ble 83 ± 31 pg/ml (Tabell 4.5). Beregnet gjennomsnittlig konsentrasjon til den laveste kalibrator (83 pg/ml) var ikke signifikant høyere enn gjennomsnittlig LOD (64 pg/ml) for syv plater, $p=0,096$ (Tabell 4.5).

Produsenten har oppgitt deteksjonsgrense på 33 pg/ml, noe som er en betydelig lavere konsentrasjon enn både konsentrasjon av den laveste kalibrator og de den beregnede LOD i dette studiet. Konsentrasjonen til kalibrator 7 fikk den høyeste CV for alle plater. Dette betyr at usikkerheten i beregning av konsentrasjon i ukjente prøver ligger i det lave målområdet (Figur 4.7). Derfor vil en deteksjonsgrense oppgitt av produsenten øke usikkerhet ved

analyse av prøver med lav MPO-konsentrasjon. Deteksjonsgrense for denne metoden bestemmes til å være 69 pg/ml.

Produsenten beregner LOQ som gjennomsnittlig signal av blank pluss $5 \cdot SD$. Etter samtale med produsenten ble det informert at LOQ for MPO-analysemetoden ikke ble beregnet på grunn av at de påstår testen krever for mange plater, og at den må utføres over en lengre periode. Derfor foreslo produsenten at LOQ i dette studiet ikke kan beregnes med god presisjon, men estimeres.

5.1.5 Linearitet

Det ble utført en linearitetstest for å se om prøvene fortynnes vil påvirke signal respons. Fortynning av prøver kan være nødvendig ved analyse av pasientprøver som har konsentrasjoner høyere enn den høyeste kalibratoren. Disse prøvene må fortynnes slik at maskinen kan klare å beregne deres konsentrasjoner. Derfor er det viktig å vite om man fortsatt kan stole på resultatene når man fortynner disse prøvene. Linearitetstest utført i dette studiet viser lineær sammenheng mellom målte MPO-konsentrasjoner og fortynningene ($R^2 > 0,995$). Dette betyr at fortynning av prøver ikke har betydning for analyserespons (Figur 4.8 og 4.9).

5.1.6 Gjenfinning

Gjenfinning er også et mål for nøyaktighet. Gjenfinningsforsøk kan også fortelle om metoden er påvirket av forskjell mellom MPO i kalibratorløsningene og den naturlige MPO i plasmaprøver. Gjenfinningsforsøk i dette studiet ble utført ved å tilsette MSD MPO kalibrator (25000 pg/ml) i plasmaprøve fra en frisk person (P3). Mengde MPO som ble funnet igjen var 81 %. Dette betyr at for hver prøve som analyseres er målt konsentrasjon 81 % av den sanne konsentrasjonen. Derfor ble alle prøvene korrigert for gjenfinning ved å gange med 1,2 (4.2.1-gjenfinning). Det kan ikke konkluderes med at nøyaktigheten i metoden er god nok kun basert på gjenfinningsforsøkene, fordi man ikke kan vite med sikkerhet om eksogent MPO oppfører seg på samme måte som endogent MPO i plasmaprøvene. Metoden baseres på affinitet mellom antistoff mot MPO og MPO-(antigen), Dersom endogent MPO ikke har samme egenskaper som den endogene MPO i plasma kan gjenfunnet MPO være lavere enn det som

ble beregnet. Derfor, ved å multiplisere pasientprøver med gjenfinningsfaktor (1,2), vil resultere i høyere MPO-konsentrasjoner enn de faktiske konsentrasjonene i plasma.

5.2 Anvendelse av metoden

5.2.1 MPO hos PS-K og REN-K

PS-K og REN-K har henholdsvis gjennomsnittlig MPO-konsentrasjon 12,47 og 14,3 ng/ml (Tabell 4.7). Verdiene varierer fra 6,38–28,61 ng/ml og 6,80 – 43,70 ng/ml. MPO analysert i EDTA-plasma tidligere hos friske personer har høyere konsentrasjonsverdier enn det som ble målt i dette studiet [5, 13]. Grunnen til denne variasjonen kan være at MPO ble målt ved hjelp av ELISA-metoder i disse studiene. Sammenliknet med MSD, som har brukt samme metode, er MPO-konsentrasjon hos friske personer lavere i dette studiet. Årsaken til dette er ukjent. Immunologiske metoder baseres på bindingsaffinitet mellom antigen og antistoff.

Konsentrasjon av MPO vil dermed avhenge av hvor mye MPO-antigen det er i plasma og som binder seg spesifikt til tilsvarende antistoff. Med dette kan det antas at pasientgruppen som ble brukt av MSD kan ha hatt høyere MPO i sine plasmaprøver. Det er observert stor spredning mellom den laveste og den høyeste MPO-verdien både hos PS-K og REN-K, uttrykt ved høy CV (Tabell 4.7). Aktiverte immunceller kan bidra til økning av MPO-konsentrasjon i plasma. Selv om en gruppe antas å være frisk, kan enkelte individer ha en eller annen form for betennelsesreaksjon i kroppen som kan forårsake økning i MPO.

5.2.2 Psoriasis

En del studier har rapportert økning i ROS produksjon fra aktiverte nøytrofiler granulocytter hos psoriasispasienter [20, 45]. Derfor er det forventet lavere MPO-konsentrasjon hos PS-K sammenliknet med PS-A og PS-P.

MPO-konsentrasjon hos PS-K ($12,5 \pm 4,4$ ng/ml, $n=40$) er signifikant lavere sammenliknet med PS-A ($16,0 \pm 5,8$ ng/ml, $n= 27$, $p= 0,0100$), men ikke signifikant lavere når den blir sammenliknet med PS-P ($134,3 \pm 4,7$ ng/ml, $n= 41$, $p= 0,0733$) (Figur 4,13).

Grunnen til manglende signifikant forskjell i MPO-konsentrasjon mellom PS-K og PS-P er ikke kjent. Sami A.Gabr og Ahmad H har rapportert at graden av psoriasissykdom er avhengig av sykdomsvarighet og affiserte områder [45]. Det kan hende at sykdomsaktivitet hos pasienter var generelt lav ved prøvetaking. Informasjon om sykdomsaktivitet eller

sykdomsvarighet hos psoriasispatienter er ikke gitt i dette studiet. Det har ikke blitt målt MPO hos psoriasispatienter før, men sammenliknet med MPO målt i EDTA-plasma tidligere hos pasienter med kroniske inflammasjonssykdommer, er MPO-konsentrasjoner både hos friske kontroller og pasientgrupper lavere i dette studiet [5]. Grunnen er ikke kjent, men skyldes mest sannsynlig bruk av en annen type metode som bruker forskjellige antistoffer som har annerledes bindingsegenskaper.

5.2.3 Nyresvikt

MPO verdier hos REN-K sprer seg jevnt fra 6,8 til 43,7 ng/ml med gjennomsnittlig MPO-konsentrasjon 14,3 ng/ml. Dette stemmer med målt MPO hos friske personer av Capeillere-Blandin. C et.al. [10]. REN-K ble testet mot hver gruppe av nyrepasienter ved hjelp av tosidig t-test med 95% signifikansnivå. Testen viste at REN-K var signifikant lavere sammenliknet REN-3 ($n=22$, 17,6 ng/ml, $p=0,036$), men ikke signifikant lavere når sammenliknet med REN 4 ($n=18$, 17,9 ng/ml, $p=0,118$) og REN 5 ($n=20$, 18,6 ng/ml, $p=0,068$) (Tabell 4.8). Dette stemmer ikke med resultatene rapportert av Capeillere-Blandin som har rapportert høyere gjennomsnittlig plasma MPO-konsentrasjon hos dialysepatienter sammenliknet med friske kontroller og pre-dialysepatienter [10]. Madhusudhana Rao et al. [46] har i motsetning rapportert at MPO reduseres med høyere grad av nyresvikt, som resultat av uremisk toksin, CNO^- som hemmer effekten av MPO. Dette kan sannsynligvis forklare grunnen at MPO-konsentrasjon hos REN-3 er signifikant høyere sammenliknet med friske kontroller, men ikke REN-4 og REN-5. Dette er bare en spekulasjon og ikke en bekreftelse. Derfor bør effekten av CNO^- på MPO undersøkes nærmere.

5.3 AOPP kontrollkort

Etter etablering av kontrollkort ble alle AOPP-konsentrasjoner målt hos HK plottet inn i et kontrollkort (Figur 4.13). Kortet viser at plate nummer 1 og 2 har enkelte verdier som ligger mellom 2 SD og 3 SD. Dette kunne skyldes dårlig teknikk eller sannsynligvis tilfeldige feil under analyse. Fra plate 5-7 kan man tydelig se at noen målepunkter har lavere konsentrasjoner i forhold til andre analysert på samme plate. Disse punktene var de siste parallellene for hver HK-prøve analysert på de nevnte platene. Årsaken til den systematiske feilen er ukjent, men kunne være forårsaket av pipetteringsfeil som medførte at pipettene sølte litt ekstra væske i brønnene, som igjen fører til fortynningsfeil. En annen grunn til avvik kan være at platene mest sannsynlig var lite homogene i alle brønnene. Derfor ble det ønskelig å utføre en pipette- og platehomogenitetstest som forklart under materiale og metode (3.3.3). Hverken automat- eller/og manuellpipette viste stor variasjon i prosent ved bruk (Tabell 4.9). Plasma fra tre forskjellige friske individer (P1, P2, og P3) ble analysert for AOPP på forskjellige steder på platen for å se om reaksjonstiden i brønnene påvirket absorpsjonen. Resultatene viser liten variasjon mellom parallellene for hvert av de friske individene (Tabell 4.9 og Figur 4.14). Dette betyr at det hverken var feil med pipetter eller homogenitet på platen. AOPP-test krever store mengder plasma. På grunn av begrenset prøvemateriale, kunne den systematiske feilen derfor være forårsaket av liten mengde plasma pipettert til de siste parallellene, noe som ville gi lavere konsentrasjon grunnet fortynningsfeil. Det ble derfor bestemt å pipettere plasma prøver ved hjelp av enkelpipette istedenfor multipipette, og man kan se på kontrollkortet at den systematiske feilen ble eliminert.

5.4 AOPP-konsentrasjon hos pasient- og kontrollgrupper

AOPP-konsentrasjon hos PS-K og REN-K varierer fra 28-382 $\mu\text{mol/l}$ og 28-299 $\mu\text{mol/l}$ henholdsvis med middelveier 74 $\mu\text{mol/l}$ og 79 $\mu\text{mol/l}$. Variasjonen mellom den laveste og den høyeste AOPP-konsentrasjon for begge gruppene er stor. Det er rapportert at pre-analytiske faktorer som hemolyse, og prøvetaking hos ikke-fastende kan bidra til det store avviket i plasma AOPP hos friske kontroller [11]. Dette kan forklare avvik observert hos REN-K, siden disse ble tatt ikke-fastende, men ikke hos PS-K som ble tatt fastende. Gjennomsnittlig AOPP-konsentrasjon hos fastende kontrollgruppe, PS-K, var ikke signifikant lavere sammenlignet med ikke-fastende friske kontrollgruppe REN-K ($p=0,714$). Dette stemmer ikke med studiet utført av Hanasand. M et. al. [11] som sier at inntak av mat før

prøvetaking kan gi høyere AOPP-konsentrasjon i plasma. Beregnet CV for alle pasientgrupper indikerer stor spredning i konsentrasjon mellom lave og høye målepunkter innenfor samme gruppe (Tabell 4.11). Årsaken til denne store variasjonen kan være forårsaket av forskjell i sykdomsaktivitet eller grad av oksidativt stress hos hver enkelt pasient. Informasjon om sykdomsaktivitet eller graden av oksidativt stress hos pasientgrupper er ikke gitt. Sammenlikning av hver kontroll- mot sin pasientgruppe viser at AOPP-konsentrasjon hos PS-K ikke er signifikant lavere i forhold til PS-P (90 $\mu\text{mol/l}$, $p=0,269$) og PS-A (85 $\mu\text{mol/l}$, $p=0,522$). AOPP gjennomsnittlig konsentrasjon hos REN-K er kun signifikant lavere sammenliknet med RTX (111 $\mu\text{mol/l}$, $p=0,037$), men ikke signifikant lavere enn REN- 3, -4, -5 og -D (110 $\mu\text{mol/l}$, 86 $\mu\text{mol/l}$, 98 $\mu\text{mol/l}$ og 90 $\mu\text{mol/l}$, $p \geq 0,05$). AOPP har blitt rapportert som oksidativt stress markør [47]. Derfor var det forventet å få økning i AOPP hos pasientgrupper i forhold til friske kontroller, fordi både psoriasis og nyresvikt assosieres med økt ROS produksjon [45, 47], noe som ikke er tilfelle i dette studiet. Grunnen kan være lavere sykdomsaktivitet hos pasientgrupper, som gir lavere ROS produksjon eller høy gjennomsnittlig AOPP-konsentrasjon hos friske kontroller. Både i PS-K og REN-K gruppene fikk enkelte personer høy AOPP-konsentrasjon, dette kunne være forårsaket av at disse personene hadde aktiverte immunceller ved prøvetaking, som følge av en eller annen form av betennelsesreaksjon i kroppen, noe som ville bidra til økning i ROS produksjon og dermed økning i gjennomsnittlig AOPP-konsentrasjon.

5.5 Sammenheng mellom MPO- og AOPP-konsentrasjoner

AOPP er produkter av proteinoksidering delvis forårsaket av økt MPO-aktivitet i aktiverte nøytrofile granulocytter [9]. Flere studier har rapportert økt AOPP hos dialysepasienter sannsynligvis dannet via MPO produsert i aktiverte nøytrofile granulocytter [10, 47, 48]. Derfor var det interessant å teste eventuell sammenheng mellom MPO- og AOPP-analysemetode i dette studiet. Dette ble utført ved hjelp av regresjonsanalyse hvor MPO- og AOPP-konsentrasjoner av REN-5 og PS-P ble plottet i et x-y koordinatsystem. Regresjonskoeffisientene ble henholdsvis $R^2 = 0,0159$, $R^2 = 0,0055$, noe som betyr at det ikke er sammenheng mellom disse to metodene. Capeillere-Blandin. C et al. [10] påstår at økning i oksidanter som bidrar til dannelse av AOPP hos pre-dialysepasienter sannsynligvis kommer

fra uraemiske toksiner, på grunn av observert økning i disse oksidantene selv i fravær av MPO. Samme studiet foreslår at økt MPO i plasma hos dialysepasienter sannsynligvis utskilles i blodstrømmen av aktiverte nøytrofiler som resultat av dialysebehandling[10]. Ut ifra dette kan man si at økning i AOPP-konsentrasjon ikke er avhengig av MPO, noe som vil forklare mangelen på korrelasjon mellom disse to markørene i dette studiet. Det ble også rapportert at det ofte er svak korrelasjon mellom markører for oksidativt stress [9].

6. Konklusjon

Utviklingen av MSD-metode viser sannsynlig inkompatibilitet mellom MPO og primær- eller umerket deteksjonsantistoff. Metoden bør utvikles videre hvor en tester flere primære og umerkede deteksjonsantistoffer.

Validering av MSD metode for å måle MPO i plasma ga følgende resultater:

- Bra kurvetilpasning $R^2 \geq 0,995$, residualer ≤ 15 %.
- CV: 6,5 %
- Deteksjonsgrense: 69 pg/ml
- Linearitet: $R^2 \geq 0,995$
- Gjenfinning: 81 %

MSD MPO metodevalidering er pålitelig i forhold til kravene satt for metoden i dette studiet, men bør ikke brukes i diagnostisering.

Det ble mot forventning ikke observert sammenheng mellom MPO- og AOPP-konsentrasjoner. Det er derfor ønskelig at dette testes nærmere i senere studier.

7. Referanser

1. Klebanoff, S.J., *Myeloperoxidase: friend and foe*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(5): p. 598-625.
2. Yazici, C., et al., *Protein oxidation status in patients with ankylosing spondylitis*. Rheumatology (Oxford), 2004. **43**(10): p. 1235-9.
3. Daugherty, A., et al., *Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions*. Journal of Clinical Investigation, 1994. **94**(1): p. 437.
4. Andelid, K., et al., *Myeloperoxidase as a marker of increasing systemic inflammation in smokers without severe airway symptoms*. Respir Med, 2007. **101**(5): p. 888-95.
5. Figschou, M., *Masteroppgave*. UIS, 2012.
6. La Rocca, G., et al., *Oxidative stress induces myeloperoxidase expression in endocardial endothelial cells from patients with chronic heart failure*. Basic Research in Cardiology, 2009. **104**(3): p. 307-320.
7. Yazici, C., et al., *Increased advanced oxidation protein products in Behçet's disease: a new activity marker?* British Journal of Dermatology, 2004. **151**(1): p. 105-111.
8. Avalos, I., et al., *Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to disease activity and symptoms*. Lupus, 2007. **16**(3): p. 195-200.
9. Norheim, K.B., et al., *Oxidative stress, as measured by protein oxidation, is increased in primary Sjogren's syndrome*. Free Radic Res, 2012. **46**(2): p. 141-6.
10. Capeillère-Blandin, C., et al., *Respective role of uraemic toxins and myeloperoxidase in the uraemic state*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2006. **21**(6): p. 1555-1563.
11. Hanasand, M., et al., *Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma*. Clinica Chimica Acta, 2012. **413**(9-10): p. 901-906.
12. MPO, Q.L., *QUANTA Lite™ MPO 16.11.2014*; nedlastet fra: http://www.inovadx.com/PDF/di/708700_NO.pdf
13. Wendland, A.E., J.L. Camargo, and C.A. Polanczyk, *Effect of preanalytical variables on myeloperoxidase levels*. Clinica Chimica Acta, 2010. **411**(21): p. 1650-1655.
14. life, L.e.F.f.l., *Chronicle inflammation*. <http://www.lef.org/Protocols/Health-Concerns/Chronic-Inflammation/Page-01?source=search&key=Chronic Inflammation>, septemer 2014.
15. Piwowar, A., M. Knapik-Kordecka, and M. Warwas, *AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 2007. **77**(2): p. 188-92.
16. Colombo, G., et al., *A central role for intermolecular dityrosine cross-linking of fibrinogen in high molecular weight advanced oxidation protein product (AOPP) formation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2014. **1850**(1): p. 1-12.
17. Informatikk, N.h., *Inflammasjon*. <http://nhi.no/sykdommer/hud/diverse/inflammasjon-6468.html>, september 2014.
18. Milovanovic, M., E. Nilsson, and P. Järemo, *Relationships between platelets and inflammatory markers in rheumatoid arthritis*. Clinica Chimica Acta, 2004. **343**(1-2): p. 237-240.

19. Helseinformatikk, N., *Psoriasis 2014*]; nedlastet fra: <http://nhi.no/sykdommer/hud/psoriasis/psoriasis-arsaker-6943.html>. August 2014
20. Baz, K., et al., *Oxidant/antioxidant status in patients with psoriasis*. Yonsei Medical Journal, 2003. **44**(6): p. 987-990.
21. Lettre, G. and J.D. Rioux, *Autoimmune diseases: insights from genome-wide association studies*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(R2): p. R116-21.
22. Web2.gyldendal, *Nyre funksjonelle enhet cited 2014*]; Nedlastet fra http://web2.gyldendal.no/undervisning/pixdir/getImage.asp?archive=Bi1&id=09_29_ny_070989_copy.
23. Helseinformatikk, N., *Nyrer*. cited august 2014]; Nedlastet fra: <http://nhi.no/sykdommer/nyrer-urinveier/kroppen-var/nyrer-og-urinveier-2592.html?page=2>.
24. Sand Olav, S.Ø.V., Haug Egil *Menneskets fysiologi*. Vol. 1. 2001, Oslo: Gyldendal Akademisk. 600.
25. Devarajan, P., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease*. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation, 2008. **68**(S241): p. 89-94.
26. Mishra, J., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery*. The Lancet. **365**(9466): p. 1231-1238.
27. Kennedy, G., et al., *Oxidative stress levels are raised in chronic fatigue syndrome and are associated with clinical symptoms*. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(5): p. 584-9.
28. Wang, G., et al., *Markers of oxidative and nitrosative stress in systemic lupus erythematosus: Correlation with disease activity*. Arthritis & Rheumatism, 2010. **62**(7): p. 2064-2072.
29. Rune, B., *Antioksidanter og Oksidativt stress*. Institutt for medisinske basalfag, 2004: p. 1643-1645.
30. Davies, M., *Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention*. journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 2010. **48**: p. 8-19
31. Madej, T., et al., *MMDB: 3D structures and macromolecular interactions*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D461-4.
32. Discovery, M.S., *MSD brukermanual. 2013*]; lastet fra: http://www.mesoscale.com/catalogsystemweb/documents/human_mpo.pdf. MSD, 2013.
33. Discovery, M.S. *ECL diagram 10 desember 2014*]; nedlastet fra <http://www.mesoscale.com/CatalogSystemWeb/WebRoot/technology/ecl/diagram.htm>
34. Colombo, G., et al., *Redox albuminomics: oxidized albumin in human diseases*. Antioxid Redox Signal, 2012. **17**(11): p. 1515-27.
35. Capeillère-Blandin, C., et al., *Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2004. **1689**(2): p. 91-102.
36. Aalen, O.O., *Innføring i statistikk*. 2004, Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS 2004.
37. Thoresen, T.S., *Statistikk for laboratoriet*. 2. ed. 2011: Lundblad Media AS. 272.
38. Helbæk, M., *Statistikk for kjemikere*. 2001, Trondheim: Tapir Akademisk Forlag. 296.

39. Turpeinen, I.N.a.S., *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens*. United nationS office on drUGS and crime Vienna, 2009.
40. Burtis, C.A., E.R. Ashwood, and D.E. Bruns, *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 2012: Elsevier Health Sciences.
41. Boqué, R., et al., *Validation of analytical methods*. *Grasas y Aceites*, 2002. **53**(1): p. 128-143.
42. discovery, M., *Standard and high bind plates 2014*]; lastet ned fra http://www.mesoscale.com/CatalogSystemWeb/Documents/Assay_Development_Plates_Uncoated.pdf.
43. discovery, M.S., *MSD sector and quickplex plates*. lastet ned fra: http://www.mesoscale.com/CatalogSystemWeb/WebRoot/literature/notes/pdf/Multi_Array_ZF040511A.pdf, 2013.
44. Discovery, M., *Human Myeloperoxidase (MPO) assay*. http://www.mesoscale.com/catalogsystemweb/documents/human_mpo.pdf, 2013.
45. Gabr, S.A. and A.H. Al-Ghadir, *Role of cellular oxidative stress and cytochrome c in the pathogenesis of psoriasis*. *Archives of dermatological research*, 2012. **304**(6): p. 451-457.
46. Rao, A.M., U. Anand, and C.V. Anand, *Myeloperoxidase in chronic kidney disease*. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2011. **26**(1): p. 28-31.
47. Witko-Sarsat, V., V. Gausson, and B. Descamps-Latscha, *Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins?* *Kidney International*, 2003. **63**: p. S11-S14.
48. Marques de Mattos, A., et al., *Protein oxidative stress and dyslipidemia in dialysis patients*. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 2012. **16**(1): p. 68-74.

Vedlegg

Vedlegg A MSD MPO metodeutvikling

Vedlegg A1 MPO metode utvikling Kit

Leverandør: MSD

Lot nummer: K15A01-1

Innhold

| Komponenter | Mengde |
|---|---------------|
| 96-brønn high bind plater | 10 stk. |
| 96-brønn standard plater | 10stk |
| Sulfo-tag NHS Ester | 2 stk. |
| Spin kolonner | 4 stk. |
| Sulfo-tag merket med Streptavidin | 50 µg |
| Sulfo-tag merket med anti-mus antistoff | 50 µg |
| Sulfo-tag merket med anti-kanin antistoff | 50 µg |
| Blokker A Kit | 50 g |
| Avlesnings buffer T(4x) | 200 ml |

Innkjøpt materiale

| Komponenter | Mengde |
|-----------------------------|-------------------|
| MPO til metodeutvikling | 1 flaske à 100 µg |
| Mus primærantistoff | 1 flaske à 1 ml |
| Umerket deteksjonsantistoff | 1 flaske à 400 µl |
| PBS-T | 2 esker |

A2 Tillaging av antistoff- og kalibratorløsninger

Tabell A2.1 Fortynning av primærantistoff

| | Konsentrasjon (µg/ml) | Primærantistoff (µl) | PBS (µl) | Stock(µl) | Høy (µl) | Middel (µl) |
|--------|--------------------------|-------------------------|----------|-----------|----------|-------------|
| Stock | 40 | 40 | 160 | - | - | - |
| Høy | 4 | - | 1440 | 160 | | |
| Middel | 2 | - | 800 | - | 800 | - |
| Lav | 1 | - | 800 | - | - | 800 |

Tabell A2.2 Fortynning av MPO

| | Konsentrasjon (ng/ml) | MPO (950000 ng/ml) | 5% blokker A (µl) | Stock |
|-------|--------------------------|-----------------------|----------------------|-------|
| Stock | 950 | 10 | 990 | - |
| Høy | - | - | 970 | 30 |
| Lav | - | - | 990 | 10 |

Tabell A2.3 Fortynning av umerket deteksjonsantistoff

| | Konsentrasjon (µg/ml) | Umerket deteksjonsantistoff (250 µg/ml) | 5% Blokker A (µl) | Stock | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0,5 µg/ml |
|-------|--------------------------|---|-------------------------|-------|---------|---------|--------------|
| Stock | 100 | 20 | 30 | - | - | - | - |
| | 2 | - | 1470 | 30 | - | - | - |
| | 1 | - | 750 | - | 750 | - | - |
| | 0,5 | - | 750 | - | - | 750 | - |
| | 0,25 | - | 750 | - | - | - | 750 |

Tabell A.2.4 Fortynning av Sulfo-tag deteksjonsantistoff

| | Konsentrasjon (µg/ml) | Sulfo-tag 500 µg/ml | 5% Blokker A (µl) | Stock | 2 µg/ml | 1 µg/ml | 0,5 µg/ml |
|-------|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------|---------|---------|-----------|
| Stock | 250 | 10 | 10 | - | - | - | - |
| | 2 | - | 1488 | 12 | - | - | - |
| | 1 | - | 750 | - | 750 | - | - |
| | 0,5 | - | 750 | - | - | 750 | - |
| | 0,25 | - | 750 | - | - | - | 750 |

A3 PROTOKOLL FOR MSD MPO METODEUTVIKLING

A3.1. Antistoffbehandling og tillaging av løsninger

Primærantistoff

MPO light chain (A-5): SC 365436

Antistoffet ble lagret ved 4 °C i alikvoter merket med innholds navn, oppløsningsdato og initialer.

Umerket deteksjonsantistoff

Kanin polykonalt antistoff: ABIN 655507

Antistoffet ble alikvotert og oppbevart ved 4 °C

Geit anti-kanin merket deteksjonsantistoff (Sulfo-tag)

Sulfo-tag deteksjonsantistoff ble levert klar til bruk. Antistoffet ble oppbevart mørkt ved 4 °C.

MPO

Myeloperoxidase, Human Neutrophil

Stamløsningen ble laget ved å løse 100 µg MPO i 1000 µl 5 % blokker A løsning.

Stamløsningen ble lagret i alikvoter (50 µl) ved -70 °C.

Phosphate Buffered Saline 0,005 % Tween20 (PBS-T)

PBS-T ble levert i pulverform. En pose med PBS-T pulver ble løst opp i 1 liter destillert vann.

Løsningen ble oppbevart i romtemperatur. PBS-T ble brukt til platevask.

MSD Blokker A løsning

Tillaging av 5 % MSD blokker A. se vedlegg B1

A3.2 Plateoptimaliseringsforsøk

Plateoptimalisering ble utført for finne egnede konsentrasjoner på MPO, primærantistoff, umerket deteksjonsantistoff og sulfo-tag deteksjonsantistoff som skulle brukes videre i prosjektet.

Forsøk 1

Følgende parametere ble testet i dette forsøket: Primærantistoff, umerket-, sulfo-tag-deteksjonsantistoff og MPO.

| | |
|---------------------------------------|--|
| Plate | High bind |
| Primærantistoff: | MPO light Chain (Sc 365436) |
| MPO: | MPO human nitrofil (katalog nr 16-14-130000) |
| Umerket deteksjonsantistoff: | Rabbit polyklonalt umerket deteksjonsantistoff |
| Sulfo-tag-deteksjonsantistoff: | Goat anti-rabbit Sulfo-tag |
| Coating teknikk: | Solution |

Plate coating

96-brønnsplate fordelt i åtte rader og tolv kolonner ble brukt . Platen ble fordelt i fire deler som vist i figuren nedenfor. Tre konsentrasjoner av primærantistoff-løsninger (4, 2 og 1 µl) og blank laget etter oppskriften som er vist i tabell A2, ble brukt til platecoating.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| B | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| C | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| D | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| E | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| F | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| G | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| H | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

- 30 µl av hver antistoffløsning ble overført til tilsvarende brønn på platen (Figur A3.1).
- Platen ble ristet i 10 min, forseglet, deretter inkubert over natten ved 4 °C.

Vasking og blokkering

- Platen ble vasket tre ganger med 150 µl PBS-T
- 150 µl blokker A ble tilsatt hver brønn, deretter ble platen forseglet og inkubert over natt ved 4 °C.

Vasking og tilsetning av MPO (antigen)

- MPO ble fortynnet i tre nivåer som vist i tabell A2.2.
- 25 µl av hver MPO-løsning ble tilsatt brønnene på respektive områder på platen som vist på figuren A3.2.
- Platen ble deretter forseglet og inkubert i romtemperatur på rister i to timer.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------------|---|--------------------|---|-------|---|------------------------|---|-----------------------|----|-------|----|
| MPO (28,5 ng/ml) | | MPO (9,5 ng/ml) | | Blank | | MPO (28,5 ng/ml) | | MPO (9,5 ng/ml) | | Blank | |

Vasking og tilsetning av umerket deteksjonsantistoff

- Platen ble vasket med 150 µl PBS-T og brønnene ble tilsatt 25µl umerket deteksjonsantistoff på tilsvarende steder som viser figuren A3.3.

| | |
|---|--------------------------------|
| A | 2.0 µg/ml deteksjonsantistoff |
| B | 1.0 µg/ml deteksjonsantistoff |
| C | 0.5 µg/ml deteksjonsantistoff |
| D | 0.25 µg/ml deteksjonsantistoff |
| E | 2.0 µg/ml deteksjonsantistoff |
| F | 1.0 µg/ml deteksjonsantistoff |
| G | 0.5 µg/ml deteksjonsantistoff |
| H | 0.25 deteksjonsantistoff |

- Platen ble deretter forseglet og ristet i to timer i romtemperatur.

Vasking og tilsetning av sulfo-tag-deteksjonsantistoff

Sulfo-tag-deteksjonsantistoff ble fortennet på samme måte som umerket deteksjonsantistoff (Figur A3.3). Etter vasking med 150 µl PBS-T ble hver brønn tilsatt 25 µl sulfo-tag-deteksjonsantistoff-løsninger på tilsvarende sted på platen.

- Platen ble forseglet med folie og inkubert i romtemperatur på rist i 1 time.
-

Vasking og tilsetning av MSD avlesningsbuffer

MSD avlesningsbuffer er 4x konsentrert løsning.

5ml avlesningsbuffer ble blandet med 15 ml destillert vann for å lage 1x avlesningsbuffer.

Etter platevask ble alle brønnene tilsatt 150 µl 1x MSD avlesningsbuffer T. Platen ble umiddelbart ført inn i MSD sector imager 2400 til avlesning.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| A | 937 | 912 | 910 | 905 | 901 | 959 | 813 | 816 | 819 | 887 | 889 | 1000 |
| B | 436 | 445 | 422 | 414 | 415 | 440 | 388 | 397 | 394 | 418 | 414 | 464 |
| C | 205 | 207 | 201 | 208 | 198 | 210 | 192 | 195 | 181 | 201 | 188 | 210 |
| D | 92 | 95 | 90 | 94 | 92 | 99 | 89 | 94 | 89 | 95 | 91 | 96 |
| E | 654 | 649 | 600 | 639 | 673 | 672 | 320 | 346 | 189 | 358 | 372 | 394 |
| F | 304 | 311 | 303 | 315 | 337 | 338 | 167 | 178 | 171 | 181 | 188 | 194 |
| G | 152 | 158 | 144 | 151 | 148 | 141 | 90 | 30 | 93 | 85 | -5 | 85 |
| H | 71 | 75 | 70 | 71 | 77 | 73 | 46 | 50 | 45 | 40 | 52 | 49 |

Forsøk

Forsøk 1 viser sannsynlig deteksjon av primærantistoff, umerket- eller sulfo-tag-deteksjonsantistoff. MPO ble ikke detektert. Forsøket ble gjentatt, samtidig som antall test parametere ble redusert.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|------|-----|
| A | 1023 | 1107 | 1093 | 1167 | 1131 | 1204 | 1001 | 1023 | 980 | 982 | 998 | 938 |
| B | 499 | 692 | 638 | 685 | 649 | 688 | 622 | 597 | 564 | 706 | 545 | 552 |
| C | 323 | 692 | 638 | 685 | 649 | 668 | 622 | 597 | 564 | 706 | 545 | 552 |
| D | 207 | 272 | 256 | 270 | 262 | 264 | 346 | 272 | 330 | 333 | 362 | 292 |
| E | 679 | 878 | 848 | 822 | 809 | 872 | 453 | 455 | 460 | 467 | 528 | 452 |
| F | 483 | 490 | 468 | 480 | 469 | 470 | 273 | 276 | 373 | 353 | 1207 | 277 |
| G | 249 | 289 | 328 | 290 | 290 | 395 | 188 | 165 | 158 | 184 | 168 | 163 |
| H | 154 | 181 | 183 | 178 | 183 | 191 | 109 | 111 | 119 | 116 | 119 | 33 |

Forsøk 3

Forsøk 2 viser fortsatt ikke deteksjon av MPO. I forsøk 3 ble det bestemt å teste enda færre parametere. Da ble det brukt en lupusprøve med kjent MPO-konsentrasjon (160 ng/ml). Lupusprøven ble fortynnet til 80 ng/ml og 40 ng/ml MPO og analysert på en halvplate sammen med en blankprøve. Den høye konsentrasjonen og lave konsentrasjonene ble pipettert i kolonner 1,2 og 5,6 henholdsvis, mens brønnene i kolonne 3,4 ble tilsatt blankprøve.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A | 238 | 252 | 570 | 588 | 251 | 241 |
| B | 262 | 263 | 578 | 583 | 249 | 236 |
| C | 272 | 277 | 581 | 580 | 254 | 243 |
| D | 270 | 280 | 577 | 582 | 259 | 242 |
| E | 267 | 285 | 570 | 565 | 261 | 252 |
| F | 258 | 268 | 566 | 576 | 259 | 247 |
| G | 266 | 278 | 543 | 556 | 255 | 253 |
| H | 271 | 272 | 536 | 552 | 265 | 249 |

Kolonner med blankprøve fikk høyere signal i forhold til kolonnene som ble tilsatt MPO, dette viser at det som detekteres er sannsynligvis bakgrunnssignal. MPO ble fortsatt ikke detektert.

Forsøk 4

I dette forsøket ble MPO testet på MSD kommersielt sett parallelt med MSD-kalibrator som følger med sette. MPO ble da fortynnet i samme konsentrasjonsområde som MSD kalibrator og analysert som prøve.

Tabell A3.1 Sammenlikning av MSD Kalibrator og MPO brukt i metodeutvikling

| MSD Kalibrator | MPO |
|-------------------|-------|
| 44255 | 49854 |
| 12675 | 15661 |
| 3991 | 4887 |
| 1239 | 1672 |
| 265 | 589 |
| 187 | 241 |
| 95 | 322 |
| 54 | 43 |

Vedlegg B MPO kommersielt sett

Leverandør: MSD

Lot nummer: K0050592 og K0050626

| Komponenter | Mengde |
|--|-------------------|
| Human Myeloperoksidase (MPO) 96-brønn plater | 5 plater |
| Sulfo-Tag anti-hMPO | 1 flaske à 200 µl |
| Egen MPO kalibrator | 5 flasker à 5 µl |
| Diluent 27 | 1 flaske à 150 ml |
| Bløkker A | 1 flaske à 250 ml |
| Read buffer 4x | 1 flaske à 50 ml |

B1 MSD kommersielt sett reagenstillaging og prøvefortynning

5% Bløkker A løsning

12,5 g Bløkker A pulver ble løst opp i 200 ml destillert vann. Løsningen stod på benken i to timer for å trekke, før det ble blandet med magnet. Løsningen ble til slutt tilsatt 50 ml 5x MSD fosfat buffer, deretter blandet i ti minutter, filtrert og lagret ved 4 °C.

Fortynningsbuffer (diluent 27)

Hel plate: 30 ml

Halv plate: 15 ml

Diluent 27 leveres frossen. Løsningen ble tint og fordelt i 5 alikvoter à 30 ml og lagret ved -20 °C. Diluent 27 kan tines og fryses opp til tre ganger uten at kvaliteten påvirkes. Diluent 27 brukes til fortynning av prøver og kalibrator.

MSD MPO-kalibrator

Egen MPO-kalibrator ble levert som 20x stamløsning med konsentrasjon 1000000 pg/ml. Stamløsningen ble brukt til å lage åtte kalibratorløsninger med synkende konsentrasjoner (0-50000 pg/ml) som vist i tabell B1.

Tabell B1 MSD MPO-kalibrator fortynningsrekke

| Kalibrator | Human MPO kalibrator konsentrasjon (pg/ml) | Fortynning (µl) |
|-------------------|---|------------------------------|
| 20x Stock | 1000000 | |
| Kal 1 | 50000 | 10µl stock+190µl diluent 27 |
| Kal 2 | 16667 | 25µl kal 1+ 50µl diluent 27 |
| Kal 3 | 5556 | 25µl kal 2 + 50µl diluent 27 |
| Kal 4 | 1852 | 25µl kal 3 + 50µl diluent 27 |
| Kal 5 | 617 | 25µl kal 4 + 50µl diluent 27 |
| Kal 6 | 206 | 25µl kal 5 + 50µl diluent 27 |
| Kal 7 | 69 | 25µl kal 6 + 50µl diluent 27 |
| Kal 8 | 0 | 50µl diluent 27 |

Sulfo-tag deteksjonsantistoff

Sulfo-tag leveres som 10x stamløsning

Sulfo-tag ble lagret mørkt i alikvoter ved 4 °C.

Hel plate: 30 µl Sulfo-tag stock+2970 µl diluent 27

Halv plate: 15 ul Sulfo-tag stock+1485 ul diluent 27

MSD avlesningsbuffer T (4x)

Avlesningsbuffer T ble fortynnet til 1x med destillert vann.

Hel plate: 5 ml Read buffer +15 ml destillert vann

Halv plate: 2.5 ml Read buffer + 7.5 destillert vann

Phosphat buffered saline med tween 20(PBS-T)

Hver pose ble løst opp i 1 liter destillert vann.

Buffer løsningen ble oppbevart i romtemperatur.

Fortynning av pasient prøver og kontroller

Plasmaprøver ble fortynnet 1:10 med diluent 27:

20 µl pasientprøve +180 µl diluent 27

B2 Utførelse av MSD kommersielt sett metoden

Forberedelser før analysering

Dagen før analyse

Ta ut diluent 27 fra fryseren og tin i kjøleskap over natt.

Lag oversiktslapp som viser hvor kalibratorløsninger, pasientprøver og kontroller skal plasseres på platen.

Merk eppendorfrør til fortynning av prøver og kalibrator. Dekk med folie for å unngå støv kontaminering.

Analysedagen

Det er viktig at alle reagenser og platen er romtemperert før en starter analyse. Ta ut platen og reagenser som var oppbevart ved 4 °C og sett de på benken i minst tretti minutter. Hent kalibrator og prøvealiquoter fra fryseren. Tin kalibratorstamløsning, pasientprøver og kontroller på is.

Blokkering

Blokker platen ved å tilsette 150 µl 5 % Blokker A løsning per brønn. Forsegl og inkuber platen i romtemperatur i 1 time. For tillaging av 5 % Blokker A, se vedlegg B1.

Mens blokkering pågår, lag kalibratorløsninger og fortynn prøver og kontroller for å unngå unødvendige forsinkelser.

For tillaging av kalibratorløsninger og prøve fortynning, se vedlegg B1.

Vasking og tilsetning av prøve eller kalibrator

Etter blokkering, vask platen tre ganger med 150 µl PBS-T

Tilsett 40 µl diluent 27. Umiddelbart tilsettes det 10 µl prøve eller kalibrator som vist på oversiktslappen. Forsegl og inkuber i romtemperatur i 1 time på rister.

Sulfo-tag-deteksjonsantistoff er lysfølsom derfor er det viktig at det lages rett før tilsetning for å unngå lyseksposering.

Vasking og tilsetning av Sulfo-tag

Vask platen med 150 µl PBS-T

Tilsett 25 µl 1x Sulfo-tag-deteksjonsantistoff. Forsegl platen med folie og inkuber i romtemperatur i 1 time på rister. For tillaging av Sulfo-tag-deteksjonsantistoff, se vedlegg B1.

Mens platen inkuberes er det lurt å opprette platelayout i maskinen. Husk å lagre.

Vasking og tilsetning av MSD avlesningsbuffer T

Vask tre ganger med 150 µl PBS-T

Tilsett forsiktig 150 µl MSD avlesningsbuffer T. Unngå luftbobler.

Avles umiddelbart på MSD sector imager 2400.

Alle data lagres automatisk i maskinens software.

Vedlegg C Advanced oxidation protein products (AOPP)

C1 Tillaging av kalibrator løsninger

Kloramin T ble brukt som kalibrator i AOPP-metode. Stamløsningen 1 (100 mmol/l) ble laget ved å løse opp 84,5 mg kloramin T i 3 ml destillert vann. Stamløsning 2 (1 mmol/l) ble laget ved å fortynne stamløsningen hundre ganger.

Stamløsning 2: 2970 µl destillert vann + 30 µl stamløsning 1.

Stamløsningen ble da brukt til å lage de åtte kalibratorløsningene (Tabell C1).

Tabell C1 Tillaging av kloramin T standardløsninger

| Kloramin T stamløsning 2 (µl) | Vann (µl) | Konsentrasjon (µmol/l) |
|----------------------------------|-----------|------------------------|
| 0 | 1000 | 0 |
| 5 | 995 | 4,75 |
| 10 | 990 | 9,5 |
| 20 | 980 | 19 |
| 40 | 960 | 38 |
| 60 | 940 | 57 |
| 80 | 920 | 76 |
| 100 | 900 | 95 |

C2 AOPP analyse metode

Forberedelser

Maskinen settes på en halv time før bruk. KI og Kloramin T er laget på forhånd og lagret i kjøleskap. Ta ut alle reagenser slik at de får romtemperatur før analyse. Pasientprøver og kontroller tines på benk, mens kalibrator tines på is. Merk alle rør med innhold og initialer. Lag oversiktslapp som viser hvor prøver, kontroller og kalibratorer skal plasseres på platen. Sett opp layout i maskinen og husk å legge inn rette kalibrator konsentrasjoner og fortynningsfaktorer (5) for prøvene. Sjekk fargen på KI (kaliumjodid). Dersom KI står lenge, utvikles det en gulaktig farge som vil påvirke analysen på grunn av fargeinterferens .

Utførelse

Lag kalibrator løsninger som vist i vedlegg C1.

Tilsett 190 μ l av hver kalibrator og 40 μ l pasient- og kontrollprøver i tre paralleller som vist på oversiktslappen.

Kalibratorer tilsettes 10 μ l KI og pasient- og kontrollprøver tilsettes 160 μ l sitronsyre.

Sitronsyre kan forårsake protein degradering, dersom den tilsettes prøver lenge før analyse, derfor bør man bruke automatmultipipette ved tilsetning.

Rist platen i to min og sett den i maskinen til avlesning.

Vedlegg D MSD MPO-kalibrator og residualer

Dato 21.11.2013

Plate 3

| Kalibrator | Teoretisk | Signal | Målt kons | SD | CV |
|------------|-----------------|--------|--------------|---------|-----|
| Nummer | Kons (pg/ml) | | (pg/ml) | (pg/ml) | % |
| Kal 1 | 50000 | 32394 | 54858 | 852 | 2 |
| Kal 2 | 16667 | 8657 | 16076 | 558 | 3 |
| Kal 3 | 5556 | 2614 | 5179 | 255 | 5 |
| Kal 4 | 1852 | 936 | 1826 | 80 | 4 |
| Kal 5 | 617 | 294 | 635 | 99 | 16 |
| Kal 6 | 206 | 142 | 211 | 13 | 6 |
| Kal 7 | 69 | 86 | 81 | 12 | 15 |
| Kal 8 | 0 | 57 | 1,0 | 2,1 | 173 |

Residualer plate 3

| Kalibrator | Teoretisk | Residualer | Residualer (%) |
|------------|-----------------|------------|-------------------|
| Nummer | Kons (pg/ml) | pg/ml | |
| Kal 1 | 50000 | -4858 | -10 |
| Kal 2 | 16667 | 591 | 4 |
| Kal 3 | 5556 | 377 | 7 |
| Kal 4 | 1852 | 26 | 1 |
| Kal 5 | 617 | -18 | -3 |
| Kal 6 | 206 | -5 | -2 |
| Kal 7 | 69 | -12 | -17 |
| Kal 8 | 0 | -1 | |

Dato 03.12.2013

Plate 5

| Kalibrator | Teoretisk | Signal | Målt kons | SD | CV |
|------------|-----------------|--------|--------------|---------|-----|
| Nr | Kons (pg/ml) | | (pg/ml) | (pg/ml) | % |
| Kal 1 | 50000 | 38947 | 53818 | 478 | 1 |
| Kal 2 | 16667 | 10522 | 16282 | 423 | 3 |
| Kal 3 | 5556 | 3348 | 5208 | 109 | 2 |
| Kal 4 | 1852 | 1143 | 1815 | 65 | 4 |
| Kal 5 | 617 | 399 | 628 | 10 | 2 |
| Kal 6 | 206 | 174 | 228 | 16 | 7 |
| Kal 7 | 69 | 94 | 67 | 16 | 23 |
| Kal 8 | 0 | 48 | 18,3 | 31,8 | 173 |

Residualer plate 5

| Kalibrator | Teoretisk | Residualer | Residualer (%) |
|------------|-----------------|------------|-------------------|
| Nr | Kons (pg/ml) | pg/ml | |
| Kal 1 | 50000 | -3818 | -8 |
| Kal 2 | 16667 | 385 | 2 |
| Kal 3 | 5556 | 348 | 6 |
| Kal 4 | 1852 | 37 | 2 |
| Kal 5 | 617 | -11 | -2 |
| Kal 6 | 206 | -22 | -11 |
| Kal 7 | 69 | 2 | 2 |
| Kal 8 | 0 | -18 | |

Dato: 10.12.2013

Plate 6

| Kalibrator | Teoretisk | Signal | Målt kons | SD | CV |
|------------|--------------|--------|-----------|---------|-----|
| Nummer | Kons (pg/ml) | | (pg/ml) | (pg/ml) | % |
| Kal 1 | 50000 | 40128 | 55658 | 746 | 1 |
| Kal 2 | 16667 | 11051 | 16331 | 571 | 3 |
| Kal 3 | 5556 | 3279,7 | 5108 | 229 | 4 |
| Kal 4 | 1852 | 1089,3 | 1743 | 111 | 6 |
| Kal 5 | 617 | 418,33 | 651 | 29 | 4 |
| Kal 6 | 206 | 171 | 226 | 2 | 1 |
| Kal 7 | 69 | 86 | 71 | 18 | 25 |
| Kal 8 | 0 | 49 | 2,0 | 3,4 | 173 |

Residualer plate 6

| Kalibrator | Teoretisk | Residualer | Residualer (%) |
|------------|--------------|------------|----------------|
| Nummer | Kons (pg/ml) | pg/ml | |
| Kal 1 | 50000 | -5658 | -11 |
| Kal 2 | 16667 | 336 | 2 |
| Kal 3 | 5556 | 448 | 8 |
| Kal 4 | 1852 | 109 | 6 |
| Kal 5 | 617 | -34 | -6 |
| Kal 6 | 206 | -20 | -10 |
| Kal 7 | 69 | -2 | -3 |
| Kal 8 | 0 | -2 | |

Dato: 13.12.2013

Plate 7

| Kalibrator | Teoretisk | Signal | Målt kons | SD | CV |
|------------|--------------|--------|-----------|---------|-----|
| Nummer | Kons (pg/ml) | | (pg/ml) | (pg/ml) | % |
| Kal 1 | 50000 | 35973 | 54811 | 2277 | 4 |
| Kal 2 | 16667 | 10209 | 16525 | 405 | 2 |
| Kal 3 | 5556 | 2981 | 5078 | 90 | 2 |
| Kal 4 | 1852 | 1027 | 1790 | 68 | 4 |
| Kal 5 | 617 | 376 | 631 | 21 | 3 |
| Kal 6 | 206 | 159 | 223 | 7 | 3 |
| Kal 7 | 69 | 85 | 75 | 22 | 29 |
| Kal 8 | 0 | 49 | 4,2 | 4,3 | 104 |

Residualer plate 7

| Kalibrator | Teoretisk | Residualer | Residualer (%) |
|------------|--------------|------------|----------------|
| Nummer | Kons (pg/ml) | pg/ml | |
| Kal 1 | 50000 | -4811 | -10 |
| Kal 2 | 16667 | 142 | 1 |
| Kal 3 | 5556 | 478 | 9 |
| Kal 4 | 1852 | 62 | 3 |
| Kal 5 | 617 | -14 | -2 |
| Kal 6 | 206 | -17 | -8 |
| Kal 7 | 69 | -6 | -9 |
| Kal 8 | 0 | -4 | |

Dato:
17.12.2013
Plate 8

| Kalibrator | Teoretisk | Signal | Målt kons | SD | CV |
|------------|--------------|--------|-----------|---------|-----|
| Nummer | Kons (pg/ml) | | (pg/ml) | (pg/ml) | % |
| Kal 1 | 50000 | 33366 | 55233 | 251 | 0 |
| Kal 2 | 16667 | 8632 | 15877 | 211 | 1 |
| Kal 3 | 5556 | 2600 | 5230 | 31 | 1 |
| Kal 4 | 1852 | 847 | 1790 | 48 | 3 |
| Kal 5 | 617 | 312 | 634 | 25 | 4 |
| Kal 6 | 206 | 141 | 228 | 25 | 11 |
| Kal 7 | 69 | 82 | 75 | 19 | 28 |
| Kal 8 | 0 | 55 | 15,5 | 22,0 | 141 |

Residualer plate 8

| Kalibrator | Teoretisk | Residualer | Residualer (%) |
|------------|--------------|------------|----------------|
| Nummer | Kons (pg/ml) | pg/ml | |
| Kal 1 | 50000 | -5233 | -10 |
| Kal 2 | 16667 | 790 | 5 |
| Kal 3 | 5556 | 326 | 6 |
| Kal 4 | 1852 | 62 | 3 |
| Kal 5 | 617 | -17 | -3 |
| Kal 6 | 206 | -22 | -11 |
| Kal 7 | 69 | -6 | -9 |
| Kal 8 | 0 | -16 | |

Dato 19.12.2013
Plate 9

| Kalibrator | Teoretisk | Signal | Målt kons | SD | CV |
|------------|--------------|--------|-----------|---------|----|
| Nummer | Kons (pg/ml) | | (pg/ml) | (pg/ml) | % |
| Kal 1 | 50000 | 41710 | 55280 | 658 | 1 |
| Kal 2 | 16667 | 11263 | 16029 | 380 | 2 |
| Kal 3 | 5556 | 3583 | 5344 | 36 | 1 |
| Kal 4 | 1852 | 1199 | 1786 | 14 | 1 |
| Kal 5 | 617 | 435 | 561 | 60 | 11 |
| Kal 6 | 206 | 267 | 274 | 107 | 39 |
| Kal 7 | 69 | 183 | 122 | 80 | 65 |
| Kal 8 | 0 | 106 | 0,0 | 0,0 | |

Residualer plate 9

| Kalibrator | Teoretisk | Residualer | Residualer (%) |
|------------|--------------|------------|----------------|
| Nummer | Kons (pg/ml) | pg/ml | |
| Kal 1 | 50000 | -5280 | -11 |
| Kal 2 | 16667 | 638 | 4 |
| Kal 3 | 5556 | 212 | 4 |
| Kal 4 | 1852 | 66 | 4 |
| Kal 5 | 617 | 56 | 9 |
| Kal 6 | 206 | -68 | -33 |
| Kal 7 | 69 | -53 | -77 |
| Kal 8 | 0 | 0 | |

Dato:
15.01.2014
Plate 10

| Kalibrator | Teoretisk | Signal | Målt kons | SD | CV |
|------------|--------------|--------|-----------|---------|----|
| Nummer | Kons (pg/ml) | | (pg/ml) | (pg/ml) | % |
| Kal 1 | 50000 | 33191 | 54664 | 1451 | 3 |
| Kal 2 | 16667 | 9291 | 16185 | 572 | 4 |
| Kal 3 | 5556 | 3014 | 5472 | 204 | 4 |
| Kal 4 | 1852 | 906 | 1667 | 164 | 10 |
| Kal 5 | 617 | 364 | 635 | 22 | 3 |
| Kal 6 | 206 | 161 | 227 | 30 | 13 |
| Kal 7 | 69 | 93 | 83 | 25 | 30 |
| Kal 8 | 0 | 53 | 0,0 | 0,0 | |

Residualer plate 10

| Kalibrator | Teoretisk | Residualer | Residualer (%) |
|------------|--------------|------------|----------------|
| Nummer | Kons (pg/ml) | pg/ml | |
| Kal 1 | 50000 | -4664 | -9 |
| Kal 2 | 16667 | 482 | 3 |
| Kal 3 | 5556 | 84 | 2 |
| Kal 4 | 1852 | 185 | 10 |
| Kal 5 | 617 | -18 | -3 |
| Kal 6 | 206 | -21 | -10 |
| Kal 7 | 69 | -14 | -21 |
| Kal 8 | 0 | 0 | |

Dato: 13.02.14
Plate 11

| Kalibrator | Teoretisk | Signal | Målt kons | SD | CV |
|------------|--------------|--------|-----------|---------|-----|
| Nummer | Kons (pg/ml) | | (pg/ml) | (pg/ml) | % |
| Kal 1 | 50000 | 71031 | 49847 | 2537 | 5 |
| Kal 2 | 16667 | 25211 | 18231 | 269 | 1 |
| Kal 3 | 5556 | 7071 | 5277 | 186 | 4 |
| Kal 4 | 1852 | 2370 | 1789 | 107 | 6 |
| Kal 5 | 617 | 794 | 579 | 31 | 5 |
| Kal 6 | 206 | 361 | 234 | 46 | 20 |
| Kal 7 | 69 | 162 | 71 | 0 | 0 |
| Kal 8 | 0 | 79 | 1,8 | 2,8 | 155 |

Residualer plate 11

| Kalibrator | Teoretisk | Residualer | Residualer (%) |
|------------|--------------|------------|----------------|
| Nummer | Kons (pg/ml) | pg/ml | |
| Kal 1 | 50000 | 153 | 0 |
| Kal 2 | 16667 | -1564 | -9 |
| Kal 3 | 5556 | 279 | 5 |
| Kal 4 | 1852 | 63 | 3 |
| Kal 5 | 617 | 38 | 6 |
| Kal 6 | 206 | -28 | -14 |
| Kal 7 | 69 | -2 | -2 |
| Kal 8 | 0 | -2 | |

Dato: 19.02.14

Plate 12

| Kalibrator Nummer | Teoretisk Kons (pg/ml) | Signal | Målt kons (pg/ml) | SD (pg/ml) | CV % |
|----------------------|------------------------------|--------|-------------------------|---------------|---------|
| Kal 1 | 50000 | 72317 | 49880 | 1956 | 4 |
| Kal 2 | 16667 | 23696 | 17144 | 410 | 2 |
| Kal 3 | 5556 | 7010 | 5312 | 161 | 3 |
| Kal 4 | 1852 | 2400 | 1859 | 38 | 2 |
| Kal 5 | 617 | 840 | 628 | 7 | 1 |
| Kal 6 | 206 | 350 | 221 | 12 | 6 |
| Kal 7 | 69 | 166 | 59 | 6 | 10 |
| Kal 8 | 0 | 107 | 7 | 6 | 89 |

Residualer plate 12

| Kalibrator Nummer | Teoretisk Kons (pg/ml) | Residualer pg/ml | Residualer (%) |
|----------------------|------------------------------|---------------------|-------------------|
| Kal 1 | 50000 | 120 | 0 |
| Kal 2 | 16667 | -477 | -3 |
| Kal 3 | 5556 | 244 | 4 |
| Kal 4 | 1852 | -7 | 0 |
| Kal 5 | 617 | -11 | -2 |
| Kal 6 | 206 | -15 | -7 |
| Kal 7 | 69 | 10 | 14 |
| Kal 8 | 0 | -7 | |

Dato: 19.03.2014

Plate 13

| Kalibrator Nummer | Teoretisk Kons (pg/ml) | Signa l | Målt kons (pg/ml) | SD (pg/ml) | CV % |
|----------------------|------------------------------|------------|-------------------------|---------------|---------|
| Kal 1 | 50000 | 63340 | 50521 | 1570 | 3 |
| Kal 2 | 16667 | 20915 | 17609 | 430 | 2 |
| Kal 3 | 5556 | 5707 | 5045 | 362 | 7 |
| Kal 4 | 1852 | 2011 | 1778 | 108 | 6 |
| Kal 5 | 617 | 946 | 783 | 42 | 5 |
| Kal 6 | 206 | 365 | 209 | 24 | 11 |
| Kal 7 | 69 | 209 | 41 | 15 | 37 |
| Kal 8 | 0 | 188 | 17 | 12 | 73 |

Residualer Plate 13

| Kalibrator Nummer | Teoretisk Kons (pg/ml) | Residualer pg/ml | Residualer (%) |
|----------------------|------------------------------|---------------------|-------------------|
| Kal 1 | 50000 | -521 | -1 |
| Kal 2 | 16667 | -942 | -6 |
| Kal 3 | 5556 | 511 | 9 |
| Kal 4 | 1852 | 74 | 4 |
| Kal 5 | 617 | -166 | -27 |
| Kal 6 | 206 | -3 | -1 |
| Kal 7 | 69 | 28 | 40 |
| Kal 8 | 0 | -17 | |

Dato: 28.03.2014

Plate 14

| Kalibrator Nummer | Teoretisk Kons (pg/ml) | Signal | Målt kons (pg/ml) | SD (pg/ml) | CV % |
|----------------------|------------------------------|--------|-------------------------|---------------|---------|
| Kal 1 | 50000 | 54942 | 51159 | 462 | 1 |
| Kal 2 | 16667 | 18225 | 17319 | 597 | 3 |
| Kal 3 | 5556 | 5386 | 5181 | 256 | 5 |
| Kal 4 | 1852 | 1919 | 1815 | 85 | 5 |
| Kal 5 | 617 | 720 | 622 | 14 | 2 |
| Kal 6 | 206 | 330 | 224 | 8 | 4 |
| Kal 7 | 69 | 180 | 68 | 16 | 24 |
| Kal 8 | 0 | 116 | 0 | 0 | 173 |

Residualer Plate 14

| Kalibrator Nummer | Teoretisk Kons (pg/ml) | Residualer pg/ml | Residualer (%) |
|----------------------|------------------------------|---------------------|-------------------|
| Kal 1 | 50000 | -1159 | -2 |
| Kal 2 | 16667 | -652 | -4 |
| Kal 3 | 5556 | 375 | 7 |
| Kal 4 | 1852 | 37 | 2 |
| Kal 5 | 617 | -5 | -1 |
| Kal 6 | 206 | -18 | -9 |
| Kal 7 | 69 | 1 | 2 |
| Kal 8 | 0 | 0 | |

Gjennomsnitt beregning av residualer (pg/ml) av alle kalibreringskurver

| Kal nr | Plate 3 | Plate 5 | Plate 6 | Plate 7 | Plate 8 | Plate 9 | Plate 10 | Plate 11 | Plate 12 | Plate 13 | Plate 14 | Gjennomsnitt |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|--------------|
| Kal 1 | -4858 | -3818 | -5658 | -4811 | -5233 | -5280 | -4664 | 153 | 120 | -521 | -1159 | -42 |
| Kal 2 | 591 | 385 | 336 | 142 | 790 | 638 | 482 | -1564 | -477 | -942 | -652 | 2 |
| Kal 3 | 377 | 348 | 448 | 478 | 326 | 212 | 84 | 279 | 244 | 511 | 375 | 3 |
| Kal 4 | 26 | 37 | 109 | 62 | 62 | 66 | 185 | 63 | -7 | 74 | 37 | |
| Kal 5 | -18 | -11 | -34 | -14 | -17 | 56 | -18 | 38 | -11 | -166 | -5 | |
| Kal 6 | -5 | -22 | -20 | -17 | -22 | -68 | -21 | -28 | -15 | -3 | -18 | |
| Kal 7 | -12 | 2 | -2 | -6 | -6 | -53 | -14 | -2 | 10 | 28 | 1 | |
| Kal 8 | -1 | -18 | -2 | -4 | -16 | 0 | 0 | -2 | -7 | -17 | 0 | |

Gjennomsnitt beregning av residualer (%) av alle kalibreringskurver

| Kal nr | Plate 3 | Plate 5 | Plate 6 | Plate 7 | Plate 8 | Plate 9 | Plate 10 | Plate 11 | Plate 12 | Plate 13 | Plate 14 | Gjennomsnitt |
|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|--------------|
| Kal 1 | -10 | -8 | -11 | -10 | -10 | -11 | -9 | 0 | 0 | -1 | -2 | |
| Kal 2 | 4 | 2 | 2 | 1 | 5 | 4 | 3 | -9 | -3 | -6 | -4 | |
| Kal 3 | 7 | 6 | 8 | 9 | 6 | 4 | 2 | 5 | 4 | 9 | 7 | |
| Kal 4 | 1 | 2 | 6 | 3 | 3 | 4 | 10 | 3 | 0 | 4 | 2 | |
| Kal 5 | -3 | -2 | -6 | -2 | -3 | 9 | -3 | 6 | -2 | -27 | -1 | |
| Kal 6 | -2 | -11 | -10 | -8 | -11 | -33 | -10 | -14 | -7 | -1 | -9 | |
| Kal 7 | -17 | 2 | -3 | -9 | -9 | -77 | -21 | -2 | 14 | 40 | 2 | |

Vedlegg E Etablering av MPO kontrollkort

Alle målte MPO konsentrasjoner av Huskontroll (pg/ml) er ført inn i tabellen nedenfor:

| Dato | Plate nr | Gjennomsnitt signal | Konsentrasjon (ng/ml) | | Gjennomsnitt Konsentrasjon ng/ml | SD n/ml | CV % |
|------------|----------|---------------------|-----------------------|-------------|----------------------------------|---------|------|
| | | | Parallell 1 | Parallell 2 | | | |
| 21.11.2013 | 3 | 455 | 8,619 | 8,396 | 8,508 | 0,158 | 2 |
| 21.11.2013 | 3 | 425 | 7,482 | 8,335 | 7,909 | 0,603 | 8 |
| 21.11.2013 | 3 | 451 | 8,214 | 8,659 | 8,437 | 0,315 | 4 |
| 03.12.2013 | 5 | 564 | 9,010 | 8,760 | 8,885 | 0,177 | 2 |
| 03.12.2013 | 5 | 549 | 7,950 | 8,000 | 7,975 | 0,035 | 0 |
| 03.12.2013 | 5 | 502 | 8,060 | 7,490 | 7,775 | 0,403 | 5 |
| 10.12.2013 | 6 | 549 | 8,754 | 8,606 | 8,680 | 0,105 | 1 |
| 10.12.2013 | 6 | 503 | 8,208 | 7,644 | 7,926 | 0,399 | 5 |
| 10.12.2013 | 6 | 577 | 9,890 | 8,407 | 9,149 | 1,049 | 11 |
| 13.12.2013 | 7 | 541 | 9,720 | 8,900 | 9,310 | 0,580 | 6 |
| 13.12.2013 | 7 | 484 | 8,390 | 8,170 | 8,280 | 0,156 | 2 |
| 13.12.2013 | 7 | 544 | 9,740 | 8,990 | 9,365 | 0,530 | 6 |
| 17.12.2013 | 8 | 454 | 9,110 | 9,910 | 9,510 | 0,566 | 6 |
| 17.12.2013 | 8 | 413 | 9,000 | 8,210 | 8,605 | 0,559 | 6 |
| 17.12.2013 | 8 | 422 | 8,630 | 8,960 | 8,795 | 0,233 | 3 |
| 19.12.2013 | 9 | 543 | 7,760 | 7,070 | 7,415 | 0,488 | 7 |
| 19.12.2013 | 9 | 555 | 7,610 | 7,610 | 7,610 | 0,000 | 0 |
| 19.12.2013 | 9 | 507 | 6,830 | 6,800 | 6,815 | 0,021 | 0 |
| 15.01.2014 | 10 | 485 | 7,981 | 9,391 | 8,686 | 0,997 | 11 |
| 15.01.2014 | 10 | 401 | 6,969 | 7,164 | 7,067 | 0,138 | 2 |
| 15.01.2014 | 10 | 434 | 7,495 | 7,922 | 7,709 | 0,302 | 4 |
| 13.02.2013 | 11 | 704 | 5,304 | 4,847 | 5,076 | 0,323 | 6 |
| 13.02.2013 | 11 | 675 | 5,021 | 4,665 | 4,843 | 0,252 | 5 |
| 13.02.2013 | 11 | 709 | 5,060 | 5,170 | 5,115 | 0,078 | 2 |
| 19.02.2014 | 12 | 733 | 5,557 | 5,253 | 5,405 | 0,215 | 4 |
| 19.02.2014 | 12 | 730 | 5,647 | 5,122 | 5,384 | 0,371 | 7 |
| 19.02.2014 | 12 | 470 | 0 | 6,430 | 3,215 | 4,547 | 141 |
| 19.03.2014 | 13 | 702 | 5,689 | 5,239 | 5,464 | 0,319 | 6 |
| 19.03.2014 | 13 | 681 | 5,405 | 5,111 | 5,258 | 0,208 | 4 |
| 19.03.2014 | 13 | 649 | 5,052 | 4,835 | 4,943 | 0,153 | 3 |
| 19.03.2014 | 13 | 479 | 5,140 | 1,276 | 3,208 | 2,733 | 85 |
| 28.03.2014 | 14 | 673 | 5,919 | 5,575 | 5,747 | 0,243 | 4 |
| 28.03.2014 | 14 | 667 | 5,585 | 5,777 | 5,681 | 0,136 | 2 |
| 28.03.2014 | 14 | 643 | 5,797 | 5,079 | 5,438 | 0,508 | 9 |

Vedlegg F innen- og mellomplatevariasjon for alle plater

For hver plate ble det beregnet gjennomsnitt og SD og CV av de seks målte HK-konsentrasjoner. Platene ble sammenliknet for å vurdere variasjon innenfor og mellom dem.

| | Plate 3 n=6 | Plate 5 n=6 | Plate 6 n=6 | Plate 7 n=6 | Plate 8 n=6 | Plate 9 n=6 | Plate 10 n=6 |
|-------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| Gjennomsnitt (ng/ml) | 8,28 | 8,21 | 8,59 | 8,99 | 8,97 | 7,28 | 7,82 |
| SD (ng/ml) | 0,43 | 0,57 | 0,75 | 0,65 | 0,54 | 0,43 | 0,87 |
| CV% | 5 | 7 | 9 | 7 | 6 | 6 | 11 |

Innenplate CV (%): 7%

Mellomplate CV

| | |
|---------------------|------|
| Gjennomsnitt(ng/ml) | 8,31 |
| SD (ng/ml) | 0,62 |
| CV% | 7 |

| | Plate 11 n=6 | Plate 12 n=4 | Plate 13 n=6 | Plate 14 n=6 |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Gjennomsnitt (ng/ml) | 5,01 | 5,40 | 5,22 | 5,62 |
| SD (ng/ml) | 0,23 | 0,25 | 0,30 | 0,30 |
| CV% | 5 | 5 | 6 | 5 |

Innenplate CV%: 5

Mellomplate CV

| | |
|----------------------|------|
| Gjennomsnitt (ng/ml) | 5,31 |
| SD (ng/ml) | 0,26 |
| CV% | 5 |

Vedlegg G Linearitet

To psoriasispatientprøver ble fortynnet 1:5, 1:10, 1:20 og 1:40 MPO med diluent 27.

PS-FTG 2 (23 ng/ml MPO)

PS-FTG 9 (23 ng/ml MPO)

1:5 fortynning:

40 µl prøve + 160 µl diluent 27

1:10 fortynning:

20 µl prøve + 180 µl diluent 27

1: 20 fortynning:

10 µl prøve + 190 µl diluent 27

1:40 fortynning:

5 µl prøve + 195 µl diluent 27

Fortynning av Psoriasis pasientprøver (PS-FTG 2 og PS-FTG 9) til bestemmelse av linearitet

| Prøve Id, Fortynning | Gjennomsnittlig Signal | Konsentrasjon (pg/ml) | | Gjennomsnittlig konsentrasjon (pg/ml) | SD (pg/ml) | CV % |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------|---|---------------|------|
| | | Parallell1 | Parallell 2 | | | |
| PS 2, 1:5 | 4286 | 4107 | 4133 | 4120 | 18 | 0,4 |
| PS 2, 1:10 | 2119 | 1965 | 2058 | 2011 | 65 | 3,2 |
| PS 2, 1:20 | 942 | 821 | 868 | 845 | 33 | 3,9 |
| PS 2, 1:40 | 584 | 494 | 475 | 485 | 13 | 2,7 |
| PS 9, 1:5 | 2999 | 2945 | 2799 | 2872 | 103 | 3,6 |
| PS 9, 1:10 | 1620 | 1522 | 1517 | 1519 | 3 | 0,2 |
| PS 9, 1: 20 | 761 | 696 | 631 | 663 | 46 | 6,9 |
| PS 9, 1:40 | 473 | 379 | 364 | 372 | 10 | 2,7 |

Vedlegg H MPO hos PS-K

Konsentrasjonene er gitt i ng/ml. CV er i %. Resultater i rød farge har blitt reanalysert på grunn av CV >15%.

| Pasient Id | Konsentrasjon parallel 1 (ng/ml) | Konsentrasjon parallel 2 (ng/ml) | Gjennomsnittlig konsentrasjon (ng/ml) | SD (ng/ml) | CV(%) |
|-------------------|--|--|---|---------------|--------------|
| PS-FTG 50 | 7,18 | 6,92 | 7,05 | 0,18 | 2,6 |
| PS-FTG 51 | 9,33 | 9,40 | 9,37 | 0,05 | 0,5 |
| PS-FTG 52 | 7,06 | 7,4 | 7,23 | 0,24 | 3,3 |
| PS- FTG 53 | 15,24 | 14,56 | 14,90 | 0,48 | 3,2 |
| PS- FTG 54 | 8,21 | 8,89 | 8,55 | 0,48 | 5,6 |
| PS- FTG 55 | 12,39 | 12,18 | 12,29 | 0,15 | 1,2 |
| PS- FTG 56 | 8,98 | 16,91 | 12,95 | 5,61 | 43,3 |
| PS- FTG 56 | 12,21 | 11,90 | 12,06 | 0,22 | 1,8 |
| PS- FTG 57 | 11,14 | 10,74 | 10,94 | 0,28 | 2,6 |
| PS- FTG 58 | 6,24 | 29,19 | 17,72 | 16,23 | 91,6 |
| PS- FTG 58 | 7,91 | 7,66 | 7,79 | 0,18 | 2,3 |
| PS- FTG 59 | 9,47 | 9,50 | 9,49 | 0,02 | 0,2 |
| PS- FTG 60 | 8,35 | 8,74 | 8,55 | 0,28 | 3,2 |
| PS- FTG 61 | 8,29 | 8,41 | 8,35 | 0,08 | 1,0 |
| PS- FTG 62 | 9,72 | 10,13 | 9,93 | 0,29 | 2,9 |
| PS- FTG 63 | 12,08 | 11,86 | 11,97 | 0,16 | 1,3 |
| PS- FTG 64 | 5,04 | 5,60 | 5,32 | 0,40 | 7,4 |
| PS- FTG 65 | 6,33 | 6,26 | 6,30 | 0,05 | 0,8 |
| PS- FTG 66 | 17,10 | 19,25 | 18,18 | 1,52 | 8,4 |
| PS- FTG 67 | 6,94 | 6,19 | 6,57 | 0,53 | 8,1 |
| PS- FTG 68 | 9,91 | 10,43 | 10,17 | 0,37 | 3,6 |
| PS- FTG 69 | 13,02 | 13,89 | 13,46 | 0,62 | 4,6 |
| PS- FTG 70 | 11,1 | 9,22 | 10,16 | 1,33 | 13,08 |
| PS- FTG7 0 | 6,42 | 6,53 | 6,48 | 0,08 | 1,2 |
| PS- FTG 71 | 9,36 | 8,04 | 8,7 | 0,93 | 10,73 |
| PS- FTG 71 | 9,36 | 8,04 | 8,70 | 0,93 | 10,7 |
| PS- FTG 72 | 8,03 | 7,79 | 7,91 | 0,17 | 2,1 |
| PS- FTG 83 | 11,78 | 13,00 | 12,39 | 0,86 | 7,0 |
| PS- FTG 84 | 8,19 | 7,91 | 8,05 | 0,20 | 2,5 |
| PS- FTG 85 | 13,85 | 13,79 | 13,82 | 0,04 | 0,3 |
| PS- FTG 86 | 6,91 | 7,71 | 7,31 | 0,57 | 7,7 |
| PS- FTG 87 | 14,21 | 14,63 | 14,42 | 0,30 | 2,1 |
| PS- FTG 88 | 10,17 | 10,14 | 10,16 | 0,02 | 0,2 |
| PS- FTG 89 | 6,79 | 7,66 | 7,23 | 0,62 | 8,5 |
| PS- FTG 90 | 8,03 | 8,03 | 8,03 | 0,00 | 0,0 |
| PS- FTG 91 | 7,28 | 7,18 | 7,23 | 0,07 | 1,0 |
| PS- FTG 102 | 5,78 | 5,15 | 5,47 | 0,45 | 8,2 |
| PS- FTG 103 | 4,85 | 5,40 | 5,13 | 0,39 | 7,6 |
| PS- FTG 104 | 10,00 | 10,90 | 10,45 | 0,64 | 6,1 |
| PS- FTG 105 | 6,82 | 6,71 | 6,76 | 0,08 | 1,2 |
| PS- FTG 106 | 6,37 | 6,58 | 6,47 | 0,14 | 2,2 |
| PS- FTG 107 | 5,03 | 4,85 | 4,94 | 0,13 | 2,6 |
| PS- FTG 108 | 4,47 | 5,47 | 4,97 | 0,71 | 14,3 |
| PS- FTG 109 | 7,07 | 7,43 | 7,25 | 0,26 | 3,5 |

Vedlegg I MPO hos PS- A

Konsentrasjonene er gitt i ng/ml. CV er gitt i %.

Resultater i rødfarge har blitt reanalysert på grunn av CV >15%.

| Pasient Id | Konsentrasjon parallell 1 (ng/ml) | Konsentrasjon parallell 2 (ng/ml) | Gjennomsnittlig konsentrasjon (ng/ml) | SD (ng/ml) | CV(%) |
|------------------|---|---|---|---------------|-------------|
| PS-FTG 1 | 9,73 | 10,71 | 10,22 | 0,69 | 6,8 |
| PS-FTG 2 | 23,7 | 22,43 | 23,07 | 0,90 | 3,9 |
| PS-FTG 3 | 14,02 | 13,17 | 13,60 | 0,60 | 4,4 |
| PS-FTG 5 | 11,96 | 11,39 | 11,68 | 0,40 | 3,5 |
| PS-FTG 7 | 27,26 | 28,03 | 27,65 | 0,54 | 2,0 |
| PS-FTG 9 | 22,27 | 23,31 | 22,79 | 0,74 | 3,2 |
| PS-FTG 11 | 10,33 | 10,43 | 10,38 | 0,07 | 0,7 |
| PS-FTG 12 | 10,55 | 9,59 | 10,07 | 0,68 | 6,7 |
| PS-FTG 13 | 18,98 | 20,03 | 19,51 | 0,74 | 3,8 |
| PS-FTG 14 | 8,05 | 6,99 | 7,52 | 0,75 | 10,0 |
| PS-FTG 14 | 8,05 | 6,99 | 7,52 | 0,75 | 10,0 |
| PS-FTG 16 | 11,51 | 10,73 | 11,12 | 0,55 | 5,0 |
| PS-FTG 19 | 16,44 | 13,47 | 14,96 | 2,10 | 14,0 |
| PS-FTG 19 | 9,21 | 8,26 | 8,74 | 0,67 | 7,7 |
| PS-FTG 23 | 11,45 | 12,56 | 12,01 | 0,78 | 6,5 |
| PS-FTG 24 | 11,84 | 12,22 | 12,03 | 0,27 | 2,2 |
| PS-FTG 27 | 10,25 | 11,47 | 10,86 | 0,86 | 7,9 |
| PS-FTG 29 | 11,07 | 11,43 | 11,25 | 0,25 | 2,3 |
| PS-FTG 31 | 8,23 | 8,9 | 8,57 | 0,47 | 5,5 |
| PS-FTG 35 | 10,5 | 11,05 | 10,78 | 0,39 | 3,6 |
| PS-FTG 36 | 13,72 | 13,64 | 13,68 | 0,06 | 0,4 |
| PS-FTG 37 | 12,71 | 13,99 | 13,35 | 0,91 | 6,8 |
| PS-FTG 38 | 14,73 | 13,94 | 14,34 | 0,56 | 3,9 |
| PS-FTG 40 | 13,98 | 14,53 | 14,26 | 0,39 | 2,7 |
| PS-FTG 42 | 14,25 | 15,65 | 14,95 | 0,99 | 6,6 |
| PS-FTG 44 | 11,26 | 11,19 | 11,23 | 0,05 | 0,4 |
| PS-FTG 46 | 14,22 | 13,17 | 13,70 | 0,74 | 5,4 |
| PS-FTG 49 | 13,85 | 14,23 | 14,04 | 0,27 | 1,9 |
| PS-FTG 76 | 4,47 | 4,64 | 4,56 | 0,12 | 2,6 |

Vedlegg J MPO hos PS-P

Resultater merket rød har blitt reanalysert på grunn av CV >15%.

| Pasient Id | Konsentrasjon parallell 1 (ng/ml) | Konsentrasjon parallell 2 (ng/ml) | Gjennomsnittlig konsentrasjon (ng/ml) | SD (ng/ml) | CV(%) |
|--------------|---|---|---|---------------|--------------|
| PS-4 | 15,12 | 14,41 | 14,77 | 0,50 | 3,4 |
| PS-6 | 8,46 | 8,56 | 8,51 | 0,07 | 0,8 |
| PS-8 | 19,93 | 20,24 | 20,09 | 0,22 | 1,1 |
| PS-10 | 11,86 | 10,97 | 11,42 | 0,63 | 5,5 |
| PS-15 | 9,02 | 9,67 | 9,35 | 0,46 | 4,9 |
| PS-17 | 8,21 | 7,01 | 7,61 | 0,85 | 11,15 |
| PS-17 | 8,21 | 7,01 | 7,61 | 0,85 | 11,2 |
| PS-18 | 15,45 | 16,48 | 15,97 | 0,73 | 4,6 |
| PS-20 | 13,23 | 13,03 | 13,13 | 0,14 | 1,1 |
| PS-21 | 16,81 | 15,99 | 16,40 | 0,58 | 3,5 |
| PS-22 | 10,91 | 10,47 | 10,69 | 0,31 | 2,9 |
| PS-25 | 15,68 | 15,62 | 15,65 | 0,04 | 0,3 |
| PS-26 | 5,86 | 5,67 | 5,77 | 0,13 | 2,3 |
| PS-28 | 9,75 | 8,90 | 9,33 | 0,60 | 6,4 |
| PS-32 | 13,45 | 14,23 | 13,84 | 0,55 | 4,0 |
| PS-33 | 10,59 | 9,79 | 10,19 | 0,57 | 5,6 |
| PS-34 | 10,70 | 11,81 | 11,26 | 0,78 | 7,0 |
| PS-39 | 7,76 | 8,21 | 7,99 | 0,32 | 4,0 |
| PS-41 | 12,29 | 12,79 | 12,54 | 0,35 | 2,8 |
| PS-43 | 7,68 | 7,34 | 7,51 | 0,24 | 3,2 |
| PS-45 | 9,93 | 9,77 | 9,85 | 0,11 | 1,1 |
| PS-47 | 13,19 | 12,98 | 13,09 | 0,15 | 1,1 |
| PS-48 | 9,91 | 10,50 | 10,21 | 0,42 | 4,1 |
| PS-73 | 10,30 | 10,63 | 10,47 | 0,23 | 2,2 |
| PS-74 | 8,84 | 8,62 | 8,73 | 0,16 | 1,8 |
| PS-75 | 10,51 | 9,68 | 10,10 | 0,59 | 5,8 |
| PS-77 | 12,47 | 13,02 | 12,75 | 0,39 | 3,1 |
| PS-78 | 17,36 | 15,59 | 16,48 | 1,25 | 7,6 |
| PS-79 | 12,43 | 10,33 | 11,38 | 1,48 | 13,0 |
| PS-80 | 10,33 | 10,65 | 10,49 | 0,23 | 2,2 |
| PS-81 | 12,24 | 12,11 | 12,18 | 0,09 | 0,8 |
| PS-82 | 11,95 | 10,99 | 11,47 | 0,68 | 5,9 |
| PS-92 | 7,95 | 7,48 | 7,72 | 0,33 | 4,31 |
| PS-93 | 6,81 | 6,90 | 6,86 | 0,07 | 0,97 |
| PS-94 | 8,76 | 8,77 | 8,76 | 0,01 | 0,08 |
| PS-95 | 6,84 | 6,67 | 6,75 | 0,12 | 1,72 |
| PS-96 | 25,63 | 6,82 | 16,225 | 13,30 | 81,98 |
| PS-96 | 4,55 | 4,74 | 4,64 | 0,13 | 2,85 |
| PS-97 | 4,43 | 4,41 | 4,42 | 0,01 | 0,32 |
| PS-98 | 8,67 | 7,83 | 8,25 | 0,60 | 7,22 |
| PS-99 | 3,39 | 3,07 | 3,23 | 0,23 | 7,08 |
| PS-100 | 12,44 | 11,37 | 11,90 | 0,76 | 6,34 |
| PS-101 | 6,64 | 7,70 | 7,17 | 0,75 | 10,46 |

Vedlegg K MPO hos friske kontroller og nyrepasienter

MPO hos REN-K

| Pasient Id | Konsentrasjon parallell 1 (ng/ml) | Konsentrasjon parallell 2 (ng/ml) | Gjennomsnittlig konsentrasjon (ng/ml) | SD (ng/ml) | CV(%) |
|------------|---|---|---|---------------|-------|
| REN-BM 1 | 13,06 | 13,59 | 13,33 | 0,37 | 3 |
| REN-BM 2 | 16,24 | 14,56 | 15,40 | 1,19 | 8 |
| REN-BM 3 | 8,19 | 8,50 | 8,35 | 0,22 | 3 |
| REN-BM 4 | 9,85 | 10,01 | 9,93 | 0,11 | 1 |
| REN-BM 5 | 14,15 | 12,74 | 13,45 | 1,00 | 7 |
| REN-BM 6 | 13,55 | 13,55 | 13,55 | 0,00 | 0 |
| REN-BM 7 | 8,99 | 9,36 | 9,18 | 0,26 | 3 |
| REN-BM 8 | 12,60 | 12,28 | 12,44 | 0,23 | 2 |
| REN-BM 9 | 10,23 | 10,19 | 10,21 | 0,03 | 0 |
| REN-BM 10 | 36,29 | 36,55 | 36,42 | 0,18 | 1 |
| REN-BM 11 | 13,62 | 13,90 | 13,76 | 0,20 | 1 |
| REN-BM 12 | 20,25 | 20,50 | 20,38 | 0,18 | 1 |
| REN-BM 13 | 8,32 | 8,62 | 8,47 | 0,21 | 3 |
| REN-BM 14 | 9,78 | 9,67 | 9,73 | 0,08 | 1 |
| REN-BM 15 | 5,74 | 5,59 | 5,67 | 0,11 | 2 |
| REN-BM 16 | 8,10 | 8,15 | 8,13 | 0,04 | 0 |
| REN-BM 25 | 9,17 | 9,83 | 9,50 | 0,47 | 5 |
| REN-BM 26 | 11,53 | 10,91 | 11,22 | 0,44 | 4 |
| REN-BM 27 | 12,76 | 13,83 | 13,30 | 0,76 | 6 |
| REN-BM 28 | 8,03 | 7,54 | 7,79 | 0,35 | 4 |
| REN-BM 121 | 5,71 | 6,00 | 5,85 | 0,21 | 4 |
| REN-BM 122 | 4,31 | 4,93 | 4,62 | 0,44 | 10 |
| REN-BM 123 | 6,25 | 6,29 | 6,27 | 0,03 | 0 |
| REN-BM 124 | 6,27 | 6,27 | 6,27 | 0,00 | 0 |
| REN-BM 125 | 9,96 | 11,20 | 10,58 | 0,874 | 8 |
| REN-BM 126 | 10,20 | 8,92 | 9,56 | 0,906 | 9 |
| REN-BM 127 | 8,03 | 7,65 | 7,84 | 0,272 | 3 |
| REN-BM 128 | 8,38 | 9,24 | 8,81 | 0,614 | 7 |
| REN-BM 129 | 5,41 | 4,75 | 5,08 | 0,467 | 9 |

| | | | | | |
|-----------------------|------|------|------|-------|----|
| REN-BM 130 | 3,66 | 4,04 | 3,85 | 0,269 | 7 |
| REN-BM 131 | 5,06 | 4,82 | 4,94 | 0,174 | 4 |
| REN-BM 132 | 7,81 | 6,88 | 7,34 | 0,661 | 9 |
| REN-BM 133 | 7,22 | 6,58 | 6,90 | 0,458 | 7 |
| REN-BM 134 | 8,71 | 9,25 | 8,98 | 0,384 | 4 |
| REN-BM 135 | 6,81 | 7,84 | 7,32 | 0,733 | 10 |

MPO hos REN-D

Prøvene merket med rødt har blitt reanalysert på grunn av høy CV

| Pasient Id | Konsentrasjon parallell 1 (ng/ml) | Konsentrasjon parallell 2 (ng/ml) | Gjennomsnittlig konsentrasjon (ng/ml) | SD (ng/ml) | CV(%) |
|----------------------|--|--|--|-----------------------|--------------|
| REN-MB 17 | 17,41 | 16,36 | 16,89 | 0,74 | 4,4 |
| REN-MB 18 | 13,45 | 13,69 | 13,57 | 0,17 | 1,3 |
| REN-MB 19 | 15,94 | 14,64 | 15,29 | 0,92 | 6,0 |
| REN-BM 20 | 12,54 | 12,95 | 12,75 | 0,29 | 2,3 |
| REN-BM 21 | 7,55 | 8,44 | 8,00 | 0,63 | 7,9 |
| REN-BM 22 | 15,08 | 14,57 | 14,83 | 0,36 | 2,4 |
| REN-BM 23 | 13,25 | 14,56 | 13,91 | 0,93 | 6,7 |
| REN-BM 24 | 14,06 | 13,82 | 13,94 | 0,17 | 1,2 |
| REN-BM 29 | 11,17 | 10,94 | 11,055 | 0,16 | 1,5 |
| REN-BM 30 | 12,6 | 13,43 | 13,015 | 0,59 | 4,5 |
| REN-BM 31 | 10,15 | 9,56 | 9,855 | 0,42 | 4,2 |
| REN-BM 32 | 13,34 | 14,13 | 13,735 | 0,56 | 4,1 |
| REN-BM 33 | 11,99 | 11,51 | 11,75 | 0,34 | 2,9 |
| REN-BM 34 | 13,79 | 10,63 | 12,21 | 2,23 | 18,3 |
| REN-BM 34 | 10,15 | 9,87 | 10,01 | 0,20 | 2,0 |
| REN-BM 35 | 18,28 | 13,81 | 16,045 | 3,16 | 19,7 |
| REN-BM 35 | 12,85 | 12,38 | 12,615 | 0,33 | 2,6 |
| REN-BM 36 | 15,99 | 16,62 | 16,305 | 0,45 | 2,7 |

| | | | | | |
|------------------|-------|-------|--------|------|------|
| REN-BM37 | 9,71 | 14,79 | 12,25 | 3,59 | 29,3 |
| REN-BM 37 | 9,28 | 8,35 | 8,815 | 0,66 | 7,5 |
| REN-BM 38 | 22,51 | 11,45 | 16,98 | 7,82 | 46,1 |
| REN-BM 38 | 11,83 | 12,27 | 12,05 | 0,31 | 2,6 |
| REN-BM 39 | 8,67 | 8,65 | 8,66 | 0,01 | 0,2 |
| REN-BM 40 | 8,63 | 8,18 | 8,405 | 0,32 | 3,8 |
| REN-BM 41 | 7,62 | 7,58 | 7,6 | 0,03 | 0,4 |
| REN-BM 42 | 14,8 | 15,34 | 15,07 | 0,38 | 2,5 |
| REN-BM 43 | 14,47 | 14,28 | 14,38 | 0,13 | 0,9 |
| REN-BM 50 | 5,74 | 6,36 | 6,05 | 0,44 | 7,2 |
| REN-BM 51 | 20,12 | 18,14 | 19,13 | 1,40 | 7,3 |
| REN-BM 52 | 13,09 | 12,34 | 12,715 | 0,53 | 4,2 |
| REN-BM 53 | 16,01 | 18,61 | 17,31 | 1,84 | 10,6 |
| REN-BM 64 | 11,37 | 11,78 | 11,575 | 0,29 | 2,5 |
| REN-BM 65 | 9,34 | 9,58 | 9,46 | 0,17 | 1,8 |
| REN-BM 66 | 6,72 | 7,38 | 7,05 | 0,47 | 6,6 |
| REN-BM 67 | 8,48 | 8,67 | 8,575 | 0,13 | 1,6 |
| REN-BM 68 | 9,55 | 10 | 9,775 | 0,32 | 3,3 |
| REN-BM 69 | 11,72 | 11,74 | 11,73 | 0,01 | 0,1 |
| REN-BM 70 | 41,18 | 37,53 | 39,355 | 2,58 | 6,6 |
| REN-BM 71 | 46,6 | 46,27 | 46,435 | 0,23 | 0,5 |
| REN-BM 72 | 11,39 | 11,58 | 11,485 | 0,13 | 1,2 |
| REN-BM 73 | 12,6 | 12,09 | 12,345 | 0,36 | 2,9 |
| REN-BM 78 | 9,87 | 10,36 | 10,115 | 0,35 | 3,4 |
| REN-BM 79 | 14,14 | 14,48 | 14,31 | 0,24 | 1,7 |
| REN-BM 80 | 4,57 | 5 | 4,785 | 0,30 | 6,4 |

MPO hos RTX

Prøvene merket med høyfarge ble reanalysert på grunn av CV >15%.

| Pasient Id | Konsentrasjon parallell 1 (ng/ml) | Konsentrasjon parallell 2 (ng/ml) | Gjennomsnittlig konsentrasjon (ng/ml) | SD (ng/ml) | CV(%) |
|---------------|---|---|---|---------------|--------------|
| RTX-1 | 37,99 | 31,35 | 34,67 | 4,7 | 13,5 |
| RTX-1 | 10,09 | 10,39 | 10,24 | 0,2 | 2,0 |
| RTX-2 | 8,89 | 8,73 | 8,81 | 0,1 | 1,2 |
| RTX-3 | 12,17 | 12,74 | 12,46 | 0,4 | 3,3 |
| RTX-4 | 5,70 | 6,19 | 5,94 | 0,3 | 5,9 |
| RTX-5 | 31,95 | 31,48 | 31,72 | 0,3 | 1,1 |
| RTX-6 | 14,20 | 14,21 | 14,21 | 0,0 | 0,0 |
| RTX-7 | 5,88 | 5,52 | 5,70 | 0,3 | 4,5 |
| RTX-8 | 6,39 | 6,67 | 6,53 | 0,2 | 3,1 |
| RTX-9 | 6,51 | 6,54 | 6,52 | 0,0 | 0,4 |
| RTX-10 | 7,78 | 8,17 | 7,98 | 0,3 | 3,4 |
| RTX-11 | 8,42 | 8,06 | 8,24 | 0,3 | 3,1 |
| RTX-12 | 6,22 | 6,47 | 6,34 | 0,2 | 2,9 |
| RTX-13 | 13,59 | 14,87 | 14,23 | 0,9 | 6,4 |
| RTX-14 | 7,86 | 8,05 | 7,96 | 0,1 | 1,7 |
| RTX-15 | 5,85 | 6,08 | 5,97 | 0,2 | 2,7 |
| RTX-16 | 9,49 | 8,92 | 9,20 | 0,4 | 4,4 |
| RTX-17 | 5,85 | 5,49 | 5,67 | 0,3 | 4,6 |
| RTX-18 | 13,47 | 14,44 | 13,96 | 0,7 | 4,9 |
| RTX-19 | 3,94 | 3,65 | 3,80 | 0,2 | 5,4 |
| RTX-20 | 5,15 | 4,77 | 4,96 | 0,3 | 5,4 |
| RTX-21 | 9,78 | 10,45 | 10,12 | 0,5 | 4,6 |
| RTX-22 | 10,84 | 11,29 | 11,07 | 0,3 | 2,9 |
| RTX-23 | 8,04 | 8,79 | 8,41 | 0,5 | 6,3 |
| RTX-24 | 84,84 | 99,7 | 92,27 | 10,51 | 11,39 |
| RTX-24 | 8,24 | 8,92 | 8,58 | 0,5 | 5,6 |
| RTX-25 | 5,04 | 5,26 | 5,15 | 0,2 | 3,1 |
| RTX-26 | 18,00 | 17,86 | 17,93 | 0,1 | 0,5 |
| RTX-27 | 4,89 | 5,51 | 5,20 | 0,4 | 8,5 |
| RTX-28 | 99 | 78,31 | 88,655 | 14,63 | 16,50 |
| RTX-28 | 17,13 | 12,56 | 14,85 | 3,2 | 21,8 |
| RTX-29 | 2,86 | 2,83 | 2,84 | 0,0 | 0,6 |
| RTX-30 | 11,48 | 11,79 | 11,63 | 0,2 | 1,9 |
| RTX-31 | 7,84 | 8,19 | 8,01 | 0,2 | 3,1 |
| RTX-32 | 11,52 | 12,48 | 12,00 | 0,7 | 5,6 |
| RTX-33 | 9,30 | 10,00 | 9,65 | 0,5 | 5,2 |
| RTX-34 | 13,76 | 13,62 | 13,69 | 0,1 | 0,7 |
| RTX-35 | 11,17 | 10,60 | 10,89 | 0,4 | 3,7 |
| RTX-36 | 13,05 | 12,45 | 12,75 | 0,4 | 3,3 |
| RTX-37 | 4,61 | 4,42 | 4,52 | 0,1 | 3,0 |
| RTX-38 | 4,89 | 4,49 | 4,69 | 0,3 | 6,0 |
| RTX-39 | 5,18 | 5,17 | 5,18 | 0,0 | 0,1 |
| RTX-40 | 10,00 | 9,92 | 9,96 | 0,1 | 0,6 |
| RTX-41 | 10,68 | 10,39 | 10,54 | 0,2 | 1,9 |
| RTX-42 | 11,02 | 11,25 | 11,14 | 0,2 | 1,5 |
| RTX-43 | 5,30 | 5,43 | 5,37 | 0,1 | 1,7 |

MPO hos REN-3

Resultater merket med rødfarge viser de prøvene som ble reanalysert på grunn av CV >15 %.

| Pasient Id | Konsentrasjon parallell 1 (ng/ml) | Konsentrasjon parallell 2 (ng/ml) | Gjennomsnittlig konsentrasjon (ng/ml) | SD (ng/ml) | CV(%) |
|-----------------------|---|---|---|---------------|-------------|
| REN-BM 81 | 22,97 | 25,66 | 24,32 | 1,9 | 7,8 |
| REN-BM 82 | 9,40 | 8,35 | 8,88 | 0,7 | 8,4 |
| REN-BM 84 | 9,62 | 9,74 | 9,68 | 0,1 | 0,9 |
| REN-BM 87 | 7,34 | 7,75 | 7,55 | 0,3 | 3,8 |
| REN-BM 88 | 16,20 | 15,22 | 15,71 | 0,7 | 4,4 |
| REN-BM 91 | 21,57 | 23,32 | 22,45 | 1,2 | 5,5 |
| REN-BM 92 | 14,64 | 14,64 | 14,64 | 0,0 | 0,0 |
| REN-BM 94 | 17,54 | 18,62 | 18,08 | 0,8 | 4,2 |
| REN-BM 95 | 15,32 | 13,56 | 14,44 | 1,2 | 8,6 |
| REN-BM 96 | 10,92 | 11,12 | 11,02 | 0,1 | 1,3 |
| REN-BM 98 | 7,41 | 6,73 | 7,07 | 0,5 | 6,8 |
| REN-BM 99 | 16,20 | 14,49 | 15,35 | 1,2 | 7,9 |
| REN-BM 101 | 13,66 | 9,02 | 11,34 | 3,3 | 28,9 |
| REN-BM 101 | 7,74 | 8,56 | 8,15 | 0,6 | 7,1 |
| REN-BM 102 | 16,48 | 18,18 | 17,33 | 1,2 | 6,9 |
| REN-BM 104 | 20,98 | 19,24 | 20,11 | 1,2 | 6,1 |
| REN-BM 105 | 10,60 | 11,88 | 11,24 | 0,9 | 8,1 |
| REN-BM 107 | 10,29 | 11,23 | 10,76 | 0,7 | 6,2 |
| REN-BM 109 | 16,42 | 16,14 | 16,28 | 0,2 | 1,2 |
| REN-BM 111 | 19,33 | 18,32 | 18,83 | 0,7 | 3,8 |
| REN-BM 113 | 13,51 | 12,67 | 13,09 | 0,6 | 4,5 |
| REN-BM 115 | 12,77 | 12,86 | 12,82 | 0,1 | 0,5 |

MPO REN-4

Prøvene merket med rødt har blitt reanalysert på grunn av høy CV(%).

| Pasient Id | Konsentrasjon parallell 1 (ng/ml) | Konsentrasjon parallell 2 (ng/ml) | Gjennomsnittlig konsentrasjon (ng/ml) | SD (ng/ml) | CV(%) |
|-----------------------|---|---|---|---------------|--------------|
| REN-BM 83 | 15,74 | 15,63 | 15,69 | 0,08 | 0,5 |
| REN-BM 85 | 11,91 | 11,84 | 11,88 | 0,05 | 0,4 |
| REN-BM 86 | 14,41 | 13,94 | 14,18 | 0,33 | 2,3 |
| REN-BM 89 | 9,43 | 7,79 | 8,61 | 1,16 | 13,5 |
| REN-BM 89 | 4,92 | 5,29 | 5,11 | 0,26 | 5,0 |
| REN-BM 90 | 19,31 | 19,66 | 19,49 | 0,25 | 1,3 |
| REN-BM 93 | 16,01 | 16,68 | 16,35 | 0,47 | 2,9 |
| REN-BM 97 | 16,85 | 17,88 | 17,37 | 0,73 | 4,2 |
| REN-BM 100 | 41,13 | 34,58 | 37,855 | 4,63 | 12,23 |
| REN-BM 100 | 22,52 | 23,17 | 22,84 | 0,46 | 2,0 |
| REN-BM 103 | 13,16 | 13,49 | 13,32 | 0,23 | 1,7 |
| REN-BM 106 | 9,82 | 9,53 | 9,68 | 0,21 | 2,2 |
| REN-BM 108 | 13,83 | 17,26 | 15,545 | 2,43 | 15,60 |
| REN-BM 108 | 9,53 | 9,64 | 9,58 | 0,08 | 0,8 |
| REN-BM 112 | 4,78 | 5,26 | 5,02 | 0,34 | 6,8 |
| REN-BM 114 | 6,50 | 5,21 | 5,86 | 0,91 | 15,6 |
| REN-BM 116 | 11,95 | 12,12 | 12,04 | 0,12 | 1,0 |
| REN-BM 117 | 5,03 | 4,59 | 4,81 | 0,31 | 6,4 |
| REN-BM 118 | 9,98 | 9,65 | 9,82 | 0,24 | 2,4 |
| REN-BM 119 | 8,04 | 8,38 | 8,21 | 0,24 | 2,9 |
| REN-BM 120 | 8,48 | 8,47 | 8,47 | 0,01 | 0,1 |

MPO hos REN-5

Prøvene merket med rødt har blitt reanalysert på grunn av høy CV

| Pasient Id | Konsentrasjon parallell 1 (ng/ml) | Konsentrasjon parallell 2 (ng/ml) | Gjennomsnittlig konsentrasjon (ng/ml) | SD (ng/ml) | CV(%) |
|--------------|---|---|---|---------------|-------|
| REN-BM 44 | 23,10 | 23,59 | 23,35 | 0,35 | 1,5 |
| REN-BM 45 | 8,00 | 7,17 | 7,59 | 0,59 | 7,7 |
| REN-BM 46 | 11,13 | 11,13 | 11,13 | 0,00 | 0,0 |
| REN-BM 47 | 17,26 | 18,10 | 17,68 | 0,59 | 3,4 |
| REN-BM 48 | 15,90 | 14,68 | 15,29 | 0,86 | 5,6 |
| REN-BM 49 | 45,95 | 43,75 | 44,85 | 1,56 | 3,5 |
| REN-BM 54 | 24,28 | 27,89 | 26,09 | 2,55 | 9,8 |
| REN-BM 55 | 12,87 | 13,19 | 13,03 | 0,23 | 1,7 |
| REN-BM 56 | 10,13 | 10,41 | 10,27 | 0,20 | 1,9 |
| REN-BM 57 | 6,81 | 7,69 | 7,25 | 0,62 | 8,6 |
| REN-BM 58 | 15,70 | 16,34 | 16,02 | 0,45 | 2,8 |
| REN-BM 59 | 15,59 | 16,11 | 15,85 | 0,37 | 2,3 |
| REN-BM 60 | 14,49 | 13,07 | 13,78 | 1,00 | 7,3 |
| REN-BM 61 | 5,67 | 6,08 | 5,88 | 0,29 | 4,9 |
| REN-BM 62 | 6,01 | 6,40 | 6,21 | 0,28 | 4,4 |
| REN-BM 63 | 20,31 | 20,35 | 20,33 | 0,03 | 0,1 |
| REN-BM 74 | 23,56 | 22,87 | 23,22 | 0,49 | 2,1 |
| REN-BM 75 | 6,95 | 6,75 | 6,85 | 0,14 | 2,1 |
| REN-BM 76 | 12,01 | 13,38 | 12,70 | 0,97 | 7,6 |
| REN-BM 77 | 12,44 | 13,84 | 13,14 | 0,99 | 7,5 |

Vedlegg L AOPP kontrollkort

Alle målte AOPP-konsentrasjoner målt hos HK er ført inn i tabellen nedenfor. Resultater merket med rødfarge fikk lavere konsentrasjoner enn de andre målingene.

| Dato | Plate nr | Parallell 1 ($\mu\text{mol/l}$) | Parallell 2 ($\mu\text{mol/l}$) | Parallell 3 ($\mu\text{mol/l}$) | Gjennomsnitt ($\mu\text{mol/l}$) | SD ($\mu\text{mol/l}$) | CV(%) |
|------------|----------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|-------|
| 14.01.2014 | 1 | 59,43 | 63,81 | 62,83 | 62,02 | 2,30 | 3,7 |
| 14.01.2014 | 1 | 62,18 | 66,19 | 65,49 | 64,62 | 2,14 | 3,3 |
| 14.01.2014 | 1 | 65,95 | 66,14 | 67,49 | 66,53 | 0,84 | 1,3 |
| 14.01.2014 | 2 | 59,00 | 66,00 | 62,00 | 62,33 | 3,51 | 5,6 |
| 14.01.2014 | 2 | 61,00 | 67,00 | 64,00 | 64,00 | 3,00 | 4,7 |
| 14.01.2014 | 2 | 64,00 | 63,00 | 61,00 | 62,67 | 1,53 | 2,4 |
| 16.01.2014 | 3 | 53,73 | 58,67 | 57,19 | 56,53 | 2,54 | 4,5 |
| 16.01.2014 | 3 | 54,35 | 56,51 | 56,56 | 55,81 | 1,26 | 2,3 |
| 16.01.2014 | 3 | 57,54 | 56,29 | 51,57 | 55,13 | 3,15 | 5,7 |
| 16.01.2014 | 4 | 61,02 | 62,90 | 62,63 | 62,18 | 1,02 | 1,6 |
| 16.01.2014 | 4 | 62,95 | 64,82 | 63,62 | 63,80 | 0,95 | 1,5 |
| 16.01.2014 | 4 | 55,71 | 60,18 | 58,57 | 58,15 | 2,26 | 3,9 |
| 22.01.2014 | 5 | 53,80 | 56,24 | 51,91 | 53,98 | 2,17 | 4,0 |
| 22.01.2014 | 5 | 54,81 | 56,91 | 54,56 | 55,43 | 1,29 | 2,3 |
| 22.01.2014 | 5 | 40,16 | 38,73 | 34,24 | 37,71 | 3,09 | 8,2 |
| 22.01.2014 | 6 | 58,90 | 57,62 | 58,81 | 58,44 | 0,71 | 1,2 |
| 22.01.2014 | 6 | 58,81 | 58,68 | 52,28 | 56,59 | 3,73 | 6,6 |
| 22.01.2014 | 6 | 38,79 | 35,93 | 52,50 | 42,41 | 8,86 | 20,9 |
| 23.01.2014 | 7 | 56,53 | 56,99 | 40,05 | 51,19 | 9,65 | 18,9 |
| 23.01.2014 | 7 | 58,36 | 58,11 | 38,76 | 51,74 | 11,24 | 21,7 |
| 23.01.2014 | 7 | 38,76 | 38,68 | 33,59 | 37,01 | 2,96 | 8,0 |
| 23.01.2014 | 8 | 56,39 | 56,43 | 53,14 | 55,32 | 1,89 | 3,4 |
| 23.01.2014 | 8 | 57,44 | 57,31 | 53,10 | 55,95 | 2,47 | 4,4 |
| 23.01.2014 | 8 | 33,81 | 41,48 | 37,77 | 37,69 | 3,84 | 10,2 |
| 24.01.2014 | 9 | 61,23 | 61,02 | 58,83 | 60,36 | 1,33 | 2,2 |
| 24.01.2014 | 9 | 60,56 | 62,30 | 59,53 | 60,80 | 1,40 | 2,3 |
| 24.01.2014 | 9 | 59,24 | 60,73 | 55,89 | 58,62 | 2,48 | 4,2 |
| 24.01.2014 | 10 | 51,49 | 51,21 | 47,37 | 50,02 | 2,30 | 4,6 |
| 24.01.2014 | 10 | 55,46 | 54,07 | 50,05 | 53,19 | 2,81 | 5,3 |
| 24.01.2014 | 10 | 52,41 | 54,07 | 49,78 | 52,09 | 2,16 | 4,2 |
| 30.01.2014 | 11 | 55,20 | 55,15 | 52,18 | 54,18 | 1,73 | 3,2 |
| 30.01.2014 | 11 | 54,58 | 55,15 | 51,06 | 53,60 | 2,22 | 4,1 |
| 30.01.2014 | 11 | 51,77 | 53,25 | 49,16 | 51,39 | 2,07 | 4,0 |
| 30.01.2014 | 12 | 56,64 | 56,44 | 53,94 | 55,67 | 1,50 | 2,7 |
| 30.01.2014 | 12 | 56,19 | 56,60 | 53,86 | 55,55 | 1,48 | 2,7 |
| 30.01.2014 | 12 | 51,68 | 54,62 | 50,19 | 52,16 | 2,25 | 4,3 |
| 30.01.2014 | 13 | 54,62 | 55,03 | 52,29 | 53,98 | 1,48 | 2,7 |

| | | | | | | | |
|------------|----|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 30.01.2014 | 13 | 55,92 | 56,21 | 51,72 | 54,62 | 2,51 | 4,6 |
| 30.01.2014 | 13 | 54,29 | 56,58 | 52,87 | 54,58 | 1,87 | 3,4 |
| 25.02.2014 | 14 | 36,98 | 38,89 | 35,86 | 37,24 | 1,53 | 4,1 |
| 25.02.2014 | 14 | 32,14 | 38,04 | 38,09 | 36,09 | 3,42 | 9,5 |
| 25.02.2014 | 14 | 37,78 | 38,79 | 34,90 | 37,16 | 2,02 | 5,4 |
| 25.02.2014 | 15 | 42,28 | 45,80 | 38,03 | 42,04 | 3,89 | 9,3 |
| 25.02.2014 | 15 | 57,70 | 39,75 | 35,47 | 44,31 | 11,79 | 26,6 |
| 25.02.2014 | 15 | 46,65 | 41,01 | 36,48 | 41,38 | 5,10 | 12,3 |
| 12.03.2014 | 16 | 58,53 | 58,49 | 58,24 | 58,42 | 0,16 | 0,3 |
| 12.03.2014 | 16 | 57,28 | 58,07 | 58,03 | 57,79 | 0,45 | 0,8 |
| 12.03.2014 | 16 | 57,57 | 58,41 | 55,66 | 57,21 | 1,41 | 2,5 |
| 14.03.2014 | 17 | 57,82 | 54,96 | 54,58 | 55,79 | 1,77 | 3,2 |
| 14.03.2014 | 17 | 57,48 | 57,09 | 56,41 | 56,99 | 0,54 | 1,0 |
| 14.03.2014 | 17 | 53,72 | 53,94 | 54,36 | 54,01 | 0,33 | 0,6 |
| 27.03.2014 | 18 | 58,92 | 57,10 | 56,81 | 57,61 | 1,14 | 2,0 |
| 27.03.2014 | 18 | 59,51 | 59,30 | 57,65 | 58,82 | 1,02 | 1,7 |
| 27.03.2014 | 18 | 58,08 | 58,08 | 56,51 | 57,56 | 0,91 | 1,6 |

Vedlegg M AOPP hos PS-K

| Pasient Id | Absorbans ($\mu\text{mol/l}$) | Gjennomsnitt konsentrasjon ($\mu\text{mol/l}$) | SD ($\mu\text{mol/l}$) | CV% |
|------------|------------------------------------|--|-----------------------------|-----|
| PS-50 | 0.186 | 61 | 2 | 3 |
| PS-51 | 0.167 | 53 | 2 | 4 |
| PS-52 | 0.119 | 32 | 1 | 4 |
| PS-53 | 0.227 | 81 | 8 | 9 |
| PS-54 | 0.157 | 48 | 3 | 6 |
| PS-55 | 0.227 | 80 | 3 | 4 |
| PS-56 | 0.177 | 58 | 2 | 3 |
| PS-57 | 0.187 | 62 | 2 | 4 |
| PS-58 | 0.155 | 48 | 2 | 4 |
| PS-59 | 0.165 | 52 | 2 | 4 |
| PS-60 | 0.205 | 71 | 5 | 6 |
| PS-61 | 0.186 | 63 | 3 | 5 |
| PS-62 | 0.164 | 57 | 1 | 1 |
| PS-63 | 0.894 | 383 | 18 | 5 |
| PS-64 | 0.311 | 117 | 6 | 5 |
| PS-65 | 0.149 | 51 | 1 | 2 |
| PS-66 | 0.183 | 66 | 2 | 3 |
| PS-67 | 0.148 | 50 | 2 | 4 |
| PS-68 | 0.147 | 49 | 1 | 3 |
| PS-69 | 0.447 | 184 | 7 | 4 |
| PS-70 | 0.167 | 59 | 2 | 4 |
| PS-71 | 0.140 | 46 | 1 | 3 |
| PS-72 | 0.190 | 69 | 2 | 3 |
| PS-83 | 0.146 | 46 | 2 | 4 |
| PS-84 | 0.281 | 102 | 3 | 3 |
| PS-85 | 0.202 | 69 | 2 | 2 |
| PS-86 | 0.149 | 47 | 1 | 3 |
| PS-87 | 0.661 | 263 | 1 | 3 |
| PS-88 | 0.117 | 33 | 4 | 12 |
| PS-89 | 0.189 | 63 | 1 | 2 |
| PS-90 | 0.158 | 53 | 1 | 1 |
| PS-91 | 0.159 | 53 | 2 | 3 |
| PS-102 | 0.131 | 40 | 0 | 1 |
| PS-103 | 0.140 | 44 | 0 | 0 |
| PS-104 | 0.208 | 72 | 1 | 1 |
| PS-105 | 0.159 | 52 | 1 | 1 |
| PS-106 | 0.145 | 46 | 0 | 1 |
| PS-107 | 0.147 | 46 | 0 | 1 |
| PS-108 | 0.103 | 28 | 1 | 2 |
| PS-109 | 0.165 | 54 | 1 | 1 |

Vedlegg N AOPP hos PS-P

| Pasient Id | Absorbans ($\mu\text{mol/l}$) | Gjennomsnitt | | CV% |
|------------|------------------------------------|--|--------------------------|-----|
| | | Konsentrasjon (n=3) ($\mu\text{mol/l}$) | SD ($\mu\text{mol/l}$) | |
| PS-4 | 0.33 | 137 | 4 | 3 |
| PS-6 | 0.258 | 103 | 2 | 2 |
| PS-8 | 0.282 | 114 | 4 | 3 |
| PS-10 | 0.138 | 47 | 2 | 3 |
| PS-15 | 0.287 | 117 | 6 | 5 |
| PS-17 | 0.417 | 177 | 5 | 3 |
| PS-18 | 0.274 | 110 | 4 | 3 |
| PS-20 | 0.185 | 69 | 1 | 1 |
| PS-21 | 0.234 | 90 | 2 | 2 |
| PS-22 | 0.159 | 54 | 1 | 2 |
| PS-25 | 0.350 | 146 | 4 | 3 |
| PS-26 | 0.706 | 317 | 4 | 1 |
| PS-28 | 0.162 | 56 | 2 | 3 |
| PS-32 | 0.167 | 58 | 1 | 2 |
| PS-33 | 0.172 | 60 | 2 | 3 |
| PS-34 | 0.134 | 42 | 2 | 4 |
| PS-39 | 0.202 | 75 | 3 | 4 |
| PS-41 | 0.171 | 60 | 2 | 3 |
| PS-43 | 0.751 | 300 | 7 | 2 |
| PS-45 | 0.199 | 68 | 0 | 0 |
| PS-47 | 0.168 | 54 | 1 | 1 |
| PS-48 | 0.204 | 70 | 5 | 7 |
| PS-73 | 0.213 | 79 | 2 | 2 |
| PS-74 | 0.144 | 48 | 1 | 3 |
| PS-75 | 0.181 | 65 | 4 | 6 |
| PS-77 | 0.144 | 48 | 2 | 5 |
| PS-78 | 0.150 | 51 | 2 | 3 |
| PS-79 | 0.140 | 46 | 4 | 8 |
| PS-80 | 0.324 | 129 | 5 | 4 |
| PS-81 | 0.144 | 48 | 0 | 1 |
| PS-82 | 0.168 | 55 | 2 | 4 |
| PS-92 | 0.166 | 56 | 1 | 3 |
| PS-93 | 0.182 | 62 | 5 | 9 |
| PS-94 | 0.166 | 56 | 3 | 5 |
| PS-95 | 0.166 | 55 | 1 | 1 |
| PS-96 | 0.330 | 125 | 2 | 2 |

Vedlegg O AOPP hos PS-A

| Pasient Id | Absorbans ($\mu\text{mol/l}$) | Gjennomsnittlig | | CV% |
|------------|------------------------------------|---|--------------------------|-----|
| | | Konsentrasjon (n= 3) ($\mu\text{mol/l}$) | SD ($\mu\text{mol/l}$) | |
| PS-1 | 0.145 | 45 | 5 | 11 |
| PS-2 | 0.155 | 55 | 1 | 2 |
| PS-3 | 0.235 | 92 | 2 | 2 |
| PS-5 | 0.245 | 97 | 4 | 4 |
| PS-7 | 0.182 | 68 | 2 | 3 |
| PS-9 | 0.149 | 52 | 2 | 4 |
| PS-11 | 0.197 | 75 | 2 | 3 |
| PS-12 | 0.191 | 72 | 3 | 3 |
| PS-13 | 0.157 | 56 | 3 | 6 |
| PS-14 | 0.145 | 50 | 1 | 3 |
| PS-16 | 0.125 | 40 | 1 | 2 |
| PS-19 | 0.164 | 59 | 2 | 3 |
| PS-23 | 0.176 | 62 | 2 | 3 |
| PS-24 | 0.211 | 79 | 0 | 1 |
| PS-27 | 0.229 | 88 | 3 | 4 |
| PS-29 | 0.415 | 177 | 4 | 2 |
| PS-31 | 0.137 | 44 | 3 | 7 |
| PS-35 | 0.158 | 54 | 3 | 5 |
| PS-36 | 0.929 | 424 | 22 | 5 |
| PS-37 | 0.319 | 131 | 6 | 5 |
| PS-38 | 0.186 | 67 | 1 | 2 |
| PS-40 | 0.235 | 91 | 2 | 2 |
| PS-42 | 0.221 | 78 | 2 | 3 |
| PS-44 | 0.139 | 41 | 1 | 2 |
| PS-46 | 0.197 | 67 | 1 | 2 |
| PS-49 | 0.229 | 81 | 5 | 6 |
| PS-76 | 0.140 | 46 | 3 | 6 |

Vedlegg P AOPP hos REN-K

| Pasient Id | Absorbans ($\mu\text{mol/l}$) | Gjennomsnitts Konsentrasjon (n=3) ($\mu\text{mol/l}$) | SD ($\mu\text{mol/l}$) | CV% |
|------------|------------------------------------|--|-----------------------------|-----|
| REN-1 | 0.183 | 63 | 2 | 3 |
| REN-2 | 0.158 | 50 | 1 | 2 |
| REN-3 | 0.140 | 43 | 1 | 2 |
| REN-4 | 0.124 | 36 | 1 | 2 |
| REN-5 | 0.104 | 28 | 0 | 1 |
| REN-6 | 0.751 | 299 | 20 | 7 |
| REN-7 | 0.093 | 55 | 1 | 2 |
| REN-8 | 0.140 | 42 | 0 | 1 |
| REN-9 | 0.131 | 38 | 1 | 2 |
| REN-10 | 0.518 | 205 | 9 | 4 |
| REN-11 | 0.199 | 69 | 3 | 4 |
| REN-12 | 0.201 | 70 | 3 | 5 |
| REN-13 | 0.126 | 38 | 1 | 3 |
| REN-14 | 0.128 | 39 | 1 | 2 |
| REN-15 | 0.134 | 41 | 5 | 13 |
| REN-16 | 0.131 | 42 | 2 | 5 |
| REN-25 | 0.170 | 57 | 3 | 6 |
| REN-26 | 0.124 | 37 | 2 | 5 |
| REN-27 | 0.191 | 66 | 7 | 10 |
| REN-28 | 0.130 | 40 | 3 | 8 |
| REN-121 | 0.166 | 56 | 0 | 0 |
| REN-122 | 0.147 | 48 | 0 | 1 |
| REN-123 | 0.18 | 61 | 1 | 2 |
| REN-124 | 0.206 | 72 | 3 | 4 |
| REN-125 | 0.294 | 110 | 1 | 1 |
| REN-126 | 0.338 | 129 | 2 | 2 |
| REN-127 | 0.194 | 68 | 1 | 1 |
| REN-128 | 0.286 | 106 | 10 | 9 |
| REN-129 | 0.405 | 157 | 4 | 2 |
| REN-130 | 0.272 | 100 | 0 | 0 |
| REN-131 | 0.176 | 60 | 2 | 4 |
| REN-132 | 0.203 | 71 | 1 | 2 |
| REN-133 | 0.371 | 142 | 1 | 1 |
| REN-134 | 0.296 | 111 | 1 | 1 |
| REN-135 | 0.302 | 113 | 2 | 1 |

Vedlegg Q AOPP REN-D

| Pasient Id | Absorbans ($\mu\text{mol/l}$) | Gjennomsnitt Konsentrasjon (n=3) ($\mu\text{mol/l}$) | SD ($\mu\text{mol/l}$) | CV% |
|-------------------|---|--|--|------------|
| REN-17 | 0.206 | 73 | 2 | 2 |
| REN-18 | 0.116 | 34 | 3 | 8 |
| REN- 19 | 0.198 | 69 | 2 | 3 |
| REN-20 | 0.243 | 88 | 2 | 3 |
| REN-21 | 0.612 | 246 | 4 | 2 |
| REN-22 | 0.359 | 138 | 4 | 3 |
| REN-23 | 0.273 | 101 | 3 | 3 |
| REN-24 | 0.148 | 48 | 2 | 5 |
| REN-29 | 0.182 | 63 | 2 | 2 |
| REN-30 | 0.212 | 73 | 1.5 | 2.0 |
| REN-31 | 0.135 | 41 | 1.6 | 3.8 |
| REN-32 | 0.210 | 72 | 7.7 | 10.6 |
| REN-33 | 0.619 | 243 | 8.0 | 3.3 |
| REN-34 | 0.272 | 98 | 3.1 | 3.1 |
| REN-35 | 0.202 | 69 | 3.5 | 5.1 |
| REN-36 | 0.37 | 141 | 1 | 1 |
| REN-37 | 0.326 | 121 | 10.0 | 8.3 |
| REN-38 | 0.136 | 42 | 3.0 | 7.3 |
| REN-39 | 0.115 | 33 | 2.9 | 8.8 |
| REN-40 | 0.177 | 61 | 1 | 1 |
| REN-41 | 0.229 | 82 | 2 | 2 |
| REN-42 | 0.223 | 78 | 2.1 | 2.7 |
| REN-43 | 0.717 | 284 | 6.0 | 2.1 |
| REN-50 | 0.177 | 58 | 1 | 2 |
| REN-51 | 0.190 | 65 | 3 | 4 |
| REN-52 | 0.164 | 53 | 2 | 4 |
| REN-53 | 0.229 | 81 | 2 | 3 |
| REN-64 | 0.196 | 67 | 5 | 8 |
| REN-65 | 0.107 | 29 | 1 | 5 |
| REN-66 | 0.119 | 34 | 1 | 3 |
| REN-67 | 0.368 | 139 | 12 | 9 |
| REN-68 | 0.152 | 49 | 2 | 4 |
| REN-69 | 0.185 | 62 | 5 | 8 |
| REN-70 | 0.291 | 109 | 4 | 3 |
| REN-71 | 0.171 | 59 | 2 | 3 |
| REN-72 | 0.578 | 227 | 6 | 3 |
| REN-73 | 0.174 | 60 | 2 | 3 |
| REN-78 | 0.159 | 50 | 1 | 2 |
| REN-79 | 0.236 | 86 | 11 | 13 |
| REN-80 | 0.176 | 61 | 2 | 3 |

Vedlegg R AOPP hos RTX

| Pasient Id | Gjennomsnitt Konsentrasjon (n=3) | | SD ($\mu\text{mol/l}$) | CV% |
|------------|--|-----------------------|-----------------------------|-----|
| | Absorbans ($\mu\text{mol/l}$) | ($\mu\text{mol/l}$) | | |
| RTX-1 | 0.191 | 63 | 2 | 4 |
| RTX-2 | 0.225 | 77 | 3 | 4 |
| RTX-3 | 0.414 | 160 | 4 | 3 |
| RTX-4 | 0.280 | 100 | 4 | 4 |
| RTX-5 | 0.140 | 42 | 1 | 3 |
| RTX-6 | 0.264 | 93 | 3 | 3 |
| RTX-7 | 0.286 | 102 | 4 | 4 |
| RTX-8 | 0.198 | 66 | 1 | 2 |
| RTX-9 | 0.242 | 84 | 3 | 3 |
| RTX-10 | 1.016 | 395 | 12 | 3 |
| RTX-11 | 0.156 | 48 | 2 | 4 |
| RTX-12 | 0.341 | 123 | 6 | 5 |
| RTX-13 | 0.193 | 63 | 2 | 3 |
| RTX-14 | 0.518 | 194 | 5 | 3 |
| RTX-15 | 0.194 | 64 | 1 | 2 |
| RTX-16 | 0.174 | 56 | 6 | 11 |
| RTX-17 | 0.235 | 80 | 4 | 5 |
| RTX-18 | 0.641 | 244 | 12 | 5 |
| RTX-19 | 0.152 | 47 | 3 | 6 |
| RTX-20 | 0.258 | 90 | 1 | 2 |
| RTX-21 | 0.205 | 68 | 2 | 3 |
| RTX-22 | 0.364 | 132 | 6 | 4 |
| RTX-23 | 0.264 | 97 | 2 | 2 |
| RTX-24 | 0.238 | 86 | 2 | 2 |
| RTX-25 | 0.188 | 65 | 1 | 1 |
| RTX-26 | 0.707 | 281 | 1 | 1 |
| RTX-27 | 0.550 | 207 | 9 | 4 |
| RTX-28 | 0.324 | 122 | 3 | 2 |
| RTX-29 | 0.252 | 87 | 3 | 3 |
| RTX-30 | 0.213 | 72 | 2 | 3 |
| RTX-31 | 0.797 | 310 | 11 | 4 |
| RTX-32 | 0.347 | 126 | 6 | 5 |
| RTX-33 | 0.181 | 59 | 3 | 5 |
| RTX-34 | 0.169 | 54 | 3 | 6 |
| RTX-35 | 0.224 | 76 | 2 | 3 |
| RTX-36 | 0.241 | 83 | 3 | 3 |
| RTX-37 | 0.437 | 163 | 3 | 2 |
| RTX-38 | 0.160 | 50 | 1 | 2 |
| RTX-39 | 0.264 | 93 | 5 | 5 |
| RTX-40 | 0.171 | 55 | 2 | 4 |
| RTX-41 | 0.154 | 48 | 2 | 4 |
| RTX-42 | 0.383 | 141 | 14 | 10 |
| RTX-43 | 0.273 | 96 | 2 | 2 |

Vedlegg S AOPP hos REN-3

| Pasient Id | Absorbans ($\mu\text{mol/l}$) | Gjennomsnitts Konsentrasjon (n=3) ($\mu\text{mol/l}$) | SD ($\mu\text{mol/l}$) | CV% |
|-------------------|---|---|--|------------|
| REN-81 | 0.223 | 81 | 3 | 4 |
| REN-82 | 0.144 | 48 | 3 | 5 |
| REN-84 | 0.198 | 70 | 7 | 10 |
| REN-87 | 0.264 | 95 | 3 | 3 |
| REN-88 | 0.228 | 80 | 2 | 3 |
| REN-91 | 0.442 | 176 | 6 | 4 |
| REN-92 | 0.694 | 293 | 14 | 5 |
| REN-94 | 0.302 | 112 | 4 | 4 |
| REN-95 | 0.287 | 105 | 2 | 2 |
| REN-96 | 0.168 | 50 | 4 | 7 |
| REN-98 | 0.584 | 242 | 14 | 6 |
| REN-99 | 0.249 | 87 | 3 | 3 |
| REN-101 | 0.202 | 66 | 3 | 4 |
| REN-102 | 0.367 | 142 | 4 | 3 |
| REN-104 | 0.134 | 34 | 2 | 5 |
| REN-105 | 0.225 | 76 | 5 | 7 |
| REN-107 | 0.287 | 105 | 6 | 6 |
| REN-109 | 0.355 | 134 | 4 | 3 |
| REN-111 | 0.321 | 117 | 6 | 5 |
| REN-113 | 0.158 | 49 | 1 | 3 |
| REN-115 | 0.374 | 142 | 2 | 2 |

Vedlegg T AOPP hos REN-4

| Pasient Id | Absorbans ($\mu\text{mol/l}$) | Gjennomsnitts Konsentrasjon (n=3) ($\mu\text{mol/l}$) | SD ($\mu\text{mol/l}$) | CV% |
|-------------------|---|---|--|------------|
| REN-83 | 0.445 | 172 | 6 | 3 |
| REN-85 | 0.132 | 43 | 2 | 5 |
| REN-86 | 0.326 | 123 | 10 | 8 |
| REN-89 | 0.216 | 75 | 2 | 3 |
| REN-90 | 0.221 | 74 | 2 | 3 |
| REN-93 | 0.197 | 63 | 3 | 4 |
| REN-97 | 0.295 | 108 | 2 | 2 |
| REN-100 | 0.209 | 69 | 8 | 11 |
| REN-103 | 0.153 | 43 | 3 | 7 |
| REN-106 | 0.196 | 63 | 5 | 8 |
| REN-108 | 0.335 | 127 | 13 | 10 |
| REN-112 | 0.274 | 97 | 5 | 5 |
| REN-114 | 0.208 | 70 | 2 | 3 |
| REN-116 | 0.213 | 72 | 2 | 3 |
| REN-117 | 0.188 | 62 | 1 | 2 |
| REN-118 | 0.207 | 69 | 2 | 2 |
| REN-119 | 0.378 | 140 | 5 | 4 |
| REN-120 | 0.224 | 77 | 2 | 3 |

Vedlegg U AOPP hos REN-5

| Pasient Id | Absorbans ($\mu\text{mol/l}$) | Gjennomsnitts Konsentrasjon (n=3) ($\mu\text{mol/l}$) | SD ($\mu\text{mol/l}$) | CV% |
|-------------------|---|---|--|------------|
| REN-44 | 0.165 | 54 | 1 | 1 |
| REN-45 | 0.212 | 73 | 5 | 7 |
| REN-46 | 0.284 | 103 | 6 | 6 |
| REN-47 | 0.242 | 86 | 4 | 5 |
| REN-48 | 0.264 | 95 | 5 | 5 |
| REN-49 | 0.352 | 132 | 8 | 6 |
| REN-54 | 0.223 | 78 | 3 | 3 |
| REN-55 | 0.236 | 84 | 3 | 4 |
| REN-56 | 0.266 | 96 | 8 | 8 |
| REN-57 | 0.535 | 210 | 2 | 1 |
| REN-58 | 0.228 | 80 | 1 | 2 |
| REN-59 | 0.25 | 89 | 2 | 2 |
| REN-60 | 0.355 | 134 | 16 | 12 |
| REN-61 | 0.309 | 114 | 1 | 1 |
| REN-62 | 0.224 | 79 | 7 | 8 |
| REN-63 | 0.270 | 97 | 2 | 2 |
| REN-74 | 0.151 | 51 | 2 | 4 |
| REN-75 | 0.440 | 170 | 2 | 1 |
| REN-76 | 0.209 | 71 | 1 | 2 |
| REN-77 | 0.165 | 57 | 1 | 3 |