

Ronald Emmanuel Dadzie
Fredrik Kaiander Kreutz
Peder Olav Skipsfjord

Holdbarhetsstudie av RF-IgM

Bacheloroppgave i Bioingeniør
Veileder: Anne Lise Hjertø
Mai 2019

Ronald Emmanuel Dadzie
Fredrik Kaiander Kreutz
Peder Olav Skipsfjord

Holdbarhetsstudie av RF-IgM

Bacheloroppgave i Bioingeniør
Veileder: Anne Lise Hjertø
Mai 2019

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

Forord

Initiativtaker til dette prosjektet var fagansvarlig bioingeniør Marit Aarhaug og overlege Anne Dorthea Rø ved avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin (AIT) ved St. Olavs hospital. Formålet med prosjektet var å undersøke hvordan lagringstid og lagringsmåte påvirker analyse av autoantistoffet RF-IgM, da det foreligger lite data om dette. Produsenten av analysen oppgir at prøvene er holdbare i 48 timer, AIT ønsker derfor å finne ut hvordan holdbarheten er utover dette.

Vi ønsker å takke Anne Lise Hjertø ved NTNU for veiledning og tilbakemeldinger ved rapportskriving underveis i prosjektet. Vi ønsker også å takke Marit Aarhaug og Anne Dorthea Rø for faglig innspill og teknisk veiledning. Vi ønsker også å takke Siri Drogset ved NTNU for råd i forbindelse med statistikk.

Sammendrag

Revmatoid artritt (RA) er en kronisk systemisk autoimmun sykdom hvor pasientens immunsystem angriper egne ledd og bindevev. Diagnostikk av sykdommen innebærer blant annet påvisning av markøren revmatoid faktor (RF), isotype IgM. Produsenten av reagenser til analysen anbefaler å analysere prøver innen 48 timer etter prøvetaking for prøver oppbevart i kjøleskap og 8 timer for prøver oppbevart i romtemperatur. Denne holdbarhetstiden kan dog overstiges ved lang transporttid fra legekontorer eller ved at prøvene ikke blir analysert på flere dager pga. f.eks. helg, høytider, og ved mindre laboratorier at analysen ikke utføres hver dag. Det kan også forekomme at prøver blir stående på benk i romtemperatur over en periode, både på legekontor og laboratoriet. Det er derfor ønskelig for Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin (AIT) å vite om lagringstid av prøver utover 48 timer og oppbevaring i romtemperatur utover 8 timer vil påvirke resultatet av RF-IgM.

For å undersøke dette ble serumprøver fra 16 pasienter med positivt resultat av RF-IgM analysert vha. ELISA-metoden. Prøver oppbevart i romtemperatur ble analysert i 5 dager og prøver oppbevart i kjøleskap ble analysert i 9 dager, med unntak av dag 6 og 7. Basert på undersøkelsene kom vi fram til at RF-IgM i pasientserum er holdbart i opptil 4 dager ved lagring i romtemperatur og 9 dager ved lagring i kjøleskap. I tillegg kom vi fram til at det ikke var noen signifikant forskjell i resultatene mellom oppbevaringstemperaturene opp til 4 dager.

Abstract

Rheumatoid Arthritis is a chronic inflammatory disorder where the patient's immune system attacks joints and tissue. For diagnosis a physician may test for rheumatoid factor (RF), isotope IgM. The company *Inova diagnostics* that produces the assay used by the Department of Immunology and Transfusion Medicine (DIT) at St. Olavs hospital recommends analysing a patient's serum within 48 hours if stored in a refrigerator or within 8 hours if stored in room temperature. These hours are often exceeded since the samples are often taken at the doctor's office and sent to the laboratory at DIT. This can take up to several days because of weekends, holidays or that the samples do not get analyzed every day, which could be the case for smaller laboratories. DIT wishes to find out if storing these samples over the recommended periods affects the results of RF-IgM.

To find out if RF-IgM is affected by storage temperature and storage length, 16 serum samples from patients with positive results of RF-IgM were analyzed over several days. Samples stored in room temperature were analyzed over five days and samples stored in the refrigerator at 2-8°C were analyzed over nine days with the exception of days 6 and 7. Based on our analysis we concluded that RF-IgM in serum is stable up to 4 days when stored in room temperature and 9 days when stored in a refrigerator. In addition we also concluded that there were no significant differences in concentration between the results of samples stored in the two different storage temperatures up to four days.

Innholdsfortegnelse

1.0 Innledning	1
1.1 Immunforsvarets rolle i kroppen	1
1.2 Autoimmunitet- når kroppen går til angrep på seg selv	1
1.3 Revmatoid artritt	3
1.4 Antistoff i diagnostikk av RA	5
1.5 Holdbarhet av prøver til analyse av RF-IgM	6
1.6 Problemstilling	7
2.0 Materiale og metode	8
2.1 Prøveinnsamling og prøvebehandling	8
2.2 Utstyr	8
2.3 Reagens	8
2.4 Fremgangsmåte	9
2.5 Analyseprinsipp for RF-IgM på Dynex DS2 med Quanta Lite, RF-IgM ELISA kit, Inova Diagnostics	9
2.6.1 Hypotesetesting	10
2.6.2 Paret T-test	11
3.0 Resultat	12
3.1 Oppbevaring i romtemperatur	12
3.2 Oppbevaring i kjøleskap	14
3.3 T-test	15
4.0 Diskusjon	18
4.1 Resultatdiskusjon	18
4.2 Studiens pålitelighet	20
5.0 Konklusjon	21
6.0 Referanser	22
7.0 Vedlegg	23
Vedlegg 1	23
Vedlegg 2	24
Vedlegg 3	25
Vedlegg 4	33
Vedlegg 5	34
Vedlegg 6	35
Vedlegg 7	36
Vedlegg 8	37

1.0 Innledning

1.1 Immunforsvarets rolle i kroppen

Immunforsvaret består av spesielle organer, vevstyper, celler og proteiner som beskytter kroppen mot inntrengende agens som bakterier, virus, sopp og andre stoffer som har evne til å forårsake skade mot celler og kroppsstrukturer. Dette forsvaret har også som funksjon å beskytte kroppen mot skadede celler og strukturer, for eksempel slitte og defekte celler og komponenter, eller ved tumorer og kreft. En av immunforsvarets viktigste egenskaper er dermed å kunne skille mellom kroppsegne og fremmede strukturer og avgjøre om disse er patogene eller skadelige, og ut i fra dette iverksette en immunrespons som ødelegger og/eller fjerner strukturen.^{[1] [2]}

I immunforsvaret er det vanligvis en rekke mekanismer som er tilstede for å beskytte kroppen fra selvreaktive lymfocytter. Lymfocytene er en av de viktigste komponentene i forsvarsmekanismen i det adaptive immunsystemet, og gjennomgår derfor en streng "opplæringsprosess" for å ikke danne selvreaktive lymfocytter. En viktig del av denne prosessen er toleranseinduksjon, hvor lymfocytene blir tolerante overfor antigene strukturer, spesielt de antigene strukturene på kroppsegne komponenter.^[3] Denne mekanismen er svært viktig for at immunforsvaret normalt ikke skal gå til angrep på egne celler og strukturer. Når immunforsvaret mister toleranseevnen overfor egne kroppsstrukturer oppstår autoimmunitet.^[3]

1.2 Autoimmunitet- når kroppen går til angrep på seg selv

Autoimmunitet er en mekanisme hvor immunforsvaret oppfatter kroppsegne komponenter og strukturer som truende, og som et resultat av dette iverksetter en immunreaksjon for å skade og/eller fjerne denne trusselen. Autoimmunitet som en mekanisme trenger ikke nødvendigvis å være farlig eller skadelig. Mekanismen kan også være nyttig og hjelpsom når kroppen skal bli kvitt utslitte og defekte celler og komponenter.^[4] Et lavt nivå av autoimmunitet er dermed normalt og er ikke sykdomsfremkallende. En autoimmun sykdom oppstår når autoimmunitet vedvarer, vanligvis over en lang periode.^[1, 4]

Sykdommer av autoimmun karakter kan grovt sett deles inn etter om den er organspesifikk eller systemisk. Ved organspesifikke autoimmune sykdommer er immunresponsen rettet mot et målantigen som er unikt til cellene i et spesifikt organ eller kjertel. Dette medfører at sykdommen er primært begrenset til kun dette organet og immunresponsen vil være rettet mot strukturer i organet. Disse strukturene hindres fra å utføre normal funksjon eller blir ødelagt.^[1] I angrepet på disse strukturene vil en finne både cellulære- og antistoffmedierte mekanismer. De cellulære mekanismene forårsakes av autoreaktive lymfocytter, ofte effektor T-lymfocytter. Antistoffreaksjonen forårsakes av autoantistoffer som retter seg mot antigener som befinner seg på eller i celler i organstrukturen. Begge disse reaksjonene fører til en betennelsesprosess hvor celler i organet lyses eller dør og blir erstattet med bindevev. Et godt eksempel på en organspesifikk autoimmunsykdom er Hashimotos thyroiditt. Målantigenet som disse autoreaktive T-cellene og autoantistoffene gjenkjenner, befinner seg på cellene i thyroidea. Infiltrasjon av aktiverte lymfocytter, autoantistoffproduserende plasmaceller og makrofager medfører skade og betennelsesreaksjon som hindrer normal funksjon til thyroidea.^[1]

Ved systemiske autoimmune sykdommer er immunresponsen mer utbredt og påvirker dermed mange av kroppens strukturer og celler. I motsetning til organspesifikk autoimmunitet vil systemisk autoimmunitet gi opphav til en immunrespons som er rettet mot et bredt spekter av målantigen. Disse målantigenene er ofte ikke tilknyttet et spesifikt organ eller vevsstruktur, noe som gjør immunresponsen mer systemisk og utbredt. Sykdommer som medfører en slik immunrespons oppstår ofte på grunn av en generell defekt i immunreguleringen som resulterer i hyperaktive T- og B-celler. Dette medfører en stimulering til antistoffproduksjon og økt T-celle aktivitet.^[2] Begge disse stimuleringene fører til utbredt vevsskade, hvor de autoreaktive T-cellene hovedsakelig står for cellemediert immunrespons, og hyperproduksjon av antistoff hos B-celler fører til direkte celledskade ved aktivering av komplementsystemet og betennelsesreaksjon. Et godt eksempel på en systemisk autoimmun sykdom er systemisk lupus erythematosus (SLE), hvor antinukleære antistoff (ANA) reagerer med cellekjernen av alle typer celler og medfører patologiske endringer i hud, nyre, ledd, blodceller og blodkar.^[4]

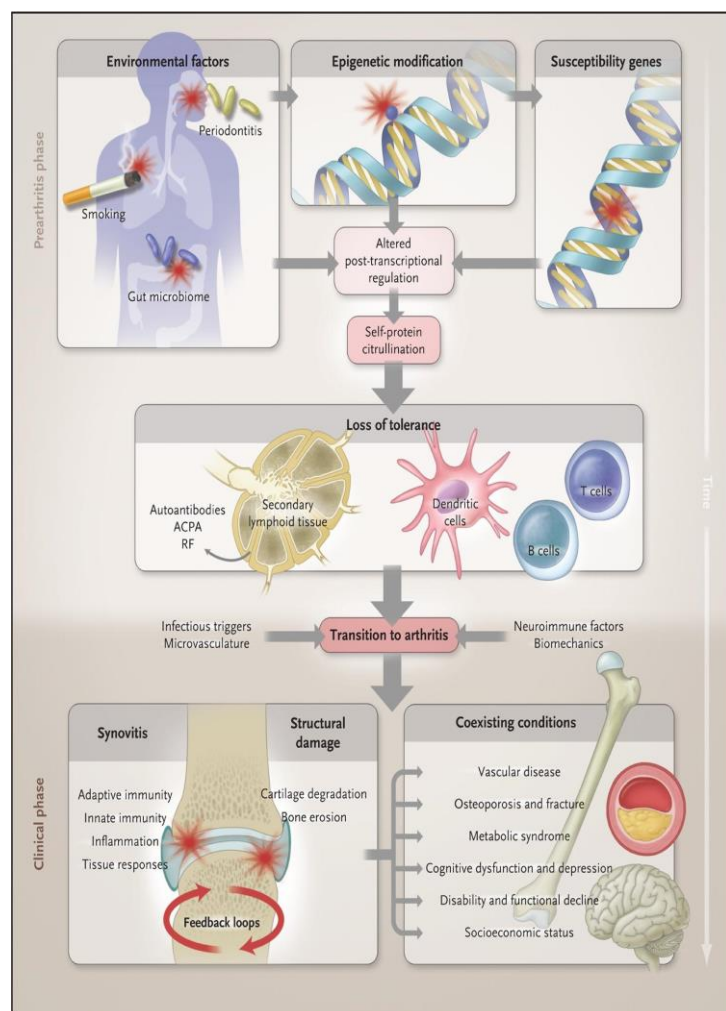
Mange autoimmune sykdommer opptrer ofte som sammensatte sykdommer som gjerne kan ha organspesifikk påvirkning, men også systemisk effekt. Ofte omtales autoimmune sykdommer som et spekter av sykdommer, hvor en finner Hashimoto's thyroiditt ved den organ-spesifikke enden av spekteret, og SLE på den systemiske eller "non-organ" spesifikke

delen av spekteret. Hvor en sykdom befinner seg i spekteret bestemmes ofte av hvor målantigenet befinner seg, enten på cellene til et spesifikt organ (organspesifikk) eller generelt i visse vevsstrukturer eller celler (systemisk).

1.3 Revmatoid artritt

Revmatoid artritt (RA) er en kronisk systemisk autoimmun sykdom hvor pasientens immunsystem angriper egne ledd og bindevev i bl.a. hender, fingre, knær og føtter.^[1] RA forekommer hos 0,5-1,0 prosent av den voksne befolkningen, der det regnes med om lag 25-40 nye tilfeller per 100 000 voksne per år. Det er beregnet at 50% av risikoen for å utvikle RA har sammenheng med genetiske faktorer.^[5] Sykdommen utvikler seg dels gjennom

miljøfaktorer som stress, infeksjoner eller røyking, og dels gjennom genetiske faktorer, som medfører strukturelle endringer av cyclisk citrullinert peptid (CCP) proteiner som befinner seg i ledd og bindevev (se figur 1.1). Tap av toleranse fører til at immunforsvaret vil kunne oppfatte disse proteinene som antigener og dermed sette i gang en betennelsesreaksjon, hvor cellulære- og antistoffmedierte mekanismer fører til angrep på leddhinnen og leddkapselen. Utviklingen av betennelsen og immunreaksjonen fører til inflammasjon, nedsatt funksjon og mobilitet, og til slutt degradering av ledd og bindevev samt benerosjon.^{[6] [7]}

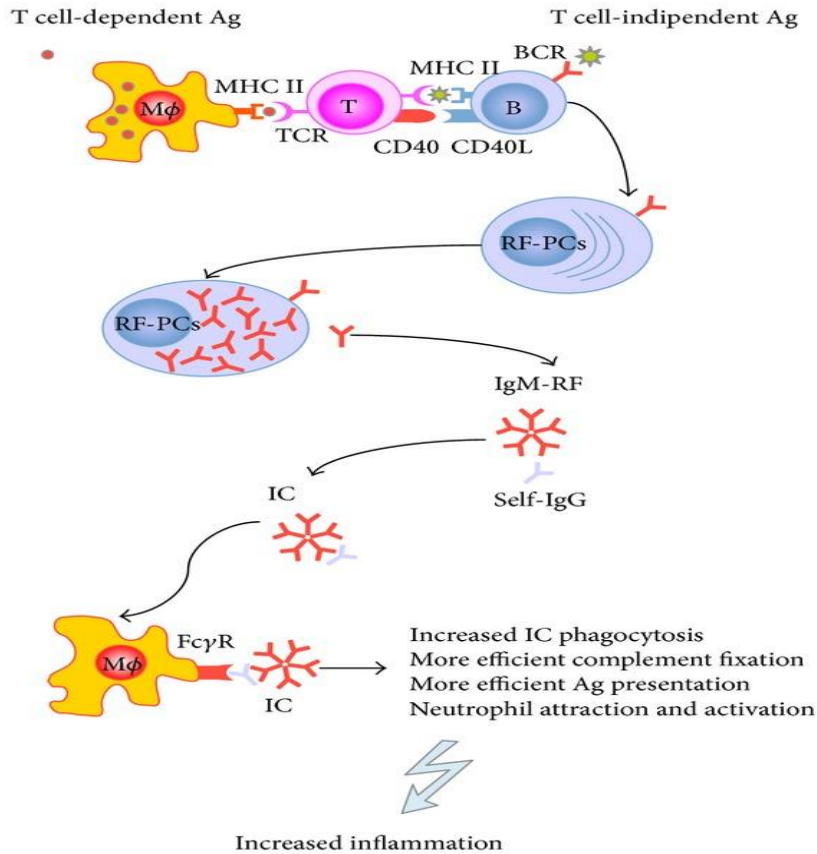


Figur 1.1, Miljømessige og genetisk faktorer bidrar til endring i post-transkripsjonsregulering. Endringen kan forårsake endring av proteiner (CCP). Tap av toleranse for disse proteinene fører til produksjon av autoantistoff, blant annet revmatoide faktorer (RF) og anti-citrullinert protein antistoffer (ACPA), mediert av antigenpresenterende celler (dendritiske celler) og T- og B-celler. Dette induserer en immunrespons som innebærer inflammasjon, aktivering av komplement og en generell betennelsesreaksjon. Om immunresponsen vedvarer uten behandling over lang tid vil en utvikle RA. Sykdommens systemiske karakter påvirker også andre funksjoner i kroppen. [Figuren er lånt fra "The pathogenesis of rheumatoid arthritis"]^[6]

Omtrent 80% av personer med RA har en gruppe antistoff i blodet som betegnes revmatoide faktorer (RF).^[8] Når RF danner immunkomplekser fører det til økt immunkompleks-fagocytose av fagociterende celler, som da vil presentere mer antigen og komplementsystemet aktiveres (se figur 1.2). Dette fører til økt inflammasjon og et mer aggressivt og ødeleggende sykdomsforløp med mer aktiv synovitt og leddskade.^[9, 10] Synovitt er betennelse i leddhinnen som fører til mer væskeproduksjon i hinnen og smertefull utvidelse av leddhulen.^[11]

Diagnostikk av RA kan være utfordrende da det kan være store variasjoner i sykdomsbildet hos RA-pasienter. Hovedutfordringen er også å skille RA fra andre former for artritt. For en kliniker vil diagnostikk begynne med klinisk mistanke om RA, hvor pasienten vil komme med symptomer som morgenstivhet, smerter ved bevegelse, ømhet i ledd og generelle symptomer som tretthet og influensalignende symptomer. Klinikeren vil basere seg på disse symptomene og gjøre utredninger, både serologiske og kliniske, og vurdere om funnene gjort hos pasienten faller innenfor diagnosekriteriene for RA, se vedlegg 1.^[12]

Sykdommens systemiske karakter fører til involvering av flere organsystemer og funksjoner i kroppen som hjerte, lunge, metabolisme og kognitive egenskaper. Det er særlig i de første årene av sykdommen at det oppstår irreversible ødeleggelser. Bruken av kliniske og serologiske funn til å stille riktig diagnose tidlig i sykdomsforløpet er derfor svært viktig. Dette gir muligheten til å tidlige behandle og kontrollere sykdommen samt minske leddskadene og andre skader den fører med seg.



Figur 1.2 viser hvordan RF blir produsert og dens immunologiske rolle i RA. RF kan produseres både med og uten T-lymfocytter, avhengig av antigen (Ag). Når B-celle (B) kommer i kontakt med Ag via egen reseptor vil dens datterceller utvikle seg til plasmaceller (RF-PCs) som produserer og utskiller RF. B-cellen kan også aktiveres og modnes vha. T-hjelpercelle (T) som har fått Ag presentert av fagocyterende celle (MΦ).^[1] Immunkomplekset (IC) som RF danner med kroppsegne antistoff (Ab) (Self-IgG) tas opp av fagocyterende celler, noe som fører til immunologisk reaksjon med økende betennelsesreaksjon. [Figuren er lånt fra artikkelen “Rheumatoid Factors: Clinical Applications”]^[9]

1.4 Antistoff i diagnostikk av RA

Selv om kliniske symptomer oftest benyttes i diagnostikk av RA, er også serologi til stor nytte, spesielt ved differensialdiagnostikk. Påvisning av markøren RF i serum er den mest brukte blodprøveanalysen innen RA-diagnostikk og kan være til hjelp ved vurdering av prognose og behandlingsmetode.^[13] RF er et antistoff som er rettet mot Fc-delen av IgG antistoffer og produseres av plasmaceller hos personer med RA. Plasmacellene utvikles fra

B-celler som har kommet i kontakt med RF-Ag (IgG-Fc fragmenter), som vist i figur 1.2. Som de fleste antistoffer gjør, opptrer RF i ulike isotyper med ulik affinitet.^[9] Isotype IgM er et større molekyl og har flere bindingssteder enn de andre typene. IgM assosieres med primær immunrespons og uttrykkes tidlig i utviklingen av lymfocytter, og deres tunge kjeder er derfor ikke fullt utviklet. Disse isotypene har derfor oftere lavere affinitet og vil reagere med flere typer Ag, noe som gjør at de lettere påvises enn de andre isotypene.^[14] Tilstedeværelse av andre isotyper er mer utbredt ved bindevevssykdommer enn i RA.^[9] De fleste kommersielle tester for RF påviser derfor isotypen IgM. Selv om RF-IgM er lettere å påvise så kan man, pga. den lave affiniteten, få problemer med varierende målinger ved kvantitering av analytten.^[15]

Analyse av serum for RF er nyttig for å tidlig kunne diagnostisere RA, men det er likevel kun 40 % av pasientene som vil være seropositiv for RF i en tidlig fase av sykdommen. 80 % vil få positiv test ved etablert sykdom. Metaanalysestudier rapporterer en sensitivitet på 60 % til 90 % og en spesifisitet på 85 % for RA.^[8] Selv om RF er oppkalt etter sin evne til å påvise RA, vil testen også bli positiv for andre sykdommer, spesielt autoimmune.^[9] Anti-cyklisk citrullinert peptid (anti-CCP) er en annen serummarkør som derfor ofte benyttes i tillegg til RF ved mistanke om RA. CCP er proteiner som er blitt modifisert og fått endret deres struktur. Modifiseringen innebærer enzymatisk omdanning av aminosyren arginin til citrulline i proteinet i en prosess som kalles citrullinering. Citrullinering av proteiner i synovialledd oppstår gjerne ved inflammasjon i leddet, og modifiseringen av aminosyrer induserer gjerne signifikant strukturell endring av proteinet. Proteinene kan bli gjenkjent av immunforsvaret som et antigen og dermed sette i gang en immunrespons. Gjennom immunresponsen vil det bli dannet antistoffer mot CCPene.^[7] Anti-CCP viser seg å være en god markør for tidlig deteksjon av RA. Antistoffet befinner seg nesten utelukkende hos RA pasienter, og gjør markøren mer spesifikk enn RF. Begge markørene benyttes i diagnostiseringen av RA for å oppnå et sikrere differensieringsresultat.

1.5 Holdbarhet av prøver til analyse av RF-IgM

RA er ikke en akutt sykdom og pasienter med symptomer på sykdommen vil som oftest oppsøke legekontor på grunn av leddsmerter. Med bakgrunn i symptomer vil legen rekvirere et analyserepertoar ved laboratoriet for leddsykdommer inklusivt RA. Prøvetakingen utføres ofte på legekontor før prøven transporteres til laboratoriene som utfører RF-IgM analyser. Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin (AIT) på St. Olavs hospital er et av disse

laboratoriene. AIT er en akkreditert avdeling, som betyr at avdelingen er anerkjent av Norsk Akkreditering for dens “kompetanse og evne til å utføre angitte oppgaver i samsvar med gitte krav fra et internasjonalt anerkjent akkrediteringsorgan”.^[16] Dette medfører at det stilles strenge krav til avdelingen om å kunne dokumentere og vise til at alt arbeid som utføres på laboratoriet er i henhold til en standard som er satt.^[17] Det er viktig ved diagnostikk og behandling at analyseresultatet gir identisk gjenspeiling av konsentrasjonen av analytten til pasientens konsentrasjon i blodet ved prøvetaking. Det er flere ting som kan påvirke analyseresultatet, som bl.a. oppbevaring, prøvetaking og behandling av prøven. Det er vanlig å innhente informasjon om en analytts holdbarhet og stabilitet fra publiserte holdbarhetsstudier, men i enkelte tilfeller har produsenten til analysesystemet gjort egne tester på holdbarheten til analytten som de legger i pakningsvedlegget. Ifølge pakningsvedlegget til RF-IgM-analysen AIT benytter seg av, garanterer produsenten at prøver skal være holdbar i 48 timer om det oppbevares i kjøleskap ved 2-8 °C og i åtte timer ved romtemperatur.^[17] Utover disse timene er holdbarheten til RF-IgM i henholdsvis kjøleskap og romtemperatur udokumentert. Ved tidligere besøk av Norsk Akkreditering på AIT ble det stilt spørsmål om hva som skjer med prøver som overskrider dette tidsrommet. På legekantoret vil det foreligge risiko for at prøven ikke blir sendt med en gang, og at prøven forblir stående i kjøleskap eller romtemperatur over en lengre periode. Noen legekantor kan være langt ut i distriktene, noe som forlenger transporttiden og påvirker oppbevaringstiden. Når prøven kommer fram kan det også hende at den ikke kan analyseres før neste virkedag, som kan være flere dager senere pga. f.eks. helg, høytider, og på mindre laboratorier at analysen ikke utføres hver dag. Det er altså flere faktorer som kan føre til at prøven overstiger holdbarhetstiden. Med bakgrunn i dette ønsker man derfor å teste hvordan analyseresultatet blir påvirket over tid og av oppbevaringsmåte.

1.6 Problemstilling

Hvert laboratorium bør ha full informasjon om hvordan konsentrasjonen til en analytt blir påvirket av lagringsbetingelser slik at de kan håndtere instabilitet på en sikker og god måte. Bakgrunnen for denne studien er å finne ut av hvor lenge pasientserum for analyse av RF-IgM vha. ELISA-metoden kan oppbevares i henholdsvis romtemperatur og kjøleskap (2-8°C) før det påvirker analyseresultatene. Det ønskes i tillegg å se om analyseresultatene er forskjellige når to alikvoter av samme prøve lagres hver for seg i romtemperatur og kjøleskap.

2.0 Materiale og metode

2.1 Prøveinnsamling og prøvebehandling

Serumprøver fra 16 pasienter med positivt resultat av RF-IgM (dvs. >10 U/L) som tidligere var analysert av AIT på St.Olavs, ble benyttet til oppgaven og var fryst ned ved -25°C i 1-9 uker (se vedlegg 2). For å få et representativt utvalg av prøver i ulike nivå ble det benyttet prøver i nivå mellom 15 og 95 U/L. Ved første analyseringsdag ble alle prøvene tatt opp fra fryseren, tint og alikvotert i tre deler: En alikvot som ble lagret i romtemperatur, en som ble lagret i kjøleskap (2-8°C), og en som ble fryst ned som reserve i tilfellet noe skulle skje med de andre prøvene. Prøvene som ble lagret i romtemperatur ble analysert over fem påfølgende dager (dag 0-dag 4). Prøvene som ble lagret i kjøleskap ble analysert over fem påfølgende dager (dag 0-dag 4). Etter to dagers pause pga. helg ble prøvene igjen analysert over de neste tre påfølgende dagene (dag 7-dag 9).

2.2 Utstyr

Dynex DS2 Automated ELISA System, Dynex Technologies, Inc.^[17]

2.3 Reagens

Quanta Lite, RF-IgM Elisa Kit, Inova Diagnostics, Kit nr.: 708690, Lot nr: 049543

- RF-IgM ELISA kalibrator A, B, C, D og E^[17]
- RF-IgM positiv kontroll
- RF-IgM negativ kontroll
- Mikrotiterbrønnplater coatet med IgG antigen fra kanin
- HRP Sample Diluent
- HRP Wash Concentrate
- HRP IgM Konjugat, (geit), anti human IgM
- TMB Chromogen
- HRP Stop Solution

RF-IgM pasientlik intern kontroll

Renset vann type 2

2.4 Fremgangsmåte

Analyseringen av prøvene ble gjort på *Dynex DS2* med *Quanta Lite, RF-IgM ELISA Kit, Inova diagnostics*, i henhold til prosedyre i vedlegg 3 som brukes for rutineanalyser ved AIT på St. Olavs. For RF-IgM benytter maskinen ELISA-metoden for å beregne mengden RF-IgM i en gitt prøve. Prøvene, kontrollene, kalibratorene, reagensene og mikrotiterbrønnene ble tatt ut av kjøleskapet og satt på benk i 30 minutter for å få romtemperatur før analyseringen. Før prøvene, kalibratorene og kontrollene ble satt i maskinen ble de blandet vha. en vortex og avkorket. I oppsettene er det inkludert positiv og negativ kontroll, samt pasientlik internkontroll. Analyseresultatene til kontrollene er presentert i vedlegg 4. Før prøvesvarene kan benyttes i statistiske beregninger må kontrollresultatene ligge innenfor grensene satt av laboratoriet, se vedlegg 4. Kontrollene lå innenfor kravet i alle oppsett. Analysen av holdbarheten for prøver oppbevart i romtemperatur og kjøleskap (2-8°C) foregikk over 5 og 9 dager respektivt. For å standardisere metoden ble prøven oppbevart på samme sted og analysert på et fast tidspunkt gjennom disse dagene.

2.5 Analyseprinsipp for RF-IgM på Dynex DS2 med Quanta Lite, RF-IgM ELISA kit, Inova Diagnostics

Maskinen blander først diluent og prøvematerialet i en dypbrønn som blir brukt videre i analyseringen. Denne blandingen, kontroller og standarder blir så tilsatt separate mikrotiterbrønner coatet med kanin IgG-antigen mot RF-IgM og inkuberes i 30 minutter. RF-IgM-antistoff vil feste seg til antigen som befinner seg i brønnen og danne antistoff-antigenbinding. Brønnene blir så vasket og alt som ikke har bundet seg til coatingen blir skylt vekk. Videre blir det tilsatt konjugatet anti-human IgM merket med horseradish peroxidase (HRP) som vil binde seg til pasientenes antistoff som er bundet til coatingen og danne et kompleks. Etter 30 minutter inkubasjon blir brønnene skylt for å fjerne ubundet konjugat og tilsatt et kromogent substrat som vil spaltes av HRP. Om komplekset er tilstede oppstår en fargeendring som stoppes etter 30 minutter inkubasjon ved tilsats av stopp solution. Fargeintensiteten som oppstår er direkte proporsjonal med RF-IgM konsentrasjonen og måles spektrofotometrisk ved 450 nm. Den målte absorbansen i brønnene blir sammenliknet med en fempunkts standardkurve og er proporsjonal opp til 100 units.^[13, 17]

2.6 Statistikk

For å vurdere om det var statistisk signifikant forskjell mellom måleverdiene for dag 0 og de øvrige målepunktene ble paret t-test benyttet. Endringen i konsentrasjonen i % av nullprøven ble beregnet ved hjelp av formel 1 som befinner seg til tabell 2.1. Her er RF_0 konsentrasjonen til nullprøven, og RF_d er konsentrasjonen i prøven oppbevart i d dager. Måleverdiene ble normalisert, altså justert til en felles "skala" der normalen, alle utgangsverdiene målt ved dag 0, er lik 1.^[18] En endring i måleverdi en annen dag på f.eks. 20% vil da få verdien 1,2. Dette gjøres for å enklere kunne sammenligne endringer, i ulike nivåer.

Analysemetodens reproduserbarhet har blitt beregnet ved AIT, der % CV for analysen er 10,0%.^[13] Ved analysing av samme prøve flere ganger, aksepterer AIT en prosentendring på $2*CV$, som da blir 20,0%.^[19]

Tabell 2.1: Formler brukt i oppgaven

Formel 1	$\%endring = \frac{(RF_0 - RF_d)}{RF_0}$
Formel 2	$T_{obs} = \frac{\bar{D}}{\frac{SD}{\sqrt{n}}}$
Formel 3	$S = \sqrt{\frac{\sum_{t=1}^n (x_t - \bar{x})^2}{n}}$

2.6.1 Hypotesetesting

De fleste statistiske analyser begynner med at man ønsker å teste ut en påstand. Ved hypotesetesting kan man teste påstander om ukjente verdier på bakgrunn av innsamlet datamateriale. Den sanne ukjente måleverdien kalles μ , og vil i denne oppgaven være gjennomsnittlig målt RF-verdi for en måleserie. Variansen, σ^2 , vil være et mål på variasjonen i data. Når man utfører en hypotesetest setter man opp en nullhypotese, H_0 , om verdien av μ . Om man ønsker å teste om verdier er like, er dette en tosidig test og H_0 blir dermed: $\mu = \mu_0$, der μ_0 vil være gjennomsnittlig måleverdi for den andre måleserien. Det vil da være en alternativ hypotese, H_1 , som en logisk motsats: $\mu \neq \mu_0$. For analysen ble det valgt et signifikansnivå på 5% som sier noe om hvor stor sannsynlighet man er villig til å akseptere for at man forkaster en H_0 som er sann. I denne undersøkelsen ble hypotesetesting benyttet

til å finne statistisk signifikans mellom nullprøven og analyseresultatene for samme prøve fra de påfølgende dagene under forskjellige betingelser. Det ble derfor valgt å sette opp to hypotesevarianter:

Hypotesevariant 1

H_0 : Resultatene blir ikke påvirket av oppbevaringstid

H_1 : Resultatene blir påvirket av oppbevaringstid

Hypotesevariant 2

H_0 : Resultatene blir ikke påvirket av oppbevaringstemperatur

H_1 : Resultatene blir påvirket av oppbevaringstemperatur

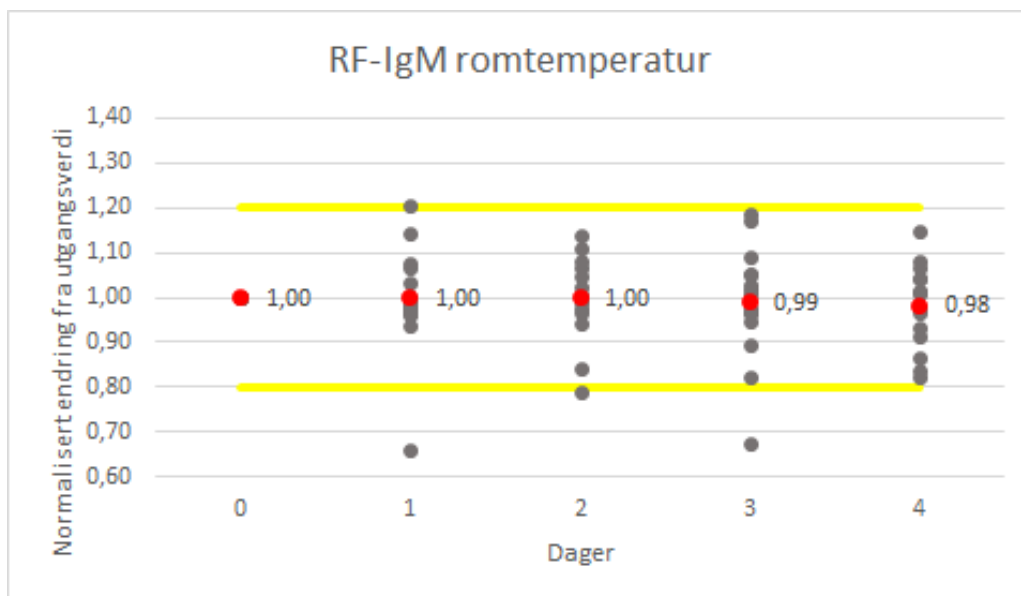
2.6.2 Paret T-test

For å undersøke påstandene utfører man ofte en T-test. T-test blir brukt for å si noe om differansen mellom gjennomsnittet av to gruppeverdier der standardavvik er ukjent og regnes ut ved hjelp av excelfunksjonen for standardavvik (tabell 2.1, formel 3). I en paret T-test har man n observasjonspaar $(X_1, Y_1), (X_2, Y_2), \dots, (X_n, Y_n)$ der hvert par er statistisk uavhengig av de andre parene. X_i og Y_i i samme par vil dog være avhengig av hverandre. I denne oppgaven vil da X_i være utgangsverdien/målt verdi ved dag 0 for prøve i , og Y_i være målt verdi ved en annen dag for samme prøve. T-testen baserer seg på gjennomsnitt og varians for de to måleseriene og utføres ved å beregne T_{obs} , som sammenlignes med $T_{Kritisk}$. T_{obs} blir beregnet ved hjelp av formel 2 i tabell 2.1 og $T_{Kritisk}$ blir bestemt vha. excel dataanalysen "T-Test: Gjennomsnitt for to parvise utvalg". Om T_{obs} ikke overskrider $T_{Kritisk}$ har man grunnlag for å påstå at måleverdiene er like, altså man kan ikke forkaste nullhypotesen.

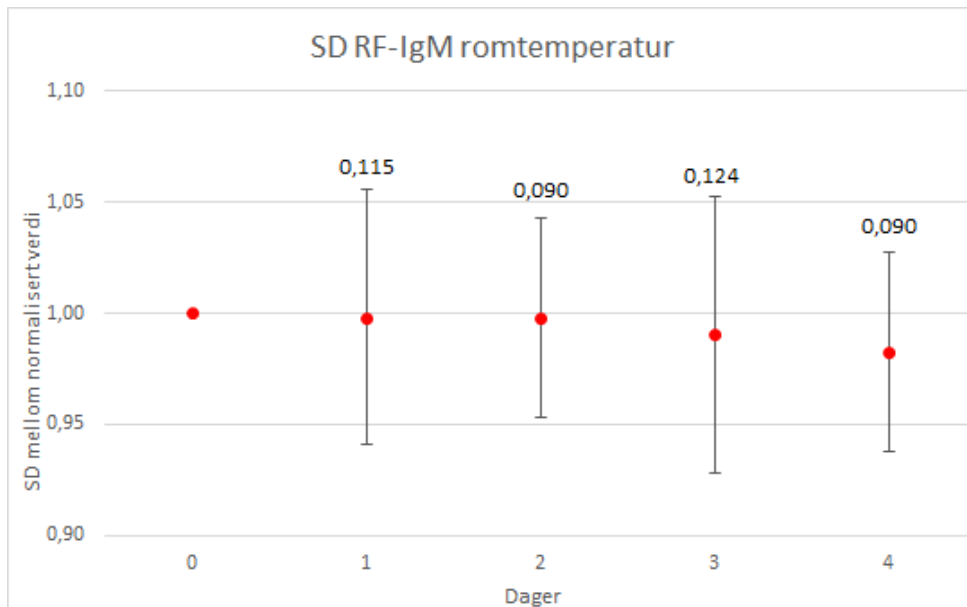
3.0 Resultat

For å undersøke holdbarheten av RF-IgM i serum, oppbevart i henholdsvis romtemperatur og kjøleskap, ble 16 serumprøver positive for RF-IgM analysert opp til ni dager, unntatt dag 5 og 6, for prøver oppbevart i kjøleskap. Prøvene oppbevart i romtemperatur ble analysert i fem dager. Ved alle målingene er kontrollene innenfor sine grenseverdier, se vedlegg 4.

3.1 Oppbevaring i romtemperatur



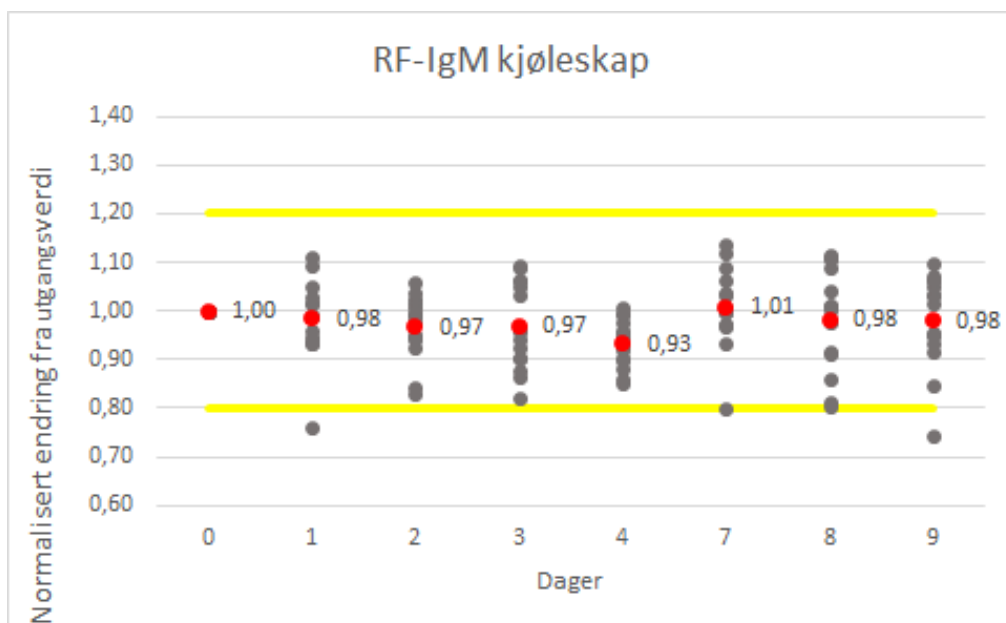
Figur 3.1, viser hvordan målt konsentrasjon av RF-IgM for 15 prøver, oppbevart i romtemperatur i fire dager, endres ut fra målt konsentrasjon ved dag 0. Verdiene er normalisert ut fra datamålingene vist i vedlegg 5, alle utgangsverdier målt ved dag 0 er altså satt lik 1. De gule linjene representerer øvre og nedre grenseverdi for hva AIT tillater av prosentendring ved analysering av samme prøve, som er $\pm 2CV$. De røde prikkene er gjennomsnitt for målingene hver enkelt dag.



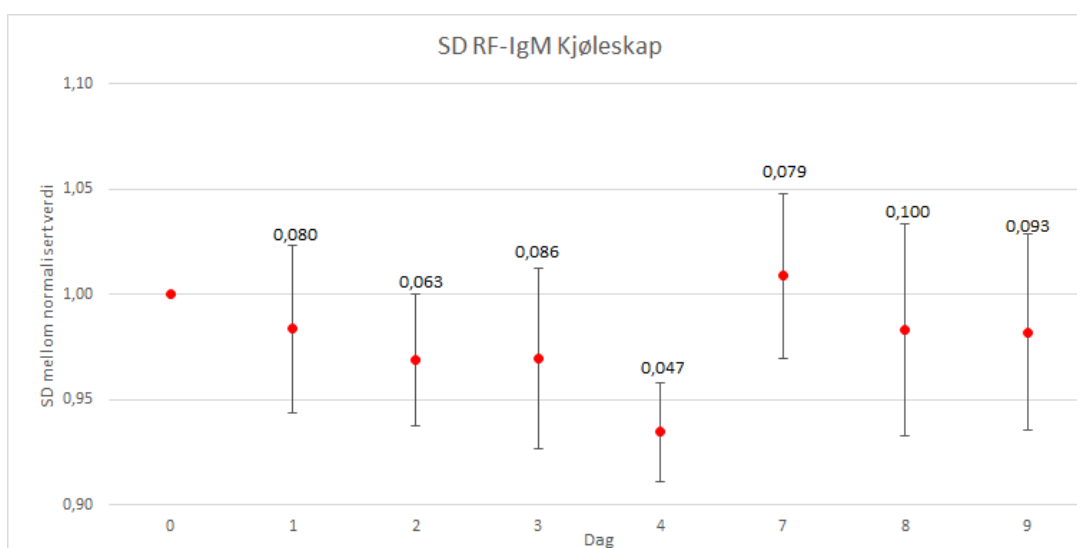
Figur 3.2, viser standardavvik av normalisert prosentendring for målt konsentrasjon av RF-IgM, for prøver oppbevart i romtemperatur. De røde prikkene er gjennomsnitt for målingene hver enkelt dag.

Man kan i figur 3.1 se at gjennomsnitt av målingene for prøver oppbevart i romtemperatur holder seg tilnærmet stabilt fra dag til dag, med en svakt synkende tendens. Alle målingene ligger innenfor tillatte grenseverdier ($2 \cdot CV\%$). Fire av enkeltmålingene befinner seg utenfor de satte grenseverdiene; to på dag 1, en på dag 2 og en på dag 3. Spredning av målingene varierer fra dag til dag, noe man også kan se av standardavvik i figur 3.2. Det er ingen trend i endring av standardavvik.

3.2 Oppbevaring i kjøleskap



Figur 3.3, viser hvordan målt konsentrasjon av RF-IgM for 15 prøver, oppbevart i kjøleskap i ni dager, endres ut fra målt konsentrasjon ved dag 0. Verdiene er normalisert ut fra datamålingene vist i vedlegg 6, alle utgangsverdier målt ved dag 0 er altså satt lik 1. De gule linjene representerer øvre og nedre grenseverdi for hva AIT tillater av prosentendring ved analysering av samme prøve, som er $\pm 2CV$. De røde prikkene er gjennomsnitt for målingene hver enkelt dag.



Figur 3.4, viser standardavvik av normalisert prosentendring for målt konsentrasjon av RF-IgM, for prøver oppbevart i kjøleskap. De røde prikkene er gjennomsnitt for målingene hver enkelt dag.

Man kan i figur 3.3 se at gjennomsnitt av målingene for prøver oppbevart i kjøleskap holder seg godt innenfor tillatte grenseverdier gjennom hele perioden. Gjennomsnitt av målingene har en synkende tendens til og med dag 4. Ved neste måling øker det kraftig, før det begynner å synke igjen. To av enkeltmålingene befinner seg utenfor de satte grenseverdiene. Spredning av målingene varierer fra dag til dag, noe man også kan se av standardavvik i figur 3.4. Det er ingen trend for endring av standardavvik.

3.3 T-test

For å styrke funnene i 3.1 og 3.2, ble det utført T-tester på måleseriene slik at man kan si noe om verdiene er like eller ikke fra dag til dag. Det ble utført T-tester for å sammenligne måleserier ulike dager med måleseriene ved dag 0. Dette ble gjort både for prøver oppbevart i romtemperatur og i kjøleskap. Tiden varierer altså for to måleserier som sammenlignes, mens oppbevaringsmåte er konstant. Det ble også utført T-tester for å sammenligne måleseriene for prøver oppbevart i romtemperatur med de i kjøleskap. Her er altså tiden konstant for de to måleseriene som sammenlignes, mens oppbevaringsmåte er variabelen.

Tabell 3.1, oversikt over utførte t-tester der verdiene for måleserier fra dag 1-4 ble sammenlignet med verdiene for de samme prøvene ved dag 0. Prøvene ble oppbevart i romtemperatur. $\Delta 1$ viser testing av verdiene ved dag 0 sammenlignet med dag 1, $\Delta 2$ viser testing av verdiene ved dag 0 sammenlignet med dag 2 osv. \bar{d} er differansen mellom gjennomsnittene av disse måleseriene og $\overline{\sigma^2}$ er differansen mellom variansene.

	$T_{Kritisk}$	\bar{d}	$\overline{\sigma^2}$	t_{obs}	Resultat
$\Delta 1$	2,145	0,033	53,3	-0,026	Beholder H_0
$\Delta 2$		-0,66	-37,9	0,648	Beholder H_0
$\Delta 3$		-1,35	-72,3	1,009	Beholder H_0
$\Delta 4$		-1,29	-54,2	1,284	Beholder H_0

T_{obs} oversteg ikke T_{Kritisk} for noen av dagene for prøvene oppbevart i romtemperatur i fire dager, se tabell 3.1. H_0 ble derfor ikke forkastet noen av dagene, som kan tyde på at resultatene ikke har blitt påvirket av å bli oppbevart i romtemperatur i fire dager. \bar{d} ser ut til å synke noe for hver dag, med unntak av dag 4. Variansene i datamålingene ser ut til å vike noe fra variansen i målingene ved dag 0, og det ser ikke ut til å være noen tydelig trend i endringen fra dag til dag.

Tabell 3.2, oversikt over utførte t-tester der verdiene for måleserier fra dag 1-9, med unntak av dag 5 og 6, ble sammenlignet med verdiene for de samme prøvene ved dag 0. Prøvene ble oppbevart i kjøleskap.

	T_{Kritisk}	\bar{d}	$\overline{\sigma^2}$	t_{obs}	Resultat
$\Delta 1$	2,145	-0,61	23,8	0,738	Beholder H_0
$\Delta 2$		-1,67	-45,5	2,022	Beholder H_0
$\Delta 3$		-2,21	-106,6	2,122	Beholder H_0
$\Delta 4$		-2,69	-37,9	3,771	Forkaster H_0 , aksepterer H_1
$\Delta 7$		0,17	4,5	-0,155	Beholder H_0
$\Delta 8$		-0,31	64,8	0,231	Beholder H_0
$\Delta 9$		-1,02	-0,9	0,897	Beholder H_0

T_{obs} oversteg T_{Kritisk} på dag 4 for prøver oppbevart i kjøleskap i ni dager, se tabell 3.2. T_{Kritisk} ble ikke oversteget av T_{obs} noen av de andre dagene det ble utført målinger. H_0 blir derfor beholdt for alle dagene, med unntak av dag 4. Dette tyder på at med unntak av dag 4 har ikke prøveresultatene endret seg ved lagring i kjøleskap i inntil ni dager. \bar{d} ser ut til å synke noe for hver dag, til og med dag 4, før det øker kraftig igjen ved neste måling, der det til slutt begynner å synke igjen. Variansene i datamålingene ser ut til å vike i varierende grad for hver dag, fra variansen i målingene ved dag 0, uten trend i endringen fra dag til dag.

Tabell 3.3, oversikt over utførte t-tester der måleseriene fra dag 0-5 for prøver oppbevart i romtemperatur ble sammenlignet med måleseriene for prøver oppbevart i kjøleskap ved samme dag.

	T_{Kritisk}	\bar{d}	$\overline{\sigma^2}$	t_{obs}	Resultat
$\Delta 0$	2,145	1,08	15,0	-1,842	Beholder H_0
$\Delta 1$		0,44	-14,5	-0,670	Beholder H_0
$\Delta 2$		0,07	7,4	-0,259	Beholder H_0
$\Delta 3$		0,23	-19,3	-0,410	Beholder H_0
$\Delta 4$		-0,33	31,3	0,759	Beholder H_0

Ved sammenligning av måleserier for prøver oppbevart i romtemperatur og kjøleskap, ble T_{Kritisk} ikke oversteget av T_{obs} ved noen av dagene, se tabell 3.3. H_0 ble derfor ikke forkastet noen av dagene, som kan tyde på at resultatene ikke har blitt påvirket av oppbevaringstemperatur noen av disse dagene. Det ser ikke ut til å være noen trend for endring av \bar{d} fra dag til dag. Variansene i datamålingene viker forholdsvis lite fra hverandre, og det ser ikke ut til å være en trend i endringen fra dag til dag.

4.0 Diskusjon

Hensikten med oppgaven var å undersøke holdbarheten til prøver til målinger av RF-IgM under forskjellige oppbevaringsbetingelser. Ifølge pakningsvedlegget til analysen AIT benytter oppgis holdbarheten til RF-IgM til 48 timer i kjøleskap og 8 timer i romtemperatur, i enkelte tilfeller kan prøvematerialet til pasienter med RA bli stående lengre enn dette. Det er av stor interesse for AIT å vite om prøvene som blir analysert på laboratoriet gjenspeiler konsentrasjonen av RF-IgM som befinner seg i pasienten ved prøvetaking.

4.1 Resultatdiskusjon

Figur 3.1 viser at resultatene for romtemperatur ligger jevnt rundt nullprøven og at det er en noenlunde lik spredning både over og under, noe som er som forventet. En av prøvene, prøve 14, avviker ekstremt fra resten av analyseoppsettet for både romtemperatur og kjøleskap, se vedlegg 7, og det ble derfor valgt å utelukke den fra resultatene og statistiske beregninger. Gjennomsnittsverdien for resultatene ligger innenfor tillatt variasjon for analysen for alle dagene og dette tyder på at prøver oppbevart i romtemperatur er holdbare i inntil 4 dager. Dette underbygges av t-testen (se tabell 3.1) som viser at nullhypotesen kan beholdes for alle dagene. Dette betyr at resultatene ikke avviker fra nullresultatene med en statistisk signifikant margin for noen av dagene. Ifølge produsenten av reagensene skal prøver kunne oppbevares i opptil 8 timer i romtemperatur. Med funnene våre ser en at prøvene er holdbar lengre enn denne perioden. Svekket holdbarhet oppstår gjerne når antistoffene begynner å denaturere, noe som kan være årsaken til at RF-IgM-verdiene synker noe frem til dag 4. Trenden kan også ha oppstått av analytiske variasjoner fra oppsett til oppsett. Det ble valgt å ikke analysere prøveresultater etter 4 dager da en pasientprøve reelt sett sjeldent vil stå i romtemperatur lengre enn 3-4 dager. Prøver vil da vanligvis bli lagret i kjøleskap. Figur 3.2 viser at det ikke er en tydelig trend i spredningen i resultatene, og at spredningen mellom dagene holder seg jevnt. Dette tyder på at resultatene ikke blir mer ustabile over tid.

Figur 3.3 viser at resultatene for prøver oppbevart i kjøleskap ligger jevnt rundt nullprøven og at det er en noenlunde lik spredning både over og under, noe som er forventet.

Gjennomsnittsverdien for resultatene ligger innenfor tillatt variasjon for analysen for alle dager, og dette tyder på at prøver oppbevart i kjøleskap er holdbare i inntil 9 dager.

Dette underbygges videre av t-testen (se tabell 3.3) som viser at nullhypotesen kan beholdes for alle dagene, med unntak av dag 4. Dette betyr at resultatene ikke avviker fra

nullresultatene med en statistisk signifikant margin for noen av dagene, med unntak av dag 4. AIT har gjort undersøkelser på metodens reproduserbarhet og kom fram til at prøver rundt 60 U/L har en CV på 10% og prøver rundt 22 U/L har en CV på 22.7%.^[13] Siden det kun er dag 4 som har blitt forkastet, og ikke de senere dagene, skyldes dette mest sannsynlig at oppsett-til-oppsett-variasjonen for analysen er høy, og ikke fordi prøvene har blitt mindre holdbare ved dag 4. Figur 3.4 viser at det ikke er en tydelig trend i spredningen i resultatene, og at spredningen mellom dagene holder seg jevnt. Dette tyder på at resultatene ikke blir mer ustabile over tid. Fire av enkeltmålingene for prøver oppbevart i romtemperatur og to av enkeltmålingene for prøver oppbevart i kjøleskap (der det også er foretatt nesten dobbelt så mange målinger) befinner seg utenfor grenseverdiene. Dette kan tyde på at prøvene er noe mer stabile i kjøleskap. Dette ser man også av generelt høyere standardavvik i figur 3.2 enn i figur 3.4.

Som nevnt oppgir produsenten av reagensene at RF-IgM prøver er holdbare i 48t i kjøleskap og 8t i romtemperatur. Antistoffer generelt er stabile proteiner og det har blitt gjort lignende studier som vårt ved AIT, hvor holdbarheten til antistoffer som ANA, anti-CCP, anti GBM, ANCA og mange andre serumanalytter har blitt analysert. AIT oppgir at de fleste av disse serumanalyttene har en holdbarhet opp til 7-8 dager oppbevart i kjøleskap, og opp til 3 dager i romtemperatur.^[20] Dette ga AIT grunnlag til å forvente lik holdbarhet for RF-IgM. Med funnene våre kan vi si at RF-IgM prøver oppfyller disse forventningene, og viser like holdbarhetstendenser som de andre antistoffene og serumanalyttene gjør.

I tabell 3.3 ser vi en t-test som sammenligner gjennomsnittsverdien til romtemperatursprøver med kjøleskapsprøver fra samme dag. Ved alle dagene beholdt vi H_0 som tyder på at det ikke er signifikant forskjell mellom lagringstemperaturene med tanke på analyseresultatene, i inntil 4 dager. Dette er ikke i samsvar med forventningene, i og med at produsenten oppgir vesentlig kortere holdbarhetstid i romtemperatur enn i kjøleskap. Når serum lagres i romtemperatur kan bakterievekst ha innvirkning på prøven. Dette var en av grunnene til at disse prøvene ikke ble analysert over flere dager enn fem.

4.2 Studiens pålitelighet

Alle prøvene var positive prøver (>10 U/L) fra pasienter med RA som lå mellom 15-95 U/L. Dette er et representativt utvalg i og med at pasienter har ulikt nivå av RF-IgM ut ifra hvor langt i sykdomsforløpet de har kommet. Analysemetoden har et målområde mellom 10-100 U/L, der ingen av prøvene lå utenfor dette. Alle analyseoppsett hadde i tillegg en positiv, negativ og pasientlik kontroll som alle lå innenfor sine grenseverdier, se vedlegg 4. Analysen ble i tillegg gjort på samme tid og på samme måte alle dagene.

Hvordan prøvematerialet ble håndtert før og under analysering kan være relevant for prøveresultatet. I studien ble hver enkelt pasientprøve alikvotert i tre deler der en av alikvotene ble lagret i kjøleskap, en i romtemperatur og en i fryser. Kjøleskapsprøvene ble tatt ut av kjøleskapet hver dag og sto i romtemperatur før, under og etter analyseringen. Ved å varme opp og kjøle ned prøvene hver dag, kan det påvirke prøveresultatene om holdbarheten blir påvirket av disse temperaturendringene. Om man er usikker på om disse temperaturendringene kan påvirke resultatene, så kunne man ha analysert alle prøvene fra alle dagene på samme dag ved å oppbevare hver prøve i inntil 9 dager før de blir fryst ned. Når man har oppbevart og fryst ned alle prøvene i sine respektive dager så kan alle bli tatt opp av fryseren og analysert på samme dag. Problemet med denne metoden er at man trenger mye prøvemateriale fra hver pasient, noe som ikke var tilgjengelig for denne studien.

I tillegg til hvordan prøvene ble håndtert er det også relevant å vurdere betydningen av antall prøver som var med på studien. Ved statistiske analyser er det viktig å ha god statistisk styrke som påvirkes av antall deltagere i en studie, effektstørrelsen, utvalgets homogenitet og risikoen for feilaktige statistiske konklusjoner. Desto flere individer man har med i en studie, desto større kostnader, tidsbruk og arbeidsmengde. Statistikere anbefaler ofte 5% sannsynlighet (α) for å begå en type 1 feil og 20% sannsynlighet for å begå en type 2 feil (β).^[21] For å beregne statistisk styrke ble det brukt styrkekalkulatoren MedCalc. Kalkulatoren regner ut antall prøver som trengs om man ønsker et signifikansnivå på 5% (α) og en styrke på 20% (β). Her blir α , β , forventet forandring i gjennomsnitt i form av $2*CV\%$ (20%) og beregnet standardavvik for studien (0,18) brukt til å beregne antall prøver som trengs. Tallene for beregnet standardavvik kan ses i vedlegg 6. Dette gir oss anbefalt antall prøver på 9 par, som kan ses i vedlegg 8. Med alt dette tatt i betraktning, er vi villige til å stole på resultatene vi har fått.

5.0 Konklusjon

RF-IgM er en analytt som er viktig å analysere ved utredning av revmatoid artritt.

Produsenten av reagensene til analysen anbefaler at prøvene analyseres innen 48 timer etter prøvetaking om prøvene lagres i kjøleskap eller 8 timer ved lagring i romtemperatur.

Imidlertid kommer mange av prøvene fra allmennpraksis, slik at ved postforsendelse kan transporttiden overstige dette. I tillegg gjøres analysene kun hverdager (mandag til fredag).

Andre antistoffanalyser på avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin (AIT) viser en holdbarhet på inntil syv dager. Det var av stor interesse for AIT å undersøke holdbarheten til RF-IgM i pasientserum, noe som er bakgrunnen for denne oppgaven. Basert på undersøkelsene kom vi fram til at RF-IgM i pasientserum er holdbart i opptil 4 dager ved lagring i romtemperatur og 9 dager ved lagring i kjøleskap. I tillegg kom vi fram til at det var ingen signifikant forskjell i resultatene mellom oppbevaringstemperaturene opp til 4 dager.

6.0 Referanser

- [1] T. Lea, *Basal og klinisk immunologi : Prinsipper og molekylære mekanismer*, 2. utg. utg. Bergen: Fagbokforlaget, 2000.
- [2] T. J. Kindt, *Kuby immunology*, 6th ed. utg. New York: Freeman, 2007.
- [3] D. Male, J. Brostoff, D. Roth og I. Roitt, *Immunology*, 8th ed. utg. Edinburgh: Mosby Elsevier, 2012.
- [4] P. Delves, S. Martin, D. Burton og I. Roitt, *Roitt's essential immunology*, 13 utg. Wiley-Blackwell, 2017.
- [5] *Leddgikt (revmatoid artritt)*. Sist oppdatert 9 apr 2018. Hentet fra: <https://nhi.no/sykdommer/muskelskjelett/giktskykdommer/leddgikt-oversikt/?page=all>.
- [6] I. B. McInnes og G. Schett, "The pathogenesis of rheumatoid arthritis," *N Engl J Med*, vol. 365, nr. 23, s. 2205-19, Dec 8 2011.
- [7] A. Raptopoulou, P. Sidiropoulos, M. Katsouraki og D. T. Boumpas, "Anti-citrulline antibodies in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis: Evolving concepts," *Crit Rev Clin Lab Sci*, vol. 44, nr. 4, s. 339-63, 2007.
- [8] S. F. Nielsen, S. E. Bojesen, P. Schnohr og B. G. Nordestgaard, "Elevated rheumatoid factor and long term risk of rheumatoid arthritis: A prospective cohort study," *BMJ*, vol. 345, s. e5244, Sep 6 2012.
- [9] F. Ingegnoli, R. Castelli og R. Gualtierotti, "Rheumatoid factors: Clinical applications," *Dis Markers*, vol. 35, nr. 6, s. 727-34, 2013.
- [10] L. Mathsson, J. Lampa, M. Mullazehi og J. Ronnelid, "Immune complexes from rheumatoid arthritis synovial fluid induce fcgammariia dependent and rheumatoid factor correlated production of tumour necrosis factor-alpha by peripheral blood mononuclear cells," *Arthritis Res Ther*, vol. 8, nr. 3, s. R64, 2006.
- [11] E. Kåss. *Synovitt*. Sist oppdatert 13 sept 2018. Hentet fra: <https://sml.snl.no/synovitt>.
- [12] "Leddgikt /reumatoid artritt (RA)," *Unilabs Laboratoriemedisin*.
- [13] M. Aarhaug, M. C. Flormælen. *Revmatoid faktor igm*. 2018. Prosedyrebeskrivelse.
- [14] H. W. Schroeder, Jr. og L. Cavacini, "Structure and function of immunoglobulins," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 125, nr. 2 Suppl 2, s. S41-52, Feb 2010.
- [15] M. Aarhaug. 2019. Muntlig kilde.
- [16] B. Skjetne. 2019. *Hva er akkreditering*. Hentet fra: <https://www.akkreditert.no/hva-er-akkreditering>.
- [17] "Quanta lite rf igm elisa," Inova Diagnostics, red., 10 utg., 2015. Pakningsvedlegg.
- [18] H. Abdi, "Normalizing data," The University of Texas at Dallas. 2010.
- [19] A. Rø. 2019. Muntlig kilde.
- [20] *Eqs dokument 20297, holdbarhet prøver til cytometri, immunologi og allergi*. Hentet fra: <https://stolav.no/Laboratoriemedisin/Holdbarhetsoversikter/Holdbarhet%20analyser%20immunologi%20cytometri%20allergi.pdf>.
- [21] A. H. Pripp, "sample size and power analyses in clinical trials," *Tidsskr Nor Laegeforen*, vol. 137, nr. 17, Sep 19 2017. Antalls- og styrkeberegninger i medisinske studier.

7.0 Vedlegg

Vedlegg 1

Klassifikasjonskriterier for revmatoid artritt [figuren er lånt fra norsk revmatikerforbunds hjemmeside] ^[5]

Klassifikasjonskriterier

Det er nye klassifikasjonskriterier for leddgikt fra 2010. Forutsetning for bruk av kriteriene er funn av minst ett ledd med synovitt som ikke kan forklares med annen sykdom. Diagnosen leddgikt krever minst 6 poeng.

	Poeng
1. Leddaffeksjon	
1 stort ledd	0
2-10 store ledd	1
1-3 småledd	2
4-10 småledd	3
2. Serologi	
Lav positiv revmatoid faktor eller ACPA (anti-CCP)	2
Sterk positiv revmatoid faktor eller ACPA	3
3. Akutfaserespons	
Forhøyet SR eller CRP	1
4. Varighet av symptomer	
Under 6 uker	0
6 uker eller lenger	1

Vedlegg 2

Oversikt over hvor lenge prøvene har vært nedfrosset

Prøve nr	Frosset ned
1	18.jan.19
2	18.jan.19
3	18.jan.19
4	22.jan.19
5	30.jan.19
6	30.jan.19
7	31.jan.19
8	06.mar.19
9	18.mar.19
10	23.jan.19
11	24.jan.19
12	30.jan.19
13	31.jan.19
14	31.jan.19
15	31.jan.19
16	21.mar.19

Vedlegg 3

Revmatoid faktor IgM

Forfatter: Marit Aarhaug, Maria Camilla Flormælen

Gyldig fra: 16.09.2018

Revisjon: 2.6

Godkjent av: Turid Fredriksen
9717

Revisjonsfrist: 15.09.2020 ID:

Hensikt og omfang

Prosedyren skal sikre stabile analyseresultater ved undersøkelse av RF IgM i serum. Det benyttes

Quanta LiteTM RF IgM analysekit fra INOVA Diagnostics.

Prosedyren omfatter fremgangsmåte for manuell og automatisk metode.

Rutinemessig utføres RFIgM på DS2[®] Automated ELISA System. Manuell metode kan benyttes ved DS2 driftsstans.

Prosedyren inngår i akkrediteringsomfanget for TEST295.

Grunnlagsinformasjon

Revmatoide faktorer (RF) er antistoffer rettet mot Fc-delen av IgG-molekyler. RF er vanligvis av klasse IgM, men kan være IgG eller IgA. De fleste kommersielle tester påviser fortrinnsvis revmatoide faktorer av type IgM.

Kan være til hjelp ved differensialdiagnostikk og prognosestilling hos pasienter med artritt.

Ved mistanke om revmatoid artritt kan det være fordelaktig å undersøke for anti-CCP i tillegg.

Forhøyede verdier sees hos ca. 60-80% av pasienter med revmatoid artritt eller med primært Sjögrensyndrom, hos omkring 20% av pasienter med systemisk lupus erythematosus, men hos mindre enn 5% av pasienter med Mb. Bekhterev, juvenil revmatoid artritt, psoriatrisk artropati, reaktiv artritt, artrose og Mb. Reiter. Positiv test kan ellers forekomme ved en rekke ulike tilstander som bl.a. primær biliær cirrhose, infeksjon med varicella-zoster virus, cytomegalovirus og Mycoplasma pneumoniae, infeksjons mononukleose, tuberkulose, sarkoidose, hepatitt, subakutt bakteriell endokarditt, syfilis og malaria. Pasienter med revmatoid artritt som har høye konsentrasjoner av revmatoide faktorer av IgM og/eller IgA klasse, har større risiko for utvikling av alvorlig sykdom. Waalers test ble tidligere antatt å ha noe høyere spesifisitet og lavere sensitivitet for revmatoid artritt enn de øvrige testene, men dette er neppe riktig med dagens tester. ¹⁾

RFIgM rekvireres som analysepakke sammen med anti-CCP fra 04.09.17.

Ansvar

Bioingeniør

Analyseprinsipp

Quanta LiteTM RF IgM er en enzym immunoassay (ELISA) for semi-kvantitativ bestemmelse av RF IgM-antistoffer. Mikrotiterbrønner er coatet med kanin IgG-antigen. Kontroller, standarder og fortynnet serum tilsettes i brønnene. RF IgM-antistoffer som er til stede i prøven, binder seg til antigen i brønnene. Ubundet antistoff vaskes bort. Det tilsettes HRP-merket konjugat (anti-human-IgM-antistoff) som bindes til RF av IgM-type. Ubundet konjugat vaskes bort. Det tilsettes substrat med et kromogen som gir en fargeutvikling direkte proporsjonal med konsentrasjon av RFIgM i prøven. Absorbansen måles fotometrisk ved 450 nm. Konsentrasjonen beregnes ut fra en flerpunkts standardkurve.

Oppstartdato

DSX ELISA-prosessor: Mai 2005

DSX ELISA-prosessor online:

Des 2006 DS2 ELISA-
prosessor: Mai 2015

Referanseområde

≤ 10 Units⁶⁾

Svartid

Analysen utføres hverdager, mandag til fredag.

Arbeidsbeskrivelse

Prøvemateriale

Serum.

Prøven kan sendes på vanlig måte og settes så fort som mulig i kjøleskap eller fryser etter mottak og registrering²⁾.

Prøvemateriale		
Oppbevaring på enheten	≤ -20°C i 1 uke (inntil 6 mnd)	Inntil 5 ganger ³⁾
Frys/tin (uten påvirkning av prøvesvar)		
Volum sekundærglass fra Prøvemottak		400 µL
Dødvolum analysering		ca. 300 µL
Volum analysering		10µL

Ingen krav til hemolyse/ lipemi⁴⁾ og ikteriske prøver²⁾.

Analyseinstrument

DS2[®] Automated ELISA System

Utstyr

Ved manuell metode:

- Boks til titreringsrør
- Titreringsrør
- Microlab 500
- 8-kanalers pipetter
- Manuelle pipetter
- Platedeksel
- Alarmklokke
- Vortexmikser
- Målekolbe 1000 ml
- Reagens-reservoar
- MTP-inkubator, 22°C
- TECAN Columbus mikrotiterplatevasker
- TECAN Sunrise
- Filterfotometer Skriver
-

Reagenser

- Renset vann type 2
- QUANTA Lite TM RFIgM ELISA-kit ²⁾

Holdbarhet reagenser på egne flasker: 4 uker ved 2-8°C
Skift også til nye flasker ved nytt lot nr / utgått holdbarhetsdato.

Konjugat er analysespesifikt. Øvrige reagenser kan benyttes felles med andre INOVA ELISA-kit under forutsetning av at det på reagensflaskene anmerkes hvilke lot som er brukt.

Se sikkerhetsdatablad for mer informasjon.

Kalibratorer

Standardene har følgende verdier: 100 – 50 – 25 – 12,5 – 5
Units Holdbarhet standarder på egne flasker: 4 uker ved 2-8°C

Standardkurven er kalibrert mot WHO internasjonal referanse 64/2²⁾.

Kontrollmateriale


Type kontroll	Oppbevaring - 20 °C fryser	Oppbevaring 2-8 °C kjøleskap
Prosesskontroll, RFIgM Control*		Til utløpsdato
Elisa negativ Control		Til utløpsdato

Intern kvalitetskontroll (pasientlik)	Inntil 6 mnd.	2 uker (etter tining)
---------------------------------------	---------------	-----------------------

*Akseptområde: se flaske


Ved behov kan analysesertifikat for spesifikt lot nr. for *Positiv kit-kontroll* finnes under:
www.inovadx.com Support, Certificates of analysis, katalognr. + lot nr.

Fremgangsmåte


Analysen skal utføres ved 18-26°C. Pasientprøver og reagenser må ha godkjent romtemperatur før oppstart. Se prosedyre  [Romtemperatur og temperering av reagenser/serumprøver](#), [Enhet for immunologi](#) [Godkjent].

Prøver/standarder/kontroller blandes på vortexmikser, øvrige reagenser manuelt. La MTP-pose ligge 30 min på benken før den åpnes.

Automatisk metode med DS2

1. Lag vaskebuffer, se pkt. 3 Manuell metode.
2. Sjekk arbeidsliste RFIgM fra NSL.
3. Følg prosedyre  [Dynex DS2, Bruk og vedlikehold AIT](#) Bruk gjeldende programfil: *RF IgM*

Manuell metode

1. Skriv ut arbeidsliste RFIgM.
2. Skriv arbeidsskjema. Se vedlegg.
3. Vaskebufferkonsentrat fortynnes til 1000 ml med Renset vann type 2. Holdbarhet: 1 uke ved 2-8°C.
4. Fortynn serum 1:101 i HRP Sample Diluent (i titreringsrør).
Benytt Microlab 500, Program 4 (10+1000 µl) eller manuelle pipetter. Fortynnede prøver er holdbare i 8 timer. Ta ut antall strips fra forpakningen, og lukk den godt igjen.
5. Tilsett 100 µl Standard/Negativ kontroll og fortynnet serum etter arbeidsskjema med 8-kanal pipette.
6. Dekk til plata, og inkuber i 30 min i inkubator (22°C).
Inkubasjonstiden starter etter tilsetning av siste prøve.
7. Still inn mikrotiterplatevaskeren: *Prime Kanal 1*
Program 1 INOVA (3 x 300 µl)
Antall rekker som skal vaskes
Vask og slå ut rester av vaskebuffer mot cellostoff.
Se prosedyre  [COLUMBUS mikrotiterplatevasker](#) [Godkjent].

8. Tilsett 100 µl HRP IgM konjugat til hver brønn.
Dekk til plata, og inkuber i 30 min i inkubator (22°C).
9. Vask som i pkt. 7.
10. Tilsett 100 µl TMB chromogen (substrat) til hver brønn.
Dekk til plata og inkuber i 30 min. i inkubator (22°C). Mørkt.
11. Tilsett 100 µl HRP stopp-løsning til hver brønn. Bland ved å banke forsiktig på plata.
12. Absorbansen leses av ved 450 nm innen 1 time. Sjekk at verdiene på standardene stemmer.
Se prosedyre [TECAN Sunrise filterfotometer, bruk og vedlikehold](#) [Godkjent].
Programfil: *RFIgM.mth*. Sample list: *RFIgM.smp*

Utgivelse av svar

For registrering, dokumentasjon og godkjenning av analyseoppsett, se prosedyre [Intern kvalitetskontroll, Enhet for immunologi](#) Kontrollresultater føres i excel-ark.

Krav til godkjenning

1. Kvalitetskrav i pakningsvedlegg²⁾

STD / Ktrl	OD
Cal A	> RFIgM pos ktrl > Elisa neg ktrl
Cal A	> 1.0
Elisa neg ktrl	< 0.2
RFIgM pos ktrl	> 2 x Elisa neg ktrl Verdien står på flaska.

Disse er lagt inn i assay-fil for RFIgM i DS2.

QC passed indikerer at kravene er oppfylt.

QC passed / *QC failed* ses øverst på rapporten.

2. Prosesskontroll (positiv kit kontroll) skal falle innenfor akseptområde gitt av produsent.
Se flaske.
3. Pasientlik prosesskontroll skal falle innenfor angitt akseptområde.

DS2 (online)

Prøvesvar med ev. kommentar *Grenseverdi* overføres automatisk via ANP.

Prøver med OD > 3,0 (*Over Limit* i DS2) vil ses som *OVER* på DS2 Data matrix liste. Disse og beregnede verdier >100 Units, får automatisk verdien >100 i NSL.

Kontroller alle alarmer i ANP. Ovennevnte tilfelle vil ses i ANP med alarm. Kontroller brønnen visuelt og godkjenn i ANP.

Skriv ut arbeidsliste (kun besvarte) i NSL.

Verifiser prøvesvarene.

Arkiver arbeidsliste og utskrift i perm

mærket RF. Arkiver prøvene i

arkivsystemet.

Manuell metode

Skriv inn resultatene i hele tall på arbeidslista.

Registrer resultater og kommentarer i NSL:

Resultat (U)	Tolkning	RFIgM rubrikk	Kommentar i NSL
<5	Negativ	<5	
5	Negativ	Hele tall	
<6	Negativ	Hele tall	
6-10	Grenseverdi	Hele tall	Grenseverdi
11-100	Positiv	Hele tall	
>100	Positiv	>100	

Verifiser prøvesvarene sammen med en annen bioingeniør. Arkiver resultatene og prøvene som angitt for DS2(online).

Måleområder

5-100 RFIgM units

Analytisk kvalitet

Analytisk presisjon

Repeterbarhet

DS2 instrument 1 ⁵⁾

CV nivå 45 units	3,6 %
CV nivå 111 units	3,4 %

DS2 instrument 2⁵⁾

CV nivå 45 units	5,4 %
CV nivå 111 units	4,4 %

Reproduserbarhet

7)

DS2 instrument 1: 27.08.16-

CV nivå 60 units n=515	10,0 %
------------------------	--------

DS2 instrument 2: 04.01.17-11.01.17⁸⁾

CV nivå 56 units n=11	8,2 %
-----------------------	-------

DS2 instrument 2 benyttes kun som back-up instrument for analysen.

Feilkilder

Immunkomplekser eller andre immunglobulinaggregater kan gi falske positive resultater²⁾.

Referanser

1. *Brukerhåndbok i medisinsk biokjemi* (20.10.2017).
<http://brukerhandboken.no/index.php?action=showtopic&topic=60eff1f135e9ae39aa14>
2. *Pakningsvedlegg QUANTA Lite™ RFIgM*. Gjeldende versjon.
Oppbevares ved Enhet for immunologi.
3. *Tin/frys validering (E-sak 11/1389-4)*.
4. Bachelor bioing. student-oppgave 2007: *Evaluering av mulig interferens av hemolyse og/eller lipemi i serumprøver ved analysering av anti-nukleære antistoffer (ANA) og revmatoid faktor (RFIgM)*.
Oppbevares ved Enhet for immunologi.

5.

Du har ikke tilgang til dokument med ID 31058

6. Referat Fagmøte immunologi 28.02.2007

I:\STOLAV - Laboratoriemedisinsk klinikk Fellesområde\AIT\S -Imm-Cyt\Immunologi\6 Møter\Fagmøter\2007\Referat fagmøte imm 280207.doc

7. I:\STOLAV - Laboratoriemedisinsk klinikk Fellesområde\AIT\S -Imm-Cyt\Immunologi\1 InterneKvalitetskontroller\DS2\RFIgM\RFIgM Historisk langtidskontroll 2015.xlsx
8. I:\STOLAV - Laboratoriemedisinsk klinikk Fellesområde\AIT\S -Imm-Cyt\Immunologi\1 InterneKvalitetskontroller\DS2\RFIgM\Reproduserbarhet DS2 2.docx

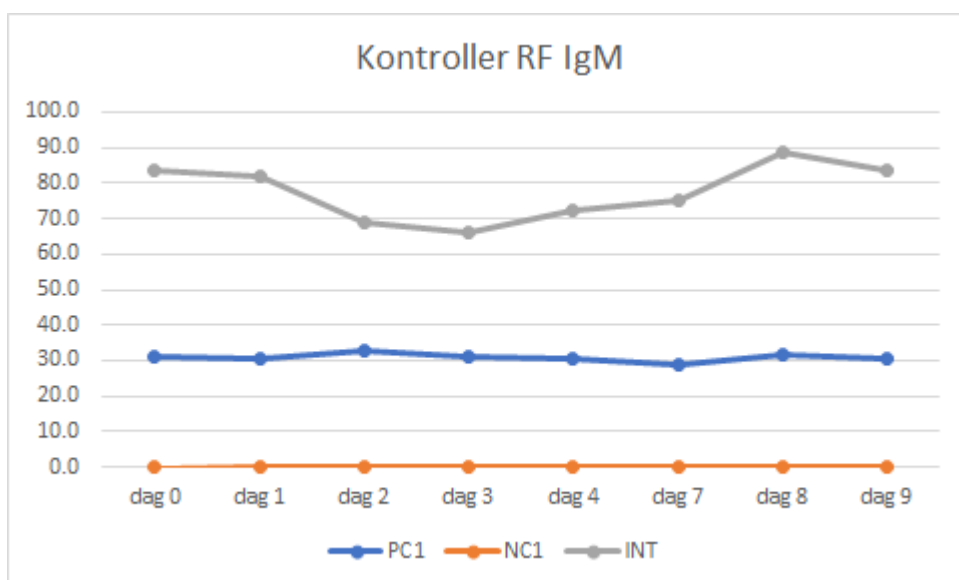
[Tilbake til søk](#)

Vedlegg

[RFIgM Arbeidsskjema](#)

Vedlegg 4

Målingene for kontrollene, dag til dag. Verdiene er gjennomsnittet mellom to paralleller. PC1 er den positive kontrollen, NC1 er den negative kontrollen og INT er en pasientlik internkontroll som er laget på avdelingen. Ved alle målingene er kontrollene innenfor sine grenseverdier, som vises i tabellen



Positiv kontroll	20-46
Negativ kontroll	<10 units
Internlik	< 31,4-100,4 > x=65,9

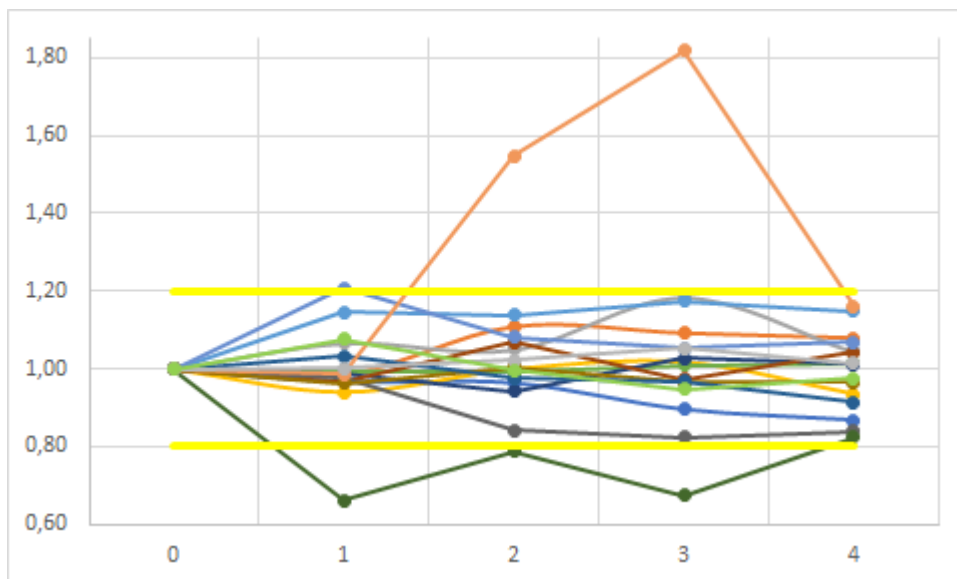
Vedlegg 5

Måledata og prosentendring fra dag til dag for prøver oppbevart i romtemperatur

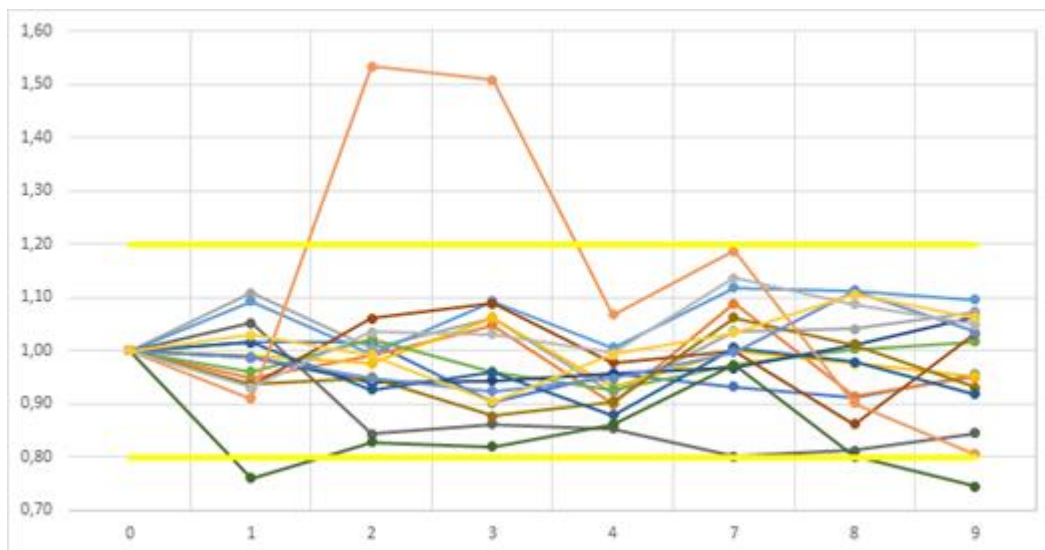
Romtemperatur									
Tid	Dag 0	Dag 1	%-endring	Dag 2	%-endring	Dag 3	%-endring	Dag 4	%-endring
Prøve nr	U/L	U/L	Dag 0 - Dag 1	U/L	Dag 0 - Dag 2	U/L	Dag 0 - Dag 3	U/L	Dag 0 - Dag 4
1	31,5	30,5	-3,17%	30,4	-3,49%	28,2	-10,48%	27,3	-13,33%
2	23,9	23,5	-1,67%	26,5	10,88%	26,1	9,21%	25,8	7,95%
3	17,9	19,1	6,70%	18,8	5,03%	21,2	18,44%	18,7	4,47%
4	20,9	19,6	-6,22%	20,9	0,00%	21,3	1,91%	19,5	-6,70%
5	28,3	32,4	14,49%	32,2	13,78%	33,2	17,31%	32,5	14,84%
6	29,1	28,9	-0,69%	28,8	-1,03%	29,4	1,03%	29,5	1,37%
7	25,3	25,0	-1,19%	23,8	-5,93%	26,0	2,77%	25,6	1,19%
8	19,3	18,7	-3,11%	20,6	6,74%	18,8	-2,59%	20,1	4,15%
9	64,1	62,7	-2,18%	54,0	-15,76%	52,8	-17,63%	53,8	-16,07%
10	59,8	57,5	-3,85%	60,0	0,33%	57,7	-3,51%	57,7	-3,51%
11	45,7	47,2	3,28%	44,6	-2,41%	44,2	-3,28%	41,8	-8,53%
12	42,0	27,8	-33,81%	33,1	-21,19%	28,3	-32,62%	34,6	-17,62%
13	42,5	51,3	20,71%	46,0	8,24%	44,8	5,41%	45,4	6,82%
14	30,3	29,8	-1,65%	46,9	54,79%	55,1	81,85%	35,2	16,17%
15	48,2	48,3	0,21%	49,3	2,28%	50,7	5,19%	48,9	1,45%
16	84,4	90,9	7,70%	84,0	-0,47%	79,9	-5,33%	82,4	-2,37%

Vedlegg 7

Endring i målt konsentrasjon, med outlayeren prøve 14, ved romtemperatur:



Endring i målt konsentrasjon, med outlayeren prøve 14, ved kjøleskapstemperatur:



Vedlegg 8

Kalkulert antall prøver som trengs om man ønsker et signifikansnivå på 5% og en styrke på 20%. Regnet ut v.h.a. MedCalc styrkekalkulator.

File:

Time: 5.16.2019 23:07

Sample size: paired samples t-test

Options

Type I error (Alpha, Significance)	0.05
Type II error (Beta, 1-Power)	0.20

Data

Mean difference	0.20
Standard deviation of differences	0.18

Result

Minimum required number of pairs	9
----------------------------------	---

Table

		Type I Error - Alpha			
		0.20	0.10	0.05	0.01
Type II Error - Beta	0.20	5	7	9	13
	0.10	7	9	11	16
	0.05	8	11	13	18
	0.01	12	15	17	23

