



Katri Ruokamo

## **TUPAKOINTI ALTISTAVANA TEKIJÄNÄ REUMAFAKTORIN JA ANTI-MCV:N ESIINTYMISELLE VERESSÄ**

Rheumachec-vieritestin luotettavuuden arviointi

# **TUPAKOINTI ALTISTAVANA TEKIJÄNÄ REUMAFAKTORIN JA ANTI-MCV:N ESIINTYMISELLE VERESSÄ**

Rheumachec-vieritestin luotettavuuden arviointi

Katri Ruokamo  
Opinnäytetyö  
Syksy 2010  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

## TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu  
Bioanalytiikan koulutusohjelma

---

Tekijä: Katri Ruokamo

Opinnäytetyön nimi: Tupakointi altistavana tekijänä reumafaktorin ja anti-MCV:n esiintymiselle veressä, Rheumachec-vieritestin luotettavuuden arviointi

Työn ohjaajat: Simo Rasi, Paula Reponen, Hanna-Maarit Aho

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Syksy 2010

Sivumäärä: 44 + 7 liitettä

---

## TIIVISTELMÄ

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, voiko tupakointi toimia altistavana tekijänä reumafaktorin ja anti-MCV:n (vasta-aine sitrullinisoituneelle vimentiinille) esiintymiselle veressä. Samalla tutkittiin Rheumachec-vieritestin luotettavuutta reumafaktorin ja anti-MCV:n määrittämisessä. Reumafaktori ja anti-MCV ovat nivelreumassa tyypillisesti esiintyviä vasta-aineita. Nivelreuman etiologia on vielä tuntematon, mutta tupakoinnin vaikutusta nivelreumaan on jo aikaisemminkin tutkittu. Työn toimeksiantajana oli Rheumachec-vieritestin maahantuojat Biotop Oy.

Opinnäytetyöni on kvantitatiivinen tutkimus, jossa perusjoukkona olivat OAMK:n Sosiaali- ja terveysalan yksikön opiskelijat ja henkilökunta. Tutkimusta varten otettiin verinäytteet 40 vapaaehtoiselta henkilöltä, joista 20 oli tupakoivaa ja 20 tupakoimatonta. Tutkittavilta otettiin sormenpäältä kapillaariverinäyte, joka analysoitiin Rheumachec-vieritestillä. Lisäksi kaikilta tutkittavilta otettiin suoniverinäyte, josta määritettiin reumafaktoriipitoisuus Konelab 20i -kemian analysaattorilla ja anti-MCV-pitoisuus ELISA-tekniikkaan perustuvalla Anti-MCV-kitillä. Näiden kahden ryhmän välisiä eroja anti-MCV- ja reumafaktoriarvoissa vertailtiin.

Rheumachec-vieritesti antoi 58 %:lle näytteistä positiivisen tuloksen reumafaktorille, ja 12 %:lle näytteistä positiivisen tuloksen anti-MCV:lle. Konelab 20i:llä ja anti-MCV-kitillä analysoidut suoniverinäytteet puolestaan olivat kaikki negatiivisia reumafaktorille ja anti-MCV:lle. Rheumachec-vieritesti ei tämän tutkimuksen perusteella ole luotettava määrittämään reumafaktoria, sillä väärin positiivisten määrä on huomattava. Tupakoivien ja tupakoimattomien ryhmien välillä ei ollut eroja anti-MCV- ja reumafaktoriipitoisuuksissa, koska kaikki näytteet olivat suoniverinäytteestä määritettynä negatiivisia. Rheumachec-vieritesti kuitenkin vaikuttaisi olevan hieman herkempi antamaan vääriä positiivisia tuloksia tupakoiville.

Tätä tutkimusta voidaan pitää suuntaa antavana, sillä tutkimusjoukko oli suppea. Aiheesta voisi mahdollisesti tehdä laajemman tutkimuksen isommalla aineistolla, jolloin tulokset tupakoimattomien ja tupakoivien osalta olisivat enemmän yleistettävissä. Koska tutkimusjoukkoon kuului vain 40 henkilöä, täytyy ottaa myös huomioon sattuman vaikutus tuloksiin.

---

Asiasanat: Rheumachec-vieritesti, nivelreuma, reumafaktori, anti-MCV, tupakointi

## ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences  
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

---

Author: Katri Ruokamo

Title of thesis: Smoking as Predisposing Cause of Appearance of Rheumatoid Factor and Anti-MCV in Blood

Supervisors: Simo Rasi, Paula Reponen, Hanna-Maarit Aho

Term and year when the thesis was submitted: Autumn 2010

Number of pages: 44 + 7 appendices

---

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Rheumatoid factor and anti-MCV (antibodies against mutated citrullinated vimentin) are antibodies which usually appear in rheumatoid arthritis. The aetiology of rheumatoid arthritis is still unknown, but the effect of smoking on rheumatoid arthritis has been examined earlier. This thesis was commissioned by Biotop Oy.

**AIM:** The aim of this thesis was to find out whether smoking can predispose to the appearance of rheumatoid factor and anti-MCV in blood. Also the aim was to examine how reliable the Rheumachec rapid test is in detecting of rheumatoid factor and anti-MCV.

**METHOD:** This thesis was a quantitative study. The material was collected by taking blood samples from twenty non-smoking persons and twenty smoking persons. The Rheumachec rapid test was performed by using capillary blood samples. A venous blood sample was also taken from each member of the test group, and the results that the Rheumachec rapid test gave were verified using that venous blood sample. The Rheumachec rapid test detected both rheumatoid factor and anti-MCV. The results the Rheumachec rapid test gave for rheumatoid factor were verified by Konelab 20i chemistry analyzer. Accordingly, the results the Rheumachec rapid test gave for anti-MCV were verified by the determination method based on ELISA technique. To find out if smoking can predispose to the appearance of rheumatoid factor and anti-MCV in blood, the results of smokers and non-smokers were compared.

**RESULTS:** The results of the study showed that the Rheumachec rapid test was not very reliable in determination of rheumatoid factor and anti-MCV. Even though all the samples that were shown negative with the Rheumachec rapid test were negative also when determined with a parallel method, the number of wrong positive results was significant. All the samples from smokers and non-smokers were negative to rheumatoid factor and anti-MCV, when determined with Konelab 20i and ELISA technique. So on the basis of this study smoking did not cause the appearance of rheumatoid factor and anti-MCV in blood.

**CONCLUSION:** The test group in this study was quite small, so this thesis can only be considered as a direction giving study. Maybe if a similar study is done with a larger test group, the results would be considered more reliable. Also, then the results of smoking as a predisposing cause of the appearance of rheumatoid factor and anti-MCV in blood could be more generalised.

---

Keywords: Rheumachec rapid test, rheumatoid arthritis, rheumatoid factor, anti-MCV, smoking

## SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

1 JOHDANTO .....	7
2 NIVELREUMA.....	8
2.1 Nivelreuman immunologiset poikkeavuudet .....	9
2.2 Tupakoinnin vaikutus nivelreumaan .....	10
3 NIVELREUMASSA TYYPILLISESTI ESIINTYVÄT VASTA-AINEET .....	11
3.1 Reumafaktori .....	11
3.2 Anti-MCV .....	11
4 MÄÄRITYSTEN TOIMINTAPERIAATTEET .....	13
4.1 Rheumachec-vieritesti .....	13
4.2 Anti-MCV-kitti.....	13
4.3 Reumafaktorin määrittäminen Konelab 20i -analysointilaitteella .....	14
5 TUTKIMUSONGELMAT .....	15
6 LAADUNVARMISTUS JA TUTKIMUKSEN LUOTETTAVUUS .....	16
6.1 Laadunvarmistus laboratoriossa .....	16
6.2 Vakioitu näytteenotto .....	16
6.3 Tutkimuksen luotettavuus .....	18
6.4 Tutkimuksen eettiset näkökohdat .....	19
7 TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN.....	20
7.1 Näytteenoton toteuttaminen.....	20
7.2 Näytteenotto .....	22
7.3 Näytteiden analysointi.....	22
7.4 Näytteistä saatujen tulosten analysointi.....	24
8 TULOKSET .....	26
8.1 Laadunvarmistustulokset .....	26
8.2 Taustatiedot.....	31
8.3 Eri menetelmillä määritettyjen reumafaktori- ja anti-MCV-arvojen erot .....	33
8.4 Rheumachec-vieritestin luotettavuus.....	36
8.5 Tupakoivien ja tupakoimattomien erot anti-MCV- ja reumafaktoriarvoissa .....	36

8.6 Tupakointi mahdollisena altistavana tekijänä anti-MCV:n ja reumafaktorin esiintymiselle veressä.....	38
9 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA.....	39
LÄHTEET.....	41
LIITTEET .....	44

# 1 JOHDANTO

Nivelreuma on yleisin nivelten tulehduksellinen sairaus, mutta sen etiologia eli syyt sairaudelle ovat tuntemattomia. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, voiko tupakointi toimia altistavana tekijänä nivelreumalle tyypillisten vasta-aineiden, reumafaktorin ja anti-MCV:n (vasta-aine sitrullinisoituneelle vimentiinille) esiintymiselle veressä ja samalla tutkia Rheumachec-vieritestin luotettavuutta reumafaktorin ja anti-MCV:n määrittämisessä. Tupakoinnin vaikutusta nivelreumaan on jo aikaisemmin tutkittu. Tällä tutkimuksella haluttiin selvittää tupakoinnin vaikutusta kahden vasta-ainearvon nousuun ja sitä kautta saada tietoa tupakoinnista nivelreumalle altistavana tekijänä. Tutkimusta varten otettiin verinäytteet 20 tupakoivalta ja 20 tupakoimattomalta henkilöltä ja näiden kahden ryhmän välisiä eroja vasta-ainepitoisuuksissa vertailtiin. Rheumachec-vieritestin antamia tuloksia verrattiin ELISA-tekniikkaan perustuvaan anti-MCV:n määrittämenetelmään sekä reumafaktorimäärittäykseen Konelab 20i -analysaattorilla ja näin saatiin tietoa Rheumachec-vieritestin luotettavuudesta.

Opinnäytetyöni aiheen sain Biotop Oy:stä, joka maahantuo sekä Rheumachec-vieritestiä että ELISA-tekniikkaan perustuvaa anti-MCV:n määrittämenetelmää. Molemmat testit ovat saksalaisen Orgentec Diagnostikan valmistamia. Biotop Oy halusi, että Rheumachec-vieritestiä koestetaan 20 tupakoivalla ja 20 tupakoimattomalla henkilöllä. Tutkimuksen tulostavoitteena oli saada luotettavaa tutkimustietoa tupakoinnista mahdollisena altistavana tekijänä reumafaktorin ja anti-MCV:n esiintymiselle sekä saada tietoa Rheumachec-vieritestin luotettavuudesta.

Opinnäytetyöni toimii suuntaa antavana tutkimuksena, pilottityönä, laajemmalle tutkimukselle, jonka Biotop Oy mahdollisesti teettää. Biotop Oy antoi käyttööni Rheumachec-vieritestiä ja anti-MCV-kitin. Thermo Fisher Scientific Oy antoi käyttööni Konelab 20i -analysaattorille tarvittavat reagenssit ja kalibrointiliuokset.

## 2 NIVELREUMA

Nivelreuma eli reumatoidiartriitti on autoimmuunisairaus, eli immuunivaste kohdistuu kehon omia kudoksia vastaan. Kudostuhoa aiheutuu erityisesti nivelissä. Tällöin elimistössä tapahtuu immunologinen reaktio, jossa muodostuu autovasta-aineita eli vasta-aineita omia kudoksia kohtaan. Nivelreuma on krooninen ja usein invalidisoiva sairaus. (Jaatinen & Raudasoja 2004, 152, Kustannus Oy Duodecim, hakupäivä 21.10.2009.)

Nivelreuman keskeisin oire on nivelkalvon tulehdus. Tulehdus voi olla missä tahansa elimistön nivelessä, mutta tyypillisimpiä ovat ranteiden ja päkiöiden nivelten sekä sormien tyvi- ja keskinivelten tulehdukset. Niveloireiden lisäksi tauti aiheuttaa muutoksia myös muualla elimistössä kuten jännetupeissa, jänteissä, lihaksissa ja limapusseissa. Myös atrofia eli lihasten surkastuminen, kuume, laihtuminen ja ruokahaluttomuus ovat yleisiä oireita. Taudin edetessä pitemmälle alkaa esiintyä myös niveltenulkoisia vaurioita, muun muassa reumakyhmyjä, vaskuliitteja eli verisuonitulehdusta, neuropatiaa, perikardiittia eli sydänpussitulehdusta sekä pernan ja imurauhas-ten suurentumista. (Isomäki 2002, 152–154, Jaatinen & Raudasoja 2004, 152.)

Nivelreuma aiheuttaa kalsiumin poistumista nivelen luista ja sitä kautta osteoporoosia. Nivelen luu tuhoutuu nivelpussin kiinnittymiskohdasta, nivelrusto heikentyy ja myös nivelpinta tuhoutuu. Potilaan liikkuminen vaikeutuu ja nivelen luut liukuvat pois normaaleista asennoistaan. Nivelet tulevat muodottomiksi ja menettävät toimintakykynsä. (ODC Group Ink., hakupäivä 23.10.2009.)

Noin yksi prosentti maailman väestöstä kärsii nivelreumasta, ja se onkin yleisin nivelten tulehduksellinen sairaus. Vaikka nivelreumalle ei ole löydetty yksiselitteistä laukaisevaa tekijää, on kuitenkin varmaa, että oireilu johtuu immuunisysteemin toimintahäiriöstä, mikä puolestaan aiheuttaa nivelten tulehdusta (Hammar & Stolzenberg 2009, hakupäivä 23.10.2009). Nivelreuman etiologiaa on pyritty selittämään muun muassa metabolisilla eli aineenvaihdunnallisilla, endokrinologisilla eli hormonitoimintaan liittyvillä ja psykologisilla syillä. Myös viruksia, bakteereita, prioneja, sekä mykoplasmoja on epäilty nivelreuman aiheuttajiksi. (Isomäki 2002, 153.) Jaatisen ja Raudasojan (2004, 152) mukaan nivelreumalle altistavia tekijöitä ovat esimerkiksi tartuntataudit, psyykkiset tekijät, perimä ja synnytyksen jälkeinen aika. Sekä geneettiset että ympäristötekijät ovat osallisina nivelreuman kehittymiseen (Hutchinson, Lear, Lynch, Moots & Shepstone 2001, 223–227).



## 2.1 Nivelreuman immunologiset poikkeavuudet

Nivelreumalle on tyypillistä, että tulehtuneella nivelpinnalla on hyvin paljon leukosyyttejä, joista suurin osa on neutrofiilejä, monosyyttejä ja dendriittisiä makrofageja. Nivelkalvolla on tällöin runsaasti myös B-soluja, jotka tuottavat suuria määriä reumatekijöitä. CD4+-muisti-T-solut ovat myös tavanomaisia tulehtuneella nivelpinnalla. Tulehdukseen osallistuvien T-solujen merkitys on epäselvää; ne hakeutuvat niveleen epäspesifisten mekanismien kautta ja ovat fenotyybiltään aktivoituneita, mutta toiminnaltaan niukkoja. T-solujen toiminta on kuitenkin merkityksellistä tulehdusreaktion jatkumiselle. Nivelkalvon T-solujen ei ole osoitettu olevan spesifisiä millekään tietylle anti-geenille. Joitakin T-solujen tunnistamia antigeenejä on kuitenkin löydetty, esimerkiksi proteiini p205, aggregaani (rustoperäinen proteoglykaani), sekä ruston glykoproteiini gp39. (Palosuo Reumataudit-kirjassa 2002, 41-42.)

Monimutkainen eri immuunijärjestelmän solujen vuorovaikutus, sekä anti-inflammatoriset proteiinit, eli sytokiinit, johtavat nivelen turpoamiseen, jolloin nivelkalvo alkaa tuottaa rustoa ja luuta tuhoavia aineita. Makrofagi-monosyyttisarjan sytokiinitasot ovat koholla nivelnesteessä, mutta T-soluperäiset lymfokiinitasot ovat matalia. (ODC-Group Ink., hakupäivä 24.10.2009, Palosuo Reumataudit-kirjassa 2002, 42.)

Kompleksivälitteinen nivelkalvoa tuhoava tulehdusreaktio aiheutuu, kun vasta-aine tarttuu anti-geeniin ja syntyy immunokompleksi. Yleensä immunokompleksit eivät ole haitallisia ja niitä syntyy tavallisesti infektioiden aikana. Jotkin immunokompleksit ovat kuitenkin alttiita menemään pienten verisuonten endoteelin läpi kudokseen ja sakkautumaan verisuonen seinämään. Tällaisissa immunokomplekseissa on vain vähän vasta-aineita, mutta runsaasti antigeeniä. Antigeeneihin kiinnittyneet IgG- tai IgM-luokan vasta-aineet aktivoivat komplementtia. Komplementti on tulehdusreaktion ja mikrobien tuhoamiseen osallistuva puolustusjärjestelmän osa, joka koostuu noin 20 veren proteiinista. Komplementin aktivoituminen saa aikaan tulehdusreaktion kudoksessa. (Karttunen, Soini & Vuopala 2005, 94, 105-106.)

Nivelreumalle on tyypillinen myös soluvälitteinen tulehdusreaktio. Tämä edellyttää sitä, että potilaalla on antigeenin tunnistavia T-lymfosyyttejä. CD4-muistisolut alkavat antigeenin vaikutuksesta erittää sytokiineja, esimerkiksi gammainterferonia, sekä interleukiineja 2 ja 12. Nämä saavat yhdessä muiden välittäjäaineiden kanssa aikaan antigeenille spesifisten CD4-auttaja- ja CD8-

sytotoksisten- T-lymfosyyttien lisääntymisen kudoksessa. Sytotoksiset T-lymfosyytit osallistuvat antigeeniä ilmentävien solujen tuhoamiseen. Kudokseen kertyy myös makrofageja, jotka pyrkivät tuhoamaan antigeenin. (Karttunen ym. 2005, 107.)

## **2.2 Tupakoinnin vaikutus nivelreumaan**

Tupakoinnin tiedetään olevan riski reumafaktoriposiitiviselle nivelreumalle. Tupakoivat nivelreumapotilaat ovat tupakoimattomia suuremmalla todennäköisyydellä reumafaktoriposiitivisia. Tupakointi on myös yhdistetty reumafaktorin tuotantoon terveillä ihmisillä. (Goodson, N. Farragher, T. & Symmons, 2008, hakupäivä 12.1.2010.) Norjalaisessa tutkimuksessa havaittiin, että tupakoivilla miehillä oli kohonnut riski saada seroposiitivinen nivelreuma. Pohjoisamerikkalaisessa tutkimuksessa puolestaan havaittiin 25 tupakkaa päivässä yli 20 vuoden ajan polttaneilla olevan 49% suurempi riski saada serologisista testeistä positiivinen tulos nivelreumalle. (Hutchinson ym. 2001, hakupäivä 12.1.2010.)

## 3 NIVELREUMASSA TYYPILLISESTI ESIINTYVÄT VASTA-AINEET

### 3.1 Reumafaktori

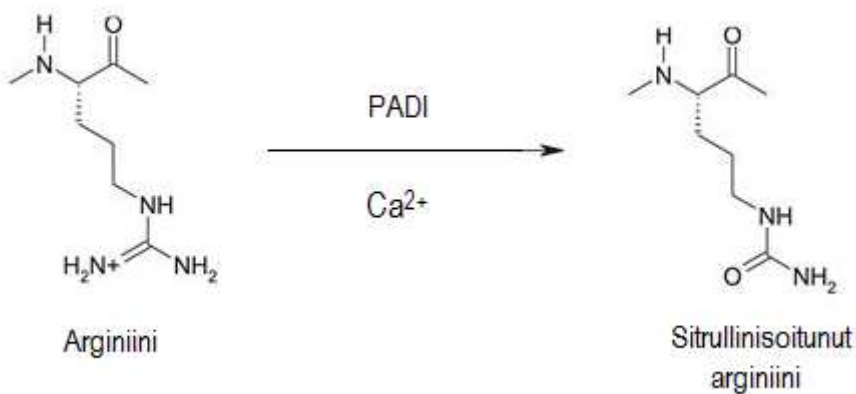
Eräs merkittävä laboratoriotutkimus nivelreuman diagnostiikassa on reumafaktorin määrittäminen. Reumafaktorin löytyminen ei kuitenkaan välttämättä ole merkki nivelreumasta, sillä kyseistä vasta-ainetta esiintyy myös monissa muissa sairauksissa, kuten kroonisissa maksasairauksissa ja tuumoreissa. Jopa terveillä yksilöillä voi olla reumafaktori. (Hammar & Stolzenberg 2009, hakupäivä 23.10.2009.) Vastaavasti kaikilla nivelreumaa sairastavilla ei reumafaktoria ole, ainoastaan 70–80 %:lla (Palosuo, 2002, 42).

Reumafaktori on yleensä IgM-luokkaan kuuluva komplementtia sitova autovasta-aine, mutta nivelreumapotilailla on myös IgG- ja IgA-luokkien reumafaktoreita. Ainoastaan IgM-luokan reumafaktorilla on osoitettu olevan selvä tulehdusta ylläpitävä patogeeninen tehtävä, mutta on myös mahdollista että IgG- ja IgA-luokkien reumafaktoreilla on merkittävä tehtävä nivelreuman patogeenisessä. Reumafaktori reagoi ihmisen ja useiden nisäkkäiden IgG-molekyylien antigeenipeptoppien kanssa. Nivelnesteessä ja perifeerisessä veressä olevat reumafaktorit eroavat hieman toisistaan. Nivelnesteeseen reumafaktori tarttuu suurimmalla affiniteetillä IgG:n alaluokkaan IgG3:een, kun taas seerumin reumafaktori sitoutuu parhaiten alaluokkiin IgG1, IgG2 ja IgG4. (Palosuo, 2002, 42–43.)

### 3.2 Anti-MCV

Vimentini on proteiini, jota esiintyy etenkin sidekudossoluissa. Vimentini sitrullinisoituu, kun proteiinin arginiiniaminohappo muuntuu sitrulliiniksi, jolloin muodostuu syklinen peptidi. Sitrullinisoitunutta vimentiniä (MCV, Mutated Citrullinated Vimentin) vastaan muodostuvaa vasta-ainetta kutsutaan anti-MCV:ksi. (Liite 4) ACPA:t (Antibodies to Citrullinated Protein Antigen), joihin anti-MCV kuuluu, ovat erittäin spesifisiä ja luotettavia biomerkkiaineita nivelreumalle, ja niillä voidaan diagnosoida taudin varhaismuotoja. Nämä autovasta-aineet voidaan havaita verestä jo vuosia ennen taudin puhkeamista. (Hammar & Stolzenberg 2009a, hakupäivä 23.10.2009, Holthöfer & Heikkilä 2005, 365–366, Kustannus Oy Duodecim, hakupäivä 21.10.2009)

Sitrulliini on aminohappo, joka syntyy, kun peptidyyliarginiinideiminaasientsyymi (PADI) saa aikaan arginiiniaminohapon muuntumisen, esimerkiksi tulehduksen tai muiden biologisten prosessien aikana (kuvio 1). Jotta PADI aktivoituu, tarvitaan sopiva  $\text{Ca}^{2+}$ -konsentraatio, joka syntyy, kun tulehdusalueella olevat granulosyytit siirtyvät apoptoosiin. Apoptoottiset solut eivät nivelreumassa poistu tarpeeksi tehokkaasti tulehdusalueelta, vaan hajoavat siellä, jolloin PADI:n aktivoitumisen vuoksi syntyy sitrullinisoituneita proteiineja. Anti-MCV siis muodostuu nivelreumassa paikallisesti nivelissä, joissa vimentini sitrullinisoituu tulehdusreaktion aikana. Tupakoinnin on huomattu olevan riski ACPA-positiiviselle nivelreumalle. Tupakointi saa aikaan vasta-ainetuotannon lisäämällä PADI-tuotantoa keuhkojen makrofageissa, joka puolestaan saa proteiinit sitrullinisoitumaan. (Kang, E. & Song, Y. 2009, hakupäivä 12.1.2010.)



KUVIO 1: Arginiiniaminohapon muuntuminen sitrulliiniksi. Reaktion katalysoi peptidylarginiinideiminaasientsyymi (PADI),  $\text{Ca}^{2+}$ -ionin läsnä ollessa. (Mukaillen Lam, Hakupäivä 5.10.2010)

## 4 MÄÄRITYSTEN TOIMINTAPERIAATTEET

### 4.1 Rheumachec-vieritesti

Rheumachec-vieritestin toiminta perustuu immunokromatografiaan. Tämä vieritesti tunnistaa kokoverestä reumafaktorin sekä anti-MCV:n (vasta-aine sitrullinisoituneelle vimentiinille). Näytteeksi Rheumachec-vieritestiin tarvitaan kapillaarikokoverta. Näyte otetaan potilaan sormenpäätä lansetilla punktoidusta reiästä muovipipettiin, josta se siirretään testikasetin huovalle. (Liite 3)

Rheumachec-vieritesti on kalvopohjainen kaksivaiheinen menetelmä, jossa on erityinen autovasta-aineita sitova proteiini. Tähän proteiiniin on sidottu kolloidikultahiukkanen. Kun näyte on pipetoitu testikasettiin, se menee erottelijan läpi. Erottelijaan jäävät verisolut. Jäljelle jääneessä plasmassa mahdollisesti olevat patologiset autovasta-aineet (reumafaktori, anti-MCV) sitoutuvat spesifiseen proteiini-kolloidikulta kompleksiin. Tähän kompleksiin sitoutuneet auto-vasta-aineet kulkeutuvat kapillaari-imussa kalvolla kohti testi-ikkunaa, jonka pohjalle on kiinnitetty rekombinantti-MCV -proteiinia (anti-MCV:n antigeeni) ja ihmisen immunoglobuliineja (reumafaktorin antigeeni). Jos näytteessä on autovasta-aineita ne sitoutuvat antigeeneihinsä, jolloin testin lukukenttään muodostuu näkyvä viiva kolloidikultahiukkasten ansiosta. Toisin sanoen yksi tai kaksi punaviolettia viivaa ilmestyy testin lukukenttään, mikäli näyte on reumafaktori- tai anti-MCV-positiivinen. Jäljelle jäänyt sitoutumaton kulta-kompleksi siirtyy kontrollialueelle osoittamaan testin onnistuneen suorituksen. (Liite 3)

### 4.2 Anti-MCV-kitti

Orgentec Diagnostican valmistama Anti-MCV-kitti perustuu epäsuoraan ELISA-tekniikkaan (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Se on spesifinen ja herkkä ja mittaa kvantitatiivisesti IgG-luokan autovasta-aineita sitrullinisoituneelle vimentiinille ihmisen seerumista tai plasmasta. Tässä opinnäytetyössä näytemuotona oli seerumi. Hemolyyysiä ja lipemiaa näytteessä tulisi välttää, mutta niillä ei ole osoitettu olevan vaikutusta testin tuloksiin. (Liite 4)

Sitrullinisoitunut vimentini on sitoutuneena kuoppalevyn pohjalle. Mikäli vasta-aineet sitrullinisoituneelle vimentiinille ovat vapaana seerumissa, ne sitoutuvat antigeeniinsä eli sitrullinisoituneeseen vimentiniin. Kuoppalevyjen pesu irrottaa epäspesifiset seerumin ja plasman komponentit. Piparjuuriperoksidaasientsyymillä konjugoitu anti-humaani IgG havaitsee immunologisesti potilaan vasta-aineet muodostaen konjugaatti/vasta-aine/antigeeni-kompleksin. Kuoppalevyjen pesu irrottaa sitoutumattoman konjugaatin. Kun kuoppiin lisätään TMB-substraattiliuos (3,3', 5,5' - tetrametyyllibentsidiini), se hapettuu, jolloin muodostuu sinistä väriä. TMB:n hapettumisen saa aikaan happiradikaalit, jotka muodostuvat, kun piparjuuriperoksidaasientsyymi hydrolysoi  $H_2O_2$ :n. Pysäytysliuoksen happo saa reaktion pysähtymään, jolloin muodostuu keltainen lopputuote. Keltaisen värin intensiteetti mitataan fotometrisesti aallonpituudella 450 nm. Värin intensiteetti on suoraan verrannollinen IgG-luokan vasta-aineen konsentraatioon alkuperäisessä näytteessä. (Liite 4)

### **4.3 Reumafaktorin määrittäminen Konelab 20i -analysaattorilla**

Reumafaktorin määrittäminen Konelab 20i -analysaattorilla on tarkoitettu reumafaktorin kvantitatiiviseen määrittämiseen ihmisen seerumista tai plasmasta. Määrittäminen perustuu reumafaktorin ja ihmisen IgG:llä päällystettyjen mikropartikkelien välillä tapahtuvaan reaktioon. Ensin analysaattori laimentaa näytteen puskuriliuoksella, jonka jälkeen siihen lisätään RF2-reagenssia, jossa mikropartikkelit ovat. Kun näytteessä oleva reumafaktori reagoi mikropartikkelien kanssa, syntyy agglutinaatio, joka aiheuttaa näytteen samentumisen. Konelab 20i -analysaattori mittaa samentumisen määrän päätepestemittauksena 540 nm:n aallonpituudella. (Liite 6) Absorbanssin muutos 540 nm:ssä on suoraan verrannollinen reumafaktorin määrään liuoksessa. (Liite 5)

## 5 TUTKIMUSONGELMAT

Tutkimuksen tarkoituksena oli siis selvittää, voiko tupakointi toimia altistavana tekijänä nivelreumalle tyypillisten vasta-aineiden, reumafaktorin ja anti-MCV:n, esiintymiselle veressä ja samalla tutkia Rheumachec-vieritestin luotettavuutta reumafaktorin ja anti-MCV:n määrittämisessä. Määriteltiin kolme tutkimusongelmaa alaongelmineen.

1. Miten eri menetelmillä määritetyt anti-MCV- ja reumafaktoriarvot eroavat toisistaan?
  - 1.1. Miten Rheumachec-vieritestillä määritetyt anti-MCV-tulokset eroavat ELISA-tekniikkaan perustuvalla Anti-MCV-kitillä saaduista tuloksista?
  - 1.2. Miten Rheumachec-vieritestillä määritetyt reumafaktoritulokset eroavat Konelab 20i -analysaattorilla saaduista tuloksista?
2. Onko Rheumachec-vieritesti luotettava anti-MCV:n ja reumafaktorin määrittämisessä?
3. Millaiset ovat tupakoivien ja tupakoimattomien anti-MCV- ja reumafaktoriarvot ja millaisia ovat näiden kahden ryhmän väliset erot?
  - 3.1. Onko tupakointi mahdollinen altistava tekijä anti-MCV:n ja reumafaktorin esiintymiselle veressä?

Tupakointia mahdollisena altistavana tekijänä reumafaktorin ja anti-MCV:n esiintymiselle tutkittiin valitsemalla tutkimusjoukkoon sekä tupakoivia, että tupakoimattomia henkilöitä. Näiden kahden ryhmän tulosten mahdollisista eroista tehtiin johtopäätöksiä tupakoinnin vaikutuksesta. Tarkoituksena oli selvittää, ovatko tupakoivilla henkilöillä reumafaktori ja anti-MCV-arvot enemmän koholla kuin tupakoimattomilla ja ovatko tupakoivat siksi alttiimpia sairastumaan nivelreumaan jossain elämänvaiheessa. Rheumachec-vieritestin luotettavuutta tutkittiin vertaamalla vieritestin antamia tuloksia ELISA-tekniikkaan perustuvalla Anti-MCV-kitillä ja Konelab 20i -analysaattorilla saatuihin tuloksiin.

## 6 LAADUNVARMISTUS JA TUTKIMUKSEN LUOTETTAVUUS

### 6.1 Laadunvarmistus laboratoriossa

Laboratorioiden laadunhallintajärjestelmät perustuvat kansainvälisiin ISO-laatustandardeihin (Siloaho 2006, 142). Esimerkiksi ISO 9001 -laatustandardi määrittää laadunhallintajärjestelmien vaatimukset (Suomen standardisoimisliitto, hakupäivä 10.2.2010). Laadunhallintajärjestelmä on tavoitteellinen ja järjestelmällinen toimintatapa, joka kehittää laboratorion toimintaa ja pitää sen hyvässä hallinnassa (Siloaho 2006, 142). Laboratorion laatutoimintaan kuuluu myös Good Laboratory Practice (GLP) -säännökset, joihin kuuluu muun muassa laboratoriotutkimuksen tarkka suunnittelu ja parametrien määrittely, kontrollointi, ympäristöstä ja tutkimuksesta johtuvien muutosten huomioon ottaminen sekä huolellinen tulosten raportointi (WHO, hakupäivä 10.2.2010).

GLP -säännöksiin mukaan tutkimuspaikan tulisi olla kooltaan, rakenteeltaan ja sijainniltaan sellainen, että se vastaa tutkimuksen vaatimuksia ja siten pienentää mahdollisia häiriötekijöitä jotka voivat vaikuttaa tutkimuksen validiteettiin. Tutkimuksessa käytettäviä laitteita tulee huoltaa, puhdistaa ja kalibroida asianmukaisesti. Kaikki reagenssit ja liuokset tulisi säilyttää ohjeiden mukaan, ja niihin tulisi aina olla merkitty viimeinen käyttöpäivä ja aineen tunnistetiedot. Kontaminaatioiden estämiseksi näytteitä ja reagensseja tulisi käsitellä puhtailla välineillä ja säilyttää puhtaissa tiloissa. (National Product Control Agency for Welfare and Health 2007, Hakupäivä 17.10.2010.) Tämän työn suorittamisessa noudatettiin edellä mainittuja GLP -säännöksiä. Kontaminaatioita vältettiin käyttämällä aseptisia työskentelytapoja. Työssä käytettiin asianmukaisesti kalibroituja pipetteja, jotta päästiin tarkkaan pipetointitulokseen. Määritysmenetelmät kalibroitiin ennen mittauksia ja tulosten luotettavuus varmistettiin kontrollinäytteitä käyttämällä.

### 6.2 Vakioitu näytteenotto

Vakioitu näytteenotto on tärkeä osa laboratorioprosessin laatua. Rheumachec-vieritestistä varten tutkittavilta henkilöiltä otettiin kapillaarikokoverinäyte sormenpäältä. Jotta verinäyte olisi laadukas, täytyy se ottaa vakioidusti. Ennen ihopistosnäytteenottoa potilaan täytyy valmistautua näytteenottoon ja riittävät esivalmistelut täytyy tehdä. Potilaan tulee istua 10–15 minuuttia ennen näyt-



teenottoa verenkierron tasaamiseksi. Näytteenottajan täytyy varmistaa, että kaikki näytteenotossa ja mittauksessa tarvittavat välineet ovat asianmukaiset. Liuskat ja reagenssit tulee olla säilytetty oikeassa lämpötilassa alkuperäisessä suljetussa pakkauksessaan, eikä vanhentuneita liuskoja saa käyttää mittaukseen. (Moodi 2009, 314–316.) Rheumachec-vieritestistä tulee säilyttää lämpötilassa (+4 °C)–(+28 °C), valolta suojattuna (Liite 3).

Pistokohdan ihon lämpötilan tulee olla normaali. Tarvittaessa näytteenottokohta voidaan lämmitellä kädenlämpöisellä vedellä. Ihopistosnäyte tulisi ottaa kahden keskimmäisen sormen (keskisormi ja nimetön) sormenpään sivuosasta. Pistokohta valitaan niin, että iho tällä alueella on terve ja entisiä pistojälkiä on mahdollisimman vähän. Ennen näytteenottoa pistokohdan iho puhdistetaan ja annetaan kuivua. Näytteenottosormesta otetaan tukeva ote uloimman nivelen kohdalta ja pistolaitteella tehdään nopea pisto sormenpään sivulle. Ensimmäinen veripisara sisältää kudostenestettä, joten se täytyy pyyhkiä pois ihonpuhdistuslapulla, ja sen jälkeen tulevat pisarat käytetään mittaukseen. Sormen liiallista puristamista ja näytteen ”kaapimista” ihon pinnalta tulee välttää, sillä ne voivat aiheuttaa hemolyysiä tai näytteen kontaminoitumisen kudostenesteellä. (Moodi 2009, 314–316.)

Ennen vakioitua suoniverinäytteenottoa potilaan tulee istua 10–15 minuuttia verenkierron tasaamiseksi. Näytteenottajan täytyy varmistaa, että käytettävät välineet, esimerkiksi neulat ja näyteputket, eivät ole vanhentuneita ja että potilas on noudattanut valmistautumisohjeita. Näytteenottamista varten valitaan sopiva laskimo, yleensä käsitaiveesta tai kämmenen päältä. Käsivarren ympärille asetetaan staasi joka kiristetään. Sen jälkeen etsitään sopiva laskimo näytteenottoa varten valitulta alueelta palpoimalla. Pistokohta puhdistetaan 70 %:lla alkoholilla yhdellä pyyhkäisyllä ja annetaan kuivua. Tämän jälkeen pistokohtaan ei saa enää koskea sterilioimattomilla välineillä tai sormilla. (Ernst 2009, 59–88, Becan-McBride & Garza 2009, 302–240)

Näytteenottoa varten valitun suonon koosta riippuen valitaan sopiva näytteenottotekniikka; suljettu- tai avotekniikka. Erittäin hentoihin suoniin voi myös käyttää siipineulaa. Neula pistetään laskimoon suonensuuntaisesti ja noin 30 asteen kulmassa. Kun neula on suonessa, tarvittava näytemäärä kerätään näyteputkeen, jonka jälkeen putkea sekoitetaan kääntelemällä sitä ylösalaisin 5–10 kertaa. Heti kun veri alkaa tulla putkeen, staasi täytyy löylyttää. Kun kaikki tarvittavat näyteputket ovat täynnä, neula vedetään pois suonesta ja pistokohtaa painetaan puhdistuslapulla niin

kauan että verenvuoto on tyrehtynyt. Heti näytteenoton jälkeen putkiin tehdään tarvittavat tunnusmerkinnät. (Ernst 2009, 45–47, 59–88, Becan-McBride & Garza 2009, 302–240)

Näytteen laatu varmistettiin ottamalla se vakioidusti ja välttämällä hemolyysejä. Seeruminäyteputkia seisotettiin huoneenlämmössä 30 minuuttia, jotta näytteet ehtivät hyytyä ja jäähtyä. Seisottamisen jälkeen näyteputket sentrifugoitiin 10 minuuttia nopeudella 2600 rpm. Sentrifugoinnin jälkeen näytteistä pipetoitiin seerumit uusiin putkiin, jotka pakastettiin. Kun kaikki seeruminäytteet oli otettu, ne analysoitiin Konelab 20i -analysaattorilla ja Anti-MCV-kitillä kaikki samassa sarjassa. Seeruminäytteet Anti-MCV-kittiä varten säilyvät jääkaappilämpötilassa viisi päivää tai pakastimessa kuusi kuukautta (Liite 4). Konelab 20i -analysaattoria varten otetut näytteet säilyvät kolme päivää jääkaappilämpötilassa ja yhden kuukauden pakastimessa (Liite 5). Seeruminäytteet pakastettiin, jotta ne säilyvät laadukkaina analysointia varten. Anti-MCV-kitti säilytettiin valolta suojattuna jääkaappilämpötilassa (Liite 4). Konelab 20i -analysaattorille tarvittavat reagenssin säilytettiin myös jääkaappilämpötilassa (Liite 5). Reagenssien käyttöpäivämäärät eivät olleet vanhentuneet, itse liuotetut reagenssit säilyvät jääkaappilämpötilassa 30 päivää.

### 6.3 Tutkimuksen luotettavuus

Tutkimuksen reliabiliteetilla tarkoitetaan mittaustulosten toistettavuutta ja tutkimuksen kykyä antaa ei-sattumanvaraisia tuloksia (Hirsjärvi ym. 2009, 231). Tässä tutkimuksessa laadunvarmistuksella oli merkittävä rooli reliabiliteetin varmistamisessa. Eri testeissä käytettävät laadunvarmistusmenetelmät takasivat sen, että testi ei anna sattumanvaraisia tuloksia. Esimerkiksi Rheumachec-vieritestä tehtäessä tuli kontrolliviivan olla selkeästi luettavissa, jotta testin tulosta voitiin pitää luotettavana. Anti-MCV-kitillä reliabiliteetti varmistettiin tekemällä jokaisesta näytteestä rinnakkaismääritykset ja suorittamalla kontrollimittaukset. Rinnakkaisten näytteiden absorbanssien tuli olla hyvin lähellä toisiaan, ne saivat poiketa toisistaan enintään 10 %. Näin voitiin varmistua siitä, että ei ollut sattunut esimerkiksi pipetointivirheitä, jotka olisivat voineet vaikuttaa testin tuloksiin. Konelab 20i -analysaattorilla puolestaan kalibrointi ja kontrollinäytteiden ajaminen takasivat sen, että tutkittavista näytteistä saatiin luotettavat tulokset, jotka olisi tarvittaessa voitu toistaa uusintamittauksella samasta näytteestä.

Tutkimuksen validius tarkoittaa sitä, että mittari tai tutkimusmenetelmä kykenee mittaamaan juuri sitä, mitä on tarkoituskin mitata. Validiteettiin vaikuttaa muun muassa se, miten vastaajat käsit-

tävät kyselylomakkeen kysymykset ja ymmärtävätkö he kysymykset juuri niin, kuin tutkija on ajatellut. (Hirsjärvi ym. 2009, 231.) Tässä tutkimuksessa käytettävä kyselylomake oli esitietolomake, joka oli sisällöltään hyvin suppea. Esitietolomake oli pyritty laatimaan niin, että kysymykset ovat mahdollisimman yksiselitteisiä, ja että vastaaminen olisi helppoa. Tärkein esitietolomakkeen antama tieto oli vastaajan tupakointi, onko se säännöllistä vai tupakoiko hän ollenkaan. Muut kysymykset, kuten ikä ja sukupuoli olivat taustatietoja, joilla ei ole vaikutusta itse tutkimustuloksiin, mutta niiden avulla voidaan tehdä yhteenveto vastaajien taustoista. Tutkimuksen reliabelius ja validius muodostavat yhdessä tutkimuksen kokonaisluotettavuuden, joka on hyvä silloin, kun otos edustaa perusjoukkoa ja mittaamisessa on mahdollisimman vähän satunnaisvirheitä (Vilka. 2007, 152). Satunnaisvirheet tässä tutkimuksessa pyrittiin eliminoimaan edellä mainituilla keinoilla.

#### **6.4 Tutkimuksen eettiset näkökohdat**

Tutkijan on otettava huomioon monia eettisiä kysymyksiä, jotka liittyvät tutkimuksen tekoon. On tärkeää noudattaa hyvää tieteellistä käytäntöä tiedon hankinnassa ja tulosten julkaisemisessa. Tulosten julkaiseminen tulee olla avointa ja tutkimuksen kulku täytyy raportoida yksityiskohtaisesti. Tutkimuksen lähtökohtana tulee olla ihmisarvon kunnioittaminen. Tutkittavilla täytyy olla mahdollisuus päättää itse, osallistuvatko he tutkimukseen, ja osallistumiseen suostumisen tulee olla vapaaehtoista. (Hirsjärvi ym. 2009, 23–25.) Hyvän tieteellisen käytännön mukaan on myös tärkeää, että tutkittavien henkilöllisyys säilyy tuntemattomana ja että tutkimustuloksista ei ole mahdollista tunnistaa yksilöitä (Vilka. 2007, 164).

Tässä tutkimuksessa tulokset julkaistaan opinnäytetyön raportissa, joka tulee ammattikorkeakoulujen verkkokirjasto Theseukseen avoimesti kaikkien saataville. Tutkimuksen tulokset ja kulku raportoitiin mahdollisimman tarkasti ja yksityiskohtaisesti. Tutkimukseen osallistuville henkilöille painotettiin jo tutkimuksesta laitettavassa ilmoituksessa, että osallistuminen on täysin vapaaehtoista. Tutkittavien henkilötietoja ei missään vaiheessa otettu muistiin, ei esitietolomakkeisiin, eikä näyteputkiin, vaan ne numeroitiin juoksevilla numeroinnilla. Näin ollen tutkittavien henkilöllisyys säilyi salassa. Henkilötiedot eivät tule olemaan edes tutkijan saatavilla ja tutkimukseen oli mahdollista osallistua myös täysin anonymisti. Tulosten raportoinnissa kiinnitettiin myös huomiota siihen, että tutkimukseen osallistuneita ei voida tunnistaa tuloksista.

## 7 TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN

Tutkimuksen perusjoukkona olivat Oulun seudun ammattikorkeakoulun Sosiaali- ja terveysalan yksikön opiskelijat ja henkilökunta. Tutkimuksessa oli mukana 40 vapaaehtoisesti ilmoittautunutta henkilöä, joista 20 oli tupakoivaa ja 20 tupakoimatonta. Tupakoivien ryhmään valittiin henkilöitä, jotka tupakoivat säännöllisesti päivittäin. Tutkimusjoukko jakaantui kahteen ryhmään, tupakoiisiin ja tupakoimattomiin. Nämä molemmat ryhmät oli tarkoitus saada ikä- ja sukupuolijakaumiltaan mahdollisimman samankaltaisiksi. Miehiä ilmoittautui kuitenkin odotettua vähemmän, joten näiden kahden ryhmän sukupuolijakaumat eivät vastaa toisiaan. Tutkittavien ikäjakauma oli noin 20–60 ikävuoden välillä. Opinnäytetyöni ohjaajina toimivat OAMK:n palvelulaboratorion vastaava sairaalakemisti Simo Rasi, lehtori Paula Reponen sekä opettaja Hanna-Maarit Aho. Lisäksi Kone-lab 20i -analysointilaitteen käytössä minua ohjasi OAMK:n palvelulaboratorion bioanalyttikko Päivi Saloranta.

### 7.1 Näytteenoton toteuttaminen

Ilmoituksia tutkimuksesta (liite 1) laitettiin Sosiaali- ja terveysalan yksikön ilmoitustauluille. Tutkimukselle haettiin sitä ennen Sosiaali- ja terveysalan yksikön johtajan Kari Virolaisen antama tutkimuslupa. Tutkimuslupa haettiin erillisellä lupahakemuslomakkeella. Ilmoituksessa vapaaehtoisia tutkimukseen halukkaita osallistujia pyydettiin ilmoittautumaan sähköpostitse. Tutkittavat henkilöt valittiin ilmoittautumisjärjestyksessä ja he saivat sähköpostitse ajan näytteenottoon ja ohjeet näytteenottoon valmistautumiseen.

Näytteenotto järjestettiin Sosiaali- ja terveysalan yksikön tilassa C2010A. Näytteenottoa varten ei ollut erityisiä esivalmisteluja. Tutkittavien tuli kuitenkin välttää erittäin kuormittavaa liikuntaa pari päivää ennen näytteenottoa. Sähköpostilla osallistujille lähetetyissä valmistautumisohjeissa pyydettiin välttämään kuormittavaa liikuntaa parin päivän ajan ennen näytteenottoa ja heitä pyydettiin myös istumaan 15 minuuttia juuri ennen näytteenottoa verenkierron tasaamiseksi. Esitietolomakkeeseen (liite 2) tutkimushenkilöt täyttivät kaikki tarvittavat esitiedot.

TAULUKKO 1: Muuttujataulukko

<i>Tutkimusongelmat</i>	<i>Muuttujat</i>	<i>Mittarin osiot</i>
1. Miten eri menetelmillä määritetyt anti-MCV- ja reumafaktoriarvot eroavat toisistaan?		
1.1. Miten Rheumachec-vieritestillä määritetyt anti-MCV-tulokset eroavat ELISA-tekniikkaan perustuvalla Anti-MCV-kitillä saaduista tuloksista?	Rheumachec-vieritesti  Anti-MCV-kitti	Tulos: positiivinen/negatiivinen  Tulos: numeerinen, yksikkö U/ml
1.2. Miten Rheumachec-vieritestillä määritetyt reumafaktoritulokset eroavat Konelab 20i -analyssaattorilla saaduista tuloksista?	Rheumachec-vieritesti  Konelab 20i -analyssaattori	Tulos: positiivinen/negatiivinen  Tulos: numeerinen, yksikkö U/ml
2. Onko Rheumachec-vieritesti luotettava anti-MCV:n ja reumafaktorin määrittämisessä?	Rheumachec-vieritestin antamien tulosten eroavaisuudet verrattuna Anti-MCV-kitin ja Konelab 20i -analyssaattorin antamiin tuloksiin	Anti-MCV- ja reumafaktoritulokset
3. Millaiset ovat tupakoivien ja tupakoimattomien anti-MCV- ja reumafaktoriarvot ja millaisia ovat näiden kahden ryhmän väliset erot?	Selittävä muuttuja: tupakointi  Selitettävä muuttuja: vastaainepitoisuuksien erot tupakoivilla ja tupakoimattomilla  Sekoittava muuttuja: kuormittava liikunta, munuaisten vajaatoiminta	Anti-MCV- ja reumafaktoritulokset  Esitietolomake

---

3.1. Onko tupakointi mahdollinen altistava tekijä anti-MCV:n ja reumafaktorin esiintymiselle veressä?	Vasta-ainepitoisuuksien erot tupakoivilla ja tupakoimattomilla	Anti-MCV- ja reumafaktoritulokset
---	--	-----------------------------------

---

## 7.2 Näytteenotto

Aineisto kerättiin ottamalla tutkittavilta henkilöiltä sormenpästä kapillaarikokoverinäyte Rheumachec-vieritestää varten ja seeruminäyte geelilliseen seerumiputkeen käsivarren laskimosta Anti-MCV-kittiä ja Konelab 20i -analysaattoria varten. Näytteet otettiin vakiodusti. Muuttujataulukossa (taulukko 1) on esitelty tutkimukseen liittyvät muuttujat. Tutkittavat täyttivät näytteenottoon tullessaan esitietolomakkeen (liite 2). Tarvittavia esitietoja olivat iän ja sukupuolen lisäksi mahdollinen munuaisten vajaatoiminta, sekä erityisen kuormittavan liikunnan harjoittaminen, jotka voivat aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia anti-MCV:n määrittämisessä. Esitietolomake oli hyvin suppea, joten sille ei suoritettu esitestausta. Esitietolomakkeet numeroitiin juoksevilla numeroinnilla, kuten myös näytekasetit ja -putket. Tutkittavien henkilötietoja ei kerätty lainkaan ylös, eikä jällenpäin ollut mahdollisuutta yhdistää ketään henkilöä tiettyyn näytteeseen tai tuloksiin. Tutkimukseen oli näin ollen myös mahdollista osallistua anonymisti. Tutkittaville ilmoitettiin näytteenoton yhteydessä näyttenumero, jonka perusteella he saavat myöhemmin tuloksensa. Tulosten saannin yhteydessä tutkittaville painotettiin, että positiivista reumafaktori- tai anti-MCV-tulosta ei voida pitää merkinä nivelreumasta, ja että kyseisiä vasta-aineita esiintyy myös terveillä.

## 7.3 Näytteiden analysointi

Rheumachec-vieritesti tehtiin tuoreesta kapillaariverestä. Näyte otettiin vieritestin mukana tulleen muovipipettiin, johon tarvittava näytemäärä (10 µl) imeytyi kapillaari-ilmion avulla. Näyte pipetoitiin välittömästi näytteenoton jälkeen huoneenlämpöisen testikasetin huovalle, neliskulmaiseen näytekenttään. Seuraavaksi testikasetin pyöreään puskurikenttään tiputettiin 6 tippaa huoneenlämpöistä puskuriliuosta. Puskuriliuos tulee käyttövalmiina vieritestin mukana ja se on 0,09 %:sta natriumatsidia. Tulos luettiin 15 minuutin kuluttua. Inkubointiaikana testikasetti säilytettiin vaakasuorassa. 30 minuutin kuluttua testin loppumisen jälkeen, eli 45 minuutin kuluttua näytteen pipetoinnista, tulokset luettiin vielä uudelleen, koska tämän ajan sisällä jokainen testikenttään

ilmestynyt viiva luetaan positiiviseksi. Testikentässä yli 30 minuuttia testin loppumisen jälkeen tapahtuvia muutoksia ei tulisi enää ottaa huomioon analyysissa. (Liite 3)

Anti-MCV-kitin suoritusta varten täytyi liuottaa kaksi reagenssia: pesuliuos ja näytteen laimennusliuos. Liuotus tehtiin kitin ohjeen mukaisesti (liite 4). Näyte laimennettiin laimennusliuoksella 1:100. Kitin mukana tulevia valmiita reagensseja ovat entsyymikonjugaattiliuos, joka sisältää kanan polyklonaalista anti-humaani IgG:ta, TMB-substraattiliuos ja pysäytysliuos, joka sisältää happoa. Kitin ohjeessa ei mainita tarkemmin, mitä kyseinen happo on. Kittiin kuuluvat myös kuoppalevyt, joiden pohjalla on sitrullinisoitunutta vimentiniä. Anti-MCV-työohjeessa selostetaan työn suoritus (liite 4). Alla olevassa pipetointikaaviossa on työn suoritus esitetty lyhyesti (kuvio 2).

1. Pipetoi **100µl** kalibraattoria, kontrollia tai laimennettua potilasnäytettä
  - Inkuboi **30 minuuttia** RT (huoneenlämmössä)
  - Tyhjennä kuoppalevyjen sisältö ja pese kuoppalevyt kolme kertaa **300µl:lla** pesuliuosta
2. Pipetoi **100µl** entsyymikonjugaattia
  - Inkuboi **15 minuuttia** RT
  - Tyhjennä kuoppalevyjen sisältö ja pese kuoppalevyt kolme kertaa **300µl:lla** pesuliuosta
3. Pipetoi **100µl** substraattiliuosta
  - Inkuboi **15 minuuttia** RT
4. Lisää **100µl** pysäytysliuosta
  - Inkuboi **5 minuuttia** RT
  - Mittaa näytteet **450nm:ssä**

*KUVIO 2: Pipetointikaavio (mukaillen Anti-MCV-työohje, liite 4)*

Anti-MCV-kitillä analysoitujen näytteiden absorbanssit mitattiin PerkinElmer Victor X4 -spektrofotometrillä, joka muodosti kontrolliliuosten absorbanssien perusteella standardikuvaajan. Kuvaajan avulla spektrofotometri tulosti vastaukset näytteille konsentraatioina yksikössä U/ml.

Thermo Fisher Scientificin valmistama reagenssikitti Konelab 20 -analysaattorille sisältää RF2-reagenssin, RF2-puskuriliuoksen, näytteen laimennosliuoksen, sekä RF2-kalibrintiliuoksen. RF2-reagenssi sisältää mikropartikkeleita, jotka on päällystetty ihmisen IgG:llä. Lisäksi kyseinen liuos on alle 2,5 %:nen  $\text{NaN}_3$ :n suhteen. RF2-puskuriliuos on 0,05 mol/l Tris-liuos, joka on alle 0,1 %:nen  $\text{NaN}_3$ :n suhteen. Näytteen laimennosliuos on 0,01 mol/l PBS:ää ja alle 0,1 %:nen  $\text{NaN}_3$ :n suhteen. RF2-kalibrintiliuos on ihmisperäistä ja se on alle 0,1 %:nen  $\text{NaN}_3$ :n suhteen. Jauhemainen RF2-reagenssi täytyy liuottaa 6ml:aan vettä, muut liuokset ovat käyttövalmiita. (Liite 5)

Analysaattori valmisti laimennoksen kalibrintiliuksesta koneelle syötettyjen parametrien mukaan. Kalibraatioparametrit ja mittauksen suoritus on kaaviokuvana liitteenä (liite 6). Kalibraatiokäyrä muodostui kalibrintiliuksesta saatujen mittausten perusteella. (liite 5) Kontrollinäytteet ja seeruminäytteet syötettiin analysaattoriin. Konelab 20i -analysaattori laski tulokset automaattisesti kalibraatiokäyrän avulla ja tulokset tulostuivat yksikössä U/ml.

#### **7.4 Näytteistä saatujen tulosten analysointi**

Tutkimuksesta saatiin kvantitatiivista tietoa. Tulokset syötettiin SPPS-tilasto-ohjelmaan. Kyseisellä ohjelmalla tuloksista tehtiin erilaisia taulukoita, joiden avulla tulokset ovat helposti luettavissa. Taulukoiden ja kuvioiden tekoon käytettiin myös Microsoft Excel -taulukkolaskentaohjelmaa. Tulosten perusteella vertailtiin Rheumachec-vieritestin ja anti-MCV-kitin eroja anti-MCV:n määrittämisessä, sekä Rheumachec-vieritestin ja Konelab 20i -analysaattorin eroja reumafaktorin määrittämisessä. Tuloksista saatujen taulukoiden perusteella tehtiin päätelmiä tupakoinnista mahdollisena altistavana tekijänä reumafaktorin ja anti-MCV:n esiintymiselle veressä.

Rheumachec-vieritestin valmistaja on ilmoittanut testin cut off -arvoksi 50 U/ml. Alle 50 U/ml tulokset ovat negatiivisia ja yli 50 U/ml tulokset ovat positiivisia. Konelab 20i -analysaattorin reumafaktorimäärittämisessä negatiivisia ovat arvot, jotka ovat alle 15 U/ml. Anti-MCV-kitin ohjeen mukaan negatiivisia ovat näytteet, joiden arvoksi saadaan alle 20 U/ml. (Liitteet 3, 4 ja 5) Rheumachec-vieritesti ei siis anna kvantitatiivista tietoa, tulos on joko positiivinen tai negatiivinen. Konelab 20i -analysaattorilla ja Anti-MCV-kitillä saadut tulokset puolestaan ovat kvantitatiivista tietoa, koska ne antavat näytteelle tarkan arvon, U/ml. Rheumachec-vieritestin, Konelab20i -analysaattorin ja Anti-MCV-kitin antamat tulokset eivät siis ole suoraan verrattavissa keskenään. Voidaan kuitenkin olettaa, että Rheumachec-vieritestillä positiivisen reumafaktorituloksen anta-



neista näytteistä tulisi Konelab 20i -analysointilaitteen antaa tulokseksi yli 15 U/ml, jotta vieritestistä voidaan pitää luotettavana. Samoin Anti-MCV-kitin antamat tulokset vieritestillä positiivisiksi todetuista näytteistä tulisi olla yli 20 U/ml.

## 8 TULOKSET

### 8.1 Laadunvarmistustulokset

#### Rheumachec-vieritestin laadunvarmistus

Rheumachec-vieritestissä jokaista näytettä analysoidessa tehtiin samalla kontrollointi. Testin lukualueella on oma kontrollivyohyke. Tuloksia luettaessa katsottiin oliko kontrollivyohykkeelle ilmestynyt punavioletti nauha. Mikäli kontrollivyohykkeelle ei olisi tullut punaviolettia nauhaa, ei testin tulosta olisi voitu hyväksyä. Jokaisen näytteen kohdalla tässä tutkimuksessa vieritesti onnistui, eli kontrollivyohykkeellä näkyi punavioletti nauha. Myös näytteen laatu varmistettiin ottamalla näyte vakioidusti.

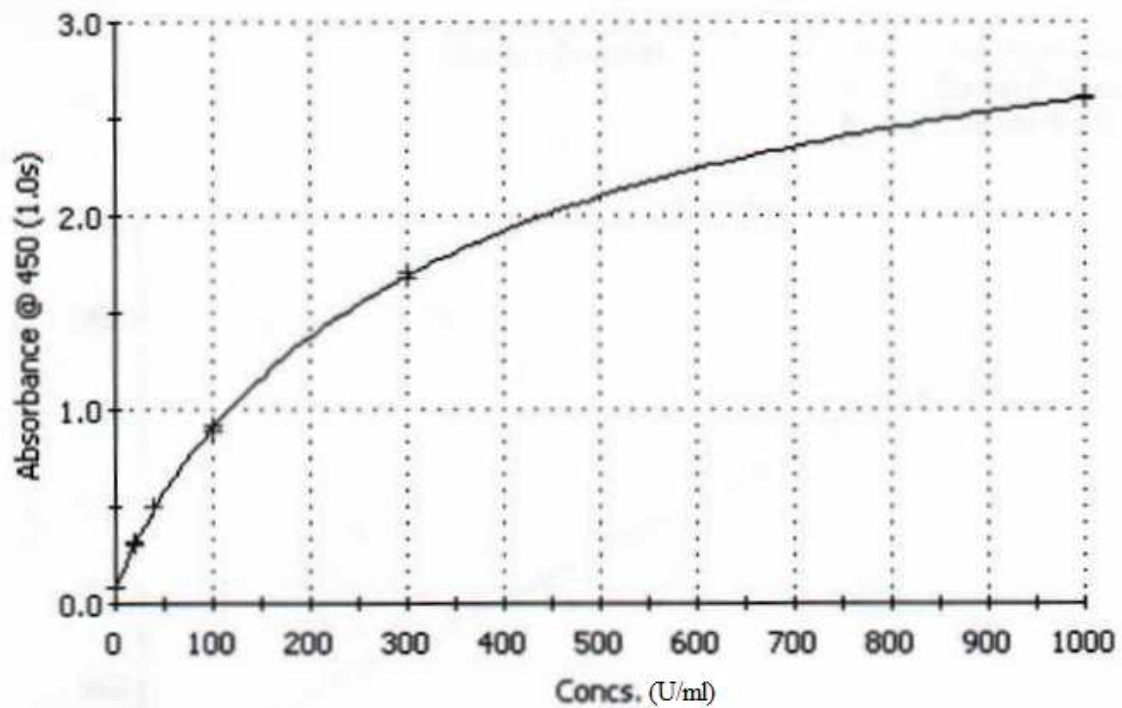
#### Anti-MCV-kitin laadunvarmistus

Anti-MCV-kitin mukana tulivat kontrollit ja kalibrintiliukset. Näytesarjaan pipetoitiin positiivinen ja negatiivinen kontrolli sekä kuusi erilaista kalibrintiliuosta, joiden anti-MCV-pitoisuudet olivat 0, 20, 40, 100, 300 ja 1000 U/ml. Jokaisesta näytteestä, kontrollista ja kalibraattorista pipetoitiin sarjaan kaksi rinnakkaista näytettä. Rinnakkaisnäytteiden absorbanssit vastasivat toisiaan (liite 7). Tuloksia voidaan pitää luotettavana, sillä kalibrintiliuosten rinnakkaispipetointien absorbanssit ja anti-MCV-konsentraatiot vastaavat toisiaan (taulukko 2). Ensimmäisen kalibrintiliuksen tavoitekonsentraatio oli 0. Rinnakkaisnäytteen 2 absorbanssi kyseisellä kalibrintiliuksella oli niin lähellä nollaa, että standardikuvaajan perusteella sille ei voitu laskea konsentraatiota (taulukko 2). Tästä liuksesta tehtyjen rinnakkaispipetointien absorbanssit ovat kuitenkin niin lähellä toisiaan, että konsentraatiotuloksen puuttumista ei voida pitää mittauksen laatuun vaikuttavana seikkana. Kalibrintiliuksille sallitut tavoitearvot ja vaihteluvälit oli ilmoitettu kitin mukana tulleessa laadunvarmennuskirjassa.

TAULUKKO 2: Anti-MCV:n kalibraattoreiden absorbanssit ja konsentraatiot, Anti-MCV-kitillä määritettyinä. Kalibraattori 1:n rinnakkaisnäytteelle 2 ei voitu laskea konsentraatiota.

	Tavoite- konsentraatio U/ml	Absorbanssi 450nm		Konsentraatio U/ml		Konsentraatioiden keskiarvo U/ml
		Rinnakkais- näyte 1	Rinnakkais- näyte 2	Rinnakkais- näyte 1	Rinnakkais- näyte 2	
Kalibraattori 1	0	0,0822	0,0799	0,01884	-	0,0188
Kalibraattori 2	20	0,3041	0,3145	19,7479	19,7624	19,755
Kalibraattori 3	40	0,4992	0,5025	40,9744	41,2696	41,122
Kalibraattori 4	100	0,9098	0,8916	98,7678	99,1606	98,964
Kalibraattori 5	300	1,7068	1,6752	301,182	300,112	300,64
Kalibraattori 6	1000	2,5933	2,6048	999,073	999,941	999,50

Standardikuvaaja anti-MCV:lle oli nouseva kuvaaja. Kalibraattoreista saatujen absorbanssien perusteella PerkinElmer Victor X4 –spektrofotometri teki standardikuvaajan. Standardikuvaaja vastaa valmistajan ilmoittamaa kuvaajaa. (Kuvio 3)



KUVIO 3: Anti-MCV-kitillä tehdyn määityksen standardikuvaaja anti-MCV:lle .

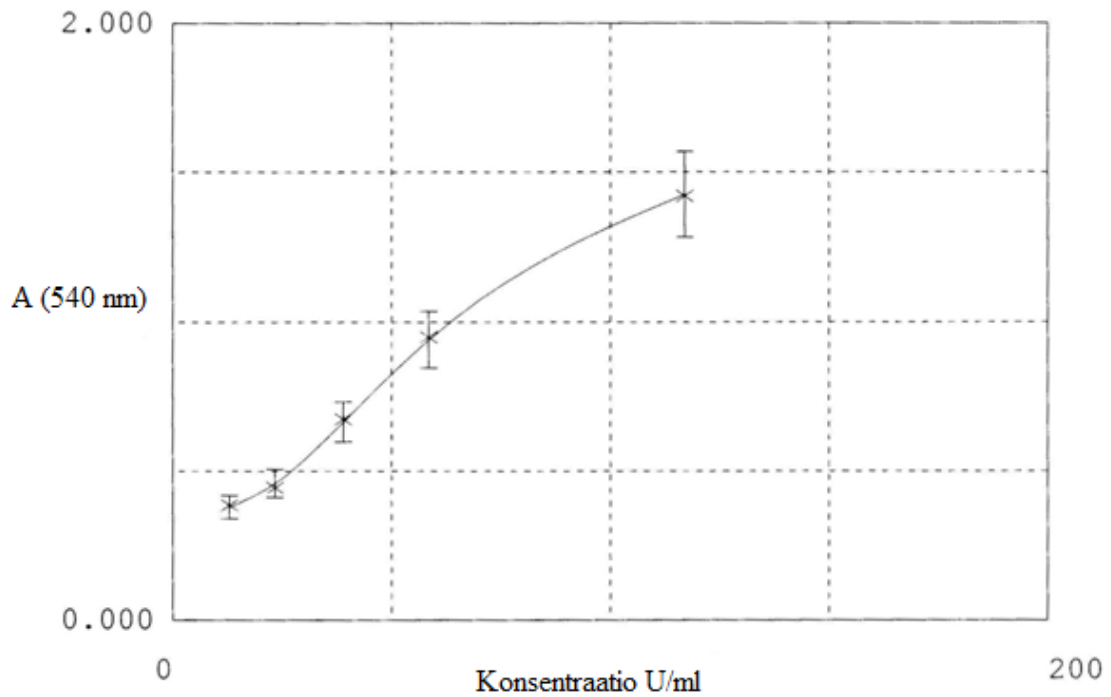
Anti-MCV:n määityksessä kontrollina oli kaksi eri pitoista kontrollia. Positiivisen kontrollin (kontrolli 1) tavoitekonsentraatio oli 200,0. Negatiivisen kontrollin (kontrolli 2) tavoitekonsentraatio oli 4,0. Kontrollien mittauksista saadut konsentraatioarvot ovat hyvin lähellä tavoitekonsentraatioita. Lisäksi Kontrollien rinnakkaiset absorbanssit ja konsentraatiot vastaavat toisiaan. (Taulukko 3)

TAULUKKO 3: Kontrollinäytteiden absorbanssit ja anti-MCV-pitoisuudet, Anti-MCV-kitillä määritettynä.

	Tavoite- konsentraatio U/ml	Absorbanssi 450nm		Konsentraatio U/ml		Konsentraatioiden keskiarvo U/ml
		Rinnakkais- näyte 1	Rinnakkais- näyte 2	Rinnakkais- näyte 1	Rinnakkais- näyte 2	
Kontrolli 1	200,0	1,38891	1,35926	200,42	200,19	200,305
Kontrolli 2	4,0	0,14723	0,14431	4,7085	4,2844	4,49645

#### Konelab 20i:llä tehdyn reumafaktorimäärityksen laadunvarmistus

Ennen näytteiden ajoa Konelab 20i -analysaattorilla, reumafaktorimääritys kalibroitiin. Kalibrointi-  
liuoksena käytettiin Thermo Fisher Scientificin RF2 -kalibraattoria. Analysaattori valmistaa kalib-  
raattoriliuoksesta viisi eri pitoista laimennosta koneelle syötettyjen parametrien mukaan, kysees-  
sä on siis 5-pistekalibrointi. Kalibraattoriliuoksesta saatujen arvojen perusteella laite muodosti  
nousevan kalibraatiokäyrän (kuvio 4), joka vastaa reagenssipakkauksessa olevaa kalibraa-  
tiokäyrää. Analysaattorin antoi siis oikeanlaisen kalibraatiokäyrän.



KUVIO 4: Konelab 20i -analysointilaitteen antama standardikuvaaja reumafaktorille

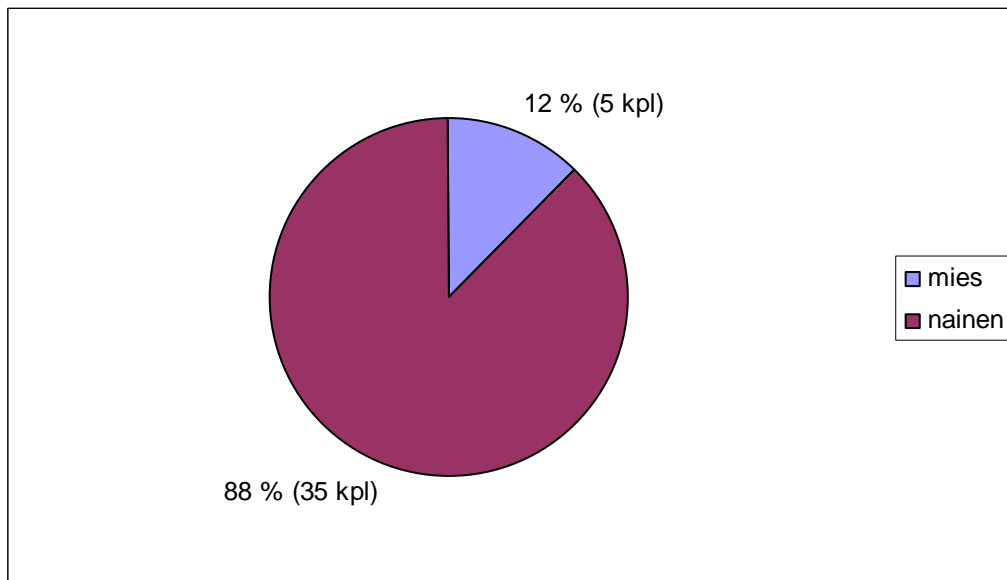
Kontrollina reumafaktorin määrittämisessä Konelab 20i:llä käytettiin Thermo Fisher Scientificin RF -kontrollia. Kontrollin tavoitearvona oli 35 U/ml ja sallittu vaihteluväli oli 28–42 U/ml. Kontrollista saatu mittaustulos 34 U/ml sijoittuu erittäin hyvin sallitun vaihteluvälin sisäpuolelle. (Taulukko 4)

TAULUKKO 4: Konelab 20i -analysointilaitteen kontrollitulokset reumafaktorille

	Tavoitearvo U/ml	Sallittu vaihteluväli U/ml	Tulos U/ml
RF-kontrolli	35	28–42	34

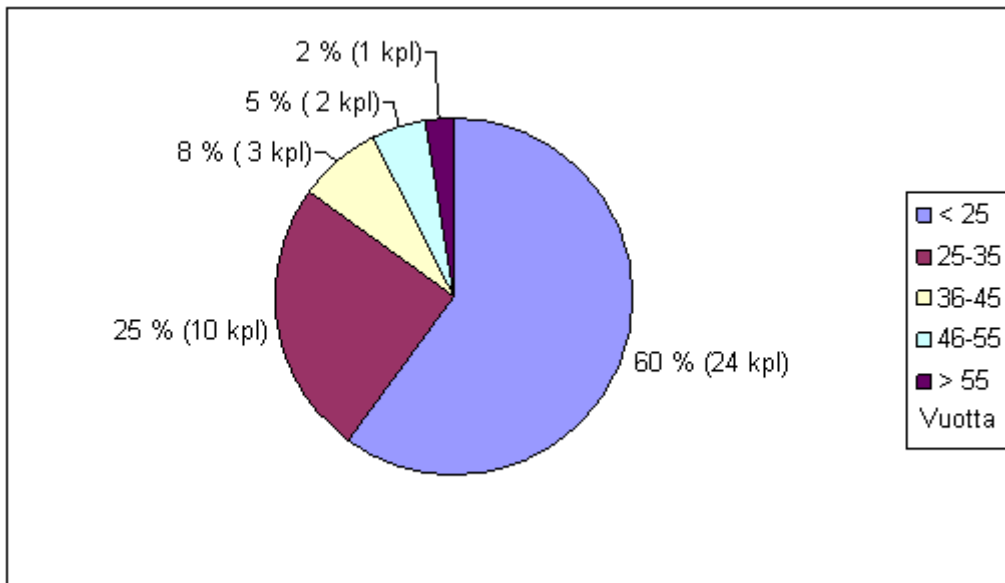
## 8.2 Taustatiedot

Tutkimukseen osallistui 40 henkilöä, joista 20 oli tupakoimattomia, ja 20 säännöllisesti tupakoivia. Näistä 40 tutkimukseen osallistuneista 35 oli naisia ja 5 miehiä (kuvio 5). Tutkimuksen luotettavuuden kannalta olisi ollut hyödyllistä, että tutkimusjoukossa olisi ollut yhtä paljon miehiä ja naisia. Tutkimusjoukko kerättiin OAMK:n Sosiaali- ja terveysalan yksikön opiskelijoista ja henkilökunnasta, joista suurin osa on naisia. Näin tutkimusjoukko vastaa sukupuolijakaumaltaan kuitenkin perusjoukkoa. Koska miesten määrä jäi vähäiseksi tutkimusjoukossa, ei voida tehdä päätelmiä, vaikuttaako tupakointi reumafaktorin ja anti-MCV:n esiintymiseen eri lailla eri sukupuolilla. Sukupuolella ei kuitenkaan ole merkitystä tutkittaessa Rheumachec-vieritestin luotettavuutta.



*KUVIO 5: Tutkimukseen osallistuneiden 40 henkilön sukupuolijakauma*

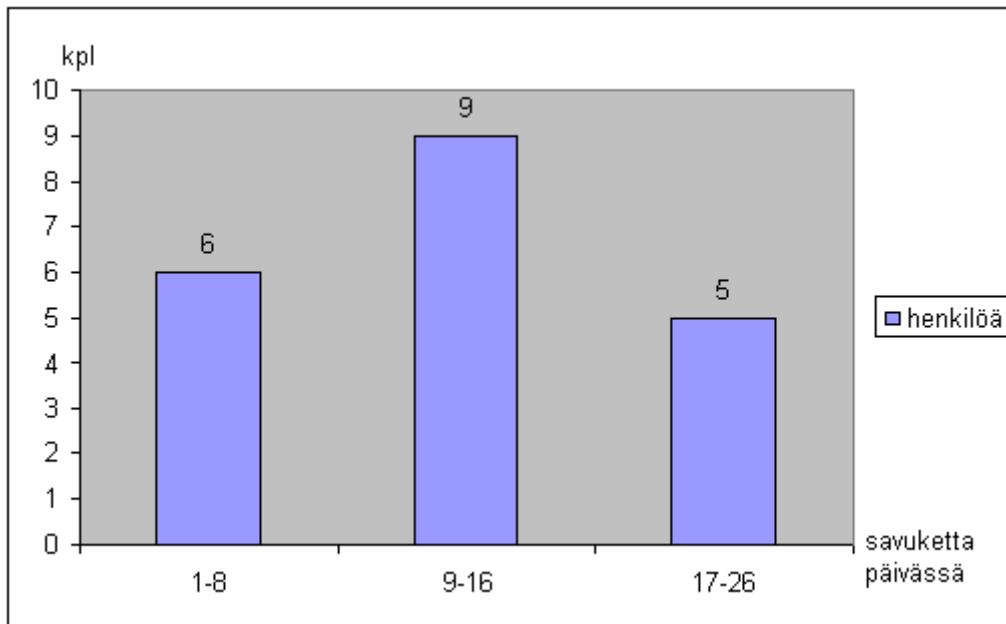
Tutkimusjoukosta suurin osa oli alle 25-vuotiaita, joita oli 60 % tutkimukseen osallistuneista. Seuraavaksi suurin ryhmä oli 25–35-vuotiaat, joita oli 25 %. 36–45-vuotiaita oli 8 % ja 46–55-vuotiaita 5 %. Pienin ryhmä oli yli 55-vuotiaat, joita oli 2 % tutkimukseen osallistuneista. (Kuvio 6)



KUVIO 6: Tutkimukseen osallistuneiden henkilöiden ikäjakauma

Tupakoivien ryhmässä kaikki tupakoivat säännöllisesti päivittäin vähintään yhden savukkeen ja enintään 26 savuketta päivässä (kuvio 7). Tupakoivat henkilöt olivat tupakoineet vähintään kahden vuoden ajan ja enintään 30 vuoden ajan. Keskimäärin he olivat tupakoineet 9,8 vuoden ajan. Tupakoimattomien ryhmästä aikaisemmin säännöllisesti tupakoineita, mutta sittemmin tupakoinnin lopettaneita, oli kuusi kappaletta, eli 30 % kaikista tupakoimattomista, ja lopettamisesta oli keskimäärin aikaa 3,7 vuotta. Munuaisten vajaatoiminta ja kuormittava liikunta saattoivat aiheuttaa virheellisiä positiivisia tuloksia anti-MCV:n määrittämisessä. Kenelläkään tutkimusryhmästä ei ollut munuaisten vajaatoimintaa, mutta kuormittavaa liikuntaa ennen näytteenottoa oli harjoittanut kaksi henkilöä eli 5 % koko tutkimusjoukosta.





KUVIO 7: Tupakoivien henkilöiden päivässä polttamien savukkeiden määrä

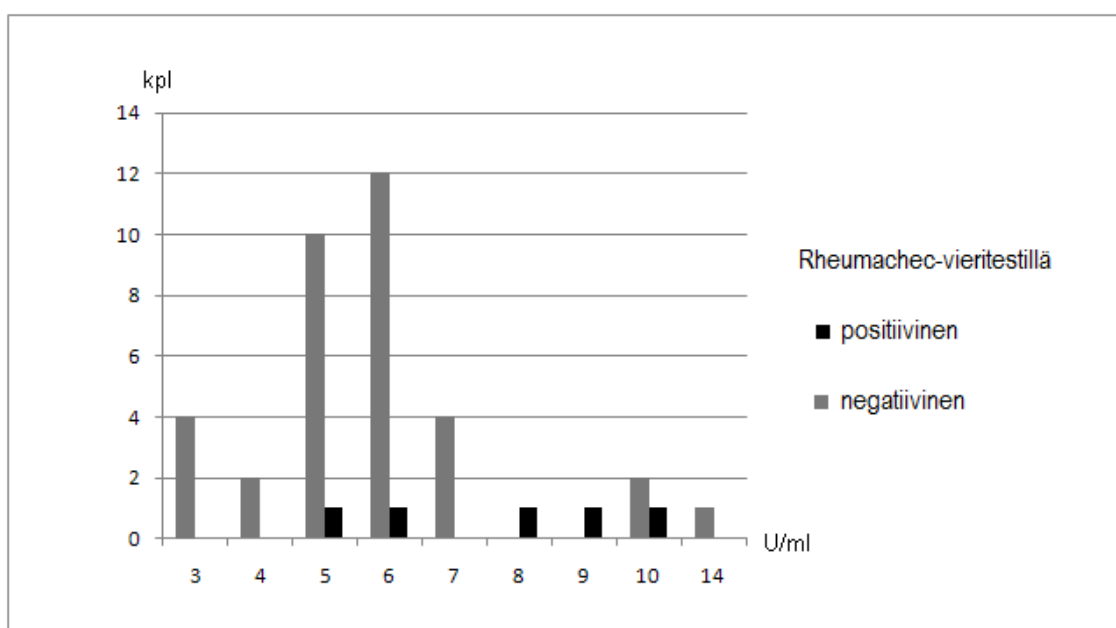
### 8.3 Eri menetelmillä määritettyjen reumafaktori- ja anti-MCV-arvojen erot

#### Anti-MCV

Rheumachec-vieritesti antoi yhteensä viisi positiivista anti-MCV-tulosta, eli 12 % kaikista näytteistä oli Rheumachec-vieritestin mukaan anti-MCV-positiivisia. Negatiivisia anti-MCV-tuloksia Rheumachec-vieritesti antoi 35 kappaletta eli 88 % näytteistä. Anti-MCV-kitti puolestaan antoi kaikille näytteille arvon, joka oli alle 20 U/ml. Kitin antamien tulosten perusteella kaikki näytteet olivat siis negatiivisia anti-MCV:n suhteen. (Taulukko 5) Rheumachec-vieritestillä negatiivisen tuloksen antamien näytteiden konsentraatiot Anti-MCV-kitillä tehtynä vaihtelivat välillä 3–14 U/ml. Positiivisen tuloksen Rheumachec-vieritestillä antaneiden näytteiden konsentraatiot olivat välillä 5–10 U/ml, eli ne eivät juuri eronneet negatiivisten näytteiden konsentraatioista kitillä tehtynä. (Kuvio 8)

TAULUKKO 5: Rheumachec-vieritestin luotettavuus verrattuna rinnakkaismenetelmiin

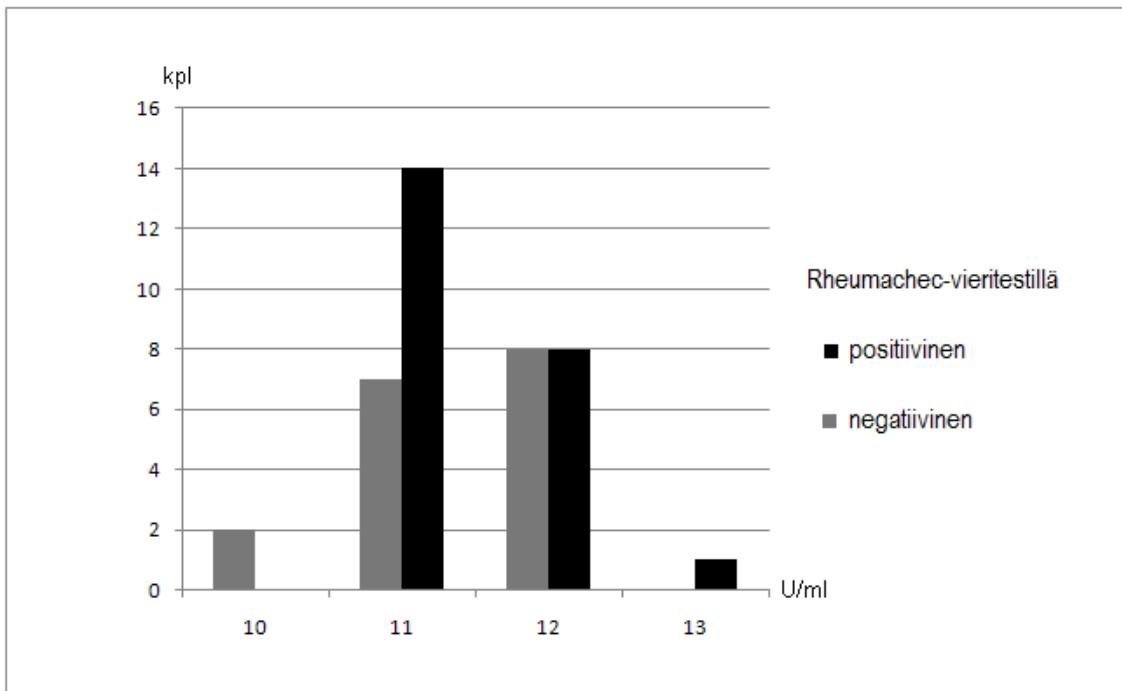
	Reumafaktori % (n)	Anti-MCV % (n)
Rheumachec-vieritestin antamat positiiviset tulokset	58 (23)	12 (5)
Rheumachec-vieritestin antamat negatiiviset tulokset	42 (17)	88 (35)
Konelab 20i:n antamat positiiviset tulokset	0 (0)	-
Konelab 20i:n antamat negatiiviset tulokset	100 (40)	-
Anti-MCV-kitin antamat positiiviset tulokset	-	0 (0)
Anti-MCV-kitin antamat negatiiviset tulokset	-	100 (40)
Rheumachec-vieritestin antamat väärät positiiviset tulokset	58 (23)	12 (5)
Rheumachec-vieritestin antamat oikeat positiiviset tulokset	-	-
Rheumachec-vieritestin antamat väärät negatiiviset tulokset	0 (0)	0 (0)
Rheumachec-vieritestin antamat oikeat negatiiviset tulokset	42 (17)	88 (35)



KUVIO 8: Rheumachec-vieritestin anti-MCV:lle antamia positiivisia ja negatiivisia tuloksia vastaavat arvot Anti-MCV-kitillä määritettynä, yksikkö U/ml. Anti-MCV-kitillä positiivisia ovat näytteet, joiden konsentraatio on yli 20 U/ml.

## Reumafaktori

Rheumachec-vieritesti antoi 23 positiivista reumafaktoritulosta, eli 58 % kaikista näytteistä oli Rheumachec-vieritestin mukaan positiivisia reumafaktorille. Kun tulokset tarkistettiin Konelab 20i -analysaattorilla, kaikki näytteet saivat reumafaktoriarvon, joka oli alle 15 U/ml. Konelab 20i -analysaattorilla saadut tulokset olivat siis kaikki negatiivisia reumafaktorille. (Taulukko 5) Konelab 20i -analysaattorin antamat konsentraatiot Rheumachec-vieritestillä positiivisille ja negatiivisille näytteille eivät poikenneet toisistaan paljon. Rheumachec-vieritestillä negatiivisten näytteiden konsentraatiot vaihtelivat Konelab 20i:llä mitattuna välillä 10–12, ja positiivisten näytteiden konsentraatiot olivat välillä 11–13. (Kuvio 9)



*KUVIO 9: Rheumachec-vieritestin reumafaktorille antamia positiivisia ja negatiivisia tuloksia vastaavat arvot Konelab 20i -analysaattorilla määritettynä, yksikkö U/ml. Konelab 20i:llä positiivisia ovat näytteet, joiden konsentraatio on yli 15 U/ml.*

## 8.4 Rheumachec-vieritestin luotettavuus

Rheumachec-vieritesti antoi 23 väärää positiivista tulosta reumafaktorille ja viisi väärää positiivista tulosta anti-MCV:lle. Rheumachec-vieritesti ei antanut yhtään väärää negatiivista tulosta. Oikeita negatiivisia tuloksia reumafaktorille oli 17 kappaletta ja anti-MCV:lle 35 kappaletta. (Taulukko 5) Jos testiryhmään olisi otettu mukaan kontrollinäytteitä nivelreumaa sairastavilta henkilöiltä, joiden reumafaktori- ja anti-MCV-arvot olisivat olleet tiedettävästi koholla, olisi voitu myös varmistaa, antaako vieritesti oikeita positiivisia tuloksia. Saatujen tulosten perusteella ei siis voida päätellä, antaako vieritesti oikeita positiivisia tuloksia, koska testiryhmässä ei ollut yhtään henkilöä, joka olisi tiedettävästi sairastanut nivelreumaa.

Rheumachec-vieritestin antamien väärin positiivisten tulosten määrä on huomattava. Vieritestiä ei tämän tutkimuksen perusteella voida pitää kovin luotettavana määrittämään reumafaktoria ja anti-MCV:tä. Testi antoi liian herkästi positiivisen tuloksen näytteille, jotka kuitenkin muilla menetelmillä varmistettaessa osoittautuivat negatiivisiksi. Kaikki vieritestin antamat negatiiviset tulokset olivat myös Konelab 20i:llä ja Anti-MCV-kitillä varmistettuna negatiivisia. Vieritestin antamia negatiivisia tuloksia ei kuitenkaan voi pitää luotettavina, sillä mukana ei ollut yhtään oikeaa positiivista näytettä.

## 8.5 Tupakoivien ja tupakoimattomien erot anti-MCV- ja reumafaktoriarvoissa

Kaikki 40 näytettä olivat Konelab 20i:llä ja Anti-MCV-kitillä määritettyinä negatiivisia reumafaktorille ja anti-MCV:lle. Tämän tutkimuksen perusteella tupakoivilla ja tupakoimattomilla ei siis näyttäisi olevan eroja anti-MCV- ja reumafaktoriarvoissa. Rheumachec-vieritesti puolestaan on hieman herkempi antamaan tupakoiville positiivisia reumafaktori- ja anti-MCV-tuloksia. Rheumachec-vieritesti antoi 50 prosentille tupakoimattomista positiivisen reumafaktoriarvon, kun taas tupakoivista 65 prosenttia oli vieritestin mukaan reumafaktoripositiivisia. Anti-MCV:n määrittämisessä Rheumachec-vieritesti näytti positiivista 15 prosentille tupakoivista, ja tupakoimattomista 10 prosentille. (Taulukko 6)

TAULUKKO 6: Tupakoivien ja tupakoimattomien väliset erot reumafaktori- ja anti-MCV-pitoisuuksissa Rheumachec-vieritestillä määritettynä

	Tulos	Tupakointi		Yhteensä
		ei	kyllä	
Reumafaktori	negatiivinen	50	35	42
	positiivinen	50	65	58
	yhteensä % (n)	100 (20)	100 (20)	100 (40)
Anti-MCV	negatiivinen	90	85	88
	positiivinen	10	15	12
	yhteensä % (n)	100 (20)	100 (20)	100 (40)

Kuormittavan liikunnan harjoittaminen ennen näytteenottoa saattoi aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia Rheumachec-vieritestille, varsinkin anti-MCV:n määrittämisessä. Tutkimusjoukosta kuormittavaa liikuntaa ennen näytteenottoa harjoittaneita henkilöitä oli 2 kappaletta eli 5 % koko tutkimusjoukosta. Kuormittavaa liikuntaa harjoittaneista 100 % oli sekä reumafaktori- että anti-MCV-positiivisia Rheumachec-vieritestillä mitattuna. Henkilöistä, jotka eivät olleet harjoittaneet kuormittavaa liikuntaa, 55 % oli reumafaktori-positiivisia ja 13 % anti-MCV-positiivisia Rheumachec-vieritestin mukaan. (Taulukko 7)

TAULUKKO 7: Kuormittavan liikunnan vaikutus Rheumachec-vieritestin antamiin tuloksiin

	Tulos	Kuormittava liikunta	
		ei	kyllä
Reumafaktori	negatiivinen	45	0
	positiivinen	55	100
	yhteensä % (n)	100 (38)	100 (2)
Anti-MCV	negatiivinen	87	0
	positiivinen	13	100
	yhteensä % (n)	100 (38)	100 (2)

## **8.6 Tupakointi mahdollisena altistavana tekijänä anti-MCV:n ja reumafaktorin esiintymiselle veressä**

Tässä tutkimuksessa käytetyillä menetelmillä määritettyinä tupakoivien ja tupakoimattomien välillä ei ollut eroja anti-MCV- ja reumafaktoripitoisuuksissa. Näin ollen tupakointia ei tämän tutkimuksen perusteella voida pitää altistavana tekijänä kyseisten vasta-aineiden esiintymiselle veressä. Tupakoinnin kestolla ei myöskään ollut vaikutusta vasta-ainepitoisuuksiin. Yli kaksikymmentä vuotta tupakoineiden ja vain muutaman vuoden tupakoineiden välillä ei ollut merkittäviä eroja. Runsaasti, yli kaksikymmentä savuketta päivässä tupakoivien, ja vain muutaman savukkeen päivässä tupakoivien välillä ei myöskään ollut eroja vasta-ainepitoisuuksissa, joten tupakoinnin määrällä ei tämän tutkimuksen perusteella ole vaikutusta.

## 9 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

Tässä työssä määritettiin 40 näytteen anti-MCV- ja reumafaktoriarvot kahdella eri menetelmällä. Rheumachec-vieritestillä määritettiin kapillaariverestä anti-MCV- ja reumafaktoripitoisuus. Anti-MCV-tulokset varmistettiin ELISA-tekniikkaan perustuvalla kitillä ja reumafaktoritulokset varmistettiin Konelab 20i -analysaattorilla. Näillä eri menetelmillä määritetyissä arvoissa oli huomattavia eroja. Anti-MCV:n määrittämisessä Rheumachec-vieritesti antoi 12 % positiivisia tuloksia. Anti-MCV-kitillä määritettynä kaikki näytteet kuitenkin olivat negatiivisia anti-MCV:lle. Samoin reumafaktorin määrittämisessä vieritesti antoi 58 %:lle näytteistä positiivisen tuloksen ja Konelab 20i -analysaattorilla määritettynä kaikki näytteet olivat negatiivisia reumafaktorille.

Rheumachec-vieritestiä ei tämän tutkimuksen perusteella voida pitää luotettavana määrittämään anti-MCV:tä ja reumafaktoria, sillä väärin positiivisten määrä on huomattava. Rheumachec-vieritestin antamat negatiiviset tulokset, joita oli anti-MCV:lle 88 % ja reumafaktorille 42 %, ovat periaattessa oikeita negatiivisia, sillä kaikki Rheumachec-vieritestillä negatiivisiksi todetut näytteet olivat myös rinnakkaismenetelmillä määritettynä negatiivisia. Näin saatuja negatiivisia tuloksia ei kuitenkaan voi pitää luotettavina, koska tutkimuksessa ei ollut mukana yhtään positiivista näytettä.

Rheumachec-vieritestin antamilla positiivisilla tuloksilla ei ollut tiettyä rajaa konsentraatiossa mitattuna rinnakkaismenetelmillä. Toisin sanoen Rheumachec-vieritestin antamien positiivisten näytteiden rinnakkaismenetelmillä mitatut konsentraatiot vaihtelivat samalla välillä kuin negatiivisten näytteidenkin, sekä reumafaktorilla että anti-MCV:llä. Näin voidaan päätellä, että vieritesti antaa positiivisen tuloksen sattumanvaraisesti, ei tietyn konsentraation ylittyessä. Tämä vahvistaa johtopäätöksen siitä, että Rheumachec-vieritesti ei ole luotettava määrittämään reumafaktoria ja anti-MCV:tä.

Rheumachec-vieritestin luotettavuutta voidaan myös arvioida tarkastelemalla testin spesifisyyttä ja herkkyyttä. Rheumachec-vieritestin valmistajan mukaan testin kliininen spesifisyys Anti-MCV:lle on 98 % ja herkkyys 72 % (liite 3). Reumafaktorin osalta spesifisyydestä ja herkkyyydestä ei ole mainintaa. Tutkimuksessa käytettyjen 40 näytteen tuloksista 58 % oli Rheumachec-vieritestillä määritettynä väärinä positiivisia reumafaktorille ja 12 % väärinä positiivisia anti-MCV:lle.

Väärien positiivisten tulosten perusteella voidaan päätellä, että testin spesifisyys ei yllä valmistajan ilmoittamalle tasolle. Jos tutkimuksessa olisi ollut mukana tiedettävästi positiivisia näytteitä, olisi myös testin herkkyyttä voitu arvioida.

Rheumachec-vieritesti vaikuttaa tämän tutkimuksen perusteella olevan hieman herkempi antamaan positiivisen anti-MCV- tai reumafaktorituloksen tupakoiville kuin tupakoimattomille. Muuta eroa tupakoivien ja tupakoimattomien välillä tässä tutkimuksessa ei havaittu. Anti-MCV-kitillä ja Konelab 20i analysaattorilla määritettyinä kaikki näytteet, sekä tupakoivien, että tupakoimattomien, olivat negatiivisia. Tupakointia ei siis tämän tutkimuksen perusteella voida pitää altistavana tekijänä anti-MCV:n ja reumafaktorin esiintymiselle veressä. Kuormittavan liikunnan vaikutusta väärin positiivisiin tuloksiin Rheumachec-vieritestillä oli havaittavissa hieman. Kuormittavaa liikuntaa ennen näytteenottoa harjoittaneita oli viisi prosenttia tutkimusjoukosta, ja he kaikki olivat sekä anti-MCV- että reumafaktoripositiivisia vieritestin mukaan. Rinnakkaismenetelmillä määritettynä nämäkin näytteet kuitenkin olivat negatiivisia.

Näin suppealla tutkimusjoukolla tehdyssä tutkimuksessa täytyy ottaa sattuman vaikutus huomioon. Erityisesti arvioitaessa kuormittavan liikunnan vaikutusta väärin positiivisiin vieritestin tuloksiin, täytyy ottaa huomioon, että kuormittavaa liikuntaa ennen näytteenottoa harjoittaneita oli vain 5 % eli kaksi henkilöä koko tutkimusjoukosta. Tekemällä vastaava tutkimus laajemmalla tutkimusjoukolla voitaisiin saada luotettavampaa tietoa tupakoinnista mahdollisena altistavana tekijänä. Lisäksi jos tutkimusjoukkoon valittaisiin tupakoivien ryhmään ainoastaan sellaisia henkilöitä, jotka ovat tupakoineet hyvin kauan, esimerkiksi vähintään 25–30 vuotta, voisivat tupakoinnin mahdolliset vaikutukset vasta-ainearvoihin tulla paremmin esille.

Omat oppimiskokemukseni tästä opinnäytetyöstä ovat monipuoliset. Opin kvantitatiivisen tutkimuksen teon eri vaiheet ja kehitin myös taitojani käytännön laboratoriotyössä, sekä näytteenotossa. Haasteeksi tämän työn tekemisessä muodostui riittävän laajan tutkimusjoukon kerääminen sekä tulosten saattaminen lopulliseen muotoonsa taulukoihin ja kuvioihin. Opinnäytetyöni edisti myös ammatillista kasvuani, koska tämän työn ansiosta osaan tulevassa ammatissani suhtautua kriittisesti uusiin testeihin ja menetelmiin.



## LÄHTEET

Becan-McBride, K. & Garza, D. 2010. Phlebotomy handbook: Blood specimen collection from basic to advanced. Upper Saddle River, N.J. : Pearson

Ernst, D. 2005. Applied phlebotomy. Baltimore, MD : Lippincott Williams & Wilkins.

Goodson, N. Farragher, T. & Symmons, 2008. Rheumatoid factor, Smoking, and Disease Severity: Associations with Mortality in Rheumatoid Arthritis. The Journal of Rheumatology. Hakupäivä 12.1.2010, <http://www.jrheum.com/subscribers/08/06/945.html>.

Hammar, F. & Stolzenberg, T. 2009. Rheumatoid Arthritis: Symptoms, diagnosis, treatment. Hakupäivä 23.10.2009, <http://www.rheumachec.com/>.

Heikkilä, T. 1999. Tilastollinen tutkimus. Helsinki: Edita.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15. uudistettu painos. Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Holthöfer, H. & Heikkilä, R. 2005. Sitrulliniipeptidi, vasta-aineet. Teoksessa M. Ellfolk, K. Huotari, S. Pääkkönen & J. Vilpo (toim.) Laboratoriokäsikirja 2006–2007. Keuruu: Yhtyneet Laboratoriot Oy, 365–366.

Hutchinson, D. Lear, J. Lynch, M. Moots, R. & Shepstone, L. 2001. Heavy cigarette smoking is strongly associated with rheumatoid arthritis (RA), particularly in patients without family history of RA. Annuals of Rheumatoid Diseases 60. Sisäinen lähde. Hakupäivä 12.1.2010, <http://ard.bmj.com/content/60/3/223.full>

ISO 9000-sarjan standardien valinta ja käyttö, Suomen standardisoimisliitto. Hakupäivä 10.2.2010, <http://www.sfs.fi/iso9000/laadunhallinta/>.

Isomäki, H. 2002. Nivelreuma. Teoksessa M. Leirisalo-Repo, M. Hämäläinen & E. Moilanen (toim.) Reumataudit. Rauma: Kustannus Oy Duodecim, 152–166.

Jaatinen, T. & Raudasoja, J. 2004. Kansamme taudit. Porvoo: WSOY.

Kang, E. & Song, Y. 2009. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. Oxford Journals. Hakupäivä 12.1.2010, <http://qjmed.oxfordjournals.org/cgi/content/full/hcp165v1>.

Kustannus Oy Duodecim, 2009. Terminologian tietokannat. Hakupäivä 21.10.2009, [http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/terveysportti/rex\\_terminologia.koti](http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/terveysportti/rex_terminologia.koti).

Lam, G. 2006. Citrullinated Proteins, Peptidylarginine Deiminase (PAD), and Rheumatoid Arthritis. Johns Hopkins University School of Medicine, Rheumatology rounds. Hakupäivä 5.10.2010, [http://www.hopkins-arthritis.org/physician-corner/cme/rheumatology-rounds/citrullinated\\_proteins\\_rheumrounds4.html](http://www.hopkins-arthritis.org/physician-corner/cme/rheumatology-rounds/citrullinated_proteins_rheumrounds4.html).

Moodi 6/2009. Vieritestaus terveydenhuollossa, Labqualityn asiantuntijasuositus. Helsinki: Labquality Oy.

National Product Control Agency for Welfare and Health 2007. GLP Programme in Finland. Hakupäivä 17.10.2010, [http://www.sttv.fi/kemo/english/GLP/GLP-PROGRAM\\_FINLAND\\_2007.pdf](http://www.sttv.fi/kemo/english/GLP/GLP-PROGRAM_FINLAND_2007.pdf).

Palosuo, T. 2002. Immunologia. Teoksessa M. Leirisalo-Repo, M. Hämäläinen & E. Moilanen (toim.) Reumataudit. Rauma: Kustannus Oy Duodecim, 31–51.

Siloaho, M. 2006. Laadunhallintajärjestelmien hyödyntäminen suomalaisissa kliinisissä laboratorioissa. Moodi 3/2006, 142-146.

Vilka, H. 2007. Tutki ja mittaa, määrällisen tutkimuksen perusteet. Jyväskylä: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

World Health Organization, Good laboratory practice handbook 2009. Hakupäivä 10.2.1010,  
<http://apps.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/good-laboratory-practice-handbook/pdf/glp-handbook.pdf>.

## LIITTEET

LIITE 1: Tule mukaan nivelreumatutkimukseen -ilmoitus

LIITE 2: Esitietolomake

LIITE 3: Rheumachec-pikatesti -käyttöohje (Orgentec Diagnostica, 2009)

LIITE 4: Anti-MCV-työohje (Orgentec Diagnostica, 2008)

LIITE 5: Konelab 20i, Rheumatoid Factor 2 -ohje (Thermo Fisher Scientific, 2007)

LIITE 6: RF 2 –kalibraatioparametrit ja inkubointikaavio (Thermo Fisher Scientific, 2007)

LIITE 7: Anti-MCV-kitillä määritettyjen rinnakkaisten potilasnäytteiden absorbanssit aallonpituudella 450 nm

## TULE MUKAAN NIVELREUMATUTKIMUKSEEN

Haluatko mukaan tutkimukseen, jossa sinulta tutkitaan alttiutta sairastua nivelreumaan?

Teen opinnäytetyönäni tutkimusta tupakoinnista mahdollisena altistavana tekijänä nivelreumassa tyypillisesti esiintyvien vasta-aineiden esiintymiselle. Tarvitsen tutkimusta varten 20 vapaaehtoista tupakoivaa ja 20 vapaaehtoista tupakoimatonta henkilöä. Tutkittavilta henkilöiltä otetaan suoniverinäyte käsivarresta, sekä kapillaariverinäyte sormenpästä.

Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää onko tupakoinnilla vaikutusta tyypillisesti nivelreumassa esiintyvien vasta-aineiden, eli reumafaktorin ja Anti-MCV:n esiintymiselle veressä ja samalla testata uuden Rheumachec-vieritestin toimintaa. Reumafaktorin löytyminen ei välttämättä ole merkki nivelreumasta, sillä kyseistä vasta-ainetta esiintyy myös monissa muissa sairauksissa ja jopa terveillä yksilöillä. Anti-MCV on spesifinen ja luotettava merkkiaine nivelreumalle ja sen avulla voidaan diagnosoida taudin varhaismuotoja. Anti-MCV voidaan havaita verestä jo vuosia ennen taudin puhkeamista.

Syy miksi nivelreumaan sairastutaan on tuntematon. Tupakoinnin vaikutusta nivelreumaan on jo aikaisemmin tutkittu. Tupakoinnin tiedetään olevan riskitekijä reumafaktoripositiiviselle nivelreumalle. Tupakoivat nivelreumapotilaat ovat tupakoimattomia suuremmalla todennäköisyydellä reumafaktoripositiivisia. Tupakointi on myös yhdistetty reumafaktorin tuotantoon terveillä ihmisillä.

Jos haluat mukaan tutkimukseen, ilmoittaudu minulle sähköpostilla ja tule näytteenottoon luokkaan C2010A viikoilla 8, 9 ja 11 (tarkemmat ajat ilmoitetaan osallistujille myöhemmin). Ilmoittaudu mahdollisimman pian, sillä **tutkimukseen otetaan mukaan 20 ensiksi ilmoittautunutta tupakoivaa ja 20 ensiksi ilmoittautunutta tupakoimatonta henkilöä. Tupakoivien tulee olla säännöllisesti (päivittäin) tupakoivia.**

Terveisin

Bioanalytiikan opiskelija Katri Ruokamo, Bio7sn





Suomi



### Käyttöohje

1 × / 10 × immunokromatografinen pikatesti reumatekijöiden ja muutoidun sitrullinoidun vimentiniin autovasta-aineen (Anti-MCV<sup>®</sup>) havaitsemiseen kokoverestä.

Vain In vitro-diagnostiikkaan.

Vain ammattitaitoisille henkilöille ammattikäyttöön.

ORG 170-01

ORG 170-10

### Sisällysluettelo

1. Testin kuvaus – testausperiaate
2. Pakkauksen komponentit
  - 2.1. Varastointi ja vakaus
3. Yleiset ohjeet ja varotoimet
4. Näytteenotto ja valmistelu
  - Testin suorittaminen
- Analyysi ja tulosten tulkitseminen
  - 6.1. Tulosten lukeminen ja analysointi
  - 6.2. Epäselvät tulokset
7. Testin ominaisuudet ja suoritiedot
8. Testin rajoitukset ja rajat

Erityinen ominaisuus: Testin kestoaika n. 15 minuuttia

#### 1. Testin kuvaus – testausperiaate

rheumachec<sup>®</sup>-pikatesti on kalvopohjainen kaksivaiheinen analyysi reumatekijöiden (RF) ja MCV:n vastaisen autovasta-aineiden (Anti-MCV<sup>®</sup>) nopeaa yhdistettyä näyttöä varten kokoverestä nivelreumaa epäiltäessä. Testi ei sovellu käytettäväksi muiden kehon nesteiden kanssa.

Testi koostuu seuraavista osista

- › erityinen autovasta-aineita sitova proteiini, joka on kytketty kolloidaalisiin kultahiukkasiin (detektor),
- › kalvo, jolle on kiinnitetty ainutlaatuinen yhdistelmä RF- ja Anti-MCV<sup>®</sup>-kohtaisia antigeenejä.

Testi perustuu immunokromatografiaan. Testi virtaa ensiksi veriseparaattorin läpi, johon veren solukkoiset osat jäävät. Tästä tuloksena olevan veriplasman sisältämät patologiset autovasta-aineet sitoutuvat testikalvon antigeeneihin (humanaaninen immunoglobuliini ja rekombinantti MCV) ja kullalla merkitty

detektor tekee niistä näkyviä. Kohtiin RF ja/tai MCV ilmestyy yksi tai kaksi punaviolettia viivaa. Loppu vasta-aine-detektorikompleksi siirtyy edelleen tarkastusvyöhykkeelle C. Täällä syntyvä punavioletti nauha ilmoittaa, että testi on suoritettu oikein.

#### 2. Pakkauksen komponentit

- 1 × / 10 × rheumachec<sup>®</sup>-testikasetti
- 1 × / 10 × automaattilansetti  
(Valm. Vitrex Medical AS<sup>1)</sup>)
- 1 × / 12 × muovipipetti 10 µl  
(Valm. Savetec Clinical Products, Inc<sup>2)</sup>)
- 1 × tippapullo, jossa 3 ml puskuriliuosta  
(0,09 % natriumatsidia)
- 1 × alkoholituppo  
(vain ORG 170-01) (Valm. H&W cv<sup>3)</sup>)
- 1 × käyttöohje

Muita materiaaleja ei tarvita.

<sup>1)</sup> Toimitusohjeet ja osoite pyynnöstä ocd groupilta.

#### 2.1. Varastointi ja vakaus

Avaamaton rheumachec<sup>®</sup>-pikatesti pysyy vakaana +4 °C ... +28 °C:n lämpötilassa. Ei saa altistaa valolle, suojattava auringon valolta. rheumachec<sup>®</sup>-pikatestiä voidaan käyttää pakkaukseen painettuun viimeiseen käyttöpäivään asti.

#### 3. Yleiset ohjeet ja varotoimet

- › Tämän käyttöohjeen noudattamatta jättäminen voi johtaa virheellisiin mitaustuloksiin.
- › Testiä tai yksittäisiä testin komponentteja ei saa käyttää uudelleen.
- › Näytteiden ja käytettyjen materiaalien käsittelyssä ja hävittämisessä on noudatettava laboratorioissa yleisiä menettelytapoja ja suojatoimia.

**Varoitus:** Verta ohentavia lääkkeitä käyttävillä henkilöillä tai henkilöillä, joilla esiintyy veren hyytymishäiriöitä (esim. hemofiliaa), on rheumachec<sup>®</sup>-pikatestiä suoritettava erityistä varovaisuutta noudattaen.

#### 4. Näytteenotto ja valmistelu

rheumachec<sup>®</sup>-pikatesti on tarkoitettu kapillaarikokoveren käyttöä varten. Testin suorittaminen on mahdollista 10 µl:lla i.v. kokoverta. Käytä ainoastaan tuoreita näytteitä. Verinäytteet on otettava voimassa olevien määräysten ja menetelmien mukaisesti.

#### 5. Testin suorittaminen

Testin kestoaika n. 15 minuuttia

Testin suorittamisesta, katso kuvat 1–3 sivulla 3.

- I. Testin suorittaminen huoneenlämpötilassa.
- II. Hiero potilaan sormenpäitä hieman, jotta veri virtaisi punktiokohdassa paremmin. Puhdista punktiokohta alkoholitupolla.
- III. Irrota automaattilansetin suojakorkki. Aseta lansetin avattu puoli punktiokohtaan. Automaattilansetti laukaistaan painamalla sitä sormenpäätä vasten. Tämän jälkeen lansetti on käyttökelvoton!

IV. Paina tarvittaessa verta ulos puristamalla sormenpäästä kevyesti. Kerää ulos tuleva veripisara muovipipetillä. Pidä pipettiä tätä varten vaakasuorassa tai hieman vinossa kärki veripisarassa. Tarvittava määrä (10 µl, merkintä) imeytyy pipettiin kapillaari-ilmiön avulla. Muoviputken merkinnän korkeudella sijaitsevan ilmanottoaukon on oltava tällöin vapaana (kuva 1). **Huomio, älä paina tällöin pipetin palloa, pipetti täyttyy automaattisesti!**

V. Pidä muovipipettiä nyt pystysuorassa ja vie se neliskulmaisen näytekentän päälle. Paina pipetin palloa varovasti ja aseta ulos tuleva veripisara näytekentän huovalle (kuva 2). Älä vahingoita tällöin näytekentän huopaa.

**Huomio:** Jos verta ei saada puhalletuksi ulos pipetin palloa painamalla, on muoviputken ilmanottoaukko (merkintä) peitettävä sormella (kuva 3).

VI. Tiputa välittömästi näytteen asettamisen jälkeen kuusi tippaa puskuriliuosta (6) pyöreään puskurikenttään.

VII. Toimenpiteen suorittamisen jälkeen testikasetti on varastoitava vaakasuorassa. – **Testin analysointi 15 minuutin kuluttua.**

## 6. Analyysi ja tulosten tulkitseminen

### 6.1. Tulosten lukeminen ja analysointi

Tulosten arvioinnista ja tulkinnasta, katso kuva 4 sivulla 3.

**Negatiivinen:** Vain tarkastusvyöhykkeellä C näkyy punavioletti nauha.

**Positiivinen:** Tarkastusvyöhyke C:n punavioletin nauhan lisäksi näkyy yksi tai kaksi muuta nauhaa kohdissa MCV ja / tai RF.

**Kuva 4:** **rheumachec**<sup>®</sup>-pikatestin analysointi: **a:** virheellinen; **b:** negatiivinen; **c:** F-positiivinen; **d:** Anti-MCV<sup>®</sup>-positiivinen; **e:** Anti-MCV<sup>®</sup>-positiivinen ja RF-positiivinen.

» **Huomaa:** Testitulosten muutoksia 30 minuutin kuluttua testin loputtua ja myöhemmin ei tulisi enää ottaa huomioon analyysissä. Tämän ajan sisällä jokainen RF- tai MCV-kohtaan ilmestynyt nauha – sen värin voimakkuudesta riippumatta – katsotaan positiiviseksi.

### 6.2. Epäselvät tulokset

Testin tulosta ei voida määritellä, jos tarkastusvyöhykkeeseen C ei ilmesty punaviolettia nauhaa. Tässä tapauksessa suosittelemme uuden testikasetin käyttöä ja testin suorittamista uudelleen.

## 7. Testin ominaisuudet ja suoritettiedot

- » **rheumachec**<sup>®</sup>-pikatesti on arvioitu johtavalla ELISA-reumatekijällä ja ELISA-Anti-MCV<sup>®</sup>:llä kliinisiä näytteitä käyttäen.
- » Anti-MCV<sup>®</sup>:lle nivelreuman merkinä kliininen spesifisyys on 98%, herkkyys 72%.
- » RF-ELISA:an ja Anti-MCV<sup>®</sup>-ELISA:an verrattuna **rheumachec**<sup>®</sup>-pikatesti saavutti 93% positiivisen yhtäpitävyyden ja 98% negatiivisen yhtäpitävyyden. Matriisivaikutuksia ja antikoagulanttivaikutuksia ei esiinny.
- » Intra-Assay- ja Inter-Assay-CV tarkkuuteen <10 %.

» **Cut-off -arvo\*:** 50 Units/ml (vastaavia ELISA-testejä vastaavasti)

» Alle 50 Units/ml RF- ja Anti-MCV<sup>®</sup>-pitoisuudet eivät aiheuta näkyviä loslinjoja vastaavissa kohdissa (RF tai MCV). Tarkastuslinja (C) merkitsee **rheumachec**<sup>®</sup>-pikatestin toimivuudesta värjäytyy joka tapauksessa navioletiksi.

\*herkkyyden alempi kynnysarvo

## 8. Testin rajoitukset ja rajat

- » Pelkkien reumatekijöiden esiintyminen ei ole todiste nivelreumasta. Reumatekijöitä voidaan havaita myös muissa sairauksissa ja n. 5% terveistä. Korkeammassa iässä jopa 25% tutkituista henkilöistä ova positiivisia.
- » Munuaisten vajaatoimintaa sairastavilla henkilöillä **rheumachec**<sup>®</sup>-pikatesti voi johtaa virheellisiin positiivisiin tuloksiin, koska munuaisten heikentynyt toiminta voi nostaa Anti-MCV<sup>®</sup>- ja reumatekijä-titтереitä.
- » Kilpaurheilijoilla voi esiintyä virheellisiä positiivisia tuloksia, koska reumatekijöiden ja Anti-MCV<sup>®</sup>:n pitoisuudet nousevat lisääntyneen lihaskuormituksen vuoksi lyhyesti normaaliarvon yläpuolelle.
- » Positiivinen Anti-MCV<sup>®</sup>-esiintymä on merkittävä viite nivelreumasta varhaisesta nivel tulehduksesta ja vaatii ottamaan yhteyttä erikoislääkärin kanssa. Pelkkä **rheumachec**<sup>®</sup>-pikatestin tulos ei ole vielä mikään lopullisen diagnoosin perusta.

### Kirjallisuutta:

Kirjallisuusluettelo on saatavana pyynnöstä ocd groupilta.

**Käyttöohje:** Painos huhtikuu 2009



## ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49  
55129 Mainz - Germany

Phone: +496131/92580  
Fax: +496131/925858

Internet: [www.orgentec.com](http://www.orgentec.com)



Instruction for use  
February 2008



## ORG 548 Anti-MCV®

Immunometric Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of antibodies against mutated citrullinated vimentin

### CONTENTS

NAME AND INTENDED USE  
SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST  
PRINCIPLE OF THE TEST  
WARNINGS AND PRECAUTIONS  
CONTENTS OF THE KIT  
STORAGE AND STABILITY  
MATERIALS REQUIRED  
SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING  
PROCEDURAL NOTES  
PREPARATION OF REAGENTS  
TEST PROCEDURE  
INTERPRETATION OF RESULTS  
PERFORMANCE CHARACTERISTICS  
LIMITATIONS OF PROCEDURE  
INTERFERING SUBSTANCES  
REFERENCES  
INCUBATION SCHEME

### NAME AND INTENDED USE

Anti-MCV® is an indirect solid phase enzyme immunoassay (ELISA) for the quantitative measurement of IgG class autoantibodies against mutated citrullinated vimentin (MCV) in human serum or plasma. The assay is intended for in vitro diagnostic use only as an aid in the diagnosis of rheumatoid arthritis.

### SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Rheumatoid arthritis (RA) is one of the most common autoimmune diseases. The main characteristics of RA is joint inflammation that results in joint damage and loss of function. An early diagnosis of RA and an immediate beginning of an appropriate treatment is important to prevent a complete joint damage. RA is diagnosed primarily on clinical manifestations and serological support has, up to now, been mainly restricted to the determination of autoantibodies against rheumatoid factor (RF). RF is a sensitive serological marker for RA with a moderate specificity of about 70%. In several studies it has been demonstrated that the determination of antibodies against citrullinated arginine residues in filament proteins occurs in RF negative patients. Citrullination is an peptidylarginine deiminase (PAD) catalysed process in which the amino acid arginine (Arg) is modified to citrullin. During this conversion, the positively charged NH<sub>2</sub>-group is hydrolyzed to an oxygen group [4].

The ORGENTEC Anti-MCV® ELISA shows both a high specificity and a high sensitivity for autoantibodies against mutated citrullinated vimentin. Vimentin is an omnipresent citrullinated protein which was observed in the rheumatoid synovial tissue of RA patients. There are recent findings of secretion and modification of vimentin by macrophages depending on pro-inflammatory signals [12]. The titer of antibodies against vimentin in RA patients strongly correlates with the disease activity score (DAS).

### PRINCIPLE OF THE TEST

Mutated citrullinated vimentin (MCV) is bound to microwells. Antibodies against this antigen, if present in diluted serum or plasma, bind to the respective antigen. Washing of the microwells removes unspecific serum and plasma components. Horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-human IgG immunologically detects the bound patient antibodies forming a conjugate/antibody/antigen complex. Washing of the microwells removes unbound conjugate. An enzyme substrate in the presence of bound conjugate hydrolyzes to form a blue color. The addition of an acid stops the reaction forming a yellow endproduct. The intensity of this yellow color is measured photometrically at 450 nm. The amount of colour is directly proportional to the concentration of IgG antibodies present in the original sample.

### WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. All reagents of this kit are strictly intended for in vitro diagnostic use only.
2. Do not interchange kit components from different lots.
3. Components containing human serum were tested and found negative for HBsAg, HCV, HIV1 and HIV2 by FDA approved methods. No test can guarantee the absence of HBsAg, HCV, HIV1 or HIV2, and so all human serum based reagents in this kit must be handled as though capable of transmitting infection.

- Avoid contact with the TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine). If TMB comes into contact with skin, wash thoroughly with water and soap.
  - Avoid contact with the Stop Solution which is acid. If it comes into contact with skin, wash thoroughly with water and seek medical attention.
  - Some kit components (i.e. Controls, Sample buffer and Buffered Wash Solution) contain Sodium Azide as preservative. Sodium Azide (NaN<sub>3</sub>) is highly toxic and reactive in pure form. At the product concentrations (0,09%), though not hazardous. Despite the classification as non-hazardous, we strongly recommend using prudent laboratory practices (see 8, 9, 10).
  - Some kit components contain Proclin 300 as preservative. When disposing reagents containing Proclin 300, flush drains with copious amounts of water to dilute the components below active levels.
  - Wear disposable gloves while handling specimens or kit reagents and wash hands thoroughly afterwards.
  - Do not pipette by mouth.
  - Do not eat, drink, smoke or apply makeup in areas where specimens or kit reagents are handled.
  - Avoid contact between the buffered Peroxide Solution and easily oxidized materials; extreme temperature may initiate spontaneous combustion.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera. During handling of all kit reagents, controls and serum samples observe the existing legal regulations.

#### CONTENTS OF THE KIT

Package size	96 determ.
Qty.1	Divisible microplate consisting of 12 modules of 8 wells each, coated with mutated citrullinated Vimentin (MCV). Ready to use.
6 vials, 1,5 ml each	Calibrators with IgG class Anti-MCV® antibodies (A-F) in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, NaN <sub>3</sub> <0,1% (w/w)) containing: IgG: 0; 20; 40; 100; 300; and 1000 U/ml. Ready to use.
2 vials, 1,5 ml each	Anti-MCV® controls in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, NaN <sub>3</sub> <0,1% (w/w)) positive (1) and negative (2), for the respective concentrations see the enclosed package insert. Ready to use.
1 vial, 20 ml	Sample buffer (Tris, NaN <sub>3</sub> <0,1% (w/w)), yellow, concentrate (5x).
1 vial, 15 ml	Enzyme conjugate solution (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)), (light red) containing polyclonal rabbit anti-human IgG; labelled with horseradish peroxidase. Ready to use.
1 vial, 15 ml	TMB substrate solution. Ready to use.
1 vial, 15 ml	Stop solution (contains acid). Ready to use.
1 vial, 20 ml	Wash solution (PBS, NaN <sub>3</sub> <0,1% (w/w)), concentrate (50x).

#### STORAGE AND STABILITY

- Store the kit at 2-8 °C.
- Keep microplate wells sealed in a dry bag with desiccants.
- The reagents are stable until expiration of the kit.
- Do not expose test reagents to heat, sun or strong light during storage and usage.
- Diluted sample buffer and wash buffer are stable for at least 30 days when stored at 2-8 °C.

#### MATERIALS REQUIRED

##### Equipment

- Microplate reader capable of endpoint measurements at 450 nm
- Multi-Channel Dispenser or repeatable pipet for 100 µl
- Vortex mixer
- Pipets for 10 µl, 100 µl and 1000 µl
- Laboratory timing device
- Data reduction software

##### Preparation of reagents

- Distilled or deionized water
- Graduated cylinder for 100 and 1000 ml
- Plastic container for storage of the wash solution

#### SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING

- Collect whole blood specimens using acceptable medical techniques to avoid hemolysis.
- Allow blood to clot and separate the serum by centrifugation.
- Test serum should be clear and non-hemolyzed. Contamination by hemolysis or lipemia is best avoided, but does not interfere with this assay.
- Specimens may be refrigerated at 2-8 °C for up to five days or stored at -20 °C up to six months.
- Avoid repetitive freezing and thawing of serum samples. This may result in variable loss of autoantibody activity.
- Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

#### PROCEDURAL NOTES

- Do not use kit components beyond their expiration dates.
- Do not interchange kit components from different lots.
- All materials must be at room temperature (20-28 °C).
- Have all reagents and samples ready before start of the assay. Once started, the test must

be performed without interruption to get the most reliable and consistent results.

5. Perform the assay steps only in the order indicated.
6. Always use fresh sample dilutions.
7. Pipette all reagents and samples into the bottom of the wells.
8. To avoid carryover contamination change the tip between samples and different kit controls.
9. It is important to wash microwells thoroughly and remove the last droplets of wash buffer to achieve best results.
10. All incubation steps must be accurately timed.
11. Control sera or pools should routinely be assayed as unknowns to check performance of the reagents and the assay.
12. Do not re-use microplate wells.

For all controls, the respective concentrations are provided on the labels of each vial. Using these concentrations a calibration curve may be calculated to read off the patient results semi-quantitatively.

#### PREPARATION OF REAGENTS

##### Preparation of sample buffer

Dilute the contents of each vial of the sample buffer concentrate (5x) with distilled or deionized water to a final volume of 100 ml prior to use. Store refrigerated: stable at 2-8 °C for at least 30 days after preparation or until the expiration date printed on the label.

##### Preparation of wash solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled or deionized water to a final volume of 1000 ml prior to use. Store refrigerated: stable at 2-8 °C for at least 30 days after preparation or until the expiration date printed on the label.

##### Sample preparation

Dilute all patient samples 1:100 with sample buffer before assay. Therefore combine 10 µl of sample with 990 µl of sample buffer in a polystyrene tube. Mix well. Controls are ready to use and need not be diluted.

#### TEST PROCEDURE

1. Prepare a sufficient number of microplate modules to accommodate controls and prediluted patient samples.
2. Pipet 100 µl of calibrators, controls and prediluted patient samples in duplicate into the wells.

	1	2	3	4	5	6
A	SA	SE	P1	P5		
B	SA	SE	P1	P5		
C	SB	SF	P2	P-		
D	SB	SF	P2	P-		
E	SC	C1	P3			
F	SC	C1	P3			
G	SD	C2	P4			
H	SD	C2	P4			

SA-SF: standards A to F  
 P1, P2... patient sample 1, 2 ...  
 C1: positive control  
 C2: negative control

3. Incubate for 30 minutes at room temperature (20-28 °C).
4. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µl of wash solution.
5. Dispense 100 µl of enzyme conjugate into each well.
6. Incubate for 15 minutes at room temperature.
7. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µl of wash solution.
8. Dispense 100 µl of TMB substrate solution into each well.
9. Incubate for 15 minutes at room temperature.
10. Add 100 µl of stop solution to each well of the modules and incubate for 5 minutes at room temperature.
11. Read the optical density at 450 nm and calculate the results. Bi-chromatic measurement with a reference at 600-690 nm is recommended.

The developed colour is stable for at least 30 minutes. Read optical densities during this time.

#### Automation

The ORGENTEC Anti-MCV® ELISA is suitable for use on open automated ELISA processors. The test procedure detailed above is appropriate for use with or without automation.

#### INTERPRETATION OF RESULTS

##### Quality Control

This test is only valid if the optical density at 450 nm for Positive Control (1) and Negative Control (2) as well as for the Calibrator A and F complies with the respective range indicated on the Quality Control Certificate enclosed to each test kit! If any of these criteria is not fulfilled, the results are invalid and the test should be repeated.

##### Calculation of results

For the Anti-MCV ELISA a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice.

##### Recommended Lin-Log Plot

First calculate the averaged optical densities for each calibrator well. Use lin-log graph paper and plot the averaged optical density of each calibrator versus the concentration. Draw the best fitting curve approximating the path of all calibrator points. The calibrator points may also be connected with straight line segments. The concentration of unknowns may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

**Interpretation of results**

In a normal range study with serum samples from healthy blood donors the following ranges have been established with the Anti-MCV® assay.

Anti-MCV® IgG [U/ml]  
normal: < 20

Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.  
It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of Anti-MCV® antibodies in serum or plasma. The above reference ranges should be regarded as guidelines only.

positive: ≥ 20

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

**Parallelism**

In dilution experiments sera with high IgG-antibody concentrations were diluted with sample buffer and assayed in the Anti-MCV® kit. The assay showed linearity over the full measuring

Anti-MCV sample	dilution	observed [U/ml]	expected [U/ml]	o/e
IgG	1:100	569,3	284,7	101%
	1:200	287,8	142,3	105%
	1:400	149,2	71,2	104%
IgG	1:800	73,9	71,2	104%
	1:100	581,5	290,8	106%
	1:200	308,1	145,4	112%
IgG	1:400	162,5	72,7	107%
	1:800	77,7	72,7	107%
	>max	>max	377,4	100%
IgG	1:100	754,7	188,7	101%
	1:200	379,0	188,7	101%
	1:400	191,4	188,7	101%

range.

**Precision (Reproducibility)**

Statistics for coefficients of variation (CV) were calculated for each of three samples from the results of 24 determinations in a single run for Intra-Assay precision. Run-to-run precision was calculated from the results of 5 different runs with 6 determinations of each sample:

Intra-Assay			Inter-Assay		
Sample No	Mean [U/ml]	CV [%]	Sample No	Mean [U/ml]	CV [%]
1	17	2.0	1	22	2.7
2	180	2.3	2	117	2.3
3	750	2.2	3	527	1.9

**Sensitivity**

The lower detection limit for Anti-MCV® was determined at 1U/ml.

**Specificity**

The microplate is coated with mutated citrullinated vimentin. The Anti-MCV® test kits is specific only for autoantibodies against the mutated citrullinated form of vimentin.

**Calibration**

Since no international reference preparation for Anti-MCV antibodies is available, the system is calibrated in arbitrary units.

**LIMITATIONS OF PROCEDURE**

The Anti-MCV® ELISA is a diagnostic aid. A definite clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated.

**INTERFERING SUBSTANCES**

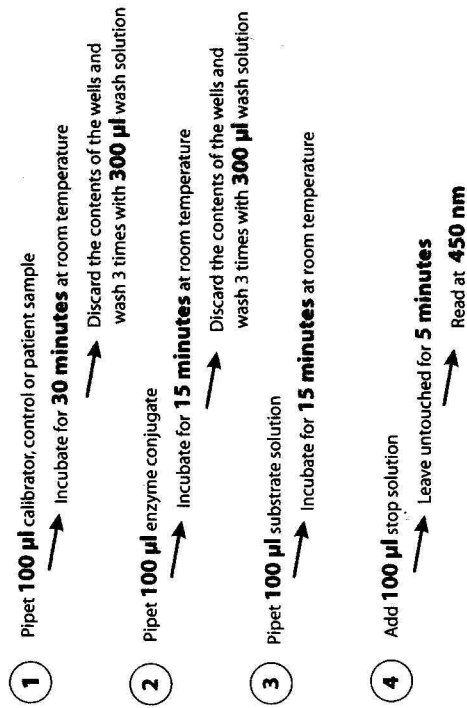
No interference has been observed with haemolytic (up to 1000 mg/dL), lipemic (up to 3 g/dL triglycerides) or bilirubin (up to 40 mg/dL) containing sera. Nor have any interfering effects been observed with the use of anticoagulants. However for practical reasons it is recommended that grossly hemolyzed or lipemic samples should be avoided.

**REFERENCES**

1. F.Bobbio-Pallavicini, C.Alpini, R.Caporali, S.Avalle, S.Bugatti, C.Montecuccio. Autoantibody profile in rheumatoid arthritis during long-term infliximab treatment. Arthritis Res Ther 2004; 6:R264-R272 (DOI 10.1186/ar1173)
2. E.R.Vossenaar, N.Deprés, E.Lapointe, A.van der Heijden, M.Lora, T.Senshu, W.J. van Venfoolij, H.A. Ménard. Rheumatoid arthritis specific anti Sa antibodies target citrullinated vimentin. Arthritis Research & Therapie Vol. 6 No. 2
3. O.Vittecoq, S.Poplin, K.Krzanowska, F.Jouen-Beades, J.F.Ménard, A.Daragon, F.Tron, X.Loet. Rheumatoid Factor is the strongest predictor of radiological progression of rheumatoid arthritis in a three-year prospective study in community-recruited patients. Rheumatology 2003; 42:939-946
4. W.J. van Venrooij, J.M.Hazes, H.Visser. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. The Netherland Journal of Medicine.
5. M.Escalon, F.J.Lópezes-Longo, C.M. González, I.Monteaudo, M.Rodríguez-Mahou, R.Grau, L.Carreño. Anti-Sa Sera from patients with Rheumatoid Arthritis contain at least 2 different subpopulations of Anti-Sa antibodies. The Journal of Rheumatology 2002; 29:10 2053-60
6. Ch.Vincent, L.Nogueira, M.Sebba, S.Chapuy-Regaud, M.Arnaud, O.Letourneur, D.Rolland, B.Rounie, A.Cantagrel, M.Jolivet, G.Serre. Detection of antibodies to determined recom-

- binant tat flaggrin by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Arthritis & Rheumatism* Vo. 46, No. 8, August 2002, pp. 2051-58
7. G.Steiner, J.Smolen. Antibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance. *Arthritis Res* 2002, 4 (suppl 2):S1-S5
  8. R.Goldbach-Mansky, J.Lee, A.McCoy, J.Hoxworth, C.Yarboro, J.S.Smolen, G.Steiner, A.Rosen, C.Zhang, H.A.Ménard, Z.J.Zhou, T.Palosuo, W.J.Van Venrooij, R.L.Wilder, J.H.Klippel, H.R.Schumacher Jr, H.S.El-Gabalawy. Rheumatoid arthritis associated antibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res* 2000, 2:236-243
  9. H.Ménard, E.Lapointe, M.D.Rochdi, Z.J.Zhou. Insights into rheumatoid arthritis derived from the Sa immune system. *Arthritis Research* 2000, 2:429-432
  10. G.Hayem, P.Chazerain, B.Combe, A.Elias, T.Haim, P.Nicaise, K.Benali, J-F Eliau, M-F Kahn, J.Sany, O.Meyer. Anti-Sa antibody is an accurate diagnostic and prognostic Marker in adult Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Rheumatology* 1999;26:7-13
  11. N. Deprés, G.Boire, F.J. Lopez-Longo, H.A. Ménard. The Sa System : A novel antigen antibody system specific for rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* 1994; 21:-1027-33
  12. E.R. Vossenaar, T.R.D. Radstake, A. van der Heijden, M.A.M. van Mansum, C. Dieteren, D.-J. de Rooij, P. Barrera, A.J.W. Zendman, W.J. van Venrooij. Expression and activity of citrullinated peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 373-381
  13. H. Burkhardt, B. Sehnert, R. Bockermann, A. Engström, J.R. Kalden, R. Holmdahl. Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 2005. 35: 1643-1652
  14. Ch. Vincent, L. Nogueira, C. Clavel, M. Sebbag, G. Serre. Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA. *Autoimmunity*, February 2005; 38 (1): 17-24
  15. M. Sebbag, S. Chapuy-Regaud, I. Auger, E. Petit-Teixeira, C. Clavel, L. Nogueira, Ch. Vincent, F. Cornélis, J. Roudier, G. Serre. Clinical and pathophysiological significance of the autoimmune response to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Joint bone Spine* 71 (2004) 493-502

## INCUBATION SCHEME



EN  
**Konelab™ / T Series**  
**Rheumatoid Factors 2 (RF 2)**

**REF 981920 2 x 6 ml**

**THIS PACKAGE INSERT IS APPLICABLE FOR USE OUTSIDE THE US. ANY REFERENCE TO THE KONELAB SYSTEMS ALSO REFERS TO THE T SERIES.**

**INTENDED USE**

For the *in vitro* quantitative determination of rheumatoid factors in human serum and plasma on Konelab analysers. All test results must be interpreted with regard to the clinical context.

**SUMMARY (1, 2)**

Rheumatoid arthritis (RA) is a common disease (1 - 2% of adult population) and can present at any age and involve any joint. It manifests as a symmetrical synovitis, mostly of the hands and feet, accompanied by tenosynovitis. During the course of illness, destructive joint changes frequently develop with deformations and progressive functional impairment. The diagnosis of RA is made on clinical grounds. Patients with rheumatoid arthritis fall into two groups: 20 % with moderate disease, who lack rheumatoid factor and a larger group (80 %) with more aggressive disease, who have rheumatoid factor. Rheumatoid factor is of more value in prognosis than in diagnosis. RF often precede the onset of the illness, sometimes by many years. The risk of RF positive healthy individuals contracting RA is stated to be 5-40 times higher than in RF negative individuals. Rheumatoid factor refers to the immunoglobulin M antibody, which binds aggregated IgG as its antigen.

**PRINCIPLE OF THE PROCEDURE**

The method is based on the reaction between rheumatoid factors and microparticles coated with human immunoglobulins G. Specific RF 2 reagent is added to a buffered sample. The increase in turbidity caused by agglutination is recorded when the reaction has reached its end-point. The change in absorbance at 540 nm is proportional to the amount of rheumatoid factors in solution.

**REAGENT INFORMATION**

RF 2 Reagent 2 x 6 ml  
 RF 2 Buffer 1 x 60 ml  
 Specimen diluent, N04843 1 x 60 ml  
 RF 2 Calibrator 2 x 1 ml

**Concentrations**

RF 2 Reagent (lyophilized): Microparticles coated with human IgG  
 NaN<sub>3</sub> 1 - <2.5 %  
 RF 2 Buffer: Tris 0.05 mol/l  
 NaN<sub>3</sub> <0.1 %  
 Specimen diluent: PBS 0.01 mol/l  
 NaN<sub>3</sub> <0.1 %  
 RF 2 Calibrator: Human  
 NaN<sub>3</sub> <0.1 %

The RF concentration of the calibrator is printed on a separate Value sheet.

**Precautions**

*In vitro* diagnostic use only.  
 Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents. The calibrator has been tested, and found negative for HBsAg and for antibodies to HIV 1/2- and HCV. However, the product must be handled just as carefully as the patient specimens.  
 The lyophilized RF 2 Reagent contains sodium azide as preservative (1 - <2.5 %). Avoid inhaling of dust. Do not swallow. Avoid contact with skin and mucous membranes. If contact occurs, wash with copious quantities of water. Sodium azide may react with lead and copper in plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal flush with large volumes of water. See separate sheet for risk and safety phrases (T,R,23/24/25 - 52/53 S,22-28-45).  
 After reconstitution the liquid RF 2 Reagent contains sodium azide < 0.1% which is not considered as harmful concentration.

**Preparation**

Reconstitution of RF 2 Reagent: Add exactly 6 ml of distilled water. Close the vial and allow to stand for 15 minutes at room temperature. Dissolve the contents completely by swirling gently. Do not shake. Transfer the reagent to an empty barcoded vial for use in Konelab analysers.  
 Note: Check that there are no bubbles in the bottleneck or on the surface of the reagent when you insert the reagent vials or vessels in the Konelab analyser.  
 Note: Use always RF 2 Buffer, RF 2 Reagent and RF 2 Calibrator of the same reagent lot number.

**Storage and Stability**

Reagents in unopened vials are stable at 2...8 °C until the expiration date printed on the label.  
 Refer to the Application Notes of your Konelab analyser for the on board stability of reagents.  
 Once opened the reagents are stable for 6 months if stored closed at 2...8 °C when not in use and if contamination is avoided.  
 Once opened RF 2 Calibrator is stable for 2 months at 2...8 °C. Store the calibrator tightly capped when not in use. Do not use any vial that has visible evidence of microbial growth.

**SPECIMEN COLLECTION**

**Sample Type**

Serum and heparin plasma can be used.  
 Do not use EDTA plasma!

**Precautions**

Human serum samples should be handled and disposed of as if they were potentially infectious.

**Storage (3)**

The sample can be stored for 3 days at 2...8 °C or for one month at - 20 °C.

**TEST PROCEDURE**

Refer to the Reference Manual and Application Notes for an automated procedure on your Konelab analyser. Any application which has not been validated by Thermo Fisher Scientific Oy cannot be performance guaranteed and therefore must be evaluated by the user.

**Materials provided**

Reagents and calibrator as described above.

**Materials required but not provided**

RF Control as indicated below.

**Calibration**

Use RF 2 Calibrator included in the kit according to the instructions given to your Konelab analyser. Let the calibrator be max. for one hour on the analyser.

**Traceability:**

Primary reference: 1<sup>st</sup> British Standard 64/002.

**Quality Control**

Use quality control samples at least once a day and after each calibration and every time a new bottle of reagent is used.

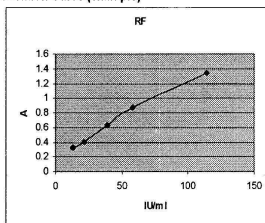
**Available control:**

RF Control, code: 981252  
 The Control intervals and limits must be adapted to the individual laboratory requirements. The results of the quality control samples should fall within the limits pre-set by the laboratory.

**CALCULATION OF RESULTS**

The results are calculated automatically by the Konelab analyser using a calibration curve. The analyser prepares automatically a dilution series from the stock calibrator according to the pre-set parameters. The calibration curve is generated from the measured calibrators using the spline fit.

**Calibration Curve (example)**



Konelab 20/30/60. The calibration curve is lot dependent.

**LIMITATIONS OF THE PROCEDURE (5)**

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

**Interference**

**Criteron:** Recovery within ± 10% of initial values.  
 Bilirubin: No interference found up to 1000 µmol/l (58 mg/dl).  
 Hemoglobin: No interference found up to 3 g/l.  
 Lipemia: No interference found up to 1 g/l of Intralipid® (trademark of Fresenius Kabi AB).  
 There is a poor correlation between turbidity and triglycerides concentration.

Heterophilic antibodies and monoclonal immunoglobulins (or parts of them) may interfere with the assay. Results from patients suspected of having such antibodies should be carefully evaluated (6).  
 For other interfering substances, please refer to the reference 4.

**Antigen excess**

No antigen excess is found up to a RF concentration of 4000 IU/ml (highest concentration tested).

**EXPECTED VALUES (5)**

Below 15 IU/ml  
 The quoted values should serve as a guide only. It is recommended that each laboratory verify this range or derives a reference interval for the population that it serves.

**MEASURING RANGE**

15 - 110 IU/ml  
 Extended measuring range after secondary dilution:  
 15 - 440 IU/ml

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS (5)**

The results obtained in individual laboratories may differ from the given performance data.

**Determination limit**

The determination limit is the lowest concentration that can be measured quantitatively: 15 IU/ml.

**Imprecision (result unit IU/ml)**

	Mean 26 IU/ml		Mean 60 IU/ml	
	SD	CV%	SD	CV%
Within run	0.22	0.8	0.40	0.7
Between day	0.69	2.6	0.22	0.4
Total	0.75	2.9	0.57	0.9

The precision study was performed using CLSI (former NCCLS) Document EP5-A as a guideline with two Konelab 60 analysers and one reagent lot for 10 days, with the number of measurements being n = 40.

© 2007 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. Template: D01162\_4



**Calibration parameters RF 2**

Calibration type	NONLINEAR
Repeat time (d)	7
Points/Calibrator	Single
Acceptance	MANUAL
Type of calibrators	SERIES
Curve direction	ASCENDING
Calibrator id	
Concentration	
Dil. ratio 1 +	

Factor	
Abs. error (mA)	10
Rel. error (%)	10
Response limit (mA)	
Min	*
Max	*

Calibrator	Conc. (µA)	Dil. ratio 1 +
RF 2 Cal	115	8
RF 2 Cal	115	4
RF 2 Cal	115	2
RF 2 Cal	115	1
RF 2 Cal	115	0

Bias	
Bias correction in use	NO
Bias corr. repeat time (dd:hh)	
Bias corr. limit (mA)	
Total	
Incremental	
Bias cal. id	

**Test flow RF 2**

Blank	YES	NO	Normal cuvette
Antigen excess			
Reagent	Sample and dilution	Incubation	Blank
RF 2 BUF	Volume (µl) 20	Time (sec.) 200	Resp. min *
Volume (µl) 110	Raw S. disp. with WATER	Reagent	Reagent
Disp. with EXTRA	Volume (µl) 35	Volume (µl) 30	Volume (µl) 30
Volume (µl) 20	Special dil. SPEDIL	Disp. with WATER	Disp. with WATER
Wash reagent NONE	Dilution with Special dil. EXTRA	Volume (µl) 20	Volume (µl) 10
	Wash reagent NONE	Volume (µl) 20	Wash reagent NONE

Incubation	Incubation	End point
Time (sec.) 420	Time (sec.) 420	Wavelength (nm) 540
		Side wavel. (nm) NONE

Meas. type	FIXED TIMING
------------	--------------

**Konelab™ / T Series RHEUMATOID FACTORS 2 (RF 2) - code: 981920, 981942**

Check the reagent insert for the specific information of the reagent(s), calibrator(s) and control(s).

☒ Determination limit (measuring range low)

☑ Value is lot dependent, refer to the calibrators value sheet.



CE-marked application for Konelab / T Series by Thermo Fisher Scientific Oy, applicable for use outside the US.  
T Series is distributed by Siemens Medical Solutions Diagnostics in selected countries.

Anti-MCV-kitillä määritettyjen rinnakkaisnäytteen potilasnäytteiden absorbanssit aallonpituudella 450 nm.

<b>Rinnakkaisnäyte 1</b>	<b>Rinnakkaisnäyte 2</b>
<b>A 450nm</b>	<b>A 450nm</b>
0,180264	0,167967
0,158986	0,158652
0,196552	0,196131
0,174046	0,153371
0,152155	0,150158
0,186851	0,179763
0,179702	0,173724
0,163999	0,167613
0,161194	0,179341
0,167066	0,147989
0,168031	0,167294
0,154849	0,161982
0,169109	0,165986
0,204719	0,210863
0,284775	0,212514
0,158331	0,172174
0,181192	0,177852
0,216499	0,199496
0,159602	0,143521
0,158394	0,174432
0,162443	0,129651
0,146369	0,152141
0,174913	0,147315
0,157532	0,154171
0,144021	0,153491
0,145609	0,175978
0,129718	0,132467
0,147718	0,143152
0,133341	0,143912
0,130832	0,133722
0,104171	0,104726
0,138693	0,128221
0,197981	0,208511
0,143934	0,161479
0,151693	0,156368
0,154881	0,137152
0,159218	0,166428
0,146774	0,172151
0,157088	0,172493
0,150203	0,156504