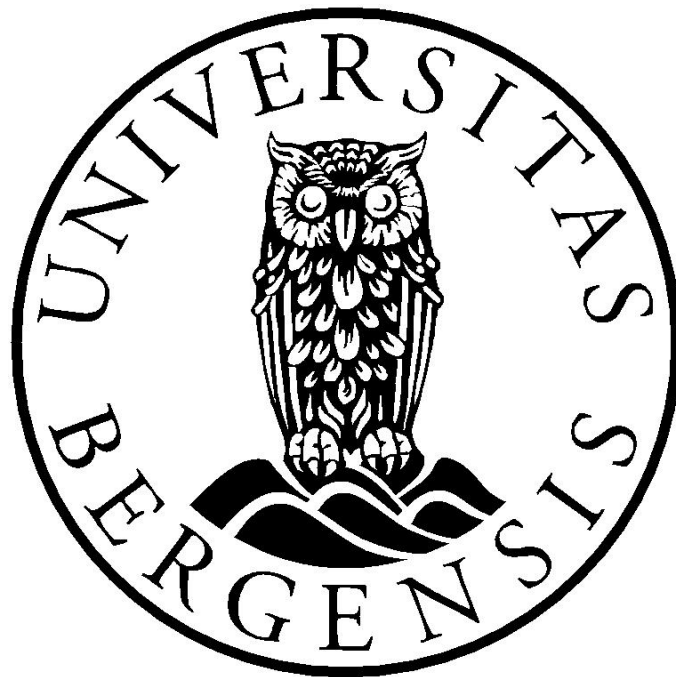


*ELISA-basert deteksjon av biomarkører i
serumprøver ved Giardia-indusert
kronisk utmattingsyndrom og
funksjonelle gastrointestinale lidinger*

*- Nivå av B-cell activating factor og antistoff mot
cytotoxic distending toxin B og flagellin hjå personar
med langvarige plager etter Giardia-utbrotet i Bergen*

Masteroppgåve i farmasi
Maren Anita Aaland



Senter for farmasi og Klinisk institutt 2
Universitetet i Bergen
Mai 2017

Forord

Arbeidet med denne masteroppgåva er utført ved Klinisk institutt 2 og Senter for Farmasi ved Universitetet i Bergen, studieåret 2016/2017.

Det har vore eit utfordrande, lærerikt og kjekt studieår, der eg har fått moglegheit til å jobbe med eit spennande og aktuelt tema. Eg er takksam for alle menneska eg har møtt og kunnskapen dei har lært meg.

Først vil eg takke min hovudrettleiar, Kurt Hanevik, for hjelp og rettleiing gjennom heile prosjektet, frå planlegging og gjennomføring, til analyse, forståing og skriving. Så vil eg takke min birettleiar, Christina Skår Saghaug, for hjelp også gjennom heile masterprosjektet, for tekniske ferdigheiter og for tips og råd. Det har vore inspirerande å jobbe med to så fagleg dyktige og kunnskapsrike personar, og eg set pris på tolmodet dei har vist i rettleiinga.

Takk til Steinar Sørnes for hjelp med det praktiske på lab og for diskusjonar om metoden. Det er kjekt å arbeide med personar som er så villige til å lære vekk av kunnskapen dei sit med.

Eg vil også takke Torunn og Karl Erik for råd om gjennomføring av metoden, og til Sarah og Anders for råd, diskusjon og hjelp til forståing av «endpoint titer».

Så vil eg takke dei deltakande personane som utgjer studiepopulasjonen og det tidlegare forskingsarbeidet gjort etter *Giardia*-utbrotet i Bergen. Dette har vore grunnlaget for arbeidet med mitt masterprosjekt. I tillegg vil eg takke Senter for Farmasi for tildeling av midlar til prosjektet, då dette har gjort det mogleg å kjøpe material eg har trengt for undersøking av serumprøver.

Eg vil takke farmasi kull 12 for ei fin og minnerik studietid. Eg har blitt kjent med mange kjekke personar, og fått vennskap eg vil ha livet ut.

Til slutt vil eg rette ein stor takk til vennar og familie. Ein spesiell takk til mine sysken, mamma og pappa som alltid har hjelpt meg, hatt trua på meg og støtta meg.

Bergen, mai 2017

Maren Anita Aaland

Forkortingar

A4-Fla2	Ein type flagellinmonomer
Anti-CdtB	Antistoff mot cytolethal distending toxin B
APC	Antigenpresenterande celler
BAFF	«B-cell activating factor»
BAFF-R	«B-cell activating factor»-reseptor
BBS	Borat-buffer
BCMA	B-cellemodningsantigen
BSA	Bovine serum albumin
CFS	Kronisk utmattingssyndrom («chronic fatigue syndrome»)
CD	Crohns sjukdom
CDR	«Calibrator Diluent RD6Q»
CV	Variasjonskoeffisient
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	«Enzyme-linked immunosorbent assay»
Fab-region	Antigenbindande region
Fc-region	Tung kjede av antistoffet. Bind til Fc-reseptorar
FGID	Funksjonelle gastrointestinale lidningar («functional gastrointestinal disorders»)
Fla-x	Ein type flagellinmonomer
Ig	Immunglobulin
HRP	«Horseradish peroxidase»
IBD	Inflammatorisk tarmsjukdom («inflammatory bowel disease»)
IBS	Irritabel tarmsyndrom («irritable bowel syndrome»)
IBS-A/IBS-M	Blanding av dei ulike subtypane IBS (både diaré og forstopping)
IBS-C	Forstoppelses-dominerande IBS
IBS-D	Diaré-dominerande IBS
IL	Interleukin (signalprotein)
ICF	Idiopatisk kronisk utmatting
IFN (α , β , γ)	Interferon
IQR	Interkvartilbreidde
LPS	Lipopolysakkarid
ME	Myalgisk encefalomyelitt
MHC	Vevsforlikelegheitskompleks («major histocompatibility complex»)
NK-celler	Naturlege dreperceller
OD	Optisk tettleik
PBS	Fosfat buffer saltvatn
PI-IBS	Postinfeksiøs irritabel tarmsyndrom
REK	«Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk»
Rpm	Omdreiningstal («rounds per minute»)
SD	Standardavvik
SOP	«Standard operating procedure»
TAC1	Transmembranaktivator og kalsiummodulerande og cyklofilinligandinteraktor
TCR	T-cellerreseptorar
TGF	«Transforming growth factor»
TLR	Toll-like reseptor
TMB	3,3',5,5'-Tetrametylbenzidine (substrat)
TNF	Tumor-nekrosefaktor (cytokin)
T _{reg}	Regulatoriske T-celler
UC	Ulcerøs kolitt

Samandrag

Bakgrunn: Parasitten *Giardia lamblia* forureina drikkevasskjelda Svartediket i Bergen hausten 2004, og var årsaka til eit stort utbrot av giardiasis i menneske. Denne gastrointestinale infeksjonen blei for mange starten på langvarige mageplager og utmatting. Seinare innfridde mange av desse pasientane Roma II-kriteria for irritabel tarmsyndrom (IBS) og nokre fekk også klinisk påvist kronisk utmattingssyndrom (CFS). Desse lidningane manglar biomarkørar i diagnostiseringa, og blir omtalte som funksjonelle lidingar. Pasientane må ofte gjennom ei rekkje undersøkingar for å ekskludere andre organiske sjukdomar. Det vil vere ein stor fordel, både for samfunnet og pasientane, om ei enklare diagnostisering ved bruk av ein biomarkør blir funnen. Markørane «B-cell activating factor» (BAFF), antistoff mot «cytolethal distending toxin B» (anti-CdtB) og antistoff mot flagellin (anti-flagellin) er tidlegare sett på i liknande sjukdomsgrupper, men treng vidare undersøking.

Hensikt: Undersøke nivået av BAFF, anti-CdtB og anti-flagellin og deira potensial som biomarkørar i pasientar med kronisk utmattingssyndrom/ideopatisk kronisk utmatting (CFS/ICF), funksjonelle gastrointestinale lidingar (FGID), irritabel tarmsyndrom (IBS) og diaré-dominerande irritabel tarmsyndrom (IBS-D) etter *Giardia*-infeksjon. I tillegg ønskjer ein å undersøke korleis fryse-tine-syklusar påverkar konsentrasjonen av BAFF i serumprøver.

Metode: Ein studiepopulasjon på totalt 102 personar med dei ulike sjukdomane CFS/ICF, FGID, IBS og IBS-D, samt kontrollar eksponerte og ueksponerte for *Giardia*, er undersøkte opp mot kvarandre. Nivået av markørane er analysert ved bruk av «enzyme-linked immunosorbent assay» (ELISA), der direkte OD-verdiar (optisk tettleik) er oppgitt som resultat for anti-CdtB og anti-flagellin, medan det for BAFF er oppgitt utrekna konsentrasjon. BAFF-degradering blei òg analysert med ELISA, etter at serumprøvene var fryst-tint éin, tre og seks gonger.

Resultat: Der var ingen signifikante forskjellar for dei tre markørane mellom sjukdomsgruppene og kontrollgruppene. Undersøking av BAFF-konsentrasjonen i serumprøver fryst-tint fleire gonger viste signifikante forskjellar mellom prøver fryst-tint éin gong og tre gonger, samt mellom éin gong og seks gonger.

Konklusjon: Resultata i prosjektet gjev ikkje grunnlag til å tru at dei tre undersøkte biomarkørane kan nyttast for å skilje pasientar med FGID eller CFS frå friske personar. Vi diskuterer svakheiter i metoden som kan ha bidrege til at vi fekk eit anna resultat enn publikasjonane vi tok utgangspunkt i. Resultata for undersøking av BAFF i serum etter gjentekne fryse-tine-syklusar tyder på at ei degradering av cytokinet skjer.

Innholdsliste

Forord	III
Forkortingar	IV
Samandrag	V
Innholdsliste	VI
1.Introduksjon	2
1.1 Immunsystemet	2
1.1.1 Antigen	2
1.1.2 Det medfødde immunsystemet	2
1.1.3 Det erverva immunsystemet	3
1.1.4 Tarmimmunsystemet	5
1.1.5 Okkulerande celleforbindingar («tight junctions»)	7
1.1.6 Lekk tarm.....	7
1.2 <i>Giardia lamblia</i>	8
1.2.1 Livssyklus	9
1.2.2 Giardiasis – diagnostisering og behandling	10
1.2.3 Forsvaret mot <i>Giardia</i>	11
1.2.4 Tarmdysfunksjon.....	11
1.3 Kronisk utmattingsyndrom (CFS)	12
1.3.1 Årsaker til CFS	12
1.3.2 Diagnostisering	13
1.3.3 Fukuda-kriteria	13
1.4 Funksjonelle gastrointestinale lidningar (FGID).....	14

1.4.1 Roma-kriteriet	14
1.4.2 Irritabel tarmsyndrom (IBS)	15
1.4.3 Overlapping mellom kronisk utmattingsyndrom (CFS) og irritabel tarmsyndrom (IBS)	16
1.5 Biomarkører.....	17
1.5.1 B-cell activating factor (BAFF)	17
1.5.2 Antistoff mot cytolethal distending toxin B (anti-CdtB)	19
1.5.3 Antistoff mot flagellin (anti-flagellin)	21
1.5.4 Oversikt over artiklane nemnde for dei tre markørane	22
1.6 Bakgrunn og mål for prosjektet.....	23
1.6.1 Bakgrunn	23
1.6.2 Mål med prosjektet – hovudmål og delmål	24
2. Material	26
2.1 Studiepopulasjon	26
2.1.1 Bakgrunnen til studiepopulasjonen i prosjektet	26
2.2 Material brukt til analyse av dei tre markørane	28
2.2.1 Serumprøve	28
2.2.2 Generelt utstyr	28
2.2.3 Anti-CdtB og anti-flagellin	29
2.2.4 BAFF	31
2.2.5 Programvarer	31
3. Metode	34
3.1 Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA	34
3.2 Pilotstudie for å finne passane serumkonsentrasjon å bruke i undersøkinga av anti-CdtB og anti-flagellin	35
3.3 Alikvotering.....	36

3.4 Framgangsmåten til BAFF.....	36
3.5 ELISA-prosedyre for anti-CdtB og anti-flagellin	37
3.6 Plateoppsett, stratifisering av prøver	39
3.7 Effekt av fryse-tine-syklusar	40
3.8 CV % - fjerning av varierende prøver.....	40
3.9 Statistisk styrke og utvalgsstørrelse-kalkulering	40
3.10 Formlar	42
3.11 Dataanalyse	42
3.12 Etikk	42
4. Resultat.....	44
4.1 Studiepopulasjon	44
4.2 Pilotstudie av serumkonsentrasjon for anti-CdtB og anti-flagellin	45
4.3 Resultatet av biomarkørane BAFF, anti-CdtB og anti-flagellin	46
4.3.1 BAFF	46
4.3.2 Anti-CdtB	47
4.3.3 Anti-flagellin	47
4.4 Effekt av fryse-tine-syklusar	48
4.5 Kontrollprøver på platene for anti-CdtB og anti-flagellin	49
5. Diskusjon.....	52
5.1 Metode	52
5.1.1 Generelt	52
5.1.2 «Kanteffekt» på ELISA-platene.....	54
5.1.3 Bakgrunnssignal	54
5.1.4 Serumprøver.....	54
5.1.5 Fargeutvikling og måling av absorbanse	55

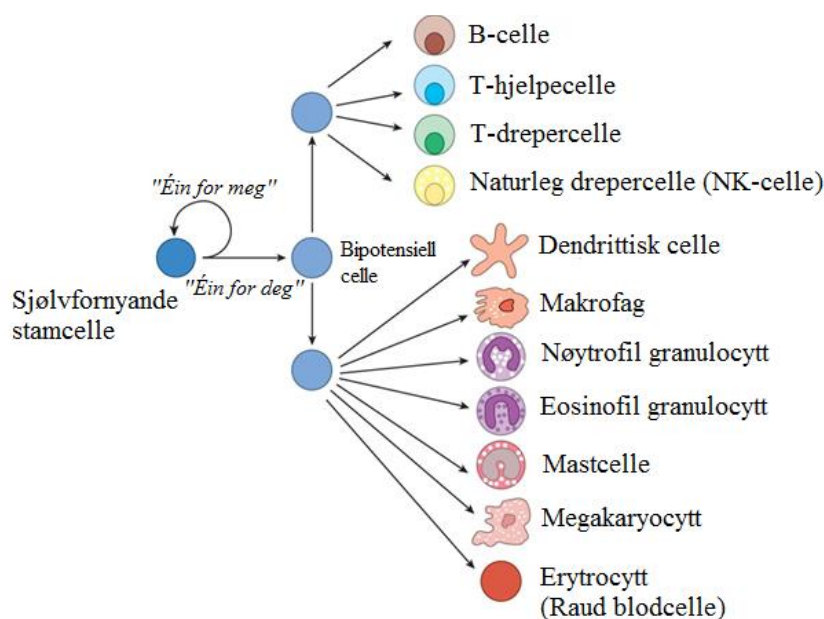
5.1.6 Plateforskjellar	56
5.1.7 Metode for å unngå plateforskjell	57
5.1.8 Serumkonsentrasjon til anti-CdtB og anti-flagellin (pilotstudie)	59
5.1.9 Studiepopulasjon	59
5.2 Resultat	60
5.2.1 BAFF.....	60
5.2.2 Anti-CdtB.....	61
5.2.3 Anti-flagellin	62
5.2.4 «Cutoff»-verdiar	63
5.2.5 Effekt av fryse-tine-syklusar	64
5.2.6 Avgrensingar/svakheiter med studien	64
5.2.7 Bakgrunnsteori i forhold til resultat	66
5.3 Konklusjon.....	67
5.4 Vidare forskning / framtidige perspektiv	68
Referansar	70
Vedlegg 1: «Fatigue skjema (Chalder)»	X
Vedlegg 2: «Funksjonelle mageplager – diagnostikk og kvantitering (Roma II +)»	XI

1.Introduksjon

1.1 Immunsystemet

Immunsystemet består av to delar; det medfødde og det erverva. Begge systema er viktige i forsvaret mot invaderande mikroorganismar [1].

Cellene i immunsystemet utviklar seg frå stamceller i beinmergen gjennom fleire trinn (figur 1.1). Når ei stamcelle veks og delar seg til to dotterceller, går éi av dottercellene tilbake til å vere stamcelle, medan den andre går vidare til å bli moden blodcelle. Etter gjentekne delingar, blir cellene differensiert i ulike retningar. Kva blodcelle den eine stamdattercella blir er nøye kontrollert, slik at ein alltid har nok av kvar type blodcelle [1, 2].



Figur 1.1. Blodcellene utviklar seg frå stamceller i beinmergen. Adaptert frå [1].

1.1.1 Antigen

Antigen er substansar som stimulerer til immunrespons, og kan vere både framande antigen (mikroorganismar) eller autoantigen (stammar frå kroppen) [3]. Den delen av proteinet eller antigenet som er i stand til å stimulere immunsystemet kallast ein epitop. Det er denne delen som bind til eit bestemt antistoff, og bindinga skjer berre dersom deira strukturar er komplementære. Mange antigen kan ha fleire forskjellige epitopar på overflata, som alle er i stand til å binde til forskjellige antistoff. Forskjellige antigen kan også ha epitopar til felles, noko som gjer at antistoff kan binde til forskjellige antigen (kryssreaksjon) [4].

1.1.2 Det medfødde immunsystemet

Det medfødde immunforsvaret er det første forsvaret mot infeksjonar og trer raskt i funksjon.

Det består av barrierar hud og epitelceller i slimhinner dannar mot mikrobar, samt komplementsystemet, fagocytter og naturlege dreperceller (NK-celler) [1].

Komplementsystemet består av rundt 20 ulike protein, produsert i hovudsak i levera. Systemet jobbar raskt når det har blitt aktivert, og effektane systemet kan utøve er auka fagocytose, celledød, inflammasjon, kjemotakse og aktivering av B-celler. Eitt av komplementproteinerna verkar som opsonin, og aktivering av dette komplementproteinet koplar bakteriar til fagocyterande celler. Komplementsystemet kan i tillegg aktivere poredannande komplementfaktorar som innsettast i bakteriemembranen, noko som kan føre til celledød [1, 2, 5].

Den andre delen av det medfødde immunsystemet er fagocytane, der makrofagar og nøytrofile granulocytter er dei viktigaste. Makrofagane er lokalisert under overflata av barrierar i kroppen som er utsette for mikrobielle infeksjonar, der «et» dei døde celler og inntrengande patogen. Når dei er aktiverte kan dei presentere antigen til T-celler og produsere tumornekrosefaktor (TNF) som kan drepe kreftceller og virusinfiserte celler. Makrofagane aktiverer andre delar av immunsystemet ved å produsere signalprotein kalla interferon (IFN), der blant anna IFN- α og IFN- β er viktige ved virusinfeksjonar [1]. Nøytrofile granulocytter kan ved hjelp av signalprotein (interleukin-8, IL-8) og cellulære adhesjonsmolekyl (intercellulær adhesjonsmolekyl-1, ICAM-1) i blodåra, forlate blodårane, bli aktiverte og erobre inflammasjonsstaden for å «ete» bakteriar med nedslag av antistoff og komplement [1, 5].

Naturlege dreperceller, NK-celler, er celler som også sirkulerer i blodet og kan øydeleggje infiserte celler. Dei kan også frigje cytokin (IFN- γ) som kan påverke både det medfødde og erverva immunsystemet [1].

1.1.3 Det erverva immunsystemet

Det erverva immunsystemet, også kalla det spesifikke immunsystemet, blir aktivert og utvikla i kontakt med mikrobar. Det erverva immunsystemet består av antigenpresenterande celler (APC) og lymfocytter, som kan delast i to typar; B-celler og T-celler [5].

APC er spesielle celler som har høge nivå av MHC-protein («det viktigaste vevsforlikelegheitskompleks», engelsk: «major histocompatibility complex»). MHC kan delast inn i klasse I og II, og saman med et kostimulerande molekyl, kan T-celler bli aktiverte av APC. Aktiverte dendritiske celler, aktiverte makrofagar og aktiverte B-celler er dei tre typane av APC ein kjenner til. Dei viktigaste av desse er dei dendritiske cellene då dei kan aktivere naive T-celler [1]. Forutan erytrocyttar, kan alle cellene i kroppen utrykke MHC-klasse I-molekyl [5].

1.1.3.1 T-celler

T-cellene har opphav frå stamceller i beinmergen og utviklar seg i organet thymus. På overflata av cellene har dei T-cellerreseptorar (TCR). Når desse reseptorane bind til antigen, delar cellene seg til mange T-celler med same spesifisitet. Reseptorane reagerer med korte peptidfragment frå antigen presentert av MHC-molekyl på andre celler. Når T-cellene er blitt aktiverte kan dei lage cytokin passande til motangrep på mikroben eller dei kan øydeleggje infiserte celler ved å setje i gong apoptose [1, 5].

Dei tre hovudtypane av T-celler er; T-dreperceller, T-hjelpecelle (T_h -celle) og regulatoriske T-celler (T_{reg}). T-drepercellene kan øydelegge virusinfiserte celler. T_h -celler produserer cytokin som interleukin (IL)-2 og IFN- γ , som har sterk påverknad på andre immunceller, som B-celler, makrofagar. T_{reg} -celler skal hindre immunsystemet i å overreagere, men mange detaljar er fortsett ikkje heilt kartlagt [1, 6].

1.1.3.2 B-celler

B-cellene dannast i beinmergen, der dei utviklar reseptorar for antigen i cellemembranen. Desse antistoffa som er festa i cellemembranen blir kalla B-cellerreseptorar.

Fordi reseptorane blir danna av tilfeldig organisering av gensegment, får ein eit stort potensial for variasjon. Det er mogleg med eit mangfald på 100 millionar B-celler, der alle har moglegheit til å lage forskjellige antistoff [1, 5].

Kvar B-celle har omlag 100 000 av éin unik B-cellerreseptor på overflata, som alle kjenner att det same antigenet. Når B-cellerreseptoren bind til epitopen på eit antigen, doblar cella seg i størrelse og delar seg i to dotterceller. Forstørringa og celledelinga gjentek seg til det har blitt produsert om lag 20 000 identiske B-celler, noko som er tilstrekkeleg for eit skikkeleg forsvar [1, 5].

B-cellene kan anten bli antistoffproduserande plasmaceller eller hukommelses B-celler. Kortliva plasmaceller dør etter 1-2 veker etter møte med antigen, og er ein kortvarig beskyttelse. Dei B-cellene som differensierast vidare i kimsenter (sekundært lymfeorgan), vandrar til beinmergen og kan overleve i fleire år. Desse har ein langvarig antistoffproduksjon som gjev vedvarande beskyttelse. Ved eksponering av antigen for andre gong vil det føreligge fleire antigenspesifikke B-celler som utviklar seg til plasmaceller med utskiljing av høgpotent antistoff som reagerer raskt på antigenet [1, 5].

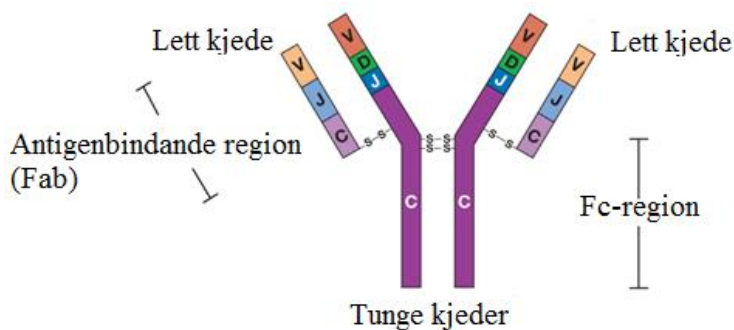
1.1.3.3 Antistoff

Mange av B-cellene som blir danna etter antigenbinding på B-cellerreseptoren, vil starte å lage antistoff. Antistoff, eller immunglobulin (Ig), er glykoprotein [2]. Antistoffa danna av

plasmacellene manglar den proteinsekvensen i enden av den tunge kjeda som gjer at reseptorane sit fast i cellemembranen. Dermed blir desse antistoffa transporterte ut av cellene og ut i sirkulasjonen [1, 5]. Figur 1.2 viser illustrasjon av eit antistoff.

B-celler som ikkje har blitt aktivert gjennom binding til antigen, naive B-celler, kan bli aktiverte anten gjennom T-celle-avhengig aktivering eller gjennom T-celle-uavhengig aktivering. I T-celle-avhengig aktivering krevst kryssbinding av B-cellerreseptorane, samt eit kostimulerande signal, vanlegvis gitt av T_H -cellene. Ved T-celle-uavhengig aktivering må ei stor mengd av B-cellerreseptorane vere krysslinka, i tillegg må cella bli kostimulert av eit faresignal, som for eksempel av toll-like reseptorar (TLR) på makrofagar som varslar fare [1, 7].

Under danninga av antistoff har B-cella moglegheit til å produsere fire forskjellige antistoffklassar; IgM, IgA, IgG og IgE. Når B-celler er aktiverte, produserer dei i hovudsak IgM antistoff (primærrespons). Etter kvart som cella modnast etter aktivering, kan cella skifte klassa av antistoff den dannar til IgG, IgE eller IgA. Dette er fordi det blir kutta DNA i gensegmentet i Fc-regionen til antistoffet. Den antigenbindande regionen blir verande den same. Fordi antistoffgruppene har ulik Fc-region, vil dei binde til forskjellige reseptorar og ha ulik funksjon. I blodet er IgG den antistoffgruppa det er mest av [1].



Figur 1.2. IgG antistoff med dei to antigenbindande områda, her vist med gensegmenta. Oppgåva til antistoff er å identifisere inntrengjarar ved å binde Fab-regionen til antigenet. Fc-regionen er fri til å binde til Fc-reseptorar på celler slik som makrofagar. Antistoffet gjer at fagocytten lettare bind til antigenet slik at det kan bli «ete» [1]. Adaptert frå [1].

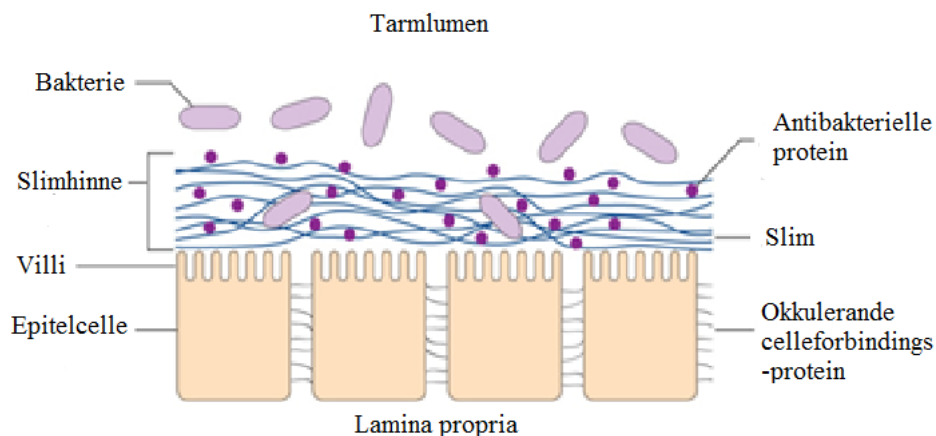
1.1.4 Tarmimmunsystemet

Ein kan sjå på immunsystemet i tarmane som eit privat immunsystem. Responsen immunceller har her er separat frå det systemiske immunsystemet. Kommensale bakteriar i tarmfloraen spelar ei viktig rolle for vern mot patogene bakteriar på grunn av utkonkurrering av tilgjengelege resursar og fysikalske forhold. [1].

Som figur 1.3 viser, er det første forsvaret ein mikrobe møter i tarmen, laget med slim

som finst utanfor epitelcellene. Slimlaget er rikt på antibakterielle protein syntetisert av tarmepitelet. Det er ei viktig barriere, då den hindrar dei fleste bakteriar i lumen tilgang til epitelet, og hemmar difor kolonisering av patogene og kommensale bakteriar. Dette er viktig fordi tarminfeksjonar vanlegvis skjer ved at bakteriar festar seg til epitelcellene. Under slimlaget finn ein tarmepitelet, beståande av celler som enterocytter, Paneth-celler og slimceller [1, 8, 9].

Innsida av tarmane, lumen, er avgrensa med eitt enkelt lag av epitelceller. Desse er kopla saman av okkulerande celleforbindingsprotein («tight-junction proteins»). Bakteriar, både kommensale og patogene, som kjem igjennom epitelbarrieren til lamina propria blir vanlegvis etne av makrofagar, som er den mest talrike immuncella i lamina propria. Dendrittiske celler, som er APC, har moglegheit til å bevege seg til lymfeknutar når dei er aktiverte, der dei kan aktivere T-celler som er spesifikke for mikroben [1]. Makrofagane i lamina propria er ulik andre makrofagar ikkje-inflammatoriske, og kallast M2 makrofagar [1, 10].



Figur 1.3. Tverrsnitt av tarmepitelet. Epitelcellene og slimlaget er viktige barrierar som skal hindre mikrobar frå tarmlumen i å passere over til vevet rundt tarmen. Adaptert frå [1].

I lamina propria er IgA den største antistoffklasse. Nokon av antistoffa blir transportert gjennom epitelcellene og frigjort inn i lumen av tarmen. IgA antistoff hindrar mikrobane i å binde seg til epitelcellene fordi dei sjølv bind seg til mikrobane. Dei kan også fange opp mikrobar som er komne over til lamina propria. Fordi Fc-delen av antistoffet ikkje bind til reseptorar på immunsystemceller, blir det ikkje skapt noko inflammasjon [1].

B- og T-celler er distribuerte gjennom heile lamina propria. Sidan IgA antistoff og lymfocyttane er på plass i lamina propria, blir responsen til å ta hand om mikrobane rask og ein avgrensar moglegheita for inflammasjon [1].

I lamina propria finst det mange T-celler, spesielt mange T_H-celler. Tarmepitelceller kan

produsere «transforming growth factor β » (TGF β) som oppmuntrar T_h-cellene til å bli induserte regulatoriske T-celler (iT_{reg}). iT_{reg} kan frigje antiinflammatoriske eller pleiotropiske cytokin, som TGF β og IL-10, og kan roe slimhinneimmunsystemet. Kommensale bakteriar bidreg også til å roe tarmene ved produksjon av kortkjeda feittsyrer (butyrate) og polysakkarid A som høvesvis påverkar T_h-celler og makrofagar, samt gjev instruksjon til T-cellene om å produsere IL-10 [1].

1.1.5 Okkulerande celleforbindingar («tight junctions»)

Opptak av næringsstoff og absorpsjon av vatn og ion gjennom epitelet skjer ved aktiv og passiv transport eller diffusjon [11]. Struktur og permeabilitet av tarmepitelet blir forandra av fysiologiske og miljømessige faktorar, som stimulering frå sjukdom eller legemiddel. Metabolittar frå mikrobar i lumen aukar barrieretettleiken for å hindre eksponering til immunceller [11, 12]. Okkulerande celleforbindingar er den viktigaste strukturelle komponenten i danninga av grunnleggande barrierefunksjon i epitelcellene [13]. Dei er multiproteinkompleks, og regulerer permeabiliteten til barrieren ved å binde epitelcellene tett saman [13, 14].

Barrierekontroll er eit resultat av interaksjonar mellom tarmfloraen, epitelceller, immunsystemet og det enteriske nervesystemet. Immunsystemet regulerer tarmbarrieren gjennom okkulerande celleforbinding-omorganisering via ulike cytokin som TNF- α , IFN- γ , IL-8 og IL-10 [11].

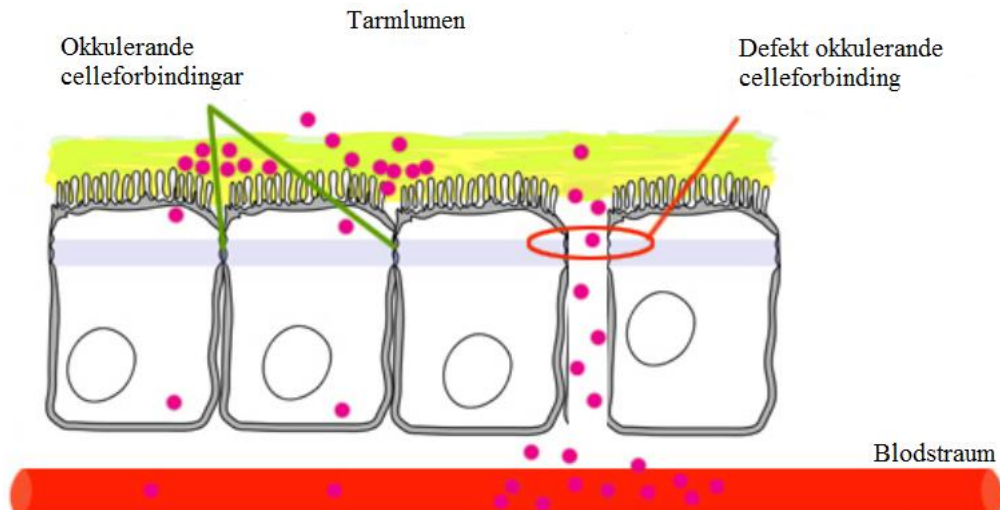
Nokon patogene mikroorganismar, både bakteriar og virus som *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* og rotavirus, kan ta kontroll over okkulerande celleforbindingar til å endre tarmbarrieren, og dermed kome over barrieren, lokke fram inflammatoriske kaskadar og forårsake diaré [15]. Parasitten *Giardia lamblia* aukar også permeabiliteten til tarmbarrieren som eit resultat av forandringar i okkulerande celleforbindingar [16].

1.1.6 Lekk tarm

Lekk tarm (på engelsk «leaky gut») er eit uttrykk for situasjonar der funksjonen til okkulerande celleforbindingar i epitelet er svekka, noko som fører til auka straum i den paracellulære ruta [17], sjå figur 1.4 for illustrasjon. Langvarig auke i permeabilitet fører til meir eksponering frå bakteriar frå lumen, noko som gjer at immuncellene kan bli overaktiverte og kan forårsake ein lavgradig slimhinnebetennelse [12]. Den auka permeabilitet er i seg sjølv ikkje ein tilstrekkeleg årsak til tarmsjukdom, sidan epitelbarrieren kan bli attrøist når stimulusen er vekke [11].

Utvikling av auka permeabilitet til sjukdom inneber ein ubalanse i oppretthaldande

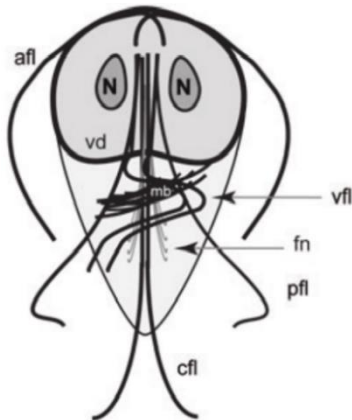
faktorar i barrieren, og immunsystemet spelar ei rolle i samanhengen mellom inflammasjon og barriere dysfunksjon [11]. Endring i tarmbarrieren er assosiert med fleire gastrointestinale sjukdomar som cøliaki, inflammatorisk tarmsjukdom (IBD) og irritabel tarmsyndrom (IBS) [11, 13, 14, 17].



Figur 1.4. Lekk tarm. Dei okkulerande celleforbindingane bind epitelcellene saman, og dannar ein barriere, open for diffusjon av væske og løysingar [18]. Når denne celleforbindinga er svekka, aukar permeabiliteten, og ein auka straum av molekyl kan kome over frå tarmlumen [17]. Adaptert frå [19].

1.2 *Giardia lamblia*

Giardia lamblia er ein flagellat mikroorganisme som kan infisere menneske og forårsake giardiasis [20], figur 1.5 viser illustrasjon av trofozoittstadiet til parasitten. Ein finn parasitten både i utviklingsland og industrialiserte land, men førekomsten av infeksjon er høgare i utviklingsland der forholda for reint vatn og hygiene er dårlegare [20, 21]. Ut av seks artar er *Giardia lamblia* den einaste som er funnen i menneske. Parasitten, også kalla *Giardia duodenalis* eller *Giardia intestinalis*, kan delast inn i åtte genotypar (assemblager), A-H, der A og B er genotypane som er påviste i menneske [20, 22, 23].

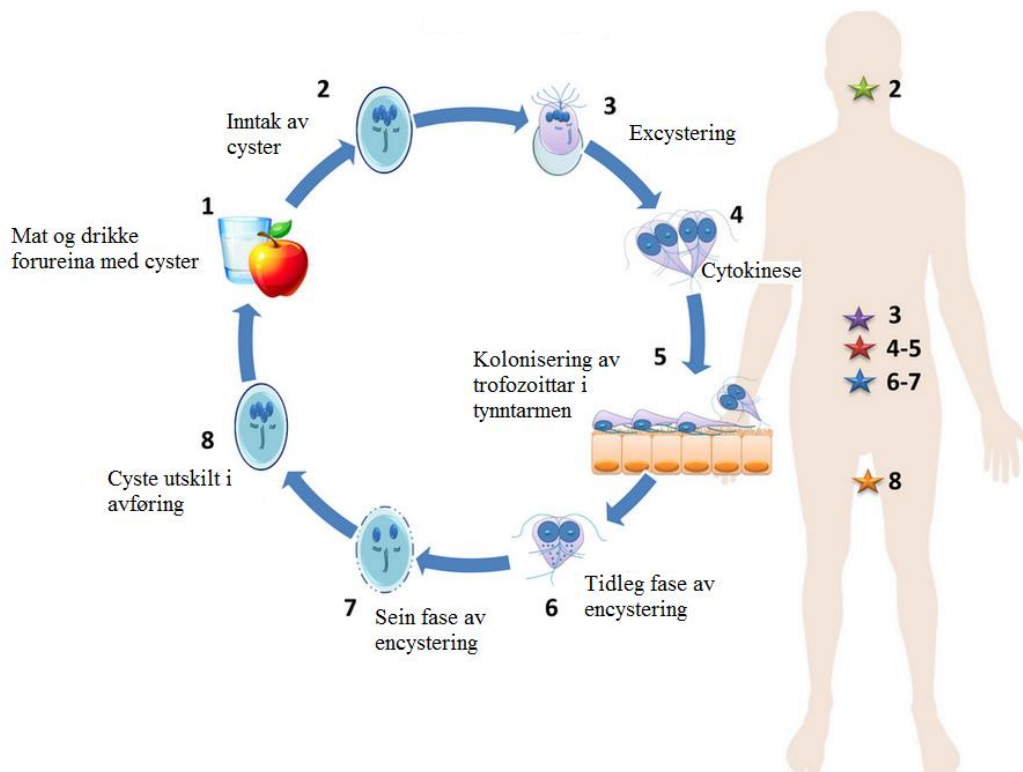


Figur 1.5 Skjematisk illustrasjon av ein *Giardia* trofozoitt. Her ser ein dei fire para med flagellar: anterior flagell (afl), posteriorlateral flagell (pfl), ventral flagell (vfl) og caudal flagell (cfl), som parasitten bevegar seg med. I tillegg visast to cellekjernar (n) og ei plate (ventral disc (vd)) som parasitten festar seg til epitelet med. Funksjonane til median body (mb) og funis (fn) er ikkje kjend [24, 25]. Adaptert frå [24].

I industrialiserte land, som USA og Storbritannia, har *Giardia* vore ei av dei vanlegaste årsakene til vassborne sjukdomar. I Noreg sjåast giardiasis som ein importert sjukdom, ved reiser til endemiske områder eller ved rutineundersøkingar av innvandrarar og flyktningar [25-27]. Bergen opplevde eit stort *Giardia*-utbrot hausten 2004. Forureining av *Giardia* genotype B i drikkevasskjelda Svartediket gjorde at mange blei smitta av giardiasis [26, 28].

1.2.1 Livssyklus

Livssyklusen, figur 1.6, til *Giardia* kan delast i to stadium; den proliferande trofozoitten og den infeksjose cysta [29]. Infeksjonen startar etter inntak av infeksjose cyster via konsumering av forureina mat eller vatn, eller direkte via fekal-oral ruta [23, 30]. Når cystene entrar magesekken og blir utsette for magesyre startar prosessen der kvar cyste blir til to trofozoittar (excystering) [23]. I tynntarmen kan trofozoittane feste seg til epitelcellene ved hjelp av ulike overflatemolekyl, og her koloniserer og replikerer dei seg utan å invadere epitelet. På grunn av miljøforandring, som endring i pH, nivå av galle og kolesterol når trofozoittane kjem lenger ned i tarmene, går dei her over til å bli meir motstandsdyktige cyster (encystering). Cystene blir frigitt i avføring, og kan infisere nye vertar [23, 30].



Figur 1.6. Cellesyklusen til *Giardia*. Trofozoittane blir også frigitt i avføringa, men overlever ikkje lenge i dette miljøet [25]. Adaptert frå [23].

1.2.2 Giardiasis – diagnostisering og behandling

Giardiasis er ei viktig årsak til diaré og overførast etter inntak av mat og vatn, forureina med *Giardia* cyster [31]. Forutan diaré (med eller utan malabsorpsjon), er kvalme, oppkast og vektnedgang dei vanlegaste kliniske symptomata. Infeksjonen kan variere frå å vere asymptomatisk, til mild infeksjon med rask betring. I nokon pasientar kan det oppstå reinfeksjonar eller kronisk diaré. Alder og tidlegare *Giardia*-eksponering er truleg viktig for grad av symptom og slimhinneinflammasjon [16, 32, 33].

Dei ulike genotypane kan gje ulik klinisk presentasjon [33]. Kronisk *Giardia*-infeksjon kan lede til komplikasjonar som irritabel tarmsyndrom (IBS), matallergiar, leddgikt eller kronisk utmattingsyndrom (CFS) [29, 31].

Giardia kan påvisast med mikroskopi, immunologiske eller molekylære metodar [34]. Tradisjonelt blir giardiasis diagnostisert gjennom identifikasjon av cyster og trofozoittar i avføring ved mikroskopi [31]. Mengda av cyster som blir utskilt i avføring varierer og er sporadisk, det er derfor anbefalt å teste tre ulike prøver over ein tidsperiode på éi veke [34].

Dei mest brukte legemiddela til behandling av giardiasis er 5-nitroimidazole-preparat, som metronidazol. Der er kjende tilfelle av behandlingssvikt og resistens, og ein leitar etter nye legemiddelmål [29].

Etter det vassborne utbrotet av *Giardia* i Bergen der om lag 2500 tilfelle blei behandla med metronidazol, hadde nokon pasientar fortsett symptom sjølv etter fleire behandlingar. Undersøkingar viste at mange av desse pasientane hadde positive *Giardia*-prøver og inflammasjon i tolvfingertarmen månadar etter infeksjonsstart. Over tid var det færre som fekk påvist *Giardia* i prøvene, men mange hadde mageplager og utmatting også etter at parasitten var effektivt behandla [28].

1.2.3 Forsvaret mot *Giardia*

Giardia er ein ikkje-invasiv parasitt og invaderer ikkje epitelcellene. Dette gjer at parasitten skapar liten eller ingen inflammasjon i slimhinna [23]. Sjølv om trofozoittane ikkje invaderer slimhinnene, kan dei likevel indusere både slimhinne- og immunresponsar [23].

Giardia-infeksjonar i personar med svekka immunforsvar er auka i intensitet og/eller varigheit i forhold til friske, noko som tyder på at immunresponsen til verten kan avgrense infeksjonen. Hemma produksjon av antistoff mot *Giardia* er truleg grunnen [32].

Det krevst både medfødde og erverva immunmeresponsar for å kvitte seg med *Giardia*-parasitten, men den fulle mekanismen er ikkje heilt forstått [23, 29]. Slim, peristaltikk i tarmene, cytotoksiske faktorar, nitrogenoksid, tarmflora, mastceller og dendrittiske celler er alle ein del av det medfødde forsvaret mot *Giardia*. Cytokinet IL-6, frigitt av dendrittiske celler modulerer B-celle modning og skifting til IgA produksjon. I tillegg sender dei signal om T-celle differensiering [23].

1.2.4 Tarmdysfunksjon

Giardia-infeksjon kan føre til svekka tarmbarriere ved å påverke epitelcellene i tarmveggen, noko som gjer at det blir danna mindre slim og enzym som kan bidra til å kjempe mot infeksjonen [23]. I tillegg til å auke permeabiliteten (løyse opp okkulerande celleforbindingar) til tarmbarrieren, kan *Giardia* forkorte mikrovilliane i tarmen. Dette er ein viktig faktor til sjukdom sidan absorpsjonsområdet blir mindre, noko som fører til malabsorpsjon av vatn, Na⁺ og disakkarid, kombinert med hypersekresjon av Cl⁻ [16, 29].

Etter *Giardia*-utbrotet i Bergen i 2004 vart mange pasientar ikkje kvitt tarmsymptoma etter effektiv medikamentell behandling av parasitten. Etter omstendeleg utgreiing konkluderte ein med at mange hadde fått postinfeksiøs irritabel tarmsyndrom (PI-IBS) (sjå kapittel 1.4.2.1) [28, 35].

1.3 Kronisk utmattingsyndrom (CFS)

Kronisk utmattingsyndrom (CFS), eller myalgisk encefalomyelitt (ME), er ein kompleks og alvorleg sjukdom med ukjend årsak [36]. Omgrepa er synonym brukte om kvarandre [37].

CFS er karakterisert av alvorleg invalidiserande utmatting som varer i lenger enn 6 månadar. Det er også assosiert med fysiske og mentale forstyrningar som hovudverk, leddssmerter, muskelverk, hukommelsessvikt, sår hals og ømme lymfeknutar [38, 39]. CFS er estimert å ha ein prevalens på 0.4 -1 % på verdsbasis, og påverkar hovudsakleg unge vaksne (mellom 20-40 år) og flest kvinner (6:1) [40].

Idiopatisk kronisk utmatting (ICF) er ein sjukdom liknande CFS, men oppfyller ikkje alle kriteria for CFS, og blir dermed sett på som ein mindre alvorleg sjukdom [41, 42]. I spørjeskjemaundersøkingar, der ein ikkje kan gjere grundig utgreiing, definerer ein kronisk utmatting som utmatting i minst seks månadar eller meir, og med ein gitt poengskår på ein validert utmattingskala (Chalder-kriteria) med 11 spørsmål [41, 43].

1.3.1 Årsaker til CFS

Ein har prøvd å forklare årsaka til sjukdomen med fleire modellar som kronisk infeksjon, endokrin dysfunksjon, autonom ubalanse, depresjon, redusert immunitet og unormal reaksjon på infeksjon [38, 41]. Ein har ingen sterke bevis som kan støtte dei føreslegne mekanismane, og ein trur årsaka består av fleire faktorar [38].

Pasientar med CFS viser seg å ha ei rekke avvik i deira immunceller, noko som kan tyde på eit underliggjande immunologisk problem. Pasientar med CFS kan ha ein underliggjande lavgradig infeksjon og dermed eit kronisk aktivert immunsystemet på grunn av dette [40].

Mange ungdomar med CFS kan oppge ein utløysande faktor, ofte ein infeksjon. For vaksne er talet lågare [39]. Kronisk utmatting har vore rapportert etter ulike bakterie- og virus infeksjonar, som Lyme borreliose, Q-feber og Ross River-virus infeksjon [41].

Tre år etter *Giardia*-utbrotet i Bergen innfridde 46 % av deltakarane Chalder-kriteria for kronisk utmatting [41, 44]. Fem år etter utbrotet blei det gjennomført strukturerte intervju og undersøkingar hjå dei pasientane som oppgav kronisk utmatting, og pasientane blei kategorisert etter Fukuda-kriteria. Ein såg at omlag halvparten av dei 53 pasientane som var inkludert i studien fortsett var utmatta og fekk diagnosen CFS/ICF [41].

1.3.2 Diagnostisering

Fråværet av ein biomarkør spesifikk for sjukdomen, gjer at diagnosen CFS er forvirrande og usikker [40, 45]. I diagnostiseringa blir det gjort fysikalske undersøkingar og diagnostiske testar for å kunne sjå vekk frå andre medisinske eller psykiatriske årsaker til kronisk utmatting. CFS kan bli diagnostisert på bakgrunn av kriterium, etter ekskludering av andre årsaker til utmattinga. [40, 45]. Der er vist betydeleg overlapping mellom CFS og funksjonelle mage-tarm lidingar (kapittel 1.3.3).

1.3.3 Fukuda-kriteria

Det finst i dag minst 20 ulike definisjonar og diagnostiske kriterium for CFS [42]. Det er ueinigheit i forhold til kva kriterium som bør bli brukt til å klassifisere pasientar med CFS [37]. Eit av dei mest brukte er Fukuda-kriteria frå 1994 [42], sjå figur 1.7, som utvikla retningslinjer til bruk i studiar av CFS, men som også er passande til bruk i klinisk praksis [46, 47]. Fukuda-kriteria krev seks av seks hovudkriterier oppfylte, samt minst fire av åtte tilleggskriterier [45].

Utredningsskjema etter CDC1994 Fukudakriteriene

Hovedkriterier (alle skal være oppfylt)

- Har en varighet på minst 6 måneder
- Er vedvarende eller tilbakevendende
- Er nyoppstått eller har en klar begynnelse
- Resultater i en vesentlig reduksjon i arbeids-, utdannings-, samt sosiale og personlige aktiviteter
- Bedres ikke av hvile
- Ikke er et resultat av pågående anstrengelse

Tilleggskriterier (minst 4 av 8 må være oppfylt)

- Selvrappertert svekkelse i korttidshukommelsen eller konsentrasjonen alvorlig nok til å forårsake vesentlig reduksjon i arbeids-, samt sosiale og personlige aktiviteter
- Hyppig og tilbakevendende sår hals
- Ømme lymfeknuder
- Muskelsmerter
- Migrerende leddsmerter uten hevelse eller rødme
- Hodepine (ny type, nytt mønster og intensitet)
- Manglende følelse av å være uthvilt etter søvn
- Forverret sykdomsfølelse i minst 24 timer etter anstrengelse

Eksklusjonskriterier iflg CDC1994 kriterier

1) Medisinske tilstander som fører til kronisk tretthet som f.eks:

- Ubehandlet/underbehandlet avt stoffskifte
- Søvnforstyrrelser
- Medikamentbivirkninger

2) Tidligere diagnostiserte medisinske tilstander uten medisinsk forsvarlig dokumentert opphør og hvor tilstedeværelsen av tilstanden kan forklare den kroniske utmattelsen. Slike tilstander inkluderer:

- Nylig behandlet kreft
- Kroniske tilfeller av hepatitt B eller C
- HIV
- Tidligere eller nåværende diagnose av
 - Alvorlig depressiv lidelse
 - Bipolar lidelse
 - Schizofreni
 - Ulike vrangforestillinger (paranoia)
 - Demens
 - Anoreksia nervosa
 - Bulimia nervosa

4) Alkohol eller stoffmisbruk fra og med de to siste år før den kronisk utmattelsen

5) Sykelig overvekt

Figur 1.7 Utgreiingsskjema etter Fukuda-kriteria for CFS/ME henta frå helsedirektoratet. Skjemaet er utarbeida av «Centers for Disease Control and Prevention» (CDC) med utgangspunkt i Fukuda-kriteria frå 1994 [41, 47]. Henta frå[48].

1.4 Funksjonelle gastrointestinale lidningar (FGID)

Funksjonelle gastrointestinale lidningar, forkorta FGID, er ei samleining for kroniske eller tilbakevendande tilstandar som ikkje har unormale strukturelle eller biokjemiske funn som kan forklare symptoma [49, 50]. Definisjonen på FGID har variert og vore upresis. Den mest aksepterte klassifiseringa er basert på Roma-kriteria og er oppdatert fleire gonger [49].

I Roma IV-komiteen blei det einigheit om følgande definisjon: «*Funksjonelle gastrointestinale lidningar (FGID) er lidingar av tarm-hjerne interaksjon. Det er ei gruppe av lidingar klassifisert av gastrointestinale symptom relatert til ein kvar kombinasjon av følgjande: motilitetsforstyrning, overfølsamt fordøyingsystem, forandra slimhinne- og immunfunksjon, forandra tarmflora, og forandra sentralnervesystem prosessering*» [51].

Klassifiseringa av FGID er primært basert på symptom heller enn fysiologiske kriterium. I framtida trur ein at biomarkørar vil bli inkludert i kriteria viss dei kan betre den prediktive verdien [51].

Irritabel tarmsyndrom (IBS), dyspepsi, forstopping og matrøyrslidningar er dei hyppigaste førekomne lidingane under FGID, det er også desse som er mest undersøkt [49].

1.4.1 Roma-kriteriet

«The Rome Foundation», som har sitt opphav på slutten av 1980-talet, samlar ekspertar frå heile verda for å utvikle retningslinjer for diagnose og behandling av FGID [51].

Pasientane som fortsett hadde magesmerter som følgje av *Giardia*-infeksjon etter utbrotet i Bergen i 2004, fekk symptoma evaluert ut frå Roma II-kriteria for FGID [35]. Figur 1.8 viser Roma II-kriteria for IBS. På grunn av etter kvart fleire publiserte studiar innan feltet, har kriteria blitt oppdatert, og finnast no som Roma IV-kriteriet [51].

ROME II DIAGNOSTIC CRITERIA
C. Functional Bowel Disorders
<p>CI. Irritable Bowel Syndrome</p> <p><i>At least 12 weeks, which need not be consecutive, in the preceding 12 months of abdominal discomfort or pain that has two out of three features:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Relieved with defecation; <i>and/or</i> 2. Onset associated with a change in frequency of stool; <i>and/or</i> 3. Onset associated with a change in form (appearance) of stool. <p><i>Symptoms that Cumulatively Support the Diagnosis of Irritable Bowel Syndrome</i></p> <ul style="list-style-type: none"> – Abnormal stool frequency (for research purposes “abnormal” may be defined as greater than 3 bowel movements per day and less than 3 bowel movements per week); – Abnormal stool form (lumpy/hard or loose/watery stool); – Abnormal stool passage (straining, urgency, or feeling of incomplete evacuation); – Passage of mucus; – Bloating or feeling of abdominal distension.

Figur 1.8. Roma II-kriteria for IBS. Desse kriteria blei brukte til diagnostiseringa av IBS-pasientane etter *Giardia*-infeksjon i forbindelse med utbrotet av *Giardia* i Bergen i 2004 [35]. Henta frå [52].

1.4.2 Irritabel tarmsyndrom (IBS)

Irritabel tarmsyndrom, forkorta IBS, er ein av dei vanlegaste funksjonelle gastrointestinale lidningane [53]. IBS er definert som ei funksjonell lidning i nedre del av mage-tarmkanalen, uttrykt som magesmerter og/eller ubehag i lag med forandra tarmfunksjon i fråværet av biokjemisk eller strukturell patologi [54]. Begrepet «ubehag» er i Roma IV-kriteria blitt fjerna sidan ein har sett at det er for lite spesifikt og har forskjellige betydingar på ulike språk [55]. IBS har i Europa og USA ei prevalensrate på 7-30 %, og rammar kvinner oftare enn menn (2:1). Dei fleste pasientane er på diagnosetidspunktet under 50 år [53].

IBS blir diagnostisert basert på kliniske symptom ved bruk av Roma-kriteriet [56]. Det er ingen gode diagnostiske testar for lidinga. Symptoma til IBS er ofte overlappande med andre mage-tarm sjukdommar. Det kan difor vere ei vanskeleg vurdering for kor mykje utgreiing som er naudsynt for å fange opp alvorlege diagnosar som krev rask gjenkjenning og behandling, i forhold til at IBS er ei vanleg og ufarleg lidning [54].

Basert på dei dominerande symptoma, kan IBS bli subgruppert inn i diaré-dominant IBS (IBS-D), forstoppelses-dominant IBS (IBS-C) og ei blanda subgruppe med både diaré og

forstopping (IBS-M eller IBS-A) [35, 54].

Kvinne, ung alder og tidlegare gastrointestinal infeksjon er dei viktigaste einslege risikofaktorane for utvikling av IBS. Det har også vore vist samlingar av IBS i familiar, truleg på grunn av genetikk og sosial læring [57].

Auka permeabilitet i tarmen er sett på som ei tidleg hending i IBS, og noko som kan lede til låg-grad immuncelle infiltrasjon i slimhinna i tarmen. Auka permeabilitet i epitelet har i hovudsak vore beskrive i PI-IBS og i IBS-D, men der er også tilfelle i IBS-C og IBS-A. Det har blitt vist auka overgang av makromolekyl frå lumen til basolateral side i tarmen, som kan kome av dei beskrivne strukturelle defektane i epitelbarrieren. Den auka permeabiliteten er knytt til diaré og alvorsgrada av smerter, som gjer at ein trur at denne mekanismen spelar ei rolle i symptomutvikling av IBS [57].

Det finst ingen effektiv førstelinje behandling for IBS, men ein kan kontrollere eller lindre symptoma ved å eliminere forverrande faktorar som legemiddel, stress eller endre kosthaldsvanar [56]. Det er behov for å finne ein god biomarkør for IBS, dette for å redusere kostnader og for å minimere unødvendige og invasive diagnostiske testar [54].

1.4.2.1 Postinfeksiøs irritabel tarmsyndrom (PI-IBS)

Symptoma til postinfeksiøse funksjonelle gastrointestinale lidingar (PI-FGID) startar med ein mistenkt eller bekrefta episode av akutt infeksiøs gastroenteritt, forårsaka av patogene mikroorganismar som for eksempel *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* eller *Giardia lamblia*. Ein av dei mest studerte fenotypane er postinfeksiøs irritabel tarmsyndrom (PI-IBS). Sannsynet for å få PI-IBS har samanheng med varigheita og alvorsgrada til infeksjonen [53, 58]. Oppfølgingsstudiar har vist at PI-IBS symptoma kan vare i inntil 8-10 år etter den utløysande infeksjonen [30, 58].

Eit spørjeskjema utsendt i 2007 vurderte magesymptoma til pasientane opp mot Roma II-kriteria. Ein høg frekvens av pasientane med magesmerter etter *Giardia*-utbrotet i Bergen, innfridde kriteria for IBS. *Giardia*-infeksjon blei derfor assosiert med IBS og funksjonell dyspepsi. Førekomsten i subgruppene til IBS viste at det var omtrent lik prevalens av IBS-D og IBS-A i pasientgruppa, medan IBS-C var uvanleg [35].

1.4.3 Overlapping mellom kronisk utmattingsyndrom (CFS) og irritabel tarmsyndrom (IBS)

Av dei med seinplager etter *Giardia*-utbrotet i Bergen blei det funnen ein høg risiko for

kombinert IBS og kronisk utmatting. Det er ikkje klart om det er unikt at denne kombinasjonen kan framkallast av *Giardia*-infeksjon, eller om det også er vanleg etter andre infeksjonar [44]. Det er truleg ein samanheng mellom IBS og CFS, då CFS-pasientar generelt har større sannsyn for å rapportere om IBS-relaterte plager. Mogleg spelar ein interaksjon mellom tarmfloraen, tarmbarrieren og immunsystemet ei rolle i patogenesen til begge sjukdomane [59].

1.5 Biomarkørar

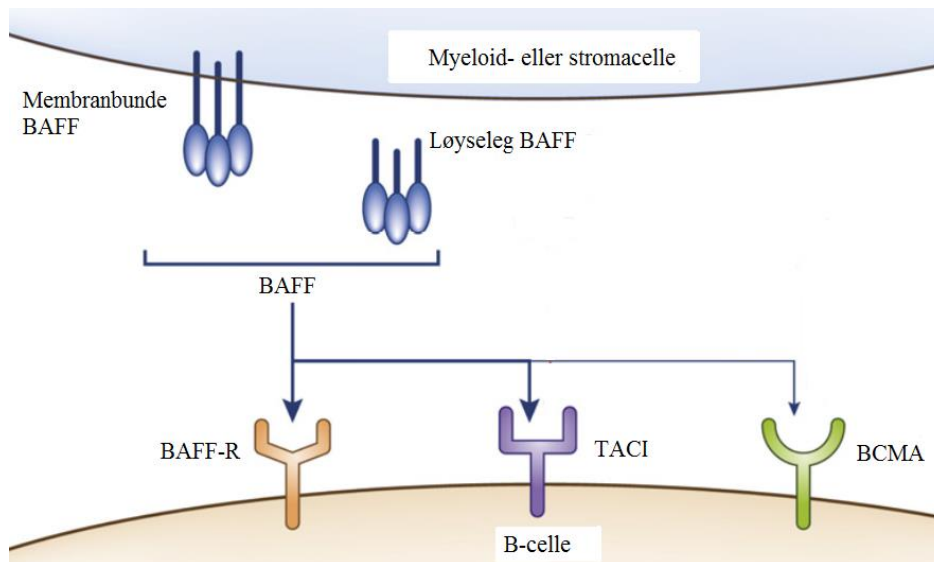
Ein biomarkør er definert som ein karakteristikk som er objektivt målt og evaluert som ein indikator for normale biologiske prosessar, patogene prosessar eller farmakologisk respons på ein terapeutisk intervensjon [60, 61].

Der er mange steg i forlaupet til ein sjukdom, frå patogenese til stadfesting av sjukdomen. Biomarkørar kan bli brukt på eit kvart punkt i forlaupet, på molekylært-, cellulært- eller organnivå [62].

Hensikta med å utvikle biomarkørar er å forbetre diagnosen, skilje diagnosen frå andre organiske sjukdomar og å skilje mellom ulike subtypar av sjukdom [60]. Det er ein stor fordel å bruke biomarkørar, fordi ein kan få informasjon tidlegare, raskare og billigare [62].

1.5.1 B-cell activating factor (BAFF)

«B-cell activating factor», forkorta BAFF, er eit cytokin av TNF-ligand superfamilien [63]. BAFF, hovudsakleg produsert av myeloide celler (monocyttar, makrofagar, dendrittiske celler) og nøytrofile granulocyttar, er avgjerande for normal B-celle utvikling og homeostase [64]. Den biologiske rolla til BAFF vert utøvd gjennom binding til reseptorar, sjå figur 1.9; B-cellemodningsantigen (BCMA), transmembranaktivator og kalsiummodulerande og cyklofilinligand-interaktor (TACI) og BAFF-reseptor (BAFF-R) [64, 65]. Dei tre reseptorane har uttrykksmønster basert på B-celleutviklingsstadiet og deira separate funksjon [64].



Figur 1.9. BAFF er eit transmembranprotein av TNF-familien som kan bli proteolytisk spalta til å danne ei løyseleg form. BAFF bind sterkt til BAFF-R og TACI, medan dei har ei svak binding til BCMA [66]. Gjennom binding til dei forskjellige reseptorane på B-celler fremmar BAFF overleving, modning og funksjon av B-cellene [64, 66]. Adaptert frå [66].

Sidan oppdaginga av BAFF i 1999 har BAFF blitt omfattande undersøkt, spesielt innan autoimmunitet der BAFF spelar ei nøkkelrolle [67].

1.5.1.1 Bakgrunn for undersøking av BAFF

Auka nivå av BAFF er rapportert i allergiske sjukdomar (t.d. astma) og autoimmune sjukdomar som revmatoid artritt, systemisk lypus erythematosus (SLE) og Sjøgrens syndrom, i tillegg til B-celle malignitetar [64, 68]. Desse sjukdomane har vore forbunde med feilregulert uttrykk eller funksjon av BAFF. Høge nivå av BAFF ved kroniske inflammatoriske prosessar tydar på at BAFF kan vere involvert i å kontrollere framdrifta av sjukdomen. I mus er det blitt vist at overuttrykking av BAFF induserer ei dramatisk utviding av aktiverte B-celler, og i tillegg hypergammaglobulinemi og autoantistoffproduksjon [64].

Lunde et al. undersøkte i ein studie blant anna nivået av BAFF i serumprøver til pasientar med CFS (n=70) i forhold til friske kontrollar (n=56) [69]. Det blei funnen ein signifikant forskjell av BAFF-nivået mellom CFS-pasientar og friske kontrollar (p=0.011). Ei forklaring kan vere at BAFF-nivå i serum har samanheng med eit aktivert B-cellesystem i pasientar med CFS. Forskjellen var likevel beskjeden i størrelse og der var ei brei overlapping mellom CFS-pasientar og friske kontrollar [69].

Zhang et al. gjennomførte ein studie der målet var å undersøke om BAFF kunne vere ein potensiell biomarkør for inflammatorisk tarmsjukdom (IBD) ved å analysere uttrykk av BAFF i slimhinner og avføring i IBD-pasientar [64]. Studiegruppa bestod av ulike subgrupper;

ulcerøs kolitt (UC, n=78), Crohns sjukdom (CD, n=37), friske kontrollar (n=44), i tillegg blei ei gruppe med IBS-pasientar (n=12) lagt til. IBD-pasientane hadde signifikant høgare nivå av BAFF i serum, vev og avføring i forhold til kontrollane. Det blei ikkje funnen noko forskjell i nivå av BAFF i avføring til IBS-pasientar i forhold til friske kontrollar, og BAFF blei heller ikkje undersøkt i serumet til IBS-pasientane [64].

Det er godt kjent at der er ein assosiasjon mellom IBS og matintoleranse. Opp til 70 % av IBS-pasientar har reaksjonar på ei eller fleire matvarer [70, 71]. Lied et al. undersøkte BAFF-nivået i personar med sjølvrapportert mathypersensitivitet (n=17) i forhold til friske kontrollar (n=11), og fann eit signifikant auka nivå i personane med mathypersensitivitet ($p < 0.03$). BAFF kan derfor tenkast å vere ein formidlingsmekanisme i overfølsamheitsreaksjonar til mat [68].

1.5.1.2 Degradering av BAFF i serum

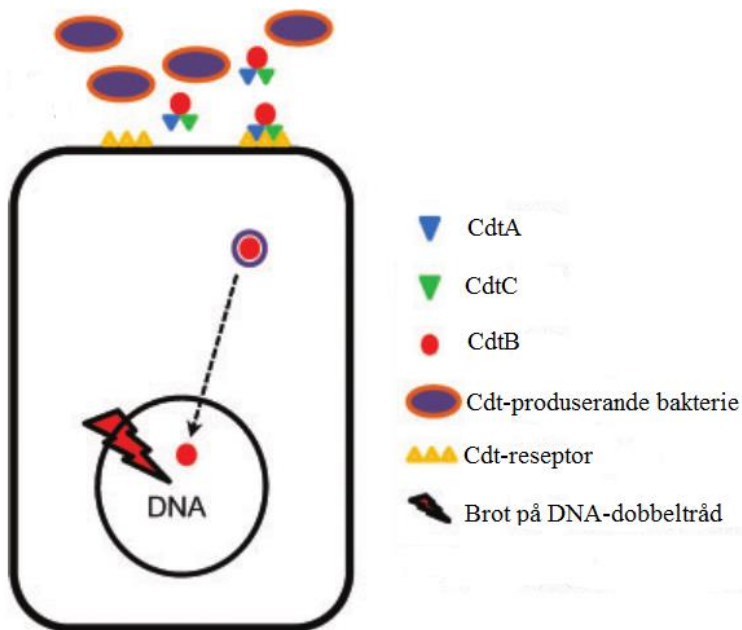
Produsentar av «BAFF-assay» rådar til frysing og tining av serumprøver berre éin gong, og anbefaler å spreie serumet i alikvotar før frysing [72]. Det er gjort studiar som har undersøkt korleis lagringsforhold påverkar stabiliteten til forskjellige komponentar i serum [73], men det finst mindre informasjon om stabiliteten til kjemiske analyttar i serum. Fleire studiar viser at nokon analyttar held seg stabile etter fryse-tine-syklusar, men at det også finst analyttar som får endra nivå [73-75]. Derfor må ein ta dei enkelte analyttane i betraktning når ein skal planlegge ein studie [73].

1.5.2 Antistoff mot cytolethal distending toxin B (anti-CdtB)

CdtB er ein del av komplekset Cdt, «Cytolethal distending toxin», som blir produsert av gram-negative patogene bakteriar. Toksinet kan forårsake ein akutt betennelsestilstand i fordøyingskanalen (gastroenteritt) [76, 77]. Cdt er produsert av gram-negative, for det meste ekstracellulære patogen, slik som *E. coli*, *Campylobacter sp.* og *Shigella dysenteriae* [78].

Cdt-komplekset består av komponentane; CdtA, CdtB og CdtC. Den aktive komponenten er CdtB, medan CdtA og CdtC er med på leveringa av CdtB inn i cellene. Alle tre komponentane trengst for å få full aktivitet [79]. Den aktive subeininga er strukturelt og funksjonelt lik pattedyr sitt deoksyribonuklease I (DNase I), og må bli translokert inn i cellekjerna for å vere effektiv. På grunn av DNase-aktiviteten, kan Cdt indusere DNA-skade, sjå figur 1.10 [76].

Studiar, både *in vivo* og *in vitro*, har vist at toksinet har ein sterk effekt på cellulær fysiologi, og kan blant anna skape inflammasjon, immunresponsar og vevsskade [76].



Figur 1.10. Cdt-komplekset, produsert av gram-negative bakteriar utanfor celler, beståande av dei tre subeinjingane A, B og C. CdtA og CdtC er med på leveringa av CdtB inn i cella. CdtB må bli translokert inn i cellekjerna for å utøve effekt. Her induserer subeinjinga DNA-skade [76]. Adaptert frå [80].

1.5.2.1 Bakgrunn for undersøking av anti-CdtB

I rotter kan *Campylobacter jejuni*-infeksjon forårsake utvikling av ein IBS fenotype, liknande PI-IBS i menneske. Truleg er nærværet av CdtB med på utviklinga til den IBS-liknande fenotypen. I rotter eksponerte for CdtB, var nivå av antistoff mot toksinet assosiert med endra mikrobielle populasjonar i tarmen og reduksjon av interstitielle cajalceller. På bakgrunn av dette undersøkte Pimentel et al., ved bruk av ELISA-metoden, om ein kunne finne ulike antistoffnivå mot CdtB i plasma til pasientar med IBS-D i forhold til kontrollgrupper [77].

I studien samanlikna ein personar med IBS-D (n=2375) mot dei ulike kontrollgruppene; IBD (n=142), cøliaki (n=121) og friske kontrollar (n=43). I studien fann dei eit signifikant høgare nivå av anti-CdtB i IBS-D samanlikna med IBD, friske kontrollar og cøliaki. Anti-CdtB nivå vart målt med ELISA og OD-verdiar (optisk tettleik) vart brukt i statistiske analysar. Studien nemner òg at biomarkøren anti-CdtB kan vere spesielt nyttig å bruke for å skilje IBS-D frå IBD i utgreiing av kronisk diaré [77].

Seinare blei ein mindre studie på 30 pasientar med ulike subgrupper gjennomført i Mexico, blant anna IBS-D (n=14), IBS-A (n=3) og funksjonell diaré (n=5) [81]. Studien oppgav ein grenseverdi, der positivt utslag for anti-CdtB i serum blei rekna som $OD \geq 2.80$. Det var berre dei pasientane som hadde diarérelatert IBS som fekk positivt utslag for anti-CdtB. OD-resultatet viste ikkje noko forskjell i nivået av anti-CdtB i PI-IBS-pasientar i forhold til ikkje-

PI-IBS-pasientar. Studien har usikkerheit sidan den er gjort på ein liten studiepopulasjon. I tillegg har studien oppgitt resultatane ved å kombinere talet på positive anti-CdtB-pasientar i lag med pasientar positive for ein anna biomarkør, nemleg anti-vinculin [81]. Der er ikkje gjort studiar av anti-CdtB-nivå i serum hjå pasientar med kronisk utmatting.

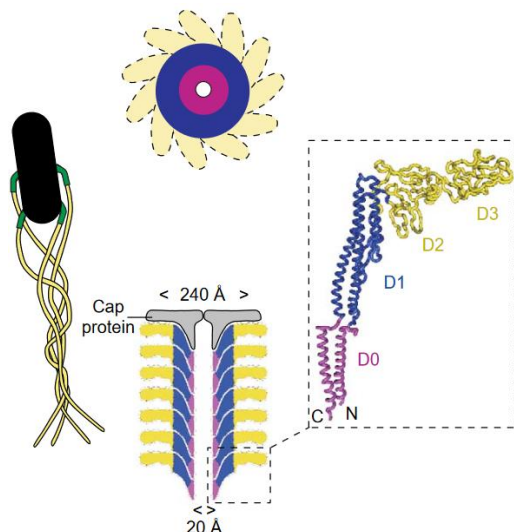
1.5.3 Antistoff mot flagellin (anti-flagellin)

Eit stort utval av protistar brukar flagellar til rørsle eller til å bevege væske og substansar rundt dei [82, 83]. Flagellane er viktige for det patogene potensialet til bakteriar nettopp fordi dei gjev rørsleevne og i tillegg kan auke adhesjon [84]. Strukturen til bakterieflagellar er vanlegvis beskrivne som tre delar: basalkroppen, filamentet (som utgjer den største delen av flagellen) og tuppen (cap) [85, 86].

Flagellin er det strukturelle proteinet som danner hovuddelen i filamentet [84, 87], og består av om lag 20 000 subeiningar, sjå figur 1.11 [87]. Flagellinmonomerar spelar ei viktig rolle for å oppdage mikrobar i verten og indusere immunresponsar. *In vitro* kan det oppstå sekresjon av flagellin anten ved lekkasje eller ved avstøyting av flagellen [87].

I pattedyr blir flagellinmonomerar oppdaga gjennom toll-like-reseptor 5 (TLR5), som triggar proinflammatoriske og erverva immunresponsar [87].

Trofozoittstadiet til *Giardia* har fire par med flagellar. Desse flagellane består av mikrotubuli, og ikkje av flagellin [88].



Figur 1.11. Figur av *Salmonella*-bakterie. Til venstre ser vi filamentet som den gule delen av flagellen til bakterien. Flagellinet danner domenene D0, D1, D2 og D3, og utgjer ulike delar av strukturen til filamentet. Ein α -heliks bestående av domenene D0 og D1 er plassert i kjerna til filamentet, medan den variable delen, D2 og D3, er på overflata [87]. Oppbygginga av filamentet varierer mellom bakterieartar [86]. I nokon bakteriar kan filamentet bestå av repeterande einslege flagellineiningar, medan andre har flagellar polymerisert frå fleire flagellin [86]. Adaptert frå [87].

1.5.3.1 Bakgrunn for undersøking av anti-flagellin

Bevegelse av bakteriar eller bakterieprodukt frå lumen av tarmen til mesenteriske lymfeknutar eller sirkulasjonen representerer ei forstyrring av tarmepitelet som kan leie til ein inflammatorisk respons. Ei hypotese er at pasientar med IBS vil vise høgare nivå av bakteriar/bakterieprodukt i sirkulasjonen samanlikna med friske kontrollar [89].

Schoepfer et al. ville undersøke om mikrobielle antigen, slik som flagellin, er vanlegare i IBS-pasientar samanlikna med friske kontrollar. Serumprøver frå totalt 266 pasientar med høvesvis IBS (n=112), Crohns sjukdom (n=61), ulcerøs kolitt (n=50) og friske kontrollar (n=43), blei undersøkte mot to typar flagellin, A4-Fla2 og Fla-X. Resultatet blei oppgitt som talet på personar i dei kvar gruppene som kom over «cutoff»-verdien. Antistoff mot desse to typane flagellin var signifikant høgare i IBS-pasientar, spesielt dei med PI-IBS, samanlikna med kontrollar (p=0.004 og p=0.009) [90].

Seinare undersøkte Dlugosz et al. om pasientar med IBS ville vise teikn på høgare nivå av bakteriar/bakterieprodukt i sirkulasjonen samanlikna med friske kontrollar, og undersøkte derfor blant anna anti-flagellin [89]. Studiepopulasjonen bestod av 87 personar med ulike subtypar av IBS (IBS-C: n=22, IBS-A: n=33, IBS-D: n=32) og 88 friske kontrollar. Analysar av serumprøver ved bruk av ELISA-metoden viste eit signifikant høgare nivå av anti-flagellin i IBS-pasientar samanlikna med kontrollar. Forskjellen var i hovudsak på grunn av høgare nivå i IBS-D-pasientar [89].

Nivå av antistoff mot flagellin er ikkje tidlegare undersøkt i CFS-pasientar.

1.5.4 Oversikt over artiklane nemnde for dei tre markørane

Oppsummering av funn og andre kommentarar til studiane vi har sett på er vist i tabell 1.1. Studiane til Zhang et al. og Schoepfer et al. er ikkje tekne med i denne tabellen [64, 90].

Tabell 1.1: Funn artiklane gjorde for anti-CdtB, anti-flagellin og BAFF.

Markør	Resultat	Kommentar	Avgrensing til studien	Referanse
Anti-CdtB	IBS-D høgare enn IBD, cøliaki og kontrollar	Seier ikkje noko om kor mange i IBS-D gruppa som er PI-IBS, men at mange med IBS i USA er PI-IBS. Seier at anti-CdtB kan gje perspektiv på patofysiologien til PI-IBS.	Svært stor IBS-D-pasientgruppe i forhold til dei andre gruppene den blei samanlikna med.	Pimentel [77]
	Fann fleire pasientar positive for anti-CdtB i IBS-D i forhold til andre sjukdomsgrupper.	Fann ingen forskjell mellom PI-IBS-D og ikkje-PI-IBS-D.	«Cutoff»-grense, inga frisk kontrollgruppe, lita studiegruppe.	Schmulson [81]
Anti-flagellin	Høgare nivå av anti-flagellin i IBS-pasientar i forhold til kontrollar. I hovudsak pga. høgare nivå i IBS-D-pasientar.	Ingen forskjell mellom PI-IBS og IBS.	Subgruppa PI-IBS var for lita til å seie om der faktisk var ein forskjell.	Dlugosz [89]
	Antistoff mot A4-Fla2 og Fla-x blei funnen signifikant oftare i IBS pasientar i forhold til friske kontrollar.	PI-IBS-pasientar hadde oftare antistoff mot flagellin i forhold til ikkje-PI-IBS.	«Cutoff»-grense.	Schoepfer [90]
BAFF	Høgare BAFF-konsentrasjon i CFS-pasientar samanlikna med friske kontrollar.	Overlappande resultat i gruppene, studien stiller sjølv tvil til resultatet, og seier BAFF ikkje er ein passende biomarkør for CFS.	Overlappande resultat.	Lunde [69]
	Høgare BAFF-konsentrasjon i pasientar med sjølvrapportert mathypersensitivitet i forhold til friske kontrollar.	Matinntoleranse er assosiert med IBS.	Lita studiegruppe.	Lied [68]

1.6 Bakgrunn og mål for prosjektet

1.6.1 Bakgrunn

Bergen opplevde i 2004 forureining av drikkevandet Svartediket, og mange blei smitta av parasitten *Giardia lamblia* [91]. Medan mange vart bra igjen etter behandling av parasitten var det ein del som hadde vedvarande plager med oppblåstheit, diaré og magesmerter. Etter omfattande utgreiing av mange av desse pasientane konkluderte ein med at dei i større og mindre grad hadde utvikla post-infeksiøs IBS med eller utan utmattingsplager [28, 35].

FGID, deriblant IBS, og CFS er sjukdomar som manglar biologiske markørar, og der diagnostiseringa skjer ved utgreiing av symptom og ekskludering av andre organiske sjukdomar [40, 45, 51, 54, 56]. Biomarkørar for sjukdomane vil vere nyttige for å stadfeste diagnosen

tidlegare, raskare og billigare [62].

Anti-CdtB og anti-flagellin er biomarkørar som i tidlegare studiar er undersøkt i IBS-pasientar. Det har blitt funne signifikante forskjellar i serumnivå for desse markørane i IBS-D pasientar i forhold til kontrollar [77, 89]. Ein har ikkje sett på komorbiditet med utmattingsplager i desse studiane sjølv om det er vanleg ved IBS, og der er heller ingen studiar som har evaluert desse markørane i forhold til CFS.

For BAFF er det blitt funne signifikante forskjellar i serumnivået mellom CFS-pasientar i forhold til kontrollar, ved å undersøke serumet ved bruk av ELISA-kit [69]. BAFF er ikkje tidlegare undersøkt i serumet til IBS-pasientar. Det blei i ein studie undersøkt nivå av BAFF i avføring til IBS-pasientar, men det blei ikkje funnen noko forskjell i forhold til friske kontrollar [64]. Det er blitt funnen ein samanheng mellom BAFF og subjektiv matintoleranse. Sidan IBS-plager i stor grad overlappar med subjektiv matintoleranse, kan det vere interessant å undersøke [68].

1.6.2 Mål med prosjektet – hovudmål og delmål

Med denne bakgrunnen har ein ei hypotese om at ein kan finne forskjell i konsentrasjonar/nivå av BAFF, anti-CdtB og anti-flagellin i serum til CFS-, FGID- og IBS-pasientar i forhold til friske kontrollar.

Hovudmål:

- Undersøke nivået av biomarkørane BAFF, anti-CdtB og anti-flagellin i serumprøver til pasientar med *Giardia*-indusert CFS, FGID og IBS i forhold til friske kontrollar ved bruk av ELISA-metode.

Delmål:

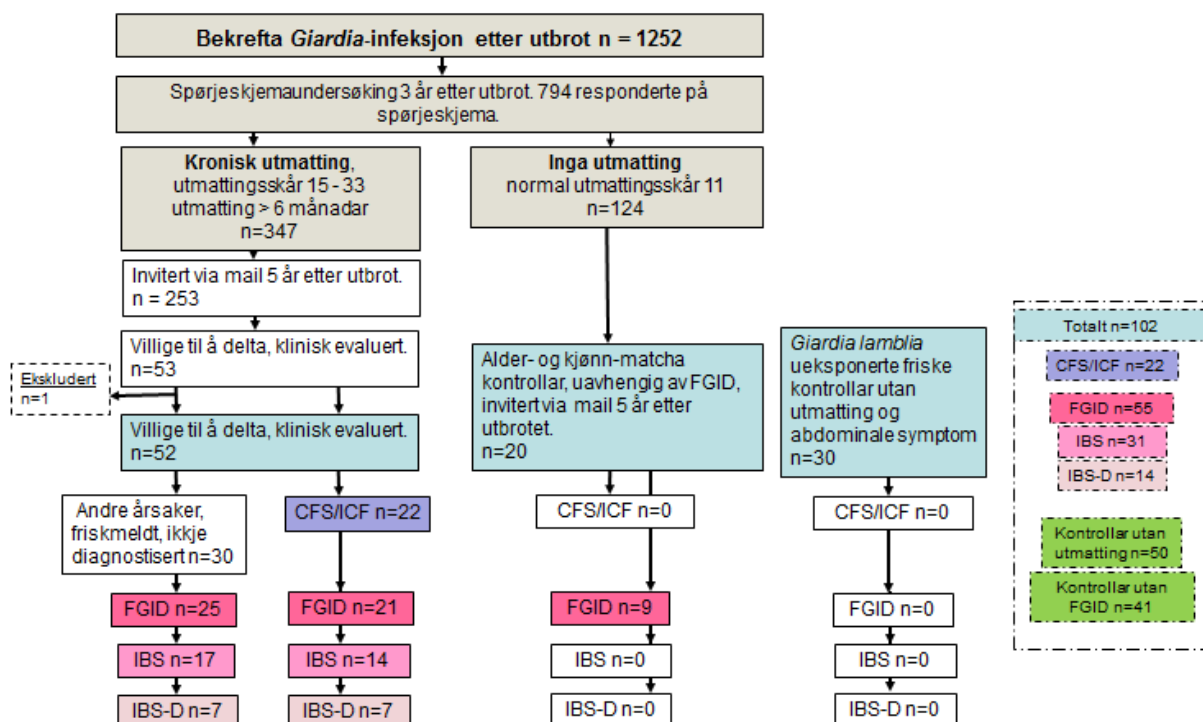
- Gjennomføre ein pilotstudie for ELISA-metoden der ein finn passende serumkonsentrasjon å bruke for undersøking av anti-CdtB og anti-flagellin.
- Undersøke nivået av biomarkørane i IBS subgrupper.
- Undersøke om den oppgitte degraderinga av BAFF er reell ved å sjå om konsentrasjonen av BAFF går ned ved gjentekne tine-fryse-syklusar av serumet.

2. Material

2.1 Studiepopulasjon

2.1.1 Bakgrunnen til studiepopulasjonen i prosjektet

Som figur 2.1 viser, var det 1252 personar med avføringsmikroskopi-bekrefta *Giardia*-infeksjon etter utbrotet i Bergen i 2004. I 2007, tre år etter utbrotet, svarte 794 personar på spørreskjema om utmatting og mageplager. Av desse tilfredsstilte 347 personar kriteria for kronisk utmatting, 124 personar hadde inga utmatting [92].



Figur 2.1. Forløpet til personane i prosjektet, med oversikt over sjukdomane og subgruppene. Adaptert frå [92].

Fem år etter *Giardia*-utbrotet blei 253 personar mellom 18-70 år og som fortsett budde i Bergen invitert til å vere med i ein studie. Personar villige til å delta blei klinisk evaluert og rutinemessige blodprøver blei undersøkt. Personar diagnostiserte med andre organiske sjukdomar, gravide og dei som på grunn av logistikk ikkje kunne delta, blei ekskluderte [92]. Av dei 53 personane villige til å delta, blei éin person her ekskludert grunna ulcerøs kolitt (UC).

Eksklusjonskriteriane for sjukdomsgruppa var alder under 18 eller over 70 år, kjend immunsuppresjon eller pågåande behandling med immunsupprimerande legemiddel og autoimmune sjukdomar.

Serumprøver og kliniske diagnosar basert på utgreiing og spørreskjema frå totalt 102

personar er med i dette mastergradsprosjektet. Desse inkluderer 52 personar som oppgav kronisk utmatting tre år etter *Giardia*-infeksjon, og som etter fem år vart diagnostiserte med tanke på sjukdomar som CFS/ICF, FGID, IBS og IBS-D. Ei gruppe på 20 personar eksponerte for *Giardia*, men utan utmatting, i lag med ei gruppe på 30 personar ueksponerte for *Giardia*, utgjør kontrollgruppa.

2.1.1.1 Dei ulike sjukdomsgruppene

CFS/ICF

Av dei 52 personane med i dette prosjektet som oppgav at dei hadde kronisk utmatting i 2007 (spørjeskjema i vedlegg 1), er det 22 personar som oppnådde kriteria for CFS/ICF ved utgreiing i 2009. CFS (n=18) og ICF (n=4) er slått saman til ei gruppe, sidan ICF liknar CFS, men ikkje oppfyller alle fire av dei åtte tilleggskriteria [93]. Alle bortsett frå éin av desse personane oppfylte også kriteria for FGID (n=21).

FGID

FGID-gruppa består av 55 personar. Dette er pasientar som oppnådde Roma II-kriteria for IBS, samt dei pasientane som ikkje oppnådde kriteria for IBS eller funksjonell dyspepsi, men som kvalifiserte til mindre veldefinerte FGID, som funksjonell oppblåstheit, funksjonell diaré, funksjonelle magesmerter og uspesifikke funksjonelle tarmlidingar [92]. 46 av desse pasientane kjem frå dei som hadde kronisk utmatting tre år etter *Giardia*-infeksjon. I tillegg var det 9 personar i kontrollgruppa som oppgav FGID, desse blei ekskludert frå kontrollgruppa og inkludert i sjukdomsgruppa ved undersøking av denne sjukdomen. Dei 9 FGID-personane er også ekskluderte frå kontrollgruppa ved undersøking av IBS og IBS-D.

IBS

I studiepopulasjonen er 31 av dei 55 personane med FGID diagnostiserte med IBS. Fordi nokon (n=5) av desse pasientane svarte i spørjeskjema (vedlegg 2) at dei hadde hatt mageproblem (IBS og FGID) også før *Giardia*-infeksjonen, blir gruppa kalla IBS og ikkje PI-IBS.

IBS-D

14 av dei 31 pasientane med IBS, hadde diaré-dominant IBS, IBS-D, ut frå Roma II-kriteria.

Kontrollgruppe

Kontrollgruppa på totalt 50 personar kan delast i to; *Giardia*-eksponerte og *Giardia*-ueksponerte. 20 av personane gjennomgjekk *Giardia*-infeksjon, men opplevde ikkje kronisk utmatting. Som nemnt under FGID, har 9 av desse 20 personane FGID og er tatt ut av kontrollgruppa der det er relevant. I tillegg er det med 30 personar som ikkje har vore eksponerte for *Giardia*, og som ikkje opplevde utmatting og mageproblem.

Kontrollprøvene frå friske ueksponerte vart samla inn i perioden 2009-2011. Krava til dei nemnde ueksponerte kontrollane var at dei aldri hadde reist til høgendemiske områder, ikkje drukke forureina vatn i Bergen hausten 2004, ingen tidlegare kjend giardiasis eller slektningar med kjend giardiasis i fortida.

2.2 Material brukt til analyse av dei tre markørane

2.2.1 Serumprøve

Alle serumprøvene er som nemnt samla inn i perioden 2009-2011, og vil derfor vere mellom seks og åtte år gamle ved analysetidspunktet. Serumprøvene blei separert frå blodprøvene ved standardisert metode. Først koagulerte blodet ved romtemperatur i om lag halvannen time, før det blei det sentrifugert i ei kjølt sentrifuge. Rett etter sentrifugering blei serumet (den øvste delen) overført i alikvotar til reine eppendorfrøyr (polypropylen røyr) i eit volum på 0.5 mL. Eppendorfrøyra, samla i kryoboksar, er blitt lagra på -80 °C i godkjent biobank (godkjent REK-vest 165.04) [94].

2.2.2 Generelt utstyr

Tabell 2.1: Generelt utstyr brukt i analysen av BAFF, anti-CdtB og anti-flagellin

Utstyr	Produsent
<i>Eppendorfrøyr, «SafeSeal tube 1.5mL»</i>	<i>Sarstedt, Tyskland</i>
<i>15 mL røyr, sterile</i>	<i>Sarstedt, Tyskland</i>
<i>50 mL røyr, sterile</i>	<i>Sarstedt, Tyskland</i>
<i>Multipipette, 12-kanal 30-300 mikroliter</i>	<i>Thermo Scientific, USA</i>
<i>Pipetter (0.5-10 µL, 40-200 µL, 100-1000 µL)</i>	<i>Thermo Scientific, USA og Labsystems, Finland</i>
<i>10 mL pipette</i>	<i>Sarstedt, Tyskland</i>
<i>25 mL brønnar</i>	<i>VWR, Pennsylvania, USA</i>

I tillegg til utstyret nemnt i tabell 2.1, er det også brukt; kryoboksar til lagring av serumprøver i eppendorfrøyr, aluminiumsfolie og sjølvklistrande plast til dekking av ELISA-plater, pipetteballong til 10 mL-pipette, begerglas, målekolbe og magnetrøyrar til oppmåling og tillaging av løysingar, isoporboks med is for lagring av serumprøver på arbeidsbenken.

2.2.3 Anti-CdtB og anti-flagellin

ELISA-metoden brukt for anti-CdtB og anti-flagellin hadde mykje likt material, og blir derfor nemnde i lag. Ulike material vil bli spesifisert.

2.2.3.1 ELISA-plate

Tabell 2.2 viser ELISA-platene brukte i analysen av anti-CdtB og anti-flagellin.

Tabell 2.2: ELISA-plate brukt i analysen av anti-CdtB og anti-flagellin

ELISA-plate	Produsent	Produksjonsnummer
Plate 96w immulon 4hbx clear f-bot	VWR, Pennsylvania, USA	PM1517254

2.2.3.2 Antigen til «coating» av ELISA-platene

Tabell 2.3: Antigen brukt til deteksjon av anti-CdtB og anti-flagellin

Analyse	Namn på antigen	Konsentrasjon i hetteglas (mg/mL)	Endeleg konsentrasjon brukt på ELISA-platene (mg/mL)
Anti-CdtB	Rekombinant <i>Campylobacter jejuni</i> CdtB ¹	0.55	$1.2 \cdot 10^{-3}$
Anti-flagellin	FLA-ST Ultrapure, Reinsa Flagellin frå <i>S. typhimurium</i> – TLR5 ligand ²	0.1	$2.5 \cdot 10^{-4}$

¹Creative BioMart, Cat-No: CdtB-01C. Lagra i alikvotar på -20°C.

²InvivoGen, Catalog code: tlr1-epstfla, tlr1-epstfla-5, Lot # FPE-38-01. 50 µg FLA-ST Ultrapure tilsett 500 µL endotoksinfritt vatn. Lagra i alikvotar på -20°C.

Tabell 2.4: Løysingar brukt til både anti-CdtB og anti-flagellin

Løysing	Bruksområde	Oppskrift og oppbevaring	Produsent og katalognr.:
Fosfat buffer saline (Dulbecco's PBS), laga på huset.	2 % BSA i PBS 0.05 % PBS-Tween 20	40 g NaCl + 7.2 g Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O + 1 g KCl + 1 g KH ₂ PO ₄ + 5 L Milli-Q vatn. pH justert til 7.4. Filtrert 0,45. Oppbevart i kjøleskåp ved 2-8°C.	-
2 % bovine serum albumin (BSA) i PBS	Blokkeringsbuffer, fortynning av serumprøver	1.6 g BSA i 80 mL PBS. Filtrert i avtrekk gjennom 0.45 µm filter. Laga ny 2 % BSA i PBS før kvar runde.	Roche, Sveits Bovine Serum Albumin Fraction V Ref: 10 735 078 001, Lot: 70471176
0.05 % PBS-Tween 20	Vaskebuffer, fortynning av HRP	0.5 mL Tween 20 pr. liter PBS	Sigma-Aldrich, USA P-7949
Svovelsyre (2M H ₂ SO ₄)	Stoppløysing	Fortynna til 2M	-
Gt X Hu IgG (H+L) HRP («Horseradish peroxidase»)	Sekundært antistoff	20.5 µL HRP i 25 mL 0.05 % PBS-Tween 20 (fortynning 1:5000)	Millipore, USA Katalognr.: AP112P LOT:2328003
TMB (3,3',5,5'-Tetrametylbenzidine) 1-Step™ Ultra TMB-Elisa	Substratløysing	Brukt ufortynna	Thermo Scientific Prod #34028, Lot #QD1900498

Merk: Produsent og katalognummer på kjemikal brukt i tillaging av PBS eller svovelsyra er ikkje oppgitt.

Tabell 2.5: Buffer brukt til fortynning spesifikt for CdtB-antigenet.

Løysing	Oppskrift og oppbevaring	Bruksområde
Borat-buffer (BBS), pH 8.2	0.618 g H ₃ BO ₃ + 8.766 g NaCl + 1 L Milli-Q vatn . pH blei justert til 8.2 ved å tilsetje NaOH. Filtrert gjennom 0,45 µm filter. Oppbevart i kjøleskåp ved 2-8°C.	Fortynning av antigen

Tabell 2.6: Buffer brukt til fortynning spesifikt for flagellin-antigenet.

Løysing	Oppskrift og oppbevaring	Bruksområde
Karbonatbuffer, pH 9.6	3.0 g Na ₂ CO ₃ + 6.0 g NaHCO ₃ + 1 L Milli-Q vatn. Filtrert	Fortynning av antigen

Tabell 2.7: Instrument felles for anti-CdtB og anti-flagellin.

Instrument	Bruksområde	Produsent
VWR 1719(EU) International	Vortex	VWR, USA
Wellwash 4 MK 2	ELISA-platevasker	Labsystems, Finland
Synergy H1 Hybrid Reader	ELISA-plateleser	BioTek, USA

Tabell 2.8: Instrument spesifikk for anti-flagellin.

Instrument	Bruksområde	Produsent
Labsystems iEMS Incubator/Shaker	Varmemaskin	Labsystems, Finland

2.2.4 BAFF

Tabell 2.9: «Kit» brukt til deteksjon av BAFF

Kit	Produsent	Katalognummer	Lot
Quantikine® ELISA Human BAFF/BLyS/TNFSF13 Immunoassay	R&D SYSTEMS, USA	DBLYS0B	P108627

Tabell 2.10: Instrument brukt i BAFF-analysen

Instrument	Bruksområde	Produsent	Nr:
VWR 1719(EU) International	Vortex	VWR, USA	Ikkje tilgjengeleg
Wellwash 4 MK 2	ELISA-platevasker	Labsystems, Finland	Ikkje tilgjengeleg
Thermo Shaker PST-60HL-4	Ristemaskin	BIOSAN, Latvia	Type: PST-60HL-4, Ser. Nr: 450511025
Synergy H1 Hybrid Reader	ELISA-plateleser	BioTek, USA	Part number: 8041000

2.2.5 Programvarer

2.2.5.1 Absorbansavlesing

Programmet Gen5 2.00 (BioTek, USA) blei brukt for å få OD-verdiane frå platelesaren (Synergy H1 Hybrid Reader).

2.2.5.2 Microsoft

Skriveprogrammet prosjektet har nytta er Microsoft Word 2016 (Microsoft corporation, Redmond, Washington, USA). Microsoft Excel 2016 (Microsoft corporation, Redmond, Washington, USA) blei nytta ved overføring av datafiler frå Gen5 2.00 (BioTek, USA).

2.2.5.3 Statistisk analyseprogram

IBM SPSS Statistics 24 IBM (corp, Armonk, New York, USA) er programmet nytta til å gjere statistiske utrekningar.

3. Metode

3.1 Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA

Det finnst ulike metodar for å undersøke antistoff eller antigen i serum, eksempelvis immunfluorescens, kulebasert «multiplex immunoassay» «hemagglutination inhibition assay» (HI) eller «enzyme-linked immunosorbent assay» (ELISA) [95].

I dette prosjektet har ein brukt same analysemetode for biomarkørane som det studiane ein har tatt utgangspunkt i, nemleg ELISA. Antigena CdtB og flagellin, og BAFF-settet er kjøpt inn frå dei produsentane desse studiane har brukt [64, 68, 69, 77, 89]. Ved bruk av same metode kan ein med større sikkerheit kunne samanlikne resultata.

ELISA blir brukt for å oppdage og kvantifisere spesifikke substansar, som antistoff eller antigen, i prøver. Metoden er i stand til å måle små konsentrasjonar av substansane med relativ liten risiko for interferens, samt analysere mange prøver på kort tid [96, 97].

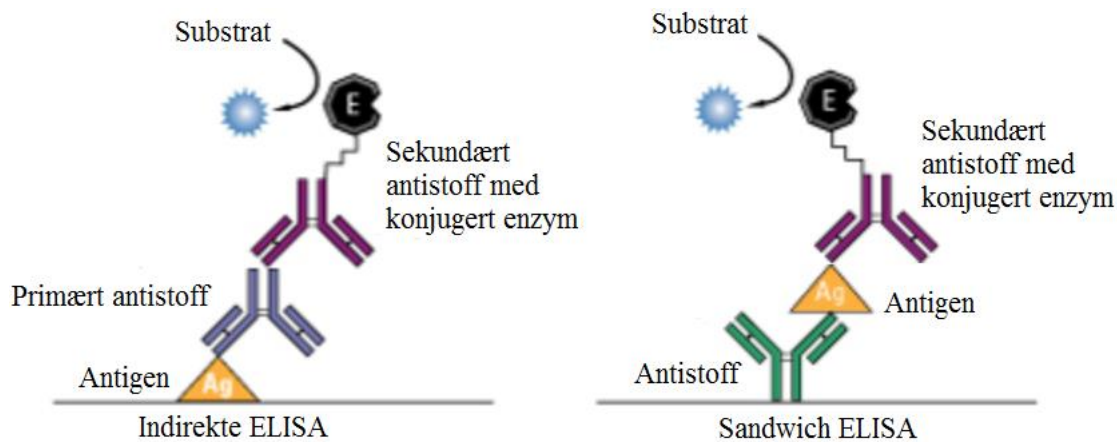
Metoden er delt inn i ulike kategoriar avhengig av karakteristikken til substansen ein vil undersøke, om det er eit antigen eller antistoff [97]. Fordi det er nivået av antistoff mot CdtB og flagellin ein ønskjer å undersøke, har ein brukt ein indirekte ELISA-metode for desse biomarkørane. For deteksjonen av cytokinet BAFF har ein brukt sandwich ELISA, kommersielt tilgjengeleg i sett (kit).

Ved indirekte ELISA, sjå figur 3.1, blir eit antigen festa til ei solid fase, altså overflata i brønnane på 96-brønns mikrotiterplater. Etter inkubering vert overskot av antigen så vaska vekk. Blokkering av brønnane skjer ved tilsetjing av protein. Eit primært antistoff blir så tilsett (serum). Vidare, etter nok ei inkubering, blir plata vaska igjen. Når ein set til sekundært antistoff med eit konjugert enzym (HRP), vil dette binde til det primære antistoffet. Etter inkubering og vasking, blir substrat (TMB) tilsett, og interaksjonen mellom substratet og enzymet leiar til ei fargeforandring [96, 97].

Sandwich-ELISA, også figur 3.1, har fått namnet sitt fordi det relevante antigenet sit mellom to antistoff. Her er brønnane «coata» med antistoff, før serumprøvene er tilsett. Når antigenet spesifikt til det bunde antistoffet er funne, kan ikkje desse antistoffa bli fjerna. Etter inkubering og vasking, blir eit enzymlinka antistoff bunde til antigenet. Vidare, etter inkubering og vasking, blir eit substrat tilsett, og etter nok ein inkubasjonsperiode vil interaksjonen mellom enzymet og substratet utvikle farge [96].

Begge metodane blir stoppa med ei stoppløysing etter fargeutvikling, og absorbansen blir målt med eit spektrofometer (mikroplatelesar) mellom 400-600 nm alt etter kva konjugat ein har brukt. Fargen ved begge ELISA-typene indikerer positive resultat, medan brønnar utan

fargeutvikling tyder på mangel på enzym eller negative resultat. Fargeutviklinga er proporsjonal med mengda av antistoff eller antigen i serumprøva. Absorbansen blir oppgitt som ein OD-verdi («optical density», optisk tettleik) [96, 97].



Figur 3.1. Prinsippa for dei to ELISA-typane. Indirekte ELISA blir i prosjektet brukt for deteksjon av anti-CdtB og anti-flagellin, medan sandwich ELISA blir brukt for å finne BAFF i serum. Adaptert frå [98].

3.2 Pilotstudie for å finne passane serumkonsentrasjon å bruke i undersøkinga av anti-CdtB og anti-flagellin

I utarbeidinga av ELISA-prosedyre for anti-CdtB og anti-flagellin undersøkte ein kva konsentrasjon det var best å bruke av serumet. Ein for låg serumkonsentrasjon vil gje stor usikkerheit, og ein for høg konsentrasjon kan kome over maksgrensa for OD det er mogleg å måle med ELISA-platelesaren (platelesaren les OD-verdiar mellom 0.0-4.0). Sterke serumkonsentrasjonar vil også kunne vise meir bakgrunnsstøy.

I artikkelen ein har tatt utgangspunkt i var fortynningane av serumet oppgitt til å vere 1:512 og 1:1000, høvesvis for anti-CdtB og anti-flagellin [77, 89]. For anti-CdtB valde ein å prøve ut ei sterkare og svakare fortynning enn den oppgitte konsentrasjonen undersøkt (1:171, 1:512 og 1:1024). Anti-flagellin var i artikkelen sterkt fortynna (1:1000), så ein valde å sjå på to sterkare konsentrasjonar (1:250, 1:500) i tillegg til den publiserte. På bakgrunn av resultatane gjekk ein vidare med å bruke ei fortynning på 1:500 for begge antistoffa. Dette gjorde at det blei mogleg å bruke same fortynna serumprøve både for anti-CdtB og anti-flagellin. Dermed kunne ein køyre ELISA-plater med både anti-CdtB og anti-flagellin same dag, og ein fekk effektivisert metoden.

3.3 Alikvotering

Fordi det ikkje var mogleg å undersøke alle dei tre biomarkørane på same dag, alikvoterte ein originalserumet i mindre einingar. Dette for å unngå unødvendige tine-fryse-syklusar. På grunn av den oppgitte advarselen mot fleire fryse-tine syklusar i BAFF-settet, analyserte vi BAFF først for kvart sett med serumprøver. Serumet undersøkt for BAFF har derfor vore gjennom éin tine-fryse-syklus, medan serumet undersøkt for anti-CdtB og anti-flagellin har vore gjennom to tine-fryse-syklusar.

3.4 Framgangsmåten til BAFF

ELISA-plata i settet var belagt med eit monoklonalt antistoff spesifikt for BAFF.

Førebuing av reagensar og standardrekke

Alle reagensane blei romtempererte før bruk. 8 mL «Calibrator Diluent RD6Q», forkorta CDR, blei tilsett 8 mL Milli-Q vatn (1:2 fortynning). Vaskebufferen blei laga ved å tilsetje 20 mL «Wash Buffer Concentrate» til 480 mL Milli-Q vatn.

For tillaging av standardrekke blei 1 mL Milli-Q vatn tilsett «Human BAFF/BLyS Standard» (40 000 pg/mL), med lett røring i 15 minutt. Ein laga til 8 eppendorfrøyr med 900 µL CDR i det første røyret og 500 µL CDR i dei resterande røyra. 100 µL standard blei overført til røyret med 900 µL CDR og rista (vortex). 500 µL av dette røyret blei så overført til neste, og så vidare. Det 8. røyret var nullstandarden, og blei derfor ikkje tilsett standard.

Serumprøvene (1:2 fortynning) blei laga ved å ta 100 µL serum i 100 µL CDR. Røyra blei rista (vortex) for å sikre homogen løysing.

Analyse

100 µL «Assay Diluent RD1-111» blei tilsett kvar brønn. Deretter blei 50 µL av standardane og serumprøvene tilsett på plata, serumet hadde då ei endeleg fortynning på 1:6 i brønnane. Plata blei dekt med sjølvklistrandende plast og inkubert 3 timar i romtemperatur på horisontal risting med «rounds per minute» (rpm) på 500 (Thermo Shaker PST-60HL-4, BIOSAN). Plata blei vaska fire gongar med 400 µL vaskebuffer i kvar brønn (Wellwash 4 MK 2), restar i brønnane blei fjerna ved å snu plata og legge/dunke det mot tørkepapir. 200 µL «Human BAFF/BLyS Conjugate» blei tilsett kvar brønn, og plata inkuberte i 1 time på risting. Plata blei vaska

som

forklart

over.

Sidan «Substrate Solution» måtte brukast innan 15 minutt etter at reagensane var blanda,

vart denne løysinga laga til rett før bruk. 11 mL av A-løysinga blei tilsett 11 mL av B-løysinga og beskytta mot lys. 200 µL av denne løysinga blei tilsett kvar brønn, og brønnane blei blå. Plata inkuberte i 30 minutt i romtemperatur på benken, beskytta mot lys ved bruk av aluminiumsfolie. Ein tilsette 50 µL «Stop Solution» til kvar brønn, og fargen blei gul. I nokre brønner blei fargen grøn, derfor blei plata sett på ristmaskina i nokre minutt. Dette var tilfellet for alle BAFF-platene.

Måling av absorban

OD blei målt ved 450 nm ved bruk av Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek, USA) innan 30 minutt. Ein bølgelengdekorreksjon blei gjort ved 540 nm, som korrigerer for optiske feil i plata. Ved hjelp av standardrekke, laga programmet Gen5 2.00 (BioTek, USA) standardkurve og rekna ut konsentrasjonen av BAFF i serumprøvene.

3.5 ELISA-prosedyre for anti-CdtB og anti-flagellin

På grunn av liknande prosedyrar forklarar ein anti-CdtB og anti-flagellin under eitt. Steg i framgangsmåten avvikande frå kvarandre vil bli presisert. Riktig volumtilsetjing av substansar i forhold til konsentrasjon er utrekna ved bruk av likning 1.1. Metodane er utvikla med bakgrunn frå dei oppgitte utgangspunkts-artiklane, samt standardprosedyrar frå ulike produsentar [77, 89, 99-102].

Antigen og «coating»

Antigena brukte til coating av ELISA-platene var «Rekombinant *Campylobacter jejuni* CdtB» (Creative BioMart) og «FLA-ST Ultrapure, Reinsa Flagellin frå *S. typhimurium* – TLR5 ligand» (InvivoGen). CdtB var ferdig tillaga i hetteglaset det kom i. Ein tinte hetteglaset og alikvoterte 22 µL til 15 mL-røyr. Desse blei lagra på -20 °C. Etter tining måtte flagellin løysast i 500 µL endotoksinfritt vatn og vortexa til det var oppløyst. Vidare jobba ein i sterilt avtrekk og overførte 25 µL flagellin til seks 15 mL-røyr. Desse blei også lagra på -20 °C.

22 µL CdtB blei sett til eit røyr med 9,98 mL BBS ($1,2 \cdot 10^{-3}$ mg/mL). 25 µL flagellin blei tilsett 9,98 mL karbonatbuffer ($2,5 \cdot 10^{-4}$ mg/mL). Multipipette blei brukt til å «coate» kvar brønn på ei 96-brønns mikotiterplate med 100 µL fortynna antigen. Både CdtB- og flagellinplatene blei dekte med sjølvklistrande plast, og inkubert ved 4 °C til over natta.

Vasking

Platene blei vaska tre gonger med 350 μL 0.05 % PBS-Tween 20 ved bruk av ein ELISA-platevasker (Wellwash 4 MK 2, Labsystems). Platene blei banka mot tørkepapir på benken, på denne måten blei eventuelle dropar som var att i brønnane fjerna.

Blokkering

Blokkering av platene blei gjort ved å tilsetje 150 μL 2 % BSA i PBS til kvar brønn. Platene blei dekte med sjølvklistrande plast og sett til inkubering. CdtB-plata inkuberte i 1 time ved romtemperatur, medan flagellin-plata inkuberte i 2 timar ved 37 °C i varmemaskin (Labsystems iEMS Incubator/Shaker, Finland).

Vasking

Platene blei igjen vaska, som forklart over.

Tilsetjing av serum

Serumprøvene blei tatt opp av frysaren (-80 °C) og tint på benken i romtemperatur. Etter kvart som ein blei ferdig med kvar serumprøvene blei dei satt på is, og til slutt sett tilbake til frysaren. 2 μL serum blei tilsett 998 μL 2 % BSA i PBS (1:500). Eppendorfrøyra blei rista på Vortex-maskin for å sikre homogen løysing. 100 μL fortynna serum blei tilsett kvar brønn, anten i duplikatar eller triplikatar. På kvar plate tok ein også med to brønnar utan serumprøve som blank kontroll. Platene blei dekte med sjølvklistrande plast. CdtB-plata blei sett til inkubering i romtemperatur i 1 time, medan flagellin blei inkubert i 2 timar ved 37 °C (varmemaskin).

Vasking

Platene blei vaska som forklart over.

Sekundært antistoff

5 μL av det sekundære antistoffet HRP (IgG) blei tilsett 25 mL PBS-Tween 20 (1:5000). 100 μL av denne HRP-fortynninga blei så tilsett kvar brønn. Platene blei dekte med plast og sett til inkubering, CdtB-plata i 2 timar ved romtemperatur og flagellin-plata i 2 timar ved 37 °C.

Vasking

CdtB-plata blei vaska fem gonger og flagellin-plata tre gonger med 350 μL 0.05 % PBS-Tween 20. Restar blei dunka ut.

Substrat- og stoppløysing

100 μ L romtemperert TMB blei tilsett kvar brønn. Fargen i brønnane gjekk frå blank til blå. For anti-CdtB blei reaksjonen stoppa etter 5 minutt og 40 sekund og for anti-flagellin etter 5 minutt og 10 sekund, ved å tilsette 100 μ L svovelsyre til kvar brønn. Fargen i brønnane blei no gul. Platene blei beskytta mot lys ved bruk av aluminiumsfolie.










Måling av absorbens

Eventuelle luftbobler i brønnane blei fjerna ved bruk av ei kanyle. Absorbansen blei målt ved 450 nm ved bruk av «Synergy H1 Hybrid Reader». I programmet Gen5 2.00 (BioTek, USA) fekk ein opp OD-verdiane for alle brønnane. Dei blanke brønnane utan serumprøver viser bakgrunnsstøy frå dei andre reagensane. Denne verdien blei trekt frå OD-verdiane til serumprøvene på plata.

3.6 Plateoppsett, stratifisering av prøver

Totalt 102 serumprøver blei i duplikatar eller triplikatar fordelte på tre 96-brønns mikrotiterplater for kvar av dei tre markørane, sjå figur 3.2. Det er anbefalt å køyre prøvene i duplikatar eller triplikatar for å få meir nøyaktige svar, samt ha moglegheit til å vurdere ein eventuell variasjon [103].

Prøvene blei stratifiserte, noko som vil seie at ein for deltakarane har ei samanlikningsgruppe med like faktorar (alder, kjønn), men utan sjukdom [104]. På kvar plate blei derfor ein frisk «match» vald ut til kvar sjuke prøve, så godt det kunne la seg gjere. På denne måten kan ein jamne ut plateforskjellar, slik at ikkje éi gruppe vert overrepresentert på plater med høgare/lågare verdier.

	Gjennomkøring		
Markør	1	2	3
BAFF			
Anti-CdtB			
Anti-flagellin			

Figur 3.2. Illustrasjon over den planlagde gjennomføringa. Dei 102 serumprøvene blei fordelte på tre plater for kvar markør. For kvar runde med BAFF blei originalserumet alikvotert til bruk for anti-CdtB og anti-flagellin.

3.7 Effekt av fryse-tine-syklusar

I settet til BAFF, var det oppgitt at ein skulle unngå fryse-tine-syklusar av serumet [72]. Det er ikkje gjort studiar som viser stabiliteten spesifikt for BAFF, og ein undersøkte derfor BAFF-konsentrasjonen i eit utval prøver som hadde vore gjennom fleire fryse-tine-syklusar.

Under den første gjennomkøyringa av BAFF, alikvoterte ein serum også til fryse-tine-prosjektet. Etter gjennomkøyringa, valde ein ut serumprøver som hadde god respons for dei tre markørane. På grunn av avgrensa plass for BAFF (16 brønner på kvar plate gjekk med til standardrekka), blei 10 serumprøver tatt med i prosjektet.

Ein valde å undersøke tre forskjellige tal på syklusar, sjå tabell 3.1. Serumprøvene fryst-tint éin gong er dei som var med på første gjennomkøyring (plate 1). Prosedyre brukt for frysing og tining; ta opp boksen med serumprøvene frå frysaren (-80 °C), fordele serumprøvene på ei plate slik at dei tinar fortare, tine til romtemperatur. Det gjekk 30 minutt frå serumprøvene var tatt opp frå frysaren til dei blei sett tilbake. Dette blei gjort éin gong for x3 og fire gonger for x6. Den siste tine-prosessen skjedde dagen for gjennomkøyring. Prøvene x3 og x6 blei analyserte på den siste gjennomkøyringa (plate 3).

Tabell 3.1: Oversikt over fryse-tine-syklusane til BAFF. Serumprøvene har vore fryst på -80 °C sidan dei blei samla inn i 2009 (5 år etter Giardia-utbrotet).

Fryse-tine-syklusar	Éin gong (x1)	Tre gonger (x3)	Seks gonger (x6)
Forklaring	1: Tint ved første gjennomkøyring. Serumet blei då alikvotert.	1: Tint ved alikvotering. 2: Tint på benk, 30 min. 3: Tint ved gjennomkøyring.	1: Tint ved alikvotering. 2-5: Tint på benk, 30 min. 6: Tint ved gjennomkøyring.

3.8 CV % - fjerning av varierende prøver

For å vise variasjonen mellom duplikatane eller triplikatane, rekna ein ut variasjonskoeffisienten (CV %), sjå likning 1.2 [105]. Vi valde å sette ein standard der prøver med ein CV % på over 10 % blei ekskluderte [103].

3.9 Statistisk styrke og utvalsstørrelse-kalkulering

Ei utvalsstørrelse-kalkulering rettferdigger den anslegne studiestørrelsen og viser at studien er i stand til å svare på det stilte spørsmålet. Ein for liten eller for stor utvalsstørrelse er sett på som dårleg praksis og er uetisk overfor pasientane med tanke på bortkasta tid og eventuelt plagsomme/risikofylte prosedyrar [105].

Ein kan ikkje sjå vekk frå at sannsynet for ein effekt/forskjell observert i ein studie er mindre enn den «sanne» effekt/forskjellen. Dette betyr at ein aldri kan garantere at ein studie er i stand til å oppdage effekt/forskjell, men ein kan auke sannsynet for å finne den ved å auke utvalsstørrelsen. Dette sannsynet blir kalla styrken til studien [105]. Låg statistisk styrke aukar sjansane for at eit statistisk signifikant funn representerer eit falskt positivt resultat (type 1 feil – funnet av ein effekt/forskjell som eigentleg ikkje eksisterer). Låg statistisk styrke kan for eksempel kome av eit lågt tal deltakarar eller at små effektar/forskjellar blir undersøkte [106].

Tabell 3.2: Oversikt over utvalsstørrelsen ein treng for å vise effekt/forskjell av ein viss størrelse (kor mange prøver ein må ha for å unngå feilaktig avvising av nullhypotesa) [107]. Utvalsstørrelsen ein får er altså så mange pasientar ein må inkludere i studien for å kunne vise same signifikante forskjell mellom dei sjuke og friske gruppene som det andre studiar har gjort.

Markør	Mu(0) «Kjend» gj.snittsverdi for populasjonen	Mu(1) «Forventa» gj.snittsverdi for prøva	Sigma (SD)	Total utvalsstørrelse for kvar gruppe	Ref.
Anti-CdtB (OD)	1.81	2.53 (IBS-D)	0.73	18	[77]
Anti-flagellin (OD)	≈0.70	≈0.79* (IBS)	0.31*	188	[89]
		≈0.83* (IBS-D)	0.22*	46	
BAFF (pg/mL)	899	981	119.5**	34	[69]
	≈914*	≈1249*	≈245*	10	[68]

*Estimerte verdier for gjennomsnitt og SD utifrå median (≈gjennomsnitt) og IQR ($SD \approx 0.75 * IQR$) som tilgjengeleg i artikkelen.

**Standardavvik utrekna frå konfidensintervallet ved bruk av likning 1.3 og 1.4.

I tabell 3.2 er kalkulatoren nytta til utrekning av den totale utvalsstørrelse (med halvparten av deltakarane i sjukdomsgruppa og halvparten i kontrollgruppa) utarbeida av «Statistical Solutions» [108]. Verdiane brukt i kalkulatoren er henta frå artiklane det er blitt tatt utgangspunkt i; gjennomsnittsverdiane for kontrollgruppene (Mu(0)), gjennomsnittsverdiane for sjukdomsgruppa ein er interessert i (Mu(1)), samt sigma (standardavviket til kontrollgruppa). «Alpha» er sett til 0.05 og styrken av testen til 0.80, som er standardverdier [108].

Studien gjennomført av Schmulson et al. av anti-CdtB kan ikkje reknast utvalsstørrelse ut frå då den ikkje har med kontrollgruppe og har oppgitt resultatet ved bruk av «cutoff»-verdi

[81]. Schoepfer et al. har sett på to andre flagellinmonomerar i serum enn det vi har i dette prosjektet, og utvalsstørrelsen med utgangspunkt i denne studien blir derfor ikkje rekna ut.

3.10 Formlar

Formlar brukte til utrekningar av volumtilsetning (likning 1.1), variasjonskoeffisienten (likning 1.2), samt utrekning av standardavvik frå konfidensintervallet (likning 1.3 og 1.4).

Likning 1.1: $C_1V_1=C_2V_2$

Der C_1 = konsentrasjon (start), V_1 =volum (start), C_2 =konsentrasjon (slutt), V_2 =volum (slutt).

Likning 1.2: $CV \% = \frac{\text{Standardavvik}}{\text{Gjennomsnittsverdi}} * 100 \%$ [105]

Likning 1.3: $SE = \frac{(\text{Øvre grense} - \text{nedre grense})}{3.92}$

Der øvre og nedre grense= konfidensintervallet, 3.92= «z-score»*2 for 95 % konfidensintervall [109].

Likning 1.4: $SD = \frac{SE}{\sqrt{\frac{1}{N_e} + \frac{1}{N_c}}}$

Der SE= standardfeil, N_E og N_C = tal på prøver i dei to gruppene [109].

3.11 Dataanalyse

Resultata ein fekk frå avlesing av ELISA-platene med «Synergy H1 Hybrid Reader» og «Gen5 2.00» blei overført til Excel (Excel 2016). Deretter brukte ein SPSS (IMB SPSS Statistics 24) til å analysere resultatet, lage figurar og å rekne ut statistisk signifikans. Vi jobbar her med forskjellar i kontinuerlege variablar mellom to grupper. Det vart laga histogram for å vurdere om variablane var normalfordelte i alle sjukdomsgruppene. Sidan ingen av resultata var normalfordelte blei den ikkje-parametriske statistiske Mann-Whitney testen brukt når ein samanlikna éi sjukdomsgruppe opp mot éi kontrollgruppe. Ein brukte Chi-kvadrat-test for å statistisk samanlikne kategoriske variablar, slik som kjønnsfordeling i gruppene i studiepopulasjonen [105].

3.12 Etikk

Prosjektet er godkjent av «Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskingsetikk» (REK), med REK-nr: 1632. Pasientar og kontrollpersonar har gitt breitt samtykke om at prøvene kan brukast i forsking. Serumprøvene har vore oppbevart i biobank, godkjent REK-vest 165.04. Deltakarar blei tildelt studienummer og data blei analysert aidentifisert.

4. Resultat

4.1 Studiepopulasjon

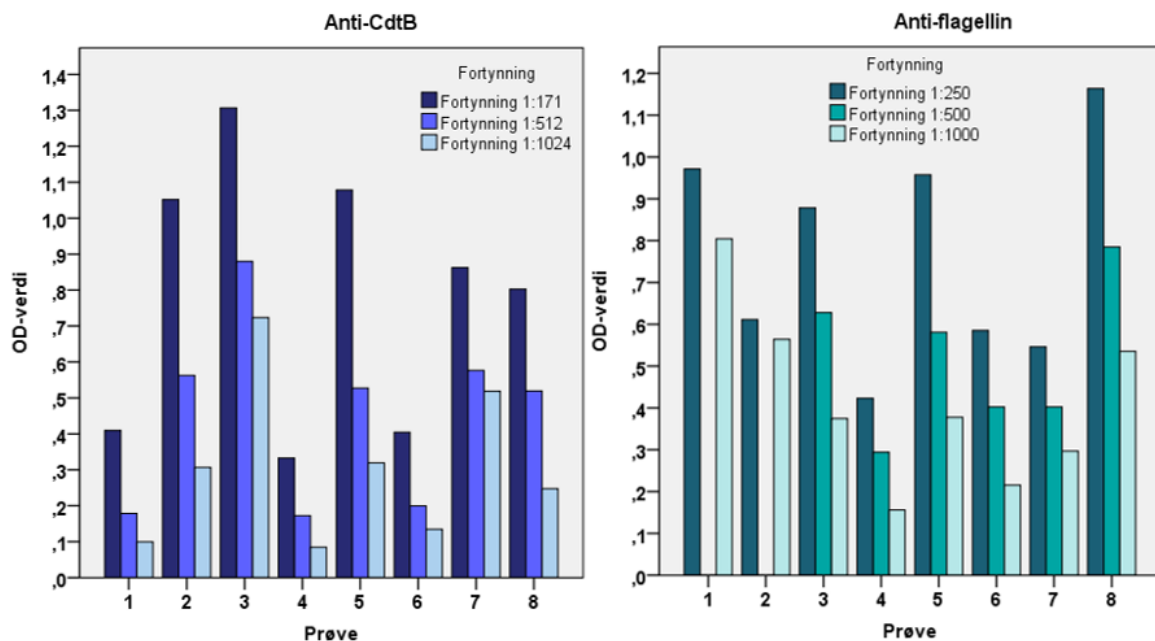
Tabell 4.1: Studiepopulasjonen i prosjektet. Her med oversikt over gjennomsnittsalder og prosentdel kvinner for alle deltakarane, samt dei ulike sjukegruppene og kontrollane.

Grupper	N=	Alder (gj.snitt±SD)	Kvinner (%)
Alle deltakarar	102	41.0 (11.8)	68.6
Sjukdom	52	41.6 (11.4)	76.9
CFS/ICF	22	42.4 (9.5)	81.8
FGID	55	41.7 (10.8)	70.9
IBS	31	41.3 (11.2)	77.4
IBS-D	14	36.6 (9.7)	71.2
Kontrollar	50	40.4 (12.4)	60.0

Som tabell 4.1 viser er gjennomsnittsalderen nokså lik i alle gruppene, og der er ein ikkje-signifikant forskjell mellom sjukdomsgruppene og kontrollar. Det er ein større del kvinner i sjukdomsgruppa, men ikkje signifikant forskjellig frå kontrollgruppa ($p=0.09$). Det var flest kvinner i CFS/ICF-gruppa, men heller ikkje her var det signifikant forskjell i forhold til kontrollane ($p=0.17$).

Vi undersøker her biomarkørar i forhold til to sjukdomar som kan opptre saman, og i vårt materiale gjer dei nettopp det. Derfor vil talet på personar i dei ulike sjukdomsgruppene bli meir enn 52 sjuke personar til saman. For eksempel har nesten alle med CFS/ICF også FGID (21 av 22). Mange av dei same personane går igjen i dei ulike sjukdomsgruppene.

4.2 Pilotstudie av serumkonsentrasjon for anti-CdtB og anti-flagellin



Figur 4.1. OD-verdiane over dei ulike serumkonsentrasjonane for høvesvis anti-CdtB og anti-flagellin. Både sjuke og friske serumprøver er undersøkt, og det er dei same prøvene som er undersøkte for begge markørane. For anti-flagellin manglar serumprøve 1 og 2 for fortynninga 1:500.

Den sterkaste konsentrasjonen brukt for begge antistoffa gav eit resultat der ein fekk ein høg OD-verdi for nokre av serumprøvene. Det kan tenkast at dette kunne ha gitt verdiar nærme eller over OD-maks (OD-maks: 4.0) for enkelte av serumprøvene. Dei svakaste konsentrasjonane gav eit lågt OD-resultat for nokre av serumprøvene, noko som gjev prøvene meir usikkerheit. Ved bruk av substratet TMB er det også anbefalt å stoppe reaksjonen ved ein OD mellom 0.7-0.9. I figur 3.1 ser ein at dei midtre konsentrasjonen undersøkt (1:512 og 1:500) for biomarkørane hadde fine verdiar. Konsentrasjonen 1:500 blei nytta for begge markørane då dette effektiviserte metoden og gjorde analysen praktisk lettare.

Det skal merkast at platene i denne pilotstudien stod i eit kortare tidsrom med substrat før reaksjonen blei stoppa med stoppløysing, enn det dei seinare platene gjorde. I pilotstudien stod platene med substrat i under 5 minutt (nøyaktig tid blei ikkje målt), medan dei seinare har stått høvesvis 05.40 og 05.10 for anti-CdtB og anti-flagellin. Derfor er OD-verdiane presentert seinare noko høgare.

4.3 Resultatet av biomarkørane BAFF, anti-CdtB og anti-flagellin

Kontrollgruppa i studiepopulasjonen vart rekruttert frå både eksponerte og ueksponerte for *Giardia*. Vi har undersøkt om det finnast forskjellar mellom sjukdomsgruppene og desse to kontrollgruppene for alle tre markørane. Sidan det ikkje er blitt funnen noko forskjell, blir resultatet presentert for éi kontrollgruppe, som då består av både eksponerte og ueksponerte personar.

4.3.1 BAFF

Tabell 4.2: BAFF-konsentrasjon i dei ulike sjukdomsgruppene og kontrollane. Konsentrasjonane er rekna ut frå standardkurvene til dei forskjellige platene.

Markør	Sjuka			Kontrollar			Totalt	P-verdi *Mann-Whitney
	Grupper	n	Gj.snitt (±SD)	Grupper	n	Gj.snitt (±SD)		
BAFF (pg/mL)	CFS/ICF	20	1223 (250)	Ikkje CFS, med FGID	49	1236 (241)	69	0.76
	FGID	52	1207 (217)	Ikkje CFS, ikkje FGID	40	1210 (243)	92	0.72
	IBS	28	1212 (181)				68	0.97
	IBS-D	14	1240 (168)				54	0.46

For BAFF er det totalt fire prøver som går ut. Tre prøver går ut fordi duplikatane for desse prøvene hadde ein CV % på over 10 %. Den siste prøva blei ikkje analysert for BAFF pga. plassmangel. Dei fire prøvene gjer at CFS/ICF, FGID og IBS- gruppene går ned i talet på personar, i tillegg til at éin kontroll forsvinn.

Resultatet framstilt i tabell 4.2 viser at alle sjukdomsgruppene har like gjennomsnittskonsentrasjonar av BAFF i forhold til kontrollgruppene. Standardavviket fortel at det er stor variasjon mellom prøvene i kvar gruppe, og derfor overlappar alle sjukdomsgruppene betydeleg med kontrollgruppene. Vi finn ingen signifikante forskjellar mellom sjukdomsgruppene og kontrollgruppene.

Gjennomsnittet av BAFF-konsentrasjonen i CFS/ICF (1223 pg/mL) er lågare enn gjennomsnittet til kontrollgruppa (1236 pg/mL). Vi ser at konsentrasjonen aukar frå FGID til dei meir spesifikke IBS og IBS-D-gruppene, men lite i forhold til gjennomsnittstalet, og derfor ser vi ikkje på dette som ein trend.

4.3.2 Anti-CdtB

Tabell 4.3: OD-verdiar av anti-CdtB for dei ulike sjukdomsgruppene og kontrollane.

Markør	Sjuka			Kontrollar			Totalt	P-verdi *Mann-Whitney
	Grupper	n	Gj.snitt (±SD)	Grupper	n	Gj.snitt (±SD)		
Anti-CdtB (OD)	CFS/ICF	22	0.763 (0.402)	Ikkje CFS, med FGID	48	0.833 (0.449)	70	0.47
	FGID	53	0.811 (0.476)	Ikkje CFS, ikkje FGID	39	0.807 (0.352)	92	0.55
	IBS	29	0.795 (0.414)				68	0.47
	IBS-D	13	0.731 (0.476)				52	0.22

Totalt fem prøver for anti-CdtB hadde ein CV % på over 10 %. Tre av desse prøvene var ein del av FGID-, IBS-, IBS-D-gruppene, i tillegg forsvann to kontrollar.

Gjennomsnittet av OD-verdiane for anti-CdtB i sjukdomsgruppene er like gjennomsnittsverdiane i kontrollgruppene, slik som tabell 4.3 viser. Standardavvika er store, noko som gjer at gruppene overlappar kvarandre betydeleg. Der er ingen signifikante forskjellar mellom sjukdomsgruppene og kontrollgruppene. Vi observerer ein synkende OD-verdi av anti-CdtB frå FGID til undergruppene IBS og IBS-D. IBS-D (0.731) er den sjukdomsgruppa med lågast OD-verdi i forhold til kontrollgruppa (0.807).

4.3.3 Anti-flagellin

Tabell 4.4: OD-verdiar av anti-flagellin for dei ulike sjukdomsgruppene og kontrollane.

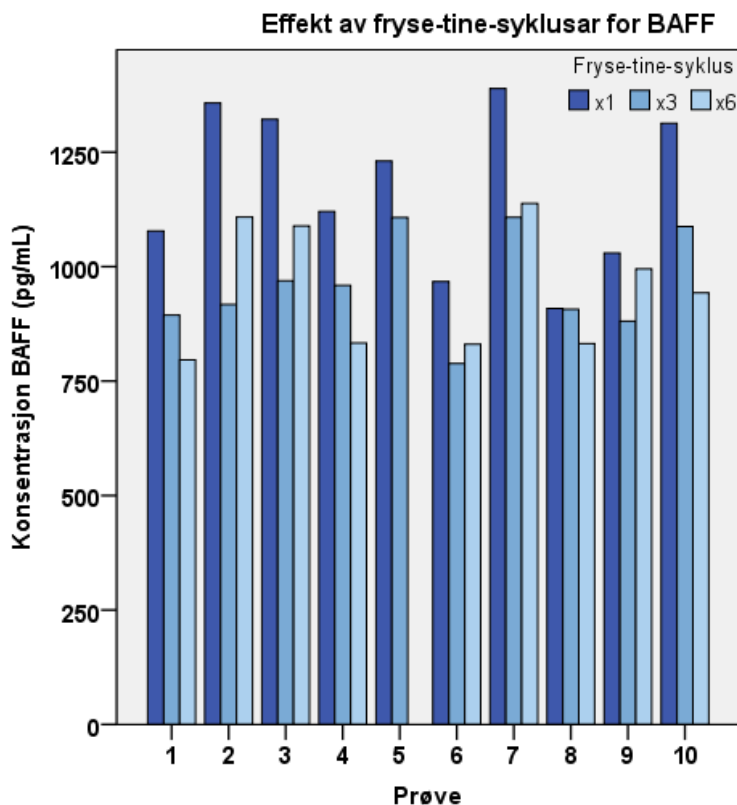
Markør	Sjuka			Kontrollar			Totalt	P-verdi *Mann-Whitney
	Grupper	n	Gj.snitt (±SD)	Grupper	n	Gj.snitt (±SD)		
Anti-flagellin (OD)	CFS/ICF	21	0.523 (0.224)	Ikkje CFS, med FGID	48	0.666 (0.473)	69	0.53
	FGID	52	0.567 (0.341)	Ikkje CFS, ikkje FGID	39	0.697 (0.516)	91	0.73
	IBS	28	0.580 (0.413)				67	0.68
	IBS-D	13	0.639 (0.567)				52	0.80

For anti-flagellin blei fem prøver tekne vekk frå analysen på grunn av ein CV % på over 10 %. Tre av desse prøvene var ein del av alle sjukdomsgruppene, i tillegg blei to kontrollar tekne vekk.

Med store standardavvik i både sjukdomsgruppene og kontrollgruppene, samt forholdsvis like gjennomsnitt, er gruppene overlappende kvarandre. Ingen signifikante forskjellar blei funnen mellom sjukdomsgruppene og kontrollgruppene, som vist i tabell 4.4.

Sjukdomsgruppa ein finn størst forskjell mellom i forhold til kontrollgruppa er CFS/ICF. Dette er den sjukdomsgruppa med lågast OD-verdiar for anti-flagellin. For FGID og undergruppene IBS og IBS-D, er det ein aukande trend for OD-verdi av anti-flagellin. IBS-D er den sjukdomsgruppa med høgst OD-verdi for anti-flagellin (0.639), men også den sjukdomsgruppa som ligg nærmast gjennomsnittsverdien for kontrollgruppa (0.697).

4.4 Effekt av fryse-tine-syklusar



Figur 4.2. Konsentrasjonen av BAFF i serumprøver fryst og tint x1, x3 og x6. Fryse-tine-syklus x6 for prøve 5 blei ikkje analysert.

I figur 4.2 ser vi at konsentrasjonen av BAFF ligg høgare for prøvene fryst og tint éin gong i forhold til tre og seks gonger. Prøve 8 har lik konsentrasjon av BAFF i x1 og x3, så denne skil seg litt ut. Det er ein signifikant forskjell mellom fryse-tine-syklus x1 ($\bar{x}=1172$) og x3 ($\bar{x}=962$) ($p=0.009$) og mellom x1 og x6 ($\bar{x}=952$) ($p=0.017$). Prøvene fryst og tint x3 og x6, har meir jamne verdiar, og dei skiftar mellom kven som har høgst BAFF-konsentrasjon. Derfor er det ingen signifikant forskjell mellom x3 og x6 ($p=0.968$).

Effekt av fryse-tine-syklusar på x2, x4 og x7 blei òg undersøkte for anti-CdtB og anti-

flagellin. Berre x4- og x7-analysane blei gjennomført på same plate. Fordi vi opplevde plateforskjellar for desse to markørane som ikkje kunne utliknast i forhold til ei standardkurve slik som for BAFF, er resultatet usikkert for x4 og x7 syklusar i forhold til x2 syklusar. Vi fann ingen syklusforskjell for anti-CdtB (OD-verdiar: x4 \bar{x} =0.637 og x7 \bar{x} =0.635; p=0.971) eller for anti-flagellin (OD-verdiar: x4 \bar{x} =0.425 og x7 \bar{x} =0.434; p=0.971).

4.5 Kontrollprøver på platene for anti-CdtB og anti-flagellin

Tabell 4.5 og 4.6 gjev oversikt over OD-verdiane av prøver som blei tekne med på fleire plater, med tanke på om ein kunne justere for plate til plate variasjon ved å multiplisere OD-verdiane med ein utrekna konstant. Prøve A er kontrollprøva som blei tatt på alle platene, medan B-E er prøver som blei tekne med på plate 3 fordi ein hadde plass til det, og til å få meir samanlikningsgrunnlag. Frå tabellane ser vi at dei same prøvene får forskjellige OD-verdiar på dei ulike platene.

Tabell 4.5: Kontrollprøver for anti-CdtB på dei tre platene. Til høgre visast forholdstallet for kontrollprøvene mellom plate 3 og dei to andre platene. Gjennomsnittet av desse utgjer ein justeringskonstant markert nedst i tabellen.

Prøve	Plate 1 (OD)	Plate 2 (OD)	Plate 3 (OD)	Forhold *med plate 3 som standard	
				Plate 1	Plate 2
A	0.971	1.413	1.177	1.212	0.833
B	0.842	-	1.057	1.255	-
C	0.434	-	0.641	1.477	-
D	-	1.995	1.876	-	0.940
F	-	1.854	1.722	-	0.929
Gjennomsnitt:				1.315	0.901

Tabell 4.5 viser at OD-verdiane for kontrollprøvene ligg i riktig retning i forhold til kvarandre. Alle verdiane på plate 3 ligg mellom verdiane på plate 1 og 2, derfor er forholdet rekna ut frå denne plata. Gjennomsnittet av forholdstala markert nedst i tabellen vil vere konstantane OD-verdiane på kvar plate kunne justerast med.

Tabell 4.6: Kontrollprøver for anti-flagellin på dei tre platene. Også her visast forholdstala til høgre i tabellen, samt justeringskonstantane for dei to platene i forhold til plate 3 nedst.

Prøve	Plate 1 (OD)	Plate 2 (OD)	Plate 3 (OD)	Forhold *med plate 3 som standard	
				Plate 1	Plate 2
A	0.777	1.127	0.982	1.264	0.871
B	2.438	-	2.544	1.043	-
C	0.328	-	0.210	0.640	-
D	-	1.982	1.327	-	0.670
F	-	1.816	1.417	-	0.780
Gjennomsnitt:				1.154	0.774

Som for anti-CdtB er det også kontrollprøvene på plate 3 for anti-flagellin som har verdier mellom prøvene på plate 1 og 2. Derfor er det plate 3 forholdstala er rekna ut frå. Eitt unntak er prøve C, der OD-verdien på plate 3 ligg under OD-verdien på plate 1.

Det blei forsøkt å gjere ei platejustering ved å bruke justeringskonstantane (gjennomsnittet av forholdstala) til å justere platene opp eller ned. Når vi ser på kontrollprøvene for anti-CdtB og anti-flagellin (tabell 4.5 og 4.6), ser vi at forholdstala mellom dei ulike prøvene er ulike. Dette indikerer at det ikkje er ein lineær korrelasjon mellom OD-verdien og konsentrasjonen. Dermed vil prøver med låge OD-verdiar måtte justerast med ein anna faktor enn det andre prøver med høgare OD-verdiar må justerast med. Denne moglegheita for å jamne ut plateforskjellar blei forkasta når vi såg at den same justeringsfaktoren ikkje kunne nyttast for ulike OD-verdiar. I tillegg ser vi at prøve C for anti-flagellin i tilfelle måtte justerast i motsett retning i forhold til dei andre prøvene analyserte på både plate 1 og 3.

5. Diskusjon

5.1 Metode

I ein kvar metode er det viktig å arbeide under faste og standardiserte forhold, dette for å unngå variasjon og for å kunne auke reproduserbarheit og nøyaktigheit av resultatet [110].

ELISA-metoden, både indirekte og sandwich, inneber mange trinn, der feil i eitt av trinna kan bli følgjefeil som kan påverke resultatet og skape variasjon.

5.1.1 Generelt

I ELISA-metoden blir det brukt pipetter til overføring av volum, både ved tillaging av løysingar og ved overføring av løysingane til brønnane på ELISA-plata. Årsaker som gjer at feil volum blir overførte er derfor ein potensiell feil for alle stega i metoden. Utstyr som pipetter og multipipetter er derfor kalibrerte på førehand, slik at volumet er kontrollert til å vere riktig. Dette er viktig sidan det ofte er snakk om overføring av små volum, noko som gjer at feilgrensa er lita. Avvikande oppmålingar når ein arbeidar med små einingar har større utslagsgjevande effekt enn om ein arbeidar med større einingar. Pipetteringsteknikken kan også føre til feil. Det er viktig å skifte pipettespiss for å unngå blanding av ulike serumprøver. I tillegg kan teknikken også føre til volumfeil, og ein må vere merksam på luftbobler og at det er likt volum i alle pipettene ved bruk av den manuelle multipipetta. Pipetteringsfeil er feilkjelder ein ikkje kan utelukke i prosjektet. Resultatet viser likevel at duplikatane og triplikatane har vore like, og berre 13 av totalt 305 analyserte serumprøver (totalt for alle tre markørane i denne oppgåva) hadde ein CV % på over 10 %.

Tabell 5.1 presenterer dei ulike stega i metoden og kva det seie for resultatet. Alle stega vil gjelde for den indirekte metoden for anti-CdtB og anti-flagellin. I analysa av BAFF var ELISA-platene allereie «coata» med antistoff, og det er usikkert om «Assay Diluent» fungerte som ein blokking, derfor ser ein på stega før serumtilsetting som små feilkjelder for BAFF.

Tabell 5.1 Dei ulike stega brukt for ELISA og forklaring på korleis desse kan påverke resultatet. Med utgangspunkt frå [110-113].

Steg i ELISA	Verknad	Eventuell påverknad av resultat
Hovudsteg:		
«Coating» med antigen	Absorberast til brønnane pga. hydrofobe interaksjonar mellom antigenet og plastikken (plata).	For høg antigenkonsentrasjon kan føre til metting av brønnane, og hindre antistoff i å binde pga. sterisk hindring. Tid og temperatur er dei viktigaste faktorane for kor mykje protein som blir absorbert.
Blokkering	Protein som bind til hydrofobe og hydrofile områder i brønnane der antigen ikkje har bunde.	Områder ikkje blokka fører til høge bakgrunnssignal, mindre spesifisitet og sensitivitet.
Serum	Antistoff eller antigen i serumprøver skal bli detektert.	«Krokeeffekten» oppstår når det er mykje antigen/antistoff i prøva. Den spesifikke bindinga mellom antigen-antistoff blir ikkje tilstrekkeleg til å måle det høge nivået, og signalet vil bli lågare enn det som er reelt. Kan kontrollerast ved undersøking av fleire fortytningar av serumprøvene.
Sekundært antistoff	Antistoff med konjugert enzym (HRP) som kan endre eit fargefritt substrat til ein farge. HRP katalyserar oksideringa av substratet, noko som fører til fargeutvikling.	Nødvendig for å kunne oppdage nivået av antistoff/antigen. Ein avgrensande faktor, då for lite HRP vil kunne vise for lite resultat (der er eigentleg meir antistoff enn det som blir «oppdaga»). For sterk konsentrasjon vil kunne gje bakgrunnssignal.
Substrat og stoppløysing	TMB dannar eit blått produkt (katalysert av HRP), ved tilsetjing av svovelsyre blir produktet gult. Svovelsyra endrar pH, slik at enzymet sluttar å fungere.	Forsura med stoppløysing blir produktet gult, og 2-3 gongar meir sensitivt. Ved bruk av dette substratet bør reaksjonen bli stoppa ved ein OD mellom 0.7-0.9. Kvar plate må stoppast etter like lang tid, då lenger tid vil føre til meir fargeutvikling og høgare OD.
Måling av absorpsjon	Måling av fargeutvikling (OD), mål på innhald av substans i serumprøva.	Må vere innstilt på riktig bølgjelengd (450 nm). Serumprøvene må vere fortynta slik at dei kjem innanfor platelesaren si grense (0.0-4.0). Brønnane må vere fri for bobler, då dette kan påverke absorpsjonen.
Mellomsteg:		
Inkubering	Tillèt høgaffinitetsspesifikke interaksjonar å bli danna mellom reaktantar. Interaksjonen er avhengig av nærleik mellom antigen og antistoff <ul style="list-style-type: none"> - Tid - Temperatur - Risting (aukar den kinetiske energien) Desse tre faktorane er medverkande til betre antigen-antistoff interaksjon.	Platene bør vere forseglade for å unngå fordamping (medverkande til «kanteffekten»). <ul style="list-style-type: none"> - For lang inkubering kan føre til veldig høge signal, tilsvarande vil kort inkubering kan føre til låge signal - Låg temperatur kan gje lågare OD-verdiar, høg temperatur kan gje høgare OD-verdiar - Risting kan gjere at det krevst mindre tid og lågare temperatur Ved optimal tid, temperatur og risting, vil meir antistoff-antigen kunne binde. Avvikande prosedyre ved desse faktorane kan derfor medføre til variasjon.
Vasking	Vaskebuffer nyttast til å fjerne overfløydige reaktantar (til eit ikkje-oppdagbart nivå) og fjerne ubunde material. Den brukast og for å oppretthalde isotonisitet, slik at interaksjonen mellom antigen og antistoff vert optimale.	Utilstrekkeleg vasking gjev høg bakgrunn, overdreven vasking kan føre til mindre sensitivitet. Dersom ikkje all vaskeløysing er blitt fjerna, kan reagensar i det neste steget bli fortynta.

5.1.2 «Kanteffekt» på ELISA-platene

Eit vanleg fenomen som kan føre til feil på ELISA-plata, er «kanteffekten». Dette er når dei ytre brønnane på plata oppfører seg annleis enn resten av brønnane. Grunnen kan vere ujamn temperatur over heile plata eller ulikskapar i produksjonen av sjølv ELISA-plata. Verdiane i desse brønnane kan variere, og ein viktig måte å bekrefte/avkrefte denne feilen på, er å køyre prøvene i duplikatar eller triplikatar [110, 111]. Ein interessant observasjon er at 8 av dei 13 serumprøvene med ein CV % på over 10 %, er serumprøver som ligg i brønner ytst på ELISA-plata. Det verkar derfor som at brønner i ytterkant av platene er ein faktor som er med å skapar meir variasjon.

Som vist i resultatet er det forskjell på kontrollprøvene vi har med på dei forskjellige platene (tabell 3.5 og 3.6). Ved tilfeldigheter har alle desse prøvene vore på ein ytterkant på minst éi av platene. Duplikatane og triplikatane av prøvene har likevel hatt ein CV % på under 10 %. Ein kan ikkje sjå vekk frå at dette kan ha vore ein medverkande faktor til at kontrollprøvene varierte mellom platene. I etterkant ser ein at kontrollprøvene burde ha vore meir spreidd på platene, og kanskje på same plass på kvar plate.

5.1.3 Bakgrunnssignal

Mange feilkjelder, som blokkering, vasking og konsentrasjon av sekundært antistoff forklart i tabell 4.1, vil gje utslag som høge bakgrunnssignal. Bakgrunnssignal vil kunne visast i dei blanke kontrollane (utan tilsett serum), og kan kome av uspesifikk binding til plastikken eller ustabilitet av substratet. Alle dei blanke kontrollane på platene hadde låge OD-verdiar (gjennomsnittleg OD-verdi på 0.059), noko som tyder på at det er lite bakgrunnssignal [111].

5.1.4 Serumprøver

5.1.4.1 Lagring av serumprøver

Serumprøvene nytta i prosjektet er lagra på -80 °C sidan 2009. Bevaring av den tredimensjonale kjemiske strukturen er avgjerande for antigen-antistoff binding. Endring i struktur eller molekylaggregering kan føre til lågare antistoff-antigen-aktivitet, og dermed eit lågare eller eit falskt negativt resultat [114].

For nokon cytokin er det vist degradering i serum oppbevart på -80 °C innan eitt år, medan andre er vist å halde seg stabile i opp til tre år [115]. Det er ikkje gjort stabilitetsforsøk på BAFF tidlegare, så det er uvisst om ei degradering av BAFF kan ha skjedd i løpet av oppbevaringsperioden. Vi kan difor ikkje sjå vekk i frå at det har skjedd ei degradering av BAFF.

Antistoff blir sett på som stabile komponentar og som opprettheld bindingsseta sine i lang tid, i forhold til andre protein[116, 117]. Det er oppgitt at serum kan bli lagra på $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for å unngå bakterievekst, og at lagring på $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ikkje er nødvendig. Ein skal likevel unngå frysetine-syklusar [117]. Ein studie gjort for anti-HIV antistoff ved bruk av ELISA-metoden, viste at antistoffet i serumprøvene heldt seg stabile i 18 år [114]. Stabilitetsstudiar på antistoff mot CdtB og flagellin er ikkje gjort tidlegare, så her kan vi heller ikkje sjå helt vekk frå ei eventuell degradering.

5.1.4.2 Risting av serumprøvene etter tining

Under gjennomføring av analysane blei ikkje serumprøvene rista etter tining. Det er vist at serumet dannar konsentrasjonsgradientar av substansane kalsium, kopar og natrium. Meir konsentrerte løysingar tinar først og legg seg på botnen av røyret, desse kan vere opptil hundre gongar meir konsentrerte enn løysingar på toppen av røyret. Også protein vil vere meir konsentrert i botnen av eppendorfrøyret [118]. Det er derfor anbefalt å riste kvart eppendorfrøyr mellom 10-20 gongar før ein brukar serumet [119, 120].

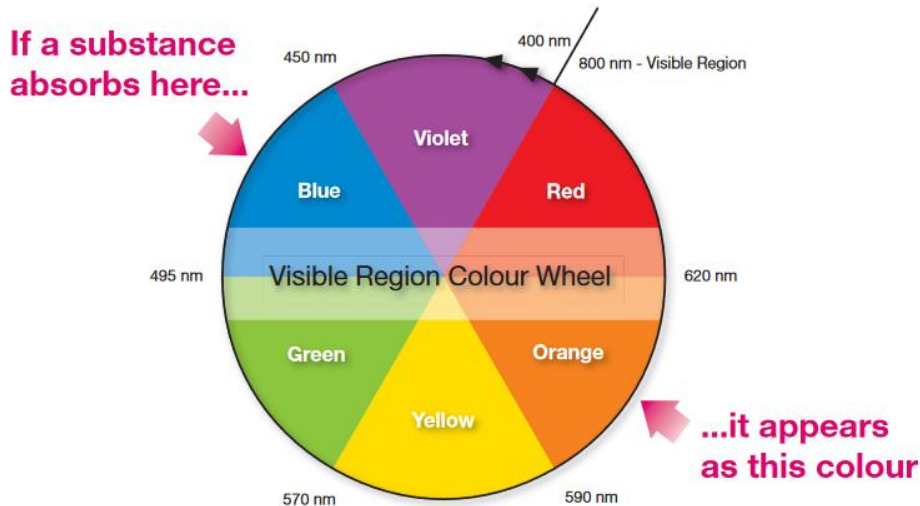
Ein har ikkje funne studiar som viser forskjell i fordelinga av antigen eller antistoff etter tining. Konsentrasjonsgradientane av Ca^{2+} , Cu^{2+} , Na^{+} seier oss likevel at serumet ikkje nødvendigvis er homogent etter tining. Dette kan ha medført eit høgare eller lågare resultat enn det som er reelt for serumprøva.

5.1.5 Fargeutvikling og måling av absorbans

Substratet TMB (1-StepTM Ultra TMB-Elisa), brukt til indirekte ELISA av anti-CdtB og anti-flagellin, er det mest sensitive av alle kromogene substrat [121]. Dette gjer at tida det tek frå substratet er tilsett, til fargereaksjonen er stoppa med svovelsyre, må vere veldig nøyaktig frå plate til plate. Små tidsforskjellar vil føre til varierende resultat mellom platene. I analysen brukte vi stoppeklokke frå substratet blei tilsett til stoppløysing blei tilsett, likevel kan tida det har gått å pipettere ha variert. Denne kjelda til variasjon vil påverke heile plata, og ikkje berre enkelte brønner slik andre feilkjelder gjer. Dersom vi hadde nytta eit mindre sensitivt substrat, som «1-Step Turbo TMB» eller «1-Step Slow TMB» ville fargeutviklinga ha gått seinare, og derfor ville rommet for tidsavvik, og dermed absorbans, vore større [121].

Absorbansen av ELISA-platene blir målt på 450 nm. Dette er absorbansen oppgitt for substratet TMB. Grunnen til at ein måler absorbansen på 450 nm sjølv om det er ein gul farge (560-600 nm) ein ser etter tilsetjing av stoppløysing, er fordi substansen absorberer lys på ei bølgelengd på 450 nm, medan fargen ein ser er den komplementære fargen slik som figur 5.1

viser [122]. Fargen til ei løysing er relatert til bølgjelengda til lyset absorbert i løysinga på ein komplementær måte. Ein ser ein gul farge i brønnane fordi den gule bølgjelengda (560-600 nm) ikkje absorberast [122, 123].



Figur 5.1. Fargehjulet med bølgjelengdene for dei synlege fargane. Dette forklarar kvifor ein målar absorpsjonen på 450 nm sjølv om ein ser ein gul farge i brønnane. Henta frå [122].

5.1.6 Plateforskjellar

Undersøking av kontrollprøvene som gjekk igjen på platene for anti-CdtB og anti-flagellin viser ein forskjell, sjå tabell 4.5 og 4.6. Ei justering ville ha ført til at verdiane blei meir like den plata ein justerte ut frå. Ved å ta gjennomsnittet av faktorane som skilde prøvene på dei forskjellige platene, undersøkte ein om desse konstantane kunne utlikne for plateforskjellane. Grunnen til at ei slik justering ikkje blei gjennomført på OD-verdiane til anti-CdtB og anti-flagellin, er fordi alle prøvene med ulik styrke ikkje kan justerast ut frå same faktor. Forholdet mellom OD-verdiane og konsentrasjonen av antistoff er ikkje-lineært, slik at serumprøver med låg konsentrasjon må justerast forskjellig frå andre prøver med høgare konsentrasjon. Den ikkje-lineære kurva seier oss at ulike OD-verdiar vil ha ulikt utslag for konsentrasjon av antistoff i serumprøva, då den er brattare i nokon OD-intervall enn andre.

Vi gjennomførde ei analyse av ei fjerde plate for anti-CdtB og anti-flagellin. Dette var ei gjentakning av dei same serumprøvene som på plate 1 for å undersøke om ein fekk like verdiar og om kontrollprøvene blei meir like kontrollprøvene på plate 2 og 3. Sidan dette i utgangspunktet ikkje var planlagt, hadde vi ikkje alikvotert serum til denne gjennomkøyringa. Serumet var derfor fryst-tint éin gong meir enn dei andre prøvene. Resultatet frå den fjerde plata skilde seg endå meir i frå resten av platene, og blei dermed forkasta, og er derfor ikkje teke med i resultatdelen.

Alle BAFF-platene har innehalde ei standardrekke i duplikatar Standardkurvene på kvar plate er tenkt til å justere for tekniske forskjellar og variasjon mellom platene. Eitkvart steg i prosedyren som kan føre til høgare eller lågare resultat, vil påverke standardrekka like mykje som serumprøvene. For eksempel vil lenger tid mellom tilsetjing av substrat og stopplysing føre til ein auka absorbans både for serumprøvene og standardrekka, og standardkurva vil då bli tilsvarande brattare for denne ELISA-plata.

5.1.7 Metode for å unngå plateforskjell

Å køyre serumprøvene i single fortyningar og bruke dei direkte avlesne OD-verdiane, slik det er blitt gjort her for anti-CdtB og anti-flagellin, er ein vanleg nytta metode [124]. Dette er også gjort i artiklane vi tok utgangspunkt i for dei to markørane [77, 81, 89, 90].

Det er mange faktorar som gjer at OD-verdien kan variere frå plate til plate, derfor bør alle plater ha ein standard som kan justere for dette [124]. Vidare nemner ein metodar som kan justere for plateforskjellar.

Stratifisering

Stratifisering av serumprøvene på dei forskjellige platene, gjer at alle sjukegruppene og kontrollgruppene er representerte på kvar plate. Dette vil derfor kunne utlikne forskjellane mellom platene. Men det gjer også at variasjonen i kvar enkelte gruppe kan vere større enn det som faktisk er tilfellet. Dette medverkar til det store standardavviket vi ser for alle sjukegruppene og kontrollgruppene, som blant anna kan gjere det vanskeleg å finne ein signifikant forskjell.

Justering

I dette prosjektet prøvde vi å gjennomføre ei platejustering, ved å nytte ein justeringskonstant basert på forholdet mellom kontrollprøver (sjå tabell 4.5 og 4.6). Denne metoden blei forkasta, sidan vi såg at forholdet mellom OD-verdien og konsentrasjonen av antistoff var ikkje-lineært. Ei justering av alle OD-verdiane med éin og same faktor for kvar prøve på ei plate blei dermed ikkje riktig.

Ein anna variant av dette er å køyre ei ekstra plate som referanseplate med prøver frå alle dei tre platene, og så kalibrere OD-verdiane frå dei andre platene ut frå denne plata. Alle platene ville ha blitt justert i den retninga resultatet på referanseplata viste. Det er dette blant anna Lunde et al. gjorde ved undersøking av BAFF i serum til CFS-pasientar [69]. I etterkant ser vi at i staden for å ta prøver berre frå den første plata på plate 4, kunne ha tatt med prøver

frå alle tre platene og brukt denne som ei referanseplate. Men dette måtte ha vore planlagt på førehand, slik at nok serum hadde vore alikvotert. Ein kan kjem heller med bruk av denne metoden vekk i frå at låge og låge OD-verdiar bør justerast ulikt.

Standardkurve og ELISA-einingar

Dersom ein hadde hatt ei prøve med kjend mengd antistoff (ei for anti-CdtB og ei for anti-flagellin) kunne ein, på same måten som blei gjort for BAFF, laga ei standardrekke og standardkurve. Ein kunne då ha rekna ut konsentrasjonen av antistoff i kvar serumprøve, og standardkurva ville ha justert for plateforskjellar. Ei standardkurve kunne ha vore nyttig, spesielt sidan ein mistenker at tida med fargeutvikling har vore ei viktig feilkjelde i dette prosjektet. Der finst ikkje ei standardprøve med kjend konsentrasjon av aktuelt antistoff kommersielt tilgjengeleg.

Miura et al. føreslår å nytte ELISA-einingar for å få meir pålitelege resultat. Ved bruk av eit serum med relativt høgt antistoff-nivå, kan ein lage ein referansestandard i ulike fortyningar. Ut frå likninga til referansestandard kan ein dermed rekne ut ELISA-einingar for alle serumprøvene. For å oppnå pålitelege data, er det viktig med kvalitetskontroll av standardkurva, då det er denne ein brukar til å finne ELISA-einingane. [124]. Ved å bruke denne metoden unngår ein å gjennomføre like mange fortyningar av serumet som ved «endpoint titer», dette er lønnsamt med tanke på tid og plateplass. Likevel går ein del av plata vekk til standard/referanse-kurve, slik at ein har mindre plass tilgjengeleg. Ei anna ulempe er at ein ikkje kan samanlikne med resultat gjort utan same referansestandard. Avgrensa økonomi og tid gjorde det ikkje mogleg å etablere ein referansestandard og teste ut ei re-analyse av våre prøver med ELISA-einingar.

Titring av prøver («endpoint titer»)

Forholdet mellom mengda av antistoff og OD er ikkje lineært, men er uttrykt ved hyperbolsk funksjon. For utrekning av endepunktet («endpoint titer») må ein derfor analysere fleire fortyningar av same prøve [124]. Ved «endpoint titer» brukar ein kvantitativ analyse av ei ukjend prøve ved å nytte ein negativ standard i staden for ein positiv. «Endpoint titer» er definert som den mest fortynta prøva med eit signal over «cutoff»-grensa, tradisjonelt definert som gjennomsnittet til dei blanke kontrollprøvene pluss to-tre standardavvik. Ein oppnår meir nøyaktige svar jo fleire fortyningar ein undersøker og det skal vere minst ei fortynting over og ei fortynting under «cutoff»-grensa [125].

Oppsummering

På bakgrunn av metodane nemnde ovanfor ville «endpoint titer» vore den mest pålitelege kvantitative analysen. Ved å bruke standardkurve og ELISA-einingar ville metoden ha blitt raskare, og vi ville ha fått justert for plateforskjellar og fått ei betre kvantitativ analyse. Ein anna fordel ved bruk av «endpoint titer» eller ELISA-einingar er at vi hadde hatt moglegheit til å oppdage «krokeffekten» av serumprøvene sidan dei blir titrerte og analyserte i ulike fortynningar. Om vi skulle ha valt ein anna metode enn berre stratifisering ville ELISA-einingar kunne ha vore den mest praktiske metoden å nytta i denne oppgåva på grunn av avgrensande tid og økonomi. Men metoden ville ha kravt mange fleire ELISA-plater, og derfor innkjøp av meir antigen, for at alle dei 102 serumprøvene skulle ha blitt analysert.

5.1.8 Serumkonsentrasjon til anti-CdtB og anti-flagellin (pilotstudie)

For deteksjon av anti-CdtB og anti-flagellin blei det brukt ei fortynning på 1:500. Dei same fortynna serumprøvene blei brukte for begge markørane, ei feilkjelde i tillaginga av desse vil derfor ha utslag for begge markørane. Oversikta over kontrollprøvene på dei forskjellige platene (tabell 3.5 og 3.6) viser, med eitt unntak, at prøvene for begge markørane har variert i same retning. Dette kan derfor bety at variasjonar i tillaging av serumfortynningar mellom kvar analyse kan ha påverka til varierende konsentrasjonar og dermed varierende resultat.

For substratet TMB er det oppgitt at det er anbefalt å måle OD mellom 0.7 og 0.9 [111]. Ein mogleg grunn til dette kan vere at forholdet mellom konsentrasjonen og OD-verdien i dette intervallet er i eit område som er meir sensitivt (ei brattare kurve). Gjennomsnittsverdiane for anti-CdtB (tabell 3.3) har hatt ein OD på mellom 0.7 til i overkant av 0.8. Noko som betyr at ein har hatt ei optimal fargeutviklingstid før stoppløysinga blei tilsett. For anti-flagellin har gjennomsnittet vore mellom 0.5 og 0.7 (tabell 3.4). Optimalt skulle denne reaksjonen ha gått litt lenger.

5.1.9 Studiepopulasjon

Sidan mange av personane i studiepopulasjonen er dei same i dei ulike sjukegruppene, betyr dette at resultatet i sjukegruppene vil bli nokså like. Dette ser ein i tabell 3.2-3.4.

Gjennomføring av utvalstørrelsekalkulering blei gjort med «statistical power». Funna gjort i studiane det er blitt tatt utgangspunkt i (tabell 3.2), viser at den største utvalstørrelsen kravt for å vise forskjell var for anti-flagellin (n=188). I tabell 4.4 ser vi at den totale utvalstørrelsen for anti-flagellin for IBS og kontrollgruppa var på 67. Dermed er studiepopulasjonen i dette prosjektet for låg til å kunne vise den same forskjellen som Dlugosz

et al. gjorde. For resten av dei utrekna prøvestørrelsane (tabell 3.2), har prosjektet stor nok populasjon til å vise dei same forskjellane. Til mindre forskjell det er mellom gjennomsnittsverdien til kontrollgruppa og gjennomsnittsverdien til den sjuke gruppa, til større utvalsstørrelse treng ein. Dette viser også tabell 3.2 for anti-flagellin, då ein treng større utvalsstørrelse for IBS i forhold til IBS-D.

Oversikta over studiepopulasjonen i tabell 4.1 viser at det er fleire kvinner enn menn som har sjukdomane og at gjennomsnittsalderen for sjukdomsgruppene er under 43 år. At det er overvekt av kvinner som har desse sjukdomane i denne studiepopulasjonen speglar befolkninga elles, då det er vist at dei er vanlegare hjå fleire kvinner enn menn (CFS 6:1, IBS 2:1) [40, 54]. I tillegg er det sett at mange av pasientane for desse sjukdomane får diagnosen før dei er fylt 50 år [40, 53]

Roma-II-kriteria brukte i diagnostiseringa av IBS er seinare blitt oppdaterte og finnast no som Roma IV-kriteria. Begrepet ubehag («discomfort») er blitt fjerna frå det nye kriteriet då det er for lite spesifikt og kan ha ulike meiningar på ulike språk. I tillegg er det gjort andre endringar i forbindelse med frekvensen av smerte. Den første populasjonsbaserte studien gjort viser at prevalensen av IBS gjekk ned med halvparten samanlikna med Roma III-kriteria. Og det er mogleg dette er grunna endringa relatert til «ubehag» i kriteria. Spørjeskjemaet brukt til diagnostiseringa (vedlegg 2) av pasientane i dette prosjektet baserer seg på «smerte eller ubehag», og det er derfor ikkje mogleg å bruke dette samanlikna med Roma IV. Dersom dei nyaste kriteria hadde blitt brukt på studiepopulasjonen i dette prosjektet, kan det tenkast at færre hadde blitt diagnostisert med IBS, sidan det er vist at prevalensen truleg går ned [55].

5.2 Resultat

5.2.1 BAFF

Resultatet av BAFF (tabell 3.1) viser at ein ikkje finn signifikante forskjellar mellom sjukdomsgruppene og kontrollane. Standardavvika for BAFF er mindre i forhold til dei vi ser ved anti-CdtB og anti-flagellin, og liknande dei estimerte standardavvika Lunde et al. og Lied et al. hadde i sine studiar [68, 69]. Dei er likevel store nok til at alle gruppene overlappar kvarandre.

5.2.1.1 CFS/ICF

I det einaste signifikante funnet gjort tidlegare av BAFF i sjukdomsgruppa CFS, utført av Lunde et al., blei det funne høgare BAFF-konsentrasjon i CFS-gruppa i forhold til friske kontrollar, og usikkerheit om resultatet vart diskutert. Dette fordi det var ei stor overlapping mellom

sjukdomsgruppa og kontrollgruppa, og det signifikante funnet truleg var på grunn av ei relativ stor studiegruppe [69].

Ser vi på CFS/ICF mot kontrollgruppa (tabell 3.1) er gjennomsnittet av BAFF-konsentrasjonen nokså lik, men CFS/ICF har eit lågare gjennomsnitt enn det kontrollgruppa har, noko som er motsett av det Lunde et al. fann i sin studie. Kontrollgruppa ein samanlikna CFS/ICF med i tabell 3.1 bestod av personar både eksponerte og ueksponerte for *Giardia*. Kontrollgruppa blei forsøkt skilt på basis av *Giardia*-eksponering, og analysert kvar for seg utan at nokon forskjellar blei funnen mellom gruppene

BAFF-konsentrasjonen til CFS/ICF-gruppa i dette prosjektet er høgare i forhold til den BAFF-konsentrasjonen Lunde et al. fekk for CFS. Det er brukt BAFF-kit frå same produsent, så ein går ut frå at same konsentrasjonen av serumet er blitt brukt [69]. Årsaka kan vere relatert til prøvetaking og lagring eller teknikk og instrument.

5.2.1.2 FGID, IBS og IBS-D

I personar med sjølvrapportert mathypersensitivitet er det blitt funne auka nivå av BAFF i serum i forhold til friske kontrollar og det finnast ein assosiasjon mellom matinntoleranse og IBS [68]. Det kan sjå ut som der er ei lita aukiing i BAFF-konsentrasjonen frå FGID til dei meir spesifikke undergruppene IBS og IBS-D, men auka er såpass lita at det er vanskeleg å seie om det er noko trend. Der er ingen signifikante funn. For IBS og IBS-D ligg BAFF-konsentrasjonen over gjennomsnittet til kontrollgruppa, slik som studien til Lied et al. viste [68]. Resultatet frå dette prosjektet kan derfor tyde på at BAFF ikkje er auka ved FGID slik det er vist å vere ved subjektiv matinntoleranse.

5.2.2 Anti-CdtB

Framstillinga av sjukdomsgruppene i tabell 3.3 viser at der ikkje er noko signifikant forskjell mellom desse gruppene og kontrollgruppene. Gjennomsnittet av OD-verdiane varierer litt, men det store standardavviket for alle gruppene seier at kvar gruppe har store variasjonar, og at gruppene overlappar kvarandre.

5.2.2.1 CFS/ICF

Anti-CdtB er ikkje tidlegare undersøkt i CFS/ICF-pasientar, og vi såg ingen signifikant forskjell i denne sjukdomsgruppa i forhold til kontrollgruppa.

5.2.2.2 FGID, IBS og IBS-D

Alle sjukdomsgruppene i dette prosjektet har lågare gjennomsnittsverdi av anti-CdtB-nivå i forhold til kontrollar. Dette er forskjellig frå studien Pimentel et al. utførde, då dei fann

signifikant høgare nivå i IBS-D-pasientar i forhold til friske kontrollar [77]. I tillegg er det ein minkande tendens av anti-CdtB frå FGID til den spesifikke undergruppa IBS-D, noko som er motsett av kva ein kunne forvente ut frå funna til Pimentel et al [77]. Studien tok føre seg IBS-D pasientar i forhold til friske kontrollar og pasientar med cøliaki og IBD, og har ikkje sett på andre former for IBS. Studien er utført med eit vesentleg større tal på IBS-D-pasientar (n=2375) i forhold til gruppene ein samanlikna med; friske kontrollar (n=43), cøliaki (n=121) og IBD (n=142). Det er derfor grunn til å undre på om denne store forskjellen på pasienttal kan ha medverka til eit signifikant funn [77].

OD-verdiane Pimentel har funne er generelt ein del høgare enn nivåa vi fann i dette prosjektet. Dette kan mogleg forklarast ut frå metoden. Studien har undersøkt plasma, og absorbansen er målt på 370 nm, noko som tyder på at eit anna konjugert enzym og substrat er brukt ved deteksjonen, sidan bølgjelengda avhenger av desse[77].

Den andre studien, utført av Schmulson et al. [81], som har sett på nivået av anti-CdtB i IBS-pasientar, fann fleire positive pasientar (brukte «cutoff»-verdi) i forhold til andre sjukegrupper, og der var ingen forskjell mellom PI-IBS og ikkje-PI-IBS [81]. Dette kan bety at mekanismen for utvikling av IBS ikkje inneberer tidlegare tarminfeksjon [81]. I vår studiepopulasjon var det fem personar som hadde hatt FGID eller IBS også før *Giardia*-infeksjon, undersøking av desse viste ingen forskjell i forhold til PI-IBS. Gruppa var likevel så lita at vi ikkje kan seie sikkert at der ikkje er noko forskjell.

Der er ein del som kan kritisera ved studien til Schmulson et al [81]. Den har ikkje undersøkt frekvensen av anti-CdtB i ei frisk kontrollgruppe, derfor er ikkje «cutoff»-verdien basert på denne slik som den ofte er. Det kjem heller ikkje fram korleis dei har bestemt denne grenseverdien. I tillegg baserer studien seg på ein liten studiepopulasjon (n=30), men som likevel er stor nok ut frå berekning i tabell 2) [81].

5.2.3 Anti-flagellin

Biomarkøren anti-flagellin blei ikkje funnen signifikant forskjellig mellom sjukegruppene og kontrollgruppene (tabell 3.4).

5.2.3.1 CFS/ICF

OD-verdien til anti-flagellin var lågare i CFS/ICF-gruppa (0.523) enn det den var i kontrollgruppa (0.666), men ikkje signifikant forskjellig. Denne biomarkøren er ikkje undersøkt i CFS-pasientar tidlegare, forventningane til å finne ein forskjell var derfor ikkje stor.

5.2.3.2 FGID, IBS og IBS-D

Den tidlegare studien gjennomført av Dlugosz et al. fann høgare nivå av anti-flagellin i IBS-pasientar, samanlikna med friske kontrollar. Dette er motsett av det som er funne i dette prosjektet. Studien såg at forskjellen i hovudsak kom frå det høge nivået av anti-flagellin i IBS-D-pasientar [89]. Vi kan derfor sjå ein likskap, sidan der er ei auke i OD-nivået frå FGID, til IBS og vidare til IBS-D. IBS-D er likevel under gjennomsnittet til kontrollgruppa.

Den andre studien, gjennomført av Schoepfer et al, har undersøkt anti-flagellin i serum til IBS-pasientar. Denne studien har sett på antistoff mot flagellin frå ein anna bakterie enn det vi har undersøkt i dette prosjektet [90], og det er derfor ikkje direkte samanliknbart. Mekanismen og hypotesen bak undersøkinga er likevel den same, og dei ulike flagellinmonomerane vil truleg påverke immunsystemet på same måte. Ein anna forskjell er at denne studien nytta «cutoff»-verdiar, og oppgjev ikkje gjennomsnittet av OD-verdiane, men frekvensen av pasientar over denne grenseverdien. Det blei funne signifikant fleire IBS-pasientar over «cutoff»-verdien samanlikna med friske kontrollar, spesielt dei med PI-IBS. Dette er forskjellig frå det Dlugosz et al. fann, sidan dei ikkje såg signifikant forskjell mellom PI-IBS og andre IBS-pasientar [89]. Ei avgrensing her er at studiepopulasjonen blir veldig liten. Dlugosz et al. seier deira tal på PI-IBS-pasientar er for liten til å seie om der er noko forskjell [89]. Det var ingen forskjell i nivå av anti-flagellin mellom PI-IBS og dei som hadde hatt IBS eller FGID før *Giardia*-infeksjon i dette prosjektet (n=5), men på lik linje som Dlugosz et al. er gruppa for lita til å seie noko sikkert.

5.2.4 «Cutoff»-verdiar

Studien utført av Schmulson et al. på anti-CdtB og Schoepfer et al. på anti-flagellin oppgav resultatet ved bruk av «cutoff»-verdiar [81, 90]. Schoepfer et al. oppgav denne verdien på tradisjonelt vis, ved å bruke gjennomsnittet til kontrollgruppa pluss to standardavvik ($\bar{x}+2D$). Schmulson et al. oppgjev ikkje korleis dei har komt fram til grenseverdien, og har heller ikkje ei frisk kontrollgruppe, så den er ikkje rekna ut frå det. Sidan kontrollgruppene for anti-CdtB og anti-flagellin ligg over sjukegruppene er tendensen at dei friske har høgare nivå av desse markørane enn dei sjuke. Derfor vil ei «cutoff»-grense i dette prosjektet ha betydning dersom vi tok gjennomsnittet til kontrollgruppa minus to standardavvik ($\bar{x}-2D$). Standardavvika i kontrollgruppene både for anti-CdtB og anti-flagellin (tabell 3.3 og 3.4) er store, for mange over halvparten av gjennomsnittsverdien. Derfor blir ein eventuell grenseverdi negativ, og dermed er «cutoff»-verdiar ikkje mogleg å bruke på same måte som i Schmulson et al. studien.

Ein perfekt diagnostisk test skal aldri gje positivt utslag for friske personar, og aldri

negativt utslag for sjuke pasientar [126]. Studien til Schoepfer et al. viser at der er ein større frekvens av pasientar med IBS som kjem over grenseverdien enn dei andre sjukdomsgruppene, likevel er det ei overvekt av diagnostiserte IBS-pasientar som ikkje kjem over grensa. Ein set derfor spørsmål ved kor riktig det blir å oppgje resultatet slik.

5.2.5 Effekt av fryse-tine-syklusar

Det blei funnen ein signifikant forskjell i BAFF nivå mellom prøver fryst-tint x1 og x3-x6, slik som figur 3.2 viser. Det er derfor utslagsgjevande om serumprøver går gjennom fleire enn éin fryse-tine-syklus, og ein kan forvente å finne mindre BAFF dersom dette skulle vere tilfellet. Vi ser ingen forskjell i degraderingsomfang mellom prøver med høge og låge konsentrasjon av BAFF, då forholdet mellom konsentrasjonane held seg forholdsvis likt etter degradering.

Resultatet her stemmer derfor overeins med den oppgitte informasjonen i BAFF-kitet om å unngå fryse-tine-syklusar [72]. Grunnen til BAFF-degraderinga kan vere at cytokinet ikkje tolerer for mange store temperaturforandringar før det blir brote ned til mindre delar, noko som gjer at det ikkje vil bli oppdaga i BAFF-kitet fordi det ikkje lenger vil binde til antistoffet. Å unngå fryse-tine-syklusar er viktig å merke seg for forskning i framtida, sidan dette vil kunne påverke og skjule eit eventuelt resultat, fordi ein målar mindre BAFF enn det som var der i utgangspunktet.

Effekt av fryse-tine-syklusar blei også undersøkt for anti-CdtB og anti-flagellin. På grunn av platevariasjonen mellom platene køyrde for desse markørane, gav dette utslag for resultatet til fryse-tine-prosjektet, og det er derfor ikkje undersøkt nærmare. Andre studiar gjort tidlegare på stabiliteten til fleire antistoff viser at antistoff verkar å vere meir stabile mot fryse-tine-syklusar enn det cytokin ser ut til å vere [116, 127]. Det er likevel oppgitt at serumprøver med lågt nivå av antistoff kan vere meir sensitive for oppbevaringsføresetnadar, og at serum derfor skal lagrast på -80 °C og fryse-tine-syklusar bør unngåast [116].

5.2.6 Avgrensingar/svakheiter med studien

Hypotesen vi hadde om å finne forskjellige nivå av biomarkørane BAFF, anti-CdtB og anti-flagellin i dei ulike sjukdomsgruppene CFS/ICF og FGID med undergruppene IBS og IBS-D mot kontrollgruppene, kan ikkje bekreftast i vår populasjon med slike plager etter *Giardia*-infeksjon. Gjennomsnitta av alle gruppene er like og spreinga av serumnivå i gruppene er stor. Det kan vere ein samansett grunn til dette, og ulike moglegheiter til kvifor vi ikkje finn noko forskjell er lista nedanfor

5.2.6.1 Serumprøver

Lang lagringsperiode av serumprøvene kan ha ført til degradering av markørane. Spesielt for BAFF då studiar har vist at cytokin ser ut til å vere meir ustabile enn antistoff. Sjølv om degraderingsfaktoren av BAFF verkar å vere lik, uavhengig av om serumprøva har høge eller låge verdiar i utgangspunktet, som vist i fryse-tine-prosjektet (figur 3.2), veit ein ikkje korleis dette er ved langvarig lagring. Dersom hastigheita i degraderinga av markørane er forskjellig i prøver med høge/låge verdiar vil dette ha påverknad for resultatet, og vil kunne jamne ut konsentrasjonsforskjellar.

5.2.6.2 Metode

Dei store standardavvika for anti-CdtB og anti-flagellin kan truleg forklarast ut frå ein større biologisk variasjon i antistoffnivå, og med den omtalte plateforskjellen. Sidan alle gruppene var fordelte på dei tre platene, vil plateforskjellsfaktoren vere medverkande til ein endå større forskjellar mellom prøvene i same gruppe enn det som kanskje er reelt. Standardavvika for BAFF er liknande dei estimerte standardavvika Lunde et al. og Lied et al. hadde (tabell 2), og er mindre i forhold til standardavvika for anti-CdtB og anti-flagellin.

Det kunne ha vore interessant å analysert dei same serumprøvene med ein anna analysemetode for å sett om vi fekk same resultat. Då ville vi eventuelt ha sett kor stor påverknad ELISA-metoden i dette prosjektet har å seie for resultatet. Andre analysemetodar nytta kunne til dømes ha vore kulebasert multipleks-analyse med fluorokrommerka sekundær antistoff («multiplex immunoassay»).

Dersom metoden har så stor påverknad på resultatet at det skjuler ein faktisk forskjell, bør det kanskje utviklast meir standardiserte metodar for gjennomføring av ELISA for anti-CdtB og anti-flagellin. Og kanskje utarbeiding ein «standard operating procedure» (SOP). Då blir det også lettare å samanlikne resultat frå forskjellige laboratorier og studiar.

5.2.6.3 Kryssreaksjon

Kryssreagerande antistoff kan forklare kvifor resultata i alle sjukdomsgruppene og kontrollgruppene er like. Kryssreaksjonar kan skje når spesifisiteten til epitopen eller epitopane (på antigena CdtB eller flagellin) ikkje er god nok til at berre spesifikke antistoff (anti-CdtB og anti-flagellin) bind [110]. Då vil andre antistoff i blodet kunne binde til antigenet, og det er ikkje mogleg å vite kor mykje anti-CdtB og anti-flagellin som faktisk er i prøva. Dette kunne undersøkast ved å ha ei positiv prøve med anti-CdtB og anti-flagellin på platene som hadde kjende nivå av antistoff. Dersom det viste seg at dette faktisk var eit problem kunne vi kanskje klart å finne fram til meir spesifikke epitopar, for eksempel ved å dele antigena i mindre einingar

eller peptid, og coata ELISA-platene med desse. Ein kan også tenkje seg at antigena brukte i dette prosjektet er frå ein anna, og meir urein, «batch» og hadde dårlegare spesifisitet enn antigena dei andre studiane har brukt.

5.2.6.4 Pasientgrupper og post-infeksiøs sjukdom

Pasientgruppene i dette prosjektet skil seg frå mange av dei andre studiane vi har sett på, sidan omtrent alle personane fekk plagene etter *Giardia*-infeksjon, og derfor har postinfeksiøse plager. Dersom vi tek utgangspunkt i at resultatet er riktig, at sjukegruppene ikkje skil seg frå kontrollgruppene og at der er ein like stor variasjon i alle gruppene, kan vi undre på om denne typen av CFS og IBS skil seg frå ikkje-postinfeksiøse sjukegrupper. For studiane som har sett på IBS i forhold til PI-IBS har det vore varierende resultat i forhold til om det er blitt funnen ein forskjell eller ikkje (tabell 4.1). Anten blei det ikkje funnen noko forskjell, eller så var det høgare nivå i personar med PI-IBS. Ofte er funna gjort i IBS-pasientar knytt til dei med IBS-D, og desse er ofte assosiert med PI-IBS. Derfor skulle vi tru at føresetnadane for å finne forskjellar ved undersøking av postinfeksiøs FGID og IBS i forhold til kontrollar var større enn om det hadde vore ei generell sjukegruppe (ikkje-postinfeksiøse).

5.2.6.5 Kontrollgruppene

Det har ikkje vore noko forskjell i resultatet mellom den ueksponeerte og eksponeerte kontrollgruppa. Ideelt kunne alle kontrollane ha vore *Giardia*-eksponeerte utan utvikling av seinplager. Dette fordi forskjellen vi har sett etter er sjukdom i forhold til ikkje-sjukdom, og ikkje om ein har vore infisert med *Giardia* eller ikkje. Den eksponeerte kontrollgruppa var ikkje stor nok, derfor blei ueksponeerte kontrollar som var rekruttert for parallelle studiar av *Giardia*-spesifikk immunitet også brukt.

5.2.7 Bakgrunnsteori i forhold til resultat

5.2.7.1 Tarmbarriere (anti-CdtB og anti-flagellin)

Teorien bak undersøkinga av markørane anti-CdtB og anti-flagellin ved IBS har vore at tarmbarrieren er svekka, noko som tillét antigen å passere over til lamina propria. Ein vil derfor finne auka nivå av bakteriar eller bakterieprodukt i desse personane i forhold til friske personar. Toksinet CdtB kan skape inflammasjon i tarmen, og vil ulikt flagellin ha ein direkte påverknad av tarmbarrieren [76]. Ved PI-IBS er det ein infeksjon (i dette prosjektet forårsaka av *Giardia*) som startar svekkinga av tarmbarrieren, og er starten på utviklinga til IBS.

Ulike infeksjonar har ulik påverknad på tarmbarrieren. Sidan vi ikkje finn forskjellar mellom sjukegrupper forårsaka av *Giardia*-infeksjon og kontrollar, kan det tyde på at

Giardia ikkje har same påverknad på tarmbarrieren som det andre infeksjonar har, og at funn gjort tidlegare på postinfeksiøse grupper, har hatt infeksjonar forårsaka av ein anna mikroorganisme enn *Giardia*.

Resultatet for anti-CdtB og anti-flagellin tyder på at sjukdomsgruppene ikkje har noko meir svekka tarmbarriere eller eventuelt like svekka tarmbarriere som kontrollane, og at dei i tillegg har vore utsette for flagellin og CdtB i like stor grad.

5.2.7.2 BAFF

Hjå CFS-pasientar er det tenkt at auka BAFF-nivå kan ha samanheng med eit aktivert B-cellesystem [69]. I tillegg har denne markøren høg konsentrasjon ved kronisk inflammatoriske prosessar, og derfor hypoteserar ein at BAFF kan vere involvert i framdrifta av IBS [64]. Funn gjort i personar med overkjenslereaksjonar for mat styrkar også teorien om å gjere funn i IBS-pasientar, då det er ein sterk assosiasjon mellom IBS og matinntoleranse [68]. Ingen av desse teoriane vart bekrefta av resultata våre, og vi kan igjen lure på om også her har skjedd ein kryssreaksjon. BAFF er ulik dei to andre markørane vi undersøker, då alle menneske har eit visst nivå av dette cytokinet i blodet, medan antistoff mot CdtB og flagellin finnast berre hjå dei personane som er blitt utsette for antigena. Resultatet i dette prosjektet tilseier derfor at pasientar med langvarige plager etter *Giardia*-infeksjon ikkje har noko auka nivå av BAFF i forhold til kontrollar.

5.3 Konklusjon

- Det blei ikkje gjort signifikante funn for nokon av dei tre markørane BAFF, anti-CdtB og anti-flagellin mellom sjukdomsgruppene CFS/ICF, FGID og IBS i forhold til kontrollgruppene. Ut frå resultatet i dette prosjektet vil derfor ikkje desse substansane kunne fungere som biomarkørar til dei nemnde sjukdomsgruppene. Resultatet kan skuldast svakheit i metoden, og vidare studiar er naudsynt for å avklare om dei kan brukast som biomarkørar i visse populasjonar.
- Heller ikkje i den meir spesifikke subgruppa IBS-D fann vi signifikante forskjellar mellom gruppene. Tendensane frå FGID til undergruppene IBS og IBS-D gjekk riktig nok i rett retning for anti-flagellin, då nivåa av markørane auka til meir spesifikke diagnosen blei.
- Konsentrasjonen av BAFF i serumprøvene blei lågare for prøvene fryst og tint tre og seks gongar i forhold til éin gong. Det var ein signifikant forskjell mellom prøver fryst-

tint éin gong og tre gonger, og éin gong og seks gonger. Det er derfor truleg ein utslagsgjevande effekt dersom serumprøvene blir fryst-tint meir enn éin gong.

- Pilotstudien brukt til metodeutvikling for deteksjon av anti-CdtB og anti-flagellin viste at ein serumkonsentrasjon på 1:500 var passande for dei begge, derfor blei denne brukt i analysen.

5.4 Vidare forskning / framtidige perspektiv

Å finne biomarkørar i CFS og FGID (IBS) vil vere svært nytting i forhold til diagnostiseringa av sjukdomane. Det vil ha ein samfunnsøkonomisk nytteverdi sidan pasientane blir diagnostiserte tidlegare og raskare. Pasientane vil sleppe å gjennomgå unødvendige diagnostiske testar og vil få ei organisk stadfesting av sjukdomen, noko som kan vere lettare å stille seg til. Ein biomarkør kan hjelpe for forståing av utviklinga av sjukdomane og mekanismen bak. Noko som igjen kan føre til oppdaging av behandlingsmål eller legemiddelmål.

Vidare forskning kan undersøke desse biomarkørane i dei same prøvene ved å bruke ein meir nøyaktig metode for deteksjon av antistoff mot CdtB og flagellin, som for eksempel «end point titer» eller kulebasert «multiplex immunoassay».

Dersom dette ikkje gav noko meir klarheit ville ein ha samla inn eit nytt material der både generell IBS utan infeksjøs årsak og PI-IBS var representert, og så undersøkt desse med ein av metodane nemnt overfor. Der er også god grunn til å undersøke andre kandidatar som kan i jakta på ein god biomarkør. Lipopolysakkarid (LPS) er eit anna mikrobielt produkt vi kunne ha sett nærmare på og som også er blitt funnen å vere høgare i IBS-D i forhold til kontrollar [89]. Antistoff mot vinculin, eit adhesjonsprotein i tarmen til verten, er også blitt funnen høgare i IBS-pasientar i forhold til friske kontrollar, IBD og cøliaki [77].

Biomarkørane treng ikkje nødvendigvis å finnast i serum, og det er også moglegheit for å undersøke anna material som spytt, avføring eller undersøke meir på cellulært- eller organnivå. For PI-IBS kan tarmfloraen bli undersøkt nærmare, då det kan vere ein årsakssamanheng for seinare utvikling av IBS, med tanke på korleis tarmfloraen er samansett og let seg påverke av ein infeksjon [128].

Referansar

1. Sompayrac, L., *How The Immune System Works*. 5. ed. 2016, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, UK. : John Wiley & Sons, Ltd.
2. Sand, O., Sjaastad, Ø. V., Haug, E. , *Menneskets fysiologi*. 2 ed. 2014, Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS. 872.
3. Britannica Academic. *Antigen*. [Internett], [Henta 16.05.17] Tilgjengeleg frå: <http://academic.eb.com/levels/collegiate/article/antigen/7823>.
4. Britannica Academic. *Epitope*. [Internett], [Henta 16.05.17] 16. mai, 2017] Tilgjengeleg frå: <http://academic.eb.com/levels/collegiate/article/epitope/475856>.
5. Bogen, B., Munthe, L. A. , *Immunologi*. 2. ed. 2009, Oslo: Universitetsforlaget.
6. Britannica Academic. *interleukin (IL)*. [Internett] [Henta 20.05.17] 20. mai, 2017] Tilgjengeleg frå: <http://academic.eb.com/levels/collegiate/article/interleukin/42550>.
7. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. **17**(1): p. 1-14.
8. Ubeda, C., A. Djukovic, and S. Isaac, *Roles of the intestinal microbiota in pathogen protection*. Clin Transl Immunology, 2017. **6**(2): p. e128.
9. Rolhion, N. and B. Chassaing, *When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2016. **371**(1707).
10. Jetten, N., et al., *Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo*. Angiogenesis, 2014. **17**(1): p. 109-18.
11. Salvo Romero, E., et al., *The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease*. Rev Esp Enferm Dig, 2015. **107**(11): p. 686-96.
12. Lechuga, S. and A.I. Ivanov, *Disruption of the epithelial barrier during intestinal inflammation: Quest for new molecules and mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2017.
13. Oshima, T. and H. Miwa, *Gastrointestinal mucosal barrier function and diseases*. J Gastroenterol, 2016. **51**(8): p. 768-78.
14. Lee, S.H., *Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases*. Intest Res, 2015. **13**(1): p. 11-8.
15. Guttman, J.A. and B.B. Finlay, *Tight junctions as targets of infectious agents*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(4): p. 832-41.
16. Halliez, M.C. and A.G. Buret, *Extra-intestinal and long term consequences of Giardia duodenalis infections*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(47): p. 8974-85.
17. Quigley, E.M., *Leaky gut - concept or clinical entity?* Curr Opin Gastroenterol, 2016. **32**(2): p. 74-9.
18. Kelly, J.R., et al., *Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders*. Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 392.
19. Briers, D. *Junctions between cells simplified* [Internett], 23.12.2012 [Henta 31.03.17] Tilgjengeleg frå: <http://www.dbriers.com/tutorials/2012/12/junctions-between-cells-simplified/>.
20. Adam, R.D., *Biology of Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(3): p. 447-75.

21. Wensaas, K.A., et al., *Postinfectious and sporadic functional gastrointestinal disorders have different prevalences and rates of overlap: results from a controlled cohort study 3 years after acute giardiasis*. Neurogastroenterology & Motility, 2016: p. n/a-n/a.
22. Lane, S. and D. Lloyd, *Current trends in research into the waterborne parasite Giardia*. Crit Rev Microbiol, 2002. **28**(2): p. 123-47.
23. Lopez-Romero, G., et al., *Host defences against Giardia lamblia*. Parasite Immunol, 2015. **37**(8): p. 394-406.
24. Dawson, S.C., *An insider's guide to the microtubule cytoskeleton of Giardia*. Cell Microbiol, 2010. **12**(5): p. 588-98.
25. Bjørklund, A.E., Johnsen, G. H. , *Parasitter i råvann; Cryptosporidium parvum og Giardia lamblia. Status i Norge, 2005*. . 2005, Bergen.
26. Nygård, K., et al., *A large community outbreak of waterborne giardiasis- delayed detection in a non-endemic urban area*. BMC Public Health, 2006. **6**(1): p. 1-10.
27. Folkehelseinstituttet. *Giardiasis - veileder for helsepersonell*. [Internett] 01.03.2016 [Henta 17.03.17] Tilgjengeleg frå:
<https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/giardiasis---veileder-for-helsepers/>
28. Hanevik, K., et al., *Persisting symptoms and duodenal inflammation related to Giardia duodenalis infection*. J Infect, 2007. **55**(6): p. 524-30.
29. Einarsson, E., S. Ma'ayeh, and S.G. Svard, *An up-date on Giardia and giardiasis*. Curr Opin Microbiol, 2016. **34**: p. 47-52.
30. Grover, M., et al., *On the fiftieth anniversary Postinfectious irritable bowel syndrome: mechanisms related to pathogens*. Neurogastroenterology & Motility, 2014. **26**(2): p. 156-167.
31. Soares, R. and T. Tasca, *Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis*. J Microbiol Methods, 2016. **129**: p. 98-102.
32. Heyworth, M.F., *Immunological aspects of Giardia infections*. Parasite, 2014. **21**: p. 55.
33. Escobedo, A.A., et al., *Management of chronic Giardia infection*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2014. **12**(9): p. 1143-57.
34. Cama, V.A. and B.A. Mathison, *Infections by Intestinal Coccidia and Giardia duodenalis*. Clin Lab Med, 2015. **35**(2): p. 423-44.
35. Hanevik, K., et al., *Development of functional gastrointestinal disorders after Giardia lamblia infection*. BMC Gastroenterol, 2009. **9**: p. 27.
36. Collatz, A., et al., *A Systematic Review of Drug Therapies for Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis*. Clin Ther, 2016. **38**(6): p. 1263-1271.e9.
37. Maes, M., et al., *Diagnosis of myalgic encephalomyelitis: where are we now?* Expert Opin Med Diagn, 2013. **7**(3): p. 221-5.
38. Appel, S., J. Chapman, and Y. Shoenfeld, *Infection and vaccination in chronic fatigue syndrome: myth or reality?* Autoimmunity, 2007. **40**(1): p. 48-53.
39. Katz, B.Z. and L.A. Jason, *Chronic fatigue syndrome following infections in adolescents*. Curr Opin Pediatr, 2013. **25**(1): p. 95-102.
40. Lorusso, L., et al., *Immunological aspects of chronic fatigue syndrome*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(4): p. 287-91.

41. Morch, K., et al., *Chronic fatigue syndrome 5 years after giardiasis: differential diagnoses, characteristics and natural course*. BMC Gastroenterol, 2013. **13**: p. 28.
42. Castro-Marrero, J., et al., *Treatment and management of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: all roads lead to Rome*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(5): p. 345-369.
43. McBeth, J., et al., *Common and unique associated factors for medically unexplained chronic widespread pain and chronic fatigue*. J Psychosom Res, 2015. **79**(6): p. 484-91.
44. Wensaas, K.A., et al., *Irritable bowel syndrome and chronic fatigue 3 years after acute giardiasis: historic cohort study*. Gut, 2012. **61**(2): p. 214-9.
45. Tidsskriftet Den Norske Legeforening, Owe, J., Næss, H., Tysnes, O.-B. . *Hvem skal utrede kronisk utmattelse?* [Internett]. [Henta 5.04.2017] Tilgjengeleg frå: <http://tidsskriftet.no/2016/12/kommentar-og-debatt/hvem-skal-utrede-kronisk-utmattelse>.
46. Fukuda, K., et al., *The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study*. International Chronic Fatigue Syndrome Study Group. Ann Intern Med, 1994. **121**(12): p. 953-9.
47. Brurberg, K.G., et al., *Case definitions for chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (CFS/ME): a systematic review*. BMJ Open, 2014. **4**(2): p. e003973.
48. Helsedirektoratet. *Utredningsskjema etter CDC1994 Fukudakriteriene*. [Internett] [Henta 05.04.2017] [cited 2017 5. april]; Tilgjengeleg frå: <https://helsedirektoratet.no/Documents/CFS-ME/Utredningsskjema%20etter%20CDC1994%20Fukudakriteriene.pdf>.
49. Corazziari, E., *Definition and epidemiology of functional gastrointestinal disorders*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004. **18**(4): p. 613-31.
50. Talley, N.J., *Functional gastrointestinal disorders as a public health problem*. Neurogastroenterol Motil, 2008. **20 Suppl 1**: p. 121-9.
51. Drossman, D.A., *Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features and Rome IV*. Gastroenterology, 2016.
52. Rome criteria, *Comparison Table of Rome II & Rome III Adult Diagnostic Criteria*. [Internett] [Henta 05.04.2017] Tilgjengeleg frå: http://www.romecriteria.org/assets/pdf/20_RomeIII_apB_899-916.pdf.
53. Oswiecimska, J., et al., *New insights into the pathogenesis and treatment of irritable bowel syndrome*. Adv Med Sci, 2017. **62**(1): p. 17-30.
54. Plavsic, I., et al., *Diagnosis of Irritable Bowel Syndrome: Role of Potential Biomarkers*. Gastroenterol Res Pract, 2015. **2015**: p. 490183.
55. Schmulson, M.J. and D.A. Drossman, *What Is New in Rome IV*. J Neurogastroenterol Motil, 2017. **23**(2): p. 151-163.
56. Soares, R.L., *Irritable bowel syndrome: a clinical review*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(34): p. 12144-60.
57. Enck, P., et al., *Irritable bowel syndrome*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16014.
58. Grover, M., et al., *On the fiftieth anniversary. Postinfectious irritable bowel syndrome: mechanisms related to pathogens*. Neurogastroenterol Motil, 2014. **26**(2): p. 156-67.

59. Lakhan, S.E. and A. Kirchgessner, *Gut inflammation in chronic fatigue syndrome*. Nutr Metab (Lond), 2010. **7**: p. 79.
60. Kim, J.H., E. Lin, and M. Pimentel, *Biomarkers of Irritable Bowel Syndrome*. J Neurogastroenterol Motil, 2017. **23**(1): p. 20-26.
61. Colburn, W.A., *Optimizing the use of biomarkers, surrogate endpoints, and clinical endpoints for more efficient drug development*. J Clin Pharmacol, 2000. **40**(12 Pt 2): p. 1419-27.
62. Aronson, J.K., *Biomarkers and surrogate endpoints*. Br J Clin Pharmacol, 2005. **59**(5): p. 491-4.
63. Rihacek, M., et al., *B-Cell Activating Factor as a Cancer Biomarker and Its Implications in Cancer-Related Cachexia*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 792187.
64. Zhang, P., et al., *B Cell-Activating Factor as a New Potential Marker in Inflammatory Bowel Disease*. Digestive Diseases and Sciences, 2016. **61**(9): p. 2608-2618.
65. Uzzan, M., et al., *B Cell-Activating Factor (BAFF)-Targeted B Cell Therapies in Inflammatory Bowel Diseases*. Dig Dis Sci, 2016. **61**(12): p. 3407-3424.
66. Hoffman, W., F.G. Lakkis, and G. Chalasani, *B Cells, Antibodies, and More*. Clin J Am Soc Nephrol, 2016. **11**(1): p. 137-54.
67. Vincent, F.B., et al., *The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity*. Cytokine Growth Factor Rev, 2013. **24**(3): p. 203-15.
68. Lied, G.A., et al., *Intestinal B cell-activating factor: an indicator of non-IgE-mediated hypersensitivity reactions to food?* Aliment Pharmacol Ther, 2010. **32**(1): p. 66-73.
69. Lunde, S., et al., *Serum BAFF and APRIL Levels, T-Lymphocyte Subsets, and Immunoglobulins after B-Cell Depletion Using the Monoclonal Anti-CD20 Antibody Rituximab in Myalgic Encephalopathy/Chronic Fatigue Syndrome*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0161226.
70. Simren, M., et al., *Food-related gastrointestinal symptoms in the irritable bowel syndrome*. Digestion, 2001. **63**(2): p. 108-15.
71. Monsbakken, K.W., P.O. Vandvik, and P.G. Farup, *Perceived food intolerance in subjects with irritable bowel syndrome-- etiology, prevalence and consequences*. Eur J Clin Nutr, 2006. **60**(5): p. 667-72.
72. *Quantikine®ELISA, Human BAFF/BLyS/TNFSF13B*. 2016, R&D Systems
73. Cuhadar, S., et al., *The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples*. Biochem Med (Zagreb), 2013. **23**(1): p. 70-7.
74. Kachhawa, K., et al., *Study of the Stability of Various Biochemical Analytes in Samples Stored at Different Predefined Storage Conditions at an Accredited Laboratory of India*. J Lab Physicians, 2017. **9**(1): p. 11-15.
75. Lee, J.E., S.Y. Kim, and S.Y. Shin, *Effect of Repeated Freezing and Thawing on Biomarker Stability in Plasma and Serum Samples*. Osong Public Health Res Perspect, 2015. **6**(6): p. 357-62.
76. Fais, T., et al., *Impact of CDT Toxin on Human Diseases*. Toxins (Basel), 2016. **8**(7).
77. Pimentel, M., et al., *Development and validation of a biomarker for diarrhea-predominant irritable bowel syndrome in human subjects*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126438.

78. Frisan, T., *Bacterial genotoxins: The long journey to the nucleus of mammalian cells*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1858**(3): p. 567-75.
79. Ohara, M., E. Oswald, and M. Sugai, *Cytolethal distending toxin: a bacterial bullet targeted to nucleus*. J Biochem, 2004. **136**(4): p. 409-13.
80. Jinadasa, R.N., et al., *Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages*. Microbiology, 2011. **157**(Pt 7): p. 1851-75.
81. Schmulson, M., R. Balbuena, and C. Corona de Law, *Clinical experience with the use of anti-CdtB and anti-vinculin antibodies in patients with diarrhea in Mexico*. Rev Gastroenterol Mex, 2016. **81**(4): p. 236-239.
82. Duan, Q., et al., *Flagella and bacterial pathogenicity*. J Basic Microbiol, 2013. **53**(1): p. 1-8.
83. Kruger, T. and M. Engstler, *Flagellar motility in eukaryotic human parasites*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **46**: p. 113-27.
84. Fedirko, V., et al., *Exposure to bacterial products lipopolysaccharide and flagellin and hepatocellular carcinoma: a nested case-control study*. BMC Med, 2017. **15**(1): p. 72.
85. Chaban, B., H.V. Hughes, and M. Beeby, *The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **46**: p. 91-103.
86. Winstanley, C. and J.A. Morgan, *The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis*. Microbiology, 1997. **143** (Pt 10): p. 3071-84.
87. Ramos, H.C., M. Rumbo, and J.C. Sirard, *Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa*. Trends Microbiol, 2004. **12**(11): p. 509-17.
88. Carranza, P.G. and H.D. Lujan, *New insights regarding the biology of Giardia lamblia*. Microbes and Infection, 2010. **12**(1): p. 71-80.
89. Dlugosz, A., et al., *Increased serum levels of lipopolysaccharide and anti-flagellin antibodies in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome*. Neurogastroenterol Motil, 2015. **27**(12): p. 1747-54.
90. Schoepfer, A.M., et al., *Antibodies to flagellin indicate reactivity to bacterial antigens in IBS patients*. Neurogastroenterol Motil, 2008. **20**(10): p. 1110-8.
91. Nygard, K., et al., *A large community outbreak of waterborne giardiasis-delayed detection in a non-endemic urban area*. BMC Public Health, 2006. **6**: p. 141.
92. Hanevik, K., et al., *Immunophenotyping in post-giardiasis functional gastrointestinal disease and chronic fatigue syndrome*. BMC Infect Dis, 2012. **12**: p. 258.
93. CDC, Centers for Disease Control and Prevention, *Chronic Fatigue Syndrome (CFS), Diagnosis*. [Internett] 14.05.2012 [Henta: 25.04.17]; Tilgjengeleg frå: <https://www.cdc.gov/cfs/diagnosis/>.
94. Thermo Fisher Scientific, *Plasma and Serum Preparation*. [Internett] [Henta 16.05.17] Tilgjengeleg frå: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/elisa-protocol/elisa-sample-preparation-protocols/plasma-and-serum-preparation.html>.
95. Day, M.J., *Introduction to Antigen and Antibody Assays*. Top Companion Anim Med, 2015. **30**(4): p. 128-31.

96. Aydin, S., *A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA*. *Peptides*, 2015. **72**: p. 4-15.
97. Shah, K. and P. Maghsoudlou, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics*. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2016. **77**(7): p. C98-101.
98. Thermo Fisher Scientific, *Overview of ELISA*. [Internett] [Henta 21.04.17]; Tilgjengeleg frå: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>
99. Leinco Technologies, Inc, *Indirect ELISA Protocol*. [Internett] [Henta 22.04.17] Tilgjengeleg frå: http://www.leinco.com/indirect_elisa.
100. Sino Biological Inc., *ELISA encyclopedia, From the sample to the reading, Indirect ELISA Protocol*. [Internett] [Henta 20.04.17] Tilgjengeleg frå: <http://www.elisa-antibody.com/index.php?page=indirect-elisa-protocol>.
101. Abcam, *Indirect ELISA protocol, General procedure and tips for ELISA assay requiring a secondary conjugated antibody*. *Indirect ELISA protocol* [Internett] [Henta 22. 04, 2017]; Tilgjengeleg frå: <http://www.abcam.com/protocols/indirect-elisa-protocol>.
102. Dakterzada, F., et al., *Induction of humoral immune response against Pseudomonas aeruginosa flagellin(1-161) using gold nanoparticles as an adjuvant*. *Vaccine*, 2016. **34**(12): p. 1472-9.
103. Abbbcccam, *Calculating and evaluating ELISA data* [Internett] [Henta 26.04.17]; Tilgjengeleg frå: <http://www.abcam.com/protocols/calculating-and-evaluating-elisa-data>.
104. Kunnskapsbasert praksis, Mediesenteret, Høgskolen i Bergen, 2012, *Stratifisert randomisering*. [Internett] [Henta 26.04.17] april, 2017]; Tilgjengeleg frå: <http://kunnskapsbasertpraksis.no/ordliste/stratifisert-randomisering/>.
105. Kirkwood, B.R., Sterne, J. A. C *Essential Medical Statistics* Second ed. 2003, Blackwell Publishing Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford, OX4 2DQ, UK: Blackwell Science Ltd.
106. Dumas-Mallet, E., et al., *Low statistical power in biomedical science: a review of three human research domains*. *R Soc Open Sci*, 2017. **4**(2): p. 160254.
107. Statistics How To, *Statistical Power: What it is, How to Calculate it*. [Internett] [Henta 26.04.17]; Tilgjengeleg frå: <http://www.statisticshowto.com/statistical-power/>.
108. Statistical Solutions LLC, *Power & Sample Size Calculator, using the 1-Sample Z-test method* [Internett] [Henta 26.04.17] Tilgjengeleg frå: http://www.statisticalsolutions.net/pssZtest_calc.php.
109. Cochrane, *Obtaining standard deviations from standard errors, confidence intervals, t values and P values for differences in means*. [Internett] [Henta 08.05.17] Tilgjengeleg frå: http://handbook.cochrane.org/chapter_7/7_7_3_3_obtaining_standard_deviations_from_standard_errors.htm.
110. Bio-Rad, *Helpful ELISA Hints*. [Internett] [Henta 06.05.17] Tilgjengeleg frå: <https://www.bio-rad-antibodies.com/helpful-elisa-hints.html>.
111. SeraCare Life Sciences and KPL Power Your Immunoassays, *Technical Guide for ELISA*, S.L.S.a.K.P.Y. Immunoassays, Editor. 2013. p. 4-43.

112. Thermo Fisher, *Thermo Scientific Pierce Assay Development Technical Handbook*. Version 2:[Internett] [Henta 09.05.17] Tilgjengeleg frå: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602127-Assay-Development-Handbook.pdf>.
113. Sino Biological Inc. Biological Solution Specialist, *ELISA Tips*. ; [Internett] [Henta 09.05.17] Tilgjengeleg frå: <http://www.elisa-antibody.com/elisa-tips/>.
114. Castejon, M.J., et al. , *Stability of anti-HIV antibodies in serum samples stored for two to eighteen years periods*. J Bras Patol Med Lab, 2014: p. 272-277.
115. de Jager, W., et al., *Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays*. BMC Immunol, 2009. **10**: p. 52.
116. Hong, Y., et al., *Effect of storage conditions and freeze/thaw cycles on serum and plasma levels of anti-acetylcholine receptor (AChR) antibody*. Clin Chem Lab Med, 2014. **52**(6): p. e103-5.
117. Pacific Immunology, *Antibody Storage*. [Internett] [Henta 08.05.17] Tilgjengeleg frå: <https://www.pacificimmunology.com/resources/antibody-characterization/antibody-storage/>.
118. Idexx, *ELISA Technical Guide*. [Internett] [Henta 08.05.17] Tilgjengeleg frå: https://www.idexx.com/pdf/en_us/livestock-poultry/elisa-technical-guide.pdf.
119. Hawker, C.D., et al., *Development and validation of an automated thawing and mixing workcell*. Clin Chem, 2007. **53**(12): p. 2209-11.
120. Omang, S.H. and O.D. Vellar, *Concentration gradients in biological samples during storage, freezing and thawing*. Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie, 1974. **269**(3): p. 177-181.
121. Thermo Fisher, *1-Step™ Ultra TMB - ELISA Substrate*. [Internett] [Henta 11.05.17] Tilgjengeleg frå: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/34028B?ICID=search-product>.
122. Royal Society of Chemistry, *Food dye analysis*. Learn Chemistry, Enhancing learning and teaching 2009 [Internett] [Henta 03.05.17] Tilgjengeleg frå: <http://www.rsc.org/learn-chemistry/resource/res00000282/spectroscopy-in-a-suitcase-uv-vis-student-resources?cmpid=CMP00001304#!cmpid=CMP00000323>.
123. United States Naval Academy, *SPECTROPHOTOMETRY*. [Internett] [Henta 11.05.17]; Tilgjengeleg frå: <https://www.usna.edu/ChemDept/files/documents/manual/ApdxI.pdf>.
124. Miura, K., et al., *Development and characterization of a standardized ELISA including a reference serum on each plate to detect antibodies induced by experimental malaria vaccines*. Vaccine, 2008. **26**(2): p. 193-200.
125. Frey, A., J. Di Canzio, and D. Zurakowski, *A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays*. J Immunol Methods, 1998. **221**(1-2): p. 35-41.
126. Balkishan Sharma, R.J., *Right choice of a method for determination of cut-off values: A statistical tool for a diagnostic test*. ASIAN JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES, 2014. **30-34**: p. 30-34.

127. Chaigneau, C., et al., *Serum biobank certification and the establishment of quality controls for biological fluids: examples of serum biomarker stability after temperature variation*. Clin Chem Lab Med, 2007. **45**(10): p. 1390-5.
128. Bhattarai, Y., D.A. Muniz Pedrogo, and P.C. Kashyap, *Irritable bowel syndrome: a gut microbiota-related disorder?* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2017. **312**(1): p. G

Vedlegg 1: Chalder Fatigue Score skjema

Vi vil gjerne vite om du har følt deg sliten, svak eller i mangel av overskudd den siste måneden. Vennligst besvar ALLE spørsmålene ved å krysse av for det svaret du synes passer best for deg. Vi ønsker at du besvarer alle spørsmålene selv om du ikke har hatt slike problemer. Vi spør om hvordan du har følt deg i det siste og ikke om hvordan du følte deg for lenge siden. Hvis du har følt deg sliten lenge, ber vi om at du sammenligner deg med hvordan du følte deg sist du var bra.

Har du problemer med at du føler deg sliten?	<input type="checkbox"/> Mindre enn vanlig	<input type="checkbox"/> Ikke mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mye mer enn vanlig
Trenger du mer hvile?	<input type="checkbox"/> Nei, mindre enn vanlig	<input type="checkbox"/> Ikke mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mye mer enn vanlig
Føler du deg søvnnig eller døsig?	<input type="checkbox"/> Mindre enn vanlig	<input type="checkbox"/> Ikke mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mye mer enn vanlig
Har du problemer med å komme i gang med ting?	<input type="checkbox"/> Mindre enn vanlig	<input type="checkbox"/> Ikke mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mye mer enn vanlig
Mangler du overskudd?	<input type="checkbox"/> Ikke i det hele tatt	<input type="checkbox"/> Ikke mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mye mer enn vanlig
Har du redusert styrke i musklene dine?	<input type="checkbox"/> Ikke i det hele tatt	<input type="checkbox"/> Ikke mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mye mer enn vanlig
Føler du deg svak?	<input type="checkbox"/> Mindre enn vanlig	<input type="checkbox"/> Som vanlig	<input type="checkbox"/> Mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mye mer enn vanlig
Har du vansker med å konsentrere deg?	<input type="checkbox"/> Mindre enn vanlig	<input type="checkbox"/> Som vanlig	<input type="checkbox"/> Mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mye mer enn vanlig
Forsnakker du deg i samtaler?	<input type="checkbox"/> Mindre enn vanlig	<input type="checkbox"/> Ikke mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mye mer enn vanlig
Er det vanskeligere å finne det rette ordet?	<input type="checkbox"/> Mindre enn vanlig	<input type="checkbox"/> Ikke mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mer enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mye mer enn vanlig
Hvordan er hukommelsen din?	<input type="checkbox"/> Bedre enn vanlig	<input type="checkbox"/> Ikke verre enn vanlig	<input type="checkbox"/> Verre enn vanlig	<input type="checkbox"/> Mye verre enn vanlig

Hvis du føler deg sliten for tiden, omtrent hvor lenge har det vart? (ett kryss)

Mindre enn en uke.....

Mindre enn tre måneder.....

Mellom tre og seks måneder.

Seks måneder eller mer.....

Hvis du føler deg sliten for tiden, omtrent hvor mye av tiden kjenner du det? (et kryss)

25% av tiden.....

50% av tiden.....

75% av tiden.....

Hele tiden.....

Vennligst kontroller at du har svart på alle spørsmålene!

**KJÆRE DELTAGER:
VENNLIGST BESVAR SPØRRESKJEMAET
VED Å SETTE KRYSS I BOKSENE TIL HØYRE.**

1	MAGESMERTER/UBEHAG SISTE TRE MÅNEDER	
1.1	Har du vært plaget av smerter eller ubehag i magen i løpet av de siste 3 måneder?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
1.2	Har du kjent disse plagene minst 1 dag i uken i 3 uker eller mer i løpet av de siste 3 måneder?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
1.3	Blir smertene/ubehaget i magen bedre etter at du har hatt avføring?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
1.4	Begynner plagene i forbindelse med at du får enten hyppigere eller sjeldnere avføring?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
1.5	Begynner plagene i forbindelse med at du får enten løsere eller fastere avføring?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
1.6	Den siste måneden, hvor plagsomme har magesmertene/ ubehaget vært? (Sett kryss for det alternativet som passer best)	
	Milde (påvirker ikke daglige gjøremål)	<input type="checkbox"/>
	Moderate (påvirker daglige gjøremål i noen grad, men de gjennomføres)	<input type="checkbox"/>
	Alvorlige (påvirker daglige gjøremål slik at de ikke blir gjort)	<input type="checkbox"/>
1.7	Den siste måneden, hvor ofte har du i gjennomsnitt hatt magesmerter/ubehag? (Sett kryss for det alternativet som passer best)	
	Gjennomsnittlig 1 dag eller mindre per uke?	<input type="checkbox"/>
	Gjennomsnittlig 2-3 dager per uke?	<input type="checkbox"/>
	Gjennomsnittlig 4-5 dager per uke?	<input type="checkbox"/>
	Gjennomsnittlig mer enn 5 dager per uke?	<input type="checkbox"/>
1.8	Den siste måneden, hvor ofte har du i gjennomsnitt hatt avføring?	
	Mindre enn 3 ganger per uke?	<input type="checkbox"/>
	Ca 3 – 6 ganger per uke?	<input type="checkbox"/>
	Ca 1 gang per dag?	<input type="checkbox"/>
	Ca 2 ganger per dag?	<input type="checkbox"/>
	Ca 3 ganger per dag?	<input type="checkbox"/>
	Mer enn 3 ganger per dag?	<input type="checkbox"/>

2 OM FORDØYELSE- & TARM-FUNKSJONER		
2.1	Hender det at du har mindre enn 3 avføringer pr uke?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
2.1.1	Hvis Ja: De siste 3 måneder, har dette hendt oftere enn hver 4.uke?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
2.2	Hender det at du har hard eller knollet avføring?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
2.2.1	Hvis Ja: De siste 3 måneder, har du hatt hard eller knollet avføring oftere enn hver 4. gang du er på toalettet?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
2.3	Hender det at du har mer enn 3 avføringer pr. dag?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
2.4	Hender det at du har løs (grøtaktig) eller vandig avføring?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
2.4.1	Hvis Ja: De siste 3 måneder: har avføringen vært løs/grøtaktig eller vandig mer enn 3 av 4 ganger (75%) du er på toalettet?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
2.5	Hender det at du har følelsen av ikke å få ut all avføringen når du er på toalettet?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
2.6	Hender det at du må presse eller trykke for å få avføring?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
2.7	Hender det at du må på toalettet med en gang fordi du har problemer med å vente med (holde tilbake) avføringen?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
2.8	Hender det at du ser slim i avføringen?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
2.9	Hender det at du føler deg stinn eller oppblåst (luft) i magen?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
3 OM SMERTER ØVERST I MAGEN		
3.1	Har du hatt smerter eller ubehag begrenset til et mindre område høyt opp og midt i magen, det vil si mellom navlen og brystbenet? Hvis nei, hopp til spørsmål 4	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
3.2	Har du kjent disse lokaliserte plagene høyt opp i magen minst 1 dag i uken i 3 uker eller mer i løpet av de siste 3 måneder?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
3.3	Bli disse lokaliserte smertene eller ubehaget i øvre del av magen bedre etter at du har hatt avføring?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
3.3	Begynner disse lokaliserte smertene eller ubehaget i øvre del av magen i forbindelse med at du får enten hyppigere eller sjeldnere avføring?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
3.4	Begynner disse lokaliserte smertene eller ubehaget med enten hardere eller løsere avføring enn vanlig?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
4 OM HALSBRANN/ BRYSTBRANN		
4.1	Har du hatt halsbrann/ brystbrann eller en sviende/brennende smerte bak brystbenet?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
4.2	Har du kjent disse plagene minst 1 dag i uken i 3 uker eller mer i løpet av de siste 3 måneder?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
4.3	Er din halsbrann/ brystbrann mer plagsomme for deg enn magesmertene?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>

5 KVANTITERING AV DINE SYMPTOMER DEN SISTE MÅNEDEN

Angi på en skala fra 1 til 10

0 = ingen symptomer

og

10 = alvorlige symptomer

Spørsmål	Svar
Kvalme	
Tidlig metthetsfølelse ved måltid	
Oppblåsthet	
Magesmerter	
Forstoppelse	
Diare	
Anoreksi (ulyst på mat)	

6 OM TIDLIGERE MAGEPLAGER

6.1

Hadde du noen mageplager før høsten 2004?

Kontinuerlig tilstede

Evt kommentar:

Kun tilstede i perioder
.....Har ikke hatt mageplager

7 OM MATVARE-INTOLERANSE

7.1

Mener du at det er sammenheng mellom kosten din og mageplagene dine?

Ja Nei

Hvis Nei, hopp til spørsmål 7

Hvis Ja: Angi hvilke matvarer du mener gir mageplager:

1.....

2.....

3.....

7.2

Har du gjort endringer i kosten din fordi du synes enkelte matvarer gir deg plager?

Ja Nei

7.3

I hvilken grad synes du mageplagene dine begrenser matvarevalget ditt? (sett ett kryss)

I stor grad I moderat grad I liten grad Begrenser ikke

7.4

Ønsker du å bli kontaktet dersom vi får nye metoder til å undersøke matvare-intoleranse ?

Ja Nei

8 OM STRESS OG MAGEPLAGER

8.1

Mener du at stress eller psykiske faktorer betyr noe for mageplagene dine?

Ja Nei

