

**«Etablering av referanseområde og estimat av
biologisk variasjon for allergianalysen tryptase»**

Birthe Rochlenge Skarbø

Masteroppgave

Masterprogram i helsefag, studieretning Radiograf/Bioingeniørfag

Institutt for global helse og samfunnsmedisin

Universitetet i Bergen



Våren 2018

Førord

Prosjektet ble utført etter ønske fra Seksjon for allergi- og proteinanalyser ved Laboratorium for klinisk biokjemi (LKB) ved Haukeland Universitetssjukehus. Jeg valgte å skrive denne masteroppgaven på bakgrunn av en kombinert interesse for immunologi og kvalitetskontroll, i tillegg til tidligere erfaring der jeg skrev om holdbarhet og samsvar av tryptaseanalyser i ulike prøvematerialer, i min bacheloroppgave (2015, HVL).

Torunn Oveland Apelseth (overlege, Ph.D), Marit Sverredotter Sylte (overbioingeniør, Ph.D) og Einar K. Kristoffersen (avdelingssjef AIT, professor, Ph.D) har vært veiledere for masteroppgaven, Apelseth har vært hovedveileder. Takk for gode innspill, tålmodighet, og hjelp til planlegging og gjennomføring av prosjektet. En stor takk til bio-statistiker Tore Wentzel-Larsen for hjelp med statistisk behandling av data og innføring i R.

Takk til alle ved Seksjon for Allergi- og proteinanalyser ved LKB for hjelp ved analysering av prøvematerialet. Takk til alle deltakerne som har stilt opp, og en spesiell takk til alle deltakerne i pilotprosjektet som stilte opp med positiv innstilling og interesse for prosjektet i 10 uker. En stor takk til alle ved tappesalen, Blodbanken for hjelp til innsamling av materiale og positiv innstilling. Takk til ledelsen ved LKB for å ha dekket utgifter ved utstyr til prøvetaking og reagenser til analysering.

En siste takk til familie og venner for all støtte og motivering underveis.

Bergen, 30.05.2018

Birthe Rochlenge Skarbø

Innhold

1. Introduksjon	1
2. Mål for studien	3
3. Teoretisk forankring	4
3.1 Tryptase	4
3.1.1 Tidligere forskning på tryptase	4
3.2 Bruk av tryptasemålinger i diagnostikk av allergi	5
3.2.1 Definisjon av allergi og allergimekanismer	5
3.2.2 Måling av tryptase ved anafylaksi	8
3.2.3 Måling av tryptase ved Mastocytose	9
3.2.4 Tidligere innkjøring av referanseområde for tryptase ved LKB	9
3.2.5 Gjennomgang av pasientprøver fra Unilab 2014 ved LKB	11
3.3 Phadia 1000	11
3.3.1 Analyseprinsipp	11
3.3.2 Kalibrering og kvalitetskontroll	14
3.4 Analysekvalitet	15
3.4.1 Preanalytiske forhold	15
3.4.2 Analytisk variasjon	16
3.4.3 Postanalytiske forhold	17
3.5 Referanseområde	17
3.5.1 Definisjon av et referanseområde	17
3.5.2 Etablering av referanseområder	18
3.6 Biologisk variasjon	18
3.6.1 Estimat av biologisk variasjon	19
3.7 Statistiske beregninger	20
3.7.1 Beregning av referanseområde	20
3.7.2 Estimering av biologisk variasjon	21

4. Forskningsdesign.....	22
4.1 Valg av forskningsdesign	22
4.2 Forankring av forskningsdesign	23
4.3 Utvalg	24
4.3.1 Utvalg for etablering av referanseområde til tryptase	24
4.3.2. Utvalg for Biologisk variasjon	25
4.4 Standardisering av preanalytiske forhold i studien	25
4.5 Etske betraktninger.....	26
5. Metode.....	27
5.1 Metode referanseområde	27
5.1.1 Innsamling og bearbeiding av prøvemateriale	27
5.1.2 Analysering av prøvemateriale:	29
5.1.3 Bearbeidelse av analyseresultater.....	30
5.2 Metode biologisk variasjon	31
5.2.1 Innsamling og bearbeiding av prøvemateriale:	31
5.2.2 Analysering av prøvemateriale.....	32
5.2.3 Bearbeidelse av analyseresultater.....	33
5.3 Statistikkprogram	33
6. Resultater.....	34
6.1 Deskriptiv statistikk om giverne	34
6.2 Referanseområde tryptase	40
6.2.1 Deskriptivt tryptase-resultater	40
6.2.2 Beregning av referanseområde	43
6.3 Biologisk variasjon tryptase	46
6.3.1. Deskriptivt resultater biologisk variasjon	46
6.3.2. Resultater måling av biologisk variasjon	46
7. Diskusjon.....	48
7.1 Utvalg	48

7.2 Referanseområde	49
7.2.1 Valg av statistikk for beregning av referanseområde	51
7.2.2 Aldersfordeling og påvirkning av referanseområdet	52
7.2.3 Allergisk sykdom og dens innflytelse på tryptase-verdi	53
7.2.4 Kjønn og påvirkning av referanseområde for tryptase	54
7.2.5 Trening og medikament/kosttilskudds påvirkning av referanseområdet for tryptase	54
7.3 Biologisk variasjon.....	55
7.3.1 Valg av statistiske beregninger	56
7.4 Studiens validitet	56
7.4.1 Intern validitet	56
7.4.2 Ekstern validitet.....	57
8. Videre arbeid	58
9. Konklusjon	59
Referanseliste	60
Vedlegg	65
I. Spørreskjema Blodbanken ved Haukeland Universitetssjukehus	65
II. Spørreskjema for studien	67
III. Samtykkeskjema studien og «Biobank for Allergianalyser»	69
IV. Kommandoer brukt i R for Referanseområde	75
V. Kommandoer brukt i R for Biologisk variasjon	78

Sammendrag

Dette prosjektet ble gjennomført for seksjon for allergi- og proteinanalyser, ved Laboratorium for klinisk biokjemi (LKB), Haukeland universitetssjukehus (HUS). Masterprosjektet hadde som mål å etablere referanseområde for analytten tryptase i en frisk befolkning med og uten allergier, samt å undersøke den biologiske variasjonen for tryptase. Prosjektet ble gjennomført som et forskningsprosjekt godkjent av regional etisk komite (2017/1179/REK Vest).

Materiale til etablering av referanseområde ble samlet inn fra friske, frivillige givere med og uten tidligere allergi (n=245). Prøvene ble analysert fortløpende på Phadia 1000 (ImmunoCAP Tryptase, ImmunoDiagnostics, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sverige). Referanseområdet for tryptase med tilhørende 90 % konfidensintervaller ble beregnet ved både parametrisk og ikke-parametrisk metode. Det ble undersøkt om ulike variabler slik som kjønn, alder, allergi, trening og medikament/kosttilskudd kunne ha en påvirkning på tryptaseverdiene.

For å undersøke den biologiske variasjonen for tryptase ble det tatt blodprøver av 14 friske frivillige deltakere over 10 uker. Prøvematerialet ble fryst ned, og ved endt innsamling ble serum fra 5 givere tint opp og analysert som et pilotprosjekt. Lineære mixed effects-modeller ble brukt til statistisk databehandling.

Ved ikke-parametrisk metode ble referanseområdet for tryptase beregnet til $<12,3 \mu\text{g/L}$ (90 % konfidensintervall 9,9 - 21,5), mens det ved parametrisk metode ble beregnet til $<11,7 \mu\text{g/L}$ (90 % konfidensintervall 10,7 – 12,8). Basert på funn foreslås en endring av referanseområde for tryptase ved LKB fra dagens øvre referansegrense på $<24,0 \mu\text{g/L}$ til $<12,0 \mu\text{g/L}$.

Pilotstudie av biologisk variasjon estimerer intra-biologisk variasjonen (CV_w) for tryptase til 3,7 %.

Nøkkelord: tryptase, referanseområde, allergi, anafylaksi, biologisk variasjon

Abstract

This project was performed on behalf of the laboratory section for allergy- and protein analysis at the laboratory for clinical chemistry (LKB), Haukeland Universitetssjukehus (HUS). The aim of this project was to establish reference values for tryptase in a healthy population with or without allergies, and to evaluate the biological variation for tryptase. The project was approved by the regional ethical committee (2017/1179/REK Vest).

Samples were collected from healthy volunteers with and without allergies (n=245). The samples were analysed at Pahlia 1000 (ImmunoDiagnostics, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden). The reference values and the associated 90 % confidence intervals were calculated both with the parametric and non-parametric method. It was also examined if different variables such as age, gender, allergies, exercise and medication/supplements could have an impact on the tryptase values.

A pilot-project was performed to examine the biological variation for tryptase, including 14 healthy volunteers who agreed to take blood samples for 10 weeks. The samples were stored frozen, and by the end of the sample collection the samples from 5 of the volunteers were thawed and analysed. Linear mixed effects-models were used for statistical computations.

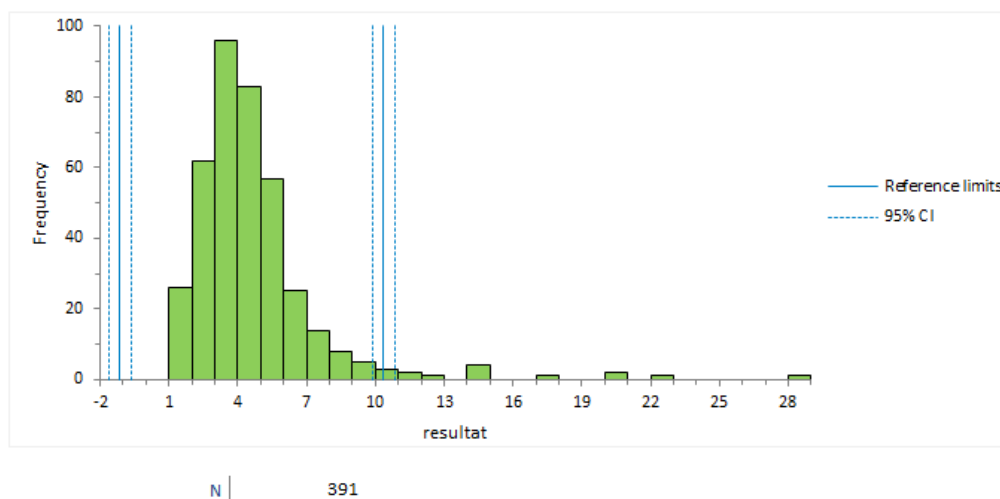
The non-parametric method gave a reference value for tryptase as $<12.3 \mu\text{g/L}$ (90 % confidence interval 9.9 – 21.5), while the parametric method gave a reference value at $<11,7 \mu\text{g/L}$ (90 % confidence interval 10.7 – 12.8). Based on these findings it is suggested to change the current reference values for tryptase at LKB from $<24.0 \mu\text{g/L}$ to $<12.0 \mu\text{g/L}$. The pilotstudy of biological variation estimates the intra-biological variation (CV_w) for tryptase to 3.7 %.

Key words: tryptase, reference values, allergy, anaphylaxis, biological variation

1. Introduksjon

Allergi er en hypersensitivitetsreaksjon initiert av en spesifikk immunologisk mekanisme (Johansson et al., 2004). Anafylaksi er en kraftig, potensielt livstruende allergisk reaksjon som blir diagnostisert på grunnlag av karakteristiske symptomer og funn. Hvis denne reaksjonen er forårsaket av en immunologisk mekanisme defineres denne som allergisk anafylaksi (F. E. R. Simons et al., 2007). Diagnostikken og behandlingen av anafylaksi bestemmes av klinikken i hvert enkelt tilfelle. I etterkant av en anafylaktisk reaksjon skal det i henhold til «Norsk veileder i praktisk anafylaksehåndtering» (Herland Berstad, Storaas, De Pater, Press, & Florvaag, 2014) alltid gjøres en utredning av hendelsen. Utredningen består av anamnese, klinisk undersøkelse, kliniske tester og laboratorieanalyser. Laboratorieanalyser benyttes for å avdekke mekanismen og den utløsende årsaken for reaksjonen. Per i dag er tryptase den viktigste biomarkøren for allergisk anafylaksi. Tryptase måles både i akuttprøver (1-4 timer etter anfallsstart) og i prøver tatt før eller 12-24 timer etter anfallsstart. Prøver tatt før eller etter reaksjonen brukes til å måle basalnivå av tryptase. Tryptase er et proteaseenzym som blir produsert, lagret og skilt ut av mastceller og basofile granulocytter.

Laboratorium for klinisk biokjemi (LKB), Haukeland universitetssjukehus (HUS) har i dag et referanseområde på $< 24,0 \mu\text{g/L}$ for analytten tryptase. Dette referanseområdet som ble etablert i 1999, er basert på et innsamlet referansemateriale som ble samlet inn i løpet av 1998/1999. Referansematerialet ble analysert ved samme metode som benyttes i dag: assay ImmunoCap Tryptase. Dette referanseområdet er betydelig høyere enn det som blir brukt på andre norske sykehus, deriblant Universitetssykehuset i Nord-Norge som benytter $< 13,5 \mu\text{g/L}$, Oslo Universitetssykehus som benytter $< 11 \mu\text{g/L}$ og St.Olavs Universitetssykehus som benytter $< 11,4 \mu\text{g/L}$. Disse verdiene er hentet fra analyseoversiktene til nevnte sykehus. Det er også høyere enn den verdien som er mest brukt internasjonalt, og produsenten Phadia sitt referanseområde, på $< 11,4 \mu\text{g/L}$ ("ImmunoCAP Tryptase," 2012; Simons et al., 2011). Figur 1 viser et eksempel på en typisk fordeling av tryptasenivåer i en frisk befolkning, der hoveddelen av målingene ligger mellom 2-10 og det er en lang hale med høyere verdier (L. B. Schwartz, 2006). Referanseområde er definert som det sentrale 95 % intervall hos friske personer (CLSI, 2008).



Figur 1: Fordeling tryptaseverdier i en frisk befolkning

Referanseområdet ved Haukeland Universitetssjukehus ligger også høyt i forhold til internasjonale retningslinjer for diagnostisering av sykdommen mastocytose. Ved diagnostisering av denne sykdommen benyttes et scoringssystem der verdier av tryptase >20 $\mu\text{g/L}$ regnes som en av de fellende kriteriene (L. B. Schwartz, Metcalfe, Miller, Earl, & Sullivan, 1987). Ved mastcellemediert anafylaksi sees en forbigående stigning av tryptasenivå i blodet, mens ved mastocytose sees vedvarende høye verdier. Hvis øvre grense for referanseområdet er for høy kan misforståelser og feildiagnostikk oppstå. Utfra innrapporterte kliniske opplysninger og gjennomgang av analyseresultater for de senere år, mistenker Seksjon for Allergi og Proteinanalyser ved LKB at dagens referanseverdi for tryptase kan være for høy.

For å vurdere analysekvaliteten til en analyse må man tolke hvert enkelt prøvesvar i lys av både den analytiske og den biologiske variasjonen (Bolann, 2009). Biologisk variasjon er definert som naturlige fysiologisk variasjoner i biokjemiske komponenter i kroppen (Fraser, 2001). Det ble ikke funnet publikasjoner på den biologiske variasjon for tryptase i litteraturen. Det ble derfor besluttet å undersøke både den biologiske, og den analytiske variasjonen ved LKB, for tryptase. Den biologiske variasjonen er viktig å kjenne til for å kunne gjøre en sikker vurdering om det er en stigning av tryptase i akuttprøven sammenlignet med basalnivået. Den biologiske variasjonen kan vurderes ved å analysere prøver fra de samme individene over tid. Ved å analysere disse prøvene i duplikater kan man i tillegg få en oversikt over den analytiske variasjonen.

2. Mål for studien

Hensikten med dette masterprosjektet er å innhente materiale og etablere et referanseområde for analytten tryptase. Da det ved undersøkelse av anafylaksi gjøres sammenligning av flere tryptasemålinger, var det også et mål å undersøke den biologiske-, og analytiske variasjonen for analysen. Dette er for å kunne vurdere hva som er en reell endring i tryptaseverdier. I sammenheng med innhenting av materiale til referanseområdet ønsket vi også å innhente ekstra materiale til «Biobank for allergianalyser» for senere etablering av referanseområder for allergianalytter.

Hovedmål for denne studien er:

- Etablere referanseområde for analytten tryptase
- Estimere den biologiske variasjonen for analytten tryptase

Delmål for studien er:

- Undersøke hvilken påvirkning alder og kjønn har på referanseområdet for tryptase
- Undersøke om trening, medikament/kosttilskudd, selvrappert allergi og positive resultater på allergianalyser har sammenheng med nivå av tryptase
- Undersøke sammenheng mellom selvrappert allergi og resultat av allergianalyser
- Estimere den analytiske variasjonen for tryptase
- Innhente materiale til «Biobank for allergianalyser»

3. Teoretisk forankring

3.1 Tryptase

Tryptase er et proteaseenzym og har enzymnummer 3.4.21.59 (L. B. Schwartz, Yunginger, Miller, Bokhari, & Dull, 1989). Genene for human tryptase er samlet på kromosom 16p13.3 og består av fire loci (Fukuoka & Schwartz, 2007). Modne tryptase-tetramerer blir lagret i sekretoriske granuler, og står for 10-20 % av alt proteininnholdet i mastceller (L. B. Schwartz, Irani, Roller, Castells, & Schechter, 1987). Basofile celler kan også produsere, lagre og skille ut tryptase, men inneholder minst 100 ganger mindre tryptase enn mastceller og bidrar veldig lite til tryptasenivåene som kan måles i blod (Jogie-Brahim, Min, Fukuoka, Xia, & Schwartz, 2004). Ca. 25 % av befolkningen mangler α -tryptase (Caughey, 2006).

Tryptaser (hovedsakelig β -tryptase) blir frigitt fra mastceller som blir stimulert av kombinasjonen av allergen og allergenspesifikk IgE (Caughey, 2006). Pro-tryptaser av både α - og β -tryptase blir frigjort fra cellenes cytoplasma når mastcellene ikke er aktivert og er bakgrunn for måling av basalverdi (L. B. Schwartz, 2006). Modne β -tryptase tetramerer har vist et bredt spekter av biologiske aktiviteter, spesielt *in vitro*. De biologiske aktivitetene til tryptase inkluderer degradering av fibrinogen, generering av kininer fra kininogener, fremming av vaskulær permeabilitet, degradering av den ekstracellulære matrix, tilrettelegging for vevsmodellering og påvirkning av cellulær migrasjon (Vitte, 2015).

3.1.1 Tidligere forskning på tryptase

Tidligere forskning viser at måling av tryptase kan bidra til å støtte opp under den kliniske anafylaksidiagnosen. Dette kommer blant annet fram i artikkelen til Brown et. al. der det ble gjort flere tryptase-målinger som en del av et forsøk med immunoterapi der deltakerne ble utsatt for insektsgift. Det kom også frem i denne artikkelen at det burde bli tatt flere tryptase-målinger for å forsikre om en reell økning under anafylaksianfallet (akuttprøve og måling av basalverdi) (Brown, Blackman, & Heddle, 2004). I forkant av studien til Brown et. al. (Brown et al., 2004) ble tryptase målt i prøver fra de utvalgte deltakerne i gjennomsnittlig 14 uker før provokasjon med insektsgift. Disse målingene viste at tryptase ikke varierte med mer enn 2,0 $\mu\text{g/L}$ innen individer over denne tidsperioden. I en annen studie ble det vist at tryptase varierer med en gjennomsnittsverdi på 0,26 $\mu\text{g/L}$ over 14 uker (Brown et al., 2004). Studier

viser at tryptase oftere øker i mer alvorlige anafylaksi, og at økningen korrelerer med alvorlighetsgraden (Brown et al., 2004; Sala-Cunill et al., 2013).

Tidligere studier viser også at tryptasenivå hos barn generelt er høyere det første leveåret, for så å synke gradvis gjennom barndomsårene. Barn har litt lavere nivåer enn voksne individer, og gutter har i gjennomsnitt noe høyere tryptasenivåer enn jenter, men denne forskjellen er ikke signifikant. (De Schryver et al., 2016; Sahiner et al., 2014). Mulige årsaker til høyere verdier av tryptase ved høyere alder kan være blant annet Kronisk myelogenleukemi (KML), redusert nyrefunksjon eller nyresvikt, hjerte-kar sykdommer og inntak av blodtrykkregulerende medikamenter (Sala-Cunill et al., 2013; Lawrence B. Schwartz et al., 1994).

Videre viser studien «*Effect of sex and haplotype on plasma tryptase levels in healthy adults*» (Min, Moxley, Neale, & Schwartz, 2004) at menn med $\beta\alpha$ -haplotypen av tryptase-genet har 0,5 ng/mL høyere tryptasenivåer enn gjennomsnittet, mens kvinner har 0,2 ng/mL høyere tryptasenivåer enn gjennomsnittet (av alle haplotypene). Forfatterne konkluderer med at både tryptase haplotype og kjønn har en statistisk signifikant effekt på total plasma tryptase-nivåer i friske individer.

Det er flere studier som ikke har funnet noen forskjeller i tryptase mellom individer med allergi og individer uten allergi. Blant annet ble det utført en studie hvor de sammenlignet tryptase-verdier hos 62 pasienter med allergisk rhinitt og 19 friske kontrollindivider, og en annen studie hvor de sammenlignet tryptase i 153 atopiske barn og 44 ikke-atopiske barn (Komarow et al., 2009; Lawrence B. Schwartz et al., 1994).

3.2 Bruk av tryptasemålinger i diagnostikk av allergi

3.2.1 Definisjon av allergi og allergimekanismer

En allergisk respons er et immunsvaret på en eksponering som kan være både antistoff-mediert og celle-mediert. Allergiske reaksjoner oppstår når allergener kommer i kontakt med kroppens hud eller slimhinner ved at allergen blir spist eller inhalert, eller ved at det blir injisert. Et allergen kjennetegnes ved at det er antigener som kan framkalle eller utløse allergi. Eksempler på allergener kan være pollen, medikamenter, insektsgift og matvarer. Det er enkeltkomponenter eller bestanddeler av de forskjellige allergenene som skaper en reaksjon og de fleste allergenene er løselige proteinmolekyl. I det et allergen inhaleres eller spises vil

den beskyttende veggen rundt allergenet brytes ned av proteolytiske enzymer og forskjellige antigener vil bli frigjort (Lea, 2006).

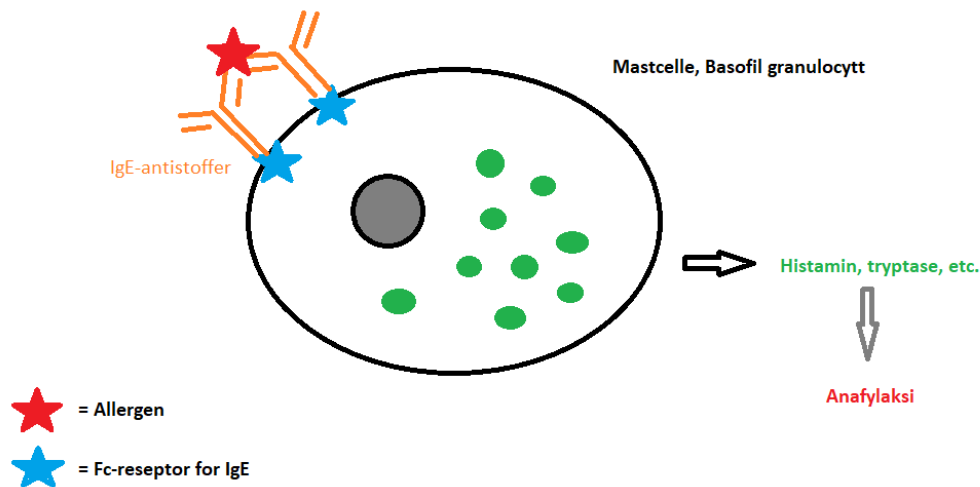
Ved en allergisk reaksjon, kan man både ha en tidlig og en sen fase i løpet av reaksjonen. Den akutte reaksjonen oppstår i det individet blir eksponert for allergenet. Etter noen timer, kan reaksjonen gå over i en sen fase hvor frigitte cytokiner rekrutterer monocytter, eosinofile og nøytrofile granulocytter til stedet for immunresponsen. Cellene vil bli aktiverte og vil dele seg. Oponiserte allergen fører til at eosinofile granulocytter degranulerer seg, slik at substanser i granulocytten frigis. Dette kan gi vevsskade (Lea, 2006).

I 1963 definerte Gell og Coombs fire typer allergiske reaksjoner (Gell & Coombs, 1963). Type I-allergi er en IgE-mediert straksreaksjon.

Type I

Dersom IgE-molekyler på overflaten av mastceller og basofile celler kryssbindes, vil det kunne føre til aktivering av cellene. Dannelsen av allergen-IgE-IgE-reseptorkomplekser aktiverer effektorcellene og frigjør en rekke potente mediatorsubstanser (Herland Berstad et al., 2014). Se figur 2 for illustrasjon. Eksempler på mediatorer som skilles ut av mastceller og basofile granulocytter er histamin, serotonin, proteaser (inkludert tryptase), forskjellige cytokiner og forbindelser med kjemotaktiske egenskaper. Det er disse mediatorene som gir pasienten symptomer. Histamin er den viktigste mediatoren for allergisk respons, men er flyktig og i praksis vanskelig å måle i serum (Herland Berstad et al., 2014). Dersom det produseres store mengder IgE i respons på bestemte antigener, vil det kunne oppstå lokale, men også systemiske, betennelsesreaksjoner som for eksempel allergier, astma og anafylaksi (Lea, 2006).

IgE-mediert anafylaksi



Figur 2: IgE-mediert anafylaksireaksjon gjennom dannelsen av allergen-IgE-IgE-reseptorkompleks.

Type II

Type II-allergi vil føre til vevsskade som er immunbetinget og forårsaket av antistoffer som vil reagere med strukturer på overflaten av cellene og ødelegge disse. AB0-uforlikelighet ved blodtransfusjoner er eksempel på type II reaksjon (Bertelsen, 2011).

Type III

Ved Type III-allergi dannes det immunkompleks ved at antigen og antistoff reagerer med hverandre. Immunkomplekset kan sirkulere til andre steder i kroppen. Komplementsystemet aktiveres og det vil gi betennelsesreaksjon og potensielt vevsskade (Bertelsen, 2011).

Type IV

Type IV-allergi er den forsinkede reaksjonen og oppstår lengre tid etter (mer enn 12 timer) eksponering av antigenet (Bertelsen, 2011). Her vil man få vevsskade som følge av cellulære immunreaksjoner (Lea, 2006).

3.2.2 Måling av tryptase ved anafylaksi

Anafylaksi er en kraftig, livstruende generalisert eller systemisk allergisk reaksjon (akutt-tilstand) der utvikling av symptom i to eller flere organsystem enten opptrer samtidig eller i rask rekkefølge (Herland Berstad et al., 2014; Johansson et al., 2004; Simons et al., 2015).

Anafylaksi er en klinisk diagnose, og tryptase-målinger blir brukt for å bekrefte den immunologiske mekanisme for reaksjonen. Dette er viktig for senere å kunne forebygge nye anafylaksi-hendelser. I Norge er det ikke noen pålitelige registreringer av antall anafylaktiske reaksjoner, men det antas at 1/1000 voksne og 1/170 barn erfarer en anafylaktisk episode. De vanligste årsakene er mat (61%), insektstikk (20%) og legemidler (8%) (Herland Berstad et al., 2014).

De tre hovedmekanismene bak anafylaksi er immunologisk, ikke-immunologisk og ideopatisk mekanisme. Immunologisk mekanisme er enten IgE-mediert ved for eksempel mat, insektbitt og legemiddel, eller ikke-IgE-mediert som for eksempel ved aktivering av mastceller via komplementsystemet. Et annet eksempel på ikke-IgE-mediert immunologisk mekanisme er IgG-mediert aktivering som vi for eksempel kan se ved reaksjon på legemidler. Ikke-immunologiske anafylaksi kan være utløst av anstrengelse, kulde/varme, alkohol, matvarer og legemidler. Ved ideopatisk mekanisme bak anafylaksi er det ukjent mekanisme og utløsende årsak (Simons et al., 2011).

Ved aktivering av mastceller og basofile celler frigis det som nevnt en rekke mediatorer. Av disse regnes histamin som den klinisk viktigste, og er årsaken til de symptomene som regnes som et anafylaktisk sykdomsbilde. Histamin når toppnivå innen 5-10 min, og går ned til basalverdi innen 60 min. Dette gjør at histamin ikke er en godt egnet analytt til å bekrefte mastcelleaktivering på grunn av praktiske årsaker. Tryptasenivåer i blod øker fra 15 min til 3 timer etter anfallsstart, og har en halveringstid på 2 timer. Etter 12-24 timer er tryptasenivået tilbake til basalverdi. Dette gjør at tryptase er en mer stabil markør for å bekrefte mastcelleaktivering (Sala-Cunill et al., 2013; L. B. Schwartz et al., 1989).

Alvorlig anafylaksi er signifikant assosiert med høy alder (>65 år), hjerte-kar risikofaktorer og inntak av medikamenter mot høyt blodtrykk som ACEi (angiotensin-converting-enzyme inhibitor) (Sala-Cunill et al., 2013). Det er observert at ungdommer og unge voksne har høyere risiko for død ved mat-indusert anafylaksi, mens eldre individer har høyere risiko for død ved insekt-indusert anafylaksi (F. E. Simons et al., 2007).

Hovedhensikten med laboratorieanalyser ved anafylaksi er som nevnt å identifisere mekanismen for reaksjonen og bidra til identifisering av utløsende agens. Dette er av avgjørende betydning for å forhindre senere gjentatte anafylaksier. I akuttprøvene blir det analysert tryptase og IgE (total og spesifikk antistoff) (Herland Berstad et al., 2014). En akutt stigning av tryptase på mer enn tre ganger basisverdien er forenelig med mastcelleaktivering (Florvaag, 2014). Det er også foreslått at den akutte tryptase-verdien bør være 20 % + 2 µg/L over baselineverdien av tryptase (Valent et al., 2012).

Anafylaksi er en klinisk diagnose og kan derfor ikke utelukkes ved manglende økning av tryptase. Dette gjelder spesielt for matindusert anafylaksi, der tryptase-nivåer ofte forblir lave. Dette er mest sannsynlig pga. en lokal, og ikke generalisert, mastcelleaktivering som fører til at veldig lite tryptase kommer ut i blodsirkulasjonen og at det ikke blir noen signifikant økning av tryptase (Sala-Cunill et al., 2013).

3.2.3 Måling av tryptase ved Mastocytose

En konstant forhøyet basalverdi av tryptase kan indikere at pasienten har mastocytose, en sykdom der pasienten har økt antall mastceller som akkumuleres i ett eller flere organer i kroppen (Rodak, Fritsma, & Keohane, 2012). Mastocytose er assosiert med spontane episoder av hypertensjon og med økt risiko for IgE-mediert og ikke-IgE-mediert anafylaksi (F. E. Simons et al., 2007). Ikke alle pasienter med forhøyede tryptasenivåer møter alle kriteriene for diagnosen mastocytose. En arbeidsgruppe ved en konferanse i 2010 (Valent et al., 2012) foreslo en global klassifisering av mastcelle-sykdommer og patologiske mastcellereaksjoner. Klassifiseringen bestod av å dele det inn i 3 typer av mastcelle aktiveringssyndromer (MACS), primær, sekundær og ideopatisk MACS. Alle disse Mastcelle aktiveringsreaksjonene (MAC) og MACS kan føre til forhøyede tryptasenivåer.

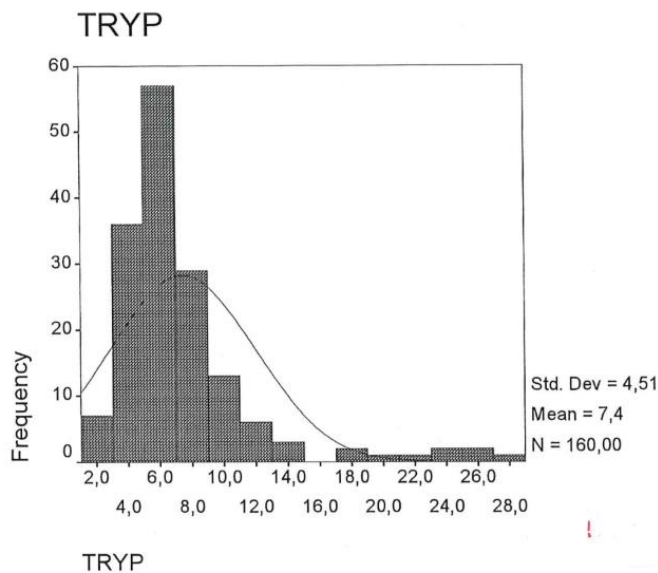
3.2.4 Tidligere innkjøring av referanseområde for tryptase ved LKB

I 1998-99 ble det ved LKB etablert referansegrenser for tryptase sammen med flere andre allergi-analytter. Friske frivillige deltakere ble rekruttert, og i tillegg til allergianalysene tryptase, total-IgE, Fx5 og Phadiatop, ble disse undersøkt med tanke på Hemoglobin (Hb), leukocyttdeltalke-konsentrasjon (LPK) og C-reaktivt protein (CRP). Giverne skulle være frie

for symptomer på allergi som astma, høysnue, eksem eller elveblest. Ved positive funn på allergitestene ble det analysert for enkeltallergener (reflekstest). Det ble også undersøkt om det var forskjeller i referanseområdet hos menn og kvinner, og hos røykere og ikke røykere.

Blod fra 191 friske givere i alderen 20-80 år ble tappet. Ut ifra de 191 givene ble referanseområdet tatt ut i to hovedgrupper: givere som var symptomfrie for allergi og også hadde negative allergitester og IgE <120 (total 136, derav 57 kvinner og 79 menn), og øvrige symptomfrie givere (total 160, derav 89 kvinner og 71 menn). Tryptase ble analysert ved Fluroenzymeimmunoassay, UNICAP, Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Upsala Sweden. Prøvematerialet ble tappet høsten 1998 og våren 1999. Materialet ble tappet på 7ml Vacutainer rør, sentrifugert, og serum ble oppbevart ved -20°C inntil analysering. Prøvene ble tint i romtemperatur før analysering, og prøvene ble analysert over 26 dager.

Det ble ikke funnet statistisk signifikant forskjeller mellom menn og kvinner, og heller ikke mellom røykere og ikke-røykere. Referanseområdet for tryptase ble satt ved 97,5 persentilen <24,0 ug/L. Figur 3 viser histogram over tryptase-målingene ved innkjøring av referanseområde til tryptase i 98/99.



Figur 3: Tryptase målt i givere frie for allergisymptomer og negative allergi-tester. Resultater fra innkjøring av referanseområde i 1998/99.

3.2.5 Gjennomgang av pasientprøver fra Unilab 2014 ved LKB

I 2015 ble det utført en gjennomgang av referanseområdet for tryptase ved Seksjon for allergi og proteinanalyser, LKB. I den forbindelse ble det hentet ut pasientresultater av tryptase fra Unilab, som er laboratedatasystemet ved Haukeland Universitetssjukehus, fra prøver analysert på LKB i året 2014. Dette var da pasientprøver fra pasienter med anafylaksi, mastocytose og pasienter til utredning både ved allmennpraksis og ved sykehus. Det ble utført 1060 målinger i 2014. I fra dette datamaterialet ble 25 tydelig patologiske prøver ekskludert ($>50 \mu\text{g/L}$). Man fant da at en 95-persentil ble estimert til $19,4 \mu\text{g/L}$.

Videre ble det beregnet 97,5 persentilen av resultatene fra pasienter ved Seksjon for klinisk spesialallergologi ved yrkesmedisinsk avdeling, Haukeland Universitetssjukehus. Disse pasientene var under utredning for allergi og man antok at de ikke hadde en akutt anafylaktisk reaksjon. Her ble det inkludert resultater fra 391 pasienter, og øvre referanseverdier, 97,5-persentil, for denne populasjonen ble estimert til $10,36 \mu\text{g/L}$. Det ble ut ifra denne gjennomgangen av pasientprøver konkludert med at referansegrense på $24 \mu\text{g/L}$ muligens var noe høy.

3.3 Phadia 1000

Analyseinstrumentet som ble benyttet til analyseringen av alle prøvene i dette prosjektet er Phadia 1000 (ImmunoDiagnostics, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sverige) ved Seksjon for Allergi- og Proteinanalyser. All analysering av prøver ble utført av ansatte ved seksjonen.

3.3.1 Analyseprinsipp

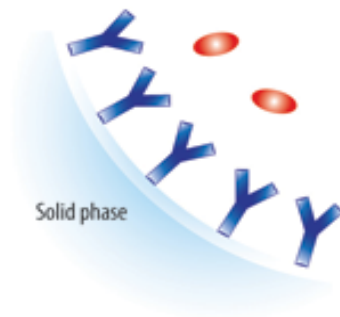
Phadia 1000 benytter assay ImmunoCap Tryptase, ImmunoCAP Total IgE og ImmunoCAP Specific IgE. Dette er immunologiske analysemetoder som benytter Sandwich immunoassay med fluorescensdeteksjon. For å illustrere dette analyseprinsippet er metoden for tryptase benyttet som eksempel under.

Analyseprinsipp Tryptase

Anti-tryptase er kovalent bundet til den faste fasen og vil reagere med tryptase i serumprøven fra pasienten. ImmunoCAPs faste fase består av en hydrofil cellulosepolymer innelukket i en kapsel, polymeren er i tillegg sterkt forgrenet, disse egenskapene gjør at allergenene binder

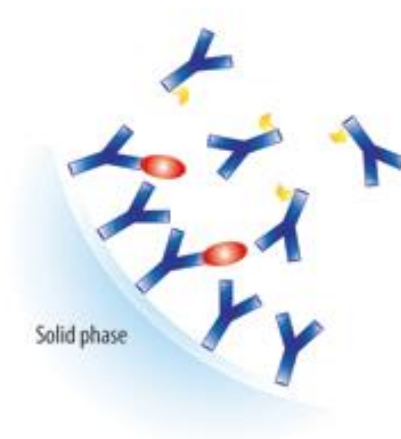
seg svært godt samtidig som deres struktur opprettholdes ("Test Principle ImmunoCAP Tryptase," 2012).

ImmunoCAP har veldig høy bindingskapasitet av allergener. Dette er fordi det er høy bindingskapasitet per mg cellulose samtidig som det er optimal mengde av cellulose i hver faste fase. Dette gjør at ønsket antistoff bindes lett uavhengig av antistoffets affinitet. Dette gir lav ikke-spesifikk binding eller god presisjon ("Test Principle ImmunoCAP Tryptase," 2012).



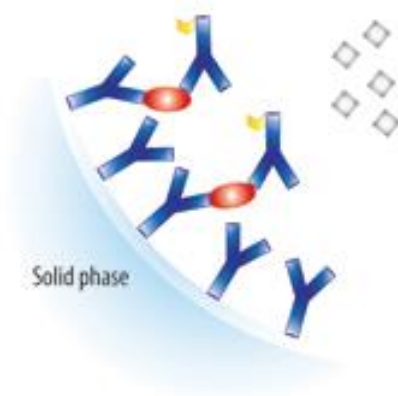
Figur 4: Tryptase bindes til anti-tryptase i den faste fasen ("Test Principle ImmunoCAP Tryptase," 2012)

Prøven blir deretter vasket for å fjerne ubundne komponenter. Etter vaskesteget blir konjugat som består av anti-tryptase konjugert med enzymet β -galaktosidase tilsatt, og det dannes et kompleks med allerede bundet tryptase. Prøven blir så inkubert ved 37°C ("Test Principle ImmunoCAP Tryptase," 2012).



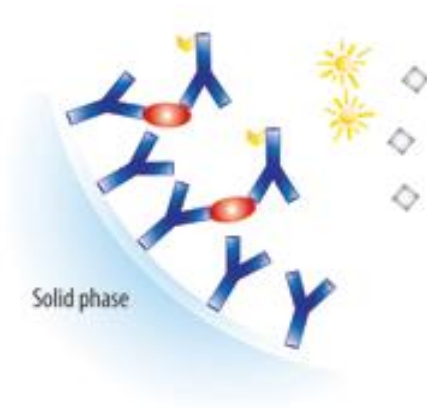
Figur 5: Enzymkonjugert antistoff danner kompleks med tryptase bundet til fastfase ("Test Principle ImmunoCAP Tryptase," 2012)

Etter inkubasjon blir ubundet enzym-konjugert anti-tryptase vasket bort, og de dannede kompleksene blir deretter inkubert med substratet 4-metylbelliferyl β -D-galactosid også kalt «framkallingsløsning» ("Test Principle ImmunoCAP Tryptase," 2012).



Figur 6: Kompleksene blir inklubert med substrat/framkallingsløsning ("Test Principle ImmunoCAP Tryptase," 2012)

Reaksjonen blir stoppet ved å tilsette 4% Na_2CO_3 som øker pH i løsningen. Etter at reaksjonen stopper blir fluorescensen av det eluerte stoffet målt ved 455nm. Emisjonen av lys er direkte proporsjonal med konsentrasjonen av tryptase i prøven. Ved høy responsverdi, vil det være mye spesifikt tryptase i prøven ("Test Principle ImmunoCAP Tryptase," 2012).



Figur 7: Fluorescensen av det eluerte stoffet måles ved 455nm ("Test Principle ImmunoCAP Tryptase," 2012)

3.3.2 Kalibrering og kvalitetskontroll

For hvert analysesett blir det analysert kontroller. For tryptase blir kontroller analysert i starten av hver analyseserie. Dette inkluderer både interne kontroller fra serumpool, og kontrollmateriale fra produsenten Phadia AB, Uppsala, Sverige. De interne kontrollene består av en høy og en lav kontroll. Det vil også bli kjørt kontroller for total IgE, Fx5 og Phaditop.

Seksjon for Allergi og proteinanalyser deltar i følgende eksterne kvalitetskontrollprogrammer; Labquality, DEKS (Dansk Institutt for Ekstern Kvalitetssikring), Quality Club (Phadia), UKNEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Scheme), og EQUALIS.

Quality Club (Phadia) leverer kontroller for spesifikk-IgE og total-IgE. DEKS inkluderer total-IgE, det samme gjør Labquality. UKNEQAS leverer kontroller for tryptase, spesifikk-IgE og total-IgE.

Under plan for innkjøring av Phadia1000 (analyseinstrumentet) ble total CV for tryptase satt til å være under 7 %. CV for kontrollene har Seksjon for allergi- og proteinanalyser satt til å være 8 %. Seksjonen har følgende kontrollregler: 1-3s/2-2s (n=2).

3.4 Analysekvalitet

Prøveresultater kan variere, og det er tre kilder til disse variasjonene: preanalytiske-, analytiske- og postanalytiske feil. Ved analysing av prøver skal resultatet gjenspeile konsentrasjonen av analytten i blodet til pasienten ved blodprøvetakningstidspunktet. Siden resultater fra laboratorieanalyser kan påvirke både diagnostisering og behandling av pasienter er det viktig å tenke på analysekvalitet under hele prøveprosessen (Burtis, Ashwood, Tietz, & Bruns, 2012). Den preanalytiske fasen omhandler alle forhold som kan påvirke prøven før den skal analyseres. Den analytiske fasen omhandler selve analyseringen av prøven, og den postanalytiske fasen omhandler alt som skjer etter analyseringen av prøven (Husøy, 2012). Variasjon i de tre fasene gir opphav til usikkerhet i analyseresultater, mens feil i de tre fasene kan få større konsekvenser og vil påvirke kvaliteten på prøvematerialet. Feil av større signifikant størrelse kan i verste tilfelle påvirke klinisk beslutningstaking.

3.4.1 Preanalytiske forhold

Preanalytiske forhold omfatter både preanalytiske variasjoner og preanalytiske feil. Faktorer som inngår i den preanalytiske fasen er blant annet pasientforberedelse, prøvetaking/innhenting av prøvemateriale, prøvebehandling og fordeling, transport og lagring av prøvemateriale.

Analyser kan påvirkes av mange faktorer, hvor ikke alle kan kontrolleres. Faktorer som ikke kan kontrolleres er blant annet alder, etnisitet, kjønn, miljømessige faktorer, graviditet, sykliske rytmer og vekt. Selv om dette er faktorer som ikke kan kontrolleres er det likevel hensiktsmessig å inkludere de i vurderingen av analyseresultater. Det kan for eksempel være aktuelt å etablere egne referanseområder basert på kjønn og/eller alder. Faktorer som kan kontrolleres er for eksempel matinntak, kroppsstilling, legemidler, aktivitet og livsstilsfaktorer som røyking og døgnvariasjoner i parameterkonsentrasjoner (Burtis et al., 2012, s. 120). Disse faktorene er viktig å standardisere og optimalisere for å redusere den preanalytiske variasjonen. Dette innebærer at alle deltakerne i kvalitetskontrollprosjekter får, og gjennomfører, de samme anbefalingene av f.eks. fasting, aktivitet, og at prøvetakingen og transporten av prøvematerialet blir utført likt og under de samme forholdene.

3.4.2 Analytisk variasjon

Analyseresultater er påvirket av tilfeldige variasjoner (presisjon), og systematiske avvik (bias) i selve analysen. Analytisk variasjon utgjør de tilfeldige variasjonene i måleresultatene som skyldes analyseprosessen. (Bolann, 2009). Avviket i det enkelte analyseresultat fra sannverdi kan skyldes både tilfeldige og systematiske feil (akkreditering, 2004).

Tilfeldige feil er feil som ikke kan unngås. Tilfeldige feil vil oftest spre seg symmetrisk rundt et gjennomsnitt. Graden av spredningen til de tilfeldige feilene avgjør den aktuelle metodens presisjon. Presisjon er definert som samsvaret mellom gjentatte målinger av uavhengige prøver. Presisjon kan uttrykkes kvantitativt ved standardavvik (SD) eller variasjonskoeffisient (CV). Standardavvik defineres som et statistisk mål for spredning av data. Videre defineres et analytisk standardavvik som et statistisk mål for tilfeldig spredning av måleresultater, et mål for måleusikkerhet (Fraser, 2001). For å optimalisere test-systemet er det viktig å optimalisere alle eventuelle tilfeldige variabler som kan oppstå. Kilder til tilfeldige feil er analyseinstrument, miljøfaktorer som temperatur, operatør og reagenser. Det er viktig for laboratorier å ha satte krav til metodens presisjon, og å overvåke dette, for å kunne oppdage avvik som skyldes kliniske utfall og ikke analytisk støy (Fraser, 2001).

Systematiske avvik kan forårsake et nivåskifte som kan påvirke analysens riktighet. Riktighet blir av IOS definert som «forskjellen/differansen mellom forventingen om måleresultat og den sanne verdien av den målte mengden». Riktighet angir slik grad av systematiske feil ved et måleresultat (BIPM, 2012). Det er ønskelig at alle prøvesvar skal angi den sanne verdien av det som blir målt i prøven. Hvor stor grad av riktighet en analysemetode har vil være avhengig av nivået kalibratoren er fastsatt til (Berg & Hagve, 2011). Det vil si dokumentasjon av kalibratorens sporbarhet. Det vil si at kalibratoren, som er et materiale med veldefinerte egenskaper, er sporbart til et standardmateriale øverst i sporbarhetskjeden, helst primærstandard eller en primær referansemetode. Kilder til systematiske avvik er skift av reagenser, kalibreringer, bruk av ikke-egnete reagenser/kalibratorene/forbruksvarer, endring i lagring av reagenser, endring av operatør eller dårlig opplæring av operatører, og dårlig vedlikehold av instrument.

For å overvåke analysens kvalitet blir det benyttet interne og eksterne kvalitetskontroller. Kvalitetskontroller dokumenterer analysemetodens presisjon og kontrollerer at den holder seg stabil over tid, de dokumenterer også analysemetodens riktighet og kontrollerer at det ikke

skjer en nivåendring. Kontrollene registrerer endringer i presisjon og riktighet som kan skyldes lot til lot-variasjoner på reagenser, kalibratorer og endringer i utstyr (Bishop, Fody, & Schoeff, 2013).

3.4.3 Postanalytiske forhold

Postanalytiske forhold består hovedsakelig av vurdering og validering av analyseresultater, rapportering av kritiske verdier og frigiving av resultater til rekvirerende lege. I tillegg inkluderes tolking av resultater, og laging av materiale som en del av den postanalytiske fasen (Husøy, 2012). Alle laboratorier har rutiner for rapportering av analyseresultater, innlegging av kommentarer til prøveresultat, og kommunikasjon ved kritiske verdier. Resultater blir tolket ut ifra referanseområder eller kliniske beslutningsgrenser.

3.5 Referanseområde

3.5.1 Definisjon av et referanseområde

Referanseområde er definert som det sentrale 95 % intervall hos friske personer (CLSI, 2008). Dette vil si at 95 % av de friske har verdier innenfor referansegrensene, mens 2,5 % av de friske ligger under referansegrensene og 2,5 % ligger over referansegrensene. En generell regel innen etablering av referanseområder, er det anbefalt et minimum av 120 referanseindivider (CLSI, 2008). Dette er fordi 120 referanseobservasjoner tillater 90 % konfidensgrenser å bli beregnet ikke-parametrisk for hver referansegrense (CLSI, 2008). Konfidensintervall defineres som et intervall som med en bestemt sannsynlighet (ofte 95 %) inkluderer den sanne verdien (Bolann, 2009). IFCC definerer terminologien innen referanseområder som følgende (CLSI, 2008; Fraser, 2001):

Referanseindivid er et individ utvalgt for sammenligning ved å benytte fastsatte kriterier (inkludjons- og ekskludjonskriterier). En *referansepopulasjon* består av alle potensielle referanseindivider. Dette er en teoretisk gruppe siden referansepopulasjonen vil kunne bestå av et ukjent antall individer. En *referanse prøvegruppe* er et tilstrekkelig antall referanseindivider valgt ut til å representere referansepopulasjonen. Denne gruppen skal representere den aktuelle populasjonen og skal dermed, i teorien, være utvalgt helt tilfeldig. I praksis må det kun antas at utvalget representerer populasjonen godt nok. *Referanseverdier* er

verdiene målt fra referanseindividene for en gitt analytt. Referanseverdiene vil ikke være identiske for alle referanseindividene; de har en statistisk spredning som blir kalt *referansefordeling*. Dermed beregnes *referansegrenser*, opprettet slik at forhåndsbestemte fraksjoner av referanseverdiene er mindre enn eller lik grensene. De øvre og nedre referansegrensene blir brukt til å definere *referanseintervall*.

3.5.2 Etablering av referanseområder

Det er anbefalt å etablere egne referansegrenser for sub-klassene med minst 120 observasjoner i hver gruppe (CLSI, 2008) hvis gjennomsnittet av to sub-klasser er statistisk signifikant forskjellige (5 % eller 1 % signifikantnivå) og at forskjellene er av klinisk betydning. Det er også anbefalt at hvis observasjonene ikke er tilnærmet normalfordelte må observasjonene bli transformert for å kunne beregne referansegrenser og konfidensintervaller. (CLSI, 2008).

Referanseområder kan beregnes både parametriske eller ikke-parametriske. Den parametriske metoden krever at dataene er tilnærmet normalfordelte eller at de blir, om mulig, transformert (eksempel log-transformert) til tilnærmet normalfordeling. Den ikke-parametriske metoden krever ingen normalfordeling av datamaterialet. Ikke-parametriske metoder er ofte anbefalt pga. av sin enkelthet (Solberg, 1987). Den mest brukte ikke-parametriske metoden er å beregne 2,5-persentilen og 97,5-persentilen. Ved å benytte den parametriske metoden må man først sørge for at dataene er tilnærmet normalfordelte.

3.6 Biologisk variasjon

Biologisk variasjon er definert som naturlige fysiologiske variasjoner i biokjemiske komponenter i kroppen, og er knyttet til ikke-påvirkelige faktorer som alder, kjønn og biologiske rytmer, samt påvirkelige faktorer som kosthold, fysisk aktivitet og stilling under prøvetaking (Fraser, 2001). Biologisk variasjon (BV) er unik for hvert individ og for hver analytt. Analyseresultater vil alltid være påvirket av tilfeldig biologisk variasjon. Biologisk variasjon deles inn i intra-individuell variasjon (CV_w) og inter-individuell variasjon (CV_b). Intra-individuell biologisk variasjon er de naturlige endringene i konsentrasjonen av en analytt hos hvert enkelt individ over tid. Intra-individuell biologisk variasjon kan ses på som et

uttrykk for personlig biologisk variasjon rundt et homeostatisk likevektspunkt. Dette kan beregnes som CV for målinger gjort på samme person ($CV_w = CV$ within) Inter-individuell biologisk variasjon er definert som forskjellen i konsentrasjon av en analytt mellom individer. Inter-individuell biologisk variasjon kan ses på som et uttrykk for den biologiske variasjonen mellom individer i et utvalg av den friske populasjonen og beregnes som CV_b (*between*). Inter-individuell biologisk variasjon er grunnlaget for referanseområder (Husøy, 2012).

Mange av faktorene som er nevnt under delkapittel 3.4.1 «Preanalytiske forhold» kan påvirke den biologiske variasjonen. Dette er blant annet biologiske rytmer, fysisk aktivitet, alder og kjønn (Husøy, 2012). For å redusere biologisk variasjon så mye som mulig er det viktig å standardisere prøvetakningsprosessen. Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) anbefaler blant annet at prøvene tas om morgenen, og at pasienten sitter i ro i minst 15 min før prøvetakning (CLSI, 2007).

Prøvesvar avhenger både av analytiske og biologiske variasjoner. Selv om den inter-individuelle biologiske variasjonen er grunnlaget for referanseområdet, så har den intra-individuelle biologiske variasjonen størst betydning for analyseresultatets totalvariasjon (Fraser, 2001).

3.6.1 Estimat av biologisk variasjon

For å kunne beregne et best mulig estimat av den biologiske variasjonen ble kravene foreslått i «Biological Variation Data Reporting Checklist (BIVAC)» lagt ekstra vekt på (Bartlett William et al., 2015). Biologisk variasjon blir benyttet til blant annet å definere krav til den analytiske variasjonen. Et generelt krav for en analysekvalitet er at den analytiske variasjonen (CV_a) skal være mindre enn halvparten av den intra-individuelle variasjonen (CV_w). Dette kravet gjør at analysekvaliteten ikke øker variasjonen i analyseresultatet med mer enn 12 % (Fraser, 2001).

Kravet til en analyses analytiske kvalitet vil med andre ord avhenge av den biologiske variasjonen for den aktuelle analytten. Hvis den intra-individuelle biologiske variasjonen for en analytt er liten, kreves det at analysemetoden må ha god presisjon (Fraser, 2001).

3.7 Statistiske beregninger

3.7.1 Beregning av referanseområde

Referanseområder kan beregnes både med en parametriske- og ikke-parametriske metode. Den ikke-parametriske metoden for å beregne referanseområde er å beregne 2,5- og 97,5-persentilen av datamaterialet. Hvis en variabel har vesentlig skjevhet, kan ikke-parametriske metoder benyttes. Ikke-parametriske metoder tåler ekstremverdier godt, og observasjonene trenger ikke å være normalfordelte. Ikke-parametriske metoder blir karakterisert ved at de kun tar hensyn til ordningsrekkefølgen til observasjonene, og ikke selve verdiene på observasjonene direkte. Dette vil si at observasjonene sorteres i stigende rekkefølge og får tildelt et rangtall (Aalen & Frigessi, 2006). 2,5-persentilen beregnes som $0,025 \times (n+1)$, og 97,5-persentilen som $0,975 \times (n+1)$, der n er antall observasjoner (Fraser, 2001, s. 96).

Den parametriske metoden beregner referanseområdet ut ifra gjennomsnitt og standardavvik ($\bar{x} \pm 1,96 SD$). For å kunne benytte den parametriske metoden må variabelen være tilnærmet normalfordelt (Solberg, 1987). Hvis ikke kan en mulighet være å transformere variabelen. Transformering vil si å modifisere en variabel ved å benytte en bestemt matematisk funksjon. Det er vanlig å benytte logaritmisk transformering (log-transformering) for å komme nærmere normalfordeling (Fraser, 2001, kap. 4).

Log-transformering er en utbredt metode brukt for å håndtere skjevfordelte (*skewed*) data, og er en av de mest vanligste transformeringene som blir brukt i biomedisinsk og psykososial forskning. Det er noen forutsetninger som må være oppfylt for at en logaritmetransformasjon skal kunne brukes. En særlig viktig forutsetning er at bare positive verdier skal kunne forekomme, 0 kan ikke være en mulig verdi. I tillegg er det bare i tilfeller med hale mot høyre det er aktuelt å bruke logtransformasjon, hvis det er hale mot venstre vil en logtransformering gjøre vondt verre. For logtransformering kan både 10-logaritme og naturlig logaritme benyttes, da alle logaritmer gir samme utseende.

Resultater fra kvantitative målinger presenteres ofte med et konfidensintervall.

Konfidensintervaller angir usikkerheten i et statistisk estimat. Til et konfidensintervall må det angis en sannsynlighet som forteller hvor stor sjansen er for at den ukjente måleverdien ligger innenfor intervallet. Dersom sannsynligheten er $P = 0,95$, vil vi ha et 95 % konfidensintervall. Jo høyere standardavviket er, jo bredere er konfidensintervallet (Aalen & Frigessi, 2006; Helbæk & Godejord, 2001). 90 % konfidens-intervall omkring referansegrensene ble beregnet ut ifra følgende formel: $P \pm 2,81 \times SD/\sqrt{n}$, der P er persentilen det skal beregnes

konfidensintervall for. For 97,5 persentilen blir P da 0,975. For de ikke-parametriske referansegrensene ble konfidensintervallene beregnet ut ifra rangnummerering lest ut i fra tabell oppgitt i «*Approved recommendations on the theory of reference values, part 5*». Hvilke rangeringsnumre konfidensintervallene leses ut ifra avhenger av størrelsen på utvalget (Solberg, 1987).

Det er flere plott og grafiske fremstillinger som kan benyttes for å vurdere resultater og fordelinger av variabler. Et histogram er en grafisk fremstilling der antall forekomster i et intervall er representert ved høyden på en søyle. Fordelen med histogram er at tallene blir gjort om til et bilde. Et alternativ til histogram er punktdiagram. I et punktdiagram er hver enkelt måling avmerket. Dette er ofte hensiktsmessig hvis grupper skal sammenlignes (Aalen & Frigessi, 2006).

Box-plott kan også benyttes til å sammenligne grupper. I et box-plott inneholder boksen i sentrum de 50% midterste observasjonene. Nedre og øvre grense for boksen blir da henholdsvis 25- og 75-persentil. Streken på tvers over boksen markerer medianen i observasjonene (Aalen & Frigessi, 2006).

T-test kan benyttes til å undersøke om det er systematisk avvik mellom f.eks. to utvalg gjennom å sammenligne gjennomsnittsdifferansen. Gjennomsnittsdifferansen er signifikant forskjellig fra null hvis p-verdien $< 0,05$. T-test er en parametrisk metode, og baserer seg på tilnærmet normalfordelte variabler (Bolann, 2009).

3.7.2 Estimering av biologisk variasjon

Biologisk variasjon undersøkes ved å observere om det skjer endringer i analyttkonsentrasjonen over tid, eller om det holder seg stabilt. For å beregne den biologiske variasjonen til tryptase ble det benyttet «linear mixed effects» (uten tilfeldig variasjon i ukenr). Lineære mixed effects-modeller er en statistiske modell med både fixed effects (faste effekter) og random effects (tilfeldige effekter), og brukes for å ta hensyn til med enn én kilde til tilfeldig variasjon. I modellene er det en kontinuerlig avhengig variabel og en eller flere uavhengige variabler (forklaringsvariabler) som kan være kategoriske eller kontinuerlige. Mixed effects-modeller blir hovedsakelig benyttet til å undersøke sammenhenger mellom en eller flere forklaringsvariabler og en avhengig variabel i datamateriale. Datamateriale kan være fra eksperimentelle eller longitudinelle studier, eller studier som kombinerer disse to.

Mixed effects-modeller kan brukes på data med klyngestruktur, der klyngene kan for eksempel være gjentatte målinger i tid, flere personer i samme familie eller flere målinger av samme blodprøve (West, Welch, Galecki, & Gillespie, 2006).

Faste effekter er nært beslektet med regresjonskoeffisienter i lineær regresjon, og tilfeldige effekter er tilfeldige variasjoner mellom målinger i hvert klyngenivå. De tilfeldige effektene beskriver tilfeldig variasjon på den avhengige variabelen. Ved å ta høyde for den tilfeldige variasjonen kan de faste effektene vurderes på tvers av grupperingene i datamaterialet. Mixed effects-modeller krever ikke balanserte data. Modellene kan estimeres korrekt selv om det forekommer manglende målinger av den avhengige variabelen. Når det utføres longitudinelle studier risikeres det også frafall av deltakere over tid, og dette gjør lineære mixed effects-modeller til en foretrukket modell for slike studier (West et al., 2006).

CV_w , CV_b og CV_a ble beregnet gjennom å omgjøre standardavviket, som ble funnet i lineær mixed effects-modellen, for den inter- og intra- individuelle biologiske variasjonen og den analytiske variasjonen om til CV% gjennom følgende formel: $\frac{SD}{\bar{x}} \times 100 = CV\%$.

4. Forskningsdesign

4.1 Valg av forskningsdesign

I studien er det benyttet et kvantitativt forskningsdesign både for etablering av referanseområde og undersøkning av den biologiske variasjonen til tryptase. Bakgrunnen for dette er at konsentrasjonen av tryptase og de andre allergi-parameterne kan kvantifiseres til tallverdier som videre kan fortolkes. I kvantitative studier arbeider man i en relativ lineær sekvens der man starter med en problemstilling, og ender med et svar på denne problemstillingen.

I tillegg til å være kvantitativt, er etableringen av et referanseområde også et ikke-eksperimentelt kvantitativt forskningsdesign. Det vil si at det ikke foretas noen intervensjon, og at det bare er eksisterende faktorer som blir undersøkt (Polit & Beck, 2012). I etablering av referanseområde måles tryptase én gang. Dette kan derfor betegnes som et tverrsnittstudie. Tverrsnittstudier gir et bilde av variabelen «her og nå», uten at det vil bli tatt noen oppfølgingsprøver. I studien er det *in vitro* målinger av analytten som skal gi et bilde på nivået av analytten i befolkningen (Polit & Beck, 2012). Forskningsdesignet som er valgt for

å kartlegge referanseområdet for tryptase kan oppsummeres som en kvantitativt, ikke-eksperimentelt tverrsnittstudie.

Forskningsdesignet som er blitt valgt ut til å svare på forskningsspørsmålet om hva som er den biologiske variasjonen for tryptase er en kvantitativt, ikke-eksperimentelt longitudinell studie. Ikke-eksperimentelle studier slik som dette kan også kalles prospektive observasjonsstudier. Studien blir prospektiv fordi deltakerne inkluderes før det foretas noen målinger. Begrunnelsene for at undersøkelse av den biologiske variasjonen til tryptase er en longitudinell studie er at variablene blir målt flere ganger over tid.

4.2 Forankring av forskningsdesign

Dette forskningsdesignet har sin vitenskapsteoretiske forankring i den medisinsk- og naturvitenskapelig tradisjonen positivismen. Positivismen er betegnelsen for en vitenskapelig tilnæringsmåte som søker årsaksforklaringer, teoribyggende sammenhenger, og et helhetsbilde basert på erfaringsmessige kjensgjerninger og vitenskapelige resultater (Godfrey-Smith, 2003; Sletnes, 2015).

Positivismen, og spesielt den logiske positivismen, blir ofte kalt for logisk empirisme og kan ses på en mer vitenskapsorientert form av empirismen. Det logisk positivistiske synet ble basert på utviklinger innen logikk, filosofi av språk, og filosofi av matematikk mellom den første og den andre verdenskrigen (Godfrey-Smith, 2003). I empirismen og positivismen er erfaring, og verifisering av erfaring, ofte sett på den eneste kilden til mening og kunnskap. Verifiseringen er her bare i prinsipp, og ikke i praksis. Det vil si at utsagn vil bli ansett som korrekt hvis det er mulig å teste dette utsagnet (Godfrey-Smith, 2003). Et eksempel på dette i forskning er at all forskning skal i prinsippet kunne reproduseres og komme frem til de samme konklusjonene som den originale forskningen.

Siden idealet til positivismen er naturvitenskapen hvor forskning er basert på observerbare data, er positivismen en passende vitenskapsteoretisk forankring for utforskningen av et referanseområde der det bare vil bli sett på observerbare og målbare data.

4.3 Utvalg

4.3.1 Utvalg for etablering av referanseområde til tryptase

Siden det ikke er realistisk å måle analytten i hele befolkningen ble det gjort en avgrensning av målpopulasjonen: friske voksne uten pågående anafylaktisk reaksjon. Vi valgte å benytte blodgivere da det antas at blodgivning ikke påvirker allergi-analyttene som skal måles. Det at blodgivere benyttes til å representere denne populasjonen kalles for «convenience sampling» (Polit & Beck, 2012).

Givere som var innkalt til tapping i innsamlingsperioden ble forespurt om inkludering i prosjektet. Fordeling av inklusjoner av ønsket antall fordelt på kjønn og alder ble bestemt før oppstart og fulgt ved hjelp av fortløpende registrering i inklusjonsskjema på tappesalen i Blodbanken. I etablering av et referanseområde er det viktig å inkludere alle aktuelle aldersgrupper som referanseområdet skal representere. De ulike aldersgruppene ble delt opp i aldersgrupper, henholdsvis 18-30 år, 31-40 år, 41-50 år osv. til og med 70+ år. Da det kunne bli vanskelig å rekruttere deltakere i alle aldersgruppene med jevn kjønnsfordeling ble det åpnet for at det kunne suppleres med friske frivillige som ikke var blodgivere.

Inklusjons- og eksklusjonskriterier

Blodgivere representerer godt den friske befolkningen og vil i tillegg til dette prosjektets inklusjons- og eksklusjonskriterier også oppfylle Blodbankens kriterier (se vedlegg I for Blodgiverskjema). Friske individer er i denne studien definert som individer som ikke forventes å hverken ha eller få en sykdom under prøvetakningen. Giverne må føle seg friske og ha en god allmenn helse. Følgende kriterier må oppfylles av referanseindividene for å bli tatt med i studien:

- Inklusjonskriterier:
 - Giver må være fylt 18 år
 - Frisk (ingen pågåendesykdommer eller sykdomsfølelse)
- Eksklusjonskriterier:
 - Allergiske plager de siste 4 ukene før prøvetakning (f.eks. sesongbasert allergi som bjørkepollen, gress pollen osv.)
 - Allergiske plager kan være eksempelvis eksem, kløe i øyne/nese/hals
 - Nylig blodtransfusjon eller nylig utført kirurgiske inngrep

Studiestørrelse

En referansestudie krever som nevnt tidligere minimum 120 referansepersoner for å kunne beregne akseptable konfidensintervall for grensene (CLSI, 2008). Ved å benytte et lavere antall givere vil det bli en høyere usikkerhet i resultatene. Det var ønskelig å ha mulighet til å beregne referanseområde for sub-grupper i referanseområdet. Dette gjaldt spesielt for kjønn og alder, i tillegg til gruppene med og uten allergi. På bakgrunn av dette ble ønsket studiestørrelse satt til 240 friske frivillige.

4.3.2. Utvalg for Biologisk variasjon

Det ble utført en pilotstudie der en mindre gruppe med og uten allergi ble tatt prøver av over 10 uker. Det som ofte blir gjort i praksis er at det følges gitte veiledende kriterier (Bartlett William et al., 2015; Carobene et al., 2017; Carobene et al., 2016). Et av disse kriteriene var at prøvene skal tas til samme tidspunkt over en viss periode. I vår pilotstudie inkluderte vi friske frivillige, som ikke var blodgivere, som hadde mulighet til å ta blodprøver over hele tidsperioden. Disse besvarte de samme spørreskjemaene som givene til referanseområdet (Vedlegg II). Det var ønskelig å undersøke CV_w og CV_b for tryptase for individer med og uten allergi. Det ble derfor benyttet de samme inklusjons- og eksklusjonskriteriene som ved referanseområdet. Siden dette var en pilotstudie ble kun et fåtall, 14 frivillige deltakere, inkludert i prosjektet. Alle de 14 givene jobbet ved Laboratorieklinikken, HUS og var dermed tilgjengelige til å delta i denne pilotstudien.

4.4 Standardisering av preanalytiske forhold i studien

Avhengig variabler for disse studiene er tryptase, samt total-IgE, Fx5 og Phadiatop. De uavhengige variablene er kjønn, alder og allergi, type allergi, tidligere anafylaksi/kjent alvorlig allergi eller overfølsomhet, fysisk aktivitet og medikament/kosttilskudd.

Prøvetakningsprosessen ble standardisert for å minimere de kontrollerbare biologiske variasjonene, blant annet fysisk aktivitet og kroppsstilling. Dette inkluderer at deltakerne måtte sitte i ro en stund før prøvetakingen, at alle prøvene ble tatt sittende, og at alle prøvene ble tatt mellom 8-10. CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) anbefaler at prøver blir tatt mellom 7 og 9 om morgenen, og at deltakerne har sittet i ro i 15 minutter før

prøvetakningen. Prøvene ble tatt mellom 8 og 10 fordi det var da deltakerne var tilstede ved arbeidsplassen og hadde anledning til å delta. Flere av deltakerne hadde oppgaver som måtte prioriteres tidlig i vekten og det var derfor ikke mulig å starte innsamlingen før 8.

Blodgivere vil ha allergisk sykdom i samme andel som resten av befolkningen, med unntak av personer som tidligere har hatt anafylaksi (Helsedirektoratet, 2014) og noen typer legemiddelallergi. Personer med milde allergier kan gi blod så lenge de ikke har symptomer. Dette gjelder også hvis de bruker allergimedisin av typen antihistamin og lokalbehandling som f.eks. neseppray. Av denne grunn ble det registrert selvrapportert allergi og utført allergipaneltester på alle blodgiverne inkludert i studien. For selvrapportering av allergi ble det inkludert spørsmål om allergisk sykdom, aktuell behandling på prøvetidspunkt og tidligere allergiske hendelser i spørreskjemaet (se vedlegg II). Tidspunkt for innsamling av prøvematerialet ble satt til høst/vinter for å unngå at giverne var preget av sesongallergi.

4.5 Etiske betraktninger

Prosjektet er godkjent av REK (Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskning) [2017/1179/REK Vest]. Dataene i dette prosjektet ble registrert aidentifisert, og ble lagret på en egen forskningsserver. Opplysninger om den enkelte giver, navn og personnummer, vil kun være tilgjengelig gjennom en koblingsnøkkel. Koblingsnøkkel vil bli slettet ved prosjektets slutt som er satt til 2021. Deltakerne i studien har avgitt skriftlig informert samtykke til deltakelse. Det ble også gitt informasjon om at deltakerne til enhver tid kan trekke seg fra studien uten å måtte oppgi grunn.

Samtykkeskrivet inneholder informasjon om studien, hva det innebærer og hva som skjer med opplysningene som blir innhentet. Dette gjelder både analyttene som blir analysert og spørreskjema, samt informasjon om deltakeren. Det ble opplyst om at deltakerne ikke ville få tilbakemelding om resultat av analysen med mindre de hadde krysset av for at fastlege skulle få tilbakemelding ved eventuelle unormale prøveresultater. Se vedlegg II og III for spørreskjema og samtykkeskriv.

Risikoen deltakere ble utsatt for i dette forsøket var å ta blodprøver og å avgi et mindre blodvolum. Siden det kun ble inkludert friske giverne ansees dette for å være en liten belastning. For blodgiverne vil det ikke bli tatt noe ekstra blod, da blodprøvene blir tatt ut ifra en egen «prøvetakningspose» og det dermed ikke tappes noe ekstra blodvolum.

Pasientskadeerstatningen vil være gjeldende for dette prosjektet. Nytteverdien til prosjektet vil være at resultatet fra forsøket vil kunne bidra til å forbedre diagnostikken ved blant annet allergisk sykdom, mastocytose og anafylaksi.

5. Metode

5.1 Metode referanseområde

5.1.1 Innsamling og bearbeiding av prøvemateriale

Prosedyredokumentet «*Etablering og gjennomgang av referanseområder*» fra LKB, HUS og anbefalinger fra *Clinical Laboratory Standards Institute* ble benyttet som veileder for etablering av referanseområdet (CLSI, 2008). Det ble samlet inn materiale fra 252 givere, derav 245 ble inkludert til referanseområdet. Det ble ekskludert 3 givere på grunn av manglende utfylling av spørreskjema/samtykkeskjema, og 4 givere ble ekskludert på grunn av pre-analytiske feil, for lang tid mellom prøvetaking og sentrifugering (>2 timer). Materialet til referanseområdet og «Biobank for allergianalytter» ble samlet inn mellom 23. oktober 2017 - 19. januar 2018. For å fylle aldersgruppene 60-69 år og >70 år ble det rekruttert 7 givere som ikke var blodgivere. Alle disse 7 givene hadde tilknytning til Laboratorieklinikken ved Haukeland Universitetssjukehus og oppfylte alle de satte kriteriene. Hoveddelen av prøvematerialet ble samlet inn på dagtid mellom 8-14, men noen prøver ble også samlet inn mellom 14-18 da tappesalen ved Blodbanken holdt sent åpent hver onsdag.

Innsamlingen ble startet senere enn originalt planlagt på grunn av forsinkelser i REK-godkjenning, og på grunn av at innsamlingen i Blodbanken ikke kunne starte før etter Sykkel-VM 2017 i Bergen. Det ble også et par ukers opphold i innsamlingen på grunn av forsinkelser i levering av nunc-rørene som ble brukt til nedfrysning av materiale til Biobanken. Bortsett fra disse forsinkelsene gikk innsamlingen som forventet.

Innhenting av samtykke og spørreskjema

Blodgivere fikk utdelt spørreskjema og samtykkeskjema ved ankomst Blodbanken for blodgivning. Spørreskjemaet som deltakerne fikk utlevert sammen med samtykkeskrivet forespør deltakerne om alder, kjønn, eventuell allergier (type allergi, behandling), eventuelt trening og medikament/kosttilskudd tatt i forkant av prøvetakingen. Dette ble gjort for å

undersøke om det kunne ha en eventuell påvirkning på tryptase-nivåene. Hvis de ønsket å delta ble spørreskjema og samtykke samlet inn og nummerert med prosjektnummer.

Prøvetaking

Materialet (serum, EDTA-fullblod og EDTA-plasma) ble samlet inn fra givere når de var inne for blodtapping ved Avdeling for Immunologi og transfusjonsmedisin (AIT, Blodbanken), eller ved oppmøte for frivillig blodprøvetaking til dette prosjektet. I Blodbanken ble innsamlingen av materiale gjort i sammenheng med selve tappingen slik at giverne ikke måtte gjennomgå noe ekstra prøvetakning i tillegg til den vanlige prosedyren ved tapping. Det ble tappet blod i 2 gel-rør (BD Vacutainer 3,5 mL) og ett EDTA-rør (Vacuette K2EDTA 3 mL) fra hver giver. All innsamlingen av materiale ved Blodbanken ble utført av de ansatte ved tappesalen, Blodbanken. Ved inkludering av givere som ikke var blodgivere ble det utført vanlig venøs prøvetakning, og dette ble utført av masterstudenten.

Kjønn og alder på givere ble registrert fortløpende ved tappesalen for å ha en oversikt over fordelingen. Utover innsamlings-perioden ble det en mer selektiv inkludering av givere for å få en jevn fordeling i alders- og kjønnsgruppene. Det ble også inkludert andre givere enn blodgivere for å få en jevn fordeling av kjønns- og aldersfordelingen. Det ble inkludert totalt 245 givere, derav 7 var ikke blodgivere

Bearbeiding av prøver

Før sentrifugering av prøvene ble 0,5 mL EDTA-fullblod overført til merkede fryse-alikvoter (nunc-rør, VWR Collection). Serum- og EDTA-rør ble sentrifugert 30-120 minutter etter prøvetakning ved standard innstillinger (2000 G i 10 minutter). Serum fra ett gel-rør ble pipettert over i to sekundær-rør som merkes med analyseetiketter (suffix for allergianalyser - 65 for t-IgE, Phadiatop og Fx5, og -67 for Tryptase), og ble satt til rutine. Analyse av tryptase utføres to ganger i uken ved Seksjon for Allergi og Proteinanalyser. Analysing av total-IgE og allergipanelene blir analysert hver ukedag ved seksjonen. Prøvene ble oppbevart i kjøleskap i påvente av analysing. Ingen prøver ble stående mer enn 1 uke før analysing. Dette er i tråd med seksjonens prosedyre for rutineprøver. Prøvene ble analysert etter hvert som materialet ble samlet inn for å simulere den normale variasjonen i rutinearbeid.

Holdbarhetsforsøk utført i 2015 viser holdbarhet i 14 dager i kjøleskap ved aktuelt prøvemateriale.

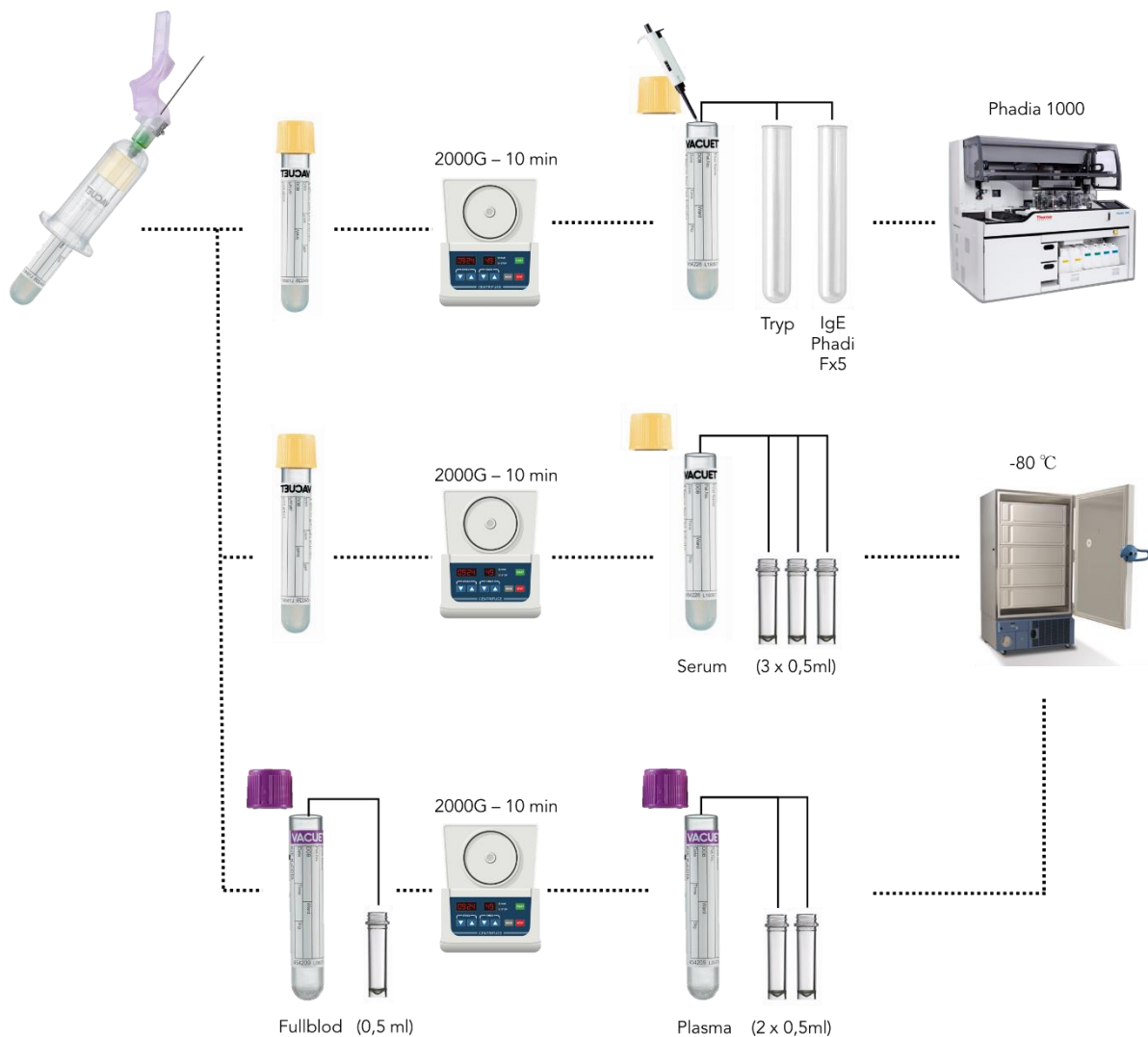
Det ble fryst ned 4-6 alikvoter (nunc-rør 0,5 mL merket med prosjektid-nr.) derav ble 2-3 alikvoter fylt med serum, 1-2 alikvoter med plasma og 1 alikvote med fullblod (se figur 8) Dette ble gjort for hver giver som hadde gitt samtykke. Alikvotene ble satt i -80°C fryser i «Biobank for Allergianalyser» for lagring til eventuell re-analysering, samt for senere innkjøring av referanseområde for andre allergianalytter.

Siden prøvene som skulle til Biobanken måtte fryses ned i alikvoter i -80 °C fryser ble det forsinkelser i innsamlingen av materiale som følger av en forsinkelse i leveranse av nunc-rørene. Forsinkelsen i leveransen av nunc-rørene påvirket ikke innsamlingen av materiale til pilot-prosjektet om den biologiske variasjonen.

5.1.2 Analysering av prøvemateriale:

Prosjektprøvene ble analysert sammen med pasientprøver. I tillegg til tryptase og total-IgE ble det også allergi-panelene Fx5 og Phadiatop (phadi) analysert for å kartlegge eventuell IgE sensibilisering. Total-IgE og allergi-panelene analyseres daglig. Ved positive utslag på allergi-panelene ble det analysert reflekstester som ved vanlig rutine påfølgende arbeidsdag. Reflekstester er tester som blir utført på spesifikke allergener etter positive utslag på allergipanel. Prøvene ble analysert på analyseinstrumentet Phadia 1000.

Følgende allergener inngår i luftveispanelet (Phadiatop): D. Pteronyssinus, katt, hest, hund, timotei, Cladosorium Herbarum, bjørk og burot. I tillegg inngår D. Farinae, oliventre og veggurt i Phadiatop. Disse analyseres utføres kun dersom Phadiatop er positiv. Følgende allergener inngår i matvarepanelet (Fx5): eggehvite, kumelk, torsk, hvete, peanøtt og soyabønner.



Figur 8: Innsamling, prøvedeling og analysing av materiale til referanseområde for tryptase og Biobank for allergianalytter.

5.1.3 Bearbeidelse av analyseresultater

Svar på spørreskjema ble registrert i en database på egen forskningsserver. Resultatene ble registrert sammen med det tilhørende prosjektid-nr. En koblingsnøkkel ble benyttet for å koble giver-id-kode opp imot giverens identitet (navn). Disse ble lagret separat etter seksjonens rutiner for lagring av data. Giverne krysser av på samtykkeskjema om de ønsker at fastlege skal kontaktes ved eventuelle funn over forventet normalområde for analyttene. Det er kun i slike situasjoner, eller hvis giver ønsker å trekke seg, at koblingsnøkkelen vil bli benyttet. Dagens referanseområde for tryptase, $<24 \mu\text{g/L}$, ble satt som grense for å eventuelt kontakte giver gjennom fastlege.

Resultatene ble bearbeidet statistisk i statistikkprogrammet R (R versjon 3.4.1). Her ble det også undersøkt for eventuelle alders- og kjønnsforskjeller, og om eventuelle allergier/trening/medikament har en påvirkning på resultatmålingene. Ut i fra dette ble det beregnet et nytt referanseområde for analytten tryptase. Det ble gjort sammenligninger mellom nytt referanseområde og dagens referanseområde som ble etablert i 1998/99.

Data fra spørreskjemaene og analyseresultatene ble satt inn i egne databaser. Registrering av data fra spørreskjema og analyseresultater ble kontrollert av en bioingeniør ved LKB for å dobbelsjekke at det ble registrert rett data. Resultatene og variablene ble statistisk bearbeidet både i statistikkprogrammet SPSS (IBM SPSS Statistics 24) og R. R ble benyttet til å lage scatterplott, histogrammer og QQ-plott, samt for å beregne referanseområde både parametrisk og ikke-parametrisk. Verdiene ble også logtransformerte i R før videre beregninger av referanseområde og t-test. T-test ble utført i R for å kunne avgjøre om det var blant annet kjønnsforskjeller eller forskjeller i noen av de andre variablene. SPSS ble benyttet til å lage histogrammer, box-plott og deskriptiv statistikk. Script for beregninger gjort i R er vist i vedlegg IV.

5.2 Metode biologisk variasjon

5.2.1 Innsamling og bearbeiding av prøvemateriale:

De frivillige giverne fikk utdelt spørreskjema og samtykkeskjema ved første prøvetakning (vedlegg II og III). Tid for prøvetakning ble avtalt ved rekruttering. Av praktiske grunner var det hovedsakelig ansatte ved LKB og Laboratorieklinikken som ble spurt om å delta i pilotstudien. Samtykke ble innhentet ved første prøvetaking. All prøvetaking ble utført av mastergradsstudenten for denne delen av prosjektet. Giverne fylte ut spørreskjemaet ved hver prøvetaking (uke 1-10). Dette var for å avdekke eventuelle endringer. Undersøkelsen av den biologiske variasjonen til tryptase ble utført som et pilotprosjekt. Det ble inkludert 14 givere som det ble tatt blodprøver av over 10 sammenhengende uker høsten 2017 (oktober-desember). Hver giver ble tildelt et eget prosjekt-id nr. Det samme prosjekt-id nr. ble benyttet for spørreskjema, samtykkeskjema og merking av prøveglass for hver enkelt giver.

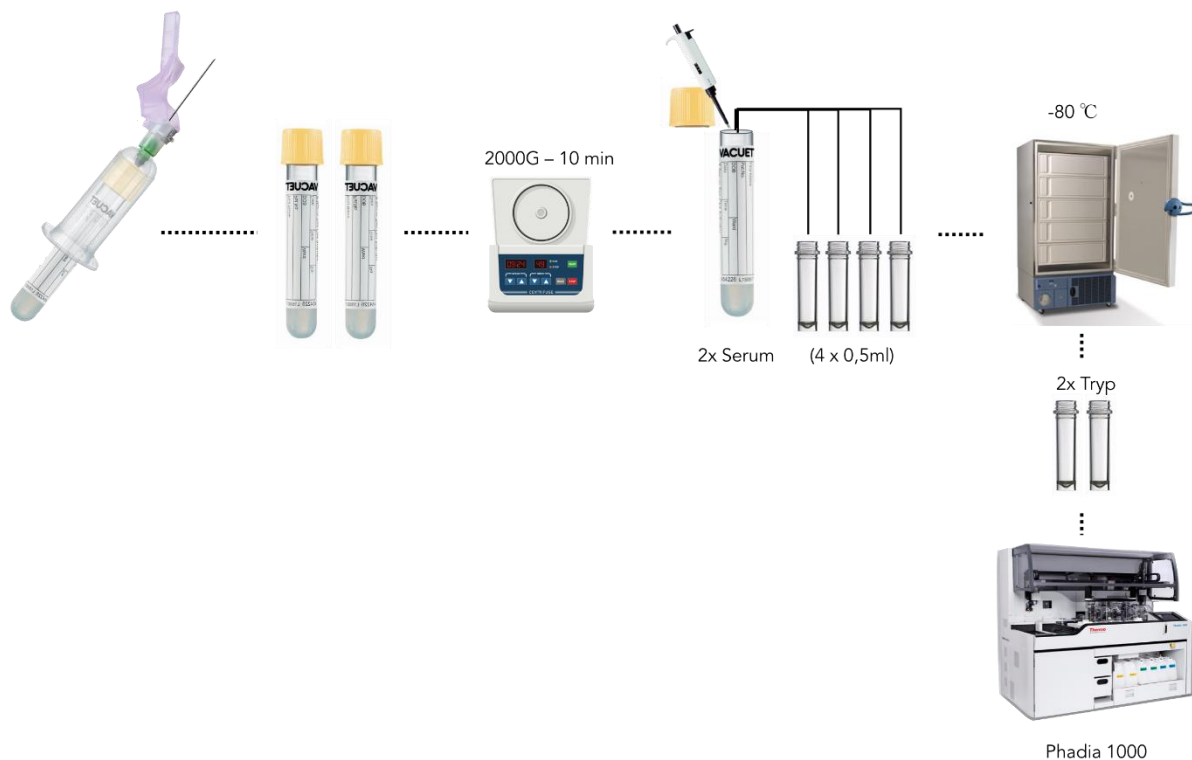
For å standardisere innsamlingen av materiale til den biologiske variasjonen, var det ønskelig at prøvene ble samlet inn en fast dag i uken \pm 1 dag og til det omtrentlige samme tidspunktet. Alle prøvene ble derfor samlet inn mellom kl 8-10. Ikke alle giverne kunne stille opp alle

ukene, men ingen av giverne gikk glipp av mer enn én uke av de 10 ukene materiale ble samlet inn. Disse standardiseringene ble satt på bakgrunn av anbefalingene i arbeidsgruppen for biologisk variasjon ved European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) (Carobene et al., 2016).

Innsamling av materiale, serum (BD Vacutainer 3,5 mL), fra de frivillige givere ble utført med vanlig venøs blodprøvetaking etter LKBs rutiner (EK-dokument 02.13.4.15.5-02 "Blodprøvetaking, venøs og kapillær"). Serum-rørene koagulerte i minst 30 minutter, og ble sentrifugert innen 2 timer ved 2000 G i 10 minutter. Ved første giving ble det tatt 3 gel-rør, og de påfølgende ukene ble det tatt 2 gel-rør. Serum fra to gel-rør, eventuelt ett gel-rør á 6 mL, ble overført til sekundærrør (nunc-rør 0,5 mL) og satt i egne merkede fryseesker i -80°C fryseboks frem til analysering. Serum ble overført til 4 sekundærrør (se figur 9). Dette ble gjort for å kunne undersøke den analytiske variasjonen ved å kjøre prøvene i duplikater, og for eventuelle re-analyseringer. Dette ble gjort alle de påfølgende ukene.

5.2.2 Analysering av prøvemateriale

Det ekstra gel-røret som ble tatt den første uken ble satt til rutine-analysering av total-IgE, Fx5 og Phadi. Dette var for å undersøke om giverne hadde noen positive utslag på allergi-panelene. Etter endt innsamling av prøvemateriale i pilot-studien ble prøvene tatt opp av frys, tint, og analysert for analyttene t-IgE og tryptase. Dette er for å unngå LOT til LOT, og dag-til dag-variasjoner. For å unngå eventuelle pre-analytiske feil ved pipettering av materiale over i nye sekundærrør, ble nunc-rørene satt direkte i sekundærrør merket med analyseetiketter. Etter endt analysering ble prøvene satt tilbake i fryseesker i -80°C fryseboks. Alle prøver fra den samme giver ble analysert i samme batch.



Figur 9: Innsamling, bearbeidelse og analysering av prøvemateriale til biologisk variasjon

5.2.3 Bearbeidelse av analyseresultater

Data fra spørreskjemaene og analyseresultatene ble satt inn i egne databaser. Resultatene og variablene ble statistisk bearbeidet både i SPSS og R. I R (R-pakke nlme) ble det dataene gruppert til duplikater for hver giver for hver uke, og det ble utført linear mixed effects-modeller for å estimere intra-individuell variasjon, inter-individuell variasjon og analytisk variasjon. Det ble også i R laget plott over datamaterialet. Script for beregninger gjort i R er vist i vedlegg V.

5.3 Statistikkprogram

Det meste av bearbeidelse av resultatene i statistikkprogrammet R (R 1386 3.4.1) ble gjort i samarbeid med Tore Wentzel-Larsen. Statistikkprogrammet R er et programmeringsspråk og system for statistisk databehandling og grafikk. R er designet rundt et ekte dataspråk, og kontrollen av beregninger foregår ved å skrive inn kommandoer. I bruksområde skiller R seg ut ved at man kan ha ett eller flere arbeidsområder som kan inneholde tidligere resultater,

egne funksjoner og datasett. SPSS (IBM SPSS Statistics 24) er et omfattende og brukervennlig statistikkprogram som også er blitt brukt i dette prosjektet. SPSS er blant de mest brukte programpakkenes for statistisk analyse innen blant annet samfunnsvitenskap og medisinsk forskning. I tillegg til statistiske analyser så kan programmet benyttes til datahåndtering og dokumentasjon. I dette prosjektet ble SPSS brukt til å danne database over innsamlede data fra spørreskjema samt analyseresultater.

6. Resultater

6.1 Deskriptiv statistikk om givene

Den gjennomsnittlige alderen på givene er 44 år, der alderen varierer fra 19 til 76 år. 50,6 % av utvalget er kvinner. Givene ble under inklusjon delt opp i aldersgrupper og med omtrentlig lik fordeling i hver gruppe både for menn og kvinner. Dette er vist i tabell 1.

Tabell 1: Alders- og kjønnsfordeling i referansepopulasjonen. Fordeling av deltakere i de ulike aldersgruppene er vist som antall kvinner og menn, totalt antall deltakere, og prosentvis andel av hele studiepopulasjonen.

ALDER (ÅR)	MENN	KVINNER	TOTALT	% ANDEL
<30	30	32	62	25 %
30-39	20	21	41	17 %
40-49	21	22	43	18 %
50-59	20	20	40	16 %
60-69	20	19	39	16 %
≥70	10	10	20	8 %
TOTALT	121	124	245	100 %

Tabell 2 viser fordelingen av de ulike variablene fra spørreskjema og tabell 3 viser resultatene av allergi-paneltestene. De ulike typene selvrapportert allergi er vist i tabell 4 sammen med eventuelt tilhørende positive allergitester.

Tabell 2: Selvrapportert allergi, trening og medikament/kosttilskudd hos deltakerne, innhentet fra spørreskjema. Forholdet mellom selvrapportert allergi og utslag på allergitester er vist nederst.

	Svar- alternativ	Antall	% Andel
Selvrapportert allergi	Nei	133	54
	Ja	112	46
Trening siste 24 timer	Nei	195	80
	Ja	50	20
Medikament /kosttilskudd siste 48 timer	Nei	167	68
	Ja	78	32
Allergitest			
Selvrapportert allergi	Negativ	54	48
	Positiv	58	52

Tabell 3: Resultat av allergipaneltestene

Allergipanel	Allergitest	Antall	% Andel
Phadiatop (luftveispanel)*	Grenseverdi	5	2
	Negativ	171	70
	Positiv	69	28
Fx5 (matvarepanel)**	Negativ	236	96
	Positiv	9	4

Analyseinstrument: Phaida 1000 (ImmunoCAP Tryptase, ImmunoDiagnostics, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sverige). Prosent av positive resultat per allergipanel.

*Phadiatop inkludere analyse av spesifikk IgE mot følgende allergener: D. Pteronyssinus, katt, hest, hund, timotei, Cladosorium Herbarum, bjørk og burot. I tillegg inngår D. Farinae, oliventre og veggurt

** Fx5 inkluderer analyse av spesifikk IgE mot følgende allergener: eggehvite, kumelk, torsk, hvete, peanøtt og soyabønner.

Tabell 4: Selvrapporterte allergier fra spørreskjema og tilsvarende positive allergipaneltester

Allergen	Antall: Selvrapportert allergi***	Antall selvrapportert allergi /m positiv allergitest*
Pollen**	18	16
Katt	17	6
Husstøv	15	10
Gress/timotei	13	11
Bjørk	10	3
Penicilin	8	-
Skalldyr	7	-
Hund	5	5
Nøtter	4	-
Gluten	3	1
Myggstikk	3	-
Melk	3	-
Parfyme	2	-
Sitrusfrukter	2	-
Veps	2	-
Vaskemiddel	2	-
Astma	2	-
Burot	2	-
Klor	2	-

* Kun utført paneltester (Phadi og Fx5)

** For givere som har oppgitt pollenallergi som selvrapportert allergi er det blitt tolket som enten gress, bjørk eller burot-allergi, eller en kombinasjon av disse.

*** 30 givere har oppgitt mer enn ett allergen, alle allergener er tatt med i tellingen av antall selvrapporterte allergener

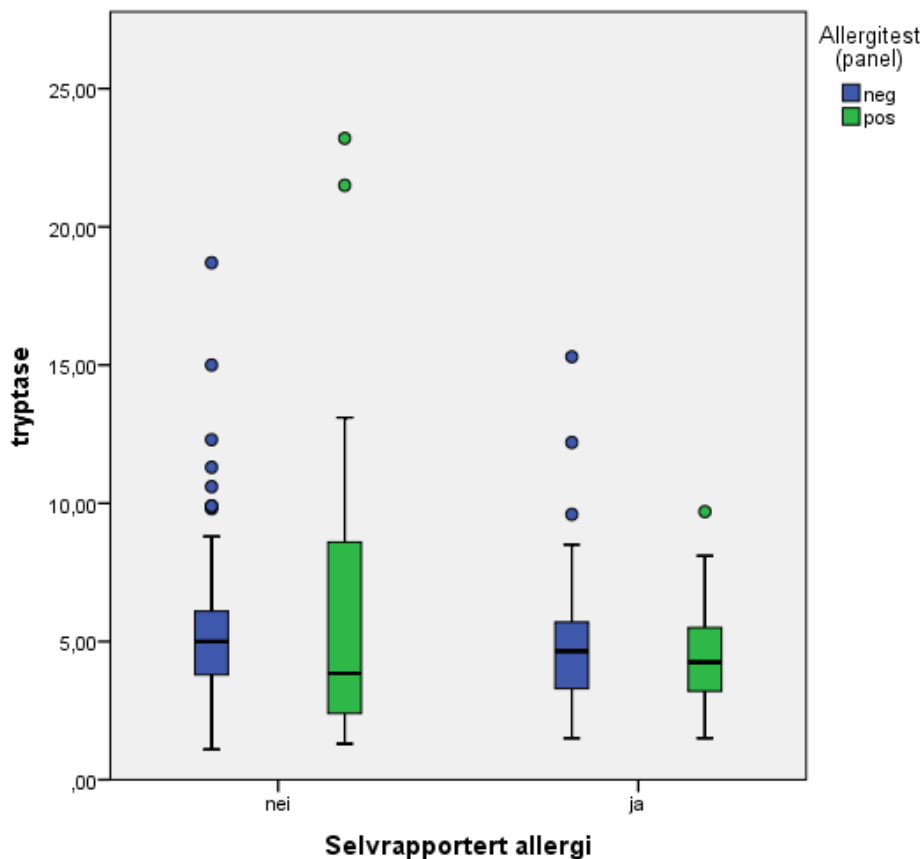
Andre allergier som er blitt oppgitt er: kontrastvæske, latex, ulike metaller, soling, RedBull, P-piller, løvetann, bringebærsyltetøy, Folkodin, Suxamethon og Cosylan Hostemikstur. Hver enkelt av disse allergenene ble kun oppgitt én gang. 30 av givere oppgav allergi mot mer enn ett allergen, og alle de oppgitte allergenene er blitt tatt med i frekvensberegningen (tabell 4). Det vil derfor være flere allergener enn antall referansepersoner som har oppgitt selvrapportert allergi. 7 av givene oppgav "ukjent" som tidligere allergi. Husstøvmidd, pollen (bjørk og timotei) er, i tillegg til katt, de hyppigste selvrapporterte allergiene (se tabell 4). For den selvrapporterte allergien er det 112 av 245 som har oppgitt at de har hatt tidligere allergiske reaksjoner.

Tabell 5 viser de positive reflekstestene for spesifikk IgE som ble utført etter positive paneltester. 75 av de 245 givene fikk positive utslag på enten Phadi, Fx5 eller begge panel-testene. Av disse 75 fikk 74 positivt resultat ved undersøkelse av spesifikk IgE mot aktuelle enkeltallergener. Timotei, husstøvmidd og bjørk var de hyppigste utslagene på panel-testene med henholdsvis 36, 34 og 32 positive reflekstester. Det ble kun testet for allergi-panelene Phadi og Fx5. Det kan derfor være en mulighet for at givene har andre allergier enn de som er inkludert i matvare- og luftveispanelene.

Tabell 5: Resultat av reflekstester utført på de 75 givene med positiv allergipaneltest

Panel	Spesifikk IgE	Antall deltakere med positivt resultat
Phadiatop (Luftveispanel)	Timotei	36
	Husstøvmidd	34
	Bjørk	32
	Hund	16
	Katt	13
	Hest	8
	Burot	7
Fx5 (Matvarepanel)	Hvete	4
	Kumelk	3
	Peanøtt	2
	Soyabønne	2
	Eggehvite	1

Figur 10 viser grafisk ulikhetene i tryptase mellom den selvrapporterte allergien til givene og resultatene på allergitestene. Her vises givene med selvrapportert allergi som har fått positive/negative allergitester. Figuren viser også hvor mange av de uten selvrapportert allergi som har fått negative og positive allergitester. Box-plottet viser også spredningen av tryptaseverdier innen de ulike gruppene, medianen og antall målinger i gruppene som ligger utenfor grensene. Det er 2 målinger som ligger over 20 $\mu\text{g/L}$. Disse deltakerne har ikke oppgitt noen tidligere allergi, men begge har fått utslag på allergitester (figur 10). Av alle gruppene er det totalt 7 av de 245 målingene som ligger over 12 $\mu\text{g/L}$. Av disse er det bare de to målingene over 20 $\mu\text{g/L}$ som har positiv allergitest selv om de ikke har rapportert noen tidligere allergi.



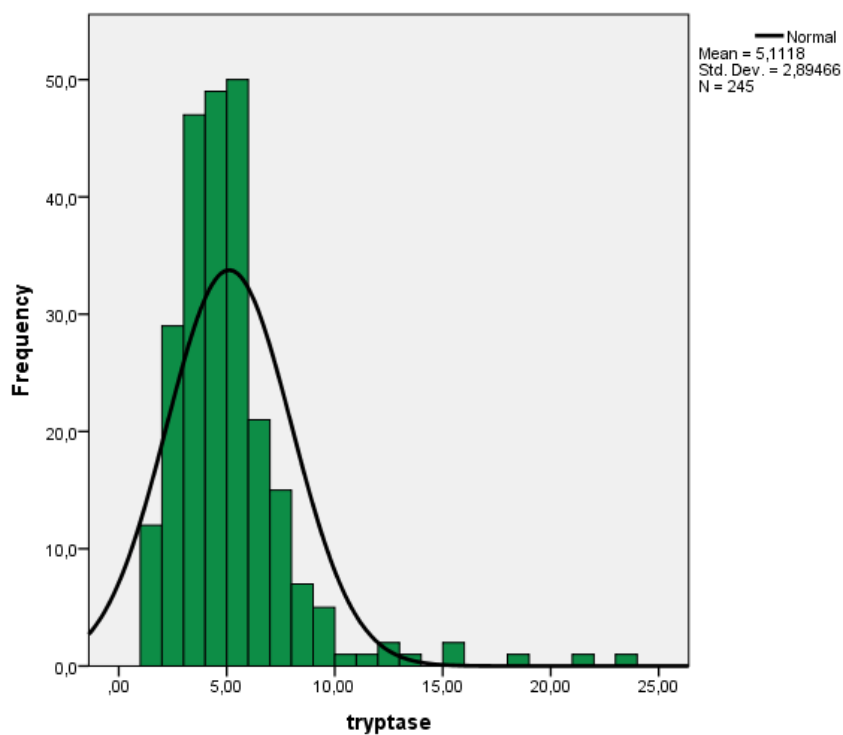
Figur 10: Box-plott for tryptase fordelt etter selvrapportert allergi og resultater på allergitester. For deltakere med negativ allergitest (blå) finner vi tilnærmet lik spredning i tryptaseverdi uavhengig om de rapportere at de har tidligere allergi eller ikke. For deltakerne med positiv allergitest (grønn) finner vi en større spredning av målingene hos de som ikke har rapporter allergi i forhold til de som har selvrapportert allergi. Middelerdiene for de ulike gruppene er tilnærmet like.

6.2 Referanseområde tryptase

6.2.1 Deskriptivt tryptase-resultater

Tryptase ble analysert ved seksjonen 2 ganger i uken. Alle kontroller var innenfor godkjente grenser i disse oppsettene.

Alle målingene ligger innenfor dagens normalområde, og 99,2 % av tryptase-målingene ligger under 20,0 $\mu\text{g/L}$. Figur 11 viser fordelingen og frekvensen av tryptase-verdiene. Her vises det at verdiene ikke er normalfordelte og har en lang høyreskjev hale mot de høyere verdiene.



Figur 11: Fordeling av tryptase-målinger vist sammen med kurve for normalfordeling

Tabell 6 viser en oversikt av tryptase-resultatene for de ulike gruppene.

Tabell 6: Utvalget til referanseområdet, bestående av 245 givere, delt inn i ulike grupper for å undersøke om de var statistisk signifikant forskjellige. Resultatene av tryptasemålingene er her presentert deskriptivt for de enkelte gruppene, samt resultatene av t-test med 0,05 signifikansnivå.

Utvalg	Antall	Middelverdi	Median	SD	Min-Max	T-test (p-verdi)
Alle (kvinner og menn)	245	5,1	4,7	2,59	1,1 - 23,2	
Kvinner	124	4,8	4,3	2,55	1,1 – 18,7	0,113
Menn	121	5,4	4,9	3,18	1,3 – 23,2	
Positive allergipanel	74	4,9	4,15	3,58	1,3 – 23,2	0,719
Negative allergipanel	171	5,1	4,8	2,54	1,1 – 18,7	
Selvrapportert allergi	112	4,7	4,4	2,11	1,5 – 15,3	0,034
Ingen selvrapportert allergi	133	5,4	5	3,38	1,1 – 23,2	
Givere < 60 år	185	4,9	4,6	2,53	1,1 – 18,7	<0,001
Givere ≥ 60 år	59	6,3	5,6	3,59	1,4 – 23,2	

For å undersøke om det var en forskjell i tryptase-nivåer for de ulike variabel-gruppene ble det utført t-test for to grupper med 0,05 signifikansnivå (tabell 6). Hypotesene for t-testen var:

H_0 : Variabelen har ingen sammenheng med tryptase-verdiene

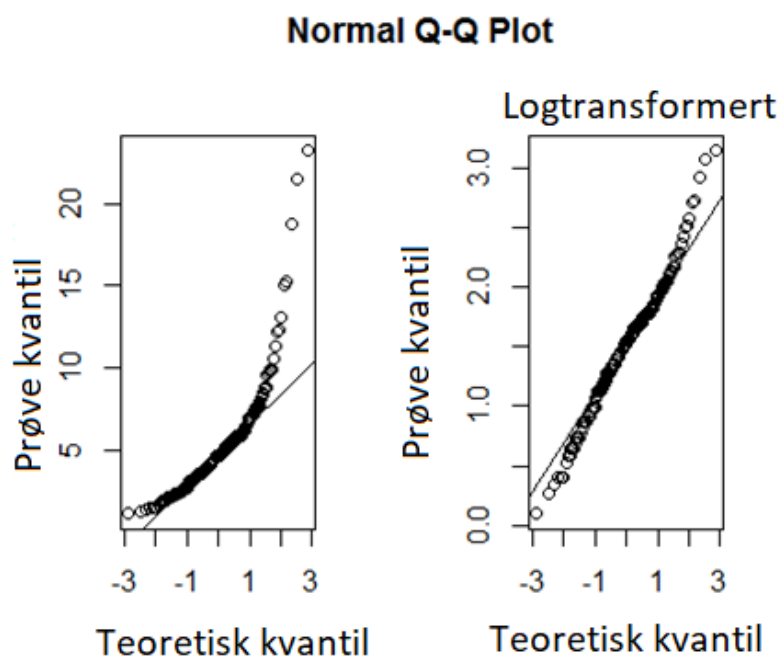
H_1 : Variabelen har en sammenheng med tryptase-verdiene

P-verdiene for trening og medikament/kosttilskudd ble 0,960 og 0,934. Siden gruppene som hadde trent og eller tatt medikament/kosttilskudd før prøvetakingen var små grupper, henholdsvis 20 % og 32 %, har t-testen lavere styrke.

Det ble også utført «Cook's distance»-test for å estimere påvirkningen enkelte datapunkter hadde på helheten av datasettet for referanseområdet. Tryptase-målingene på 21,5 og 23,2 µg/L er de høyeste målingene og de fikk henholdsvis Cook's distance (D_i) verdier på 0,876 og

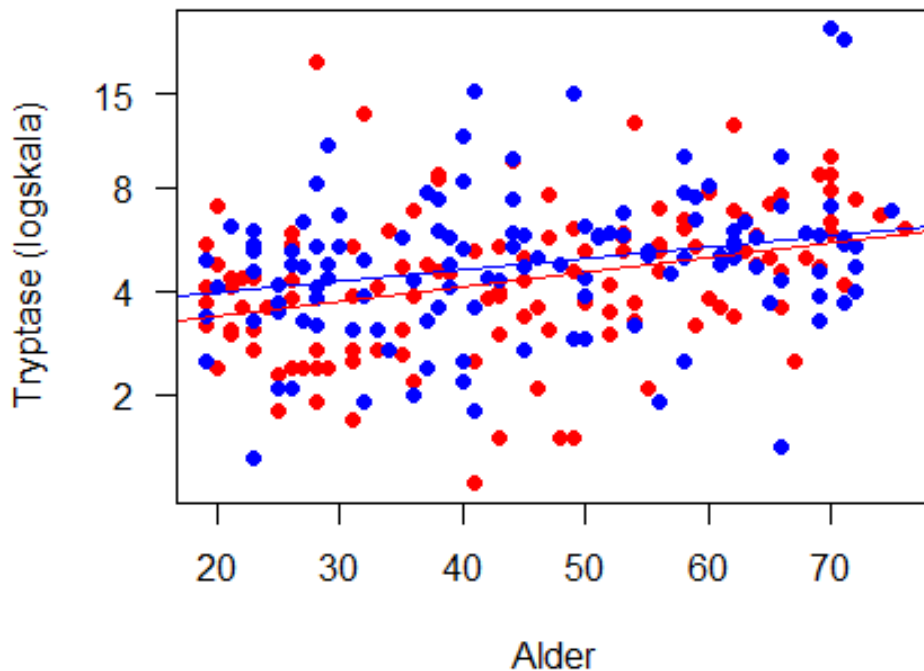
0,156. Det er av Cook et. al. (Cook & Weisberg, 1982) foreslått å sette en grense på $D_i > 1$ for å være sikker på at en måling er en uteligger og forstyrrer datasettets riktighet.

For å undersøke nærmere fordelingen av tryptase i utvalget ble det satt opp QQ-plott (se figur 12). QQ-plottet for tryptase-verdiene viser en hale mot høyre. Siden tryptaseverdiene ikke er normalfordelte, men skeivt fordelt med hale mot høyre, ble de log-transformert. QQ-plottet for de log-transformerte tryptase-verdiene blir mye mer tilnærmet normalfordelt, men har fremdeles litt tunge haler, nå i begge retninger.



Figur 12: QQ-plott for tryptase og log-transformert tryptase

Figur 13 viser fordelingen av tryptase-verdiene ut ifra alder (x-akse) og kjønn (rød for kvinner og blå for menn). Figuren er på logskala.



Figur 13: Fordeling av tryptaseverdier etter alder og kjønn (rød = kvinner, blå = menn)

6.2.2 Beregning av referanseområde

For å estimere referanseområdet for tryptase og de tilhørende konfidensgrensene ble det i tillegg til ikke-transformerte data benyttet log-transformerte data for å få dataene mer normalfordelt. Det er også blitt beregnet et ikke-parametrisk referanseområde for 2,5 og 97,5 prosentil, sammen med 90 % konfidensintervall rundt grensene (tabell 7). Referanseområdet til tryptase er ensidig, men det er blitt beregnet både øvre og nedre grenser.

Uten å ta hensyn til normalfordelingen og variabler som kjønn og alder så har vi med dette datasettet et 95 % referanseområde på 1,7 – 12,3 µg/L basert på 2,5- og 97,5-persentilen. Tabell 7 viser beregnede referanseområder for alle de ulike utvalgene. Det er her blitt benyttet både parametriske og ikke-parametriske metode og beregning av 90 % konfidensintervall. 90 % konfidensintervall for det ikke-parametriske referanseområdet er kun beregnet for utvalg med minst 119 verdier (Solberg, 1987).

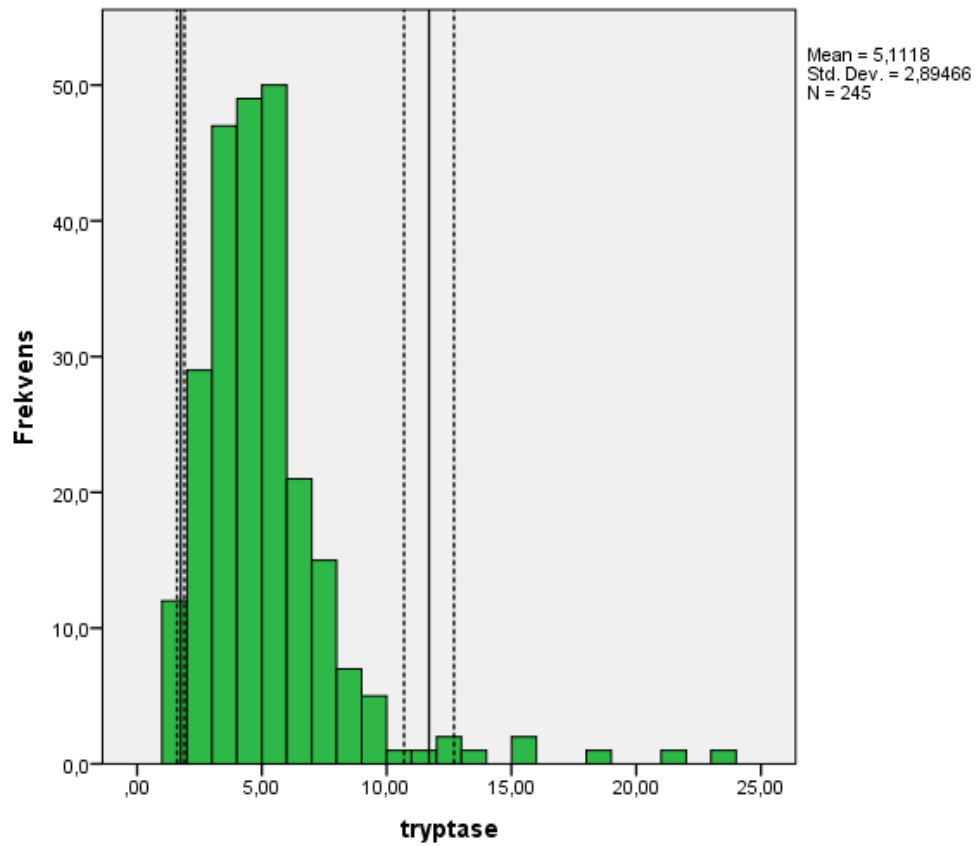
Tabell 7: Estimering av referanseområde for tryptase, både parametriske og ikke parametriske, med og uten logtransformering av verdiene.

Utvalg	Antall	Ikke-parametrisk referanseområde 2,5 % - 97,5 %			Parametrisk referanseområde	
		Ikke-transformerte data	Log. Transformert	90 % konfidensintervall*, **	$\bar{x} \pm 1,96 \times SD$	90 % konfidensintervall*
Alle	245	1,7 – 12,3	1,7 – 12,3	1,3 – 1,9 9,9 – 21,5	1,8 – 11,7	1,6 – 1,9 10,7 – 12,8
Kvinner	124	1,5 – 12,0	1,5 – 12,0	1,1 – 2,1 8,8 - 18,7	1,7 – 11,1	1,5 – 1,9 9,8 – 12,5
Menn	121	1,9 – 15,0	1,9 – 15,0	1,3 – 2,1 9,9 - 23,2	1,9 – 12,3	1,7 – 2,1 10,9 – 14,0
Positiv allergipanel	74	1,7 – 14,6	1,7 – 14,3	-	1,5 – 12,1	1,3 – 1,8 10,2 – 14,4
Negativ allergipanel	171	1,8 – 12,0	1,8 – 11,7	1,1 – 2,1 9,9 - 18,7	1,9 – 11,5	1,7 – 2,1 10,4 – 12,7
Selv-rapportert allergi	112	1,9 – 9,6	1,9 – 9,6	-	1,9 – 9,9	1,7 – 2,1 8,8 – 11,1
Ingen selvrappert allergi	133	1,6 – 14,4	1,6 – 14,4	1,1 – 2,1 10,6 - 23,2	1,7 – 13,3	1,5 - 1,9 11,7 – 15,1
Givere <60 år	186	1,8 – 12,2	1,8 – 12,2	1,1 – 1,9 9,7 – 18,7	1,7 – 11,4	1,5 – 1,9 10,1 – 12,9
Givere ≥60 år	59	2,9 – 17,3	2,8 – 16,7	-	2,8 – 12,2	2,0 – 2,8 11,4 – 15,7

* 90% konfidensintervall for øvre og nedre grense.

** Det er kun blitt beregnet 90 % konfidensintervall på den ikke-parametriske metoden (rank-tabell) for utvalg med flere enn 119 observasjoner

Figur 14 viser histogram av tryptase-verdiene fra hele referanseutvalget med parametrisk referanseområde og 90 % konfidensintervall rundt grensene.



Figur 14: Histogram for tryptase med ikke-parametrisk 95 % referansegrenser med 90 % konfidensintervall

6.3 Biologisk variasjon tryptase

6.3.1. Deskriptivt resultater biologisk variasjon

Som en pilot ble det analysert prøver fra de 5 første givere av totalt 14 givere. Materialet ble samlet inn høsten 2017 (oktober-desember). Gjennomsnittsalderen er 25 år, og utvalget består av 1 kvinne og 4 menn. Kun én av de fem har allergi, både selvrapportert og positive allergitester. For den ene giveren med allergi var gjennomsnittlig tryptaseverdi på 2,4 µg/L. Totalt antall tryptaseprøver som ble analysert var 84 prøver.

- Range: 2,0 - 3,8 µg/L
- Middelerdi: 2,7 µg/L
- Median: 2,6 µg/L

Gjennomsnittlig total-IgE er for dette utvalget 38 kU/L.

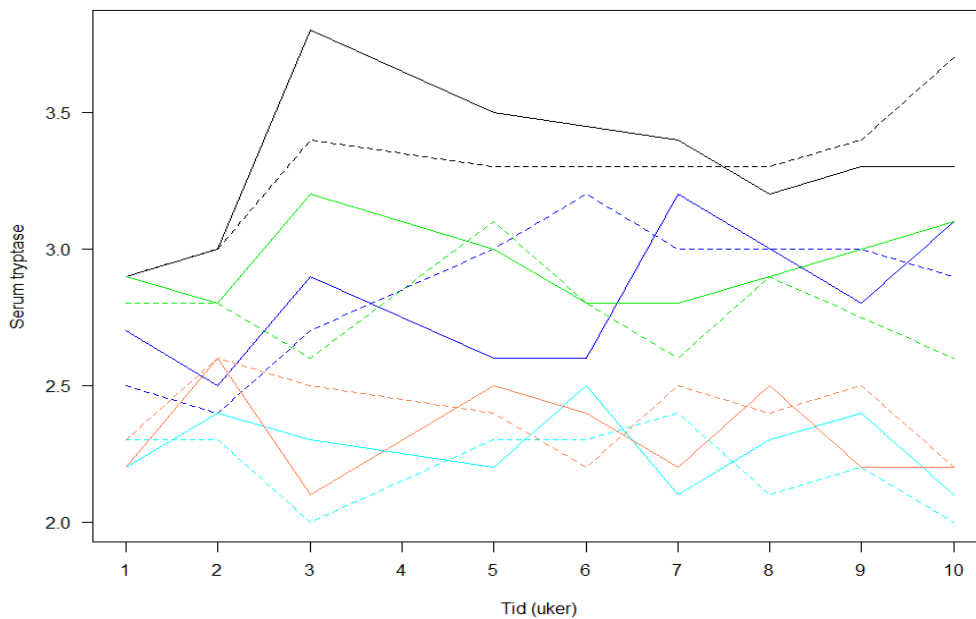
6.3.2. Resultater måling av biologisk variasjon

For å undersøke den biologiske variasjonen i disse målingene ble det benyttet linear mixed effects-modell. Resultatene er vist i tabell 8

Tabell 8: Resultater for beregning biologisk variasjon- Standardavvik, Konfidensintervall for SD og beregnet CV % for inter-, intra- biologisk og analytisk variasjon

	Standardavvik	Konfidensintervall	CV %
Inter biologisk (CV _b)	0,419	0,207 – 0,848	15,5
Intra-biologisk (CV _w)	0,101	0,053 – 0,194	3,7
Analytisk (CV _a)	0,174	0,140 – 0,215	6,3

Resultatet av målingene av materiale til de 5 givene er vist grafisk i figur 15. Hvert individ er blitt tildelt egen farge på linjene og den stiplede linjen viser duplikatmålingene. Ut ifra figuren kan man se at tryptase holder seg ganske stabilt over tid og at de duplikate målingene ikke varierer for stort fra hverandre.



Figur 15: Variasjon i tryptase over 10 uker med duplikate målinger. Ulik farge for hver av givene. De stiplede linjene i samme farge som de heltrukne linjene er duplikatmålingene.

7. Diskusjon

7.1 Utvalg

Det ble valgt å benytte blodgivere til å representere den generelle friske populasjonen hovedsakelig på grunn av den praktiske rekrutteringen og tilgjengeligheten. Utvalgsstørrelsen (>240 givere) gjorde det også mer praktisk å benytte blodgivere siden dette prosjektet hadde begrenset tid. Ved innsamling av materiale til referanseområder er ofte det å være blodgiver ett av eksklusjonskriteriene (CLSI, 2008). Dette er på grunn av at de jevnlige blodtappingene kan påvirke flere analytter slik som hemoglobin og jern-lagre. Det å benytte blodgivere som utvalg vil potensielt være en svakhet i denne studien. Siden allergianalytter slik som total-IgE og tryptase mest sannsynlig ikke vil bli påvirket av jevnlige blodtappinger ble det valgt å gjøre det på denne måten. Blodgivere vil kunne ha allergier på tilnærmet lik linje som resten av populasjonen, med unntak om de har hatt en anafylaktisk reaksjon tidligere, og noen legemiddelallergier. Blodgivere skal heller ikke gi blod når de har sterke allergiske plager, for eksempel på grunn av sesongallergi. Dette ser vi på som en styrke siden vi hadde som et eksklusjonskriterie i denne studien at givene ikke kunne ha allergiske plager under prøvetakningen.

Å være frisk ble i denne studien definert som at giveren følte seg frisk og ikke hadde vært syk eller hatt sykdomsfølelse det siste døgnet. Allergi ble ikke definert som en sykdom, og vi inkluderte dermed givere både med og uten allergier så lenge de ikke hadde noen allergiske plager på prøvetakingstidspunktet. Allergikere har en høyere sannsynlighet for å få en anafylaktisk reaksjon, og det var dermed viktig å undersøke om de med allergi hadde en høyere basalverdi av tryptase i forhold til individer uten allergi. Med mindre tryptase analyseres i forhold til utredning av mastocytose og mastcelle-aktiverings-sykdommer, er selve konsentrasjonen av tryptase i blodet av lite betydning. Det man ofte er ute etter i analysering av tryptase er om det har vært en endring fra basalverdien til en eventuell akuttverdi ved en anafylaktisk reaksjon.

Vi valgte å sette krav til aldersfordeling og kjønnsfordeling fordi flere studier har indikert at det kan være både kjønnsforskjeller og aldersforskjeller i tryptase (Caughey, 2006; Gonzalez-Quintela et al., 2010; Min et al., 2004; Schliemann, Seyfarth, Hipler, & Elsner, 2012). Det er også i de fleste anbefalinger når det kommer til etablering av referanseområder anbefalt å ta høyde for eventuelle alders- og kjønnsforskjeller (CLSI, 2008). Det ble dermed inkludert

givere for å kunne eventuelt etablere egne referanser for kjønn med minimum 120 givere per gruppe, og for å kunne undersøke eventuelle forskjeller i aldersgrupper.

7.2 Referanseområde

I studien til Schwartz et. al. (Lawrence B. Schwartz et al., 1994) målte de tryptase-nivåer i 4 ulike populasjoner av friske individer der gjennomsnittsmålingene gikk fra 1,9 til 4,9 µg/L, og verdiene varierte fra 0,4 til 13,9 µg/L. I dette masterprosjektet målte vi en gjennomsnittlig tryptase-verdi på 5,12 µg/L, med et konsentrasjonsområde på mellom 1,1 – 23,2 µg/L. Det ble dermed målt høyere verdier i dette prosjektet enn i studien til Schwartz et. al, men gjennomsnittsverdiene er tilnærmet like. Vårt estimerte referanseområde på 12 µg/L stemmer godt overens med tidligere studier slik som Schwartz et. al og Schliemann, og produsenten Phadia sitt eget referanseområde på 11,4 µg/L (Schliemann et al., 2012; Lawrence B. Schwartz et al., 1994). Disse studiene har beregnet referanseområde ut i fra 95 % med 2,5- og 97,5-persentiler. Vi har i dette prosjektet både beregnet referanseområde med 2,5- og 97,5 persentiler med og uten logtransformering, og vi har beregnet det ikke-parametriske referanseområdet. De parametriske referanseområdene ble veldig like, 12,28 og 12,29 µg/L med logtransformering, og det ikke-parametriske referanseområdet var igjen tilnærmet likt disse med 11,7 µg/L og 90 % konfidensintervall på 10,7-12,7 µg/L. Siden alle disse beregningene av referanseområdet til tryptase er såpass like ble det valgt å sette det øvre referanseområdet til 12,0 µg/L. Nedre referansegrense for tryptase er ikke klinisk relevant og er dermed ikke blitt lagt vekt på. Ved tryptase-analyser er det kun av interesse å måle en eventuell stigning ved anafylaksi-utredning, eller en forhøyet verdi ved mastocytose og andre mast-celle-aktiverende sykdommer.

Etter beregning av referanseområde for tryptase på en ny gruppe individer og nye målinger ble det øvre referanseområdet tilnærmet halvert fra <24 µg/L til 12 µg/L. Forskjellene i utvalget mellom de to innsamlingene av referanseverdier er hovedsakelig blodgivere/ikke blodgivere. Ved innsamlingen i 1998/99 satte de kriterier om total-IgE <120, negative allergitester (F_{x5} og Phadi), samt kriterier for HB, LPK og CRP, og de hadde blodgivning som et eksklusjonskriterie. Ved innsamlingen i 2017 baserte vi utvalget vårt på friske givere uten allergiske plager under prøveinnsamlingen. Blodgivere må være friske for å få lov til å gi blod og vil ha en Hb over satte verdier bestemt av blodbanken. Det ble derfor ikke målt noen

ekstra parametere for å undersøke om våre givere var friske. Analysemetoden som ble benyttet er den samme ved begge tilfellene, så forskjellene kommer nok ikke fra eventuelle metodeendringer. Den eneste metodeendringen som er blitt gjort er at det kommersielle assay er blitt tilsatt et stoff som undertrykker heterotypisk antistoffaktivitet. Dette ble gjort på grunn av rapporter om falskt positive tester som kom av assay interferens av heterofile antistoffer slik som reumatisk faktor (RF) og human anti-mus antistoff (HAMA) (Sargur et al., 2011). Det er naturlig at man i ett utvalg av en populasjon vil finne én hale og ved et nytt utvalg av populasjonen vil man kunne finne en annen hale. Hovedandelen av den utvalgte populasjonen vil ha tilnærmet like tryptaseverdier, og forskjellen blir da hvor lang hale man finner ut ifra hvilke tilfeldige høye verdier i utvalget. Vårt referanseområde sammenlignet med andre studier, tidligere referanseområde og andre sykehus er presentert i tabell 9.

Tabell 9: referanseområde for tryptase sammenlignet med andre studier, tidligere referanseområde og andre sykehus

	Øvre referansegrense
Etablering av referanseområde 2017/2018 (LKB)	<12,0 µg/L
Pasientprøver Unilab 2014 (LKB)	10,36 µg/L
Etablering av referanseområde 1998/1999 (LKB)	<24,0 µg/L
Internasjonale guidelines og Phadia (produsent)	<11,4 µg/L
St. Olavs universitetssykehus	<11,4 µg/L
Universitetssykehuset i Nord-Norge	<13,5 µg/L
Oslo Universitetssykehus	<11 µg/L.

Det er vist at Morfinanalogen folkodin (PHO) er et sterkt IgE-stimulerende legemiddel. I Norge ble det fram til 2007 solgt PHO i form av blant annet hostesaften Tuxi. Studier viste at etter en uke med eksponering økte antistoffnivåene 50-100 ganger hos PHO-sensibiliserte individer. Under generell anestesi økte da risikoen for anafylaksi med 2-300 ganger i forhold til den ikke-sensibiliserte befolkningen. Etter sensibilisering så de fleste test-individene ut til å være tilbake til utgangsverdiene innen 1-2 år, men enkelte individer kunne ha forhøyede

verdier 10-12 år etter siste dose (Florvaag & Johansson, 2017). Det kan tenkes at en slik eksponering som gir forhøyede total-IgE nivåer kan ha påvirket utvalget ved innsamling av referansemateriale i 1998/99.

7.2.1 Valg av statistikk for beregning av referanseområde

Vi har i dette prosjektet beregnet referanseområdet både parametrisk, med og uten logtransformering, og ikke-parametrisk referanseområde med logtransformerte verdier. Det ble utført logtransformering av datamaterialet for å gjøre det mer tilnærmet normalfordelt, da det er en fordel med normalfordelte verdier når parametrisk beregningsmåte benyttes. Vi ser i tabell 7 at resultatene av den parametriske metoden for beregning av referanseområdet ikke har store forskjellene om datamaterialet er blitt logtransformert eller ikke. Etter logtransformering ble datamaterialet betydelig nærmere normalfordeling. Dette ser vi også i QQ-plottene hvor verdiene ble mer normalfordelte og halene ble betydelig mindre enn for utransformert tryptase. Videre ble de logtransformerte variablene også benyttet ved beregning av referanseområdet med en ikke-parametrisk metode. Ved ikke-parametrisk framgangsmåte vil referanseområdet, og konfidensintervallet for referansegrensene, bli tilnærmet det samme enten det benyttes logtransformering eller ikke.

En ulempe med å benytte parametrisk metode er at disse beregningene baserer seg på at verdiene skal være tilnærmet normalfordelte. For verdier slik som tryptase så får vi ikke en slik normalfordeling, og verdiene må dermed eventuelt logtransformeres for at vi skal kunne benytte parametrisk metode. En av de større fordelene med å benytte en parametrisk metode er at disse er sterkt robuste mot avvik. De største fordelene med å benytte ikke-parametriske metode er at det ikke krever normalfordelte verdier.

Referanseintervall blir sikrere i et større datamateriale, men kan både bli smalere og bredere. Konfidensintervallene for referansegrensene blir kortere i et større datamateriale. Beslektet med dette i figur 14 er konfidensintervallet for det nedre referanseområdet (2,5-persentilen) mye smalere enn konfidensintervallet for 97,5-persentilen. Dette kommer av at vårt materiale har flere lave verdier enn høye verdier. Dette fører dermed til at vi får ulik bredde på konfidensintervallene. Det kommer også frem i tabell 7 hvor 90 % konfidensintervall for de ikke-parametriske beregningene er mye videre for de øvre referansegrensene enn for de nedre. Dette kommer hovedsakelig av at det er en større spredning av den høye halen i de målte

verdiene. De høye konfidensintervallene, og spesielt de beregnet ut i fra rank-tabell, gjør at det er mindre sikkerhet i de øvre referansegrensene enn de nedre.

For t-tester og lineær regresjon har ikke-parametriske framgangsmåter svakere robusthet mot avvik enn det de parametriske framgangsmåtene har. I følge Fagerland fungerer ikke-parametriske tester best for små studier (Fagerland, 2012). T-test blir for det meste kun benyttet for normalfordelte data, men for studier i et større datamateriale kan t-test og deres korresponderende konfidensintervaller benyttes selv for tungt skjevfordelte data (Fagerland, 2012). Siden vi har her et relativt stort antall, 245 givere, har vi dermed benyttet t-test for å undersøke for eventuelle signifikante forskjeller mellom de ulike gruppene, selv om vi har skjevfordelte verdier.

7.2.2 Aldersfordeling og påvirkning av referanseområdet

I vårt utvalg (se figur 13) kan vi se en svak stigning som indikerer at tryptase øker i takt med økende alder. Denne tendensen er også funnet i flere andre studier. Det ble funnet i en studie med 1092 dermatologi-pasienter at eldre individer (>64 år) hadde statistisk signifikant høyere tryptase-nivåer enn de yngre aldersgruppene (Schliemann et al., 2012). De samme konklusjonene kom de fram til i studien til Gonzalez-Quintela et. al der de undersøkte faktorer som kunne påvirke den totale tryptase konsentrasjonen i en generell voksen populasjon (Gonzalez-Quintela et al., 2010). På grunnlag av funn i disse tidligere studiene ble det beregnet referanseområder for givere <60 år og givere ≥ 60 år (se tabell 7). Det ble også utført t-test for de to aldersgruppene. Det ble her funnet signifikant forskjell ($p < 0,001$), der individer ≥ 60 år har signifikant høyere tryptaseverdier enn individer under 60 år. Til tross for den signifikante forskjellen ble det ikke satt egne referanseområder for aldersgruppene i dette prosjektet. Dette er på grunn av at vi ikke har et tydelig skille hvor tryptaseverdiene endrer seg i forhold til alder. Det er heller ikke blitt satt egne referanseområder for eldre i andre studier. For å kunne etablere et eget referanseområde er det nødvendig å samle inn mer materiale fra givere ≥ 60 år (minst 120) for å kunne ha et godt nok grunnlag. Det vil også være nødvendig å undersøke nærmere hvor en eventuell aldersgrense skal settes, og om referanseområdet for tryptase må deles inn i flere aldersgrupper.

Som tidligere nevnt kan høyere verdier av tryptase ved høyere alder komme av blant annet Kronisk myelogenleukemi (KML), redusert nyrefunksjon eller nyresvikt, hjerte-kar-sykdommer og inntak av blodtrykkregulerende medikamenter (Sala-Cunill et al., 2013;

Lawrence B. Schwartz et al., 1994). Kronisk myelogen leukemi (KML) er en form for kreft hvor stamceller vokser og deler seg uhemmet. Sykdommen er noe hyppigere hos menn enn hos kvinner, og den gjennomsnittlige alderen ved diagnostidspunktet er 65 år (Apperley, 2015). KML fører dermed også til økt mengde mastceller og basofile granulocytter som igjen gir økt mengde tryptase. I en studie av Samorapoompichit et al. fant de neoplastiske basofile celler i pasienter med KML, ideopatisk myelofibrose (IMF) og myelodysplastisk syndrom (MDS) kan uttrykke påvisbare mengder tryptase, mens det ikke kan detekteres i friske individer (Samorapoompichit et al., 2001).

7.2.3 Allergisk sykdom og dens innflytelse på tryptase-verdi

I sammenheng med innsamlingen av materiale til referanseområdet ble deltakerne i spørreskjemaet bedt om å oppgi om de hadde noen allergier/eller hadde hatt noen tidligere allergiske reaksjoner. Svarene oppgitt her ble variabelen «selvrapportert allergi». Dette er en subjektiv variabel, og har dermed større usikkerhet enn en objektiv variabel. I utvalget vil de ulike individene ha ulike definisjoner på hva de oppfatter som allergi og allergiske reaksjoner. Dette kom tydelig fram av de oppgitte årsakene for den selvrapporterte allergien. Av de 112 individene som oppgav at de hadde hatt/har allergi oppga 7 stykker ukjent årsak. Det ble også oppgitt flere allergener der det var tvil om det hadde vært en allergisk reaksjon eller ikke. Det var heller ikke fullstendig konsensus mellom oppgitt allergi og allergitest for de allergenene som var inkludert i allergipaneltestene (Fx5 og Phadi). Det ble funnet en liten signifikant forskjell i gjennomsnittlig tryptase-verdier mellom de som hadde rapportert tidligere allergi og de som ikke rapporterte tidligere allergi. Det var overraskende nok den gruppen uten selvrapportert allergi som hadde høyest gjennomsnittlig tryptase-verdi med 5,4 µg/L mot 4,7 µg/L. Her kan også de to høye tryptase-verdiene (>20 µg/L) ha en påvirkning siden disse ikke hadde noen selvrapportert allergi. Tidligere studier har ikke funnet klinisk signifikant forskjell mellom individer med og uten allergisk sykdom (Komarow et al., 2009).

Det ble som nevnt kun analysert allergipaneltestene Fx5 og Phadi. Disse panelene består av de mest hyppige allergenene innen mat- og luftveisallergener. Som vist i tabell 5 så oppga de frivillige giverne, som hadde oppgitt tidligere allergi, flere allergener enn det som var inkludert i disse to panelene. Det er dermed en usikkerhet i hvorvidt giverne ville gitt positive utslag på de oppgitte allergenene som ikke er inkludert i paneltestene. Optimalt sett ville man ha analysert for hvert enkeltallergen som ble oppgitt, men på grunn av begrensede midler og

den relativt store dekningsgraden til Fx5 og Phadi gir så ble dette ikke utført. For én giver ble det analysert for Folkodin og Suxamethon. Dette ble utført på grunn av kjent allergi og dermed interesse for hvordan dette kunne påvirke eventuelle analysesvar. Det ble ikke funnet noen signifikant forskjell mellom giverne med positive og negative allergitester (p-verdi 0,326).

7.2.4 Kjønn og påvirkning av referanseområde for tryptase

En av de variablene som var mest interessante å undersøke for eventuelle signifikante forskjeller var kjønn. Det er i flere studier (Gonzalez-Quintela et al., 2010; Min et al., 2004) funnet at det er forskjeller i gjennomsnittsverdi av tryptase mellom kvinner og menn. Studiene finner en liten signifikant forskjell, men forskjellen er ikke blitt sett på som klinisk signifikant og det har dermed ikke blitt laget egne referanseområder for disse sub-gruppene. I vårt materiale fant vi ingen forskjell mellom kjønnene. Menn hadde en gjennomsnittlig tryptase-verdi på 5,4 µg/L mens kvinner hadde en gjennomsnittsverdi på 4,8 µg/L. Det høyere gjennomsnittet hos mennene kommer delvis av at de to høyeste verdiene i datasettet, 23,3 µg/L og 21,5 µg/L, er menn. Ut i fra figur 13 ser vi at det er en jevn fordeling av begge kjønnene i det sentrale sjiktet av tryptase-verdier, og at det ikke er noen tydelige forskjeller i de høyere målingene med unntak fra de to høyeste verdiene. Vi har på bakgrunn av dette valgt å beregne referanseområdet til tryptase for begge kjønnene samlet.

7.2.5 Trening og medikament/kosttilskudds påvirkning av referanseområdet for tryptase

I tillegg til tidligere allergier ble det spurt om giverne hadde trent de siste 24 timene og om de hadde tatt noen medikamenter eller kosttilskudd de siste 48 timene før prøvetakning. 20 % av giverne hadde trent de siste 24 timene, og 32 % av giverne hadde tatt medikamenter eller kosttilskudd de siste 48 timene før blodprøvetakingen. Siden det er en mindre andel av giverne er det derfor vanskelig å trekke noen konklusjon om det har noen påvirkning på tryptase-målingene ut i fra parametriske tester som t-test. Ut ifra vurdering av resultatene i de ulike gruppene ser det ikke til være noen signifikante forskjeller her.

7.3 Biologisk variasjon

I utvikling av en ny immunoassay for tryptase-måling utført av Schwartz et al. (Lawrence B. Schwartz et al., 1994) fant de også her at tryptase holder seg stabil over flere sykluser med nedfrysing og opptining (her 5 ganger). Det var dermed mulig for oss å fryse ned og tine opp materiale med sikkerhet for at analytten ikke ville bli påvirket. Vårt materiale ble bare fryst, tint og re-fryst én gang i løpet av dette prosjektet. I den samme studien målte de også tryptase-nivåer i 5 friske personer over en 15 måneders-periode og konkluderte med at tryptase holder seg stabil over tid. Dette var uavhengig av om individene lå lavt, middels eller høyt innen normalområdet. Dette stemmer overens med funnene i denne pilotstudien der tryptase-målingene holdt seg stabile over de 10 ukene det ble målt. I en studie med insektsgift provoserte reaksjoner ble det i forkant av studien analysert tryptase i 14 uker før provokasjonen. De fant her at tryptase ikke endret seg mer enn 2,0 µg/L ved fravær av allergisk reaksjon/anafylaksi (Brown et al., 2004). Det er ikke blitt beregnet biologisk variasjon i disse studiene. Alle de 5 givene som ble målt for i denne omgangen hadde lave tryptase-nivåer (2,0-3,8 µg/L).

For å forbedre studien hadde det vært av interesse å måle tryptase-nivåer over tid både for individer med lavt, normalt og høyt nivå i forhold til normalområdet (< 12,0 µg/L). Det er ukjent hvilke tryptase-nivåer de resterende 9 givene fra dette pilotprosjektet har. Det ble inkludert både individer med allergi (4 givere) og individer uten allergi (10 givere). Dette ble gjort for å kunne vurdere om dette kunne ha en påvirkning på stabiliteten til den biologiske variasjonen over tid. Spesielt hadde dette vært av interesse å undersøke videre i ulike sesonger hvor man kan få med eventuelle variasjoner i og utenfor de typiske allergisesongene. Da spesielt med tanke på vår- og sommersesongen for blant annet gress- og bjørkepollen. Ut i fra målingene utført i dette pilotprosjektet kunne vi beregne et estimat for innen-individ biologisk variasjon, mellom-individ biologisk variasjon og den analytiske variasjonen. Den analytiske variasjonen målt i dette pilotprosjektet (6,3 %) stemmer godt overens med seksjonenes satte analytiske variasjon på 7 % som ble satt under innkjøring av analysen. Siden det ble analysert så få av de inkluderte givene er resultatene vi har beregnet her i denne studien kun estimerer for den intra- og inter-biologiske variasjonen, og for den analytiske variasjonen.

7.3.1 Valg av statistiske beregninger

For beregning av den biologiske variasjonen ble det benyttet lineær mixed effects. Denne modellen ble valgt fordi vi har her både faste effekter, og tilfeldige effekter. Den uavhengige variabelen er her tryptase, og de faste effektene ble satt som forklaringsvariablene alder, kjønn, allergier osv. I tillegg har vi klyngestrukturer ved at tryptase er blitt målt for hver giver i flere uker, og i duplikater. Siden lineære mixed effects-modellen tar hensyn til alle disse faktorene ble denne benyttet. Fordelen med å benytte denne modellen for å undersøke den biologiske variasjonen er at den omfatter både faste og tilfeldige faktorer. En annen stor fordel er at modellen tar hensyn til eventuelle manglende data, slik at vi utnytter alle observasjoner i datamaterialet selv om vi ikke har målinger for alle ukene for alle givene.

7.4 Studiens validitet

For å ha en god forskningsstudie eller –prosjekt er det essensielt å både kartlegge studiens interne og eksterne validitet, og å arbeide for å få disse så gode som mulig. Validitet er i hvilken grad man ut fra resultatene av et studie kan trekke gyldige slutninger om det man har undersøkt (Dahlum, 2015).

7.4.1 Intern validitet

Intern validitet handler om hvorvidt funnene i et forsøk eller en studie kan forklares gjennom den antatte hypotesen (Dahlum, 2015; Polit & Beck, 2012). Man må da ha god kontroll over mulige bias, og i denne sammenhengen vil det si at det er analytten tryptase som blir målt og at de målingene ikke blir påvirket av andre faktorer. Målemetoden er god dokumentert og blir her regnet med å være en god målemetode med få feilmarginer, så dette er en faktor som er med på å øke studiens interne validitet.

Faktorer som kan minske studiens interne validitet er interferens og preanalytiske faktorer som prøvetaking, oppbevaring, prøvebehandling og analysering som alle kan virke inn på resultatet. Hemolyse, lipider og bilirubin har liten innvirkning på analysering av tryptase (EK-dokument). Dette eliminerer de største interferens-kildene i serum. Prøvetakingen, prøvebehandlingen og oppbevaringen ble standardisert for å minimere eventuelle preanalytiske variasjoner. Analyseringen ble gjort etter rutine av personale ved Seksjon for allergi- og proteinanalyser. Siden det var fullt opplærte bioingeniører med erfaring som utførte all analyseringen ble også analyseringen av prøvematerialet standardisert. Det ble

valgt å utføre analyseringene som en del av rutinearbeidet for å inkludere den naturlige variasjonen som pasientprøver gjennomgår ved analysering.

7.4.2 Ekstern validitet

Ekstern validitet handler om at resultatene fra en studie av et begrenset omfang kan generaliseres, og gjøres gjeldende for en større mengde data enn det som var undersøkt i studien (Dahlum, 2015; Polit & Beck, 2012). Det vil si at hvis det samme prosjektet blir utført vil det få tilsvarende resultater selv om et annet utvalg av studiepopulasjoen blir benyttet. Dette til tross for variasjoner i personer, setting, tid osv. For eksempel vil man i en referansestudie som denne anta at tryptase-verdiene man finner blant de utvalgte studiedeltakerne vil kunne gjelde for hele populasjonen.

Forhold som kan svekke den eksterne validiteten til denne studien er i referansestudien hovedsakelig utvalget av referansepersoner. Referansepersonene til denne studien er friske blodgivere med og uten allergier. Denne gruppen er valgt for at det skal være minst mulige faktorer som kan påvirke resultatene, men det er ikke helt sikkert at denne gruppen er den beste til å representere hele populasjonen. Man antar at personer med allergiske plager, og eventuelt personer som tar medisiner med antihistamin, vil kunne ha litt ulike tryptase-verdier enn referansegruppen. Siden referanseverdier skal måles ut ifra den friske populasjonen, og skal representere den friske populasjonen, er det valgt å se vekk fra dette. Det ble valgt å inkludere givere med allergier fordi det er denne gruppen som har en større sannsynlighet for å få en anafylaktisk reaksjon. Det vil også være tvil om referanseområdet kan benyttes for den eldre populasjonen (>76 år) og for barn (<18 år), siden referanseutvalget er voksne personer mellom 19-76 år. I studier av tryptasenivåer hos barn er det funnet at tryptasenivåene er generelt høyere det første leveåret, og så går gradvis ned de følgende barndomsårene (>10 år). Det ble vist at barn har litt lavere tryptasenivåer enn voksne individer, og at gutter har i gjennomsnitt høyere tryptasenivåer enn jenter, men ikke signifikant høyere (De Schryver et al., 2016; Sahiner et al., 2014).

8. Videre arbeid

Under innsamlingen av materiale til referanseområdet for tryptase ble det samlet inn ekstra materiale (fullblod, serum og plasma) som ble fryst ned i alikvoter i «Biobank for allergianalyser». Dette var ekstra arbeid som ble utført i sammenheng med masterprosjektet, men som ikke har en annen tilknytting til dette prosjektet enn at det kan benyttes til å etablere referanseområder for andre allergianalytter. Det er blant annet aktuelt å etablere referanseområde for tryptase i plasma, og å utføre gen-analyser relatert til mastocytose i fullblods-prøvene.

Det ble sammen med tryptase analysert total-IgE for hver av de inkluderte giverne. Dette ble gjort både i sammenheng med å undersøke om giverne hadde indikasjon på allergi (>120 kU/L), og for å kunne dokumentere det satte referanseområdet for total-IgE.

Referanseområdet til total-IgE ble ikke tatt med i denne oppgaven da hovedfokuset var på analytten tryptase, men det ble beregnet og kan bli bearbeidet ved en senere anledning. Ved beregning av referanseområde for total-IgE er må det også tas hensyn til om giverne har allergier eller ikke. Dette er fordi total-IgE blir brukt som en indikator på om en person har IgE-mediert allergi eller atopi. Det ble også samlet inn materiale i pilotprosjektet om biologisk variasjon med tanke på å undersøke dette for total-IgE. På grunn av begrensede midler ble ikke dette utført denne omgangen. Det vil også her være av interesse å undersøke om det er eventuelle forskjeller i biologisk variasjon for individer med og uten allergi, og eventuelle sesongvariasjoner.

Forslag til videreføring av prosjektet om referanseområdet kan være å videre beregne referanseområde for total-IgE. Det vil også være aktuelt å analysere prøvene i «Biobank for allergianalyser» for å etablere referanseområdet for flere allergi-relaterte analytter.

For videreføring av prosjektet om den biologiske variasjonen vil det være aktuelt å analysere de resterende prøvene for å få et større utvalg. For den biologiske variasjonen hadde det vært av interesse å samle inn materiale over flere sesonger, og å inkludere flere deltakere. Dette er for å få med eventuelle variasjoner som kan oppstå med blant annet sesongbaserte allergier som gress- og bjørkepollen. Dette vil spesielt ha en betydning for å undersøke den biologiske variasjonen til total-IgE.

9. Konklusjon

Ved ikke-parametrisk metode ble referanseområdet for tryptase beregnet til $<12,3 \mu\text{g/L}$ (90 % konfidensintervall 9,9 - 21,5), mens det ved parametrisk metode ble beregnet til $<11,7 \mu\text{g/L}$ (90 % konfidensintervall 10,7 – 12,8). Basert på disse resultatene anbefales det å sette referanseområdet for tryptase til $<12,0 \mu\text{g/L}$. Det er ikke funnet at referanseområdet for tryptase påvirkes av kjønn, men det er en signifikant forskjell i aldersgruppene <60 år og ≥ 60 år. På grunn av for lavt antall givere i gruppen med givere ≥ 60 år kan det ikke settes egne referansegrenser med stor nok sikkerhet. Det ble ikke påvist noen klinisk signifikante forskjeller i nivå av tryptase for grupperingene basert på trening, medikament/kosttilskudd, selvrappertert allergi og allergitester.

Basert på resultatene fra pilotprosjektet for biologisk variasjon ble det funnet at den intra-biologisk variasjonen (CV_w) for tryptase er 3,7 %. Studien kan danne grunnlaget for å kunne beregne hva som er en sikker stigning av tryptase i forbindelse med en anafylaktisk reaksjon. Måling av duplikater indikerte at tryptase har en innen-serie analytisk variasjon (CV_a) på 6,3 %.

Referanseliste

- Aalen, O. O., & Frigessi, A. (2006). *Statistiske metoder i medisin og helsefag*. Oslo: Gyldendal akademisk.
- akkreditering, N. (2004). NA Dok. nr 48a Klinisk kjemi. Retrieved from <http://www.akkreditert.no/globalassets/na-dokumenter/dok00082.pdf>
- Apperley, J. F. (2015). Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*, 385(9976), 1447-1459. doi:10.1016/s0140-6736(13)62120-0
- Bartlett William, A., Braga, F., Carobene, A., Coşkun, A., Prusa, R., Fernandez-Calle, P., . . . Laboratory, M. (2015). A checklist for critical appraisal of studies of biological variation *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* (Vol. 53, pp. 879).
- Berg, J. P., & Hagve, T.-A. (2011). *Klinisk biokjemi og fysiologi* (4. utg. [i.e. 15. utg.]. ed.). Oslo: Gyldendal akademisk.
- Bertelsen, B. I. (2011). *Patologi : menneskets sykdommer* (2. utg. ed.). Oslo: Gyldendal akademisk.
- BIPM. (2012). International vocabulary of metrology : basic and general concepts and associated terms (VIM) = Vocabulaire international de métrologie : concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM) (3rd edition, 2008 version with minor corrections. ed.). [Paris, France] :: [BIPM, Bureau International des Poids et Mesures].
- Bishop, M. L., Fody, E. P., & Schoeff, L. E. (2013). *Clinical chemistry : principles, techniques, and correlations* (7th ed. ed.). Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Bolann, B. J. (2009). *Riktig svar på biokjemiske analyser : en innføring i analytisk kvalitetsovervåking*. Bergen: Fagbokforl.
- Brown, S. G., Blackman, K. E., & Heddle, R. J. (2004). Can serum mast cell tryptase help diagnose anaphylaxis? *Emergency Medicine*, 16(2), 120-124. doi:10.1111/j.1742-6723.2004.00562.x
- Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Tietz, N. W., & Bruns, D. E. (2012). *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics* (5th ed. ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Carobene, A., Røraas, T., Sølvi, U. Ø., Sylte, M. S., Sandberg, S., Guerra, E., . . . Ceriotti, F. (2017). Biological Variation Estimates Obtained from 91 Healthy Study Participants for 9 Enzymes in Serum. *Clinical chemistry*, clinchem.2016.269811. doi:10.1373/clinchem.2016.269811
- Carobene, A., Stollo, M., Jonker, N., Barla, G., Bartlett, W. A., Sandberg, S., . . . Laboratory, M. (2016). Sample collections from healthy volunteers for biological variation estimates' update: a new project undertaken by the Working Group on Biological Variation established by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.(Report)(Author abstract). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 54(10), 1599. doi:10.1515/cclm-2016-0035
- Caughey, G. H. (2006). Tryptase genetics and anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(6), 1411-1414. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2006.02.026>

- CLSI. (2007) Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; approved standard - sixth edition. *Vol. 27. CLSI document H3-A6*. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
- CLSI. (2008). Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline C28-A3c (Third ed., Vol. CLSI document C28-A3c): Clinical Laboratory Standards Institute
- Cook, R. D., & Weisberg, S. (1982). *Residuals and Influence in Regression*: Chapman & Hall.
- Dahlum, S. (2015, 4. september 2015). Validitet. Retrieved from <https://snl.no/validitet>
- De Schryver, S., Halbrich, M., Clarke, A., La Vieille, S., Eisman, H., Alizadehfar, R., . . . Ben-Shoshan, M. (2016). Tryptase levels in children presenting with anaphylaxis: Temporal trends and associated factors. *J Allergy Clin Immunol*, *137*(4), 1138-1142. doi:10.1016/j.jaci.2015.09.001
- Fagerland, M. W. (2012). t-tests, non-parametric tests, and large studies--a paradox of statistical practice? *BMC Med Res Methodol*, *12*, 78. doi:10.1186/1471-2288-12-78
- Florvaag, E. (2014). Anafylaksiutredning. Retrieved from <http://www.helse-bergen.no/no/OmOss/Avdelinger/lkb/faglig-informasjon/Sider/anafylaksiutredning.aspx>
- Florvaag, E., & Johansson, S. G. (2017). Historien om folkodin. *Allergi i Praksis*(1), 18-24.
- Fraser, C. G. (2001). *Biological Variation: From Principles to Practice*: AACC Press.
- Fukuoka, Y., & Schwartz, L. B. (2007). Active monomers of human beta-tryptase have expanded substrate specificities. *Int Immunopharmacol*, *7*(14), 1900-1908. doi:10.1016/j.intimp.2007.07.007
- Gell, P. G. H., & Coombs, R. R. A. (1963). *Clinical aspects of immunology*. Oxford: Blackwell.
- Godfrey-Smith, P. (2003). *Theory and Reality: An Introduction to the Philosophy of Science* Science and Its Conceptual Foundations S,
- Gonzalez-Quintela, A., Vizcaino, L., Gude, F., Rey, J., Meijide, L., Fernandez-Merino, C., . . . Vidal, C. (2010). Factors influencing serum total tryptase concentrations in a general adult population.(Author abstract)(Report). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *48*(5), 701.
- Helbæk, M., & Godejord, P. A. (2001). *Statistikk for kjemikere*. Trondheim: Tapir.
- Helsedirektoratet. (2014). Veileder for transfusjonstjenesten i Norge Veileder (Helsedirektoratet) (7. utg. ed.). Oslo: Helsedirektoratet.
- Herland Berstad, A. K., Storaas, T., De Pater, G. H., Press, K., & Florvaag, E. (2014). Norsk veileder i praktisk anafylaksihåndtering. In NFAI (Ed.). Bergen: Den norske legeförening
- Husøy, A.-M. (2012). *Blodprøvetaking i praksis* (2. utg. ed.). Oslo: Cappelen Damm akademisk.
- ImmunoCAP Tryptase. (2012). Retrieved from <http://www.phadia.com/en/products/allergy-testing-products/immunocap-lab-tests/immunocap-tryptase/>

- Jogie-Brahim, S., Min, H.-K., Fukuoka, Y., Xia, H.-Z., & Schwartz, L. (2004). Expression of [alpha]-tryptase and [beta]-tryptase by human basophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *113*(6), 1086-1092. doi:10.1016/j.jaci.2004.02.032
- Johansson, S. G., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P. S., Lanier, B. Q., Lockey, R. F., . . . Williams, H. C. (2004). Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol*, *113*(5), 832-836. doi:10.1016/j.jaci.2003.12.591
- Komarow, H. D., Hu, Z., Brittain, E., Uzzaman, A., Gaskins, D., & Metcalfe, D. D. (2009). Serum tryptase levels in atopic and nonatopic children (Vol. 124, pp. 845-848).
- Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker* (3. utg. ed.). Bergen: Fagbokforl.
- Min, H. K., Moxley, G., Neale, M. C., & Schwartz, L. B. (2004). Effect of sex and haplotype on plasma tryptase levels in healthy adults. *J Allergy Clin Immunol*, *114*(1), 48-51. doi:10.1016/j.jaci.2004.04.008
- Polit, D. F., & Beck, C. T. (2012). *Nursing research : generating and assessing evidence for nursing practice* (9th ed. ed.). Philadelphia, Pa: Wolters Kluwer Health.
- Rodak, B. F., Fritsma, G. A., & Keohane, E. M. (2012). *Hematology : clinical principles and applications* (4th ed. ed.). St. Louis, Mo: Saunders Elsevier.
- Sahiner, U. M., Yavuz, S. T., Buyuktiryaki, B., Cavkaytar, O., Arik Yilmaz, E., Tuncer, A., & Sackesen, C. (2014). Serum basal tryptase levels in healthy children: correlation between age and gender. *Allergy Asthma Proc*, *35*(5), 404-408. doi:10.2500/aap.2014.35.3769
- Sala-Cunill, A., Cardona, V., Labrador-Horrillo, M., Luengo, O., Estes, O., Garriga, T., . . . Guilarte, M. (2013). Usefulness and Limitations of Sequential Serum Tryptase for the Diagnosis of Anaphylaxis in 102 Patients. *International Archives of Allergy and Immunology*, *160*(2), 192-199. doi:10.1159/000339749
- Samorapoompichit, P., Kiener, H., Scherthner, G., Jordan, J., Agis, H., Wimazal, F., . . . Valent, P. (2001). Detection of tryptase in cytoplasmic granules of basophils in patients with chronic myeloid leukemia and other myeloid neoplasms. *Blood*, *98*(8), 2580-2583. doi:10.1182/blood.V98.8.2580
- Sargur, R., Cowley, D., Murng, S., Wild, G., Green, K., Shrimpton, A., & Egner, W. (2011). Raised tryptase without anaphylaxis or mastocytosis: heterophilic antibody interference in the serum tryptase assay. *Clin Exp Immunol*, *163*(3), 339-345. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04287.x
- Schliemann, S., Seyfarth, F., Hipler, U.-C., & Elsner, P. (2012). Impact of age and heterophilic interference on the basal serum tryptase, a risk indication for anaphylaxis, in 1,092 dermatology patients. *Acta dermato-venereologica*, *92*(5), 484. doi:10.2340/00015555-1245
- Schwartz, L. B. (2006). Diagnostic value of tryptase in anaphylaxis and mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*, *26*(3), 451-463. doi:10.1016/j.iac.2006.05.010
- Schwartz, L. B., Bradford, T. R., Rouse, C., Irani, A.-M., Rasp, G., Van Der Zwan, J. K., & Van Der Linden, P.-W. G. (1994). Development of a new, more sensitive immunoassay for

- human tryptase: Use in systemic anaphylaxis. *Journal of Clinical Immunology*, 14(3), 190-204. doi:10.1007/bf01533368
- Schwartz, L. B., Irani, A. M., Roller, K., Castells, M. C., & Schechter, N. M. (1987). Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells. *J Immunol*, 138(8), 2611-2615.
- Schwartz, L. B., Metcalfe, D. D., Miller, J. S., Earl, H., & Sullivan, T. (1987). Tryptase levels as an indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N Engl J Med*, 316(26), 1622-1626. doi:10.1056/nejm198706253162603
- Schwartz, L. B., Yunginger, J. W., Miller, J., Bokhari, R., & Dull, D. (1989). Time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. *J Clin Invest*, 83(5), 1551-1555. doi:10.1172/jci114051
- Simons, F. E., Frew, A. J., Ansotegui, I. J., Bochner, B. S., Golden, D. B., Finkelman, F. D., . . . Walls, A. F. (2007). Risk assessment in anaphylaxis: current and future approaches. *J Allergy Clin Immunol*, 120(1 Suppl), S2-24. doi:10.1016/j.jaci.2007.05.001
- Simons, F. E. R., Arduoso, L. R. F., Bilò, M. B., El-Gamal, Y. M., Ledford, D. K., Ring, J., . . . Thong, B. Y. (2011). World allergy organization guidelines for the assessment and management of anaphylaxis. *The World Allergy Organization journal*, 4(2), 13. doi:10.1097/WOX.0b013e318211496c
- Simons, F. E. R., Ebisawa, M., Sanchez-Borges, M., Thong, B. Y., Worm, M., Tanno, L. K., . . . Sheikh, A. (2015). 2015 update of the evidence base: World Allergy Organization anaphylaxis guidelines. *World Allergy Organization Journal*, 8(1), 1-16. doi:10.1186/s40413-015-0080-1
- Simons, F. E. R., Frew, A. J., Ansotegui, I. J., Bochner, B. S., Golden, D. B. K., Finkelman, F. D., . . . Walls, A. F. (2007). Risk assessment in anaphylaxis: Current and future approaches. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(1), S2-S24. doi:10.1016/j.jaci.2007.05.001
- Sletnes, K. B. (2015, 12. mai 2015). Positivism: vitenskapsfilosofi.
- Solberg, H. E. (1987). Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *Clinica Chimica Acta*, 170(2-3), S13-S32. doi:10.1016/0009-8981(87)90151-3
- Test Principle ImmunoCAP Tryptase. (2012). Retrieved from <http://www.phadia.com/Products/Allergy-testing-products/ImmunoCAP-Lab-Tests/ImmunoCAP-Tryptase/Test-Principle/>
- Valent, P., Akin, C., Arock, M., Brockow, K., Butterfield, J., Carter, M., . . . Metcalfe, D. (2012). Definitions, Criteria and Global Classification of Mast Cell Disorders with Special Reference to Mast Cell Activation Syndromes: A Consensus Proposal (Vol. 157, pp. 215-225). Basel: S. Karger AG.
- Vitte, J. (2015). Human mast cell tryptase in biology and medicine. *Mol Immunol*, 63(1), 18-24. doi:10.1016/j.molimm.2014.04.001
- West, B. T., Welch, K. B., Gajekci, A. T., & Gillespie, B. W. (2006). *Linear mixed models : a practical guide using statistical software*

Vedlegg

I. Spørreskjema Blodbanken ved Haukeland Universitetssjukehus

Blodbankene i Norge

Skjema for blodgivere

Velkommen til blodbanken!

Fyll ut (bruk blokkbokstaver):		
Etternavn	Fornavn	Fødselsnummer (11 siffer)
Privatadresse med postnummer Som før <input type="checkbox"/>		
Tlf privat	Tlf mobil	Tlf arbeid
Epostadresse		

	JA	NEI
Tillater du at blodbanken sender deg epost (innkalling, timepåminning, eventuell annen viktig informasjon)?		
Tillater du at blodbanken sender deg SMS (innkalling, timepåminning, eventuell annen viktig informasjon)?		

Blodoverføring er en uerstattelig del av moderne medisinsk behandling. Likevel kan både det å motta blodoverføring og det å gi blod medføre risiko.

- Noen sykdommer kan overføres med blod fra blodgiver til pasient. Man kan være bærer av overførbare smittestoffer uten selv å vite om det. En nylig smittet person kan være smittefarlig selv om testene ikke viser noe galt. Av den grunn må personer som kan ha blitt utsatt for smitte, ikke gi blod. Vi stiller derfor mange spørsmål som vedrører situasjoner der man kan ha blitt utsatt for smitte.
- Hvis man er frisk, er risikoen ved å gi blod svært liten. Noen sykdommer kan gi økt risiko for komplikasjoner etter blodgivning. Vi stiller derfor mange spørsmål om blodgiverens egen helse, for å være sikre på at han eller hun trygt kan gi blod.

Vennligst besvar spørsmålene nedenfor ærlig og oppriktig under forutsetning av blodbankpersonalets taushetsplikt. Blodbanken må ha full tillit til at de opplysningene som gis er riktige. Er du i tvil om du kan være blodgiver, kan du drøfte dette med den som kontrollerer spørsmålene.

Blodbanken har informasjonsmateriell om blodgivning. Hvis du ikke har lest dette tidligere, oppfordrer vi deg til å gjøre det nå!

Vennligst besvar	JA	NEI
Har du fått informasjon om blodgivning?		
Føler du deg frisk nå?		
Hvis du har gitt blod tidligere, har du vært frisk i perioden fra forrige blodgivning og til nå?		
Veier du 50 kg eller mer?		
Har du åpne sår, eksem eller hudsykdom?		
Har du piercing i slimhinne?		

Har du i løpet av de siste fire uker	JA	NEI
- brukt medisiner?		
- vært syk eller hatt feber?		
- hatt løs avføring?		
- fått vaksine?		
- vært hos tannlege eller tannpleier?		

Har du i løpet av de siste seks måneder	JA	NEI
- vært til legeundersøkelse eller på sykehus, eller fått behandling for noen sykdom?		
- fått behandling med sprøyter?		
- hatt kjønnsykdom, eller fått behandling for kjønnsykdom?		
- hatt seksuell kontakt med person med HIV-infeksjon eller hepatitt B eller hepatitt C, eller med person som har hatt positiv test for en av disse sykdommene?		
- hatt seksuell kontakt med person som bruker eller har brukt dopingmidler eller narkotiske midler som sprøyter?		
- hatt seksuell kontakt med prostituerte eller tidligere prostituerte?		
- blitt tatovert, fått piercing eller tatt hull i ørene?		

Snu arket!

IS-1414 Skjema

Gyldig fra 5.12.2014

Har du i løpet av de siste seks måneder	JA	NEI
- fått akupunktur?		
- stukket eller skåret deg på gjenstander som var forurenset med blod eller kroppsvæsker,		
- bodd i samme husstand som en person som har hepatitt B?		
- fått blodsøl på slimhinner eller skadet hud?		
- blitt bitt av flått?		
- hatt seksualpartner som har bodd mer enn ett år sammenhengende utenfor Vest-Europa ?		
- hatt seksualpartner som har vært i Afrika?		
- hatt seksuell kontakt med en person som har fått blod eller blodprodukter utenfor Norden?		
- hatt ny seksualpartner?		
- vært utenfor Vest-Europa?		

Har du i løpet av de siste to år	JA	NEI
- hatt sjeldne eller alvorlige infeksjonssykdommer?		

Har du på noe tidspunkt gjennom livet	JA	NEI
- hatt, hjerte-, lever-, eller lungesykdom?		
- hatt kreft?		
- hatt blødningstendens?		
- hatt allergi mot mat eller medisiner?		
- hatt malaria?		
- hatt tropesykdommer?		
- hatt hepatitt (gulsott), HIV-infeksjon eller AIDS?		
- hatt positiv prøve for hepatitt (gulsott) eller HIV-infeksjon?		
- fått blodoverføring?		
- fått veksthormon?		
- fått hornhinnetransplantat?		
- hatt syfilis?		
- hatt alvorlig sykdom som ikke er nevnt her?		
- brukt dopingmidler eller narkotiske midler som sprøyter?		
- mottatt penger eller narkotika som gjenyttelse for sex?		

Besvares av kvinner	JA	NEI
Er du gravid?		
Har du vært gravid i løpet av de siste tolv måneder, eller ammer du nå?		
Hvis du har gitt blod tidligere, har du vært gravid siden forrige blodgivning?		
Har du i løpet av de siste seks måneder hatt seksuell kontakt med en mann som du vet har hatt seksuell kontakt med andre menn?		

Besvares av menn	JA	NEI
Har eller har du hatt seksuell kontakt med andre menn?		

Besvar også	JA	NEI
Har du brukt narkotika en eller flere ganger de siste 12 måneder?		
Har du eller noen i familien hatt Creutzfeldt-Jakob sykdom eller variant CJD?		
Har du oppholdt deg i Storbritannia i mer enn ett år til sammen i perioden mellom 1980 og 1996?		
Har du i løpet av de siste tre år vært i områder der malaria forekommer?		
Har du oppholdt deg sammenhengende i minst seks måneder i områder der malaria forekommer?		
Har du oppholdt deg i Afrika i mer enn fem år til sammen?		
Er du eller din mor født i Amerika sør for USA?		
Godtar du at anonymiserte prøver av ditt blod kan brukes til forskning? Du er like velkommen som blodgiver enten du svarer ja eller nei. Blodbanken kan gi informasjon om aktuelle forskningsprosjekter.		
Har du deltatt i medikamentforsøk de siste 12 måneder?		
Jeg samtykker i at mitt plasma føres ut av Norge for legemiddelproduksjon.		
I hvilke(t) land er du født og oppvokst?		

Dato og underskrift	
Plass for eventuelle tilleggsopplysninger	
Dato	Din underskrift

Fylles ut av blodbanken			
Hb:	BT:	Puls	Konklusjon vedrørende blodgivning:
Dato:		Blodbankens signatur:	

Jeg gir med dette blodbanken tillatelse til å innhente ytterligere helseopplysninger	Din underskrift
vedr: ca. tidspkt: fra lege/sykehus:	

II. Spørreskjema for studien

Spørreskjema til forskningsprosjektet: Referanseområde og biologisk variasjon for allergianalyser

1. Har du noen gang hatt allergisk reaksjon eller mistenker du at du har allergi?

NEI JA

Hvis JA, hva tror du utløste reaksjonen?

.....
.....

2. Har du hatt allergiske plager de siste 4 ukene før prøvetakning?

NEI JA

Hvis ja:

Hvilke symptomer? (kryss av)

Rennende og/eller kløende øyne

Renning og/eller kløe i nese

Kvalme

Diare

Utslett

Kløe i munn og prikking i lepper

Pustevansker

Svimmelhet og/eller besvimelse)

Annet:

Ble det behandlet?

NEI JA

Hvis Ja, hvilken behandling?

Lokalbehandling (nesespray/øyedråper)

Tablettbehandling, hvilken (eks. Zyrtec eller reseptbelagt allergitabletter):

Adrenalin (sprøyte)

Fastlege/Legevakt/Sjukehus

Annet:

3. Føler du deg frisk i dag ved prøvetakning?

Ingen pågående sykdommer eller sykdomsfølelse

NEI JA

4. Har du trent det siste 24 timer:

NEI JA

Hvor mye (intensitet)

Tid (antall minutter)

5. Har du tatt noen medikamenter/kosttilskudd siste 48 timer:

NEI JA

Hvis JA, hvilke preparat og dose?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Tusen takk for hjelpen!

III. Samtykkeskjema studien og «Biobank for Allergianalyser»

Referanseområde og biologisk variasjon for tryptase og immunoglobulin E, 12.06.17, v01

FORESPØRSEL OM DELTAKELSE I FORSKNINGSPROSJEKTET

«REFERANSEOMRÅDE OG BIOLOGISK VARIASJON FOR ALLERGIANALYSER I EN FRISK BEFOLKNING MED OG UTEN ALLERGI»

BAKGRUNN OG HENSIKT

Dette er et spørsmål til deg om å delta i et forskningsprosjekt for å etablere referanseområde og biologisk variasjon for allergianalyser i en frisk befolkning med og uten allergi. Aktuelle analyser er særlig tryptase og immunoglobulin E, eventuelt restmateriale vil kunne bli benyttet til etablering av andre referanseområder ved Laboratoriet ved Haukeland universitetssjukehus. Tryptase er en analytt som blir frigitt fra mastceller som blir stimulert av kombinasjonen av allergen og allergenspesifikk IgE. Målinger av tryptase benyttes i utredning av anafylaksi og ved diagnostisering av sykdommen Mastocytose. Alle friske mennesker har et basalnivå av tryptase, og det er en eventuell stigning av tryptase som benyttes i den kliniske vurderingen. Ved anafylaksi er det en kortvarig økning av tryptasekonsentrasjonen, mens ved mastocytose ses en konstant forhøyet verdi.

HVA INNEBÆRER PROSJEKTET?

Deltaker blir inkludert i en av to deler av dette prosjektet.

- Referanseområde for tryptase og immunoglobulin E**
Deltakelse i studien innebærer at det vil bli tatt blodprøver (2 serumglass og ett EDTA-glass) enten i sammenheng med blodgivning eller ved standard venøs blodprøvetaking. Dette er en engangs giving.
- Biologisk variasjon for tryptase og immunoglobulin E**
For vurdering av den biologiske variasjonen til tryptase vil det bli tatt blodprøver (2 serumglass) én gang i uken i totalt 10 påfølgende uker. Det er ønskelig at blodprøvene blir tatt til samme tid på en fast dag (f.eks. kl. 8 hver onsdag).

Prøvetakingen foregår i tråd med prosedyrer ved sykehuset, og skal ikke innebære noe større risiko eller ubehag. I tillegg til innsamling av prøvemateriale vil det bli samlet informasjon om eventuelt tidligere allergier i et spørreskjema. Alle opplysningene som blir gitt i spørreskjemaet vil registrert sammen med analysesvarene. Restprøvematerialet vil bli fryst ned i sløtkoter i den generelle biobanken «Biobank for Allergi analyser», og kan bli benyttet til å eventuelt etablere referanseområdet for andre allergianalytter ved laboratoriet ved Haukeland universitetssjukehusallergianalytter.

Det vil ikke gis tilbakemelding på resultatene ved normale prøver. Hvis du ønsker at vi skal kontakte din fastlege ved eventuelle uventede funn kan du krysse av for det under samtykket.

MULIGE FORDELER OG ULEMPER

Risikoen du som giver utsettes for i dette forsøket vil være å ta blodprøver og avgi et mindre blodvolum. Blant friske givere ansees dette for å være en liten belastning. Pasientskadeerstatningen vil være gjeldende for dette prosjektet. Nytteverdien til prosjektet vil være at resultatet fra forsøket vil kunne bidra til å forbedre diagnostikken ved allergisk sykdom, mastocytose og anafylaksi.

FRIVILLIG DELTAKELSE OG MULIGHET FOR Å TREKKE SITT SAMTYKKE

Det er frivillig å delta i prosjektet. Dersom du ønsker å delta, undertegner du samtykkeerklæringen på siste side. Du kan når som helst og uten å oppgi noen grunn trekke ditt samtykke. Dersom du trekker deg fra prosjektet, kan du kreve å få slettet innsamlende prøver og opplysninger, med mindre opplysningene allerede er inngått i analyser eller brukt i vitenskapelige publikasjoner.

Dersom du senere ønsker å trekke deg eller har spørsmål til prosjektet, kan du kontakte:

Ansvarlig for ~~biobanken~~/kontaktperson: Overlege Torunn Apelseth, Laboratorium for klinisk biokjemi, Haukeland Universitetssjukehus, Helse Bergen HF.

Telefonnummer: 55 97 31 40 eller 55973092 (dagtid).

HVA SKJER MED INFORMASJONEN OM DEG?

Informasjonen som registreres om deg skal kun brukes slik som beskrevet i hensikten med studien. Eventuelle prøver og informasjonen som registreres om deg vil bli behandlet konfidensielt. Opplysninger er kun tilgjengelige gjennom en koblingsnøkkel som skal beskytte din identitet, men samtidig gjøre det mulig å knytte opplysningene om deg til ditt materiale gjennom en kodeliste. Virksomheten er ansvarlig for at koblingsnøkkel oppbevares og forvaltes forsvarlig. Koblingsnøkkel vil bli slettet ved prosjektets slutt.

HVA SKJER MED PRØVER SOM BLIR TATT AV DEG?

Prøvene som tas av deg skal oppbevares i den generelle ~~biobanken~~ «~~Biobank~~ for Allergi analyser». Restprøvematerialet vil bli fryst ned i allkvoter og lagret i «~~Biobank~~ for Allergi analyser», se vedlegg for informasjon og samtykke til lagring av restmateriale i ~~biobank~~. er overlege Torunn Apelseth, Laboratorium for klinisk biokjemi, Haukeland Universitetssjukehus, Helse Bergen HF.

~~Biobanken~~ opphører etter prosjektslutt. Dato for prosjektslutt er 31.12.2021

GODKJENNING

Prosjektet er godkjent av Regional komite for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk, [2017/1179/REK Vest.]

SAMTYKKE TIL DELTAKELSE I PROSJEKTET

JEG ER VILLIG TIL Å DELTA I PROSJEKTET

Sted og dato	Deltakers signatur
	Deltakers navn med trykte bokstaver

Jeg ønsker at min fastlege får tilbakemeldinger om eventuelle funn (nivler over forventet normalområde):

- JA
- NEI

Hvis ja: Oppgi navn på lege/legesenter og adresse:

FORESPØRSEL OM Å AVGI BIOLOGISK MATERIALE TIL

BIOBANK FOR ALLERGIANALYSER

BAKGRUNN OG HENSIKT

Formålet med biobanken er å oppnå ny kunnskap innen diagnostikk av allergi og overfølsomhet. Det biologiske materialet blir oppbevart på ubestemt tid og skal brukes i fremtidig forskning på overfølsomhet, allergi og annen immunologisk hypersensitivitetsreaksjon.

HVILKET BIOLOGISK MATERIALE SKAL INNSAMLES?

Prøvematerialet vil hovedsakelig være blodprøver, men det kan bli aktuelt å undersøke prøver av ulike typer sekret, urin, avføringsprøver eller vevsprøver.

Studiepersoner kan avgi materiale til forskningsbiobanken i forbindelse med at de er inkludert i et prosjekt, i forbindelse med blodgivning eller i relasjon til utredning og/eller behandling.

Prøvetakingen foregår i tråd med prosedyrer ved sykehuset, og skal ikke innebære noe større risiko eller ubehag. Så langt det er mulig skal prøvetaking til biobanken gjøres samtidig med at det tas prøver til utredning eller behandling. Vi kan komme til å be deg om ekstra blodprøvetakninger til forskningsformål, men dette er frivillig om du vil bidra med dette.

BREDT SAMTYKKE

Når du avgir biologisk materiale til denne generelle forskningsbiobanken, avgir du også et bredt samtykke til at materiale og relevante helseopplysninger skal brukes til fremtidig forskning innen allergi og overfølsomhet.

INNSAMLING OG BRUK AV HELSEOPPLYSNINGER

Biobanken vil inneholde noen opplysninger om deg. Eventuelle prøver og informasjonen som registreres om deg vil bli behandlet konfidensielt. Opplysninger er kun tilgjengelige gjennom en koblingsnøkkel som skal beskytte din identitet, men samtidig gjøre det mulig å knytte opplysningene om deg til ditt materiale gjennom en kodeliste. Virksomheten er ansvarlig for at koblingsnøkkel oppbevares og forvaltes forsvarlig. Materiale og opplysningene om deg lagres permanent og vil analyseres i forbindelse med spesifiserte forskningsprosjekter.

SAMMENSTILLING AV DATA FRA BIOBANKEN MED ANDRE OPPLYSNINGER

I enkelte forskningsprosjekter kan det være aktuelt å sammenstille informasjon fra biobanken med opplysninger fra pasientjournal, helseundersøkelser, helseregistre eller offentlige administrative registre. Aktuelle register kan være: Anafylaksiregisteret, Matallergiregisteret, Norsk pasientregister, Norwegian Cardiovascular disease registry, CONOR, Reseptregisteret, Dødsårsaksregisteret eller andre relevante registre.

Du kan bli spurt om å besvare spørreskjemaer og delta på oppfølgingstiltak for å samle inn ytterligere opplysninger.

GENETISKE UNDERSØKELSER

Biologisk materiale som samles inn i biobanken vil bli brukt i ulike typer allergianalyser. Dette kan inkludere ulike former for genetiske analyser knyttet til allergisk sykdom. Dersom det ved genetisk undersøkelse fremkommer funn som kan ha diagnostisk betydning eller gir informasjon om risiko for fremtidig sykdom, kan du bli kontaktet for informasjon, oppfølging og veiledning. Avhengig av hvilke type undersøkelser som skal gjøres, kan det enten bli aktuelt å kontakte deg i forkant av at prosjektet gjennomføres, eller i etterkant hvis det gjøres funn studiedeltakere bør få vite om hvis han/hun ønsker det.

GODKJENNING AV FREMTIDIGE FORSKNINGSPROSJEKTER

Alle fremtidige forskningsprosjekter som benytter materialet fra deg skal forhånds godkjennes av en regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk, men du vil kun unntaksvis bli spurt på nytt om slik bruk.

INFORMASJON OM FREMTIDIGE PROSJEKTER

Informasjon om forskningsprosjekter der materiale fra biobanken benyttes finner du på vår nettside www.helse-bergen.no/anafylaksiregisteret

UTLEVERING AV PRØVEMATERIALE

Det kan være aktuelt at opplysninger og prøvemateriale utleveres til samarbeidende forskere eller laboratorier ved foretakene i Helse Vest og Universitetet i Bergen. Dette kan også gjøres til samarbeidende forskere eller laboratorier andre steder i Norge eller i utlandet inkludert land med lover som ikke tilfredsstiller europeisk personvernlovgivning. Opplysninger og prøvemateriale vil kun utleveres uten navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjennende opplysninger, såkalt avidentifisert.

DET ER FRIVILLIG Å DELTA

Å avgi biologisk materiale til «Biobank for allergianalyser» er frivillig og krever samtykke. Det vil ikke ha noen betydning for din behandling dersom du velger ikke å avgi prøve, eller dersom du senere ønsker å trekke deg.

MULIGHET FOR Å TREKKE SITT SAMTYKKE, INNSYNSRETT, ENDRING OG SLETNING AV OPPLYSNINGER

Du kan til enhver tid få innsyn i hvilket materiale som er lagret fra deg. Du kan når som helst kreve at materialet blir destruert, uten at du må oppgi noen grunn. Destruksjon av materialet vil imidlertid ikke innebære sletting av utledete opplysninger som har inngått i sammenstilling eller analyser.

KONTAKT

Ansvarlig for biobanken/kontaktperson: Overlege Torunn Apelseth, Laboratorium for klinisk biokjemi, Haukeland Universitetssjukehus, Helse Bergen HF.

Telefonnummer: 55 97 31 40 eller 55973092 (dagtid).

E-post: torunn.oveland.apelseth@helse-bergen.no

**SAMTYKKE TIL LAGRING AV BIOLOGISK MATERIALE
VOKSNE OVER 16 ÅR**

Forskningsområde		Prosjektnummer
Overfølsomhet, allergi og annen immunologisk hypersensitivitetsreaksjon		2016/577
Prosjektleders navn Torunn Apelseth		Klinikk/avdeling Laboratorium for klinisk biokjemi, Haukeland universitetssjukehus, Bergen, Norge
Jeg er villig til å avgi bredt samtykke til at mitt biologiske materiale kan oppbevares varig i «Biobank for allergianalyser» og bli benyttet i fremtidig forskning		
Navn med blokkbokstaver		Fødselsnummer (11 siffer)
Dato	Underskrift	
Fylles ut av representant for forskningsområdet		
Jeg bekrefter å ha gitt informasjon om forskningsområdet:		
Dato	Underskrift	Brukerkode (4-tegnskode)
Eventuelle kommentarer:		

IV. Kommandoer brukt i R for Referanseområde

library(foreign) # hente inn data fra andre programmer:

```
bane <- "//ihelse.net/Forskning/HBE/2017-01179/Database ref.område/"
filnavn <- paste(bane, "kopi database referanseområde.sav", sep="")
dr <- read.spss(filnavn, to.data.frame=TRUE)
```

```
names(dr)
# norske bokstaver blir rotet til, rfetter:
names(dr)[4] <- "Kjønn"
names(dr)
```

```
#Histogram samlet og oppdelt kjønn
summary(dr$tryptase) # fra 1,1 til 23,5
hist.tryptase.alle <- hist(dr$tryptase, col="lightgreen",
                          xlab="tryptase, alle", main="")
# max 23,2
hist.tryptase.alle$counts # største antall i søyle 94
par(mfrow=c(2,2))
hist(dr$tryptase, col="lightgreen", xlab="tryptase, alle", main="",
     xlim=range(0,25), ylim=range(0,100))
hist(dr$tryptase[dr$Kjønn=="k"], col="lightgreen",
     xlab="tryptase, kvinner", main="", ,
     xlim=range(0,25), ylim=range(0,100))
hist(dr$tryptase[dr$Kjønn=="m"], col="lightgreen",
     xlab="tryptase, menn", main="", ,
     xlim=range(0,25), ylim=range(0,100))
par(mfrow=c(1,1))
#t-test kjønn tryptase (men ikke tatt hensyn til skeivhet i denne testen)
t.test(tryptase~Kjønn,data=dr)
```

```
# normalfordelingsplott av tryptase og logtransformert tryptase:
par(mfrow=c(1,2))
qqnorm(dr$tryptase)
qqline(dr$tryptase)
qqnorm(log(dr$tryptase))
qqline(log(dr$tryptase))
par(mfrow=c(1,1))
# tryptase er skeivt fordelt, logtransformert tryptase er mye nærmere
# normalfordelt, men har litt tyngde haler i begge retninger.
```

```
# tryptase mot kjønn og alder:
summary(dr$tryptase)
plot(x=dr$Alder[dr$Kjønn=="k"], y=dr$tryptase[dr$Kjønn=="k"],
     ylim=c(min(dr$tryptase),max(dr$tryptase)), las=1, pch=19, col="red",
     xlab="Alder", ylab="Tryptase")
points(x=dr$Alder[dr$Kjønn=="m"], y=dr$tryptase[dr$Kjønn=="m"],
       col="blue", pch=19)
```

```

abline(lm(dr$tryptase[dr$Kjønn=="k"]~dr$Alder[dr$Kjønn=="k"]), col="red")
abline(lm(dr$tryptase[dr$Kjønn=="m"]~dr$Alder[dr$Kjønn=="m"]), col="blue")

summary(dr$tryptase)
# samme også på logskala:
par(mfrow=c(1,2))
plot(x=dr$Alder[dr$Kjønn=="k"], y=dr$tryptase[dr$Kjønn=="k"],
     ylim=c(min(dr$tryptase),max(dr$tryptase)), las=1, pch=19, col="red",
     xlab="Alder", ylab="Tryptase")
points(x=dr$Alder[dr$Kjønn=="m"], y=dr$tryptase[dr$Kjønn=="m"],
       col="blue", pch=19)
abline(lm(dr$tryptase[dr$Kjønn=="k"]~dr$Alder[dr$Kjønn=="k"]), col="red")
abline(lm(dr$tryptase[dr$Kjønn=="m"]~dr$Alder[dr$Kjønn=="m"]), col="blue")
plot(x=dr$Alder[dr$Kjønn=="k"], y=log(dr$tryptase[dr$Kjønn=="k"]),
     ylim=c(min(log(dr$tryptase)),log(max(dr$tryptase))), pch=19, col="red",
     xlab="Alder", ylab="Tryptase (logskala)", axes=FALSE)
points(x=dr$Alder[dr$Kjønn=="m"], y=log(dr$tryptase[dr$Kjønn=="m"]),
       col="blue", pch=19)
box()
abline(lm(log(dr$tryptase[dr$Kjønn=="k"]~dr$Alder[dr$Kjønn=="k"]), col="red")
abline(lm(log(dr$tryptase[dr$Kjønn=="m"]~dr$Alder[dr$Kjønn=="m"]), col="blue")
axis(1)
axis(2, las=1, at=log(c(2,4,8,15)), labels=c(2,4,8,15))
par(mfrow=c(1,1))

# referanseområde uten å ta hensyn til kjønn og alder:
quant1.tryptase <- quantile(dr$tryptase,probs=c(.025, .975))
quant1.tryptase

# med logtransformasjon, skal bli noe liknende:
quant1.tryptase.log <- exp(quantile(log(dr$tryptase),probs=c(.025, .975)))
quant1.tryptase.log
hist(dr$tryptase, col="lightgreen", xlab="tryptase, alle", main="",
     xlim=range(0,25), ylim=range(0,100))
abline(v=quant1.tryptase,col="red")
abline(v=quant1.tryptase.log,col="red", lty="dotted")
# det blir svært likt

# forberedelse til beregning av konfidensintervall for prosentiler:
to.81 <- qnorm(.95)*sqrt(2+qnorm(.975)^2)/sqrt(2)
to.81
#regner ut 2.5 prosentil, på logskala
mean.log.tryptase <- mean(log(dr$tryptase))
sd.log.tryptase <- sd(log(dr$tryptase))
tryptase.025.log <- exp(mean.log.tryptase - qnorm(.975)*sd.log.tryptase)
tryptase.975.log <- exp(mean.log.tryptase + qnorm(.975)*sd.log.tryptase)
tryptase.025.log
tryptase.975.log
quant1.tryptase.log
#konfidensgrenser

```

```
ndr <- dim(dr)[1]
ndr # antall personer i datamaterialet
tryptase.025.nedre <- exp(mean.log.tryptase - qnorm(.975)*sd.log.tryptase -
  to.81*sd.log.tryptase/sqrt(ndr))
tryptase.025.øvre <- exp(mean.log.tryptase + qnorm(.975)*sd.log.tryptase +
  to.81*sd.log.tryptase/sqrt(ndr))
c(tryptase.025.nedre, tryptase.025.log, tryptase.025.øvre)
tryptase.975.nedre <- exp(mean.log.tryptase + qnorm(.975)*sd.log.tryptase -
  to.81*sd.log.tryptase/sqrt(ndr))
tryptase.975.øvre <- exp(mean.log.tryptase + qnorm(.975)*sd.log.tryptase +
  to.81*sd.log.tryptase/sqrt(ndr))
c(tryptase.975.nedre, tryptase.975.log, tryptase.975.øvre)
```

V. Kommandoer brukt i R for Biologisk variasjon

```
library(foreign) # hente data fra andre programmer
library(nlme) # mixed effects-modeller

bane <- "//ihelse.net/Forskning/HBE/2017-01179/Database biologisk variasjon/"
filnavn <- paste(bane, "database - biologisk variasjon første 5.sav", sep="")
bv <- read.spss(filnavn, to.data.frame = TRUE)
summary(bv)

# setter opp de viktigste variablene som gruppert datamateriale:
nbv <- dim(bv)[1]
bg <- data.frame(id=rep(bv$Id,2), duplikat=rep(1:2,rep(nbv,2)),
                ukenr=rep(bv$ukenr,2), kjønn=rep(bv$Kjønn,2),
                alder=rep(bv$Alder,2),
                tryptase=c(bv$Tryptase,bv$Tryptase2))
# stokker om så personene kommer i rekkefølge:
bg <- bg[order(bg$Id,bg$ukenr,bg$duplikat),]
# fjerner linjer der tryptase mangler:
bg <- bg[is.na(bg$tryptase)==0,]
# gjør til gruppert datamateriale:
bg <- groupedData(bg, formula=tryptase~alder|id/ukenr)
bg
summary(bg)
# ingen missing, ser på ukenr:
table(bg$ukenr) # uke 1-10
# lager ukenr med 0 for første uke:
bg$uke0 <- bg$ukenr - 1
summary(bg)
table(bg$ukenr,bg$uke0) # ok

# modellerer:
lme1.tryptase <- lme(tryptase~uke0, random=~uke0, data=bg)
# konvergerer ikke, prøver uten tilfeldig variasjon i stigning:
lme1.tryptase <- lme(tryptase~uke0, random=~1, data=bg)
anova(lme1.tryptase, type="marginal")
summary(lme1.tryptase)
intervals(lme1.tryptase) # stabilt

# plott (antar at begge duplikater finnes hvis en av dem finnes):
summary(bv)
par(mar=c(c(bottom=4.2, left=4, top=0.2, right=0) + 0.1)) # mindre luft rundt
plot(x=1:10, y=rep(3,10), ylim=c(2.0,3.8),
     axes=FALSE, col="white", xlab="Time (weeks)",ylab="Serum tryptase")
box()
axis(1, at=1:10)
axis(2, las=1)
col.person <- c("blue","cyan","coral","black","green2")
```

```
line.dupl <- c("solid","dashed")
for(person in 1:5) {
  ukenr.person <- bv$ukenr[bv$Id==person&is.na(bv$Tryptase)==0]
  tryptase.person <- bv$Tryptase[bv$Id==person&is.na(bv$Tryptase)==0]
  tryptase2.person <- bv$Tryptase2[bv$Id==person&is.na(bv$Tryptase)==0]
  points(x=ukenr.person, y=tryptase.person, type="l", col=col.person[person],
lty=line.dupl[1])
  points(x=ukenr.person, y=tryptase2.person, type="l", col=col.person[person],
lty=line.dupl[2])
} # end for person
par(mar=c(c(bottom=5, left=4, top=4, right=2) + 0.1)) # tilbake til standardoppsett
```