

# Bachelorproef

---

**Studiegebied** Gezondheidszorg  
**Bachelor** Biomedische Laboratoriumtechnologie  
**Afstudeerrichting** Medische Laboratoriumtechnologie  
**Academiejaar** 2015-2016  
**Student** Céline Christiaens

---

## Thema

**Validatie van een Phadia 250-systeem voor de bepaling van tryptase**

## Stageplaats

---

**AZ Groeninge, Kortrijk**



# Bachelorproef

---

**Studiegebied** Gezondheidszorg  
**Bachelor** Biomedische Laboratoriumtechnologie  
**Afstudeerrichting** Medische Laboratoriumtechnologie  
**Academiejaar** 2015-2016  
**Student** Céline Christiaens

---

## Thema

**Validatie van een Phadia 250-systeem voor de bepaling van tryptase**

## Stageplaats

---

**AZ Groeninge, Kortrijk**

## Voor akkoord verklaring

*De stageplaats biedt modaliteiten aan om de bachelorproef uit te voeren en doet aan procesbegeleiding, maar neemt geen eindverantwoordelijkheid bij het uiteindelijke product.*

Apr. Biol. Olivier Heylen  
Bachelorproefbegeleider, AZ Groeninge

Mevrouw Dorine Gadeyne  
Stagegever, AZ Groeninge

Mevrouw Mieke Vandenhoute  
Bachelorproefbegeleider, Howest

Céline Christiaens  
Student MLT, Howest

## Woord vooraf

Na weken zwoegen kan ik eindelijk met trots mijn bachelorproef voorstellen. Hierin staat beschreven hoe ik het Phadia 250-toestel van het AZ Groeninge gevalideerd heb voor de bepaling van tryptase in serum: welke prestatiekenmerken geëvalueerd werden, hoe deze geëvalueerd werden, welke berekeningen er gedaan werden...

Maar zonder de steun en hulp van een aantal mensen zou me dit niet gelukt zijn.

Eerst en vooral wil ik mijn stageplaats AZ Groeninge bedanken om mij een leerrijke stageplaats aan te bieden.

Ik richt ook zeker een woord van dank aan Apr. Biol. Olivier Heylen voor de goede en leerrijke begeleiding van mijn bachelorproef. U heeft me steeds geholpen als ik ergens mee in de knoop zat.

Daarnaast wil ik alle laboranten bedanken die mij geholpen hebben met het praktisch werk van mijn bachelorproef. Zonder hen zou het iets langer geduurd hebben voor ik wist hoe het Phadia 250-toestel werkt.

Ook mevrouw Vandenhoute verdient een woord van dank voor het verlenen van advies in verband met mijn bachelorproef en de ondersteuning.

Ten slotte nog een woord van dank aan mijn familie en vrienden om mij telkens opnieuw de moed te geven om verder te gaan en om steeds een luisterend oor te bieden.

## Abstract

Tryptase is an enzyme, made and stored in mast cells. The measurement of tryptase is a useful marker in the diagnosis of systemic mastocytosis, allergic reactions and anaphylaxis.

Tryptase can be measured with a Phadia system. These days AZ Groeninge sends the samples for measuring tryptase to UZ Leuven. But AZ Groeninge would like to investigate the possibility of determining tryptase in their own laboratory. So the purpose is to validate the tryptase assay on the Phadia 250 system in the laboratory of AZ Groeninge.

For the validation of the Phadia 250 system of AZ Groeninge, a few performance characteristics were evaluated: precision (reproducibility and repeatability), trueness, uncertainty of measurement, method comparison and measurement range. Also the stability of tryptase in serum was evaluated.

For the evaluation of the reproducibility and the trueness the tryptase level of the Tryptase Control and the Curve Control was measured on ten different days. The coefficient of variation (CV) and the relative bias ( $B_{rel}$ ) were calculated. The CV is used to evaluate the between-day reproducibility and the  $B_{rel}$  to evaluate the trueness. The CV was lower than the proposed 10% and the  $B_{rel}$  was situated between -10% and +10%.

Two patient samples, one with a high tryptase level and one with a low tryptase level, were used for the evaluation of the repeatability. The concentration of tryptase was measured ten times in the same run. The within-run precision was acceptable with a CV lower than 10%.

The uncertainty of measurement (Total Error (TE) =  $B_{rel} + 1,65 * CV$ ) was determined with the previous results. The TE of both controls was lower than the calculated error limit of 26,5%.

Since there was no reference method available, we compared results of 32 samples that were determined in UZ Leuven on a Phadia 1000 system. A Wilcoxon test showed a statistically significant bias. Passing-Bablok regression analysis showed a significant slope and a non-significant intercept. However, the difference was clinically acceptable according to the absolute difference plot between the two methods.

The manual of the Phadia 250 system states that the machine can measure tryptase levels between 1 and 200  $\mu\text{g/L}$ . Calibrators were used as samples and the  $B_{rel}$  was calculated. With a  $B_{rel}$  between  $\pm 15\%$  the measuring range between 1 and 200  $\mu\text{g/L}$  was confirmed.

Regarding stability tryptase should be measured within five days if a sample is stored in the refrigerator according to the manufacturer. Tryptase was measured on five new samples and then stored in the refrigerator. Tryptase was measured again after five and seven days. There was no statistically significant difference between the results from day one, five and seven. Thus samples can be stored for up to seven days in the refrigerator.

The conclusion is that the Phadia 250 system in AZ Groeninge can be used for the routine measurement of tryptase in serum. It showed acceptable performance characteristics regarding precision, trueness, measurement uncertainty, method comparison, measuring range and stability.

# Inhoudsopgave

Voor akkoord verklaring .....	2
Woord vooraf .....	3
Abstract .....	4
Inhoudsopgave .....	1
Lijst met figuren .....	7
Lijst met tabellen.....	8
Lijst met symbolen .....	9
Lijst met afkortingen.....	10
Verklarende woordenlijst .....	11
Inleiding.....	12
1 Tryptase in mastcellen.....	13
1.1 Mastcellen .....	13
1.2 Tryptase .....	14
2 Baselineconcentratie tryptase .....	15
2.1 Verhoogde baselineconcentratie tryptase bij systemische mastocytose.....	15
2.1.1 Cutane mastocytose .....	15
2.1.2 Systemische mastocytose .....	16
2.2 Concentratieverloop van tryptase bij een mastcelactivatie .....	18
3 Klinische waarde van tryptase .....	19
3.1 Risicomerker voor ernstige anafylactische reacties .....	19
3.2 Klinische merker bij anafylactische reacties .....	19
3.2.1 Anafylactische reactie na een insectenbeet .....	19
3.2.2 Anafylactische reactie gedurende anesthesie en operaties .....	20
3.3 Mastocytose .....	20
3.4 Hematologische neoplasma's .....	21
4 Phadiatoestellen .....	22
4.1 Testen die op een Phadiatoestel uitgevoerd kunnen worden.....	24
4.2 Principe om de concentratie tryptase te bepalen.....	25
4.3 Soorten stalen die gebruikt kunnen worden voor de bepaling van tryptase .....	26
4.4 Interferenties van de tryptasetest .....	26
5 Materialen en methoden .....	27
5.1 Stalen .....	27
5.2 Materialen .....	27
5.3 Reagentia .....	27
5.4 Toestel en software .....	27

5.5	Methoden .....	28
5.5.1	Precisie .....	28
5.5.2	Juistheid .....	29
5.5.3	Meetonzekerheid .....	30
5.5.4	Methodevergelijking .....	30
5.5.5	Meetbereik .....	31
5.5.6	Stabiliteit van tryptase.....	31
6	Resultaten en discussie.....	32
6.1	Precisie .....	32
6.1.1	Herhaalbaarheid ( <i>within-run</i> precisie) .....	32
6.1.2	<i>Between-day</i> reproduceerbaarheid .....	33
6.2	Juistheid .....	34
6.3	Meetonzekerheid .....	35
6.4	Methodevergelijking .....	36
6.4.1	Statistische evaluatie.....	36
6.4.2	Analytische evaluatie.....	37
6.4.3	Klinische evaluatie.....	39
6.5	Meetbereik .....	41
6.6	Stabiliteit van tryptase.....	42
	Conclusie.....	44
	Referentielijst .....	45
	Bijlagen.....	47
	Bijlage 1: Protocol voor het gebruiken van een Phadia 250-toestel voor de bepaling van tryptase in serum .....	48
	Bijlage 2: Meetresultaten voor de methodevergelijking .....	50



## Lijst met figuren

Figuur 1.1: De activatie en secretie van $\alpha$ -, $\beta$ - en $\gamma$ -tryptase.....	14
Figuur 2.1: Verloop van de concentratie histamine en tryptase na een mastcelactivatie.....	18
Figuur 3.1: Concentratie tryptase bij drie verschillende subtypes van SM .....	20
Figuur 4.1: Een Phadia 250-toestel .....	22
Figuur 4.2: Het procesverloop van een Phadia 250-toestel.....	23
Figuur 4.3: Principe van de Phadiatoestellen voor de bepaling van tryptase .....	25
Figuur 4.4: De interferentie van HAMA-antilichamen met de muisantilichamen die gebonden zijn aan de well en deze die aanwezig zijn in het conjugaat.....	26
Figuur 6.1: De Passing-Bablok regressie en de regressievergelijking voor de analytische methodevergelijking .....	37
Figuur 6.2: De absolute difference plot voor de klinische methodevergelijking .....	39

## Lijst met tabellen

Tabel 2.1: De drie verschillende types cutane mastocytose .....	16
Tabel 2.2: De zes verschillende types systemische mastocytose .....	16
Tabel 2.3: Diagnostische criteria van de World Health Organization (WHO) voor systemische mastocytose .....	17
Tabel 3.1: Aantal patiënten (%) met een hematologische maligniteit én een verhoogde concentratie tryptase .....	21
Tabel 4.1: Het aantal resultaten dat de verschillende Phadia-toestellen kunnen afleveren per week .....	22
Tabel 4.2: Overzicht van welke testen op welke Phadia-toestellen uitgevoerd kunnen worden.....	24
Tabel 5.1: Formules voor het berekenen van de standaarddeviatie $s$ en de variatiecoëfficiënt $CV$ .....	29
Tabel 5.2: Formules voor het berekenen van de absolute en de relatieve bias .....	29
Tabel 5.3: Formule voor het berekenen van de totale fout .....	30
Tabel 5.4: Formule voor de bepaling van het binomiale betrouwbaarheidsinterval van de steekproef .....	31
Tabel 6.1: Resultaten voor de evaluatie van de herhaalbaarheid.....	32
Tabel 6.2: Resultaten voor de evaluatie van de reproduceerbaarheid .....	33
Tabel 6.3: Resultaten voor de evaluatie van de juistheid .....	34
Tabel 6.4: Resultaten voor de evaluatie van de meetonzekerheid .....	35
Tabel 6.5: De resultaten van de Wilcoxon test voor de statistische methodevergelijking	36
Tabel 6.6: De resultaten van de Passing-Bablok regressie voor de analytische methodevergelijking .....	37
Tabel 6.7: Analyseresultaten voor het bepalen van het meetbereik.....	41
Tabel 6.8: Analyseresultaten voor het nagaan van de stabiliteit van tryptase .....	42
Tabel 6.9: Resultaten van de gepaarde T-test voor de vergelijking van de meetresultaten van dag 0 met deze van dag 5 .....	42
Tabel 6.10: Resultaten van de gepaarde T-test voor de vergelijking van de meetresultaten van dag 0 met deze van dag 7 .....	43

## Lijst met symbolen

$B_{abs}$	Absolute <i>bias</i>
$B_{rel}$	Relatieve <i>bias</i>
$C_{ref}$	Targetconcentratie van het referentiemateriaal
$n$	Aantal analyseresultaten
$p$	Aantal datapunten die buiten de grenzen mogen liggen
$s$	Standaarddeviatie
$\bar{x}$	Gemiddelde
$x_i$	i-de analyseresultaat
$z_{1-\frac{\alpha}{2}}$	z-waarde voor het gewenste betrouwbaarheidsinterval

## Lijst met afkortingen

<b>AML</b>	Acute myeloïde leukemie
<b>ANA</b>	Antinucleaire antistoffen
<b>ANC</b>	<i>Absolute neutrophil count</i>
<b>ANCA</b>	Antineutrofiele cytoplasmatische antistoffen
<b>APS</b>	Antifosfolipidensyndroom
<b>ASM</b>	Agressieve systematische mastocytose
<b>CCP</b>	cyclisch citrulline peptide
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CI</b>	Betrouwbaarheidsinterval
<b>CM</b>	Cutane mastocytose
<b>CML</b>	Chronische myeloïde leukemie
<b>CMML</b>	Chronische myelomonocyttaire leukemie
<b>CV</b>	Variatiecoëfficiënt
<b>DCM</b>	Diffuse cutane mastocytose
<b>ECP</b>	<i>Eosinophil cationic protein</i>
<b>EDTA</b>	ethyleendiaminotetra-azijnzuur
<b>ER</b>	Endoplasmatisch reticulum
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FEIA</b>	<i>Fluorescence enzyme immunoassay</i>
<b>GBM</b>	<i>Glomerular basement membrane</i>
<b>HAMA</b>	Humaan anti-muis antistof
<b>Hb</b>	Hemoglobine
<b>IDM</b>	<i>Information Data Manager</i>
<b>IgA</b>	Immunoglobuline A
<b>IgE</b>	Immunoglobuline E
<b>IgG(4)</b>	Immunoglobuline G(4)
<b>ISM</b>	Indolente systemische mastocytose
<b>MC</b>	Mastcel
<b>MCL</b>	Mastcelleukemie
<b>MCT</b>	<i>Mast cells containing tryptase</i>
<b>MCTC</b>	<i>Mast cells containing tryptase and chymase</i>
<b>MPCM</b>	Maculopapulaire cutane mastocytose
<b>MPD</b>	<i>Myeloproliferative disorder</i>
<b>RF</b>	Reumafactor
<b>SM</b>	Systemische mastocytose
<b>SM-AHNMD</b>	<i>Systemic mastocytosis with associated clonal hematologic non-mast cell lineage disorder</i>
<b>TE</b>	Totale fout
<b>UP</b>	<i>Urticaria pigmentosa</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>

## Verklarende woordenlijst

<b>Acute myeloïde leukemie</b>	Een hematologische maligniteit waarbij er een overproductie is van myeloblasten.
<b>Allergeen</b>	Een antigeen dat een allergische reactie kan veroorzaken bij een deel van de humane populatie terwijl dit antigeen bij de meesten niets veroorzaakt.
<b>Anafylactoïde reactie</b>	Een anafylactische reactie die niet IgE-gemedieerd is.
<b>Anafylaxie</b>	Een zeer ernstig verlopende overgevoeligheidsreactie, vaak gepaard met een plotselinge bloeddrukdaling. Vaak is er ook bewustzijnsverlies en soms misselijkheid, braken en diarree.
<b>Bias</b>	Afwijking ten opzichte van de werkelijke waarde.
<b>Chronische myeloïde leukemie</b>	Een hematologische maligniteit waarbij er een woekering is van witte bloedcellen, voornamelijk granulocyten.
<b>Chronische myelomonocytaire leukemie</b>	Een ziekte die tot de groep van myelodysplastische syndromen en <i>myeloproliferative disorders</i> behoort. De patiënten hebben een te veel aan monocyten.
<b>Chymase</b>	Een serine protease dat zich vooral in mucosale mastcellen bevindt.
<b>Indolent</b>	Traag ontwikkelend met geringe symptomen en weinig klachten.
<b>Mastcel</b>	Een soort witte bloedcel die een belangrijke rol speelt bij overgevoeligheidsreacties type 1 (onmiddellijke allergie en anafylaxie). Deze komen vooral voor in weefsels die in contact staan met de buitenwereld.
<b>Myelodysplastisch syndroom</b>	Een groep van beenmergstoornissen waarbij de aanmaak van de bloedcellen ernstig verstoord is waardoor er misvormde en niet goed uitgegroeide cellen ontstaan.
<b>Myeloproliferative disorder</b>	Een groep van beenmergziekten waarbij er een te veel aan cellen wordt geproduceerd.
<b>Neoplasma</b>	Autonome groei van cellen of weefsels tot goed- of kwaadaardige cellen of gezwellen.
<b>Parenteraal</b>	Een toedieningsvorm van geneesmiddelen en voeding, maar niet via het maag-darmstelsel. Voorbeelden hiervan zijn via injectie, infuus...
<b>Serine protease</b>	Een enzym dat bepaalde peptidebindingen in eiwitten kan knippen.

## Inleiding

In het AZ Groeninge worden dagelijks een groot aantal stalen verwerkt. Momenteel worden er ook nog heel wat stalen verzonden naar andere labo's omdat een aantal testen nog niet kunnen of mogen uitgevoerd worden in het labo van AZ Groeninge. Eén van die testen is de bepaling van tryptase. De stalen voor deze test worden vandaag de dag opgestuurd naar het UZ Leuven. In de toekomst wil het AZ Groeninge deze test zelf uitvoeren aangezien het toestel, het Phadia 250-systeem, waarmee deze test kan uitgevoerd worden, reeds aanwezig is in het labo van het AZ Groeninge. Het Phadia 250-systeem wordt al gebruikt voor allergietesten en andere auto-immuniteitsparameters, maar deze is nog niet gevalideerd voor de bepaling van tryptase.

De bepaling van tryptase wordt gebruikt om een anafylactische reactie te bevestigen of om te helpen bij de diagnose van systemische mastocytose. Bij een anafylactische reactie zal de concentratie tryptase sterk stijgen omdat mastcellen geactiveerd worden. Deze activatie zorgt namelijk voor het vrijstellen van een aantal mediators waaronder tryptase. Bij mastocytose is er een proliferatie en accumulatie van mastcellen in één of meerdere weefsels waardoor er een verhoogde concentratie tryptase in het serum terug te vinden is.

Het doel van deze bachelorproef is het toestel, het Phadia 250-systeem, waarmee de concentratie tryptase bepaald kan worden te valideren voor de bepaling van tryptase in serum. Hiervoor moeten een aantal prestatiekenmerken van het toestel geëvalueerd worden. Het gaat om de volgende prestatiekenmerken:

- Precisie
- Herhaalbaarheid
- Meetonzekerheid
- Methodevergelijking
- Meetbereik

Naast deze prestatiekenmerken wordt ook de stabiliteit van tryptase in serum nagegaan om te weten te komen hoelang de stalen in de koelkast bewaard kunnen worden zonder dat daardoor de concentratie tryptase significant verandert.

Voor de validatie bestaat geen gouden standaardmethode, daarom worden stalen gebruikt waarvan de concentratie tryptase reeds bepaald werd in het UZ Leuven. De waarde die bepaald werd in Leuven wordt dus als de werkelijke waarde gezien. Er kan niet van uit gegaan worden dat daar zonder bias en imprecisie wordt gewerkt. Er is dus geen werkelijke targetwaarde.

Naargelang de resultaten van de validatie zal de test in de toekomst wel of niet kunnen uitgevoerd worden in het labo van het AZ Groeninge.

# 1 Tryptase in mastcellen

Tryptase is één van de meest voorkomende serine proteases in de granules van mastcellen. Het komt vrij uit de granules wanneer de mastcellen geactiveerd worden. Hierdoor kan er een anafylactische reactie ontstaan. (Michalska-Krzanowska, 2012)

## 1.1 Mastcellen

Mastcellen worden ook mastocyten genoemd. In het gevasculariseerd weefsel zijn deze cellen aanwezig, maar vooral in weefsels waarbij er contact is met de omgeving waaronder bijvoorbeeld de huid, de mucosa van de luchtpijp en de mucosa van het gastro-intestinaal stelsel. (Michalska-Krzanowska, 2012; Sheldon & Philips, 2015)

Mastcellen bestaan uit 2 grote groepen. Ten eerste is er de groep van mastcellen die tryptase bevatten. Deze mastcellen worden *mast cells containing tryptase* (MCT-cellen) genoemd. Deze bevinden zich in de alveolen van de longen en de mucosa van de darm. De tweede groep mastcellen bevatten naast tryptase ook nog chymase. Tryptase en chymase zijn beiden serine proteasen. Deze tweede groep mastcellen worden *mast cells containing tryptase and chymase* (MCTC-cellen) genoemd. Deze mastcellen bevinden zich in de huid, in de submucosa van de darm en rond de bloedvaten. (Michalska-Krzanowska, 2012)

De granules van mastcellen bevatten naast tryptase en chymase ook nog heel wat andere mediators zoals bijvoorbeeld histamine. Tijdens een allergische reactie komen deze mediators vrij door een activatie van de mastcel. Het vrijkomen van de mediators wordt ook wel degranulatie genoemd. (Michalska-Krzanowska, 2012)

Er bestaan twee mechanismes om een mastcel te activeren. Ten eerste kan dit immunoglobuline E (IgE)-gemedieerd zijn. Bij een eerste reactie met het allergeen worden door B-cellen IgE-antilichamen aangemaakt die een sterke affiniteit hebben voor mastcellen. Deze antilichamen gaan via IgE-receptoren binden aan de mastcellen. Bij een volgend contact met hetzelfde allergeen ontstaat er een *cross-linking* van de IgE-receptoren door de binding van het antigeen aan deze receptoren. Dit zorgt voor de activatie van de mastcel die uiteindelijk een allergische anafylactische reactie uitlokt. Een tweede manier om mastcellen te activeren is niet IgE-gemedieerd. De mastcellen worden rechtstreeks geactiveerd door niet-specifieke stimuli, zoals bijvoorbeeld hoge temperaturen en toxines zonder de tussenkomst van IgE. Deze stimuli veroorzaken een niet-allergische anafylactische reactie, vroeger ook wel een anafylactoïde reactie genoemd. Tegenwoordig wordt het begrip anafylaxie vaak gebruikt voor zowel allergische als niet-allergische anafylactische reacties. Het onderscheid wordt gemaakt indien via diagnostische tests de onderliggende oorzaak of het onderliggende mechanisme werd vastgesteld. ("Anaphylaxis," 2016; Sheldon & Philips, 2015)

De mediators die vrijkomen bij een activatie van de mastcellen zorgen voor een lokale of een systemische reactie. Deze reactie kan mild zijn, maar de vrijgekomen mediators kunnen ook een ernstige tot zelfs fatale reactie veroorzaken. (Sheldon & Philips, 2015)

## 1.2 Tryptase

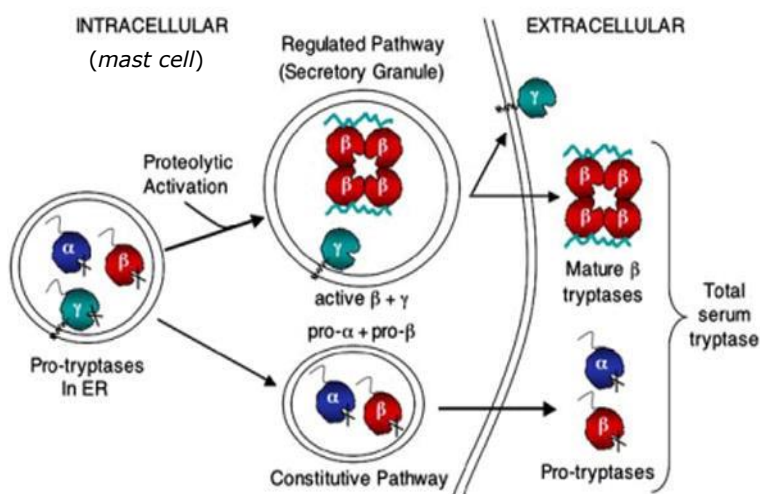
Tryptase is een serine protease dat sterk aanwezig is in de granules van mastcellen en in mindere mate in basofielen. Er bestaan verschillende types tryptasen namelijk  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - en  $\delta$ -tryptase. (Michalska-Krzanowska, 2012)  $\alpha$ - en  $\beta$ -tryptase zijn de twee meest voorkomende types in mastcellen die ook in het serum kunnen voorkomen. (Caughey, 2006)

In figuur 1.1 is de activatie en secretie van  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\gamma$ -tryptase te zien. Deze drie verschillende soorten tryptasen worden geproduceerd in de mastcellen als protryptasen in het endoplasmatisch reticulum (ER). Pro- $\gamma$ -tryptase is een proteïne dat zich in het membraan van de granules in de mastcellen bevindt. Dit soort tryptase wordt katalytisch actief door de verwijdering van het propeptide waardoor  $\gamma$ -tryptase ontstaat. Na een activatie van de mastcel zal het  $\gamma$ -tryptase door de degranulatie in het buitenste celmembraan terecht komen waar het ook blijft vastzitten. Het is een transmembraantryptase. (Caughey, 2006)

Door de aanwezigheid van een mutatie kan het propeptide van pro- $\alpha$ -tryptase niet verwijderd worden terwijl dit wel gebeurt bij pro- $\beta$ -tryptase. Pro- $\beta$ -tryptasen worden na de verwijdering van het propeptide actief door tetrameren te vormen die gestabiliseerd worden door heparine. De tetrameren worden vervolgens opgeslagen in de granules van de mastcel samen met vele andere mediators. Bij een activatie van de mastcel zullen deze mediators en de tetrameren, de zogenaamde mature  $\beta$ -tryptasen, vrijgesteld worden in het bloed. (Caughey, 2006)

Bij pro- $\alpha$ -tryptase kan het propeptide niet verwijderd worden waardoor deze direct gesecreteerd wordt uit de mastcel samen met het overgebleven pro- $\beta$ -tryptase. Het pro- $\alpha$ -tryptase wordt niet opgeslagen in de granules van de mastcel. In het serum kan dus altijd een kleine hoeveelheid pro- $\alpha$ - en pro- $\beta$ -tryptase gemeten worden zelfs al is er geen mastcelactivatie opgetreden. Dit wordt de baselineconcentratie van tryptase genoemd. (Caughey, 2006; "ImmunoCAP Tryptase," 2007)

Naast  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\gamma$ -tryptase bestaat er ook nog  $\delta$ -tryptase. In mastcellen is de expressie van  $\delta$ -mRNA en het bijhorende proteïne maar zeer miniem. Momenteel is er nog geen bewijs dat  $\delta$ -tryptase voorkomt in serum en of het een biologische rol heeft. (*Anaphylaxis and Hypersensitivity Reactions*, 2011; Caughey, 2006)



Figuur 1.1: De activatie en secretie van  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\gamma$ -tryptase (Caughey, 2006)



## 2 Baselineconcentratie tryptase

Mastcellen secreteren voortdurend pro- $\alpha$ -tryptase en een heel klein deel pro- $\beta$ -tryptase. Er kan dus altijd een kleine hoeveelheid tryptase gemeten worden in het serum. Dit wordt de baselineconcentratie van tryptase in het serum genoemd. Bij iedere persoon is deze baselineconcentratie anders want deze concentratie is afhankelijk van de hoeveelheid mastcellen aanwezig in het lichaam. Deze concentratie blijft ook stabiel gedurende een lange periode. Op basis van een steekproef met 124 vrijwillige, gezonde mensen blijkt dat het 95<sup>ste</sup> percentiel 11,0  $\mu\text{g/L}$  is. ("ImmunoCAP Tryptase," 2007; "ImmunoCAP Tryptase (manual)," 2015)

### 2.1 Verhoogde baselineconcentratie tryptase bij systemische mastocytose

De meeste laboratoria gebruiken 11,0  $\mu\text{g/L}$  als *cut-off* voor een normale waarde. Waarden die hoger zijn dan 11,0  $\mu\text{g/L}$  worden als abnormaal beschouwd. Een licht of sterk verhoogde baselineconcentratie tryptase verhoogt het risico op een ernstige allergische reactie of een anafylactische reactie. De verhoogde concentratie tryptase kan eventueel wijzen op een onderliggende systemische mastocytose. ("ImmunoCAP Tryptase," 2007)

Mastocytose is een ziekte waarbij er een abnormale groei en accumulatie is van mastcellen in de huid en/of interne organen. De symptomen ontstaan door het vrijkomen van de mastcelmediatoren en/of door de massale mastcelinfiltratie in weefsels en organen waardoor de functie van het orgaan belemmerd wordt. Het vrijkomen van de mastcelmediatoren zorgt voor mediator gerelateerde symptomen zoals bijvoorbeeld overgeven, diarree en hypotensie. Voorbeelden van symptomen ontstaan door de mastcelinfiltratie in weefsels zijn botbreuken en anemie. (Bonadonna, Lombardo, & Zanotti, 2014; "Mastocytosis: A disease of Mast Cells," sd)

Er bestaan verschillende vormen van mastocytose. Deze worden onderverdeeld in twee grote groepen, namelijk cutane mastocytose (CM) en systemische mastocytose (SM). ("European Mastocytosis Support Network," 2016)

#### 2.1.1 Cutane mastocytose

CM is een dermatologische ziekte. De toename van de mastcellen is enkel aanwezig in de huid. Deze vorm komt het meest voor bij kinderen en verdwijnt ook meestal tijdens de puberteit. Het is een goedaardige aandoening waarbij de baselineconcentratie tryptase in het serum binnen de normale range valt bij de meeste patiënten. In sommige gevallen kan CM ontwikkelen tot een SM. De toename van mastcellen in de huid veroorzaakt jeuk, zwellingen en verkleuringen van de huid. Om de diagnose te stellen van CM worden deze klinische symptomen bekeken en er wordt een biopsie genomen van de aangetaste huid. In die biopsie moet een duidelijke toename van mastcellen te zien zijn. ("European Mastocytosis Support Network," 2016; "Mastocytosis: A disease of Mast Cells," sd; "Tryptase as diagnostic tool in suspected mastocytosis," 2015)

Er bestaan drie verschillende types CM. Deze staan beschreven in tabel 2.1.

Tabel 2.1: De drie verschillende types cutane mastocytose ("European Mastocytosis Support Network," 2016)

<b>Maculopapulaire cutane mastocytose (MPCM) = urticaria pigmentosa (UP)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Meest voorkomend</li> <li>- Kleine roze/bruine vlekken of zwellingen</li> <li>- Meestal niet in het gezicht</li> </ul>
<b>Diffuse cutane mastocytose (DCM)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Erg zeldzame vorm</li> <li>- Aanwezig bij geboorte</li> <li>- Huid is verdikt</li> <li>- Vaak ontstaan van blaren</li> </ul>
<b>Mastocytoma</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zeldzame vorm</li> <li>- Bij kinderen</li> <li>- Verhoogde knobbels</li> </ul>

### 2.1.2 Systemische mastocytose

Bij een SM is er een mastcelproliferatie die wordt gevonden in minstens één orgaan, meestal het beenmerg. Deze vorm komt veel meer voor bij volwassenen. Het veroorzaakt heel wat uiteenlopende symptomen waaronder bijvoorbeeld botpijn, overgeven en cardiovasculaire symptomen. De baselineconcentratie tryptase is bij SM meestal hoger dan 20 µg/L. ("European Mastocytosis Support Network," 2016)

De zes verschillende types SM staan beschreven in tabel 2.2.

Tabel 2.2: De zes verschillende types systemische mastocytose ("European Mastocytosis Support Network," 2016)

<b>Indolente systemische mastocytose (ISM)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Meest voorkomende vorm</li> <li>- Indolent klinisch verloop</li> <li>- Verandert zelden in een ander type</li> <li>- Goede prognose</li> </ul>
<b>Systemic mastocytosis with associated clonal hematologic non-mast cell lineage disorder (SM-AHNMD)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bij patiënten met SM kunnen er hematologische ziekten ontstaan, meestal een myeloïd neoplasma</li> </ul>
<b>Agressieve systemische mastocytose (ASM)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Beschadiging van ten minste één orgaan</li> <li>- Agressief klinisch verloop</li> </ul>
<b>Mastcelleukemie (MCL)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zeer zeldzame hematologische ziekte waarbij mastcellen in het bloed gevonden worden</li> <li>- Geen huidaandoeningen</li> </ul>
<b>Mastcel sarcoma</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kwaadaardige mastceltumor</li> </ul>
<b>Extracutane mastocytoma</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Goedaardige mastceltumor</li> <li>- Niet in de huid</li> </ul>

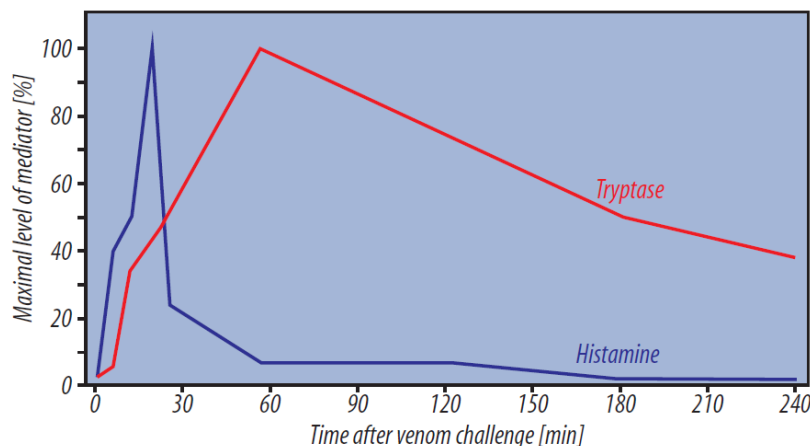
De diagnose van SM wordt gesteld aan de hand van verschillende diagnostische criteria. Er bestaan major en minor criteria. Deze zijn te zien in tabel 2.3. Om de diagnose te stellen moet minstens voldaan worden aan het major criterium én één minor criterium of aan drie minor criteria. Daarnaast bestaan er ook nog B- en C-*findings*. Dit zijn criteria die gebruikt worden om een onderscheid te kunnen maken tussen de verschillende soorten SM. De B-*findings* zijn bevindingen die wijzen op de betrokkenheid van verschillende myeloïde cellijnen in het ziekteproces of op een toename van mastcellen in bepaalde organen zonder de functie aan te tasten. Indien twee of drie B-*findings* aanwezig zijn, spreekt men van een *smoldering SM*. Dit is een SM die zich tussen ISM en ASM bevindt. De C-*findings* zijn criteria die geassocieerd worden met agressievere vormen van SM. Het zijn klinische verschijnselen die ontstaan wanneer het aantal mastcellen in een orgaan massaal stijgt zodat de functie van het orgaan belemmerd wordt. ("Mastocytosis: A disease of Mast Cells," sd; Naeim, 2013)

Tabel 2.3: Diagnostische criteria van de World Health Organization (WHO) voor systemische mastocytose (Bonadonna et al., 2014)

<i>A firm diagnosis of systemic mastocytosis is established when at least 1 major and 1 minor or at least 3 minor criteria are present</i>	
<b>Major</b>	<i>Multifocal dense infiltrates of MCs in bone marrow sections or other extracutaneous organs (&gt;15 MCs in aggregate).</i>
<b>Minor</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>a. MCs in bone marrow or other extracutaneous organs show an abnormal (spindle-shaped) morphology (&gt;25%).</i></li> <li><i>b. Mutation at codon 816 of the KIT gene in extracutaneous organs. In most cases the mutation is D816V.</i></li> <li><i>c. MCs in bone marrow express CD2 and/or CD25.</i></li> <li><i>d. Serum tryptase &gt;20 ng/mL (not in patients with AHNMD-type disease).</i></li> </ul>
<b>B-findings</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>a. Bone marrow biopsy showing &gt;30% infiltration by MCs (focal, dense aggregates) and/or serum tryptase level &gt;200 ng/mL.</i></li> <li><i>b. Signs of dysplasia or myeloproliferation in non-MC lineages, but insufficient criteria for definitive diagnosis of a hematopoietic neoplasm (AHNMD), with normal or slightly abnormal blood counts.</i></li> <li><i>c. Hepatomegaly without impairment of liver function, and/or palpable splenomegaly without hypersplenism, and/or lymphadenopathy on palpation or imaging.</i></li> </ul>
<b>C-findings</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>a. Bone marrow dysfunction manifesting as cytopenia (ANC &lt;1.0 x 10<sup>9</sup>/L, Hb &lt;10 g/dL, or platelets &lt;100 x 10<sup>9</sup>/L), but no obvious non-MC hematopoietic malignancy.</i></li> <li><i>b. Palpable hepatomegaly with impairment of liver function, ascites, and/or portal hypertension.</i></li> <li><i>c. Skeletal involvement with large osteolytic lesions and/or pathological fractures.</i></li> <li><i>d. Palpable splenomegaly with hypersplenism.</i></li> <li><i>e. Malabsorption with weight loss due to gastrointestinal mast cell infiltrates.</i></li> </ul>

## 2.2 Concentratieverloop van tryptase bij een mastcelactivatie

Bij een mastcelactivatie komen heel wat mediators vrij waaronder histamine en tryptase die een ernstige anafylactische reactie veroorzaken. Figuur 2.1 toont het verloop van het tryptase- en het histaminelevel in het serum na zo'n activatie. Bij zo'n mastcelactivatie komt een grote hoeveelheid histamine en matuur  $\beta$ -tryptase vrij uit de mastcellen. De concentratie histamine in het bloed stijgt en daalt veel sneller in vergelijking met de concentratie tryptase. Histamine blijft niet lang aanwezig in het bloed omdat de halfwaardetijd van histamine slecht twee tot drie minuten is. De halfwaardetijd van tryptase is ongeveer twee uur waardoor het langer detecteerbaar is in serum na de mastcelactivatie. Daarom is het aangeraden om de concentratie tryptase te analyseren om na te gaan of er een mastcelactivatie heeft plaatsgevonden. De verhoogde tryptaseconcentratie in het serum bij een mastcelactivatie moet van voorbijgaande aard zijn. ("ImmunoCAP Tryptase," 2007)



Figuur 2.1: Verloop van de concentratie histamine en tryptase na een mastcelactivatie ("ImmunoCAP Tryptase," 2007)

Om een mastcelactivatie te bevestigen worden best drie opeenvolgende bloedstalen verzameld. Het eerste staal moet afgenomen worden tussen vijftien minuten en drie uur na het begin van de anafylactische reactie. Dit omdat de piek van tryptase bereikt wordt tussen 15 en 120 minuten. Een tweede staal kan afgenomen worden tussen de drie en de zes uur na het begin van de reactie. Hiermee kan nagegaan worden of de concentratie tryptase wel degelijk daalt. Uiteindelijk kan nog een laatste bloedstaal afgenomen worden na ongeveer 24 uur. Dit staal dient om na te gaan of de concentratie tryptase terug gedaald is naar de baselineconcentratie. In de realiteit wordt meestal maar één staal afgenomen tussen de vijftien minuten en drie uur nadat de anafylactische reactie is begonnen. In het serum van dat staal moet de tryptaseconcentratie dan sterk verhoogd zijn om een anafylactische reactie te diagnosticeren. ("ImmunoCAP Tryptase," 2007; "Tryptase as a clinical marker, an aid in explaining severe reactions," 2015)

Vorbijgaande sterk verhoogde tryptaselevels worden meestal gemeten na een anafylactische reactie. Ook bij minder ernstige allergische reacties kan de concentratie tryptase in het bloed licht verhoogd zijn voor een bepaalde tijd. ("ImmunoCAP Tryptase," 2007)

Het bepalen van de tryptaseconcentratie van *post mortem*-stalen kan zelfs helpen bij de diagnose van een anafylactische shock als doodsoorzaak. (Sheldon & Philips, 2015)

## 3 Klinische waarde van tryptase

Tryptase kan voor verschillende doeleinden bepaald worden. Ten eerste kan tryptase gebruikt worden als risicomarker voor anafylactische reacties of om een anafylactische reactie te bevestigen. Daarnaast bestaat er ook een ziekte, mastocytose genaamd, waarbij de patiënten te veel mastcellen in hun lichaam hebben waardoor dit een effect heeft op de concentratie tryptase. Tryptase kan ook een diagnostische en/of prognostische betekenis hebben bij een aantal hematologische maligniteiten. ("ImmunoCAP Tryptase," 2007)

### 3.1 Risicomarker voor ernstige anafylactische reacties

Sommige mensen met een verhoogde baselineconcentratie tryptase in het bloed hebben een groter risico op ernstige anafylactische reacties. Indien een patiënt vaak last heeft van anafylactische reacties kan dus nagegaan worden of de baselineconcentratie tryptase verhoogd is wat het aantal ernstige anafylactische reacties zou verklaren. ("ImmunoCAP Tryptase," 2007; "ImmunoCAP Tryptase," 2012)

### 3.2 Klinische merker bij anafylactische reacties

De concentratie tryptase kan gebruikt worden om een anafylactische reactie te bevestigen. Een anafylactische reactie wordt veroorzaakt door een mastcelactivatie. Hierbij moet de concentratie tryptase eerst sterk verhogen en na ongeveer 24 tot 48 uur moet die terug gedaald zijn naar de baselineconcentratie. ("ImmunoCAP Tryptase," 2007; "Tryptase as a clinical marker, an aid in explaining severe reactions," 2015)

Na de bevestiging van een mastcelactivatie kan vervolgens gezocht worden naar specifieke IgE-antilichamen waarmee kan nagegaan worden waartegen de patiënt precies allergisch is. Deze test kan met hetzelfde toestel uitgevoerd worden, namelijk een Phadiatoestel. ("ImmunoCAP Tryptase," 2007)

Een allergische reactie waarbij de tryptaseconcentratie stijgt in het bloed kan bijvoorbeeld veroorzaakt worden door insectengif en agentia die gebruikt worden tijdens operaties. ("ImmunoCAP Tryptase," 2007; Wongkaewpothong et al., 2014)

Bij een voedsel-geassocieerde anafylaxie blijft de tryptaseconcentratie meestal normaal. Aangezien de mastcelactivatie bij zo'n voedsel-geassocieerde anafylaxie zo goed als beperkt is tot de mastcellen in de darm is er maar weinig *release* van tryptase in het volledige lichaam. (Caughey, 2006)

#### 3.2.1 Anafylactische reactie na een insectenbeet

De vliesvleugeligen (*Hymenoptera*) zijn insecten die een ernstige anafylactische reactie kunnen veroorzaken. Tot deze groep van insecten behoren de bijen, wespen en mieren. Bij een ernstige reactie na een beet van één van deze insecten kan de voorbijgaande verhoging van de concentratie tryptase opgevolgd worden om de activatie van mastcellen te bevestigen. ("ImmunoCAP Tryptase," 2007; "ImmunoCAP Tryptase," 2012)

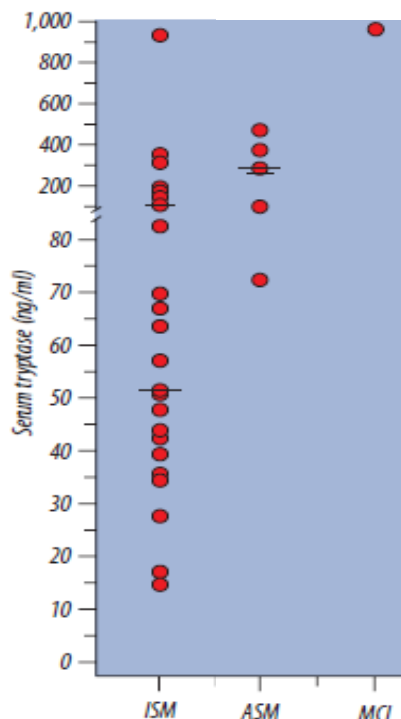
### 3.2.2 Anafylactische reactie gedurende anesthesie en operaties

Gedurende de anesthesie en de operatie worden de patiënten blootgesteld aan heel wat agentia die een anafylactische reactie kunnen veroorzaken zoals bijvoorbeeld antibiotica en latex. ("ImmunoCAP Tryptase," 2007)

Hierbij geldt ongeveer hetzelfde principe als bij een ernstige reactie op een insectenbeet. Bij het voorkomen van een anafylactische reactie gedurende een operatie kan bevestigd worden of het om een mastcelactivatie gaat door de concentratie tryptase op te volgen. Dit is van belang, zeker indien het gaat om een anafylactische reactie gedurende anesthesie, want dan zijn de symptomen en signalen van een anafylactische reactie meestal niet duidelijk door de anesthesie. ("Tryptase as a clinical marker to help understand severe reactions during surgery," 2015)

### 3.3 Mastocytose

Indien een SM vermoed wordt, kan de concentratie tryptase bepaald worden als een minor criterium voor de diagnose van SM. De concentratie tryptase is meestal groter dan 20 µg/L, maar die concentratie is niet hetzelfde bij de verschillende types SM. In figuur 3.1 is te zien welke concentraties tryptase er voorkomen bij drie subtypes van SM. ("ImmunoCAP Tryptase," 2007)



#### Legende:

<b>ISM</b>	Indolente systemische mastocytose
<b>ASM</b>	Agressieve systemische mastocytose
<b>MCL</b>	Mastcelleukemie

Figuur 3.1: Concentratie tryptase bij drie verschillende subtypes van SM ("ImmunoCAP Tryptase," 2007)

Aangezien de concentratie tryptase verhoogd is bij een SM, hebben personen met SM een aanzienlijke kans op anafylactische reacties op insectenbeten en geneesmiddelen. ("ImmunoCAP Tryptase," 2007)

### 3.4 Hematologische neoplasma's

Er bestaan hematologische abnormaliteiten en maligniteiten waarbij de concentratie tryptase in het bloed bij een groot deel van de patiënten verhoogd is. Bij deze hematologische abnormaliteiten en maligniteiten gaat het meestal om een ongecontroleerde groei van immature myeloïde cellen. Deze ongecontroleerde groei ontstaat door mutaties of chromosomale defecten. Tryptase kan een diagnostische en/of prognostische betekenis hebben bij een aantal hematologische abnormaliteiten en maligniteiten. Een verhoogde concentratie tryptase kan een indicator zijn voor een myeloïd neoplasma. Bij een lymfoïd neoplasma is de concentratie tryptase meestal normaal. In tabel 3.1 is te zien hoeveel procent van de patiënten met een bepaalde hematologische maligniteit een verhoogde concentratie tryptase vertonen in hun bloed. ("ImmunoCAP Tryptase," 2007; Sperr & Valent, sd)

Tabel 3.1: Aantal patiënten (%) met een hematologische maligniteit én een verhoogde concentratie tryptase ("ImmunoCAP Tryptase," 2007)

Hematologische maligniteit	Patiënten (%) met een verhoogde concentratie tryptase
Acute myeloïde leukemie (AML)	30-40
Chronische myeloïde leukemie (CML)	40-50
Myeloproliferatieve disorder (MPD) zonder CML	5-40
Myelodysplastisch syndroom (MDS)	20-30
Chronische myelomonocyttaire leukemie (CMML)	40-60

## 4 Phadiatoestellen

Er bestaan verschillende types Phadiatoestellen, zo is er het Phadia 100-, 250-, 1000-, 2500- en 5000-systeem. De toestellen maken allemaal gebruik van hetzelfde principe voor de testen, maar de capaciteit is telkens anders. In tabel 4.1 is te zien hoeveel resultaten ieder toestel per week kan afleveren. Afhankelijk van het aantal stalen dat per week verwerkt moet worden, kan voor een bepaald toestel gekozen worden. ("Ontwikkeld voor middelgrote laboratoria," 2012)

Tabel 4.1: Het aantal resultaten dat de verschillende Phadiatoestellen kunnen afleveren per week

Toestel	Aantal resultaten per week	Referentie
Phadia 100	50 - 400	("Phadia 100," s.d.)
Phadia 250	400 - 2000	("Phadia 250," s.d.)
Phadia 1000	2000 - 10000	("Phadia 1000," s.d.)
Phadia 2500	10000 - 25000	("Phadia 2500," s.d.)
Phadia 5000	25000 - 45000	("Phadia 5000," s.d.)

Er is niet alleen een verschil in capaciteit maar ook in welke testen een bepaald Phadiatoestel kan uitvoeren. Er kunnen heel wat verschillende testen uitgevoerd worden op een Phadiatoestel, maar niet alle testen kunnen op alle types toestellen uitgevoerd worden. Hier wordt later in deze bachelorproef nog dieper op ingegaan. ("ImmunoCAP Allergy & Asthma Assays," 2012)

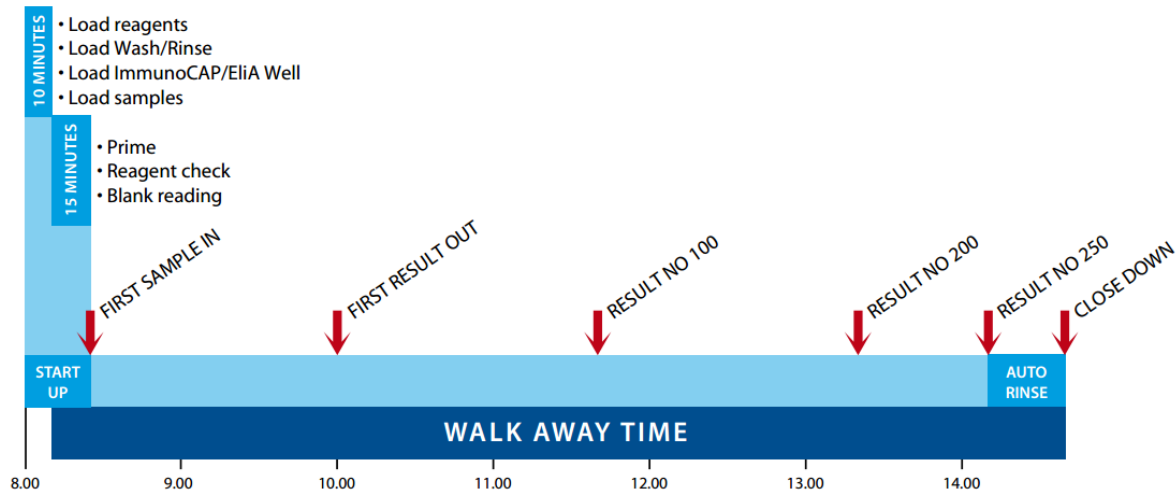
In het AZ Groeninge wordt een Phadia 250-systeem gebruikt. Deze is te zien in figuur 4.1.



Figuur 4.1: Een Phadia 250-toestel ("Phadia 250," 2016)



Bij een Phadia 250-systeem duurt het ongeveer 10 minuten om alle nodige reagentia en de stalen op het toestel te plaatsen. Daarna wordt de *assay* gestart door aan te duiden op het scherm welke testen uitgevoerd moeten worden, want er kunnen heel wat verschillende testen uitgevoerd worden door het toestel. Het toestel heeft ongeveer 15 minuten nodig om te *primen*, de reagentia te controleren en een blanco te bepalen. Daarna gaat het toestel eerst de Curve Control of de kalibratoren bepalen. Iedere test heeft zijn eigen *Curve Control* en kalibratorstrip. De *Curve Control* en de bepaling van de kalibratoren gebeurt nooit samen op één dag. Om de 28 dagen wordt een kalibratie uitgevoerd waarbij de kalibratoren bepaald worden. Met de waarden van de kalibratoren wordt dan een kalibratiecurve opgesteld die 28 dagen lang gebruikt wordt. Op de andere dagen wordt met de *Curve Control* nagegaan of het toestel nog juist meet met de gearhiveerde kalibratiecurve. Het hangt dus af van wat het toestel moet doen of de *Curve Control* of een kalibratorstrip op het toestel geplaatst moet worden. Vervolgens gaat het toestel verder met het bepalen van de controle(s). Deze controles worden op dezelfde manier op het toestel geplaatst als stalen. Iedere test die uitgevoerd kan worden op het toestel heeft zijn eigen specifieke controle of controles. Uiteindelijk gaat het toestel verder met het bepalen van de concentratie van de stalen. Terwijl het toestel bezig is met de concentratiebepaling van de stalen, kunnen steeds stalen bijgeplaatst worden op het toestel. De eerste resultaten worden verkregen ongeveer 100 minuten nadat het toestel gestart is met de meting van de stalen. Het toestel verwerkt ongeveer 60 testen per uur. Aan het toestel kan ook doorgegeven worden dat het automatisch mag afsluiten als alle stalen geanalyseerd zijn. Het toestel voert dan een *rinse* uit om te spoelen. Na het afsluiten kan alle reagentia van het toestel gehaald worden. Het procesverloop is te zien in figuur 4.2. ("Ontwikkeld voor middelgrote laboratoria," 2012)



Figuur 4.2: Het procesverloop van een Phadia 250-toestel ("Ontwikkeld voor middelgrote laboratoria," 2012)

## 4.1 Testen die op een Phadiatoestel uitgevoerd kunnen worden

Op de Phadiatoestellen kunnen een groot aantal verschillende testen uitgevoerd worden. Het AZ Groeninge voert momenteel al heel wat van die testen uit op het Phadia 250-toestel. ("ImmunoCAP Allergy & Asthma Assays," 2012)

Er zijn twee grote groepen analyses die op de Phadiatoestellen uitgevoerd kunnen worden. Ten eerste zijn er astma- en allergietesten, de zogenaamde immunoCAP-testen, waarbij gezocht wordt naar specifieke antilichamen of stoffen die te maken hebben met allergieën en astma. En ten tweede zijn er auto-immuuntesten, de zogenaamde EliA-testen, waarbij specifieke auto-antistoffen bepaald worden. Beide soort testen zijn *fluorescence enzyme immunoassays* (FEIA) waarbij op het einde de fluorescentie gemeten wordt. Met de gemeten fluorescentie wordt door de *IDM-software* de concentratie van de te bepalen stof berekend aan de hand van de kalibratiecurve. ("ImmunoCAP Allergy & Asthma Assays," 2012)

Niet alle testen kunnen op ieder Phadiatoestel uitgevoerd worden. Tabel 4.2 toont welke testen op welk Phadiatoestel uitgevoerd kunnen worden. Zo is bijvoorbeeld te zien dat de bepaling van tryptase enkel kan gebeuren op een Phadia 100-, 250- en 1000-toestel. ("ImmunoCAP Allergy & Asthma Assays," 2012)

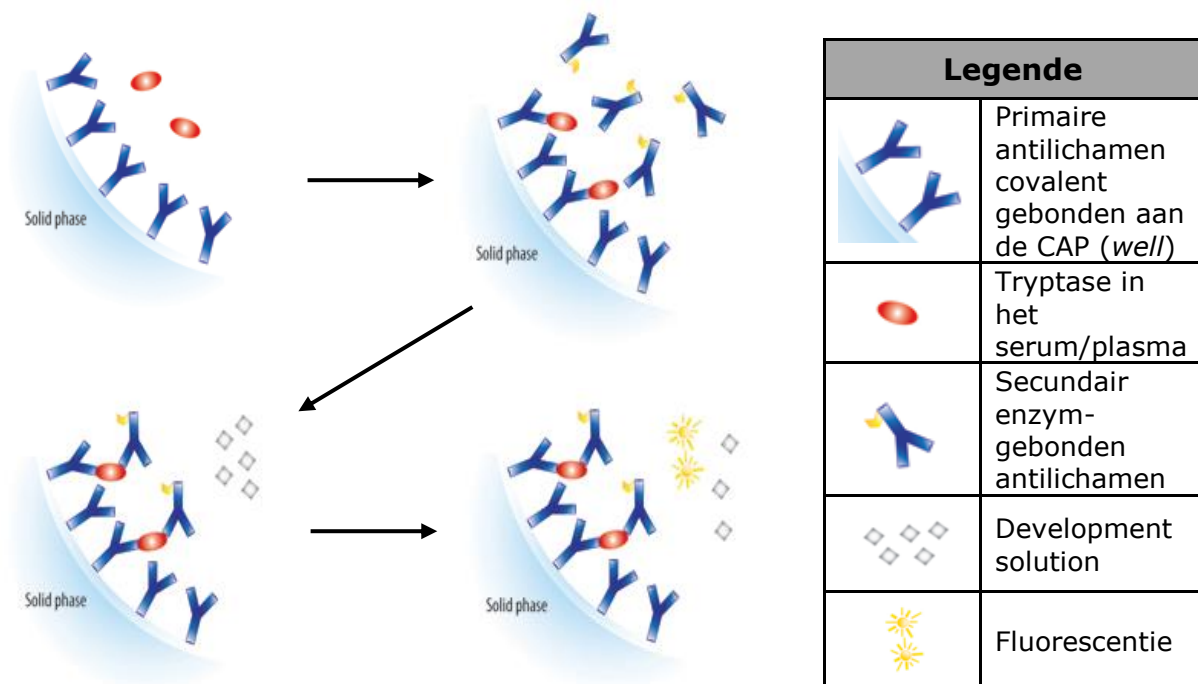
Tabel 4.2: Overzicht van welke testen op welke Phadia-toestellen uitgevoerd kunnen worden ("ImmunoCAP Allergy & Asthma Assays," 2012)

	Phadia				
	100	250	1000	2500	5000
<b>Astma- en allergietesten</b>					
<i>ImmunoCAP Total IgE</i>	X	X	X	X	X
<i>ImmunoCAP Total IgE Low Range</i>	X	X	X	X	X
<i>ImmunoCAP Specific IgE</i>	X	X	X	X	X
<i>ImmunoCAP Phadiatop/Phadiatop Infant</i>	X	X	X	X	X
<i>ImmunoCAP Specific IgA</i>	X				
<i>ImmunoCAP Specific IgG/IgG4</i>	X	X	X		
<i>ImmunoCAP ECP</i>	X	X	X		
<i>ImmunoCAP Tryptase</i>	X	X	X		
<b>Auto-immuuntesten</b>					
<i>EliA ANA for connective tissue diseases</i>	X	X		X	X
<i>EliA ANCA/GBM for vasculitis</i>	X	X		X	X
<i>EliA CCP/RF for rheumatoid arthritis</i>	X	X		X	X
<i>EliA Celiac for celiac disease</i>	X	X		X	X
<i>EliA APS for antiphospholipid syndrome</i>	X	X		X	X

## 4.2 Principe om de concentratie tryptase te bepalen

Het principe voor de bepaling van tryptase is een *fluorescence enzyme immunoassay* (FEIA). Een kleine *well*, een CAP genoemd, is gecoat met een muisantilichaam tegen tryptase. 40  $\mu\text{L}$  van het serum of plasma wordt in het welletje gebracht. Dit geheel wordt vervolgens geïncubeerd gedurende een bepaalde periode. Indien tryptase, zowel pro- $\alpha$ -tryptase als niet-matuur (pro- $\beta$ -tryptase) en matuur  $\beta$ -tryptase, aanwezig is in het serum of het plasma zal dit gaan binden aan de gecoate muisantilichamen. Er volgt een wasstap. Daarna wordt 50  $\mu\text{L}$  conjugaat, dat enzym-gelabelde muisantilichamen gericht tegen tryptase bevat, toegevoegd. Opnieuw volgt een incubatieperiode waarbij de enzym-gelabelde antilichamen gaan binden aan het antilichaam-tryptase-complex. Een nieuwe wasstap wordt uitgevoerd. 50  $\mu\text{L}$  *Development Solution* wordt toegevoegd. In die *Development Solution* zit een substraat dat door het enzym omgezet wordt in een fluorescent product. Na een incubatieperiode wordt de reactie stopgezet met 600  $\mu\text{L}$  *Stop Solution* en de gevormde fluorescentie wordt gemeten. De *IDM-software* zet de gemeten fluorescentie om in een concentratie met behulp van de kalibratiecurve. Alle incubatiestappen gebeuren bij 37°C in het toestel zelf. Met dit principe wordt de totale concentratie tryptase bepaald, niet specifiek een bepaald soort tryptase. ("ImmunoCAP Tryptase (manual)," 2015; "Test Principle ImmunoCAP Tryptase," 2012)

Dit principe is geïllustreerd in figuur 4.3.



Figuur 4.3: Principe van de Phadiatoestellen voor de bepaling van tryptase ("Test Principle ImmunoCAP Tryptase," 2012)

### 4.3 Soorten stalen die gebruikt kunnen worden voor de bepaling van tryptase

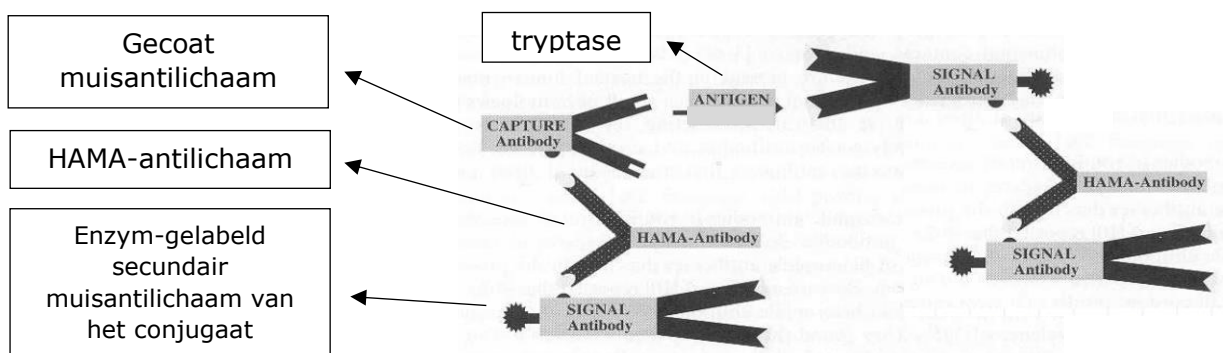
Serum- en plasmastalen kunnen geanalyseerd worden op een Phadia 250-toestel voor de bepaling van tryptase. Meestal wordt serum of plasma genomen van veneus bloed. Het plasma kan verkregen worden in een ethyleendiaminotetra-azijnzuur(EDTA)-tube of een heparinetube. Plasmastalen geven vergelijkbare resultaten als serumstalen. In het AZ Groeninge en het UZ Leuven worden serumstalen gebruikt voor de bepaling van tryptase. ("ImmunoCAP Tryptase (manual)," 2015)

De stalen mogen volgens de *manual* maximaal 5 dagen bewaard worden in de koelkast. Indien het langer zou duren vooraleer de concentratie tryptase bepaald wordt, worden de stalen het best bewaard in de diepvries bij  $-20^{\circ}\text{C}$ . Het herhaaldelijk invriezen en ontdooien moet wel vermeden worden. De stalen kunnen ook twee dagen op kamertemperatuur gehouden worden voor het geval de stalen verzonden moeten worden. ("ImmunoCAP Tryptase (manual)," 2015)

In de *manual* van de tryptasekit staat dat het toestel een meetbereik heeft van 1 tot 200  $\mu\text{g/L}$  tryptase. Indien een staal dus een zeer hoge tryptaseconcentratie heeft, gelegen boven 200  $\mu\text{g/L}$ , zal het staal verdund moeten worden met *ImmunoCAP IgE/ECP/Tryptase Sample Diluent*. ("ImmunoCAP Tryptase (manual)," 2015)

### 4.4 Interferenties van de tryptasetest

Humane anti-muis antistoffen (HAMA) kunnen aanleiding geven tot interferenties bij de bepaling van tryptase met een Phadiatoestel. Als deze aanwezig zijn in het serum of plasma van de patiënt kunnen deze reageren met de muis-immunoglobulinen die gebonden zijn aan de *well* of de enzym-gelabelde secundaire muisantilichamen in het conjugaat. Zo kunnen er dus foutieve resultaten ontstaan, namelijk foutieve hoge waarden. In figuur 4.4 is te zien hoe HAMA-antilichamen interfereert met de muisantilichamen die gebonden zijn aan de *well* en deze die aanwezig zijn in het conjugaat. De aanwezigheid van dit soort antistoffen komt zeer weinig voor en de samenstelling van het conjugaat is zodanig ontwikkeld dat deze soort storing zo klein mogelijk is. HAMA-antistoffen worden vooral gevonden bij patiënten die preparaten met monoklonale muisantistoffen toegediend krijgen voor diagnostisch en therapeutisch gebruik en bij mensen die met muizen werken. ("ImmunoCAP Tryptase (manual)," 2015)



Figuur 4.4: De interferentie van HAMA-antilichamen met de muisantilichamen die gebonden zijn aan de *well* en deze die aanwezig zijn in het conjugaat ("Scholing endocrinologie blok 1 (ppt)," sd)

## 5 Materialen en methoden

### 5.1 Stalen

De serumstalen waarvan de concentratie tryptase bepaald moet worden, worden tot nu toe nog steeds opgestuurd naar het UZ Leuven. Daar wordt de concentratie tryptase bepaald met een Phadia 1000-systeem. In het AZ Groeninge zou de concentratie tryptase bepaald worden met een Phadia 250-systeem. Beide toestellen zijn van dezelfde firma en gebruiken hetzelfde principe om de concentratie tryptase te bepalen. Er wordt verwacht dat er een goede correlatie is tussen de resultaten van het UZ Leuven en de resultaten van het AZ Groeninge.

Voor de validatie van een Phadia 250-systeem voor de bepaling van de concentratie tryptase in serum bestaat er geen gouden standaardmethode. Daarom worden ingevroren gearhiveerde stalen die afgenomen werden tussen eind september 2015 en begin februari 2016 in het AZ Groeninge voor de bepaling van tryptase, gebruikt. De concentratie tryptase van deze stalen werd al eens bepaald in het UZ Leuven aangezien stalen voor de bepaling van tryptase naar daar worden opgestuurd. Zo kunnen de waarden die bepaald werden in het UZ Leuven gebruikt worden als referentiewaarden bij het evalueren van bepaalde prestatiekenmerken.

Voor de bepaling van de stabiliteit van tryptase worden vijf willekeurige verse serumstalen gebruikt.

### 5.2 Materialen

- Vortex
- Micropipetten met bijhorende tips
- Pasteurspipetten
- *Nesting sample cups*

### 5.3 Reagentia

- ImmunoCAP Tryptase Conjugaat
- ImmunoCAP Tryptase *Calibrator Strip*
- ImmunoCAP Tryptase *Curve Control Strip*
- ImmunoCAP Tryptase *Anti-Tryptase* = carrier met 16 CAP's
- *Development Solution*
- *Stop Solution*
- *Washing solution*
- ImmunoCAP *Tryptase Control*

### 5.4 Toestel en software

- Toestel: Phadia 250 van *Thermo Fisher Scientific*
- Software: *Phadia Information Data Manager (IDM)*-software

## 5.5 Methoden

Voor de validatie van het Phadia 250-toestel moeten een aantal prestatiekenmerken geëvalueerd worden, waaronder de reproduceerbaarheid, de herhaalbaarheid, de juistheid, de meetonzekerheid, een methodevergelijking met de methode van het UZ Leuven en het meetbereik. Daarnaast wordt ook de stabiliteit van tryptase bepaald. Hieronder wordt beschreven hoe de prestatiekenmerken geëvalueerd worden. Een protocol om met een Phadia 250-systeem te werken voor de bepaling van tryptase in serum is terug te vinden in bijlage 1. De concentratie tryptase wordt telkens met het Phadia 250-toestel van het AZ Groeninge bepaald.

### 5.5.1 Precisie

Ten eerste moet de precisie geëvalueerd worden. De precisie bepaalt hoe sterk de meetresultaten verspreid liggen rondom het gemiddelde van deze meetresultaten die verkregen worden door een bepaalde analyse een aantal maal te herhalen op hetzelfde monster. Afhankelijk van de omstandigheden waaronder de herhaalde analyses uitgevoerd worden, kan men de precisie onderverdelen in twee kenmerken, namelijk de herhaalbaarheid (de *within-run* precisie) en de (*between-day*) reproduceerbaarheid. (Klaessens, 2013)

De herhaalbaarheid is de precisie van herhaalde metingen onder zo identiek mogelijke omstandigheden (Klaessens, 2013). Zo wordt de concentratie tryptase van twee verschillende stalen, één met een hoge concentratie tryptase en één met een lage concentratie tryptase, tien maal na elkaar bepaald in dezelfde *run*. Het probleem dat via de *IDM-software* niet tien maal dezelfde test aangevraagd kan worden op éénzelfde staal stelt zich. Hiervoor moet bijgevolg een oplossing gezocht worden. Ieder staal wordt verdeeld in tien *nesting sample cups*. Er wordt voor gezorgd dat er minstens 100 µl serum in ieder *nesting sample cup* zit, want het toestel verbruikt voor de test 40 µl serum en er is een dood volume van 50 µl in een *nesting sample cup*. De gevulde *nesting sample cups* worden in proefbuizen in een rekje van het Phadia 250-toestel geplaatst. Via de *IDM-software* wordt dan op ieder *nesting sample cup* de tryptasetest aangevraagd. Vervolgens wordt het rek met de tien proefbuizen waarin de gevulde *nesting sample cups* zitten op het toestel geplaatst en zo wordt de concentratie van éénzelfde staal 10 maal bepaald in éénzelfde run.

De reproduceerbaarheid is de precisie van herhaalde metingen onder variabele omstandigheden (Klaessens, 2013). Hier wordt de *between-day* reproduceerbaarheid bepaald. Zo wordt de concentratie tryptase van de *Tryptase Control* en de *Curve Control* op tien verschillende dagen bepaald. Voor de bepaling van de reproduceerbaarheid worden geen serumstalen gebruikt omdat de stabiliteit van tryptase achteruit kan gaan door de serumstalen vele malen te ontdooien en omdat de werkelijke concentratie van de controles gekend is voor de bepaling van de juistheid.

De standaarddeviatie en de variatiecoëfficiënt worden dan berekend aan de hand van de bekomen meetresultaten. De precisie wordt namelijk weergegeven met de standaarddeviatie of de variatiecoëfficiënt die beiden een maat zijn voor de imprecisie of anders gezegd de toevallige fout. (Callewaert, 2014)

In tabel 5.1 zijn de formules te vinden voor de berekening van de standaarddeviatie en de variatiecoëfficiënt.

Tabel 5.1: Formules voor het berekenen van de standaarddeviatie  $s$  en de variatiecoëfficiënt  $CV$  (Klaessens, 2013)

	formule	parameters	Nummer
<b>Standaarddeviatie <math>s</math></b>	$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$	$s$ = standaarddeviatie (eenheid van het analyseresultaat) $n$ = aantal analyseresultaten $x_i$ = $i$ -de analyseresultaat $\bar{x}$ = gemiddelde van $n$ analyseresultaten	(1)
<b>Variatiecoëfficiënt <math>CV</math></b>	$CV = \frac{s \cdot 100\%}{\bar{x}}$	$VC$ = variatiecoëfficiënt (%) $s$ = standaarddeviatie $\bar{x}$ = gemiddelde van alle analyseresultaten	(2)

### 5.5.2 Juistheid

Ten tweede moet de juistheid geëvalueerd worden. De juistheid bepaalt hoe sterk het gemiddelde van een reeks meetresultaten overeenstemt met de werkelijke waarde van de te analyseren stof (Klaessens, 2013). Voor het evalueren van de juistheid is het normaal de bedoeling om referentiemateriaal te gebruiken (Klaessens, 2013), maar bij gebrek aan zo'n referentiemateriaal worden de *Tryptase Control* en de *Curve Control* gebruikt. De herhaling van de meting moet gebeuren onder reproduceerbaarheidsomstandigheden (Klaessens, 2013), daarom worden de resultaten gebruikt van de bepaling voor de *between-day* reproduceerbaarheid.

De juistheid wordt weergegeven met de *bias* die ook kan gezien worden als de systematische fout. De *bias* kan absoluut of relatief weergegeven worden. (Callewaert, 2014)

In tabel 5.2 staan de formules voor de berekening van de absolute en relatieve *bias*.

Tabel 5.2: Formules voor het berekenen van de absolute en de relatieve *bias* (Klaessens, 2013)

	formule	parameters	Nummer
<b>Absolute bias <math>B_{abs}</math></b>	$B_{abs} = \bar{x} - C_{ref}$	$B_{abs}$ = absolute bias (eenheid van de analyse-resultaten) $\bar{x}$ = gemiddelde van alle analyseresultaten $C_{ref}$ = targetconcentratie van het referentiemateriaal	(3)
<b>Relatieve bias <math>B_{rel}</math></b>	$B_{rel} = \frac{\bar{x} - C_{ref}}{C_{ref}} \cdot 100\%$	$B_{rel}$ = relatieve bias (%) $\bar{x}$ = gemiddelde van alle analyseresultaten $C_{ref}$ = targetconcentratie van het referentiemateriaal	(4)

### 5.5.3 Meetonzekerheid

Naast de precisie en de juistheid moet ook de meetonzekerheid bepaald worden. Meerdere metingen van eenzelfde staal geven nooit exact hetzelfde resultaat. De meetwaarden zullen verspreid liggen rondom de werkelijke waarde. De meetonzekerheid geeft de spreiding van deze meetwaarden weer ten opzichte van de werkelijke waarde. (van der Kuil, 2015; Callewaert, 2014)

De maat voor de meetonzekerheid is de totale fout (*total error*; TE). Deze kan bepaald worden aan de hand van de systematische fout (*bias*) en de toevallige fout (variatiecoëfficiënt) van de *Curve Control* en de *Tryptase Control*. De formule is te zien in tabel 5.3. (Westgard & Westgard, 2016; Callewaert, 2014)

Tabel 5.3: Formule voor het berekenen van de totale fout (Westgard & Westgard, 2016)

	formule	parameters	nummer
<b>Totale fout TE</b>	$TE =  B_{rel}  + 1,65 \cdot CV$	$TE$ = totale fout (%) $B_{rel}$ = relatieve bias (%) $CV$ = variatiecoëfficiënt (%)	(5)

Formule (5) is gebaseerd op de formule van Carmen Ricos. Door het gebruik van factor 1,65 wordt een 95%-betrouwbaarheidsinterval bekomen. (Westgard & Westgard, 2016)

### 5.5.4 Methodevergelijking

Er wordt eveneens een methodevergelijking uitgevoerd. Hierbij wordt nagegaan of het toestel in het AZ Groeninge (een Phadia 250-systeem) gelijke resultaten geeft als het toestel in het UZ Leuven (een Phadia 1000-systeem) (Callewaert, 2014). De concentratie tryptase van de 33 ingevroren gearchiveerde stalen werd al eens bepaald in het UZ Leuven. Nu wordt de concentratie tryptase bepaald in het AZ Groeninge om de resultaten te kunnen vergelijken. De bepaling van de concentratie tryptase van de 33 aanwezige stalen gebeurt op verschillende dagen, dus onder reproduceerbaarheidsomstandigheden.

Eerst wordt met behulp van een *D'Agostino-Pearson test* via het computerprogramma *MedCalc* nagegaan of de populatie normaal verdeeld is. Daarna wordt aan de hand van de meetresultaten bepaald of er statistisch, analytisch en klinisch gezien een significant verschil is tussen de resultaten van het UZ Leuven en het AZ Groeninge.

Voor de statistische evaluatie wordt een *Wilcoxon test* uitgevoerd via het computerprogramma *Medcalc* aangezien de populatie niet normaal verdeeld blijkt te zijn.

Ook voor de analytische evaluatie wordt *MedCalc* gebruikt. Er wordt een *Passing-Bablok* regressieanalyse uitgevoerd op voorwaarde dat beide methodes voldoende gecorreleerd zijn volgens de *Spearman* correlatiecoëfficiënt.

Om na te gaan of er een klinisch significant verschil is tussen beide methodes wordt een *absolute difference plot* opgesteld. Daarna wordt er gekeken hoeveel datapunten buiten de zelfbepaalde grenzen liggen. Er mag een bepaald aantal datapunten buiten de grenzen liggen, maar er moet ook rekening gehouden worden met de onzekerheid van de steekproef. Dus moet er nog een binomiaal betrouwbaarheidsinterval bepaald worden (Mayfield, 2013).



Dit kan met formule (6) die terug te vinden is in tabel 5.4.

Tabel 5.4: Formule voor de bepaling van het binomiale betrouwbaarheidsinterval van de steekproef (Mayfield, 2013)

	formule	parameters	Nummer
<b>Binomiaal betrouwbaarheidsinterval</b>	$\text{binomiaal CI} = p \pm z_{1-\frac{\alpha}{2}} \cdot \sqrt{\frac{p \cdot (1-p)}{n}}$	binomiaal CI= binomiaal betrouwbaarheidsinterval $p$ = aantal datapunten die buiten de grenzen mogen liggen $z_{1-\frac{\alpha}{2}}$ = z-waarde voor het gewenste betrouwbaarheidsinterval $n$ = aantal datapunten	(6)

### 5.5.5 Meetbereik

Ook het meetbereik wordt geëvalueerd. Volgens de *manual* van de tryptasekit kunnen stalen geanalyseerd worden met een tryptaseconcentratie tussen de 1 en 200 µg/L ("ImmunoCAP Tryptase (manual)," 2015).

Voor het bepalen van het meetbereik worden de kalibratoren met een tryptaseconcentratie van 1; 5; 12,5; 50 en 200 µg/L als monsters geanalyseerd. De tryptaseconcentratie van iedere kalibrator wordt in duplo bepaald. De gemiddelde respons van de kalibratoren wordt door de *IDM-software* geplot versus de nominale concentratie van de kalibratoren. Met behulp van regressieanalyse wordt de concentratie van de kalibratoren teruggerekend door de *IDM-software*. Om na te gaan of het meetbereik goed is, wordt de relatieve *bias* berekend van iedere kalibrator. Formule (4) in tabel 5.2 wordt gebruikt voor het berekenen van de relatieve *bias*.

### 5.5.6 Stabiliteit van tryptase

Ten slotte wordt de stabiliteit van tryptase in serum onderzocht nadat het serumstaal een bepaalde periode in de koelkast werd bewaard. Dit is niet nodig voor de validatie van het toestel maar het is wel interessant te weten hoe lang een staal bewaard kan worden zonder een invloed te hebben op de concentratie tryptase. Volgens de firma *Phadia AB* mag het staal bewaard worden in de koelkast als de concentratie tryptase bepaald wordt binnen de vijf dagen ("ImmunoCAP Tryptase (manual)," 2015). De bedoeling is om na te gaan of de concentratie tryptase significant verandert nadat het serumstaal vijf tot zeven dagen in de koelkast bewaard wordt.

Van vijf verse serumstalen willekeurig gekozen uit de serumstalen voor de Cobas, wordt de concentratie tryptase bepaald op de dag van afname. De dag van afname is gelijk aan dag nul. Daarna worden de stalen vijf dagen in de koelkast bewaard om op dag vijf opnieuw de concentratie tryptase te bepalen. Vervolgens worden deze nog eens twee dagen in de koelkast bewaard om op dag zeven nog een laatste keer de concentratie tryptase te bepalen. Met de meetresultaten kan nagegaan worden of de concentratie tryptase daalt indien een serumstaal vijf tot zeven dagen in de koelkast bewaard wordt.

## 6 Resultaten en discussie

Voor de validatie van het Phadia 250-systeem in het AZ Groeninge voor het bepalen van de concentratie tryptase worden stalen gebruikt waarvan de concentratie tryptase eerder reeds bepaald werd in het UZ Leuven. Dit zijn stalen van patiënten uit het AZ Groeninge, maar deze werden doorgestuurd naar het UZ Leuven omdat het toestel in Leuven wel al gevalideerd is om de concentratie tryptase te bepalen. De waarden die in Leuven bepaald werden, worden als richtwaarden gebruikt omdat er geen gouden standaardmethode bestaat om een Phadia 250-systeem te valideren voor tryptase. Dit heeft wel tot gevolg dat de resultaten van het UZ Leuven niet mogen beschouwd worden als targetwaarden, gezien deze ook onderhevig zijn aan een systematische en toevallige fout.

### 6.1 Precisie

#### 6.1.1 Herhaalbaarheid (*within-run* precisie)

In tabel 6.1 staan de resultaten van de metingen voor de herhaalbaarheid van twee verschillende stalen, een serumstaal met een normale concentratie tryptase en een serumstaal met een sterk verhoogde concentratie tryptase. De standaarddeviatie en de variatiecoëfficiënt worden berekend met behulp van formules (1) en (2) in tabel 5.1.

Tabel 6.1: Resultaten voor de evaluatie van de herhaalbaarheid

Nummer meting	Concentratie tryptase van een staal met een normale tryptaseconcentratie ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentratie tryptase van een staal met een sterk verhoogde tryptaseconcentratie ( $\mu\text{g/L}$ )
1	4,80	95,9
2	5,02	96,3
3	5,18	96,0
4	5,44	95,3
5	5,38	94,1
6	5,13	87,8
7	5,55	95,7
8	4,84	84,7
9	5,11	79,8
10	5,65	84,9
<b>Gemiddelde</b>	5,21 $\mu\text{g/L}$	91,05 $\mu\text{g/L}$
<b>Standaarddeviatie</b>	0,29 $\mu\text{g/L}$	6,14 $\mu\text{g/L}$
<b>Variatiecoëfficiënt</b>	5,54%	6,75%
<b>Concentratie gemeten in het UZ Leuven</b>	5,8 $\mu\text{g/L}$	76,6 $\mu\text{g/L}$

Om een conclusie te trekken in verband met de herhaalbaarheid wordt naar de variatiecoëfficiënt gekeken. In de productcatalogoog van Phadia die terug te vinden is in de

*IDM-software* staat dat een variatiecoëfficiënt op lange termijn van 6 tot 10% normaal is. Dit is het criterium om de reproduceerbaarheid te evalueren, maar aangezien er geen herhaalbaarheids criterium terug te vinden is voor dit toestel wordt hetzelfde criterium gebruikt als voor de reproduceerbaarheid. Zoals te zien is in tabel 6.1 zijn de variatiecoëfficiënten van beide stalen kleiner dan 10%. Er kan dus besloten worden dat de herhaalbaarheid acceptabel is.

### 6.1.2 *Between-day* reproduceerbaarheid

Voor de *between-day* reproduceerbaarheid werd de concentratie tryptase van de *Tryptase Control* en de *Curve Control* telkens op tien verschillende dagen bepaald. Er was niet alleen een variatie in de dagen waarop de concentratie bepaald werd, maar ook het gebruik van verschillende flesjes van de controles zorgt voor variatie. Een flesje *Tryptase Control* mag maar gedurende één week gebruikt worden. Er werden in totaal vier verschillende flesjes *Tryptase Control* gebruikt voor de resultaten voor de evaluatie van de reproduceerbaarheid aangezien enkel de maandag, dinsdag en woensdag de tryptasetest werd uitgevoerd. De gebruikte flesjes waren wel allemaal afkomstig van hetzelfde lot. Ook voor het tien maal bepalen van de *Curve Control* werden meerdere *Curve Control*-strips gebruikt aangezien met één strip maar zes maal de *Curve Control* bepaald kan worden. Ook hier waren alle gebruikte *Curve Control*-strips afkomstig van hetzelfde lot. In tabel 6.2 worden de resultaten weergegeven. De standaarddeviatie en de variatiecoëfficiënt worden opnieuw berekend met formule (1) en (2) in tabel 5.1.

Tabel 6.2: Resultaten voor de evaluatie van de reproduceerbaarheid

Datum bepaling	Concentratie tryptase van de <i>Tryptase Control</i> (µg/L)	Concentratie tryptase van de <i>Curve Control</i> (µg/L)
15/02/2016	6,43	/
16/02/2016	6,28	12,3
17/02/2016	6,67	12,4
22/02/2016	6,62	12,8
23/02/2016	6,45	12,3
24/02/2016	7,04	12,7
29/02/2016	6,23	12,2
1/03/2016	6,19	12,2
2/03/2016	6,44	12,3
7/03/2016	6,35	12,6
9/03/2016	/	12,1
<b>Gemiddelde</b>	6,47 µg/L	12,38 µg/L
<b>Standaarddeviatie</b>	0,25 µg/L	0,24 µg/L
<b>Variatiecoëfficiënt</b>	3,91%	1,94%
<b>Werkelijke concentratie</b>	6,85 µg/L	12,50 µg/L

Hier wordt de referentiewaarde uit de productcatalogoog toegepast. Een variatiecoëfficiënt tussen de 6 en 10% wordt beschouwd als normaal. Hier zijn beide variatiecoëfficiënten zelfs kleiner dan de 6%, dus kan er besloten worden dat de *between-day*

reproduceerbaarheid zeer goed is, zelfs met de extra variatie door het gebruik van de verschillende flesjes *Tryptase Control* en de verschillende *Curve Control*-strips.

Er moet wel een opmerking gemaakt worden in verband met het gebruik van de *Curve Control* en de *Tryptase Control*. De variatiecoëfficiënten van de *between-day* reproduceerbaarheid zijn veel lager dan die bij de herhaalbaarheid terwijl er verwacht wordt dat het eerder andersom zou zijn. Dit kan komen door het feit dat voor de *between-day* reproduceerbaarheid gebruik gemaakt werd van controles. De matrix van de serumstalen is complexer dan deze van de controles waardoor er bij serumstalen waarschijnlijk een grotere variatie ontstaat in tryptaseconcentratie bij herhaalde metingen.

## 6.2 Juistheid

Voor de evaluatie van de juistheid wordt gebruikt gemaakt van de meetresultaten voor de bepaling van de *between-day* reproduceerbaarheid. Deze resultaten zijn nog eens te zien in tabel 6.3, maar nu worden de absolute en relatieve *bias* bepaald in de plaats van de standaarddeviatie en de variatiecoëfficiënt. Dit wordt gedaan met behulp van formule (3) en (4) in tabel 5.2.

Tabel 6.3: Resultaten voor de evaluatie van de juistheid

Datum bepaling	Concentratie tryptase van de <i>Tryptase Control</i> (µg/L)	Concentratie tryptase van de <i>Curve Control</i> (µg/L)
15/02/2016	6,43	/
16/02/2016	6,28	12,3
17/02/2016	6,67	12,4
22/02/2016	6,62	12,8
23/02/2016	6,45	12,3
24/02/2016	7,04	12,7
29/02/2016	6,23	12,2
1/03/2016	6,19	12,2
2/03/2016	6,44	12,3
7/03/2016	6,35	12,6
9/03/2016	/	12,1
<b>Gemiddelde</b>	6,47 µg/L	12,38 µg/L
<b>Werkelijke concentratie</b>	6,85 µg/L	12,50 µg/L
<b>Absolute bias</b>	-0,38 µg/L	-0,12 µg/L
<b>Relatieve bias</b>	-5,55%	-0,96%

In de literatuur is voor de juistheid nergens een geschikte grenswaarde te vinden voor de relatieve en absolute *bias*, daarom wordt er beslist om zelf een grenswaarde voor de relatieve *bias* vast te leggen op 10% zoals bij de herhaalbaarheid en de *between-day* reproduceerbaarheid. De relatieve *bias* moet dus gelegen zijn tussen -10% en 10%. Op basis van de bekomen resultaten kan er besloten worden dat het toestel juist meet. De gemiddelde waarde van alle meetresultaten van éénzelfde controle ligt dicht genoeg bij de werkelijke waarde.

## 6.3 Meetonzekerheid

Om de meetonzekerheid te evalueren wordt de totale fout bepaald met behulp van formule (5) in tabel 5.3. Deze kan berekend worden op basis van de resultaten van de reproduceerbaarheid (variatiëcoëfficiënt) en de juistheid (relatieve *bias*) van de *Tryptase Control* en de *Curve Control*. De resultaten zijn weergegeven in tabel 6.4.

Tabel 6.4: Resultaten voor de evaluatie van de meetonzekerheid

	<b><i>Tryptase Control</i></b> <b>(<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b><i>Curve Control</i></b> <b>(<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>
<b>Variatiecoëfficiënt</b>	3,91%	1,94%
<b>Relatieve bias</b>	-5,55%	-0,96%
<b>TE</b>	12,00%	4,16%

De limiet voor de meetonzekerheid wordt bepaald aan de hand van de grenzen voor de reproduceerbaarheid en de juistheid. De grens was daar telkens 10%. Deze 10% wordt ingevuld in formule (5) in tabel 5.3 op de plaats van CV en  $B_{\text{rel}}$ :

$$TE \text{ limiet} = |10\%| + 1,65 \cdot 10\% = 26,5\%$$

De TE van de *Tryptase Control* en de *Curve Control* moet dus kleiner zijn dan 26,5%. Dit is hier zeker het geval. De meetonzekerheid is dus aanvaardbaar.

Er wordt hier opnieuw gebruik gemaakt van de meetresultaten van de *Curve Control* en de *Tryptase Control*. Dezelfde opmerking in verband met het gebruik van de controles zoals bij de *between-day* reproduceerbaarheid geldt ook hier.

## 6.4 Methodevergelijking

In bijlage 2 zijn de meetresultaten van het UZ Leuven en de eigen bepaalde resultaten in het AZ Groeninge te zien. In de derde kolom staat het gemiddelde van beide methodes per staal en in de vierde kolom het absolute verschil tussen het meetresultaat van het UZ Leuven en dat van AZ Groeninge. Deze waarden zijn nodig om na te gaan of er een klinisch verschil is. Naast het nagaan van het klinisch verschil wordt er ook nagegaan of er een analytisch en/of statistisch verschil is.

### 6.4.1 Statistische evaluatie

De *D'Agostino-Pearson test* berekend met *MedCalc* geeft als resultaat '*reject Normality*'. Dit wil zeggen dat de populatie niet normaal verdeeld is waardoor er hier niet zomaar gebruik gemaakt mag worden van een gepaarde T-test voor de statistische methodevergelijking. Daarom moet er gewerkt worden met de *Wilcoxon test*. De resultaten van de *Wilcoxon test* bepaald met het computerprogramma *MedCalc* zijn terug te vinden in tabel 6.5.

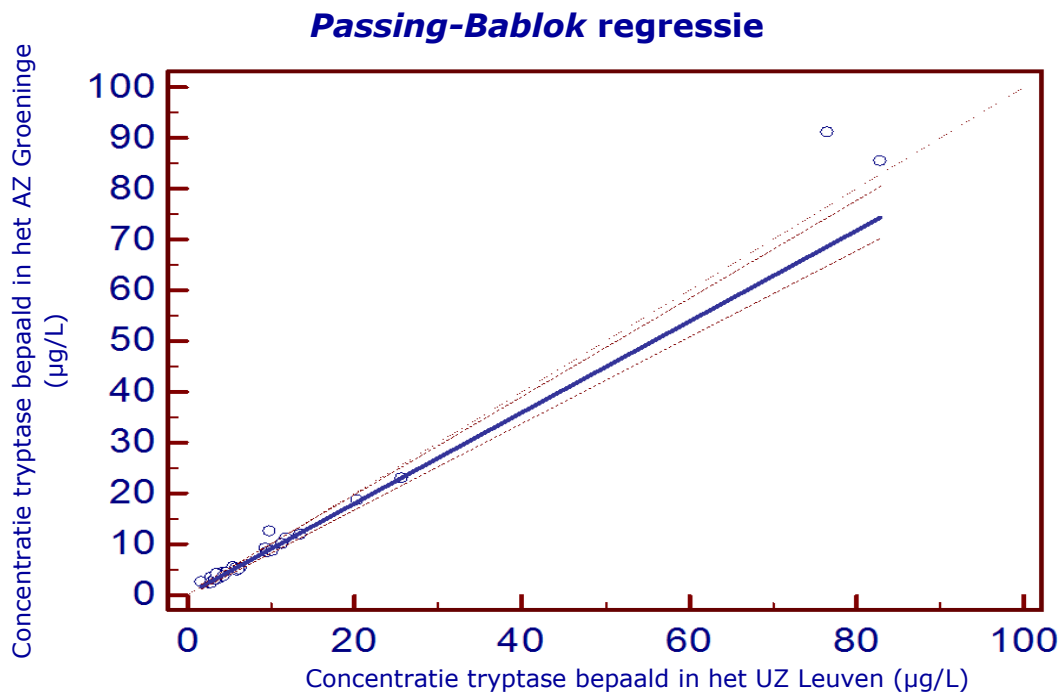
Tabel 6.5: De resultaten van de *Wilcoxon test* voor de statistische methodevergelijking

<b>Number of positive differences</b>	8
<b>Number of negative differences</b>	24
<b>Large sample test statistic Z</b>	2,150378
<b>Two-tailed probability</b>	P = 0,0315

De bekomen P-waarde is 0,0315. Deze waarde is kleiner dan 0,05. Er kan dus besloten worden dat er een statistisch significant verschil is tussen de meetresultaten van beide methodes.

## 6.4.2 Analytische evaluatie

Met een *Spearman* correlatiecoëfficiënt van 0,975 kan besloten worden dat de methodes voldoende gecorreleerd zijn om te onderwerpen aan een lineaire regressie analyse. De grafische analyse van de *Passing-Bablok* regressie uitgevoerd met het computerprogramma *MedCalc* zijn terug te vinden in figuur 6.1.



Figuur 6.1: De *Passing-Bablok* regressie en de regressievergelijking voor de analytische methodevergelijking

In tabel 6.6 is de vergelijking van de regressierechte te zien samen met extra waarden in verband met het intercept en de *slope* van die rechte.

Tabel 6.6: De resultaten van de *Passing-Bablok* regressie voor de analytische methodevergelijking

$y = 0.135371 + 0.895670 x$	
<b>Systematic differences</b>	
Intercept A	0,1354
95% CI	-0,2679 to 0,3925
<b>Proportional differences</b>	
Slope B	0,8957
95% CI	0,8500 to 0,9660

Er moet aan twee voorwaarden voldaan zijn vooraleer gezegd kan worden dat er geen analytisch verschil is tussen de resultaten van het UZ Leuven en het AZ Groeninge. Ten eerste moet het 95%-betrouwbaarheidsinterval (CI) van het intercept A 0 omvatten om aan te tonen dat er geen absolute *bias* is tussen beide methodes en ten tweede moet het 95%-CI van de *slope* B 1 omvatten om aan te tonen dat er geen proportionele *bias* is tussen beide methodes.

Aan de eerste voorwaarde is voldaan. Het 95%-CI van het intercept A bevat effectief 0. Er is dus geen absolute *bias* tussen beide methodes, maar er is wel een proportionele *bias* aangezien het 95%-CI van de slope B 1 niet bevat. Analytisch gezien is er dus een significant verschil tussen de methode van het UZ Leuven en deze van het AZ Groeninge.

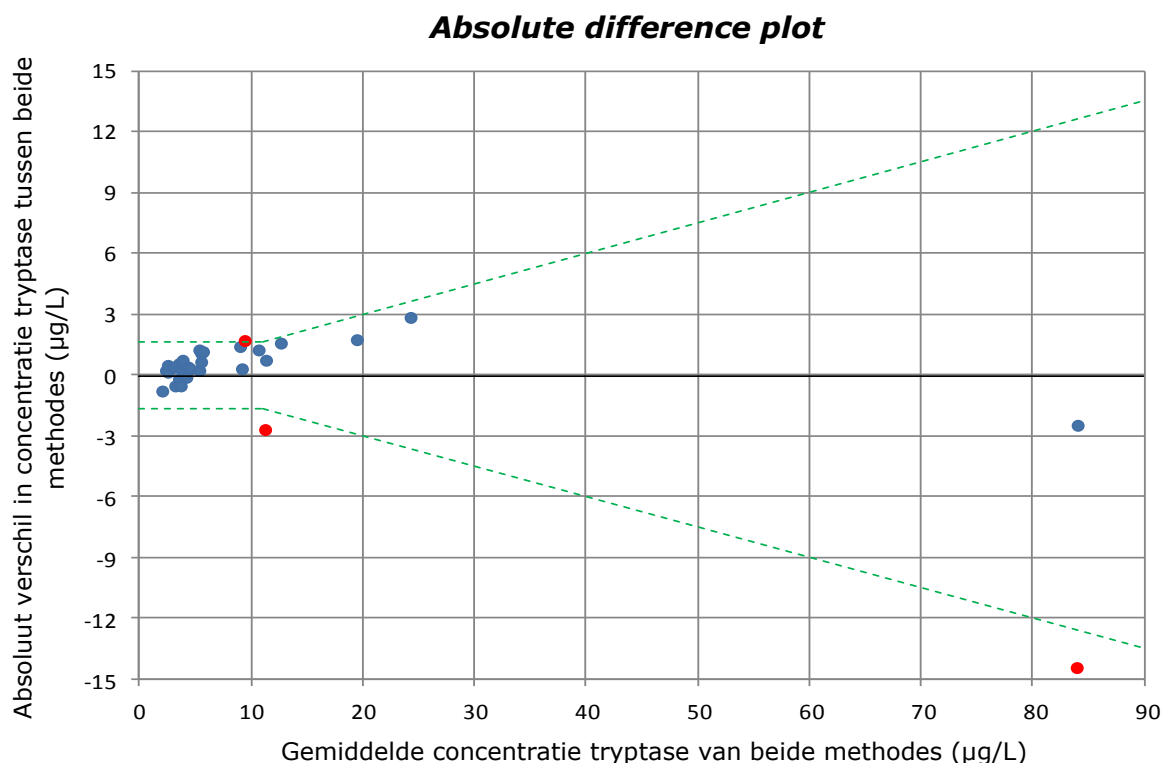


### 6.4.3 Klinische evaluatie

Voor de klinische methodevergelijking wordt een *absolute difference plot* opgesteld die te zien is in figuur 6.2. Op de x-as staat de gemiddelde tryptaseconcentratie van beide methodes en op de y-as het absoluut verschil tussen de tryptaseconcentratie bepaald in het UZ Leuven en deze bepaald in het AZ Groeninge.

De zwarte horizontale lijn in de grafiek stelt het gemiddeld absoluut verschil,  $-0,09 \mu\text{g/L}$ , voor. De groene stippellijn stelt de *error* limiet voor. Dit is het maximaal toegelaten absoluut verschil tussen beide methodes. In principe zou hier de TE limiet van 26,5% als *error* limiet gebruikt kunnen worden, maar deze TE limiet zal voor tryptaseconcentraties kleiner dan  $11 \mu\text{g/L}$  maar een zeer smal gebied insluiten en voor tryptaseconcentratie groter dan  $11 \mu\text{g/L}$  een te ruim gebied.

Een criterium voor de *error* limiet wordt dus zelf vastgelegd. Bij lage tryptaseconcentraties zijn de absolute verschillen eerder constant. Daarom wordt voor een gemiddelde tryptaseconcentratie lager dan  $11 \mu\text{g/L}$  geopteerd voor een constante *error* limiet. Deze wordt vastgelegd op  $\pm 1,65 \mu\text{g/L}$ , namelijk een absoluut verschil van  $\pm 1,65 \mu\text{g/L}$ . Voor een gemiddelde tryptaseconcentratie groter dan  $11 \mu\text{g/L}$  gaan de datapunten bredere uitwaaien. Vanaf een gemiddelde concentratie van  $11 \mu\text{g/L}$  wordt gekozen voor een procentuele *error* limiet van  $\pm 15\%$ .



#### Legende:

- *Error* limiet: 1. Gemiddelde concentratie  $< 11 \mu\text{g/L}$  => maximaal toegelaten absoluut verschil =  $\pm 1,65 \mu\text{g/L}$
- 2. Gemiddelde concentratie  $> 11 \mu\text{g/L}$  => maximaal toegelaten absoluut verschil = 15% van de gemiddelde concentratie
- Gemiddeld absoluut verschil ( $-0,09 \mu\text{g/L}$ )

Figuur 6.2: De absolute difference plot voor de klinische methodevergelijking

De blauwe datapunten zijn de datapunten die binnen de *error* limieten liggen. Voor deze stalen is er dus geen klinisch significant verschil tussen het meetresultaat van het UZ Leuven en dat van het AZ Groeninge. De drie rode punten vallen buiten de *error* limieten. Bij deze stalen is er wel een klinisch significant verschil tussen het meetresultaat van het UZ Leuven en dat van het AZ Groeninge.

Er wordt beslist dat 5% van de datapunten buiten de *error* limiet mag liggen. Voor deze methodevergelijking werd gebruik gemaakt van 33 serumstalen, maar één van de meetresultaten wordt niet meegenomen in de berekeningen aangezien het een *outlier* betreft. 5% van 32 is 1,6. Bij deze methodevergelijking zouden dus 1,6 datapunten buiten de *error* limieten mogen liggen. Er moet echter ook rekening gehouden worden met de onzekerheid op de steekproef. Het binomiaal betrouwbaarheidsinterval wordt bepaald met behulp van formule (6) in tabel 5.4. Er zijn 32 datapunten waarvan er maximaal 5% buiten de grenzen mogen liggen en er wordt een betrouwbaarheidsinterval van 95% verwacht. Dit 95%-betrouwbaarheidsinterval komt overeen met een z-waarde van 1,96.

$$\text{binomiaal CI} = 0,05 \pm 1,96 \cdot \sqrt{\frac{0,05 \cdot (1 - 0,05)}{32}} = 0,05 \pm 0,0755$$

Het betrouwbaarheidsinterval loopt dus van -0,0255 of beter -2,55% van 32 datapunten tot 0,1255 of beter 12,55% van 32 datapunten. Het 95% betrouwbaarheidsinterval loopt dus van 0 datapunten tot 4 datapunten die buiten de *error* limieten mogen liggen. De ondergrens is 0 omdat -2,55% van 32 een negatief getal is.

In deze methodevergelijking liggen er maar drie datapunten buiten de grenzen. Dit ligt binnen het 95%-betrouwbaarheidsinterval. Het statistisch en analytisch significant verschil hebben dus maar een beperkte impact op de vorming van een klinisch besluit. Deze beperkte impact is aanvaardbaar.

## 6.5 Meetbereik

In tabel 6.7 zijn de resultaten te zien voor het bepalen van het meetbereik.

Tabel 6.7: Analyseresultaten voor het bepalen van het meetbereik

Nominale concentratie kalibrator (µg/L)	respons 1	teruggerekende concentratie 1 (µg/L)	respons 2	teruggerekende concentratie 2 (µg/L)	gemiddelde respons	gemiddelde teruggerekende concentratie (µg/L)	B <sub>rel</sub> (%)
1	364	1,12	318	0,91	341	1,02	1,5
5	1244	4,97	1238	4,94	1241	4,96	-0,9
12,5	2911	12,40	3014	12,90	2962,5	12,65	1,2
50	9693	49,70	9403	50,70	9548	50,20	0,4
200	2106 6	197,00	21392	205,00	21229	201,00	0,5

Voor het evalueren van het meetbereik wordt de relatieve *bias* van iedere kalibrator berekend met behulp van formule (4) in tabel 5.2. Het acceptatiecriterium is gebaseerd op de criteria van de *Food and Drug Administration* (FDA) ("Guidance for Industry," 2001). De teruggerekende concentratie van iedere kalibrator dient binnen  $\pm 15\%$  van de nominale concentratie te vallen. Voor de vijf kalibratoren is dit zeker het geval. Dus er kan besloten worden dat het meetbereik volgens de *manual* van de tryptasekit in orde is.

Hier moet de opmerking gemaakt worden dat er gebruik gemaakt werd van de kalibratoren. In principe zou gebruik gemaakt moeten worden van een staal met een zeer hoge concentratie tryptase in de plaats van de kalibratoren. Daarvan zou dan een seriële verdunningsreeks gemaakt moeten worden, maar dergelijk staal was niet voor handen.

## 6.6 Stabiliteit van tryptase

De concentratie tryptase van de vijf willekeurig gekozen serumstalen werd bepaald op de nulde (de dag dat het staal afgenomen werd), de vijfde en de zevende dag. Tussendoor werden de stalen in de koelkast bewaard. De analyseresultaten zijn terug te vinden in tabel 6.8.

Tabel 6.8: Analyseresultaten voor het nagaan van de stabiliteit van tryptase

Staalnummer	Concentratie tryptase op 27/04/2016 = dag 0 (µg/L)	Concentratie tryptase op 02/05/2016 = dag 5 (µg/L)	Concentratie tryptase op 04/05/2016 = dag 7 (µg/L)
1	7,39	7,77	8,02
2	3,35	3,37	3,49
3	7,51	7,68	7,83
4	3,73	3,69	3,73
5	3,86	3,98	4,11

Via het computerprogramma *MedCalc* wordt nagegaan of er een significant verschil is tussen de meetresultaten van de verschillende dagen. *MedCalc* voert een gepaarde tweezijdige T-test uit.

Eerst worden de resultaten van dag nul vergeleken met de resultaten van dag vijf met behulp van een gepaarde tweezijdige T-test. De resultaten zijn te zien in tabel 6.9.

Tabel 6.9: Resultaten van de gepaarde T-test voor de vergelijking van de meetresultaten van dag 0 met deze van dag 5

<b>Mean difference</b>	0,1300
<b>Standard deviation</b>	0,1622
<b>95% CI</b>	-0,07136 to 0,3314
<b>Test statistic t</b>	1,7920
<b>Degrees of Freedom (DF)</b>	4
<b>Two-tailed probability</b>	P = 0,1475

Er wordt een P-waarde bekomen van 0,1475. Enkel indien de P-waarde kleiner is dan 0,05 is er een significant verschil. Er kan besloten worden dat er geen significant verschil is tussen de analyseresultaten van dag nul en dag vijf. De concentratie tryptase is nog niet significant veranderd na vijf dagen bewaring van het staal in de koelkast.

Vervolgens worden de resultaten van dag nul en dag zeven met elkaar vergeleken. Deze resultaten zijn terug te vinden in tabel 6.10.

Tabel 6.10: Resultaten van de gepaarde T-test voor de vergelijking van de meetresultaten van dag 0 met deze van dag 7

<b>Mean difference</b>	0,2680
<b>Standard deviation</b>	0,2357
<b>95% CI</b>	-0,02470 to 0,5607
<b>Test statistic t</b>	2,5420
<b>Degrees of Freedom (DF)</b>	4
<b>Two-tailed probability</b>	P = 0,0638

Met behulp van een gepaarde tweezijdige T-test wordt een P-waarde van 0,0638 bekomen. Dit is ook groter dan 0,05. Dit betekent dat er geen significant verschil is tussen de resultaten van dag nul en dag zeven waaruit besloten kan worden dat de concentratie tryptase niet significant verandert indien het staal zeven dagen bewaard wordt in de koelkast.

Serumstalen kunnen dus op basis van dit onderzoek zeven dagen bewaard worden in de koelkast zonder dat de concentratie tryptase significant verandert. Maar het blijft natuurlijk beter om zo snel mogelijk de tryptaseconcentratie te bepalen. In een volgende stap kan nog getest worden na hoeveel dagen de concentratie tryptase significant verandert indien het serumstaal bewaard wordt in de koelkast.

## Conclusie

Voor het valideren van het Phadia 250-toestel van AZ Groeninge werden enkele prestatiekenmerken van het toestel geëvalueerd.

De precisie werd opgedeeld in de herhaalbaarheid en de *between-day* reproduceerbaarheid. De berekende variatiecoëfficiënten zijn kleiner dan de vooropgestelde 10% wat de herhaalbaarheid en de *between-day* reproduceerbaarheid aanvaardbaar maken. Aangezien ook telkens de relatieve *bias* kleiner is dan 10% kan gezegd worden dat de juistheid zeer goed is. De berekende totale fouten liggen eveneens allemaal onder de grens. De meetonzekerheid is dus zeker ook aanvaardbaar. Hier moet wel de opmerking gemaakt worden dat bij de bepaling van de *between-day* reproduceerbaarheid en de meetonzekerheid de controles gebruikt werden bij de metingen en geen reële patiëntenstalen. De matrix van de controles is minder complex waardoor er een kleinere variatiecoëfficiënt en relatieve bias verkregen wordt dan bij patiëntenstalen.

Uit de resultaten van de methodevergelijking is gebleken dat er een statistisch en analytisch significant verschil is tussen de resultaten van het UZ Leuven en deze van het AZ Groeninge. Maar de impact van deze verschillen is klinisch gezien beperkt volgens de *absolute difference plot* en dus aanvaardbaar.

Het meetbereik volgens de handleiding van de kit werd bevestigd door de resultaten.

Ook de stabiliteit van tryptase in serum dat bewaard wordt in de koelkast werd nagegaan. Volgens de handleiding van de tryptasekit moet de concentratie tryptase bepaald worden binnen de vijf dagen indien het staal in de koelkast bewaard wordt, maar uit de test is gebleken dat het ook na zes of zeven dagen nog bepaald kan worden zonder dat de concentratie tryptase significant veranderd is. De stalen werden niet langer dan zeven dagen bewaard in de koelkast, maar in de toekomst kan eens bepaald worden na hoeveel dagen bewaring in de koelkast de concentratie tryptase significant verandert.

Als algemeen besluit kan gezegd worden dat het Phadia 250-toestel van het AZ Groeninge bruikbaar is voor de bepaling van tryptase in serum in routine. Alle geteste parameters zijn aanvaardbaar. In de toekomst zal het AZ Groeninge dus zelf de tryptasetest kunnen uitvoeren om een anafylactische reactie te bevestigen of om te helpen bij de diagnose van systemische mastocytose. Zo moeten deze serumstalen niet meer opgestuurd worden naar het UZ Leuven.

## Referentielijst

- Anaphylaxis. (2016). Geraadpleegd op 27 april 2016 via [http://www.worldallergy.org/public/allergic\\_diseases\\_center/anaphylaxis/anaphylaxis.php](http://www.worldallergy.org/public/allergic_diseases_center/anaphylaxis/anaphylaxis.php)
- Anaphylaxis and Hypersensitivity Reactions*. (2011). New York: Humana Press.
- Bonadonna, P., Lombardo, C., & Zanotti, R. (2014). Mastocytosis and allergic diseases. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 24(5), 288-297; quiz 283 p preceding 297.
- Callewaert, N. (2014). Verificatie & Validatie van analytische methoden.
- Caughey, G. H. (2006). Tryptase genetics and anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*, 117(6), 1411-1414.
- European Mastocytosis Support Network. (2016). Geraadpleegd op 6 maart 2016 via <http://www.mastocytosis.eu/countries/belgium.php>
- Guidance for Industry. (2001). *Bioanalytical Method Validation*.
- ImmunoCAP Allergy & Asthma Assays. (2012). Geraadpleegd op 13 maart 2016 via <http://www.phadia.com/en-GB/5/Products/ImmunoCAP-Assays/>
- ImmunoCAP Tryptase. (2007). *Clinical utility of Total Tryptase*: Phadia.
- ImmunoCAP Tryptase. (2012). Geraadpleegd op 13 maart 2016 via <http://www.phadia.com/en/Products/Allergy-testing-products/ImmunoCAP-Lab-Tests/ImmunoCAP-Tryptase/>
- ImmunoCAP Tryptase (manual). (2015). Thermo Scientific.
- Klaessens, J. (2013). *Statistiek, validatie en meetonzekerheid voor het laboratorium*. Utrecht: Uitgeverij Syntaxis Media.
- Mastocytosis: A disease of Mast Cells. (sd). Geraadpleegd op 6 april 2016 via <http://ecnm.net/homepage/index.php/information-on-mastocytosis>
- Mayfield, P. (2013). Understanding Binomial Confidence Intervals. Geraadpleegd op 6 mei 2016 via [http://www.sigmazone.com/binomial\\_confidence\\_interval.htm](http://www.sigmazone.com/binomial_confidence_interval.htm)
- Michalska-Krzanowska, G. (2012). Tryptase in diagnosing adverse suspected anaphylactic reaction. *Adv Clin Exp Med*, 21(3), 403-408.
- Naeim, F. (2013). *Atlas of Hematopathology*: Academic Press.
- Ontwikkeld voor middelgrote laboratoria. (2012). Geraadpleegd op 6 april 2016 via <http://www.phadia.com/nl/Products/Phadia-Laboratory-Systems/Phadia-250/>
- Phadia 100. (s.d.). *Designed for allergy and autoimmunity testing*: Thermo Scientific.
- Phadia 250. (2016). Geraadpleegd op 3 mei 2016 via <http://www.somagen.com/products/phadia-250/>
- Phadia 250. (s.d.). *Designed for allergy and autoimmunity testing*: Thermo Scientific.
- Phadia 1000. (s.d.). *Designed for allergy and autoimmunity testing*: Thermo Scientific.
- Phadia 2500. (s.d.). *Designed for allergy and autoimmunity testing*: Thermo Scientific.
- Phadia 5000. (s.d.). *Designed for allergy and autoimmunity testing*: Thermo Scientific.
- Scholing endocrinologie blok 1 (ppt). (sd). Geraadpleegd op 6 april 2016 via <http://resultlaboratorium.nl/wp-content/uploads/2015/06/Scholing-Endocrinologie-Blok-1.pdf>

- Sheldon, J., & Philips, B. (2015). Laboratory investigation of anaphylaxis: not as easy as it seems. *Anaesthesia*, 70(1), 1-5.
- Sperr, W. R., & Valent, P. (sd). The Tryptase Test *Clinical Use in Hematology*: Thermo Scientific.
- Test Principle ImmunoCAP Tryptase. (2012). Geraadpleegd op 13 maart 2016 via <http://www.phadia.com/Products/Allergy-testing-products/ImmunoCAP-Lab-Tests/ImmunoCAP-Tryptase/Test-Principle/>
- Tryptase as a clinical marker to help understand severe reactions during surgery. (2015). Thermo Scientific.
- Tryptase as a clinical marker, an aid in explaining severe reactions. (2015). Thermo Scientific.
- Tryptase as diagnostic tool in suspected mastocytosis. (2015). Thermo Scientific.
- van der Kuil, J. (2015). Wat kalibreren precies is. Geraadpleegd op 13 april 2016 via <https://qualitybs.wordpress.com/2015/07/29/wat-kalibreren-precies-is/>
- Westgard, J. O., & Westgard, S. A. (2016). Total Analytic Error. Geraadpleegd op 25 april 2016 via <https://www.aacc.org/publications/cln/articles/2013/september/total-analytic-error>
- Wongkaewpothong, P., Pacharn, P., Sripramong, C., Boonchoo, S., Piboonpocanun, S., Visitsunthorn, N., et al. (2014). The utility of serum tryptase in the diagnosis of food-induced anaphylaxis. *Allergy Asthma Immunol Res*, 6(4), 304-309.



## Bijlagen

**Bijlage 1:** Protocol voor het gebruiken van een Phadia 250-toestel voor de bepaling van tryptase in serum

**Bijlage 2:** Meetresultaten voor de methodevergelijking

## **Bijlage 1: Protocol voor het gebruiken van een Phadia 250-toestel voor de bepaling van tryptase in serum**

De bepaling van de concentratie tryptase met een Phadia 250-systeem gebeurt steeds op dezelfde manier:

1. Het toestel aanleggen.
  2. De *Curve Control Strip/Calibrator Strip*, het conjugaat, de *Development Solution* en de *Stop Solution* op het toestel plaatsen door de barcode te scannen en op de juiste plaats op het toestel te zetten.
  3. Controleren of er genoeg reagentia (conjugaat, *Development Solution* en *Stop Solution*) aanwezig is op het toestel, want terwijl het toestel de analyses uitvoert, kan er van deze reagentia geen extra flessen of strips op het toestel geplaatst worden. Het toestel kan nagaan hoeveel testen er nog uitgevoerd kunnen worden met de reagentia die op het toestel staan. Dit wordt bepaald door het toestel door op '*level detection*' te klikken.
  4. Controleren of er nog genoeg CAP's op het toestel aanwezig zijn om de verschillende controles en kalibratoren te kunnen bepalen. Indien niet, kunnen er *carriers* met CAP's bijgeplaatst worden. *Carriers* kunnen na de bepaling van de controles altijd bijgeplaatst worden op het toestel.
  5. De *assay* starten door op '*Assay*' te drukken.
  6. De tryptasetest kiezen.
  7. Druk op '*Next*'. Indien er een bepaald reagens nog niet op het toestel staat, zal dit aangegeven worden door het toestel en dit kan dan nog bijgeladen worden via '*Load*'.
  8. Druk nog eens op '*Next*'.
  9. Controleren of er nog genoeg *Washing Solution* onder het toestel staat. Indien dit niet het geval is, moet er bijgemaakt worden.  
*Washing Solution* aanmaken:
    - a. Vijf liter gedemineraliseerd in het reservoir voor de *Washing Solution* doen.
    - b. Eén fles *Wash Solution Concentrate* van 400 ml toevoegen.
    - c. Goed mengen.
    - d. Eén klein flesje *Wash Solution Additive* van 86 ml toevoegen.
    - e. Alles goed mengen.
- Terwijl het toestel bezig is kan er wel nieuwe *Wash Solution* op het toestel geplaatst worden.
10. Controleren of het reservoir van de *Waste* leeg is. Indien deze niet leeg is, moet deze leeggemaakt worden.
  11. Controleren of het reservoir van *Rinse* gevuld is tot aan de streep. Indien deze niet vol is moet deze aangevuld worden met gedemineraliseerd water tot aan de streep.
  12. Druk op '*Next*'.
  13. Op '*Start*' duwen: de initialisatie, de *priming*, de blanco meting, de bepaling van de kalibratoren/*Curve Control* start.
  14. De *ImmunoCAP Tryptase Control* oplossen in 500 µl klinisch laboratoriumwater (dit gebeurt éénmaal per week op maandag aangezien deze controle één week bewaard kan worden in de koelkast).
  15. Het flesje van de *Tryptase Control* in het voorgeprogrammeerde rek plaatsen.
  16. Het rek op het toestel schuiven.
  17. De serumstalen vortexen.
  18. Het deksel van de serumstalen halen.

19. De serumstalen in een rek plaatsen zodanig dat de barcode zichtbaar is. Deze barcode is nodig voor de identificatie van het staal zodanig dat het toestel weet welke test er moet uitgevoerd worden op dit staal. Indien de hoeveelheid staal eerder beperkt is, wordt het staal in een *nesting sample cup* gegoten en dit wordt vervolgens in de proefbuis gezet waarin het staal oorspronkelijk zat. De proefbuis waarin de gevulde *nesting sample cup* zit, wordt in een rek geplaatst.
20. De tryptasetest aanvragen op de juiste stalen via de *IDM-software* die bij het Phadiatoestel hoort. Ofwel wordt de tryptasetest aangevraagd via de barcode ofwel via het programmeren van stalen op bepaalde rekken.
21. De rekken met de stalen op het toestel schuiven.
22. Het toestel gaat automatisch van alle stalen waarop de tryptasetest aangevraagd werd via de *IDM-software*, de concentratie tryptase bepalen.
23. De rekken van het toestel halen als de lamp onder het rek groen kleurt.
24. De lege *carriers* waarin de CAP's zitten van het toestel halen vooraleer op '*End assay*' geduwd wordt.
  - a. Ga naar het scherm '*immunoCAP/Elia Well Carrier*'.
  - b. Klik op '*Select empty items*'.
  - c. Klik op '*Unload*'. Het toestel plaatst alle geselecteerde lege pennen in de *Loading tray*.
  - d. De lege pennen van de *Loading tray* halen en in de vuilbak gooien.
  - e. Op '*Clear Tray*' klikken.
25. Duw op '*End assay*' om het toestel af te sluiten. (Dit kan ook al gedaan worden terwijl het toestel nog bezig is met de analyses, want er kan aangeduid worden dat het toestel pas mag afsluiten als alle stalen afgewerkt zijn.)
26. Als het toestel helemaal afgesloten is: Alle reagentia (De *Curve Control Strip/Calibrator Strip*, het conjugaat, de *Development Solution* en de *Stop Solution*) van het toestel halen en in de koelkast steken, enkel niet-lege *carriers* en de *Washing Solution* blijven op het toestel staan.
27. Het reservoir van de *Rinse* bijvullen tot aan de streep met gedemineraliseerd water als het toestel helemaal is afgesloten.
28. Het reservoir van de *Waste* ledigen.
29. De resultaten bekijken en afdrukken. De *IDM-software* bepaalt zelf of de waarden van de controles goed zijn.

**Bijlage 2: Meetresultaten voor de methodevergelijking**
tryptasen

patiënten-ID	Concentratie tryptase bepaald in het UZ Leuven (µg/L)	Concentratie tryptase bepaald in het AZ Groeninge (µg/L)	Het absoluut verschil in tryptase-concentratie tussen beide methodes (µg/L)	De gemiddelde tryptase-concentratie van beide methodes (µg/L)
V1510-20919-04	1,6	2,44	-0,84	2,02
V1510-08104-03	2,5	2,35	0,15	2,43
V1509-24877-01	2,6	2,52	0,08	2,56
V1512-28672-01	2,8	2,38	0,42	2,59
V1510-24765-04	2,9	3,46	-0,56	3,18
V1511-22158-01	3,2	2,81	0,39	3,01
V1510-22039-01	3,4	3,60	-0,20	3,50
V1601-25927-04	3,4	3,03	0,37	3,22
V1601-26761-01	3,5	4,08	-0,58	3,79
V1510-08178-05	3,8	3,24	0,56	3,52
V1510-28231-01	3,8	3,57	0,23	3,69
V1509-22615-01	4,1	4,21	-0,11	4,16
V1511-08828-01	4,2	3,71	0,49	3,96
V1602-01308-01	4,3	3,64	0,66	3,97
V1510-28229-01	4,6	4,28	0,32	4,44
V1510-05029-02	4,7	4,41	0,29	4,56
N1510-06599-04	5,5	5,35	0,15	5,43
V1601-26616-01	5,8	5,21	0,59	5,51
V1601-11692-01	6,0	4,84	1,16	5,42
V1602-11834-05	6,1	5,03	1,07	5,57
V1602-03244-01	6,3	5,18	1,12	5,74
V1509-26144-05	9,3	9,04	0,26	9,17
V1601-25174-01	9,7	8,36	1,34	9,03
V1509-22480-04	9,8	12,50	-2,70	11,15
V1602-07051-02	10,2	8,53	1,67	9,37
V1512-28641-05	11,3	10,10	1,20	10,70
V1510-19051-05	11,8	11,10	0,70	11,45
V1512-04422-07	13,4	11,90	1,50	12,65
V1511-05653-04	20,3	18,60	1,70	19,45
N1510-06909-03*	24,8	13,20	/	/
V1512-09481-01	25,7	22,90	2,80	24,30
N1510-01488-04	76,6	91,05	-14,45	83,83
V1510-23855-01	82,9	85,40	-2,50	84,15
<b>Gemiddelde</b>	/	/	-0,09	/

\*Dit staal wordt niet meegenomen in de methodevergelijking aangezien dit een *outlier* betreft.