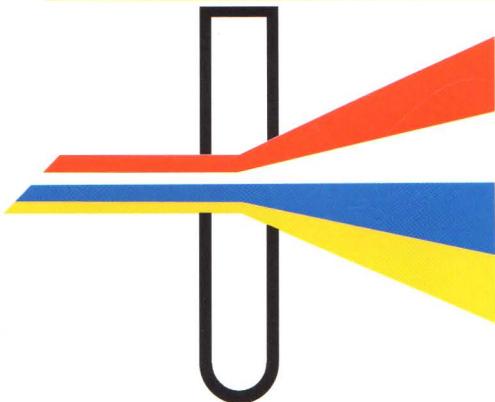


Klinisk Kemi i Norden

Tidskrift för Nordisk Förening för Klinisk Kemi



**Nr 2, vol. 10
1998**

INNEHÅLL

- 39 *Redaktionellt*
40 *Nytt fra styret*
41 Kapillær elektroforese
54 Hur skall vi utreda B12-brist?
59 *Medisinsk publicering: Statistiske vurderinger*
65 ROSAN på nätet
65 *Möteskalender*

Redaktionskommitté för KLINISK KEMI I NORDEN

Huvudredaktör: Kristoffer Hellsing, adress nedan.

Manuskript sändes till huvudredaktör eller det egna landets redaktör.

NFKK

och Norge Overlege Tor-Arne Hagve
Klinisk-kjemisk avdeling
Rikshospitalet
Pilestedet 32
N-0027 Oslo 1, Norge
Telefon: Int. +47 22 86 70 10
Telefax: Int. +47 22 86 70 29
E-post: tahagve@galenos.uio.no

Island Cand. Pharm. Leifur Franzson
Dept of Clinical Chemistry
Borgarspítalinn Fossvogi
IS-108 Reykjavík
Island
Telefon: Int. +354 5 25 14 85
Telefax: Int. +354 5 25 14 72
E-post: leifurfr@shr.is

Danmark Overlæge Palle Wang
Afdeling KKA
Odense Universitetshospital
DK-5000 Odense C
Danmark
Telefon: Int. + 45 65 41 28 39
Telefax: Int. + 45 65 41 19 11
E-post: pwa@imbmed.ou.dk

Sverige Docent Kristoffer Hellsing
EQUALIS
Box 977
S-751 09 Uppsala
Sverige
Telefon: Int. +46 18 69 31 47
Telefax: Int. +46 18 69 31 46
E-post: kristoffer.hellsing@equalis.se

Finland Professor Ilkka Penttilä
Avdelningen för klinisk-kemi
Kuopio universitetscentralsjukhus
SF-702 10 Kuopio
Finland
Telefon: Int. +358 17 17 31 50
Telefax: Int. +358 17 17 32 00
E-post: ilkka.penttila@uku.fi

Omslaget: Välkommen till den nordiska kongressen i Åbo.

KONTROLLSERA

**35 års sporbarhet til
nordisk klinisk kjemi**



Da professor Lorentz Eldjarn utviklet **SERONORM** i 1963 var det et banebrytende nytt hjelpemiddel for å kontrollere kvaliteten av laboratorieanalyser. Den teknologiske utvikling innen laboratoriemedisin har gjort det stadig vanskeligere å kontrollere analysemetoder og instrumenter på annen måte enn ved bruk av pålitelige og uavhengige kontrollsera.

Det viktigste spørsmålet ved valg av kontrollsera er sporbarhet og tillit til de data som oppgis for produktene. Takket være et nært samarbeid med de klinisk kjemiske fagmiljøer i Norden gjennom 35 år, står **SERONORM** og de andre **SERO**-produktene, som er utviklet siden 1963, i en særklasse med hensyn til sporbarhet og dokumentasjon. Produktene benyttes av laboratorier over hele verden og framstår daglig som ambassadører for kvalitetsbevisstheten i nordisk klinisk kjemi.

Nye utfordringer krever nye produkter og **SERO** har idag et omfattende

produktspekter med kontrollmaterialer for klinisk kjemi, proteiner, hormoner, farmaka, sporelementer mv. Stabile flytende kontroller forenkler bruken av produktene og muliggjør pålitelig kvalitetskontroll også av enklere instrumenter i primærhelsetjenesten. Men kravene til kvalitet, sporbarhet og dokumentasjon består uforandret. Produktene er framstilt av trygge skandinaviske råvarer fra kontrollerte kilder. Analysedata presenteres fra navngitte, uavhengige laboratorier i økende grad også ved bruk av referansemetoder og med sporbarhet til internasjonale standarder.

Gjennom 35 år har **SERO** ønsket å bidra til en kvalitetsutvikling av laboratoriemedisin. Med god hjelp og støtte fra fagmiljøer i de nordiske land har dette vært mulig. Sammen med **NYCOMED Pharma AS**, som distribuerer produktene i Norden, ønsker vi fortsatt å være en uavhengig og pålitelig støttespiller for kvalitetsbevisste laboratorier.

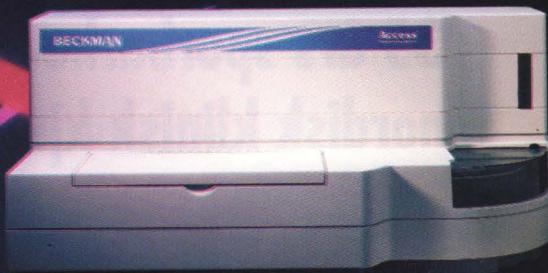
DISTRIBUSJON:



| | | |
|----------|------------------------------------------|-----------------------|
| Sverige: | Nycomed AB | Tel.: +46 8 731 2800 |
| Finland: | OY Nycomed AB | Tel.: +358 9 5123 550 |
| Danmark: | Nycomed DAK AS | Tel.: +45 4677 1111 |
| Island: | Pharmaco | Tel.: +354 5658 111 |
| Norge: | Sero AS | Tel.: +47 66846560 |
| | Nycomed Pharma (Primærhelsetjenesten) | Tel.: +47 23185050 |

Access The Immunoassay Panels Patients Need Most.

Cardiac • Thyroid • Fertility • Anemia • Diabetes • Adrenal/Pituitary
Tumor Markers • Allergy • Infectious Disease • Blood Virus



Now, in one automated immunoassay system, you get world-standard panels for your most requested tests—all available with continuous random access and 24-hour STAT processing.

TSH with third-generation performance is a powerful component of our thyroid panel. Estradiol is an integral part of our in-depth fertility panel. The Access® complete cardiac panel includes both Myoglobin and Troponin I. And the anemia panel offers a full range of tests including RBC Folate. Add to these our new Access PSA assay and it's easy to see our test menu is designed to provide the answers you need most.

We invite you to access the new standard in immunoassay automation. Contact your Beckman Coulter representative today.

The Power of Process™

Africa/Middle East/Eastern Europe: Switzerland, Nyon (41) 22 994 0707. **Australia,** Gladesville (61) 2 844-6000.
Austria, Vienna (43) 17292164. **Canada,** Mississauga (800) 463-STAT, (905) 819-1234. **France,** Gagny (1) 43 017000.
Germany, Munich (49) 89 358700. **Hong Kong** (852) 814 7431. **Italy,** Milan (39) 2 953921.
Japan, Tokyo (03) 5352 2800. **Latin America** (714) 993-8997. **Mexico,** Mexico City (625) 575 52 00.
Netherlands, Mijdrecht (31) 297 230630. **Singapore** (65) 3393633. **South Africa,** Johannesburg (011) 805-2014.
Spain, Madrid (34) 358 0051. **Sweden,** Bromma (46) 8 985320. **Switzerland,** Nyon (022) 994-0746.
Taiwan, Taipei (886) 23783456. **UK,** High Wycombe (44) 1 494 441181. **USA,** Brea, CA (800) 526-3821, (714) 993-5321.



Klinisk Kemi i Norden

Nr 2, volym 10, 1998

REDAKTIONELLT

Så kommer vi redan nedimpande i din brevlåda. Det var ju inte länge sedan sist. Men - som jag skrev i förra numret - innevarande nummer skall vara färdigt före Åbo-kongressen och färdigt är det!

Som du ser har vi fortsatt enligt tidigare uppdragna linjer. I detta nummer finns en artikel inom området "Nya tekniker på väg in till våra laboratorier" och en artikel inom området "Medisinsk publiserings". Båda artiklarna vädefulla och välskrivna. Vidare sammanfattar Göran Lindstedt från ett symposium som SFKK arrangerade i samband med Riksstämmen 1997 och som handlade om diagnosiken vid B12-brist.

Nästa nummer räknar vi med skall komma i oktober. Hör av er dessförinnan!

I föregående nummer skrev Sverre Landaas om

att NFKK skall komma på Internet med en egen hemsida. Jag har inte fått adressen ännu, men den skall nog komma snart. Emellertid hittar ni något om NFKK på SFKK:s hemsida. Dit hittar ni med adressen: swedemedsoc.se/sektioner.

Däremot finns ROSAN på nätet numer. Dit hittar ni med adressen:

www.rosan.com. Titta in där skall ni se! För att hjälpa dig litet på traven har jag tagit ut en av hjälpsidorna och återger den i detta nummer. Sedan ankommer det förstås på dig att lägga till alla dina ovanliga analyser och använda dig av registret i så stor omfattning som möjligt. Lycka till!

Så räknar jag med att vi

ses i Åbo inom kort.

Bästa hälsningar

Kristoffer Hellsing



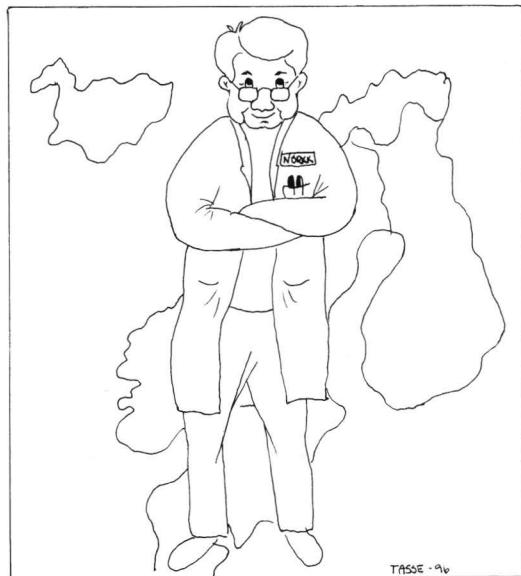
Nytt fra Styret

TOR-ARNE HAGVE

På det kommende styremøte som arrangeres i forbindelse med Nordisk kongress i Åbo er en av de viktigste sakene en diskusjon om i hvilken grad NFKK i fremtiden skal være økonomisk ansvarlig for de nordiske kongresser, og på hvilken måte NFKK da kan tenkes å være involvert mer aktivt i arrangering av kongressene. Denne saken ble aktualisert ved at Styret på forrige møte besluttet å dekke en del av underskuddet fra Torshavn-kongressen.

Styret vil også utrede nærmere NFKKs forhold til ROSAN i fremtiden. ROSAN er som kjent lagt ut på Internett (www.rosan.org) og tilgjengeligheten er derfor bedret betraktelig.

Andre viktige saker fokuserer på (1) hvordan NFKK kan bidra til å øke manuskripttilgangen til SJCLI, (2) nordisk rekommendasjon for analyse av ALP, LD, amylase, (3) NFKK på Internett, (4) logo for NFKK, (5) nordiske kurs, (6) økonomioversikt og (7) valg av ny formann. Sistnevnte sak har jo



den åpenbare konsekvens at dette er det siste Nytt fra Styret jeg skriver. Tre år som fornann i NFKK har gått raskt. Det har vært en fin tid for meg.

KAPILLÆR ELEKTROFORESE I KLINISK KJEMI

KATJA B. PRESTO ELGSTOEN og EGIL JELLUM,
Institutt for Klinisk Biokjemi, Rikshospitalet 0027-Oslo, Norge

1. Introduksjon

Kapillær elektroforese (CE) ble først introdusert av Hjerten i 1967(1). Virtanen (2) og Mikkers og medarbeidere (3) var også tidlige pionerer. Annen generasjons CE ble utviklet av Jorgensen og Lucas (4) i 1981, og deres videreutvikling av instrumentering og deteksjonssystemer fra tidlig på åttitallet danner mye av grunnlaget for moderne CE slik vi kjenner den i dag. Det første kommersielle CE instrument kom i 1988, og snart ble mange ulike CE apparater tilgjengelig. Utviklingen har imidlertid vist at det egentlig bare er 2-3 produsenter som dominerer markedet.

I dag definerer vi kapillær elektroforese om en familie av relaterte teknikker hvor det benyttes kapillærkolonner med indre diameter på mellom 20 og 150 μm .

Separasjon av analyttene skjer ved at det påsettes spenning, ofte opptil 25000V. Benyttes et 50 cm langt kapillær gir dette en elektrisk feltstyrke på 500V/cm.

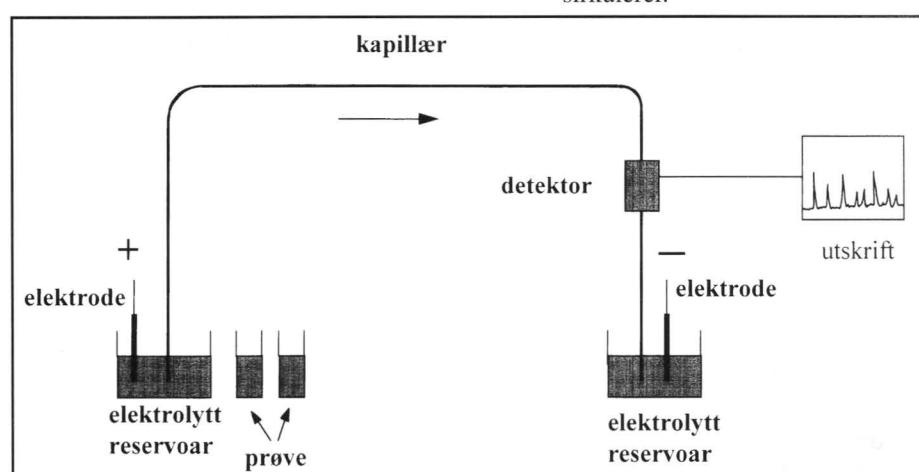
En prinsippskisse av et CE instrument er vist i fig. 1.

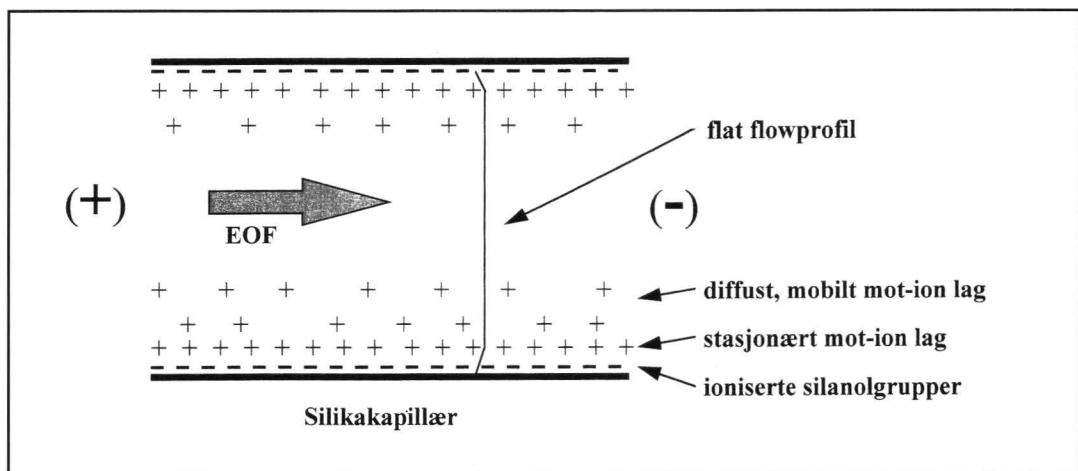
Begge endene av kapillæret er plassert i et elektrolytterservoar med separasjonselektrolytt, og kapillæret er også fylt med denne løsningen. I hvert av elektrolytterservoarene er det også en elektrode, koplet til en høyspentkilde. Generelt er injeksjonsenden ved + elektroden, og detektorenden nær - elektroden. Deteksjon gjøres som regel *on-column* ved at kapillæret er tredd gjennom detektoren.

Ved injeksjon av prøve byttes elektrolytterservoaret ut med et prøvereservoar,

og prøven injiseres ved påsetting av trykk (hydrodynamisk injeksjon) eller eventuelt spenning (elektrokinetisk injeksjon). Det finnes i dag flere kommersielle instrumenter med autoinjektorer, og en prøvekarusell med opptil 120 prøveposisjoner plasserer kapillæret i ønsket posisjon.

Det utvikles mye varme i kapillæret under analysen, og kjøling er derfor essensielt. I dag benyttes enten luftkjøling, hvor en vifte sørger for at overskuddsvarmen transportereres bort fra kapillæroverflaten, eller væskekjøling hvor kapillæret er tredd gjennom en teflonslange hvor kjølevæsken sirkulerer.





En forbindelses vandringshastighet i CE er i stor grad bestemt av dens ladning/masse forhold, og forbindelser med et stort ladning/masse forhold (størst ladningstetthet) vil ha høyest vandringshastighet.

Et viktig fenomen i kapillær elektroforese er elektroosmose, eller elektroosmotisk flow (EOF), se fig. 2.

EOF er en vandring av væske gjennom silikakapillæret, og oppstår som en følge av ionisering av silikaoverflatens silanolgrupper ved pH over ca 3,5. Til denne negativt ladede overflatene vil det assosieres positive ioner i løsningen. Utenfor dette stasjonære laget av kationer vil det assosieres et mere diffus lag av mobile kationer. Når spenningen settes på vil disse mobile positive ionene bevege seg mot den negative elektroden, og drar således hele væsken i kapillæret med seg. EOF er altså en jevn flyt av væske fra + til - elektroden i ubehandlete silikakapillær. Den resulterende flowprofilen er flat, i motsetning til den paraboliske flowprofilen som observeres i systemer hvor en pumpe presser mobilfasen igjennom kolonnen (fex. HPLC). Den flate flowprofilen i CE resulterer i at prøvesonene blir meget smale, og følgelig blir de resulterende toppene på utskriften meget smale (høye platetall).

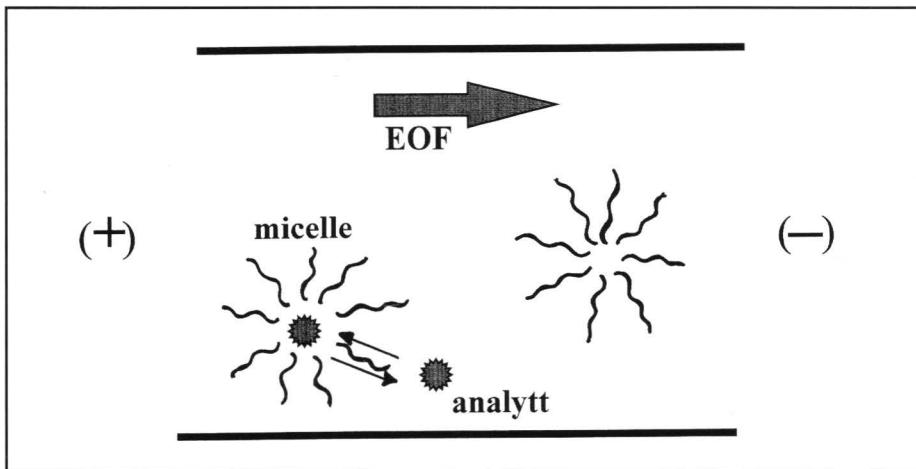
EOF påvirkes av flere faktorer, spesielt pH, og EOF øker med økende pH.

Ved pH over ca 9,5 vil så å si alle silanolgruppene på silika kapillæreroverflatene være ionisert, og en videre økning i pH utover dette vil derfor ikke øke EOF nevneverdig.

Separasjonen av forbindelsene i et kappilær

elektroforese system kan beskrives enkelt ved at vi ser for oss kapillæret som en elv. Vannet som strømmer nedover elven beskriver EOF, fra toppen av et fjell (+ elektroden) til bunnen av en dal (- elektroden). En positivt ladet forbindelse vil da være en som svømmer medstrøms (mot - elektroden) og passerer derfor detektorvinduet først. En negativt ladet forbindelse vil være en som svømmer motstrøms (mot + elektroden), men fordi strømmen i elven (EOF) er sterkere vil han drive med elven og passere detektorvinduet. En nøytral forbindelse vil være en som ikke gjør noe forsøk på å svømme i noen retning, og vil derfor drive med vannets hastighet (EOF). Med et slikt oppsett vil altså en positivt ladet forbindelse detekteres først, deretter de nøytrale, og til slutt de negativt ladede. Alle nøytrale forbindelser vil ha samme vandringshastighet, lik EOF, og vil derfor ikke separeres. Er det ønskelig med separasjon av nøytrale forbindelser, må et såkalt MEKC system benyttes (se senere).

Separasjonselektrolytten eller bakgrunnselektrolytten som den også kalles utgjør mediet separasjonen skjer i. Dette er som regel en veldig buffer som fosfat eller borat, og pH ligger som regel i området 4 til 11. Organiske additiver som acetoni-tril eller metanol kan tilsettes for å forandre selektiviteten. Generelt kan det sies at pH er absolutt den viktigste parameteren for optimalisering av en CE-separasjon. pH i separasjonsmediet vil påvirke ioniseringen av silikaoverflatene og derfor også EOF, men i tillegg vil pH avgjøre ladningen på vår analytt dersom denne er en ioniserbar forbindelse.



1.1 Micellar elektrokinetic chromatography, MEKC.

For separasjon av nøytrale forbindelser kan det tilsettes ladede miceller som SDS (sodium dodecyl sulphate) til separasjonselektrolytten, og micellene vil fungere som en mobil stasjonær fase, se fig.3. Separasjonssystemet kalles nå for *micellar electrokinetic chromatography* (MEKC). Separasjonsprinsippet blir tilsvarende omvendt fase HPLC, i det forbindelsene separeres utfra deres hydrofobe/hydrofile egenskaper.

Selektiviteten og elueringsrekkefølgen i MEKC vil som regel også stemme godt overens med resultater fra omvendt fase HPLC.

En fordel ved bruk av miceller er at det muliggjør direkte injisering av væsker med høyt proteininnhold, slik som serum.

Ulempen er at oppkonsentreringsteknikkene som er utviklet for fri sone elektroforese generelt ikke er anvendbare for MEKC.

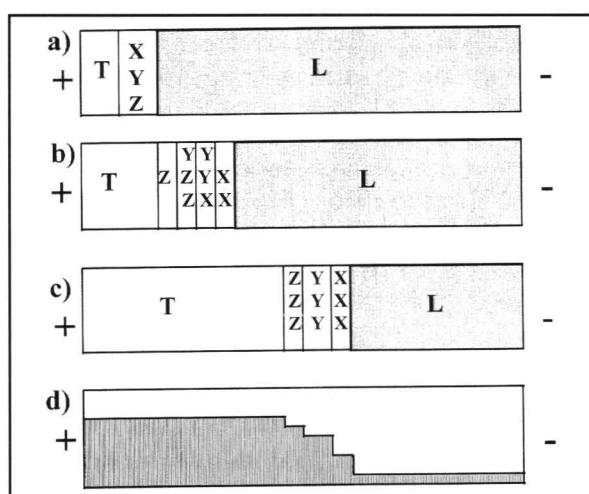
1.2 Kapillær isotachoforese, cITP

I isotachoforese (cITP), benyttes samme instrumentering som kapillær elektroforese, men separasjonen av forbindelsene skjer i et diskontinuerlig buffersystem bestående av en ledende (L) og en terminerende (T) elektrolytt. Prøven injiseres i grensen mellom disse to løsningene. En skjematiske fremstilling av et isotachoforeseseparasjon er vist i fig.4.

Som eksempel kan tas separasjon av tre kationiske forbindelser (X, Y og Z).

Kapillæret og reservoaret ved - elektroden er fylt med den ledende elektrolytten (L). Den ledende elektrolytten kationer må ha høyere mobilitet enn kationene som skal separeres, og i tillegg må anionene i denne løsningen ha en tilstrekkelig bufferkapasitet i pH området hvor separasjonen skal utføres.

Reservoaret ved + elektroden er fylt med terminerende elektrolytt (T), og kationene i denne elektrolytten må ha lavere mobilitet enn kationene som skal separeres. Når spenningen settes på (fig.4a), vil den kationiske analytten med høyest mobilitet (X) vandre raskest, og de mere langsomt migrerende analyttene (Y og Z) vil henge bak (fig.4b). Fordi kationene i den ledende elektrolytten (L) har høyere mobilitet enn analyttene, og sistnevnte vil derfor aldri migrere inn i



L-sonen. Den terminerende elektrolytten (T) på sin side inneholder bare kationer med lavere mobilitet enn analyttene, og kationene i T-sonen vil derfor ikke kunne migrere inn i prøvesonen. Prøvesonen blir på denne måten «låst fast» mellom den ledende og den terminerende elektrolytten. For å opprettholde transporten av strøm gjennom kapillæret vil kationene i prøvesonen separeres ytterligere, inntil hver sone består av kun en type kationer (fig.4c). Det er nå oppnådd en likevekt, og ingen videre forandringer vil skje i systemet. Alle sonene i kapillæret vil nå vandre med samme hastighet tilsvarende hastigheten til kationene i den ledende elektrolytten.

Den elektriske feltstyrken viser en trappeprofil langs kapillæret (fig.4d).

For separasjon av anioner benyttes nøyaktig det samme prinsipp, men L-elektrolytten er nå i reservoaret ved + elektroden og T-elektrolytten i reservoaret ved - elektroden.

1.3 Kapillær isoelektrisk fokusering, cIEF

Kapillær isoelektrisk fokusering (cIEF) er begrenset til separasjon av amfolyttiske substanser. Forbindelsene separeres her ikke etter deres forskjell i mobilitet som i de tidligere beskrevne tilfeller, men ut fra forskjell i isoelektrisk punkt (pI). Isoelektrisk punkt er den pH hvor en amfolytt har null netto ladning.

Ved denne pH foreligger de fleste amfolyttene som zwitterioner, det vil si at de både har en positivt og negativt ladet gruppe, og de vil da ikke migrere ved påsetting av et elektrisk felt. Ved lavere pH enn deres pI vil de ha en netto + ladning og migrere mot - elektroden, og ved pH over deres pI vil de ha en netto - ladning og vandre mot + elektroden. Separasjon av forbindelsene skjer ved at det benyttes en lineær pH gradient gjennom kapillæret. Denne pH gradienten oppnås ved at separasjonselektrolytten består av amfolytter med pI verdier fra lav til høy pH, som regel en blanding av polyamino- polykarboksylsyre. Når prøven injisieres vil de amfolyttiske analyttene migrere til de kommer til det pH området i kapillæret som tilsvarer deres pI. De vil nå ha en netto ladning på 0, og stopper derfor opp.

Det er mange likhetstrekk mellom isotachoforese og isoelektrisk fokusering, og begge disse teknikkene fører til meget smale prøvesoner og gir

også ofte god oppløsning mellom toppene.

1.4 CEC- kapillær elektrokromatografi

I kapillær elektrokromatografi (CEC) benyttes pakkede kapillærer. Pakkematerialet som utgjør stasjonärfasen er et kromatografisk materiale tilsvarende det som benyttes i omvendt fase HPLC, f.eks. C-18 eller C-8. Til nå har teknikken vært preget av en del praktiske problemer forbundet med å få et homogent pakkemateriale i så tynne kolonner som benyttes i CE. CEC blir allikevel sett på som en lovende teknikk for framtiden, spesielt innen farmasøytsk industri. Separasjonen utføres ved at det settes på spenning, og EOF vil dra løsningen igjennom det pakkede kapillæret. Analytten vil ha interaksjon med stasjonärfasen, og hydrofobe forbindelser vil elueres sist da disse har størst affinitet til det kromatografiske materialet. Fordelene med CEC sammenliknet med omvendt fase HPLC er den flate flowprofilen som oppnås i CE, og dette gir meget smale topper og følgelig bedre oppløsning enn tilsvarende separasjon i utført med omvendt fase HPLC.

2. Fordeler og ulemper med kapillær elektroforese

Bruken av CE har økt mye de senere årene, og antall publikasjoner har økt tilsvarende.

Dette skyldes i stor grad at teknikken har flere fordeler sammenliknet med tradisjonelle kromatografiske teknikker som gasskromatografi (GC) og væskekromatografi (LC), spesielt omvendt fase HPLC. Den kraftige veksten i bruk av CE de senere år skyldes også i stor grad at det er funnet praktiske løsninger på problemet med dårlig koncentrasjonsfølsomhet, som tidligere var en av svakhetene med teknikken.

En stor fordel ved bruk av CE er at forbruket av prøve er meget lite. Generelt injiseres mellom 2 - 10 nL prøve (!), og dette er gunstig spesielt ved analyse av biologisk materiale. Paradoksal nok er det denne fordelen som også fører til en av ulempene ved CE, relativt dårlig koncentrasjonsfølsomhet. Til nå har on-column UV deteksjon vært det mest anvendte deteksjonsprinsipp. Kapillæret er da tredd gjennom detektoren og deteksjonen skjer on-column når forbindelsene passerer detektorvinduet, i motsetning til f.eks. HPLC hvor en ekstern detektorcelle benyttes. Det vil igjen si at det

er den indre diameteren på kapillæret som bestemmer lysveien , som regel mellom 25 og 100 μ m. Sammenliknet med lysveien i en HPLC detektor celle (fra 2-10 mm) blir resultatet at det er langt færre molekyler i lysveien samtidig i CE enn i HPLC.

For å bedre konsentrasjonsfølsomheten benyttes flere forskjellige teknikker.

Dette dreier seg enten om bruk av andre detektorer enn UV og diode-array (DAD), eller om teknikker for å oppkonsentrere prøven før eller under analysen.

2.1 Bruk av andre deteksjonsprinsipper.

Det er utviklet såkalte bobleceller og Z-cellér for å øke lysveien ved UV eller DAD. Bruk av kapillærer med slike cellér bedrer deteksjonsgrensene med inntil ca. 10 ganger. For enkelte applikasjoner kan dette være tilstrekkelig, men i mange tilfeller , spesielt for applikasjoner innen klinisk kjemi vil ikke dette være nok. Bruk av laser indusert fluorescens (LIF) er gunstig for bestemmelse av fluorescerende forbindelser. Eksempler på dette er enkelte cytostatika, og deteksjonsgrensene bedres ofte med en faktor på ca 1000 ved å bruke en LIF detektor sammenliknet med UV. For forbindelser som ikke er selvfluorescerende kan derivatiseringsreaksjoner utføres for å innføre fluorescerende kromoforer på analytten. Ulempen med bruk av slike reagenser er at de er relativt dyre, og at derivatiseringstrinnet kan være tidkrevende. Kobling av massespektrometer (MS) til CE har også økt mye i bruk de senere år. Fordelen ved bruk av MS som detektor er at det muliggjør bestemmelse av forbindelser som ikke absorberer UV-lys, i tillegg til at det resulterende massespekteret gir en meget sikker identifisering av analytten. Bruk av elektrokjemisk deteksjon muliggjør også meget selektiv deteksjon av en del forbindelser.

2.2 Oppkonsentrering før eller under analysen

En av de mest brukte teknikkene for oppkonsentrering under analysen er *stacking*, hvor prøven injiseres i et organisk løsningsmiddel. Forskjell i ledningsevne mellom prøvesonen og separasjonselektrolytten vil føre til at analyttene oppkonsentreres i overgangen mellom disse to sonene. *Isotachforese* kan også gi en betydelig oppkonsentrering av analyttene.

On-line oppkonsentrering har blitt viet mye oppmerksomhet spesielt det siste året(5). Det festes da en liten enhe, en såkalt analytt-konsentrator på inngangsenden av kapillæret. Analytt-konsentratoren er pakket med et kromatografisk materiale, f.eks. C-18 eller ionebyttermateriale og prinsippet er tilsvarende fast-fase ekstraksjon. Prøven (fex. serum eller urin) injiseres i et stort volum (opp til ca. 100 μ L), og analytten vil feste seg til det kromatografiske materialet i analytt-konsentratoren, mens resten av løsningen (matriks) vil passere gjennom kapillæret og til waste. Neste steg er vasking, hvor det innføres en løsning, som regel separasjonsbufferen. Analytten vil fremdeles sitte fast på det kromatografiske materialet, mens forurensninger og resten av matriks vaskes ut av systemet. Det injiseres så et meget lite volum av et organisk løsningsmiddel, f.eks. metanol eller acetonitril. Analytten vil løsne fra materialet og føres med det organiske løsningsmiddelet inn i analysekapillæret.

Deretter settes det på spenning og analysen fullføres som normalt. Med denne teknikken kan det oppnås en oppkonsentrering med en faktor på 1000.

Denne oppkonsentreringsteknikken er spesielt interessant for analyse av fysiologiske væsker, hvor konsentrasjonen av analytten ofte er meget lav.

3. Sammenlikning med andre kromatografiske teknikker

3.1 Sammenlikning CE og HPLC :

Mange av separasjonene som utføres på HPLC i dag kan gjøres ved bruk av CE.

De store fordelene med CE i denne sammenhengen er et meget lavt forbruk av løsninger, og spesielt organiske løsningsmidler. Det kan enkelt forstås når vi vet at total volum et av en kapillærelektroforese-kolonne er noen få microliter (μ L). Analysekostnadene for en CE separasjon ligger generelt på 1-2% av de samme utgifter ved bruk av omvendt fase HPLC.

Kolonnmaterialet er vesentlig billigere enn HPLC- kolonne og kan generelt brukes til minst like mange analyser.

En annen fordel er at selektivitet og analysetid enkelt kan justeres i CE ved å variere kapillærer lengde og sammensetning av separasjonsbuffer. Ved overføring av en applikasjon fra omvendt fase

HPLC til CE benyttes generelt MEKC.

Vi kan da optimalisere separasjonen både ved å forandre separasjonselektrolytten, men også ved å justere konsentrasjonen av den mobile stasjonærfasen (f.eks. konsentrasjonen av SDS). Skal selektiviteten forandres i omvendt fase HPLC på stasjonærfasenivå må som kjent analysekolonnen byttes ut, og en kolonne med annen stasjonær fase benyttes med de kostnadene det medfører.

Det er altså enkelt og billig å optimalisere en MEKC separasjon, og analysetiden er ofte kortere enn tilsvarende analyser oppnådd ved omvendt fase HPLC.

På tilsvarende måte kan optiske isomerer og endo-exo isomere forbindelser separeres ved CE ved tilsetning av forskjellige additiver som cyklo-dextriner til separasjonsbufferen.

3.2 Sammenlikning CE og GC

En forutsetning for at forbindelser skal kunne analyseres med GC er at de er flyktige. En del små forbindelser er flyktige, mens storparten av analyttene må derivatiseres for å bli flyktige nok for GC-analyser.

Derivatiseringsreagenser er generelt kostbare, i tillegg til at derivatiseringsprosedyren som sådan kan være tidkrevende.

Kravet om at analytten skal være flyktig fører også til en molekylvektsbegrensning, og forbindelser med molekylvekt høyere enn ca. 500 analyseres derfor vanligvis ikke med GC.

For CE analyser er det ingen slike krav til analytens fysiske egenskaper, og teknikken kan brukes til å analysere alt fra små uorganiske ioner til høymolekylære forbindelser som proteiner og DNA fragmenter. Selektiviteten oppnådd i CE vil generelt være annerledes enn selektiviteten oppnådd i GC. Dette skyldes at vi i CE separerer ut fra forbindelsenes ladningstetthet, hydrofobisitet eller stereokjemi avhengig av sammensetningen av separasjonsbufferen, mens i GC separeres forbindelser generelt utfra forskjeller i kokepunkt.

4. Anvendelser i klinisk kjemi

Selv om prinsippet for CE har vært kjent i mange år, og kommersielle instrumenter har vært på markedet i 10 år, er det først i den siste tiden

teknikken begynner å finne sin plass i klinisk kjemi.

I det følgende skal vi kort omtale noen av de områder hvor CE trolig vil bli nytte i økende grad i tiden fremover. For lesere som vil gå mer i dybden henvises det til et spesialnummer i journalen «Electrophoresis»(6), og et spesial nummer i J. Chromatography B(7). Det kan også henvises til en oversikts artikkel: CE in medical diagnosis(8).

4.1 Serumproteiner

Elektroforetisk separasjon av serumproteiner ble første gang utført i 1951(9), og har i årene siden fått en viktig plass i diagnostikk av en rekke tilstander, for eksempel påvisning av monoklonal komponent ved myelomatose. Papir var det første separasjonsmedium, etterfulgt av cellulose acetat og agarose gel som dominerer i dag. På 70-tallet ble det introdusert mer høyoppløslige metoder som polyacrylamid gelelektronforese, SDS elektroforese og kombinasjonen av disse til høy opplosnings 2D elektroforese, som separerer 727 serumproteiner, som polypeptidkjeder(10).

Ingen av disse metodene nytes i rutine klinisk kjemi, og fremdeles er det den klassiske elektroforesen som gir 8-10 bånd av serum proteiner som dominerer.

Tidlig på 90-tallet ble det vist at CE også kunne nytes til analyse av serumproteiner, og ga et mønster som nærmest var identisk med klassisk elektroforese (11). I 1996 ble det første spesiallagede CE instrument dedisert til serum protein bestemmelse lansert (Beckmann Paragon 2000). Dette instrumentet har 7 parallelle kolonner med hver sin tilhørende UV-detektor, og har en kapasitet på 40-50 analyser per time. Fordi UV deteksjon nytes, blir farging/avfarging unødvendig, og man får direkte kvalitative og kvantitative resultater.

Flere studier (12,13) samt egen erfaring viser god overensstemmelse mellom klassisk elektroforese og CE analyse. Vi har imidlertid observert at dersom et serum inneholder litt fibrinogen, vil dette oppdages på agarose, men maskeres ved bruk av CE (14).

CE kombinert med immunostraksjon er velegnet til å identifisere monoklonale komponenter, og her utnyttes fordelen med flere kolonner i parallel. Serum tilsettes immobilisert anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa og anti-lambda, og

supernatanten analyseres deretter med CE. Et typisk resultat er vist i fig.5, som identifiserer den monoklonale komponenten 15 år før diagnose av myelomatose (16).

Denne pasienten hadde gitt blod til Janus-banken (15), og analyse av sera samlet i flere år før klinisk diagnose påviste den monoklonale komponenten 15 år før diagnose av myelomatose (16).

Det samme fant vi for en rekke andre kasus i Janusmaterialet.

Det er nå flere laboratorier som nyter CE i rutinebestemmelse av serum proteiner, og man kan utføre over 300 analyser per dag. Dette er en overkapasitet for mange laboratorier. Selv om instrumentet er relativt kostbart i innkjøp, vil det på den annen side være arbeidsbesparende, og vil kunne frigi verdifull arbeidskraft til andre formål. Man

kan også reise spørsmålet hvorvidt bruk av serumprotein analyse med høy kapasitet CE kan nyttes på nye måter, for eksempel til screeningformål..

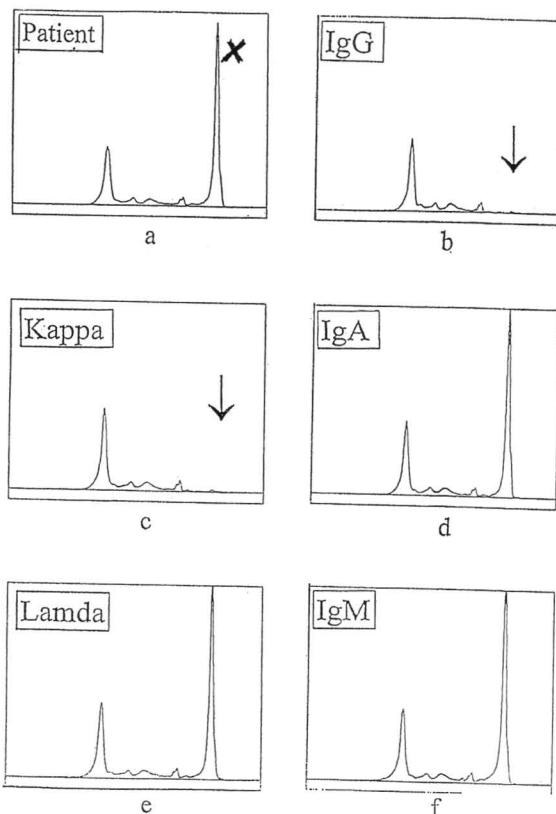
4.2 Proteiner i spinalvæske

CE er nylig blitt nyttet til å separere proteiner i CSF(17). Den store fordelen er at svært lite spinalvæske trenges, kun 20 µL sammenliknet med 2-4 mL som er nødvendig til klassisk agarose gel elektroforese. I begge tilfeller må det gjøres en oppkonsentrering. Det er imidlertid meget som tyder på at man om ikke lenge oppnår tilstrekkelig følsomhet med CE til å kunne injisere spinalvæske direkte uten noen form for prøveforbehandling. En viktig anvendelse av CSF elektroforese er påvisning av oligoklonale bånd i gammaregionen, som indikasjon på multippel sclerosis. CE synes å kunne påvise slike oligoklonale immunoglobuliner minst like godt som klassisk elektroforese (18), og det er dessuten p.g.a gode kvantiteringsmuligheter relativt enkelt å bestemme «CSF-index» (ratio albumin i CSF/serum).

4.3 Hemoglobinvarianter

Flere laboratorier har rapportert separasjon av ulike hemoglobintyper ved hjelp av CE. Best resultat oppnås ved å bruke CE i modus cIEF. Hempe og medarbeidere (19) publiserte nylig et omfattende arbeide hvor for eksempel HbA₂, HbS, HbF, HbA₀ og HbA_{1c} var meget godt adskilt. Denne gruppen viste at CE med fordel kan brukes til: a) påvisning av postsyntetisk modifisert Hb tilstede i små mengder i normalt blod; b) dannelse av Hb oksydasjonsprodukter ved inadekvat prøvebehandling og lagring; c) differensialdiagnose av S/β⁻ thalassemi, G-Philadelphia trait, S/C Harlem sykdom og Hb-H sykdom; d) sensitiv deteksjon av uvanlige varianter, eks. HbA_{2'} som indikator på mutasjon av alfa-globin genet; og e) kanskje

IDENTIFICATION OF THE MONOCLONAL, UNKNOWN COMPONENT X IN THE PATIENT



Conclusion: X = IgG, Kappa

frem for alt at cIEF er meget velegnet til neonatal screening ved å bruke blod spots på filtrerpapir. Konklusjonen er at cIEF bestemmelse av Hb varianter er en metodikk som mange kliniske laboratorier vil kunne dra nytte av i tiden fremover.

4.3.1 HbA1c målinger har vært nyttet i mer enn 20 år til kontroll av diabetes pasienter. En rekke ulike rutinemetoder nytes, men til nå er det ingen av disse som oppfyller de internasjonale krav som stilles til en referanse metode. Nylig publiserte Kobold og medarbeidere (20) en analyseteknikk, som kommer til å bli IFCC's referansemetode for HbA1c. Kort skissert starter man med erythrocytter som hemolyseses, og endoproteinase Glu-C tilsettes for å spalte betakjeden slik at man får beta-N-terminale hexapeptider av HbA1c og HbA0. Disse peptidene separeres og måles kvantitativt på to måter: a) med HPLC-massespektrometri eller b) med HPLC-CE. Begge er kandidater til referansemetode, og evalueres for tiden av IFCC Working Group on HbA1c Standardization (se ref.20).

4.4 Lipoprotein analyse

Lipoprotein analyser og triglycerid bestemmelse utføres som kjent i et betydelig antall i alle klinisk kjemiske laboratorier i forbindelse med evaluering av risikofaktorer for hjerte/kar sykdom. Metoder til måling av totalkolesterol, HDL, LDL samt apoproteiner utføres med tildeles høyt automatisert utstyr. I de senere årene er man imidlertid blitt klar over at de tradisjonelle lipoprotein klassene består av flere undergrupper (for eksempel HDL2 og HDL3, tette LDL partikler, etc.) som kan ha betydning for utvikling og forståelse av kardiovaskulær sykdom. Flere forskningsgrupper utvikler nå CE-metodikk til lipoproteinanalyser, og resultatene ser lovende ut. Den prinsipielt enkleste metoden er beskrevet av Schmitz og medarbeidere (21). Lipoproteinene merkes først med et fluoriserende fargestoff (NBD-ceramide) før separasjon med cITP, som gir 9 hovedfraksjoner. HDL separeres i 3 hovedgrupper: En hurtig migrerende HDL som inneholder hovedsakelig apo A-I og fosfatidylcholin; En noe mer langsom fraksjon som består av partikler rike på kolesterol, apo A-II, apo E og apo C; og den siste HDL fraksjonen består av apo A-I, apo A-IV og LCAT. CE/cITP separerer chylomikron, VLDL, IDL og LDL i flere fraksjoner. Schmitz og hans gruppe ved klinisk kjemisk

avdeling, Regensburg universitet, konkluderer med at analytisk cITP er et verdifullt verktøy til rask (separasjonstid 6 min), pålitelig, og automatisert bestemmelse av lipoprotein-profiler i det kliniske laboratorium.

Macfarlane og medarbeidere (22) har under utvikling et meget avansert system for lipoprotein analyse hvor CE spiller en sentral rolle. Programmet nyter både ultrasentrifugering, SDS-CE analyse og CE-elektronspray massespektrometri og gir detaljert informasjon både om intakte lipoproteiner og apoproteiner. Deler av dette kompliserte systemet nytes nå ved Scott & White Memorial Hospital i Texas til utredning av risikopasienter for hjerte/kar sykdom.

4.5 DNA analyser

Et felt hvor CE spiller en stadig større rolle, er til DNA analyser. Man nyter CE istedenfor den tradisjonelle polyacrylamid gel elektroforesen. Eksempelvis er CE noe brukt i det humane genomprosjektet til effektiv sekvensering. CE nytes også til separasjon av PCR produkter og kan brukes i mutasjonsanalyser (23). En anvendelse som kan være av interesse for klinisk kjemi, er apo E typing ved hjelp av CE analyse av restriksjonsfragmenter.

4.6 Homocystin

Øket serumnivå av aminosyren homocystin er i de senere årene funnet å være en risikofaktor for tromboseutvikling. Den mest brukte metode til å måle homocystin har vært HPLC, etter frigjøring av proteinbundet homocystin og derivatisering. Det er nylig beskrevet en metode (24) som nyter CE isteden for HPLC. Imidlertid er det nå utviklet immunkjemiske metoder, som trolig vil erstatte kromatografi og elektroforese.

4.7 Uorganiske ioner

Bestemmelse av totalt og ionisert Ca og Mg ved bruk av CE (25,26) har vist seg å gi gode resultater. Resultatene er samsvarende med resultatene man finner ved bruk av ionespesifikke elektroder for ionisert kalsium, og atom absorpsjon for total-kalsium. Separasjon av mange uorganiske kationer, NH₄⁺, Na⁺, Li⁺, Ca⁺⁺ og Mg⁺⁺ har også blitt vist ved bruk av indirekte UV-deteksjon (27).

Imidlertid er det lite sannsynlig at CE til måling

av elektrolytter vil få særlig praktisk nytte i klinisk kjemi.

4.7.1 NO/NO₃

Nitrogenoksid har blitt identifisert som en mediator for mange cellefunksjoner som signaloverføring og fagocytose. Nitrogenoksid blir raskt oksidert til nitritt og nitrat i blodet. Serumnivået av nitrat øker etter sepsis, og urinnivået øker ved nefrotisk syndrom hos barn. Urinnivået av nitrat synker etter preeclampsia. Nitrat/kreatinin ratioen i urin blir signifikant økt (ca. 3X) hos pasienter med rheumatoid arteritt og ca 10X hos pasienter med infektiøs gastroenteritt. Urinnivået av nitrat og også nitritt har blitt bestemt ved bruk av CE (28). Videre har plasma NO₂ og NO₃ blitt bestemt med CE (29), samt serum NO₂/NO₃ (30). I disse arbeidene

konkluderes det med at CE er raskere og billigere for nitratanalyser sammenliknet med enzymatiske metoder.

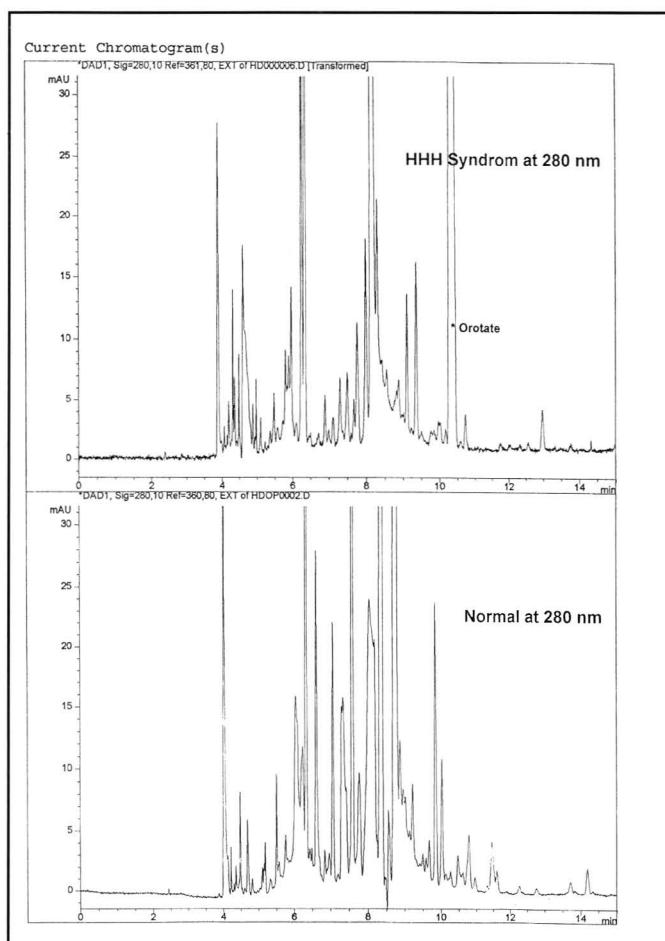
4.8 Organiske syrer

CE har vist seg å være en meget godt egnet teknikk for å bestemme forskjellige organiske syrer i biologiske prøver. Tradisjonelt har GC-MS blitt brukt for denne typen analyser, og de fleste rutineanalyser av organiske syrer skjer i dag ved bruk av GC-MS. Selv om denne teknikken fungerer godt, kreves både en tidkrevende prøveopparbeitelse (ekstraksjon og derivatisering), i tillegg til at analysestiden er lang (ca. 90 min). Vi har vist at CE med diode array (UV)-deteksjon er et potensielt raskere og enklere alternativ til GC-MS ved analyse av organiske syrer i urin (31,32,33).

I fig.6 er det vist at orotsyre, som er relativt vanskelig å måle med GC-MS, lett kan bestemmes med CE.

Den benyttede CE metoden gjør bruk av en separasjonsbuffer med meget høy ionestyrke, og dette muliggjør direkte injeksjon av urinprøvene uten noen form for prøveopparbeitelse. Omkring 50 metabolitter ble separert på ca. 15 min. De diagnostiske metabolittene ble identifisert ved sammenlikning av diodearray spektra og migrasjonstid med tilsvarende sett av data for standarder. Kobling av CE til en MS detektor vil utvide mulighetene ytterligere, da MS-detektoren vil kunne identifisere diagnostiske metabolitter som ikke absorberer lys.

Andre eksempler kan nevnes som bestemmelse av citrat og oxalat i urin, - sistnevnte er viktig ved dannelse av nyresten. Disse syrene er tilligge bestemt ved bruk av flere andre teknikker, men metodikken har vært preget av problemer med interferenser og har også krevet flere kompliserte prøveopparbeitings-trinn. CE metoder er utviklet for citrat og oxalat, både ved bruk av indirekte UV-deteksjon (34,35) og ved direkte UV deteksjon (36).



Bestemmelse av fumarat, acetat, pyruvat, laktat, ascorbat, og glutamin i cerebrospinalvæske (CSF) på under 10 min. er også rapportert ved bruk av CE (37).

Ved bruk av CE med indirekte UV-deteksjon kan pyruvat, citrat, malat, laktat og acetoacetat også enkelt bestemmes i serum (38).

4.9.1 Metyl malon syre (MMA)

Metyl malonsyre er et sensitivt mål for vitamin B12 og folysyre - mangel, og forandringer i serum-nivået av MMA inntrer før forandringen i serum-vitaminnivået. MMA nivået er dramatisk økt hos pasienter med den sjeldne sykdommen methylmalonsyremi. MMA er en liten organisk syre med dårlige lysabsorberende egenskaper. For bestemmelse av denne syren i serum hvor konsentrasjonen er lav må derfor en derivatiseringsreaksjon utføres først.

På Haukeland Sykehus utføres nå MMA analyser rutinemessing ved bruk av CE (39), og Marsh og Nutall har vist at CE er egnet for bestemmelse av MMA i urin (40).

4.10 karbohydrater

De fleste karbohydrater er ikke ladet ved pH under ca 12, og selv ved slike ekstreme pH verdier er det en del karbohydrater som ikke ioniseres. I tillegg mangler de fleste sukkertyper kromoforer egnet for direkte UV-deteksjon. Man skulle utfra dette tro at karbohydrater ikke er spesielt egnet for CE analyser. Det er allikevel vist av mange forskjellige forskningsgrupper at bestemmelse av karbohydrater meget vellykket kan utføres ved bruk av CE (41).

Glucose står for den høyeste konsentrasjonen av enkle karbohydrater i serum, men andre sukkerre og deres korresponderende alkoholer og syrer er tilstede i lavere konsentrasjoner. Mange av karbohydratene kan bestemmes i serum med CE-indirekte UV (42,43). For direkte UV-deteksjon kan karbohydratene derivatiseres med et UV absorberende reagens (se ref. 41). For å bedre selektiviteten benyttes også ofte borat i separasjonselektrolytten. Borat anionet danner stabile 1:1 kompleks med cis-diolgrupper på sukkermolekylene.

4.11 Steroider, østrogener

Antall publikasjoner som beskriver CE analyser av hormoner har økt mye de siste årene. Da dette generelt er forbindelser med hydrofobe egenskaper, er det stort sett MEKC metoder som er utviklet.

Mange steroider, som kortison og østrogener kan bestemmes ved bruk av MEKC (SDS-miceller) (44). Videre er separasjon av fritt og bundet serum kortisol beskrevet (45,46). Andre eksempler er MEKC-separasjon av mange steroider, blant disse kortisol, kortikosteron, kortison, progesteron og testosteron på under 10 min.(47), samt bestemmelse av østron, østradiol og østriol i urin (48).

4.12 Aminosyrer

Analyser av aminosyrer kan være relativt komplisert, da aminosyrer har store strukturelle likheter i tillegg til at det som regel foreligger både basiske, sure og nøytrale aminosyrer i blanding. De fleste biologiske prøver inneholder i tillegg andre forbindelser med amino-grupper samt små peptider som kan interferere med separasjonen.

CE vil trolig ikke med det første kunne konkurrere med kommersielle aminosyrealysatorer som i dag benyttes i det kliniske laboratoriet for rutineanalyser, med det er vist en rekke eksempler på at CE i spesialtilfeller kan være et godt alternativ (49).

Referanser

- (1) Hjerten, S., *Chromatogr. Rev.*, 1967, Rev. 9, 122-219.
- (2) Virtanen, R., *Acta Polytech. Scand. Ch.*, 1974, 123, 1-67.
- (3) Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Verheggen, T. P. E. M., *J Chromatogr. A* 1979, 169,11-20.
- (4) Jorgenson, J. W., og Lucas, K. D., *Clin. Chem* 1981, 27, 1551-1553.
- (5) Guzman, N. A., Park, S. S., Schaufelberger, D., Hernandez, L., Paez, X., Rada, P., Tomlinson, A. J., Naylor, S., *J. Chromatogr. B* 1997, 697, 37-66.
- (6) *Electrophoresis* 1997, vol.10.
- (7) *J.Chromatogr. B* 1997, vol. 697.
- (8) Jellum, E., *J. Capil. Electroph.* 1994, 1, 97-105.
- (9) Durrum, E.L., *J. Am.Chem. Soc.* 1951 , 73, 4875-4880.
- (10) Anderson, N. L., og Anderson, N. G., *Electrophoresis* 1991, 12, 883-906
- (11) Chen, F. T., Liu, C.M., Hsieh, Y.Z., og Sternberg, J.C., *Clin.Chem.* 1991, 37, 14-19
- (12) Jolliff, C. R., og Blessum, C. R., *Electrophoresis* 1997, 10, 1781-1784.

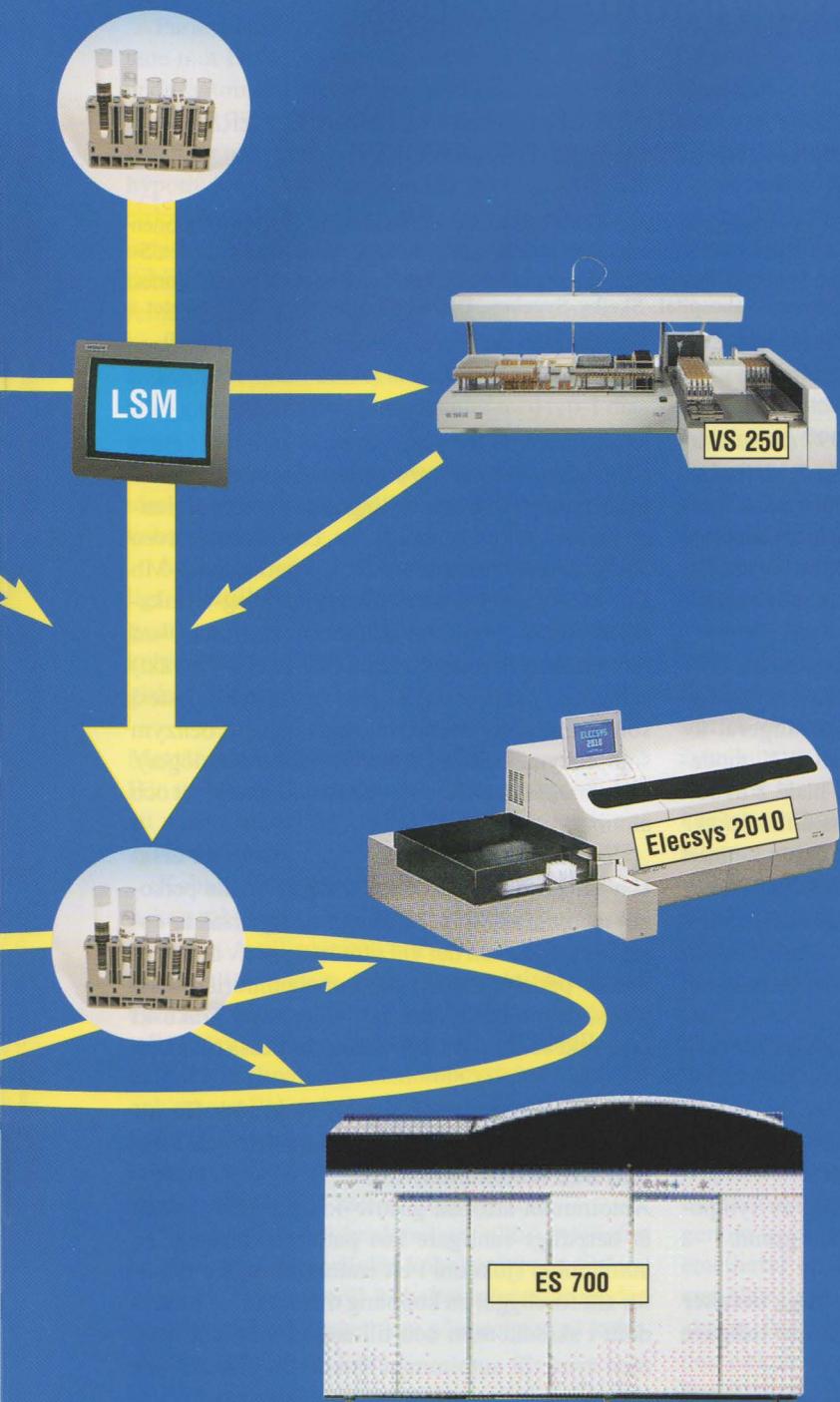
- (13) Lehmann, R., Voelter, W., Liebich, H. M., *J. Chromatogr. B* 1997, 697, 3-35.
- (14) Jellum, E., Dollekamp, H., og Blessum, C., *J. Chromatogr. B* 1996, 683, 55-65.
- (15) Jellum, E., Andersen, Aa., Lund-Larsen, P., Theodorsen, L., og Ørjasæter, H., *Environmental Health Perspectives* 1995, 103 (supplement 3), 85-88.
- (16) Jellum, E., Dollekamp, H., Brunsvig, A., og Gislefoss, R., *J. Chromatogr. B* 1997, 689, 155-164.
- (17) Oda, R. P., Clark, R., Katzmann, J.A., Landers, J. P., *Electrophoresis* 1997, 10, 1709-1714.
- (18) Katzmann, J. A., Sanders, E., Clark, R., Oda, R. P., og Landers, J. P., presentert under HPCE 98, Orlando, Fl., USA, 1-5 februar 1998.
- (19) Hempe, J. M., Granger, J. N., Craver, R. D., *Electrophoresis* 1997, 10, 1785-1795.
- (20) Kobold, U., Jeppsson, J-O., Dulffer T., Finke, A., Hoelzel, W., Miedema, K., *Clin. Chem.* 1997, 43, 1944-1955.
- (21) Schmitz, G., Mollers, C., og Richter, V., *Electrophoresis* 1997, 10, 1807-1813.
- (22) Macfarlane, R.D., Bondarenko, P. V., Crockill, S. L., Cruzado, I. D., Koss, W., McNeal, C. J., Spiekerma, A. M., og Watkins, L. K., *Electrophoresis* 1997, 10, 1796-1806.
- (23) Righetti, P. G., og Gelfi, C., *J. Chromatogr. B* 1997, 697, 195-205.
- (24) Kang, SH, Kim, J. W., Chung, D. S., *Pharm. Biomed. Anal.* 1997, 9-10, 1435-1441.
- (25) Zhang, R., Shi, H., Ma, Y., *J. Microcol. Sep.* 1994, 6, 217-221.
- (26) Oehrle, S. A., *J. Chromatogr. A* 1996, 745, 87-92.
- (27) Riviello, J. M., Harold, M. P., *J. Chromatogr. A* 1993, 652, 385-392.
- (28) Janini, G. M., Chan, K. C., Muschik, G., Isaaq, H. J., *J. Chromatogr. B* 1994, 657, 419-423.
- (29) Leone, A. M., Francis, P. L., Rhodes, P., Moncada, S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994, 200, 951-957.
- (30) Udea, T., Maekawa, T., Sadamitsu, D., Oshita, S., Ogino, K., Nakamura, K., *Electrophoresis* 1995, 16, 1002-1004.
- (31) Jellum, E., Dollekamp, H., Blessum, C., *J. Chromatogr. B* 1996, 683, 55-65.
- (32) Jellum, E., Dollekamp, H., Brunsvig, A., Gislefoss, R., *J. Chromatogr. B* 1997, 689, 165-174.
- (33) Presto Elgsto, K. B., og Jellum, E., *Electrophoresis* 1997, 18, 1857-1860.
- (34) Holmes, R. P., *Clin. Chem.* 1995, 41, 1297-1301.
- (35) Wildman, B. J. Jackson, P.E., Jones, W. R., Alden, P. G., *J. Chromatogr. A* 1991, 546, 459-466.
- (36) Shirao, M., Futura, R., Suzuki, S., Nazakawa, H., Fujita, S., Maruyama, T., *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 247-251.
- (37) Hiraoka, A., Junichiro, A., Tominaga, I., Hattori, M., Sasaki, H., Arato, T., *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 243-246.
- (38) Dolnik, V., Dolnikova, J., *J. Chromatogr. A* 1995, 716, 269-277.
- (39) Schneede, J., Ueland, P. M., *Anal. Chem.* 1995, 67, 802-819.
- (40) Marsh, D. B., Nutall, K. L., *J. Capil. Electrophor.* 1995, 2, 63-67.
- (41) El Rassi, Z., Mechef, Y., *Electrophoresis* 1996, 17, 275-301.
- (42) Lee, Y., Lin, T., *J. Chromatogr. B* 1996, 681, 87-97.
- (43) Xu, X., Kok, W. T., Poppe, H., *J. Chromatogr. A* 1995, 716, 231-240.
- (44) Vomastova, L., Miksik, I., Deyl, J., *J. Chromatogr. B* 1996, 681, 107-113.
- (45) Schmalzing, D., Nashabeh, W., Yao, X., Hhatre, R., *Anal. Chem.* 1995, 67, 606-612.
- (46) Schmalzing, D., Nashabeh, W., Fuchs, M., *Clin. Chem.* 1995, 41, 1403-1406.
- (47) Abubaker, M. A., Bissell, M. G., Peterson, J. R., *J. Capil. Electrophor.* 1995, 2, 105-110.
- (48) Ji, A., Nunez, M.F., Machacek, D., Ferguson, J.E., Lossi, M.F., Kao, P. C., Landers, J.P., *J. Chromatogr. B* 1995, 669, 15-26.
- (49) Chan, K., Isaaq, H. J., *Electrophoresis* 1995, 16, 467-480.

Konsolidering och Integrering

| | |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| ALAT | Järnbindande kapacitet, omättad |
| Albumin | Kalium |
| Albumin, läggradig | Karbamazepin |
| Amfetamin | Klorid |
| Ammoniak | Kokain |
| α Amylas | Kolesterol |
| α Amyas, pankreas-isoenzym | Kolesterol, HDL-fraktion |
| Antitrombin III | Kolesterol, LDL-fraktion |
| α 1-Antitrypsin | Kolinesteras |
| Apolipoprotein A1 | Komplement, C3 |
| Apolipoprotein B | Komplement, C4 |
| Apolipoprotein Lp(a) | Kreatinin |
| ASAT | Laktat |
| Barbiturater | LD |
| Bensodiazepiner | LD1, isoenzym |
| Bikarbonat | Lipas |
| Bilirubin | LSD |
| Bilirubin, konjugerat | Magnesium |
| Calcium | Metadon |
| Cannabis | α 1-Mikroglobulin |
| Ceruloplasmin | β 2-Mikroglobulin |
| CK | Myoglobin |
| CK-MB kat. | Natrium |
| CRP | Opiater |
| D-dimer | Orosomukoid |
| Digitoxin | Propoxifen |
| Digoxin | Protein C akt. |
| Etanol | Protein, tot. |
| Fencyklidin | Reumatoidfaktor |
| Fenobarbital | Salicylat |
| Fenytoin | anti-Streptolysin O |
| Ferritin | Teofyllin |
| Fibrinogen | Tobramycin |
| Folat | Transferrin |
| Fosfat | Transferrin, kolhydratbrist |
| Fosfatas, alkalisk | Transtyretin |
| Fosfatas, alkalisk, skelett-isoenzym | Triglycerid |
| Fosfatas, sur | Urat |
| Fosfatas, sur, tartrathämbar | Urea |
| Fruktosamin | Valproat |
| Gentamicin | Vitamin B12 |
| Glukos | |
| GT | |
| Haptogloblin | |
| HbA1c | |
| Immunglobulin A | |
| Immunglobulin G | |
| Immunglobulin M | |
| Immunglobulin, lätt kedja, kappa | |
| Immunglobulin, lätt kedja, lambda | |
| Järn | |



för det stora laboratoriet



Roche Diagnostics Scandinavia AB

Box 147

161 26 Bromma

Tel. 08-404 88 00

Fax 08-98 44 42



Diagnostics

AFP
 CA 125
 CA 15-3
 CA 19-9
 CA 72-4
 CEA
 CK-MB massa
 Cyfra 21-1
 Digoxin
 Ferritin
 Fibrinmonomer
 Folat
 FSH
 HbA1c
 HCG
 anti-HAV
 anti-HAV IgM
 anti-HBc
 anti-HBc IgM
 HBe
 anti-HBe
 HBsAg
 anti-HBs
 anti-HCV
 anti-HIV
 HIV p24 Ag
 IgE, tot.
 Insulin
 Kortisol
 LH
 Myoglobin
 Osteocalcin
 Prolaktin
 Progesteron
 PSA
 PSA, fritt
 Testosteron
 Troponin T
 T3
 T3, fritt
 T4
 T4, fritt
 TSH
 anti-TSH recept
 Tyreoglobulin
 anti-Tyreoglobu
 anti-Tyreoidape
 oxidas
 Vitamin B12
 Östradiol

Symposierapport

”Hur ska vi utreda vitamin B12-brist?”

GÖRAN LINDSTEDT,¹ PIA BURMAN,² ANDERS LINDGREN,³ LENNART PERSSON,⁴ KARSTEN RASMUSSEN,⁵ JÖRN SCHNEEDE,⁶ BIRGITTA SWOLIN¹

¹Institutionen för laboratoriemedicin (Avdelningen för klinisk kemi och transfusionsmedicin) och ⁴Institutionen för klinisk neurovetenskap (Neurologiska kliniken), Göteborgs Universitet, Sahlgrenska Universitetssjukhuset, S-413 45 Göteborg; ²Pharmacia & Upjohn, S-112 87 Stockholm; ³Medicinska kliniken, Lasarettet, S-501 82 Borås;

⁵Klinisk biokemisk afdeling, Århus Universitetshospital, Skejby Sygehus, DK-8200 Århus N; ⁶Universitetet i Bergen, Institutt for farmakologi og toksikologi, Armauer Hansens Hus, Haukeland Sykehus, N-5021 Bergen.

Vid Medicinska Riksstämmans 1997 diskuterades utredningsgången för vitamin B12 (kobalamin)-brist mellan företrädare för endokrinologi, klinisk kemi, medicinsk gastroenterologi och neurologi. Bl a betonades vikten av att definiera de medicinska målen för utredningen.

Vid Svenska Läkaresällskapets Riksstämma 1997 avhölls ett symposium i Victoriahallen kring diagnostiken av vitamin B12-brist, arrangerat av Svensk Förening för Klinisk Kemi (SFKK, moderator Göran Lindstedt). Symposiet hade 3 avdelningar: *När bör vitamin B12-brist misstänkas?* (Birgitta Swolin: Hämatologiska aspekter; Lennart Persson: Neurologiska aspekter), *Metabola konsekvenser av vitamin B12-brist. Diagnostiska möjligheter* (Jörn Schneede: Vitamin B12-bristens och folatbristens patofysiologi; Karsten Rasmussen: Metylmalonat och homocystein i plasma) samt *Etiologiska överväganden och diagnostiska konsekvenser* (Anders Lindgren: Uppkomstmekanismer för vitamin B12-brist: diagnostiska konsekvenser; Pia Burman: Autoimmun atrofisk gastrit och relaterade endokrina sjukdomar).

Här följer en kort sammanfattning av symposiets rekommendationer och deras bakgrund.

Atrofisk gastrit och coeliaki är viktiga orsaker till vitamin B12 (kobalamin)-brist hos tidigare friska personer med normal diet

Risk för utveckling av kobalaminbrist föreligger hos patienter med låg tillförsel av vitamin B12 till kroppens celler och/eller ökad förbrukning i cel-

lerna. Exempel för vuxna är *nedsatt födotillförsel* (vegan diet), *nedsatt absorption* (kronisk atrofisk gastrit, långvarig behandling med syrareducerande medel, tarmväggsskada, ex. coeliaki som även förekommer vid dermatitis herpetiformis, Mb Crohn-ileit samt operativa ingrepp i mag-tarmkanalen som gastrektomi och tarmresektion), *ökad förbrukning i tarmen* (mask, bakteriell överväxt) samt *ökad inaktivering i cellerna* (lustgasanestesi som inaktiverar metioninsyntas, såväl coenzym som enzym, och genererar kobalaminanaloger). *Ökat kobalaminbehov* föreligger vid graviditet och amning.

Kronisk atrofisk gastrit är den viktigaste orsaken till kobalaminbrist hos tidigare friska personer med normal diet. En annan viktig orsak är coeliaki. Därför kan det vid utredningen av den vanligaste patientgruppen där kobalaminbrist misstänks, dvs. medelålders och äldre, vara praktiskt att direkt söka efter hållpunkter för dessa tillstånd.

Vilka patientgrupper har en ökad risk för att utveckla autoimmun atrofisk gastrit och vitamin B12 (kobalamin)-brist?

Autoimmun atrofisk gastrit och perniös anemi är betydligt vanligare hos patienter som har en autoimmun sjukdom i ett endokrint organ. Framför allt föreligger en koppling till autoimmun sjukdom i sköldkörteln och till autoimmun diabetes, men även till autoimmun sjukdom i binjurar och bisköldkörtlar samt till vitiligo och alopeci. Vid dessa sjukdomstillstånd tycks den autoimmuna gastriten uppkomma tidigare och/eller progredie-

ra snabbare än i den övriga befolkningen, vilket leder till att även unga och medelålders individer kan drabbas av perniciös anemi.

Parietalcellsantikroppar (dvs. antikroppar riktade mot H⁺/K⁺-ATPas) är markörer för en pågående autoimmun process i magslemhinnan och finns hos ungefär 5% av normalpopulationen. Hos patienter med den i Sverige vanligaste orsaken till hypothyreos, den autoimmuna thyreoiditen, har cirka en tredjedel antikroppar mot parietalceller, och 4-10% utvecklar perniciös anemi. Hos patienter med Graves' thyreotoxikos har ungefär en femtedel parietalcellsantikroppar och 2% perniciös anemi. Att döma av förekomsten av parietalcellsantikroppar i blodet är den atrofiska gastriten c:a 4 gånger vanligare hos patienter med typ-1 diabetes.

Hos dessa sjukdomsgrupper bör man alltså vara särskilt uppmärksam på symptom förenliga med kobalaminbrist.

Av klinisk vikt är att järnbrist är ett icke ovanligt följd tillstånd till den autoimmuna atrofiska gastriten. Järnbrist kan förekomma parallellt med kobalaminbrist, vilket kan grumla den hematologiska bilden.

Methylmalonat och homocystein

För att fastställa kobalaminbrist är det nu möjligt att mäta metaboliter i två kobalaminberoende enzymreaktioner.

Kobalaminer deltar i coenzymform i enzymatiska reaktioner vilka omvandlar methylmalonyl-coenzym A till succinyl-coenzym A resp. homocystein till metionin. I den förra reaktionen är co-enzymet adenosylkobalamin, i den senare methylkobalamin. Kobalaminbrist leder därför till ökad halt av methylmalonat och homocystein i vävnader och extracellulärvätska. För syntesen av metionin från homocystein krävs även folsyrorerivat. Detta innebär att såväl kobalaminbrist som folatbrist ger upphov till förhöjd halt av homocystein.

Mätning av methylmalonat ger alltså möjlighet att fastställa intracellulär kobalaminbrist (ibland benämnt "funktionell kobalaminbrist"), medan homocysteinmätningen kan påvisa brist på kobalaminer och/eller folater.

Förhöjda metabolitkoncentrationer kan föreliga även vid ovanliga ärftliga rubbningar, liksom vid påtagligt nedsatt njurfunktion. Normalisering

av koncentrationerna vid terapi med vitamin B12 resp. folysyra talar för brist.

Hos patienter med marginellt låga kobalamindepåer och normala koncentrationer av methylmalonat, men som har folatbrist med homocysteinkönning, kan folat tillförsel leda till ökade koncentrationer av methylmalonat talande för att kobalaminbrist de facto föreligger. Detta talar också för värdet av metabolitmätningar för att värdera behandlingseffekt, dvs. som led av den diagnostiska processen bör inte bara klinisk utan också biokemisk uppföljning utföras (se mera nedan).

Kobalaminmätningen har bristfälliga diagnostiska egenskaper!

En av lärdomarna från de ökade erfarenheterna av mätning av de vitamin B12-beroende metaboliterna methylmalonat och homocystein är att kobalaminbestämningens diagnostiska egenskaper är otillräckliga, dvs den har för låg diagnostisk sensitivitet och specificitet. Detta gäller även när mätningarna görs med bästa möjliga metodik. Av patienter med kobalaminkoncentration lägre än referensintervallets undre gräns föreligger i en del fall inga hållpunkter för kobalaminbrist. Andelens storlek varierar med studerad population. Man har även kunnat konstatera, att personer med kobalaminbrist fastställd genom metabolitmätning i ett inte obetydligt antal fall har kobalaminkoncentrationer i serum inom referensintervallet.

Merparten av kobalaminerna i blod binds till plasmaproteinet haptokorrin vars koncentration inte alltid är relaterad till kobalamindepåerna. Leversjukdom, leukocytos och myeloproliferativa sjukdomar är exempel på tillstånd med haptokorrinökning som leder till förhöjda serumkoncentrationer av kobalaminer utan motsvarande ändring av kobalamindepåernas storlek. Endast den mindre kobalaminfraktionen som är bunden till plasmaproteinet transkobalamin (tidigare benämnt transkobalamin II) tas upp av de perifera cellerna genom specifika receptorer. Transkobalamin är emellertid ett akutfas-protein, dvs. koncentrationen ökar i samband med akut inflammatorisk reaktion. Detta är alltså ytterligare en situation där den cirkulerande kobalaminkoncentrationen inte återspeglar depåerna. Kobalaminmätning ger således inte alltid den goda uppfattning om depåernas storlek som tidigare antagits, och framför allt

gäller detta patienter med akut inflammatorisk sjukdom, leversjukdom (alkoholhepatit!), kronisk myeloisk leukemi och tumörsjukdom.

Med hänsyn till dessa förhållanden höjs allt fler röster för att man vid misstänkt kobalaminbrist initialt bör utföra mätning av de kobalaminberoende metaboliterna och/eller fastställa om patienten tillhör en riskgrupp för utveckling av kobalaminbrist. Om utredningen av kobalaminbrist inleds med mätning av kobalaminer i serum bör som regel fortsatta undersökningar göras för rimligt säker diagnos, framför allt av fall med kobalaminkoncentration mellan ca.100 och 250 pmol/L och som i övrigt är till synes friska. Hos patienter med klar inflammatorisk reaktion kan man t.o.m. ifrågasätta om kobalaminmätning överhuvud taget bör utföras med tanke på risken för missleddande diagnostisk information.

När bör vitamin B12 (kobalamin)-brist misstänkas?

Frågeställningen uppkommer i första hand hos patienter med ett eller flera av följande symptom och/eller tecken:

Hämatologiska

- Kvantitativa cellavvikeler: makrocytär anemi, granulocytopeni, trombocytopeni
- Kvalitativa cellavvikeler: avvikande erythrocytformer, hypersegmenterade granulocyter

Vid benmärgsundersökning ses förändringar inom erythropoies, myelopoes och/eller trombopoies, ev. även beträffande järnmimnehållet.

Neurologiska

- Baksträngsmyelopati med nedsatt sensibilitet för proprioception/vibrationssensibilitet i nedre extremitaterna, ofta upp till bålnivå
- Tilltagande parapares med nedsatt finmotorik, rörelsehastighet, spastisk tonusökning och muskelreflexstegring i benen samt positivt Babinski-tecken
- Encefalopati med framträdande drag av inpräglings- och retentionsstörningar med fr.a. närmnesproblem, ibland också med konfusion/desorientering.

Det är sällsynt att såväl makrocytär anemi som nervsystemsymtom uppträder samtidigt.

Kobalaminbrist bör emellertid också misstän-

kas hos en patient som tillhör en riskgrupp för utveckling av sådan brist, och som söker för sådana symtom eller tecken som inte säkert kan förklaras bero på något annat sjukdomstillstånd.

Att konstatera ”vitamin B12-brist” räcker inte - varför har patienten vitamin B12-brist?

Bakom utvecklingen av kobalaminbrist ligger tillstånd vilka som regel även kräver annan behandling än kobalaminsubstitution. Grundregeln är att en etiologisk utredning alltid bör utföras. Det är alltså viktigt att fastlägga de medicinska målen för utredningen av kobalaminbrist.

Vilka är de medicinska målen för utredning av vitamin B12 (kobalamin)-brist?

Utredningen syftar i första hand till att fastställa om substitutionsbehandling med vitamin B12 är indicerad, och hur den i så fall bör ges. Andra medicinska mål är:

- Att fastställa om kobalaminbrist kan förklara patientens symptom, kliniska fynd och/eller laboratoriefynd.
- Att klärlägga etiologien vid fall av kobalaminbrist, och därmed klargöra behovet av ytterligare diagnostiska insatser.
- Att fastställa om patienten tillhör en riskgrupp för utveckling av kobalaminbrist.
- Att klärlägga det ev. behovet av ytterligare medicinska åtgärder.

Synpunkter på utredningsgång vid misstänkt brist på vitamin B12 (kobalaminer), dels med hänsyn till dagens laboratorieresurser och sjukvårdssekonomi, dels i en framtid med förbättring i dessa avseenden

Mot bakgrund av de medicinska målen för utredning av kobalaminbrist gav panelen följande synpunkter på diagnostiken:

Fastställa om kobalaminbrist kan förklara patientens symptom, kliniska fynd och/eller laboratoriefynd.

- Basal hematologisk utredning görs alltid initialt, även om normala resultat inte utesluter kobalaminbrist. Däremot råder ingen enighet hur den fortsatta utredningen bör göras.
- Av tradition mätertes koncentrationen av kobalaminer i serum. Analysen har otillfredsställande

sensitivitet och specificitet för att identifiera kobalaminbrist, varför ytterligare laboratorieundersökningar behövs.

- I vissa situationer, ex. när det gäller äldre patienter, kan fastställande av att patienten tillhör en riskgrupp för utveckling av kobalaminbrist vara tillräcklig - tillsammans med klinisk och hematologisk information - för att göra det sannolikt att patienten har kobalaminbrist.

- ”Funktionell kobalaminbrist” föreligger när koncentrationen av methylmalonat i serum(plasma) är förhöjd, ev. även av homocystein i plasma, samt normaliseras efter tillförsel av vitamin B12.

- Vid behandling med vitamin B12 måste uppföljning ske. Vid successiv förbättring av neurologiska symptom är detta en sannolik bekräftelse av hypotesen B12-brist. Vid utebliven effekt eller försämring måste fortsatt utredning ske för att klargöra om annan orsak till symptomen finnes. Rörande biokemisk uppföljning, se ovan.

- Föreligger klinisk misstanke om kobalaminbrist i nervsystemet bör sannolikt methylmalonat mätas i prov från cerebrospinalvätska, även om det för närvarande inte finns tillräckliga undersökningar om detta. Såväl koncentrationerna av kobalaminer som av methylmalonat och/eller homocystein i serum/plasma korrelerar nämligen dåligt med symptom/tecken på kobalaminbrist i nervsystemet.

Klarlägga etiologien vid fall av kobalaminbrist, och därmed klargöra behovet av ytterligare diagnostiska insatser.

Aktuella laboratorieundersökningar är som följer.

- Kronisk atrofisk gastrit leder till sänkt koncentration av pepsinogen A (pepsinogen-1) i serum, samt sänkning av kvoten pepsinogen A/pepsinogen C (pepsinogen-1/pepsinogen-2) i serum, oftast även till höjd koncentration av gastrin i serum (plasma). Pepsinogen A kombinerat med gastrin eller pepsinogen C är således förstahandsanalyser.

Koncentrationen av antikroppar mot K⁺/H⁺-ATPas är ofta hög vid svår atrofisk gastrit. Blockerande antikroppar mot intrinsic factor ses hos en del av patienterna med perniciös anemi.

Schillingtestet har visserligen hög diagnostisk specificitet för svår atrofisk gastrit, men sensitiviteten är acceptabelt låg.

Hos patienter med ökad gastrinstimulering av ventrikelslemhinnan kan koncentrationen av kro-

mogranin A i plasma vara förhöjd.

Vid oklarhet rörande tolkningen av de bioekiska fynden kan gastroduodenoskopgi vara motiverad för att klärlägga bl. a. om det föreligger patologisk gastroduodenal slemhinna (se även nedan, ytterligare medicinska åtgärder).

- Vid coeliaki föreligger ofta antikroppar i serum riktade mot endomysium, samt antikroppar mot gliadin.

Fastställa om patienten tillhör en riskgrupp för utveckling av kobalaminbrist.

- I första hand rör det sig om kronisk atrofisk gastrit och coeliaki, vilka - som nämnts ovan - är de vanligaste orsakerna till kobalaminbrist hos tidiagare friska patienter med normal diet. Läkaren bör vara medveten om den ökade risken för autoimmun atrofisk gastrit hos patienter med autoimmun endokrin sjukdom.

- I andra hand bör hänsyn tagas till övriga nämnda tillstånd med risk för kobalaminbrist.

Klarlägga det ev. behovet av ytterligare medicinska åtgärder

Vid kronisk atrofisk gastrit kan det finnas anledning att

- klärlägga om järnbrist föreligger
- undersöka ev. förekomst av tumörer i ventrikelslemhinnan (cancer, ECL-cellstumörer, lymfom)
- behandla mot *Helicobacter pylori*, påvisad genom mätning av specifika antikroppar i serum, alt. vid gastroskopi. Detta är emellertid för närvarande en kontroversiell fråga, dels därför att det inte råder fullständig enighet rörande ett orsakssamband mellan *H. pylori*-infektion och utveckling av atrofisk gastrit och kobalaminbrist, dels hur behandlingen i så fall bör ske.

Huruvida alla delmål bör uppnås beror på en rad faktorer, i första hand patientens situation (anamnes och status, familjeanamnes, ev. abnormalaboratoriefynd, ”screening”-undersökning eller utredning av allvarligt sjukdomstillstånd etc), i andra hand tillgängliga utredningsresurser, behov av snabb utredning etc.

Tänk på att snabb och effektiv utredning och behandling är viktiga hos patienter med neurologiska eller neuropsykiatriska symptom med hänsyn till att nervskadorna kan vara en del av ett subakut tillstånd och bli irreversibla efter relativt

kort tid! Kobalaminsubstitution vid skador i nervsystemet skall ges i injektionsform.

Det är fortfarande en kontroversiell fråga om man vid fynd av kronisk atrofisk gastrit bör undersöka huruvida patienten har riskfaktorer för kardiovaskulär sjukdom och hjärtinfarkt. Det visades nämligen i mitten av 1980-talet i Kvinnostudien i Göteborg, att gastrinökning hos postmenopausala kvinnor, som ett uttryck för atrofisk gastrit, var förenad med en bortåt 10-faldig risk för hjärtinfarkt (12 års uppföljningstid). Opublimerade studier av 1913 års män visar att gastrinökning är en riskfaktor även hos 67-åriga män. Mekanismerna för dessa samband är okända.

Förhöjd halt av homocystein i plasma är en oberoende riskfaktor för hjärt-kärlsjukdom. Mätning av homocystein i plasma är därför av intresse inte bara som diagnosticum för vitamin B12 och/eller folatbrist utan också som sådan riskfaktor.

Var utförs mätningar av komponenter relaterade till vitamin B12 (kobalamin)-brist?

Vid förfrågningar vid landets laboratorier före symposiet framkom att metylmalonat i serum analyseras vid 10 svenska sjukhuslaboratorier och homocystein i plasma vid 11. Alla dessa laboratorier deltar i den kvalitetssäkring som organiseras från Skejby sjukhus i Århus under ledning av sjukhuskemisten Jan Møller och av Karsten Rasmussen. Gastrin i serum eller plasma analyseras vid 8 svenska sjukhuslaboratorier och 1 kommersiellt laboratorium, medan pepsinogen A (pepsinogen-1) endast analyseras vid 3 laboratorier och pepsinogen C (pepsinogen-2) vid ett enda laboratorium.

En förteckning av laboratorierna och bl. a. deras analysintervall delades ut vid ingången till Victoriahallen. Den kommer att publiceras i SFKK:s medlemsblad Klinisk Kemi och kan erhållas från författarna.

Övrigt informationsmaterial

Karsten Rasmussen delade ut den diagnostiska algoritmen som börjar användas alltmer i Danmark, och som bygger på mätningar av metylmalonat och homocystein. Lennart Persson gav ut en översikt över de neurologiska tecknen och symptomen. Vid symposiet utdelades också en uppsättning frågor kring ämnet, vilka kommer att belysas i en separat artikel. Bildmaterialet som visades av Jörn Schneede kommer att kunna erhållas från Dumex-Alpharma.

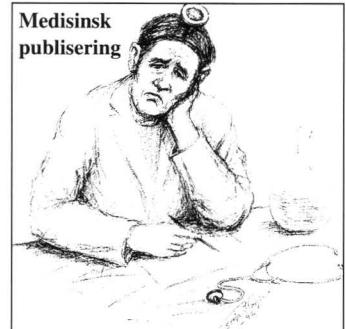
Sammanfattning

Vitamin B12 (kobalamin)-brist är vanlig. Mätning av kobalaminer i serum har visats erbjuda otillfredsställande diagnostisk sensitivitet och specifitet, varför mätning av kobalaminberoende metaboliter i blodprov bör göras för säker diagnos. Hos äldre patienter kan det emellertid vara motiverat att i första hand inrikta utredningen mot påvisande av atrofisk gastrit eller coeliaki, de vanligaste orsakerna till kobalaminbrist hos tidigare friska patienter med normal diet. Etiologien till kobalaminbrist bör alltid klarläggas, vilket också i många fall kan ske med hjälp av blodprovsmätningar.

Statistiske vurderinger ved endring av analysemetode

LARS MØRKRID

Klinisk-kjemisk avdeling, Rikshospitalet N-0027 Oslo



1. Innledning

Innen klinisk kjemi kommer det stadig nye og forbedrede metoder, og vi velger ofte å skifte analysemetode for en bestemt analytt. Eksempler på dette er en rekke immunkjemiske analyser (f.eks. for hormoner og plasmaproteiner) som i økende grad legges over på helautomatiske instrumenter. Her tilbys det for tiden mange ulike systemer og analyseprinsipper. Det kan være nødvendig å vurdere disse opp mot hverandre, både med hensyn til analysekvalitet, pris og andre kriterier. Når vi først har valgt et bestemt system, kommer det rett som det er større eller mindre metodemodifikasjoner (endret inkubasjonsprosedyre, nytt antistoff) som gir endret nøyaktighet og presisjon. I tillegg ser vi at kontrollnivåene plutselig gjør sprang ved skifte til kit med nytt lotnr. I denne oversikten skal vi se litt på de statistiske metodene vi bruker når vi skal vurdere analyseresultater fra ulike metoder eller serier opp mot hverandre. Prøvesvaret er en kontinuerlig variabel og standardkurvene er ofte ulineære funksjoner. Vi skal se på situasjonen med to ulike datasett og velger notasjonen $X = \text{gammel}$ og $Y = \text{ny}$ metode. For hver av metodene er det viktig å kartlegge en rekke forhold.

2. Karakterising av viktige metodeegenskaper

2.1. Standardkurvens form bestemmes i en serie buffer-baserte løsninger, tilsatt kjente mengder analytt samt (bovint) serum albumin for etterligning pasientprøvenes plasma/serumproteiner. Hvert punkt analyseres gjerne som duplikat eller triplikat. Standardkurven for immunkjemiske analyser er sjeldent en rett linje. Standardkurver som ikke er rettlinjede, kan skape problemer i statistiske prosedyrer. Ofte forsøker man å linearisere standardkurven for å enkelt kunne beregne analytkonsentrasjonen ut fra instrumentresponsen. Men etter slik linearisering vil ofte spredningen

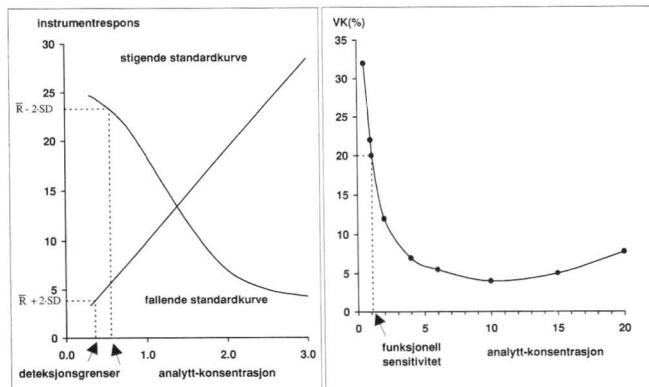
på grunn av tilfeldige feil variere med analyttkonsentrasjonen, og ofte øke mot det ene eller begge endepunktene. Systematisk avvik i standardkurvens parametre vil kunne føre til nøyaktighetsavvik i analyseresultatet som blir en ulineær funksjon av nivået. Dette kan være én av forklaringene på at funksjonssammenhengen mellom måleresultatene fra metoder som har ulik form på standardkurven, ikke blir en rettlinjet funksjon.

2.2. Nedre deteksjonsgrense bestemmes ut fra instrumentresponsen R_i , på n målinger ($R_i; i = 1, 2, \dots, n$) av et analyttfritt, bufferbasert medium (standard 0). Aritmetisk gjennomsnitt \bar{R} , og standardavvik SD av disse målingene beregnes. Nedre deteksjonsgrense defineres ofte som den konsentrasjonen som ut fra standardkurven ligger ved $\bar{R} + 2 \cdot SD$ ved stigende standardkurve og $-2 \cdot SD$ ved fallende standardkurve. Se Figur 1 venstre del. Siden nedre deteksjonsgrense ikke er bestemt i serum, er den lite egnet som mål på den minste analyttkonsentrasjonen man med sikkerhet kan påvise hos en bestemt pasient.

2.3. Analytisk sensitivitet er den minste endring i konsentrasjon som gir en signifikant detekterbar endring i avlesning (respons). Denne kan defineres for hvilket som helst type medium (buffer, serum, etc.). Analytisk sensitivitet vil være avhengig av analyttkonsentrasjonen.

2.4. Presisjonsprofil bestemmes med serumbaserte prøver (helst pasientprøver) som dekker et stort konsentrationsområde. Hver prøve analyseres en rekke ganger og variasjonskoeffisienten ($VK = 100\% \cdot SD/\bar{X}$) beregnes. Man fremstiller VK som

funksjon av konsentrasjonen. Funksjonell sensitivitet er den laveste konsentrasjon der $VK = 20\%$, se Figur 1.



Figur 1. Venstre del: Definisjon av nedre deteksjonsgrense ved henholdsvis stigende og fallende standardkurve (piler). Høyre del: Presisjonsprofil med definisjon av funksjonell sensitivitet.

2.5. Måleområdet (working range) bør så kartlegges. For noen analyser settes denne lik området fra laveste til høyeste standard. I andre tilfeller vil man bruke området fra funksjonell sensitivitet og opp til et punkt der responsen avviker klinisk signifikant fra den matematiske tilnærningsmodell som er tilpasset for standardkurven, f. eks. rett linje, flerparameter polynom, firparameter logistisk funksjon, logit-log eller mer kompliserte modeller (1). Ved endel immunkjemiske analyser må man være særlig oppmerksom på såkalt "hook" effekt, der prøver med analyttkonsentrasjon over det egentlige måleområdet gir en instrumentrespons som tilsvarer prøver i målemårådet, dvs. falskt lave svar (2). Dette kan avsløres ved fortyning av prøven.

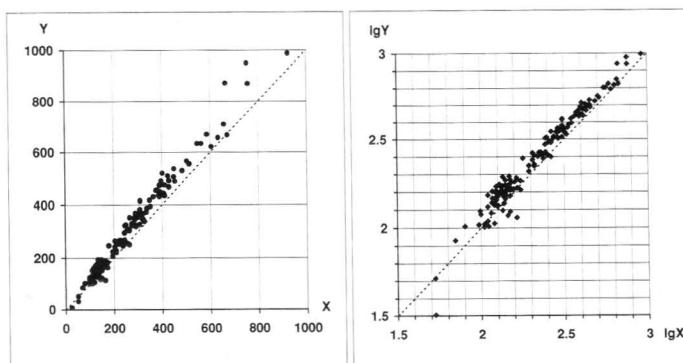
2.6 Linearitet betyr at fortyning av en pasientprøve med høy konsentrasjon av analytt med analyttfritt serum (null-serum) eller analyttfri buffer gir samme proporsjonale reduksjon i analyttsvaret. Null-serum er vanskelig å oppdrive, og i stedet må man oftest ty til buffere eller kullfiltrert serum, som begge dessverre kan vise forskjellig matrikseffekt fra vanlige pasientprøver slik

at fortynningskurven ikke blir lineær. Avvik fra linearitet kan også ses som resultat av kurveforskyving ved ikke-rettlinjede standardkurver.

3. Grafisk sammenligning av to analysemetoder

Ideelt sett bør dette gjøres samtidig med de to metodene og med ferske pasientprøver. I praksis velger man ut prøver som har vært analysert med gammel metode og forsøker å få disse jevn fordelt over et så stort konsentrasjonsområde som mulig. Har prøvene vært frosset lagret en tid og er tint igjen, bør reanalyserete verdier for X benyttes.

3.1. Spredningsdiagram mellom Y og X. Den gamle og kjente metoden X kan i første omgang velles langs abscisseaksen, Y langs ordinataksen. Identitetslinjen $Y = X$ stilles alltid inn. Hvis metodene kan rangeres etter presisjon, bør man velge den med best presisjon langs abscisseaksen. Dette diagrammet danner utgangspunkt for regresjonsanalyse, men først vurderes spredningsmønsteret visuelt. Hvis svarområdet dekker flere dekadiske enheter, kan det være nytlig å benytte logaritmene til måleverdiene. Figur 2 viser ett aktuelt spredningsdiagram.



Figur 2. Spredningsdiagram mellom måleverdiene fra to ulike metoder for analyse av vit B12. Venstre del: vanlige enheter i pmol/L. Høyre del: logaritmiske enheter.

I spredningsgrammet bør man se etter følgende forhold:

Ligger største delen av punktene (X_i , Y_i) jevnt samlet omkring en rett linje $y = a + b \cdot x$? Ved statistisk tilpassning, der man beregner estimerer for a og b , kalles denne ligningen en regresjonsligning.

Hvis en rett linje synes å gi den beste tilpasning, vurderes

3.1.1. evt. *parallelforskyvning* i forhold til identitetslinjen. Dette kalles konsentrasjonsuavhengig avvik (intercept a i regresjonsligningen). Hvis nullhypotesen $H_0: a = 0$ forkastes, har vi et statistisk signifikant avvik. Det må vurderes separat om dette har noen klinisk signifikans.

3.1.2. evt. endret *stigningstall* i forhold til identitetslinjen. Dette kalles proporsjonalavvik og opptrer når stigningstall eller slope $b \neq 1$. Hvis nullhypotesen $H_0 : b=1$ forkastes, har vi et statistisk signifikant proporsjonalavvik. Som i avsnittet ovenfor må det vurderes om dette har klinisk betydning innenfor måleområdet.

3.1.3. Eventuell *kombinasjon av konsentrasjonsuavhengig avvik og proporsjonalavvik*. Se Figur 3. For analyser der måleområdet ligger langt fra 0, som f. eks. for den hematologiske variable MCV, er et intercept a ved 0 lite meningsfylt. Man kan da heller legge et referansepunkt ($X = X_{ref}$) nederst eller midt i måleområdet, lage nye variable $\Delta X = X - X_{ref}$ og $\Delta Y = Y - X_{ref}$ og se på regresjonsligningen $\Delta Y = a + b \cdot \Delta X$. Interceptet a vil da få en mer konkret betydning, nemlig avvik fra identitetslinjen ved det nye referansepunktet («origo» = X_{ref} , X_{ref}) som nå har en beliggenhet i aktuelt måleområde. Estimatet for b blir uendret ved denne prosedyre.

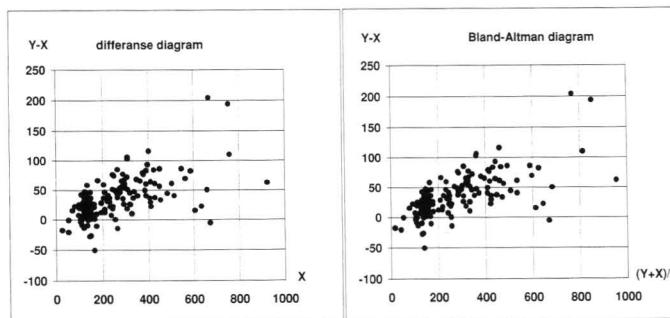
Deretter inspiseres endepunktene

3.1.4. Nedre endepunkt kan avsløre *sensitivitetsproblemer* med den ene metoden når punktskaren bøyer av mot den ene aksen (se Figur 3, høyre

del), eller for begge metodene når det er generelt økende spredning av punktene ved lave verdier. Dette området bør tas ut av den endelige regresjonsanalysen.

3.1.5. Plutselig *endring i kurveforløpet* ved høye verdier. Én årsak kan være «hook» effekt. En annen hyppig årsak er nøyaktighetsavvik når prøven fortynnes for å komme innenfor måleområdet. Med helautomatiske maskiner skjer fortynning enkelte ganger automatisk med fortynningsmedium som har annen matrikseffekt enn vanlig serum. Resultatene for linearitetsundersøkelse (fortynningsforsøk) for begge metodene kan avsløre eventuell uoverensstemmelse. Dette området tas normalt heller ikke med i en regresjonsanalyse.

3.1.6. «*Slengere*» (outliers, dvs. punkter som ligger lang fra resten av kurveskaren) kan forekomme. Dette er illustrert i Figur 3, venstre del. Om reanalyse viser samme avvikende resultat mellom de to metodene, kan det tyde på forhold som er spesifikke for akkurat denne pasientprøven. Slike slengere skal forbli i spredningsdiagrammet, men bør naturligvis ikke tas med i regresjonsanalysen. Hyppige årsaker er tilstedevarelsen av heterofile antistoffer, kompleksdannelse med andre proteiner, spesielle isoformer eller biologisk inaktive nedbrytningsprodukter som ses ulikt av de to metodene. De glykosylerte peptidhormonene (f. eks. FSH og LH) forekommer i en rekke ulike isoformer, betinget i ulik aminisyresekvens og/eller grad av og type glykosylering. Ved immunkjemiske metoder med ett monoklonalt antistoff, kan spesifisiteten være for høy til å fange opp spesielle isoformer. Immunologisk aktivitet har i disse tilfellene dårlig sammenheng med biologisk aktivitet. Dette problemet er mindre ved bruk av polyklonale antistoffer, men her er naturligvis *kryssreaksjon* andre molekyltyper med stor grad av homologi et tilsvarende problem (f. eks. mellom hCG og FSH).



Figur 3. Ulike former for avvik fra identitetslinjen (stiplet linje): Venstre del: kombinert konsentrationsuavhengig avvik og proporsjonalavvik, samt to «slengere» (outliers). Høyre del: I nedre måleområde antydes sensitivitetsproblemer for Y- metoden.

3.1.7. Hvis sammenhengen mellom Y og X avviker fra en rett linje, finner man ofte at logaritmene til måleverdiene viser brukbar rettlinjet sammenheng (tilpasses best av $\lg y = a + b \cdot \lg x$, og da er $y = 10^a x^b$ den beste tilpasning med de opprinnelige måleverdiene). Det er vanlig med avvik fra en rett linje, spesielt når de to metodene har ulineære og ulik form på standardkurvene. Dette vil også gi seg utslag i at spredningen blir ulik i ulike deler av konsentrasjonsområdet, og ofte størst i ett av endepunktene eller i begge. Hvis spredningen øker jevnt mot det øvre endepunktet, vil diagrammet basert på logaritmer få en jevnere spredning, og betingelsene for en rettlinjet regresjonsanalyse er bedre tilstede (se Figur 2, høyre del).

3.2. Differansediagram mellom Y og X. Differansen Y-X plottes som funksjon av X, og dette gir bedre oppløsning enn spredningsdiagrammet ovenfor. Hvis begge metoder har samme grad av usikkerhet (kombinasjon av unøyaktighet og upresisjon), kan Y-X fremstilles som funksjon av $(X+Y)/2$. Dette diagrammet kalles Bland-Altman diagrammet (3). Se Figur 4. Hvis sammenhengen mellom Y og X best tilpasses av en rett linje, vil differansediagrammet også bli en rett linje. For mange analyser vil differansediagrammet best bli beskrevet av en rett linje når det benyttes logaritmisk transformasjon av de opprinnelige måle-variable.

4. Statistiske sammenligningsmetoder – regresjonsanalyse

Hensikten med bruk av regresjonsanalyse innen metodesammenligning er å undersøke om avviket fra identitetslinjen beror på tilfeldigheter eller om vi har et statistisk signifikant avvik.

4.1. I avsnittene ovenfor har vi antydet hva slags del av måleområdet som bør tas med i en regresjonsanalyse for å finne omregningsformler mellom nye og gamle verdier. Det er viktig at punktene er mange og jevnt fordelt over regresjonsområdet.

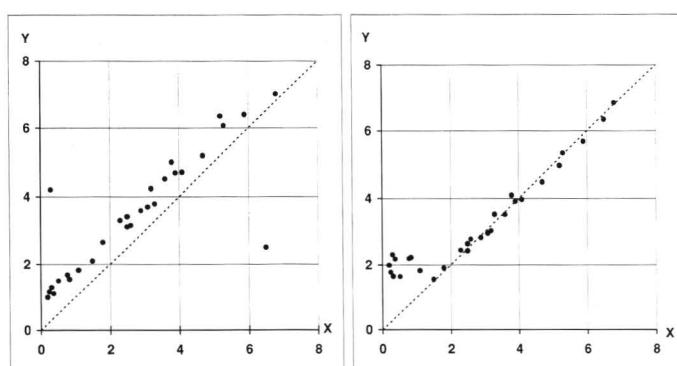
Det finnes to ulike regresjonsprosedyrer. Ved den ordinære prosedyre antar man at de tilfeldige feilene kun er i Y retning, dvs. X målingen er helt presis.

Vi kan da skrive

$$Y_i = a + b \cdot X_i + \epsilon_i$$

der $i = 1, 2, \dots, n$. n er antall punkter.

ϵ_i kalles restleddene (residuals), se Figur 5, venstre del. Disse er uttrykk for avviket fra regresjonslinjen i Y retning og uttrykker upresisjonen med metode Y. Metoden kan også benyttes når med en viss upresisjon i metode X, sålenge upresisjonen i metode Y er mye større.



Figur 4. Differansediagram (venstre del) og Bland-Altman diagram (høyre del) for to målemetoder for vitB12.

Ved den vanlige regresjonsanalysen minimaliseres kvadratsummen av alle restledd. For at resultatene skal bli noenlunde pålitelige kreves det at i) restleddene ϵ_i skal fordele seg jevnt rundt 0 i hele intervallet som studeres, ii) Det skal ikke være noe spesielt mønster av ϵ_i (oppnopninger av punkter), iii) spredningen i ϵ_i skal være konstant over hele regresjonsområdet. I analysen krever vi egentlig at ϵ_i er normalfordelte størrelser med forventningsverdi 0 og standardavvik s.

Hvis vi setter

$$SS_X = \Sigma(X_i - \bar{X})^2, SS_Y = \Sigma(Y_i - \bar{Y})^2 \text{ og } S_{XY} = \Sigma(Y_i - \bar{Y})(X_i - \bar{X})$$

får vi følgende estimatorer for stigningstall og intercept $\hat{b} = S_{XY}/SS_X$ og $\hat{a} = \bar{Y} - \hat{b} \cdot \bar{X}$

Et estimat (anslag) for spredningen som skylles feilreddene ϵ_i , finnes i uttrykket

$$s = \sqrt{\frac{SS_Y - \hat{b}^2 \cdot SS_X}{n - 2}}$$

Ved denne metoden er observatorene

$$t_{obs} = (\hat{a} - c)/s \cdot \sqrt{1/n + \bar{X}^2/SS_X} \text{ og } t_{obs} = (\hat{b} - c)/(s/\sqrt{SS_X})$$

t-fordelte størrelser med $n-2$ frihetsgrader og kan brukes til å teste nullhypotesene $H_0: a=c$ (vanligvis $a=0$) og $H_0: b=c$ (vanligvis $b=1$).

Hvis man ikke kan se bort fra upresisjonen i noen av metodene, lages en modell der restleddet beregnes som avstanden fra punktet (X_i, Y_i) vinkelrett ned på regresjonslinjen. Se Figur 5, høyre del. Dette kallas Demings metode, og den tar hensyn til upresisjon både ved X og Y metode. Hvis man minimaliserer kvadratsummen av alle restleddene δ_i får følgende estimatorer for de nye regresjonskoeffisientene

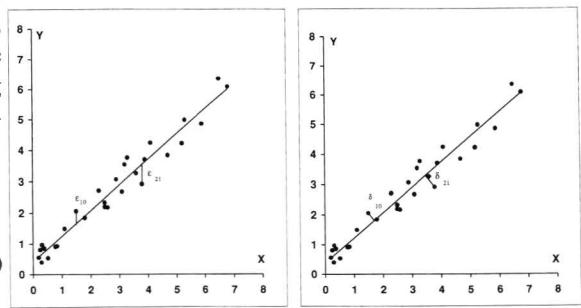
$$b_D = -C/2 + \sqrt{(C/2)^2 + 1} \text{ og } a_D = \bar{Y} - b_D \cdot \bar{X}$$

$$\text{der hjelpestørrelsen } C = \frac{1}{\hat{b}} - \frac{\hat{b}}{r^2}$$

er uttrykt ved estimatet \hat{b} fra den vanlige regresjonsanalyse. r er Carl Pearsons korrelasjonskoeffisient, $r = \frac{S_{XY}}{\sqrt{SS_X \cdot SS_Y}}$.

Ulempen med Demings metode er at vi ikke har enkle statistiske metoder til å teste hypoteser

vedrørende a og b.



Figur 5. Restledd ved ordinær regresjon (venstre del) og Deming regresjon.

Vanlig regresjonsanalyse i et Bland-Altman diagram kan da være et alternativ. Antas målefeil i X og Y uavhengige, vil upresisjonen langs ordinatksen som fremstiller $Y - X$ være dobbelt så stor som upresisjonen langs abscisseaksen som angir $(X+Y)/2$, slik at man kan benytte den vanlige regresjonsmetoden. Det henvises ellers til lærebøker i statistikk. Test av intercept blir fortsatt bli $H_0: a = 0$, mens test av stigningstallet ved regresjon i Bland-Altman diagrammet blir $H_0: b = 0$ (tilsvarer $b = 1$ i XY diagrammet). Differansediagram og Bland-Altman diagram kan også konstrueres for log-transformerte data.

Hvis statistisk signifikante avvik fra identitetslinjen også er klinisk betydningsfulle, er man pliktig til å informere brukerne.

4.2. Rapportering til kliniske brukere om at metoden er endret. Angi formler fra regresjonsanalysen for omregning fra gamle til nye verdier og omvendt. Dette er spesielt viktig når prøvesvarene inngår i langvarige kliniske forskningsprosjekter.

4.3. Endring av referanseområdet. Dette kan skje ved hjelp av omregningsformler fra regresjonsanalysen. Imidlertid må man være varsom med å benytte seg av slike omregninger hvis det skiftes metode flere ganger, da hver omregning kan akkumulere avvik. Analyse av normalitetsdiagram (z-score diagram) for hele laboratorieproduksjonen før og etter metodeskifte vil kunne indikere om

det har skjedd et nivåskifte. Hvis pasientutvalget er noenlunde stabilt bør medianen forbli uendret. Ved den såkalte Hoffmanns metode (4) kan man ekstrapolere den sentrale rettlinjede del av z-score diagrammet. Denne delen antas å tilhøre pasientgrupper som ikke avviker fra friske referansepersoner når det gjelder den aktuelle analyse. Ekstrapolering til 2.5 og 97.5 percentilpunkter vil kunne gi pekepinn om det har skjedd et større avvik i henhold til de gamle referansegrensene.

4.4. Innsamling av nytt referansematerialer bør gjennomføres oftere enn det som er vanlig ved metodeskifte i våre kliniske laboratorier.

5. Konklusjon

Mindre eller større endringer i analysemetode skjer hyppig i klinisk-kjemiske laboratorier. Det er viktig å ha oversikt over hvordan dette forandrer ana-

lysekvaliteten. Denne artikkelen har berørt endel statistiske metoder som er nyttige ved det tidspunkt da slike forandringer skjer. I tillegg til de ovennevnte prosedyrer kommer også interne og eksterne kvalitetskontroll-regimer.

Referanser

- 1) Normolle DP: An algorithm for robust non-linear analysis of radioimmunoassays and other bioassays. Statistics in Medicine. 12(2) 2025-42, 1993.
- 2) Studies of the 'hook' effect in the one-step sandwich immunoassay. Journal of Immunological Methods. 15(1-2), 47-66, 1992.
- 3) Bland JM, Altman DG: Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. Lancet. 346(8982): 1085-7, 1995 Oct 21.
- 4) Hoffmann RG: Establishing quality control and normal ranges in the clinical lab. Exposition Press, NY 1971.



Scandinavian Society for Clinical Chemistry



THE *ROSAN* DATABASE HELP-FILE: ABOUT SSCC & ROSAN

The Clinic Committee of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry (SSCC) has decided to create and maintain a directory of rare analyses for the Nordic countries.

The purpose of this database is to enable laboratories and doctors

- to find a laboratory capable of performing a special test or quantitating a special component or
- to identify an individual with special knowledge concerning the use of tests or procedures for diagnosis or characterisation of rare diseases.

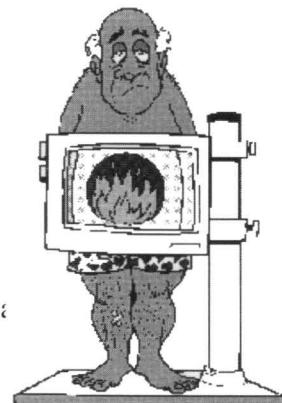
The register's prime purpose is to create a possibility for contact between two parties: between one who is in need of a service and the supplier of this service.

The first version of the ROSAN DataBase was released as a DOS-based pc-software and as an on-line (BBS-)service, where subscribers could find the information needed.

This updated version is now released as an Internet Service for the members of SSCC and other interested parties combined with a stand-alone pc-application for Windows 95 giving the user a possibility to supplement the information in the ROSAN DataBase with his own separate database of other analyses/tests used by his/her institution.

Registered users of the pc-application will here find the possibility to down-load updated versions of the DataBase to be used locally, thus reducing access-time to the information needed. Registered users can also subscribe to a diskette-based up-dating service for the DataBase.

The SSCC expects the register to become very useful in modern cost-effective laboratory medicine. This comprehensive and continuously updated database will assist and support all the Nordic hospitals and health care systems in their efforts to provide high-quality and fast service to patients at the lowest possible cost for the community.



<http://www.rosan.org/hlpabout.htm>

Möteskalender

Ansvarig: Ilkka Penttilä, Kuopio, fax +358 17 17 32 00

email: ilkka.penttila@uku.fi

Möten i Danmark

24. 9. 1998

DEKS brugermøde, Skejby Sygehus, Århus

Tema: Kvalitetssikring

Kontaktperson: Adam Uldall, Klinisk Biokemisk

Afdeling, Herlev Sygehus,

tel: +45,44,883310, fax: +45,44,535369

Möten i Island

24. 8. - 25. 8. 1998

2nd Nordic Telemedicine Congress, Reykjavik

Leading themes:

- Telemedicine, its place and applications in the sparsely populated and remote areas bordering on the arctic and subarctic regions
 - Telemedicine in subarctic regions: experiences, research, successes and failures
- Information: Thorgeir Palsson, fax: +354,5601519, email: telemed@landlaeknir.is, <http://www.landlaeknir.is/cong.htm>

Möten i Finland

2.9. - 4.9.1998

Facing information World 2000 Nord IoD 98, The Nordic conference on information and documentation, Mauno Koivisto Centre, Turku

Information: Finnish Society for Information Services, fax: +358,9,518167, email: nord98@tietopalveluseura.fi, <http://www.tietopalveluseura.fi/nord>

17.9. - 18.9.1998

Laboratorium medicin och utställning '98, Marina Congress Center, Helsingfors

Information: Kirsi Sirviö, fax: +358,9,1552632, e-mail: biokisi@jtpalvelut.fi

15.10. - 16.10.1998

Höstmötet av Finska förening för endokrinologi, tema: Diabetes

Hyvinkää

Information: docent Pirjo Nuutila, fax: +358,2,2612030, email: pirjo.nuutila@utu.fi

3.11.-5.11. 1998

KEMIA/KEMI 98 - Finnish Chemical Congress,

Helsingfors Mässcentrum, Helsingfors

Information: Helena Karrus, fax: +358,9,408780,

e-mail: skks@kemia.pp.fi,

<http://www.kemianseura.fi>

Möten i Norge

28.9. - 1.10. 1998

Nordic Junior Workshop: High dose chemotherapy supported by autologous stem cells and cytokines, Oslo; Information: Sc. manager Ulla Høy Davidsen, The Stem Cell Secretariat, Herlev Hospital, København, Danmark, fax: +45,44,535067.

Möten i Sverige

10.9.-11.9. 1998

Equalis användarmöte: Endokrinologi

Kvalitetssäkringsprogrammet. Minisymposium 1: Kan klinisk kemister diagnosticera och följa upp behandling av hjärtinsufficiens? Minisymposium 2: Gaskromatografi-masspektrometri som analytiskt hjälpmedel.

Information: kristoffer.hellsing@equalis.se

16.9.-17.9. 1998

Svenska sjukhuskemistförbundet och Sverige klinisk kemiska laboratorieingenjörers förenings utbildningsdagar. Huddinge universitetssjukhus. Huvudprogram: Olika modeller för metodenavlering. Användning av GC/MS som analysmetod.

Information: Hans Wallinder, Medilab, Box 1550, 183 15 TÄBY, fax +46,8 792 93 45

24.9 1998

Equalis användarmöte: Klinisk immunologi

Information: kristoffer.hellsing@equalis.se

8.10-9.10. 1998

Equalis användarmöte: Primärvårdens laboratoriemedicin

Information: kristoffer.hellsing@equalis.se

26.11. 1998

Svenska Läkaresällskapets Riksstämma, Göteborg

Information: bodil.olander@kem.ds.sll.se

AutoDELFIA™ arbetar även när resten av labbet vilar

Dagens laboratorium kräver precision, tillförlitliga resultat och driftssäkerhet av ett automatiserat immunoassay-system.

AutoDELFIA™ är optimerat med avseende på: kvalitet på resultat, kostnadseffektivitet, enkelhet att använda och produktivitet.

Några egenskaper hos AutoDELFIA™

- Kräver ingen passning efter laddning av dagens prov – minimalt manuellt arbete
- Inga kompromisser med kemin
- Flera analyter per patientrör
- Väl beprövad datakommunikation

Finland

Wallac OY
Box 10
FIN-20 101 Turku
Tel: +358 22678111

Danmark

Wallac Danmark A/S
Gydevang 30
DK-3450 Allerød
Tel: +45 48169000

Norge

Wallac Norge AS
Gerdrums vei 12
N-0486 Oslo
Tel: +47 22 952180

Sverige

Wallac Sverige AB
Oxfordhuset
S-194 81 Upplands Väsby
Tel: +46 8 590 797 00

wallac



The IMMULITE® family of analyzers from DPC will propel your lab into the 21st century through speed and efficiency—plus offer effective patient management through more menu options.

www.dpcweb.com

IMMULITE® DYNAMIC DUO



Kingo Diagnostika ApS

Præstø, Denmark
Tel: +45 5599 3050
Fax: +45 5599-3048

Kjemi-Diagnostikk A.S.

Drammen, Norway
Tel: +47 3284 8700
Fax: +47 3284 8710

DPC Finland Oy

Helsinki, Finland
Tel: +358 9-3434-960
Fax: +358 9-3434-9696

DPC Skafte AB

Mölndal, Sweden
Tel: +46 31-275195
Fax: +46 31-871844

DPC

DEDICATED TO PEOPLE CARE

Nordisk förening för Klinisk Kemi (NFKK)

NFKK har som syfte att verka för utvecklingen av klinisk kemi, särskilt nordiskt samarbete inom forskning, utveckling och utbildning. Den består av medlemmarna i de vetenskapliga föreningarna för klinisk kemi i Danmark, Finland, Island, Norge och Sverige. Verksamheten i NFKK bedrivs i olika arbetsgrupper och kommittéer, t ex arbetsgruppen för utbildningsfrågor. Föreningen har det vetenskapliga ansvaret för Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investiga-

tion (SJCLI) och står dessutom för arrangerandet av de nordiska kongresserna i klinisk kemi.

Styrelsen består av Tor-Arne Hagve (ordförande) och Ludvig Daae (sekreterare) samt från Danmark: Axel Brock, Ebba Nexø; från Finland: Päivi Laitinen, Marjaana Ellfolk; från Island Leifur Franzson, Elin Olafsdottir; från Norge: Petter Urdal, Sverre Landaas; från Sverige: Gunnar Skude, Per Simonsson.

TILL MANUSKRIFTÖRFATTARE

Bidrag till KLINISK KEMI I NORDEN sändes i två exemplar till den nationella redaktören, som finns angiven på omslagets andra sida. Manuskripten skall vara maskinskrivna och följa de instruktioner som angetts i Vancouver-avtalet (Nordisk Medicin 1988; 103:93–6). Språket skall vara nordiskt.

Meddelanden och korta inlägg skrives helst fortlöpande, medan längre artiklar med fördel delas i avsnitt med en kort överskrift.

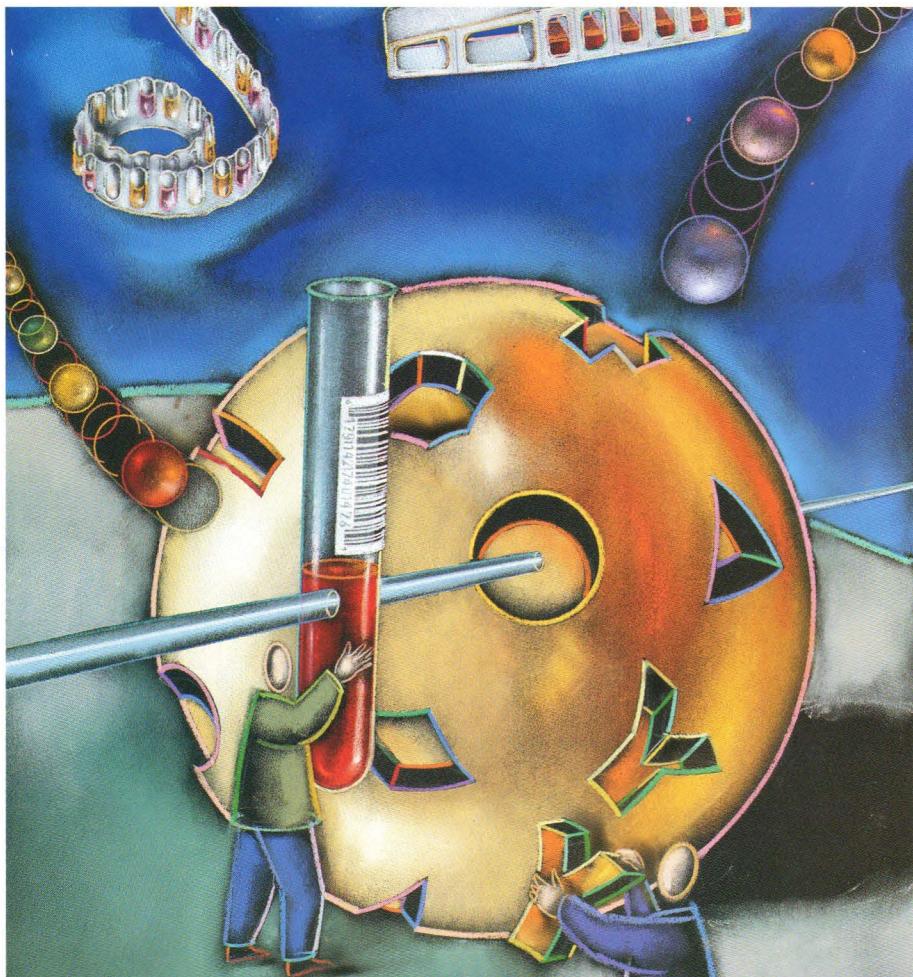
Tabeller skrives på särskilda ark till sammans med en text, som gör tabellen självförlarande.

Figurer måste vara av tekniskt god kvalitet med text och symboler tillräckligt stora för att tåla förminskning. Till varje figur skrives en förklarande text.

Litteraturhänvisningar numreras i den ordning de anges i texten och skrives som i följande exempel.

Sandberg S, Christensen NB, Thue G, Lund PK. Performance of dry-chemistry instruments in primary health care. Scand J Clin Lab Invest 1989; 49:483–8.

Innehållet i de insända artiklarna kommer inte att genomgå vanlig granskning med referee-system. Redaktionskommittén kommer emellertid att värdera alla manuskript innehållsmässigt och redaktionellt och eventuellt föreslå ändringar.



Dimension® RxL Open to the future



- Immunokemi & klinisk kemi på ett instrument
- Ingen reagensberedning
- Unikt kvyettsystem

- Multisensorteknik för Glukos, Urea och Kreatinin *
- Penetrerar primärrörskorkar**
- Integrerad centrifugmodul***

* Kommer under 1998

** Lansering 1998/99

*** Beräknad lansering 1999



Dade Behring

Sverige

Box 150

127 23 SKÄRHOLMEN

Tel +46-8-449 55 60

Norge

P.O. Box 4231 Torshov

0401 OSLO

Tel: +47-23 00 61 20

Danmark

Islevdalvej 110

2610 RÖDOVRE

Tel: +45-70 22 70 01

Finland

P.O. Box 872

00101 HELSINKI

Tel: +358-9-870 945

Vi finns i monter 26-27 på XXVI Nordiska kongress i klinisk kemi i Åbo, 7-10 juni 1998

DADE BEHRING