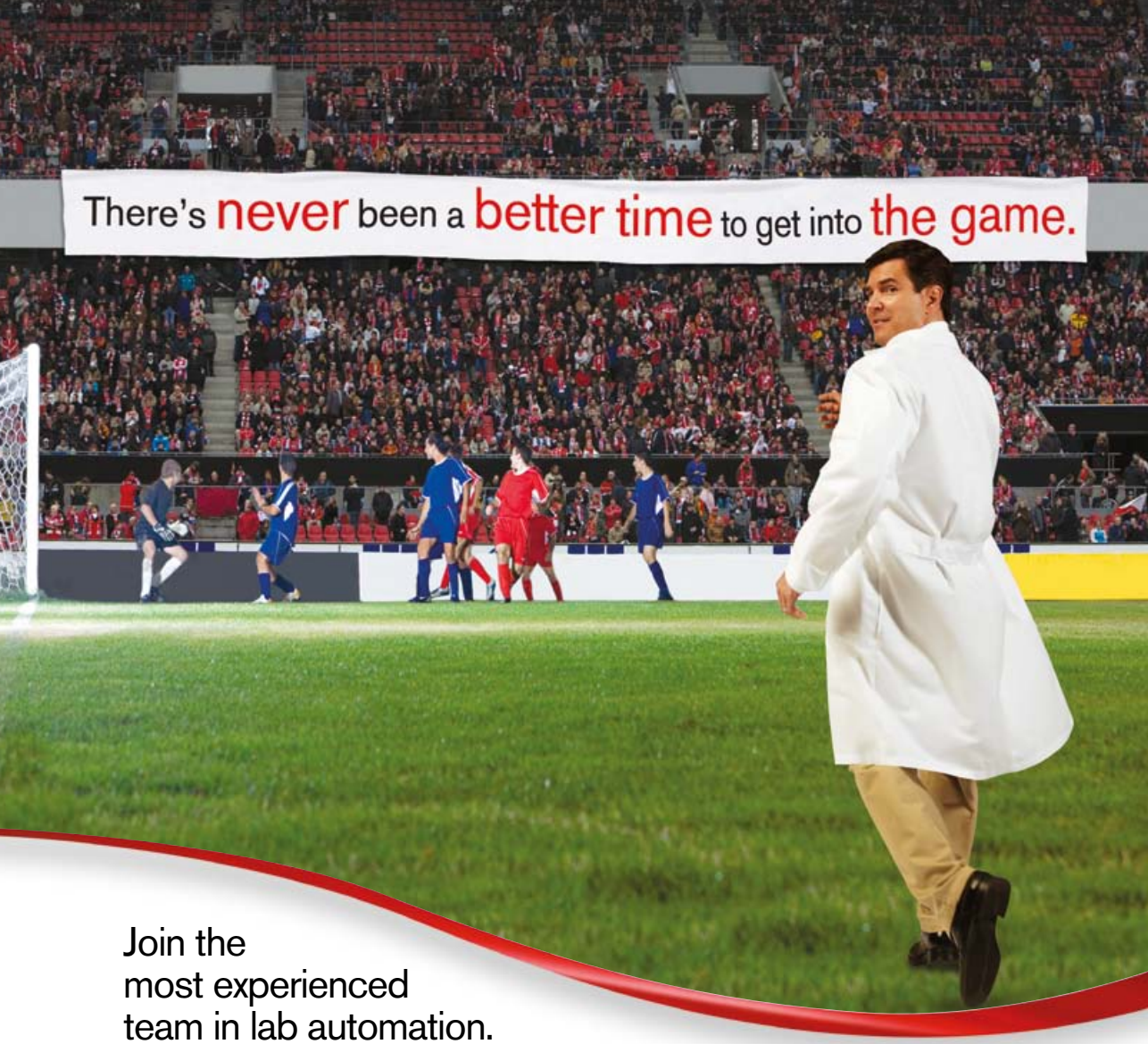
ISSN 1101-2013

Klinisk Biokemi i Norden

Nordisk Forening for Klinisk Kemi

Nr. 4, vol. 22, 2010



Join the most experienced team in lab automation.

What's true on the playing field is equally true in the field of laboratory automation: You can't win until you're in the game.

With the recent addition of the new Auto*Mate* 1200 and 2500 sample processing systems to Beckman Coulter's winning automation lineup, the time is right to collaborate with the market leader in lab automation. Get off the sideline and score big results no matter what your level of throughput – from low volume to ultra-high.

Focusing solely on the goals of your lab, Beckman Coulter can help you develop a strategy to optimize your workflow, turnaround time and efficiency.

Don't wait to automate. Team up with your Beckman Coulter representative or visit us on the web today.

www.beckmancoulter.com

Blood Bank Testing | Immunodiagnostics | Centrifugation | Molecular Diagnostics | Hematology | Hemostasis
Chemistry | Disease Management | Information Systems | **Lab Automation** | Flow Cytometry | Primary Care

BECKMAN COULTER
We're better together

Power Processor

Auto*Mate* 600

Auto*Mate* 800

NEW!

Auto*Mate* 1200/2500

NEW!

Auto*Mate* 1250/2550

© Copyright 2009 Beckman Coulter, Inc. Beckman Coulter and the stylized logo are registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. Auto*Mate* is a trademark of Beckman Coulter, Inc.

INDHOLD

Hvad skal en speciallæge i Klinisk Biokemi kunne? 4
Linda Hilsted

Ordföranden har ordet 8
Ingunn Þorsteinsdóttir

Infektionsbiomarkøren procalcitonin til diagnose, prognose og behandlingsvejledning hos intensivpatienter 10
Maria Egede Johansen og Jens-Ulrik Stæhr Jensen

HoloTC og vitamin B12-mangel. 18
Ebba Nexø

Arvelige hemoglobinopatier hos personer av ikke-nordeuropeisk avstamning 22
Petter Urdal, Åshild Amelie Sudmann og Armin Piehler

Citratkoncentrationen och koagulationsanalyser: Dags att harmonisera till 3,2 % 30
Equalis Expertgrupp för Koagulation

Lineær regresjon med flere variabler 36
Johan Bjerner

IFCC News 42
Päivi Laitinen

Bokrecension: Björn J. Bolann. Riktig svar på biokjemiska analyser. En införing i analytisk kvalitetsovervåking 46
Elvar Theodorsson

Den vandrande vetenskapskvinnan: Rungstedlund revisited. 48
Linda Hilsted

Omslagsbild: Det fotografi av sig själv som Karen Blixen skickade KBN:s redaktör Linda Hilsted. Se mer i "Vandrande vetenskapskvinnan". (Fotograf: Okänd)

Hvad skal en speciallæge i Klinisk Biokemi kunne?

Linda Hilsted

Hvad skal man lære, når man er under uddannelse i vores speciale – hvordan skal man lære det – og hvordan skal det evalueres? Vigtige spørgsmål, der kan sætte mange - næsten eksistentielle - overvejelser i gang hos en speciallæge, der selv blev uddannet for dekader siden.

Målbeskrivelse 2004:

I Danmark blev der taget stilling til disse spørgsmål i 2004 i forbindelse med omlægning af speciallægeuddannelsen. Der var behov for at uddannelsen blev kortet ned, så der kunne uddannes flere speciallæger. Uddannelsen blev ændret til 'turnus' (1 år) og så Introduktionsuddannelse på 1 år fulgt af Hoveduddannelsen (2 års klinisk biokemi, ½ års klinik og 1½ års klinisk biokemi). Alle specialer skulle udarbejde en 'målbeskrivelse' for speciallægeuddannelsen, under tæt opfølgning fra Sundhedsstyrelsens side. Udgangspunktet for alle de lægelige specialer var lægens 7 roller: (Medicinsk Ekspert, Kommunikator, Samarbejder, Leder/Administrator, Sundhedsfremmer, Akademiker, Professionel) som var beskrevet i Speciallægekommissionens betænkning fra 2000. En arbejdsgruppe nedsat af Dansk Selskab for Klinisk Biokemi (DSKB) gjorde en meget stor indsats for, at den målsbeskrivelses-matrice, som SST lagde ned over alle specialer, kunne komme til at passe nogenlunde til vores speciale. Sundhedsstyrelsen havde det sidste ord. Forskning måtte fx ikke fylde så meget, som gruppen ønskede det. Specialet måtte nemlig ikke være noget 'særligt' i forhold til de andre. Men der skulle gerne være rigtig mange mål, ledsaget af læringsstrategier og evalueringsmetoder. Alle disse mål skulle så ind i en logbog, tilhørende den uddannelsessøgende, og der skulle signeres og kontrasigneres for hvert eneste mål, når kompetencerne var opnået under uddannelsen. Denne logbog udgør, sammen med varigheden af de formaliserede ansættelser, grundlaget for, at speciallægeautorisationen kan udstedes. Resultatet af gruppens arbejde og Sundhedsstyrelsens redigering blev en målbeskrivelse, som de uddannelsessøgende og de uddannelsesansvarlige overlæger nu har levet med i 6 år. Andre specialer har i den sidste tid haft held til at komme igen med mindre rigide målbeskrivelser – så nu var det tid.

Målbeskrivelse 2009:

DSKB nedsatte i 2009 en arbejdsgruppe af 2 yngre læger under uddannelse, 1 professor, 2 uddannelsesansvarlige overlæger og 1 postgraduat klinisk lektor. Gruppen skulle udarbejde en ny målbeskrivelse, der skulle godkendes af selskabets uddannelsesudvalg, DSKB's bestyrelse og Sundhedsstyrelsen. Sundhedsstyrelsens retningslinjer var stadig, at de 7 roller skulle være fundamentet i målbeskrivelsen, og der skulle stadig kunne evalueres og dokumenteres. Men der måtte gerne reduceres i antallet af mål.

Hvad skulle indholdet så være nu? Gruppen var meget enig: Vi har nogle specialespecifikke kerneydelser, som vi skal uddannes i, og så skal vi have

(Fortsætter side 6)

Do more with less. Let allergy testing be part of your Immunoassay main-stream testing

3gAllergy® provides laboratories with a fully automated solution for better diagnosis of allergic diseases, while improving workflow and reliability of testing. IMMULITE® allergen-specific IgE assays are based on a patented, liquid-allergen technology.

Siemens proprietary liquid allergens are the key to making IMMULITE® Immunoassay allergy tests sensitive, specific, and reliable. The soluble polymer support for the allergens increases the number of binding sites and their accessibility to allergen-specific IgE antibodies. Analytical evaluations and clinical comparison studies[1,2] confirm the reliable performance of the assay system and the utility of 3gAllergy® for specific IgE determinations in the routine laboratory setting.

3gAllergy assays are FDA-cleared for quantitative results and calibrators are standardized against the WHO 2nd International Reference Preparation (IRP)75/502, a coded sample of human serum total IgE.

The comprehensive 3gAllergy® menu covers more than 400 allergens, 55 panels and a growing number of molecular allergens.

With the introduction of molecular allergens the laboratory can provide physicians with additional information such as risk assessment and cross-reactivity patterns and thereby improving allergy diagnosis. Information obtained from analyzing molecular allergens also aids the physician in deciding on allergen specific immunotherapy.

All allergens on the 3gAllergy® menu, including the molecular allergens, can be assayed for specific IgG or IgG4 in addition to the routine testing of specific IgE.

The quantitative measurement of specific IgG antibodies may serve as a monitoring tool for the evaluation of immunological responses during immuno-therapy[3].

Allergy testing on the IMMULITE® platform provides laboratories with unparalleled flexibility in terms of work-flow capabilities. Depending on the needs of your laboratory – allergy can be run alongside your routine immunoassays either on a stand alone instrument or fully integrated on a track system (ADVIA WorkCell® or ADVIA LabCell® systems).

There are already several customers in the Nordic countries that are running allergy as part of their fully automated processes.
For further information visit us at www.siemens.com/diagnostics or contact your local Siemens representative.

1.Ollert, M, et al. Allergen-Specific IgE Measure by a Continuous Random-Access Immunoanalyzer: Interassay Comparison and Agreementwith Skin Testing, Clin Chem, 2005; 51(7) 1241-1249
2.Guilloux, L. et al. Peanut allergy diagnosis in the context of grass pollen sensitization for 125 patients: roles of peanut and cross-reactive carbohydrate determinants specific IgE. Int Arch Allergy Immunol 2009;149:91–97
3.Muller UR. Recombinant hymenoptera venom allergens. Allergy. 2002;57:570-6.

ADVERTISEMENT

Order No. A91DX-9125-A1-4A00 © 2010 Siemens Healthcare Diagnostics inc.

(Fortsat fra side 4)

klinik i uddannelsen. Formålet med klinikken er ikke at gøre os til (halv)gode klinikere, for dels er det urealistisk på den begrænsede tid der er til rådighed, og dels er det ikke rollen som kliniker, vi skal agere i i vores senere speciallægeliv. Klinikopholdet skal derimod bruges til at forstå klinikkens udfordringer og dens behov for klinisk biokemiske ydelser. Vi skal under klinikopholdet først og fremmest sætte os ind i den kliniske afdelings snitflader til den klinisk biokemiske afdeling – og dermed være i stand til som speciallæger at fungere i relation til klinikken.

For de mål der relaterer til uddannelsen på den klinisk biokemiske afdeling kom der (nok lidt overraskende for os ældre læger) et unisont ønske fra de uddannelsessøgende: Meget mere basal metodelære! Spektrofotometri, immunkemi, PCR, sekventering, m.v. Desuden en større detaljeringsgrad af de kompetencer og afledte mål, der skal nås under de klinisk biokemiske ansættelser. Og et nyt mål, som også alle kunne tilslutte sig: Udarbejdelse og indsendelse at et videnskabeligt originalarbejde – som 1. forfatter.

Der var også et fælles ønske om at reducere de talrige mål vedr. diagnostik og behandling af en række intern medicinske sygdomme. De er nu erstattet af generelle krav 'svarende til god medicinsk standard', samt mere omfattende krav til mindst tre sygdomsområder. Og endelig skal man opnå dybtgående viden inden for 1-2 klinisk biokemiske områder (ekspertfunktion). Antallet af mål blev reduceret fra 117 til 77.

Prosa-beskrivelsen af specialet og speciallægens rolle er gjort meget konkret – og forhåbentlig mere rekrutteringsvenlig. For hvad er det de yngre læger gerne vil: De vil gerne fordybe sig og specialiseres og de vil forske! Det ved vi, bl.a. fordi vi i DSKB for et par år siden udsendte et spørgeskema til dem. Ind i mellem forlyder det, typisk fra ældre kolleger (som typisk er mænd), at når flere kvinder kommer på lægestudiet – og flere kvinder vælger vores speciale, så går det ud over forskningen. Så bliver det en anden prioritering og en anden type speciallæger, vi uddanner. Det kunne være interessant at se data angående dette spørgsmål, for det med data plejer vi jo gerne at hylde i vores speciale! Motivationen for forskning mangler i hvert fald ikke.

For de uddannelsesgivende afdelinger er der en lang række tiltag, der kan gøres for at fastholde de yngre lægers forskningsengagement (1).

Er en målbeskrivelse væsentlig for hvordan vi uddanner unge kolleger? For at være ærlig, så mener jeg, at en god uddannelsesafdeling giver en god speciallægeuddannelse, uanset hvad der står i en målbeskrivelse. Men det kan have rekrutteringsmæssig betydning, at målbeskrivelsen indeholder mål, som en ung læge, der skal vælge speciale, kan relatere til. Og især derfor er den utrolig vigtig.

Det har været en god proces med entusiasme fra alle de involverede instanser – inkl. Sundhedsstyrelsen. Vi håber den nye målbeskrivelse bliver til gavn.

1. Nexø E, Rasmussen LM.Klinisk biokemi – et forskningstungt speciale. Fremtid eller en forældet romantisk forestilling? Klinisk Biokemi i Norden 2009;2:46-8.

Foto: Henrik Alfthan

p.s. Målbeskrivelsen ligger på Sundhedsstyrelsens hjemmeside:
http://www.sst.dk/Uddannelse%20og%20autorisation/Special%20og%20videreuddannelse/Laege/Maalbeskrivelser%20i%20speciallaegeuddannelsen/Klinisk_biokemi.aspx

ImmunoCAP® Molecular Allergology pinpoints disease-causing allergens, for unparalleled insight into allergy

Now you can take allergy diagnosis to a whole new level. Because Phadia, pioneers in allergy testing with nearly 40 years of expertise, are pleased to bring you **ImmunoCAP Molecular Allergology**. It's the most precise, comprehensive and advanced diagnostic technology available today.

Unlike traditional allergy testing, **ImmunoCAP Molecular Allergology** uses single allergen components to quantitatively detect IgE antibodies. It's a level of insight previously unimaginable – one that gives you the ability to accurately assess the risk of allergic reaction, identify cross-reactivity patterns, and determine a patient's suitability for specific immunotherapy. All of which means that you can help your patients put their allergy in perspective, and get back to enjoying life.

To learn more about the advancements we're making in allergy testing, contact your local Phadia representative or visit **www.phadia.com**.

ImmunoCAP® Molecular Allergology

ImmunoCAP is a registered trademark of Phadia AB.

Phadia
Setting the Standard

Ordföranden har ordet

Ingunn Þorsteinsdóttir
NFKK

Efter en ljuvlig sommar på Island har dagarna blivit märkbart kortare igen här på de nordliga breddgraderna. När dessa rader skrivs pryder hösten landskapet med sina underbara färger. En dags insamlande av lamm och får nära Islands bultande hjärta på Thingvellir ger energi inför vintermörkret.

Den första nordiska kongressen i klinisk kemi ägde rum i Finse i Norge 1946 då man bl a enades om att bilda Nordisk Förening för Klinisk Kemi och Klinisk Fysiologi.

Huvudämnena för kongressen var diskussion om samarbetsformer for klinsk kemiska och klinisk fysiologiska laboratorier i de nordiska länderna, hemoglobinbestämning och standardisering, proteinbestämning i serum, plasma och urin samt askorbinsyrebestämningar.

De nordiska kongresserna har allt sedan varit ett viktigt forum för kliniska kemister i Norden där vi har delat med oss av kunskap, umgåtts, träffat gamla vänner och knutet nya kontakter.

De nordiska kongresserna har hållits i genomsnitt vart annat år, initialt gemensamt med klinisk fysiologi. Från början växlade det organisatoriska ansvaret mellan fyra föreningar, men efter 1980 mellan fem.

I början av juni i år hölls den 32:a nordiska kongressen i klinisk kemi i Oslo. Målsättningen var att hålla den bästa kongressen genom tiderna och många av oss ansåg att de nådde sitt mål. Det vetenskapliga programmet var både djupt och varierande och det sociala programmet helt strålande. Även vädrets höga makter stod arrangörerna bi. Det märktes att våra norska kollegor hade stora ambitioner och hade lagt hjärtat i varje detalj av organisationen av kongressen. Norsk Selskap for Medisinsk Biokjemi, med Tor-Arne Hagve som kapten, skall ha stort tack för detta strålande arrangemang inom klinisk kemi i Norden.

I Oslo delades ut två priser till framstående kollegor.

Lorentz Eldjarn priset delades ut för första gången. Det är en donation från denne pionjär och föregångare i nordisk laboratoriemedicin. Det delas ut till de som skrivit bästa arbete i SJCLI de sista fem åren. Anders Grubb vann tävlingen för sitt arbete med cystatin C. Andra priset fick Pål Rustad, för arbete med NORIP. Jaana Renko fick tredje pris för arbete om matrix metalloproteinas 9.

Astrup priset, nu sponsrat av Siemens, vanns av Felicitas Müller, Stockholm. Hennes arbete handlar om polyfosfater som koagulationsfaktorer.

Om två år är det Islands tur, för fjärde gången, att arrangera den 33:e nordiska kongressen. Det är verkligen en utmaning att ta över rodret efter den utmärkta kongressen i Oslo. Den lilla, men tappra, skaran kliniska kemister skall försöka göra sitt bästa. Vi ser fram emot att ta emot den samlade styrkan av nordiska kliniska kemister 12-15 juni 2012, på den ljusaste tiden av året.

- Troponin I
- CKMB
- Myoglobin
- CRP
- D-dimer
- ßhCG
- NT-proBNP
- Troponin T*
- hsCRP*
- PT-INR*
- APTT*

* in development

Result in just 18 minutes

The new AQT90 FLEX immunoassay POCT analyzer

- Cardiac, coagulation, infection and pregnancy markers from a single sample
- Superior analytical performance
- Measures on whole-blood or plasma - no sample preparation
- Automated mixing and measurement
- All tests done in parallel - up to 30 tests per hour
- No contact with blood or waste
- Full connectivity

Simpler, faster, better

RADIOMETER

Denmark
Radiometer Danmark
Åkandevej 21
DK-2700 Brønshøj
Tel: +45 38 27 28 29
Fax: +45 38 27 27 12
www.radiometer.dk

Norway
Bergman Diagnostika AS
P.O. Box 403
N-2001 Lillestrøm
Tel: +47 63 83 57 50
Fax: +47 63 83 57 40
www.bergmandiag.no

Sweden
TRIOLAB AB
Åbäcksgatan 6, Box 2109
SE-431 02 Mölndal
Tel: +46 31 81 72 00
Fax: +46 31 81 72 28
www.triolab.se

Finland
Triolab Oy
Lemminkäisenkatu 20
FI-20520 TURKU
Puh.: +358 201 226 600
Fax: +358 201 226 601
www.triolab.fi

Infektionsbiomarkøren procalcitonin til diagnose, prognose og behandlingsvejledning hos intensivpatienter

Maria Egede Johansen[1] og Jens-Ulrik Stæhr Jensen[1, 2]

[1.] Copenhagen HIV Programme, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

[2.] Klinisk mikrobiologisk afdeling 445, Københavns Universitetshospital, Hvidovre

Sepsis er en væsentlig årsag til død hos intensivpatienter (1,2). Bakterielle infektioner øger mortaliteten i alle patientgrupper på intensivafdelinger (ITA) fra 12,1 % hos ikke-inficerede, og op til 43,9% hos inficerede patienter (3). Ydermere øges mortaliteten i væsentlig grad, jo længere tid der går, inden relevant antibiotisk behandling påbegyndes (4,5). I de seneste ti år er vores viden om de patofysiologiske mekanismer hos den septiske patient øget, og på baggrund af denne viden er nye behandlingsstrategier blevet indført, fx implementering af guidelines fra Surviving Sepsis kampagnen (6).

I behandlingen af infektioner hos intensivpatienter er det derfor afgørende med tidlig diagnosticering, identifikation og kontrol af infektionskilde samt hurtig justering af behandlingen ud fra disse parametre. Biomarkøren procalcitonin har været genstand for en lang række kliniske og laboratorieorienterede studier gennem de seneste to årtier.

Begrænsninger i allerede etablerede infektionsmarkører på intensivafdelingen

Brugen af etablerede inflammationsmarkører som C-reaktivt protein (CRP) og leukocytter har vist sig at have flere ulemper på intensivafdelingen. Det drejer sig især om langsom kinetik både ved stigning og fald, samt en langt fra perfekt sensitivitet og specificitet for diagnosen sepsis (7,8). Med hensyn til CRP ved vi, at intensivpatienter - uanset sygdommens sværhedsgrad - ofte har stigning af CRP til patologisk niveau (9). For både CRP, leukocytter ("total" eller neutrofile granulocytter) samt de nyligt opdagede *High mobility group box-1 protein og Lipopolysaccharide Binding Protein* har det vist sig, at der ikke er væsentlig forskel i koncentrationen i blodet hos patienter med alvorlig infektion (bakteriæmi) og patienter med mildere eller ingen infektion (non-bakteriæmi). Behandlingsteamet på intensivafdelingen mangler derfor fortsat en effektiv metode til at afgøre:

1) Hvornår en patient har en alvorlig bakteriel infektion - og
2) hvornår der er behandlingssvigt, således at den antimikrobielle behandling skal ændres (10).

Procalcitonin (PCT) har været foreslået som en sepsismarkør til brug i diagnostik og behandling af infektioner hos intensivpatienter (11).

Procalcitonins biologi, fysiologi og kinetik

PCT (~ 12,6 kDa) består af 114 aminosyrer og er et prohormon for calcitonin (12), der produceres i neuroendokrine medullære C-celler i skjoldbruskkirtlen. Interessen for calcitonins propeptider, herunder PCT, har været stigende siden 1984, hvor calcitonin blev påvist i forbindelse med medullær thyroideacancer (13). I 1993 blev PCT første gang beskrevet som markør for bakteriel sepsis (14).

PCT, produceret i C-celler, undergår posttranslationel behandling, der fører til frigivelse af det bioaktive hormon, calcitonin på 32 aminosyrer. PCT og andre forløbere for calcitonin er i dyreforsøg blevet isoleret i følgende væv udover skjoldbruskkirtlen: Binyrer, milt, rygmarv, hjerne, lever, bugspytkirtel, tyktarm, lunge, fedtvæv, testikler, og mavesæk (15). Calcitonins mRNA (CALC-I gen på kromosom 11) opreguleres mere specifikt end mRNA fra andre inflammatoriske cytokiner, såsom tumor nekrose faktor (TNF-α), interleukin-1 β og interleukin-6, som kan findes opreguleret uden tilstedeværelsen af infektion (15).

PCT's fysiologiske rolle på molekylært niveau er forsat ikke fuldt klarlagt, dog er en intracellulær cAMP-produktion observeret (16). Monneret et al (17) har vist, at PCT påvirker reguleringen af integrin CD 11b, ligesom det er vist, at PCT kan ændre monocytters chemotaksi (18).

Stigningen i PCT koncentration, inden der er opnået kontrol med den bakterielle infektion, er generelt højere end eliminationshastigheden (9). Havde dette ikke været tilfældet, og eliminationshastigheden overgik produktionen, ville man risikere at se en faldende PCT, til trods for en ikke kontrolleret infektion. Eliminationen af PCT fra blodbanen er på nuværende tidspunkt ikke helt afklaret, men foregår formentlig ved hhv. proteolyse samt renal clearance (19). Flere studier tyder på, at PCT-målinger kan anvendes hos patienter med forskellige grader af nyresvigt samt under hæmodialyse og kontinuert veno-venøs hæmofiltration (CVVH), til diagnosticering af bakterielle infektioner (20-22) om end disse er baseret på små patientpopulationer.

Procalcitonin analysemetoder

Der findes på nuværende tidspunkt flere forskellige PCT-analysemetoder (assays) fra forskellige virksomheder, mest udbredt er "PCT sensitive, KRYPTOR®", fra Brahms Diagnostica. Det mest anvendte assay indtil ~ 2003 var "BRAHMS Lumitest®". Interassay variationen er 9-82 % i intervallet 0,0 µg/l - 1,0 µg/l, men <6,5 % over 1,0 µg/l. (9). Dette gør Lumitest® assay'et uanvendeligt i måleintervallet op til 1,0 µg/l, dvs. ved værdier, der oftest forekommer ved lokaliserede infektioner (23,24). I modsætning hertil har det nu mere benyttede assay, "Brahms PCT sensitive, KRYPTOR®", en analytisk sensitivitet på 0,019 µg/l og en funktionel sensitivitet på 0,06 µg/l (25). En anden fordel i forhold til Lumitest® er, at "PCT sensitive analysen, KRYPTOR®" er fuldt automatiseret. Interassay variation er lav i det klinisk relevante interval, for "PCT sensitive KRYPTOR®" er CV < 8 %, hvilket i de fleste tilfælde ikke påvirker tolkningen af resultatet (25).

For nylig er PCT-analysen blevet tilgængelig på nogle af de mest udbredte laboratorieplatforme: Vidas®/mini-Vidas® (Biomerieux), Elecsys og Cobas (begge Roche Diagnostics).

Procalcitonin, kirurgi og traume

Postoperative infektiøse komplikationer fører til svær morbiditet og mortalitet (5). Prognosen er afhængig af tidlig diagnosticering, og behandling rettet mod den ætiologiske faktor. Ved behandlingssvigt er en kontinuerlig overvågning af behandlingsrespons særdeles vigtig for at sikre rettidig behandlingsændring. Daglige målinger af CRP anvendes ofte til dette formål, men der er alvorlige begrænsninger af denne markør i det postoperative forløb. I dagene efter operation og traume øges CRP koncentrationen for at nå et plateau på dag 2-4, og ukontrolleret infektion er derfor i de første postoperative dage ofte svær at skelne fra det naturlige CRP-forløb (26-28).

Flere grupper har undersøgt forløbet af PCT og CRP efter abdominal kirurgi. PCT-niveauet stiger moderat efter operation, men falder - i modsætning til CRP og leukocytter - allerede den efterfølgende dag hos patienter uden komplikationer. Det er vist, at patienter med insufficient behandlede bakterielle infektioner får en PCT stigning postoperativt (29).

Præanalytisk og analytiske forhold for PCT-måling

Præanalytisk

Både arterielt og venøst blod kan benyttes til analyse af PCT-koncentrationen (30). PCT er stabilt i blod ved 4°C i op til 96 timer (25). De fleste assays er i

(Fortsætter side 12)

(Fortsat fra side 11)

stand til både at benytte serum eller EDTA-plasma.

Som beskrevet har visse patientgrupper uden bakteriel infektion en PCT-stigning til patologiske niveauer, men koncentrationen falder hurtigt i døgnet efter hændelsen.

Kortikosteroider er kendt for at påvirke inflammatoriske markører som fx leukocyt-koncentrationen. Dette gør sig dog ikke gældende for PCT-koncentrationen, som ikke påvirkes i væsentlig grad (31).

Analytisk

PCT-koncentrationen kan påvirkes af andre blodkomponenter, bla. forhøjede niveauer af bilirubin og trigycerid (25). Ved bilirubin koncentration under 10 g/L samt triglycerid-koncentration under 4 mmol/L genfindes > 90% af PCT i blodprøven. Brahms PCT sensitive KRYPTOR® er i stand til at detektere en sådan interferens og prøven vil derfor ikke blive analyseret. Interassay variationen for 'PCT sensitive KRYPTOR®' er beskrevet ovenfor.

Diagnostisk nøjagtighed af "Sepsis"-markører

Sepsis defineres oftest i henhold til ACCP / SCCM-Chicago 1992 konsensuskonference som *systemisk inflammatoriske respons syndrom* (SIRS) + tegn på lokaliseret infektion (32). Traditionelt set testes nye markører for inflammation mod en "*guld standard*" gældende for sepsis. Den største ulempe ved at benytte denne guld standard til at teste PCT er, at PCT hovedsagelig er en bakteriel markør. ACCP / SCCM kriterier for sepsis fortolkes ofte som tegn på infektion af *enhver* ætiologi, dvs forårsaget af bakterier, vira, parasitter eller svampe. Derudover er infektionstegnene blevet fortolket meget forskelligt, fra positiv bloddyrkning, kolonisering af huden eller øvre luftveje samt "unormalt røntgen af thorax" og "klinisk diagnose".

Når der er så forskellige fortolkningsmuligheder af kriterierne, må det forventes, at resultaterne af afprøvningen af nye markører for inflammation, herunder PCT, afhænger af patientpopulation og fortolkningen af sepsisdiagnosen. Sensitiviteten og specificiteten af PCT i forhold til fx CRP, er højest i de undersøgelser, hvor patientgruppen hyppigt har en eller anden form for bakteriel infektion, fx intensivpatienter. Hvis en perfekt (100 % sensitivitet og 100 % specificitet) test for systemisk bakteriel infektion skulle testes mod de kliniske kriterier for sepsis, ville den sandsynligvis klare sig dårligt i populationer, hvor alvorlige bakterielle infektioner ikke er den hyppigste årsag til SIRS.

Fejlkilder ved sammenligning af Procalcitonin med andre markører

Problemet med *guld standard* er diskuteret ovenfor. Udover *guld standard*-problemet ses fejlkilder i forhold til "*Locked bias*", *den valgte strategi for prøveudtagningen (enkelt vs. gentagne målinger)* og *hvilket PCT-assay, der anvendes i laboratoriet*.

TABEL 1. Risiko for død hos patienter med stigende og faldende PCT niveauer.

Dage med PCT-ændring efter PCT ≥1,0 µg/l	90 dages mortalitet		Relativ risiko (PCT Stigning) (95% CI)	P-værdi for forskel i risiko	Patienter (n)
	alert PCT *	non-alert PCT **			
1	56,1%	30,7%	1,8 (1,4-2,4)	<0,0001	336
2	62,2%	28,7%	2,2 (1,6-3,0)	<0,0001	261
3	72,4%	26,0%	2,8 (2,0-3,8)	<0,0001	233

* **alert PCT koncentration**, *PCT over 1,0 µg/l som stiger fra forrige dag*
** **non-alert PCT koncentration**, *PCT under 1,0 µg/l eller som er over 1,0 µg/l og falder fra forrige dag*
P-værdier e r estimeret med Chi-square test for lige proportioner. Patienter med faldende PCT koncentrationer efter en grænse på 1,0 µg/l er nået, og patienter med konstant lav PCT værdier regnes som "non-alert" PCT. Patienter med stigende PCT efter 1,0 µg/l er nået, er "alert" PCT. Patienter kan indgå i flere kategorier, fx patienter med stigende PCT tendens i tre dage, indgår også i kategorien med stigende PCT tendens på første og anden dagen.

"*Locked bias*"
Når en undersøgelse foretages, testes ofte en traditionel og meget anvendt analyse (fx CRP) mod den alternative metode (fx PCT). Hvis den traditionelle markør (fx CRP) benyttes til at stille en bestemt infektionsdiagnose (og har været anvendt til det i den pågældende undersøgelse), vil disse to, uanset om diagnosen er sand, være koblet sammen. En høj CRP vil fx ofte føre til enten direkte diagnose af infektion eller føre til supplerende undersøgelser for infektion og dermed føre til infektionsdiagnose. Samtidig vil det praktisk taget være umuligt at blinde de personer i studie-teamet, der diagnosticerer infektion med brug af CRP.

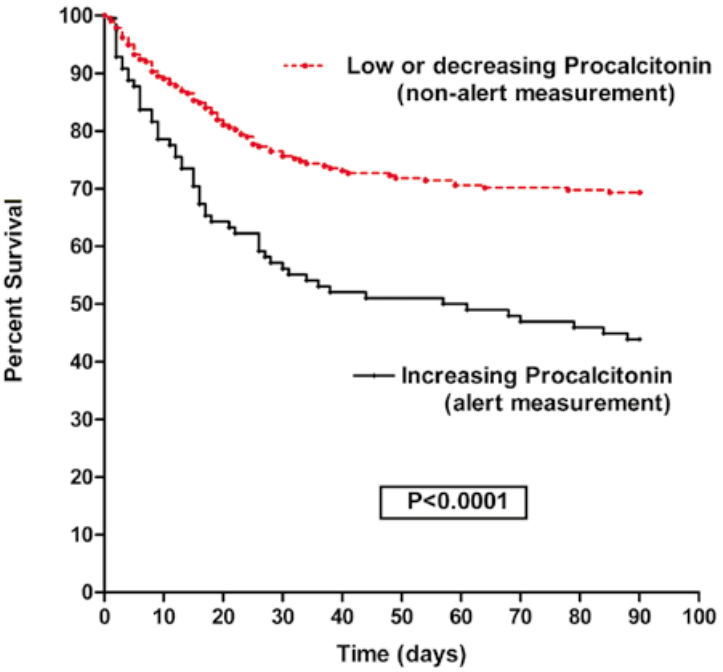
Enkelt versus sekventielle daglige målinger
De fleste undersøgelser, der sammenligner CRP og PCT-koncentrationer ved sepsis eller andre infektioner, benytter kun en enkelt måling af begge markører. Det er veldokumenteret, at traumer og kirurgi i sig selv medfører en stigning i CRP niveauer på 2-4 dagen. Dette kan være med til at vanskeliggøre diagnostikken af nytilkomne bakterielle infektioner. Ud over ved progressive bakterielle infektioner ses PCT-niveauer at stige ved fx omfattende kirurgi, traume, hæmoragisk shock samt AMI. En mulig forklaring på dette er en translokation af endotoksiner (og andre bakterieprodukter) fra tarmen til blodbanen. Når den igangsættende begivenhed er afsluttet, vil PCT-kinetik imidlertid hurtigt domineres af elimination (27). Ved kun at sammenligne en enkelt måling af PCT (eller enhver anden markør) med CRP, udelukker man muligheden for, at PCT kan skelne en bakteriel infektion fra en ikke-bakteriel årsag, hvilket gentagne målinger ville muliggøre.

Procalcitonin og mortalitet

Jensen et al. (9) har undersøgt PCT stigning som en prædiktor for død hos patienter på intensivafdelinger. Resultaterne blev sammenlignet med stigning i CRP og leukocyt-koncentrationer i blodet hos samme patientgruppe. Undersøgelsen viste, at stigning i CRP og leukocytter ikke udviste prædiktive egenskaber. Derimod observerede man, at blot én enkelt dags stigning i PCT, når en PCT koncentration på 1,0 µg/l var nået, ("alert-PCT") samt den maksimalt opnåede PCT koncentration, begge var uafhængige prædiktorer for mortalitet. Ydermere var mortaliteten stærkt afhængig af det samlede antal PCT stigninger under indlæggelse på ITA. Resultaterne er opsummeret i TABEL 1 og FIGUR 1. Undersøgelsen blev foretaget med BRAHMS Lumitest®. Øvrige PCT analyse metoder (herunder den ofte anvendte Brahms KRYP-

(Fortsætter side 14)

Foto: Henrik Alfthan



FIGUR 1. 90 dages mortalitet hos patienter med en lav (under 1,0 µg/l) eller faldende PCT ("non-alert measurement") og stigende PCT, efter grænsen på 1,0 µg/l er nået første gang ("alert measurement").

Alert measurement: PCT over 1,0 µg/l som stiger fra forrige dag
Non-alert measurement: PCT under 1,0 µg/l eller som er over 1,0 µg/l og falder fra forrige dag

(Fortsat fra side 13)

TOR®) har vist at have høj korrelation med denne metode (25). Disse resultater understreger nødvendigheden af at lave sekventielle målinger af PCT, hvis analysen indføres til rutinemæssig brug.

Skal daglige PCT målinger gennemføres på intensivafdelinger?

Vi ved endnu ikke, om gentagne daglige PCT målinger på ITA er "nice to know" eller "need to know". Bekræfter vi blot vores (allerede valgte) kliniske beslutninger, eller kan vi faktisk ændre diagnostisk og terapeutisk strategi i tide, og dermed reducere komplikationer ved bakteriel, og /eller reducere dødeligheden hos patienter på intensivafdelinger?

I 2006 indledte en dansk gruppe *The Procalcitonin And Survival Study (PASS)*, et multicenter randomiseret, kontrolleret interventionsstudie, hvori der indgik 1200 patienter. Formålet med PASS var at afklare, om en antimikrobiel behandlingsstrategi, der blev vejledt af daglige PCT-målinger, kunne forbedre overlevelsen blandt inficerede intensivpatienter. Detaljer vedr. design, intervention og forventede resultater kan findes i den publicerede protokol (33). De primære resultater af dette er indsendt til publikation [JU Jensen, L Hein, B Lundgren et al., Antimicrobial interventions guided by procalcitonin in the intensive care unit to increase adequate antimicrobial therapy and improve survival (Procalcitonin And Survival Study): a multicentre randomised controlled trial. Submitted]. Forventes publiceret i efteråret 2010.

Konklusion

Procalcitonin, et 114-aminosyre prohormon for calcitonin, er en lovende sepsismarkør med en fordelagtig kinetik til brug på intensivafdelinger. Kliniske undersøgelser har vist, at denne sepsismarkør er tæt relateret til bakteriel infektion, og har desuden vist, at blot en målt stigning i PCT- koncentrationen, efter et cut-off på 1,0 µg/l er nået, er en uafhængig prædiktor for død hos intensivpatienter.

Det er forsat uvist, om PCT-vejledt antimikrobiel behandling kan medføre rettidige behandlingsskift og dermed kan forbedre overlevelse og mindske komplikationsraten hos intensivpatienter. Resultater fra PASS, et større randomiseret studie, der undersøger dette, forventes snarligt publiceret.

Referencer

1. Garnacho-Montero J, Garcia-Garmendia JL, Barrero-Almodovar A, Jimenez-Jimenez FJ, Perez-Paredes C, Ortiz-Leyba C. Impact of adequate empirical antibiotic therapy on the outcome of patients admitted to the intensive care unit with sepsis. Crit Care Med 2003;31:2742-51.
2. Alberti C, Brun-Buisson C, Goodman SV, Guidici D, Granton J, Moreno R, et al. Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients. Am J Respir Crit Care Med 2003;168:77-84.
3. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. Intensive Care Med 2002;28:108-21.
4. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. Chest 1999;115:462-74.
5. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. Crit Care Med 2006;34:1589-96.
6. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. Crit Care Med 2008;36:296-327.
7. Castelli GP, Pognani C, Cita M, Stuani A, Sgarbi L, Paladini R. Procalcitonin, C-reactive protein, white blood cells and SOFA score in ICU: diagnosis and monitoring of sepsis. Minerva Anestesiol 2006;72:69-80.
8. Lavrentieva A, Kontakiotis T, Lazaridis L, Tsotsolis N, Koumis J, Kyriazis G, et al. Inflammatory markers in patients with severe burn injury. What is the best indicator of sepsis? Burns 2007;33:189-94.
9. Jensen JU, Heslet L, Jensen TH, Espersen K, Steffensen P, Tvede M. Procalcitonin increase in early identification of critically ill patients at high risk of mortality. Crit Care Med 2006;34:2596-602.
10. Gaini S, Koldkjaer OG, Moller HJ, Pedersen C, Pedersen SS. A comparison of high-mobility group-box 1 protein, lipopolysaccharide-binding protein and procalcitonin in severe community-acquired infections and bacteraemia: a prospective study. Crit Care 2007,11(4):R76.
11. Ventetuolo CE, Levy MM. Biomarkers: diagnosis and risk assessment in sepsis. Clin Chest Med 2008;29:591-603, vii.
12. Weglohner W, Struck J, Fischer-Schulz C, Morgenthaler NG, Otto A, Bohuon C, et al. Isolation and characterization of serum procalcitonin from patients with sepsis. Peptides 2001;22:2099-103.
13. Birnbaum RS, Mahoney WC, Burns DM, O'Neil JA, Miller RE, Roos BA. Identification of procalcitonin in a rat medullary thyroid carcinoma cell line. J Biol Chem 1984;259:2870-4.
14. Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. Lancet 1993;341:515-8.
15. Muller B, White JC, Nylen ES, Snider RH, Becker KL, Habener JF. Ubiquitous expression of the calcitonin-i gene in multiple tissues in response to sepsis. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:396-404.
16. Burns DM, Forstrom JM, Friday KE, Howard GA, Roos BA. Procalcitonin's amino-terminal cleavage peptide is a bone-cell mitogen. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 23:9519-23.
17. Monneret G, Arpin M, Venet F, Maghni K, Debard AL, Pachot A, et al. Calcitonin gene related peptide and N-procalcitonin modulate CD11b upregulation in lipopolysaccharide activated monocytes and neutrophils. Intensive Care Med 2003;29:923-8.

(Fortsætter side 16)

(Fortsat fra side 16)

18. Wiedermann FJ, Kaneider N, Egger P, Tiefenthaler W, Wiedermann CJ, Lindner KH, et al. Migration of human monocytes in response to procalcitonin. Crit Care Med 2002;30:1112-7.
19. Meisner M, Lohs T, Huettemann E, Schmidt J, Hueller M, Reinhart K. The plasma elimination rate and urinary secretion of procalcitonin in patients with normal and impaired renal function. Eur J Anaesthesiol 2001;18:79-87.
20. Level C, Chauveau P, Delmas Y, Lasseur C, Pelle G, Peuchant E, et al. Procalcitonin: a new marker of inflammation in haemodialysis patients? Nephrol Dial Transplant 2001;16:980-6.
21. Level C, Chauveau P, Guisset O, Cazin MC, Lasseur C, Gabinsky C, et al. Mass transfer, clearance and plasma concentration of procalcitonin during continuous venovenous hemofiltration in patients with septic shock and acute oliguric renal failure. Crit Care 2003;7:R160-R166.
22. Sitter T, Schmidt M, Schneider S, Schiffl H. Differential diagnosis of bacterial infection and inflammatory response in kidney diseases using procalcitonin. J Nephrol 2002;15:297-301.
23. Christ-Crain M, Opal SM. Clinical review: the role of biomarkers in the diagnosis and management of community-acquired pneumonia. Crit Care;14:203.
24. Gurgoze MK, Akarsu S, Yilmaz E, Godekmerdan A, Akca Z, Ciftci I, et al. Proinflammatory cytokines and procalcitonin in children with acute pyelonephritis. Pediatr Nephrol 2005;20:1445-8.
25. Steinbach G, Rau B, Debard AL, Javourez JF, Bienvenu J, Ponzio A, et al. Multicenter evaluation of a new immunoassay for procalcitonin measurement on the Kryptor System. Clin Chem Lab Med 2004;42:440-9.
26. Meisner M, Tschaikowsky K, Hutzler A, Schick C, Schuttler J. Postoperative plasma concentrations of procalcitonin after different types of surgery. Intensive Care Med 1998;24:680-4.
27. Lindberg M, Hole A, Johnsen H, Asberg A, Rydning A, Myrvold HE, et al. Reference intervals for procalcitonin and C-reactive protein after major abdominal surgery. Scand J Clin Lab Invest2002;62:189-94.
28. Reith HB, Mittelkotter U, Debus ES, Kussner C, Thiede A. Procalcitonin in early detection of postoperative complications. Dig Surg 1998;15:260-5.
29. Novotny AR, Emmanuel K, Hueser N, Knebel C, Kriner M, Ulm K, et al. Procalcitonin ratio indicates successful surgical treatment of abdominal sepsis. Surgery 2009;145:20-6.
30. Meisner M, Tschaikowsky K, Schnabel S, Schmidt J, Katalinic A, Schuttler J. Procalcitonin--influence of temperature, storage, anticoagulation and arterial or venous asservation of blood samples on procalcitonin concentrations. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1997;35:597-601.
31. de Kruif MD, Lemaire LC, Giebelen IA, Struck J, Morgenthaler NG, Papassotiriou J, et al. The influence of corticosteroids on the release of novel biomarkers in human endotoxemia. Intensive Care Med 2008;34:518-22.
32. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. Chest 2009;136(5 Suppl):e28.
33. Jensen JU, Lundgren B, Hein L, Mohr T, Petersen PL, Andersen LH, et al. The Procalcitonin And Survival Study (PASS) - a randomised multi-center investigator-initiated trial to investigate whether daily measurements biomarker Procalcitonin and pro-active diagnostic and therapeutic responses to abnormal Procalcitonin levels, can improve survival in intensive care unit patients. Calculated sample size (target population): 1000 patients. BMC Infect Dis 2008,8:91.

IDS Nordic

Bone, Growth and Cartilage Diagnostics

immunodiagnosticsystems

IDS-iSYS - Our Fully Automated Speciality Analyzer

IDS- iSYS assay menu

Calciotropic Hormones

25-Hydroxy Vitamin D
1,25-Dihydroxy Vitamin D*
Intact PTH
Bioactive PTH (1-84)*

Growth Disorders

hGH
IGF-I
IGF-BP3*

Bone Turnover

Serum CrossLaps® (CTX-I)
Intact PINP
BoneTRAP® (TRACP 5b)*
N-Mid® Osteocalcin
Ostase® BAP

Hypertension

Renin*
Aldosteron*

* in development

Automated Vitamin D now available!

Immunoassays

Bone Markers

25-Hydroxy Vitamin D
1,25-Dihydroxy Vitamin D
Intact PTH (1-84)
OSTASE® BAP
N-MID® Osteocalcin
BoneTRAP® (TRACP 5b human)
CrossLaps® (CTX-I)

Cartilage Markers

Urine CartiLaps® (CTX-II)
Total Aggrecan

Come and visit us at

Medica

Location: Düsseldorf, Germany

Date: 17th-20th November, 2010

Booth: # F21

Immunodiagnostic Systems Nordic a/s (IDS Nordic)
Marielundvej 30, 2. sal, 2730 Herlev, Denmark
Tel: + 45 44 84 0091 Email: info.nordic@idsplc.com Homepage: www.idsplc.com

IDS- iSYS – Our fully Automated Speciality Analyzer

HoloTC og vitamin B12-mangel

Ebba Nexø
Klinisk Biokemisk afdeling, Århus Universitetshospital, Århus Sygehus
e.nexo@dadlnet.dk

"Why measure total B12. Why not measure the part of B12 available for the cells, holoTC" gjaldede det på konference efter konference i slut-firserne fra nu afdøde Victor Herbert, den navnkundige amerikanske folat og vitamin B12-forsker. Han får nok ret, Victor Herbert, selv om holoTC endnu ikke har erstattet måling af total-cobalamin i daglig klinisk praksis.

Manden bag ideen om holoTC

Det var Victor Herbert, der på egen krop viste, at folatmangel kan medføre megaloblastær anæmi. Han satte sig selv på en diæt af udkogte fødevarer - og ventede. Efter nogle måneder var han døden nær. Men det var ikke folatmangel – blot mangel på kalium. Da det var korrigeret, fortsatte forsøget til den megaloblastære anæmi var en realitet (1).

Det var også Victor Herbert, der på to hjul drønede gennem New Yorks gader for at forsyne mig med byens bedste cheesecake, inden jeg efter endt jobinterview tog turen tilbage til basen i Baltimore. Som bekendt valgte jeg Danmark og ikke New York.

Der kunne fortælles meget mere om Victor Herbert, men tilbage på sporet. Denne artikels emne er holoTC og vitamin B12-mangel.

HoloTC - en del af plasma-cobalamin

Vitamin B12 i plasma er bundet til to proteiner (fig 1). Det meste er bundet til haptocorrin, et protein af ukendt funktion. Kun en mindre del er bundet til transcobalamin, det protein der transporterer cobalamin ind i kroppens celler. Det er denne del af plasma-cobalamin, der går under navnet holoTC eller aktivt B12.

De første bud på koncentrationen af holoTC kom fra studier, hvor man målte total-cobalamin (eg. 340 pmol/L) og haptocorrinbundet cobalamin (eg. 280 pmol/L). HoloTC var forskellen mellem disse to store tal (eg. 60 pmol/L). Med en analyseusikkerhed på knap 10 % vil enhver klinisk biokemiker straks kunne se, at det ikke er let at få brugbare resultater. Men Victor Herbert var ikke klinisk biokemiker. Han holdt på sit, og fik os andre provokeret til at udvikle brugbare metoder til måling af holoTC. En medvirkende årsag var, at de allerede etablerede analyser ikke altid slog til. Total-cobalamin har både en lav diagnostisk sensitivitet og specificitet, og de to metaboliske markører MMA og homocystein har lav specificitet og er påvirket af nyrefunktionen.

Måling af holoTC

I halvfemserne kom et frugtbart samarbejde i stand mellem det norske firma Axis og forskergrupper i Århus, formaliseret gennem et EUREKA projekt. Det førte til udvikling af metoder, der på forskellig vis kunne måle holoTC. Et forslag er at fjerne det umættede transcobalamin (apoTC) og måle det, der er tilbage. Denne metode er udviklet til en in-house ELISA, der i dag anvendes i rutinen på Århus Universitetshospital, Århus Sygehus (2). Et andet princip er at fælde alt transcobalamin og så måle mængden af cobalamin i bundfaldet (3,4). Men det enkleste princip er udviklet af Axis, nu Axis-Shield. De har markedsført en analyse, der anvender et antistof specifikt for cobalaminmættet transcobalamin (holoTC, aktivt B12). Analysen, der tillader måling af holoTC uden forbehandling af prøven, kan udføres på Axzym (5) og forventes med tiden at blive tilbudt også på andre platforme.

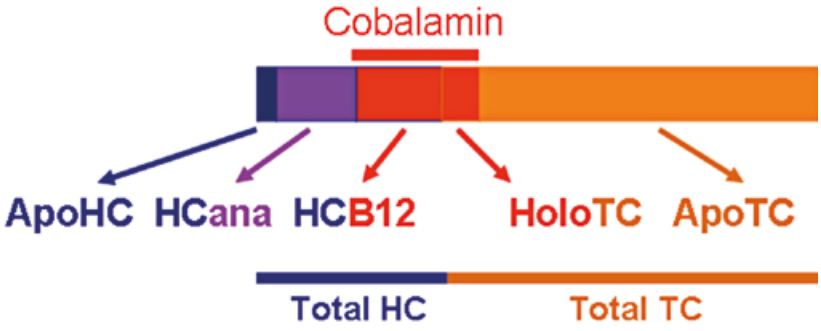


Fig 1. Cobalamin og dets bindingsproteiner i plasma.
To proteiner binder cobalamin i plasma. Transcobalamin er nødvendigt for transport af cobalamin ind i kroppens celler. Haptocorrin binder både cobalamin og inaktive analoger af cobalamin. Funktionen af haptocorrin er ukendt. Kun en mindre del af plasma-cobalamin er bundet til transcobalamin (holoTC), det meste transcobalamin cirkulerer umættet med cobalamin (apoTC). Total TC er summen af apo og holoTC. Det meste cobalamin i plasma er bundet til haptocorrin (HCB12). Desuden transporterer HC cobalamin analoger (HCanal), og kun en meget lille del af HC cirkulerer umættet med cobalamin (apoHC). Total HC er summen af HCB12, apoHC og HCanal. Ved rutineanalyse af cobalamin undersøges summen af holoTC og HCB12.

Fra analyse til klinisk anvendelse

Et er at kunne måle holoTC, noget andet er at vise dens kliniske duelighed. Resultaterne fra et stort EU-projekt med deltagelse fra Danmark, Norge, England og Irland har haft afgørende betydning. Projektets særkende var, at de halvårlige møder blev afholdt på steder, vi gerne ville besøge, Malta, Madeira, Tenerife, Barcelona og Skagen, for nu at nævne nogle yderpunkter. Jeg husker endnu det lettelsens suk, der ved kysten syd for Barcelona gik gennem forsamlingen, da de første data bekræftede, at holoTC faldt før total-cobalamin under udvikling af vitamin B12 mangel. Projektet fik ny energi.

Lidt efter lidt viste det sig, at holoTC er et utvetydigt fremskridt i forbindelse med diagnose af vitamin B12-mangel under graviditeten, til undersøgelse af optagelsen af vitamin B12 og ved diagnose af transcobalaminmangel.

HoloTC er bedre end total-cobalamin hos gravide

Total-cobalamin falder fysiologisk ganske markant igennem graviditeten og er ved termin kun ca. 50 % af de værdier, der kan måles nogen tid efter nedkomsten (6). Det gør måling af total-cobalamin næsten nytteløs, når vitamin B12-mangel skal udelukkes hos den gravide patient. HoloTC er anderledes. Den holder sig uændret igennem hele graviditeten og må derfor anbefales som markør for vitamin B12-mangel hos gravide (6).

HoloTC og vurdering af vitamin B12-optagelsen

Når en patient har fået stillet diagnosen vitamin B12-mangel, kan det være af betydning for den fortsatte behandling, at vide om patienten kan optage vitaminet. Det kunne i mange år undersøges med den såkaldte Schillings test. Patienten fik en radioaktiv dosis af vitaminet, og med forskellige teknikker målte man herefter, hvor meget af denne dosis patienten optog. Var der god optagelse, kunne patienten behandles med vitaminpiller, men var optagelsen mangelfuld, måtte patienten sættes på en livslang behandling med indsprøjtninger. Nu er Schillings testen nedlagt, og erstattet af en ny undersøgelse (CobaSorb) baseret på måling af holoTC.

Ved CobaSorb testen måles holoTC før og to dage efter en daglig indtagelse af tre gange ni mikrogram vitamin B12 (cyanocobalamin). En stigning i holoTC på mere end 22 % - og i absolutte tal mere end 10 pmol/L - viser, at patienten kan optage vitamin B12 (7). Også denne test er plaget af de store tals besværligheder. Den kan kun anvendes, hvis baseline holoTC er under 65 pmol/L. Er holoTC højere (eg. 100 pmol/L), vil det være usikkert, om en værdi efter indtag af vitamin B12 på eg. 105 pmol/L er falsk negativ på grund af analyseusikkerhed og intraindividuel variation. I daglig klinik er denne begrænsning af mindre betydning, fordi det selvsagt stort set kun er relevant at undersøge optagelsen, hvis patienten har tegn på vita-

(Fortsætter side 20)

(Fortsat fra side 19)

min B12-mangel og dermed en holoTC koncentration vel under 65 pmol/L. I forskningssammenhæng er begrænsningen ikke tilfredsstillende, og det har ført til udvikling af C-CobaSorb testen. Testen kan lade sig gøre, fordi der normalt stort set ikke findes cyanocobalamin i blodet, og fordi cyanocobalamin optages uden at blive omdannet. Ved at måle indholdet af cyanocobalamin i stedet for holoTC kan optagelse derfor påvises også hos patienter med en baseline holoTC over 65 pmol/L (8). C-CobaSorb er en tidskrævende og besværlig analyse, der ikke anvendes i rutinen, men CobaSorb testen udføres i dag som rutineanalyse på klinisk biokemisk afdeling, Århus Universitetshospital, Århus Sygehus. De praktiske forhold vedrørende undersøgelsen står beskrevet i afdelingens elektroniske analysefortegnelse under Pt-Cobalamin absorption.

Mangel på transcobalamin og holoTC, en sjælden sygdom

Det tredje område, hvor måling af holoTC og navnlig total TC (9) er et klart fremskridt, er ved diagnose af medfødt transcobalaminmangel (10). Det er en sjælden sygdom, hvor patienterne typisk har et normalt niveau af total-cobalamin. Nok engang de store tals magi. Total-cobalamin ændres ikke markant, fordi tilskuddet fra holoTC bortfalder. Det er vigtigt at få stillet diagnosen tidligt, fordi udskydelse af behandling med store doser cobalamin kan medføre varige neurologiske skader hos barnet. Klinisk biokemisk afdeling, Århus Sygehus udfører både analyse for holoTC og total TC, og fungerer som internationalt center i forbindelse med udredning af patienter med medfødt transcobalaminmangel.

Kan holoTC erstatte total-cobalamin?

Det store og endnu uafklarede spørgsmål er, om holoTC vil komme til at erstatte måling af total-cobalamin, eller om holoTC skal forblive et supplement til denne analyse. Langt de fleste studier viser, at holoTC er lidt bedre end total-cobalamin til påvisning af vitamin B12-mangel. I de fleste studier er vitamin B12 mangel defineret på baggrund af MMA og undertiden med inddragelse af homocystein. Eksempelvis fandt vi, i et studie af over 1500 patienter, hvor ca. 100 havde vitamin B12-mangel defineret som en MMA over 0,75 mikromol/L, et areal under ROC kurven (AUC) på 0,87 for holoTC og på 0,76 for total-cobalamin (11). Problemet med brug af MMA som "golden standard" er undgået i et nyt arbejde, der med en svært tilgængelig matematisk modulering klassificerer patienterne baseret på alle fire markører for vitamin B12-mangel og herefter undersøger, hvilken parameter der enkeltvis indeholder mest information. HoloTC er bedst med en AUC på 0,93 skarpt fulgt af MMA (AUC: 0,92), medens total-cobalamin (AUC: 0,88) og homocystein (AUC: 0,87) ikke er så gode (12).

HoloTC i dag – og i årene fremover

Samlet set er det rimeligt at konkludere, at holoTC er en lidt bedre parameter end total-cobalamin til påvisning af vitamin B12-mangel. Det må derfor forventes, at holoTC erstatter total-cobalamin den dag, analysen findes på de almindeligt anvendte platforme, og den dag analysen prismæssigt nærmer sig prisen for en cobalaminanalyse. Indtil det sker, vil holoTC med fordel kunne anvendes ved diagnose af vitamin B12-mangel hos gravide og til vurdering af vitaminets optagelse.

Victor Herbert ville have glædet sig. Måske ville han have skrevet nok en bog og introduceret den på sin karakteristiske måde - som afslutningsfanfare på et skarpt spørgsmål eller en korrekt korrektion af det netop afholdte foredrag: " And while I have the mic: You can buy my new book at the coffee break- at discount price - and signed by me for no extra charge". Jeg fik en af dem – helt gratis og med signatur!

Referencer.

1. Herbert V. Experimental nutritional folate deficiency in man. Trans Assoc Am Physicians. 1962;75:307-20.
2. Nexo E, Christensen AL, Hvas AM, Petersen TE, Fedosov SN. Quantification of holotranscobalamin, a marker of vitamin B12 deficiency. Clin Chem. 2002;48:561-2.
3. Ulleland M, Eilertsen I, Quadros EV, Rothenberg SP, Fedosov SN, Sundrehagen E, Orning L. Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (holo-transcobalamin) in serum. Clin Chem. 2002;48:526-32.
4. Refsum H, Johnston C, Guttormsen AB, Nexo E. Holotranscobalamin and total transcobalamin in human plasma: determination, determinants, and reference values in healthy adults. Clin Chem. 2006;52 :129-37.
5. Brady J, Wilson L, McGregor L, Valente

E, Orning L. Measurement ofActive B12: a rapid, automated assay for holotranscobalamin on the Abbott AxSYM analyzer.Clin Chem. 2008;54:567-73.
6. Morkbak AL, Hvas AM, Milman N, Nexo E. Holotranscobalamin remains unchanged during pregnancy. Longitudinal changes of cobalamins and their binding proteins during pregnancy and postpartum. Haematologica. 2007;92:1711-2.
7. Hvas AM, Morkbak AL, Nexo E. Plasma holotranscobalamin compared with plasma cobalamins for assessment of vitamin B12 absorption; optimisation of a non-radioactive vitamin B12 absorption test (CobaSorb). Clin Chim Acta. 2007;376:150-4.
8. Hardlei TF, Mørkbak AL, Bor MV, Bailey LB, Hvas AM, Nexo E. Assessment of vitamin B(12) absorption based on the accumulation of orally administered cyanocobalamin on transcobalamin. Clin Chem. 2010;56: 432-6.
9. Nexo E, Christensen AL, Petersen TE, Fedosov SN. transcobalamin by ELISA. Clin Chem. 2000;46:1643-9.
10. Nissen PH, Nordwall M, Hoffmann-Lücke E, Sorensen BS, Nexo E. Transcobalamin deficiency caused by compound heterozygosity for two novel mutations in the TCN2 gene: a study of two affected siblings, their brother, and their parents. J Inherit Metab Dis. 2010 Jul 6. [Epub ahead of print].
11. Clarke R, Sherliker P, Hin H, Nexo E, Hvas AM, Schneede J, Birks J, Ueland PM, Emmens K, Scott JM, Molloy AM, Evans JG. Detection of vitamin B12 deficiency in older people by measuring vitamin B12 or the active fraction of vitamin B12, holotranscobalamin. Clin Chem. 2007;53:963-70.
12. Fedosov SN. Metabolic signs of vitamin B(12) deficiency in humans: computational model and its implications for diagnostics. Metabolism. 2010;59:1124-38.

Foto: Henrik Alfthan, Svalbart, Norge.

Arvelige hemoglobinopatier hos personer av ikke-nordeuropeisk avstamning

Petter Urdal, Åshild Amelie Sudmann og Armin Piehler
Avdeling for medisinsk biokjemi, Oslo universitetssykehus, Ullevål, Oslo, Norge

Med den økende innvandringen til Norden de siste tiårene har de arvelige hemoglobinopatiene blitt stadig vanligere. De fleste medisinsk biokjemiske avdelinger får i dag prøver til utredning for slike tilstander. Oftest er utgangspunktet hematologiske forandringer som gir mistanke om hemoglobinopati. Ikke sjelden blir et abnormt hemoglobin påvist tilfeldig ved analyse av HbA1c med kromatografisk metode.

Utredning for hemoglobinopatier har foregått i mange år, men forbedrede kromatografiske og molekylærbiologiske metoder har revolusjonert diagnostikken. Vi skal i denne artikkelen gjennomgå dagens diagnostiske muligheter og streife innom noen av de utfordringer man kan møte ved slike utredninger.

Normale hemoglobiner

Hemoglobin består av fire globinkjeder hvorav to alltid er α-kjeder mens de to øvrige kjedene er av β-, δ- eller γ-type. De sistnevnte valgmuligheter gir opphav til de tre hemoglobiner:

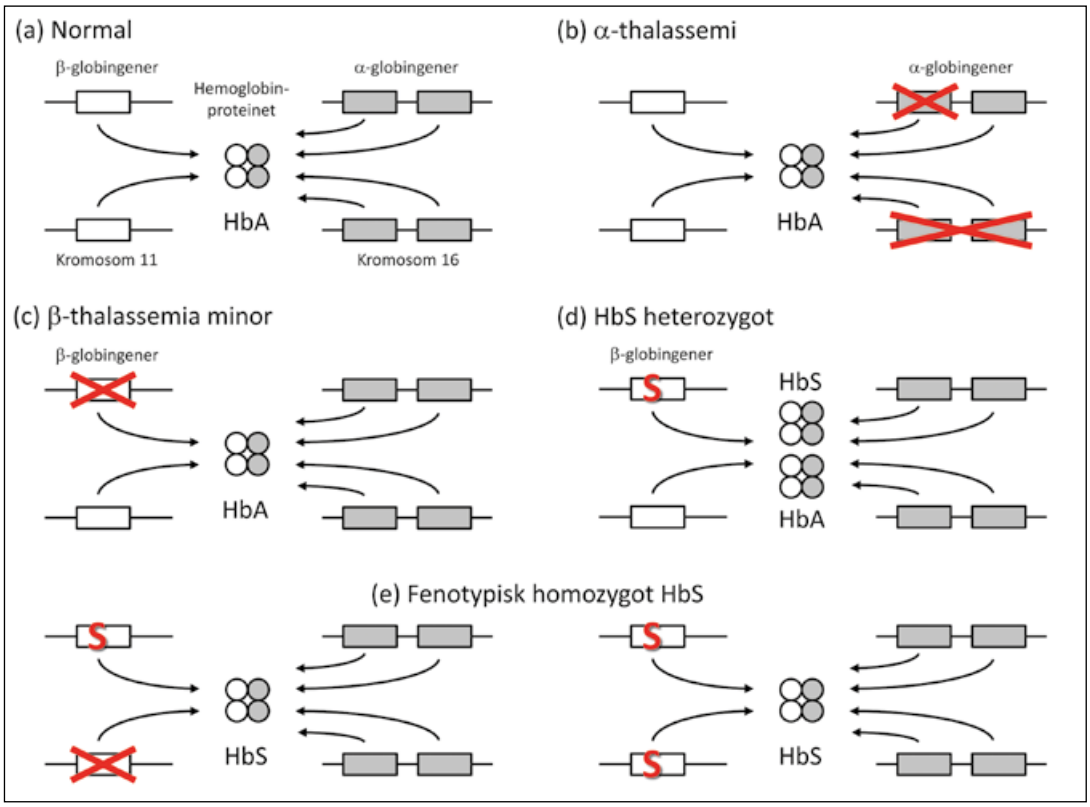
- HbA (2α2β)
- HbA2 (2α2δ)
- HbF (2α2γ)

Intrauterint dominerer HbF fra ca 12.-15. svangerskapsuke, andelen begynner å falle før fødsel og påvises vanligvis kun i spormengder hos voksne. HbA blir produsert i større mengder fra ca 30. uke i svangerskapet og er det dominerende hemoglobinet fra ca 2-3 måneder etter fødsel. HbA2 er meget lavkonsentrert ved fødsel og når voksent nivå (< 3,2 % av alt hemoglobin) fra ca 6 måneders alder.

To grupper av hemoglobinopatier

Genetisk endret produksjon av hemoglobin, arvelig hemoglobinopati, foreligger i dag hos flere hundre millioner mennesker bosatt rundt Middelhavet og i Asia og Afrika. Blant innvandrere til Danmark fra disse områder kan klinisk viktige hemoglobinopatier påvises hos 3-4 % (1). Hemoglobinopatiene i sin heterozygote form gir vanligvis liten eller ingen anemi. Derimot gir de økt motstandskraft mot malaria, spesielt falciparum-varianten, hvilket forklarer deres store utbredelse. Lav sykelighet og dødelighet av malaria hos de mange med heterozygot hemoglobinopati betyr mer rent befolkningsmessig enn høy sykelighet og dødelighet ved anemi hos de få med alvorlige former for hemoglobinopati.

De arvelige hemoglobinopatiene skyldes endret DNA-sekvens. Genene for produksjon av α-globinkjedene ligger som duplikat på kromosom 16, mens genene for β-, δ- og γ-globinkjedene ligger nær hverandre på kromosom 11 (Figur 1a). Hemoglobinopatiene deles i to grupper, de hvor det foreligger nedsatt syntese av en ellers normal kjedetype (thalassemier) og de med produksjon av et abnormt hemoglobin med endret struktur (hemoglobinvarianter). Thalassemiene subgrupperes dernest i α- og β-thalassemi alt etter hvilken kjedetype det er nedsatt produksjon av.



Figur 1. DNA-forandringer ved de vanlige hemoglobinopatiene.
(a) normal hemoglobinproduksjon; (b-e) hemoglobinproduksjon ved ulike hemoglobinopatier

- **α-thalassemi** skyldes nesten alltid (over 90 %) delesjon av en større del av α-globingenområdet. Disse thalassemiene deles inn etter hvorvidt delesjonen omfatter kromosomets ene eller begge gen (hhv 1- eller 2-gensdelesjon). På figur 1b er det avmerket en 1-gensdelesjon på det ene kromosomet og en 2-gensdelesjon på det andre kromosomet.
- **β-thalassemi** skyldes i over 90 % av tilfellene en punktmutasjon i β-globingenet. I de fleste tilfeller oppheves derved syntesen fra dette genet (β^0-mutasjon), mens noen mutasjoner derimot kun reduserer syntesen (β^+-mutasjon) (Figur 1c). Store delesjoner av β-globinområdet kan også være årsak til β-thalassemi.
- **Hemoglobinvarianter** skyldes punktmutasjoner som ikke påvirker selve syntesehastigheten, men som gir et hemoglobin med endret struktur. Alle de viktigste hemoglobinvariantene (HbS, HbE, HbC, HbD) skyldes en mutasjon i β-globingenet (Figur 1d).
- **Kombinasjoner** av flere hemoglobinopatier er ikke uvanlig. Siden de viktigste hemoglobinvariantene skyldes endring i β-globinkjeden oppstår det et nært samspill mellom β-thalassemi og hemoglobinvariantene. Dersom man for eksempel på proteinnivå påviser bare HbS, kan dette genotypisk skyldes enten en homozygot HbS-mutasjon, hvor begge β-globingenene produserer HbS-varianten av β-globinkjeden, eller det kan skyldes en kombinert heterozygot HbS og heterozygot β-thalassemi hvor det ene β-globingenet produserer HbS mens det andre β-globingenet er utslukket grunnet en β-thalassemimutasjon (Figur 1e).

Geografisk fordeling

β-thalassemi finnes i stor grad i alle områder hvor

(Fortsætter side 24)

(Fortsat fra side 23)

malaria var eller er hyppig forekommende (spesielt rundt Middelhavet, i Asia og i Afrika). α-thalassemi og hemoglobinvarianter finnes også i malariabefengte områder, men fremviser en mer ujevn geografisk fordeling. De større 2-gens α-delesjonene finnes særlig i Kina, Filipinene, Thailand og i det indre Middelhav, med flere. De mindre 1-gens delesjonene finnes særlig i Afrika, men også til dels i Pakistan og India og for øvrig i Asia. De klinisk alvorlige α-thalassemiene forutsetter minst en 2-gensdelesjon. Derfor finner man nesten ikke alvorlige α-thalassemier i Afrika mens de er vanlige i Sørøst-Asia. Av hemoglobinvariantene finnes HbS i det ekvatoriale Afrika, men også mange andre steder. HbE i området Thailand, Vietnam og Sri Lanka, HbC mest i Vest-Afrika og HbD i India.

Utredning ved mistanke om hemoglobinopati

Gjennom utredningen forsøker vi å klargjøre følgende tre problemstillinger:

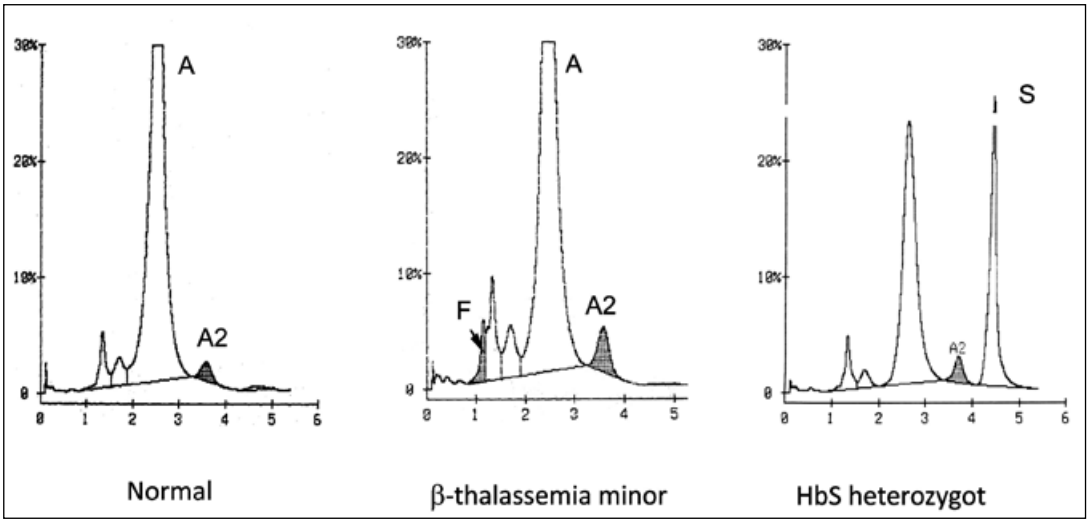
1. Foreligger det en hemoglobinopati og i så fall hvilken type?
2. Kan de hematologiske forandringer forklares ut fra den evt påviste hemoglobinopati?
3. Hva betyr funnene for pasienten og for pasientens familie?

På alle prøver til utredning av hemoglobinopati tas det hematologisk status og konsentrasjonen av normale og evt patologiske hemoglobiner bestemmes med høytrykksvæskekromatografi (HPLC). Ved behov suppleres utredningen med ulike gentester.

Hematologiske forandringer

Thalassemi gir til dels typiske hematologiske forandringer. Minorvariantene av thalassemi (heterozygot β-thalassemi, 1- og 2-gens α-thalassemi) gir bare en beskjeden eller ingen anemi, men de gir nesten alltid nedsatt MCV og MCH samt høyt antall erytrocytter som ligger nær eller over øvre referansegrense. Til sammenlikning gir jernmangelanemi, som er vanlig i de samme befolkningsgruppene, en mer varierende anemi og en markert størrelsesvariasjon av erytrocyttene som man ikke ser ved thalassemi. Med unntak av HbE, som gir et thalassemisk bilde, gir de heterozygote hemoglobinvariantene ingen klare hematologiske forandringer. Minorvariantene av hemoglobinopati, det være seg thalassemi eller hemoglobinvariant, er således uten betydning for pasienten selv. Derimot er de av klar betydning for eventuelle barn dersom pasientens partner også har en hemoglobinopati. Man risikerer da å få kombinasjoner av hemoglobinopatier som nevnt i tabell 1.

Majorvariantene av hemoglobinopati skyldes kombinasjoner av hemoglobinopatier som nedarves fra begge foreldre. Det er bare enkelte kombinasjoner av hemoglobinopati som gir alvorlig anemi (2), disse er angitt i tabell 1. For eksempel vil en kombinert hete-



Figur 2. Hemoglobinmønstre ved HPLC

Tabell 1. Kombinasjoner av hemoglobinopatier som gir risiko for anemi

	Risiko for alvorlig anemi når kombinert med	Risiko for mer moderat anemi når kombinert med
HbS	HbS, β-thal, HbO^{arab}, HbC, HbD	δβ-thal
HbE	β-thal	δβ-thal
β-thal	HbS, β-thal, δβ-thal, HbE	HbO^{arab}
δβ-thal	β-thal	δβ-thal, HbS,HbO^{arab}, HbE
HbC	HbS	
HbO^{arab}	HbS	β-thal, δβ-thal
HbD	HbS	

thal thalassemi.

rozygot HbE og heterozygot β-thalassemia minor kunne gi grav anemi som ved en β-thalassemia major. En homozygot HbE derimot, gir bare en beskjeden eller ingen anemi. HbC gir anemi bare i kombinasjon med HbS.

Ved de mest alvorlige formene av α-thalassemi (4-gensdelesjonene) utvikles en grav anemi med intrauterin død. Ved β-thalassemia major (begge β-globingen utslått) er hemoglobinverdien nær normal ved fødsel og anemi utvikler seg i løpet av få måneder. Diagnosen sigdcelleanemi (homozygot HbS) stilles derimot oftest først etter 6 måneder til 2 år.

Hemoglobinmønster vurdert med HPLC

Kasuistikk: 41 år gammel kvinne fra Pakistan, det foreligger ingen kliniske opplysninger. Hemoglobin 13,2 g/dL (normal), røde blodlegemer 6,5x10^9/L (høy), MCV 67 fL (lav), MCH 20,4 pg (lav), RDW (Red cell Distribution Width) 18,2 % (høy), ferritin 75 µg/L (normal). Ved undersøkelse med HPLC utgjør HbA 68 % av alt hemoglobinet. I tillegg påvises et abnormt hemoglobin som utgjør 27 % og har vandring svarende til HbD.

Vurdering: Et hemoglobinmønster kan vurderes med forskjellige metoder, men i dag brukes HPLC mest. HPLC-metoden tillater påvisning av nesten alle former for β-thalassemi i form av påvisning av økt HbA2 over den diagnostiske grensen på 3,6 %, samt av bortimot alle hemoglobinvarianter (figur 2). Derimot gir ingen av de vanligste formene for α-thalassemi endret hemoglobinmønster og lar seg derfor ikke påvise med HPLC.

Hos den aktuelle pasienten vår foreligger det HPLC funn som er typiske for en heterozygot HbD. Heterozygoti for HbD gir imidlertid ikke hematologiske forandringer og funnet forklarer derfor ikke det økte antallet mikrocytære erytrocytter. Disse funnene gir mistanke om en thalassemi i tillegg til HbD. β-thalassemi er utelukket siden vi har påvist både HbD og HbA (kfr figur 1), og det er derfor grunn til å mistenke en α-thalassemi i stedet.

(Fortsætter side 28)

Foto: Henrik Alfthan

cobas® 8000 modular analyzer series
Intelligent LabPower

Vår senaste analysplattform, cobas® 8000 modular analyzer series, har en unik design och flexibel konstruktion. Den levererar tillförlitliga resultat med korta svarstider, hög kapacitet och intelligent arbetsflöde – utan att begränsa dess kvalitet eller säkerhet. Vi erbjuder dessutom hög effektivitet, innovativa och skräddarsydda lösningar samt en omfattande testmeny.

Roche

Krävande jobb behöver
intelligenta och kraftfulla lösningar,
idag såväl som i framtiden.

Intelligent LabPower

Med en passion för flexibilitet

Roche Diagnostics eftersträvar att erbjuda en fullständig laboratorielösning för såväl små som stora laboratorier. Vi levererar tester som garanterar viktig klinisk information inom ett brett medicinskt område, från infektions- och hjärtsjukdomar till hjärnskador och cancer.

cobas®
Life needs answers

(Fortsat fra side 25)

Gentest for α-thalassemi

Man kan mistenke tilstedeværelse av en α-thalassemi ut fra typisk hematologi, men bare gentest for α-thalassemi vil kunne gi en sikker diagnose. Den mest benyttede versjonen av gentesten (3) kan påvise de to mest vanlige 1-gensdelesjonene (α–3.7 og α–4.2) samt de fem vanligste 2-gensdelesjonene (SEA, MED, THAI, FIL, α–20.5). Over 90 % av alle tilfeller av α-thalassemi skyldes en av disse syv delesjonene. Selve testen benytter syv primerpar som hvert gir et PCR-produkt kun dersom delesjon foreligger. Testen inkluderer også et primerpar som påviser normalt gen forutsatt at begge α-globingenene på minst ett kromosom er normale.

Hovedindikasjonene for gentesten for α-thalassemi er angitt i tabell 2. Det er imidlertid en del uenighet om disse indikasjonene. Enkelte utfører gentest for α-thalassemi selv om MCH er normal, fordi nær 1/3 av 1-gens α-thalassemiene har normal MCH (4). De britiske retningslinjene (4) derimot anbefaler testing kun når MCH er under 25 pg og pasienten fra Sørøst-Asia, Kina eller et middelhavsland. Testing av personer fra andre områder, f eks Afrika, vurderes som unødig ressursbruk da det ikke finnes 2-gensdelesjoner der. På vårt laboratorium har vi valgt å teste alle med nedsatt MCH, selv om det foreligger en mulig forklaring som f eks jernmangel. Dette fordi normalisering av MCH hyppig brukes som responskriterium ved behandling av jernmangelanemi og også som responskriterium ved behandling av sigdcelleanemi med hydroxyurea. I disse tilfellene er det viktig å vite om det foreligger en thalassemi som vil kunne forhindre en normalisering av MCH. I tillegg tester vi ektefelle og nære slektninger av personer som har fått påvist α-thalassemi, uavhengig av hvilken MCH-verdi vedkommende ektefelle/slektning har. Derimot utfører vi ikke gentest for α-thalassemi ved en påvist hemoglobinvariant, med mindre det foreligger hematologiske forandringer som gir mistanke om en samtidig thalassemi.

Andre gentester

Overnevnte undersøkelser (hematologi, HPLC og gentest for α-thalassemi) er nå standardundersøkelser i utredning av hemoglobinopatier og tilstrekkelig for de fleste (over 90 %) problemstillinger. Dog vil dette i noen tilfeller ikke kunne gi en full avklaring. Det kan da være nyttig med ytterligere gentester, tester som i dag kun er etablerte ved et fåtall laboratorier i Norden. Mest brukt blant disse er sekvensering av hele β-globingenet. Dette kan være indisert å gjøre i følgende situasjoner:

- **Hemoglobinvariant av usikker type.**
- **Fenotypisk homozygot hemoglobinvariant.**
- For å kunne skille mellom en homozygot hemoglobinopati og en kombinert heterozygot hemoglobinopati (Figur 1 e) (f eks heterozygot β-thalassemi + heterozygot hemoglobinvariant). Dette kan være viktig i vurdering av risiko for alvorlig hemoglobinopati hos eventuelle barn.
- **Mistanke om β-thalassemia major eller intermedia**. Disse hemoglobinopatiene kan ellers være vanskelige å skille fra andre tilstander som gir grav anemi hos spedbarn og fra arvelig persisterende HbF.
- **Pasienten har blitt transfundert i løpet av de siste 4 ukene, og det er mistanke om alvorlig hemoglobinopati.** I denne situasjonen vil HPLC-analyse ofte ikke kunne gi et klart svar på grunn av det tilførte blodet. Sekvensering av β-globingenet derimot, vil kunne utføres allerede få dager etter en evt. blodtransfusjon, fordi man til dette benytter pasientens native leukocytt-DNA.
- **HbA2 ligger nær den diagnostiske beslutningsgrensen på 3,6 % og man ønsker å avklare hvorvidt det foreligger en β-thalassemia minor** (heterozygot β-thalassemi).

Sekvensering av α-globingenet, eller mer presist α2-globingenet, kan være indisert ved mistanke om

Tabell 2. Hovedindikasjoner for α-thalassemi gentest

Indikasjon	Kommentar
Lav MCH (under nedre, kjønns- og aldersspesifikke referansegrense)	Selv om det er påvist en β-thalassemi eller en jernmangel
Økt antall erytrocytter	Dersom det ikke er påvist β-thalassemi
α-thalassemi hos ektefelle eller nær slektning	

Hb Constant-Spring, men dette gjøres svært sjelden.

Sekvensering av β-globingenet påviser de fleste mutasjoner, men klarer ikke å påvise store delesjoner i β-globingenet som av og til forekommer. Dersom situasjonen fortsatt er uavklart etter sekvensering, finnes det nå genanalyser som kan påvise delesjoner i β-globingenet og i andre gen. Ved mistanke om delesjon som ikke bare omfatter β-globingenet men også nabogenet for δ-globin (δβ-thalassemi), er det aktuelt å utføre delesjonsanalyser i stede for sekvensering. Analyser som påviser store delesjoner av globingenområder baserer seg på ulike molekylærbiologiske teknikker som f eks kvantitativ "real-time" PCR, MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) eller aCGH (array-based Comparative Genomic Hybridisation).

Hva gjenstår så av utfordringer?

Det finnes ytterligere noen utfordringer i tillegg til de som er nevnt over. Innfallsporten til utredningen er ofte lav MCH eller MCV. Ved samtidig B12- eller folatmangel vil MCH og MCV kunne være normale til tross for at det foreligger en thalassemi. Videre kan markert jernmangel påvirke graden av anemi og mikrocytose, og kan nedsette HbA2 med inntil ca 0,5 %. I utredning av hemoglobinopati inngår derfor ofte også måling av serumferritin. En transfusjon i løpet av ca de 4 siste ukene forut for prøvetaking kan vanskeliggjøre diagnostikken, særlig dersom det ikke opplyses om denne transfusjonen. I verste fall vil f eks en fenotypisk homozygot HbS (sigdcelleanemi) kunne bli diagnostisert som en heterozygot HbS pga tilført HbA. Med bakgrunn i dette, tar vi forbehold om fravær av transfusjon når vi konkluderer med sannsynlig heterozygot HbS eller HbE. Nesten uansett innsats og tilgjengelighet av avanserte undersøkelser, opplever man i enkelttilfeller at de hematologiske forandringer tilsier en arvelig hemoglobinopati, vanligvis en thalassemi, men at diagnosen ikke lar seg bekrefte hverken på protein- eller DNA-nivå. Det er flere forklaringer på dette. Det er påvist mutasjoner i flere genområder beliggende fjernt fra β-globingenet som i betydelig grad påvirker og nedsetter β-globingenets funksjon. Disse mutasjonene påvises ikke ved de vanlige gentestene. Likeledes kjenner man etter hvert flere punktmutasjoner i α-globingenet som reduserer genets funksjon, men som ikke påvises ved den vanlige gentesten for α-thalassemi (som kun påviser delesjoner).

"Dukker man ned i porfyriene dukker man aldri opp igjen". Dette utsagnet kan nok også brukes om de arvelige hemoglobinopatiene. Diagnostikk av hemoglobinopatier har blitt en viktig del av vår laboratoriehverdag og vil fortsette å være det. Viktig for pasienten. Og spennende for laboratoriene som må involvere seg i komplekse tilstander med mange varianter og et variert diagnostisk armamentarium. Et fagområde som er i betydelig utvikling. Området kan anbefales!

Referanser

1. Birgens H. Hemoglobinopatiscreening vid kunnskapscentrum i Köpenhamn. Läkartidningen 2000;97:2752-4.
2. Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. Scand J Clin Lab Invest 2007;67:71-86.
3. Tan AS, Quah TC, Low PS and Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. Blood 2001;98:250-1.
4. Ryan K, Bain BJ, Worthington D et al. BJH guideline. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. Br J Haematol 2010;149:35-49.

Foto: Henrik Alfthan

Citratkoncentrationen och koagulationsanalyser: Dags att harmonisera till 3,2 %

Equalis Expertgrupp för Koagulation.
Inger Fagerberg Blixter, Nils Egberg, Andreas Hillarp, Margareta Sten-Linder, Lennart Stigendal, Karin Strandberg, Tomas Lindahl, Fariba Baghaei.
Inger.Fagerberg.Blixter@vgregion.se

Av historiska skäl används provtagningsrör innehållande 3,8% (0,129 mol/L) natriumcitrat i Sverige och i övriga Norden. WHO och Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) som arbetar med standardisering av laboratorietester, rekommenderar sedan flera år att rör med tillsats av 3,2% skall användas. För närvarande är situationen den, att de nordiska länderna använder båda citratkoncentrationerna och att inom snar framtid kommer detta att harmoniseras enligt internationell praxis till att använda rör med citrathalt 3,2%.

Bakgrund

Valet av antikoagulantia är en preanalytisk faktor som kan påverka analysresultaten. För koagulationsanalyser används rör med tillsats av natriumcitrat som antikoagulantia. Natriumcitrat binder kalcium i provtagningsröret vilket förhindrar koagulering och i samband med analys tillsätts kalcium i överskott vilket medför att koagulationen startar.

Av historiska skäl används provtagningsrör innehållande 3,8% (0,129 mol/L) natriumcitrat i Sverige och i övriga Norden. Provtagningsrör innehållande 3,2% (0,105-0,109 mol/L) används i större utsträckning i övriga världen.

Anledningen till att det finns citrathalt 3,2% och 3,8% är ett räknefel när natriumcitrat med olika mängder kristallvatten användes (1). WHO och Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), som arbetar med standardisering av laboratorietester, rekommenderar sedan flera år att rör med tillsats av 3,2% natriumcitrat skall användas (2).

Anledningen till denna rekommendation är att känsligheten för såväl avvikelse i fyllnadsgrad av provtagningsröret som för förhöjd hematokrit i provet reduceras.

Förhållandet blod/citrat skall vara 9:1 i provtagningsrören. Underfyllda rör eller prov med förhöjt hematokrit medför att proportionen citrat i provtagningsröret blir större än avsett i förhållande till mängden plasma. Detta leder till att en större andel kalcium binds, vilket i sin tur leder till längre koagulationstider. Underfyllda rör som inte är helt ovanligt i klinisk rutin kan därmed ge en falskt förlängd koagulationstid [3,4]. Det innebär att provtagningsrör innehållande 3,2% citrat är mindre känsliga för avvikelser i fyllnadsgrad. Det finns således goda skäl för att enbart använda provtagningsrör med 3,2% citrathalt.

Syfte

För att säkerställa att övergång till användning av rör med lägre citrathalt inte medför kliniskt betydelsefulla skillnader i analysresultat har Expertgruppen

Analys	Reagens
APT-tid	Platelin LS (BioMérieux), PTT Automate (Stago), HemosIL APTT (IL)
PK (INR)	SPA (Stago), Owrens PT (MediRox)
Fibrinogen	FibriPrest Automate (Stago), STA Fibrinogen (Stago), Multifibren U (DadeBehring/Siemens), Fibrinogen C (IL)
D-dimer	Tinaquant (Roche), AutoDimer (Biopool), GHI-143 (Medirox) STA-Liatest D-Di (Stago)
Antitrombin	Berichrom Antitrombin III (DadeBehring/Siemens), STA – Stachrom AT III (Stago) Coamatic LR Antithrombin (Chromogenix), HemosIL R Liquid Antithrombin (IL)

Tabell 1. Reagens för rutinanalyser

Analys	Reagens
Trombintid	STA – Thrombin (Stago)
Anti-Xa aktivitet	Coamatic Heparin (Chromogenix)
PAI-1 aktivitet	Chromolize PAI-1 (Biopool AB)
FVIII aktivitet	Coamatic FVIII (Chromogenix)
FXII aktivitet	Dade Actin FS (Dade Behring/Siemens)
VWF:Ag	VWF LIA test (Stago)
VWF:RCo	BC VW reagent (DadeBehring/Siemens)
VWF:CBA	lokal metod baserad på kollagen typI/III (Hormonchemie)
DRVV	LA1/LA2 screen/confirm assay (DadeBehring/Siemens)
Protein S, fritt	Free Protein S, HemosIL (IL)
Protein C	Protein C, HemosIL (IL)
APC-resistens	Factor V Leiden (APCä Resistance V) (IL)

Tabell 2. Reagens för specialkoagulationsanalyser

för Koagulation inom EQUALIS tagit initiativ för att utvärdera citrathaltens betydelse för olika koagulationsanalyser.

Material och metod

För att jämföra effekten av de olika citrathalterna genomfördes en studie med medverkan av laboratorier vid Karolinska Universitetslaboratoriet i Solna, Sahlgrenska Universitetssjukhuset i Göteborg, Universitetssjukhuset i Linköping och Universtitetssjukhuset i Malmö.

Studien uppdelades i två moment:

1) Rutinanalyser: APT-tid, PK(INR), D-dimer, fibrinogen och antitrombin.
2) Specialkoagulationsanalyser som utförs på ett fåtal laboratorer i Sverige: Fritt protein S, Aktiverat protein C resistens (APC resistens), plasminogenaktivatorinhibitor 1(PAI-1), faktor VIII (FVIII), faktor XII (FXII), von Willebrand faktor antigen (VWF:Ag), von Willebrand faktor ristocetin cofaktor aktivitet (VWF:RCo), von Willebrand faktor Collagen Binding Assay (VWF:CBA), lupusantikoagulans, antifaktor X aktivitet (Anti-Xa) och trombintid.

Blodprover togs i BD Vacutainer™-rör innehållande natriumcitrat 3,2% och 3,8%. Plasma avskiljdes genom centrifugering (2000xg, 20 min) och överfördes till ett nytt rör som förvarades i -70˚C innan analys. Detaljer beträffande reagens framgår av tabell 1och 2.

För rutinanalyser användes de deltagande laboratoriernas standardreagens och samtliga resultat har poolats samman och bearbetats utan hänsyn till reagensval.

Statistisk beräkning utfördes med Student' Parat T-test, SPSS for Windows (ver. 16.0, SPSS, Chicago).

(Fortsætter side 32)

Specialkoagulationsanalyser

	Citrat 3,8%			Citrat 3,2%					
Analys	**Min/max**	**mv**	**SD**	**Min/max**	**mv**	**SD**	**p-värde**	**95% Konf Interv; diff nedre/övre**	**n**
VWF:Ag (kIE/L)	0,31/2,95	1,44	0,64	0,32/2,88	1,47	0,63	0,001	-0,04/-0,01	38
VWF:RCo (kIE/L)	0,12/2,30	1,24	0,47	0,12/2,56	1,28	0,50	0,010	-0,07/-0,01	38
VWF:CBA (kIE/L)	0,71/2,90	1,63	0,51	0,74/3,04	1,69	0,50	0,037	-0,11/0,00	29
DRVV (kvot)	1,07/1,40	1,19	0,08	1,03/1,39	1,17	0,08	0,001	0,01/0,04	30
Protein S, fritt (kIE/L)	0,11/1,02	0,61	0,22	0,16/1,00	0,63	0,22	0,102	-3,44/0,33	39
APC-resistens (kvot)	1,37/3,62	2,76	0,58	1,34/3,53	2,76	0,56	0,936	-0,07/0,07	35
Trombintid (sek)	15,7/22,0	17,9	1,3	14,5/18,8	16,6	1,0	<0,0001	1,0/1,6	40
PAI 1 (kIE/L)	0,6/91,4	12,5	19,5	0,9/88,8	12,3	19,1	0,168	-0,1/0,4	30
FVIII (kIE/L	0,01/2,65	1,37	0,87	0,01/2,72	1,40	0,20	0,054	-0,06/0,00	28
FXII (kIE/L)	0,61/1,51	1,13	0,20	0,64/1,40	1,14	0,19	0,347	-0,03/0,01	29
Anti-Xa akt. (kIE/L)	0,04/1,06	0,37	0,31	0,04/1,05	0,36	0,31	0,043	0,00/0,16	27

Tabell 3. Specialkoagulationsanalyser utförda på normalpersoner och patienter.

(Fortsat fra side 31)

Rutinanalyser

Prover samlades in från 44 friska vuxna individer vid de fyra olika laboratorierna. Rutinanalyserna utfördes med olika reagens vilket framgår av tabell 1.

Följande analysinstrument användes; BCS (DadeBehring/Siemens), STAR (Stago), Sysmex, CA-1500 (DadeBehring/Siemens) och ACL Futura (IL).

Specialkoagulationsanalyser

Plasma insamlades från friska individer och från patienter med warfarinbehandling. Dessutom inkluderades 26 patienter med någon av följande koagulationsrubbningar: lupusantikoagulans, protein S- eller protein C-brist, APC resistens (homozygot- eller heterozygot), protombingenmutation, hemofili A och B, förvärvad hemofili, von Willebrands sjukdom och antitrombinbrist.

Resultat

Rutinanalyser

Resultaten för APTT-analyser utförda med olika reagens visade en medeldifferens på -0,83 sekunder mellan de två citrathalterna (p-värde= 0,017) (figur 1) Samtliga använda APTT reagens uppträdde på likartat sätt i denna jämförelse.

Heparin tillsattes 18 av proven *in vitro* för att studera effekten av olika citrathalt på prov med förlängda APT-tider (figur 2). APT-tiderna varierade mellan 60-200 sekunder och visade en medeldifferens på 8 sekunder mellan de två citrathalterna.

Övriga rutinanalyser PK(INR), fibrinogen, antitrombin och D-dimer uppvisade små men statistiskt signifikanta medeldifferenser (figur 3-6).

Specialkoagulationsanalyser

Resultat för specialanalyser redovisas i tabell 3.

(Fortsætter side 34)

sysmex

EXPERTline
... make your work flow

- Reliable & standardised laboratory workflow
- Short reaction times for requests from wards
- Cost reduction for processes
- Disease management concepts
- Innovative parameters
- Sophisticated technical validation and support
- Better compliance and satisfied patients

Sysmex Sverige Marios Gata 13, 434 37 Kungsbacka · Phone 0300 56 72 02 · Fax 0300 56 72 03 · info@sysmex.se · **www.sysmex.se**
Sysmex Norge Hvamsvingen 24, 2013 Skjetten · Phone 63 84 01 60 · Fax 63 84 31 40 · info@sysmex.no · **www.sysmex.no**
Sysmex Danmark Møsvråvej 23, 6051 Almind · Phone 70 20 45 01 · Fax 70 20 45 41 · info@sysmex.de · **www.sysmex.dk**

(Fortsat fra side 32)

Diskussion

I vår jämförelse mellan de två citrathalterna fann vi små men statistiskt signifikanta skillnader för APTT analyserat med tre olika reagens. Medeldifferensen var dock mindre än 1 sekund vilket således är en marginell skillnad som saknar klinisk relevans. APTT resultat för heparintillsatt plasma från normalpersoner visade en medeldifferens på 8 sekunder, dvs liknande skillnad som Adcock och medarbetare fann på heparinbehandlade patienter (5). PK(INR) analyserade med två reagens uppvisade en medeldifferens mindre än 0,02 INR mellan de två citrathalterna (figur 3). Även de övriga rutinanalyserna uppvisade små skillnader utan klinisk betydelse.

I gruppen specialanalyser såg vi ingen skillnad mellan citrathalterna för fritt protein S, APC resistens, PAI-1 aktivitet, FVIII och FXII. Beträffande de övriga specialanalyserna d.v.s. VWF:Ag, VWF:RCo, VWF:CBA, DRVV och anti-Xa aktivitet fann vi statistiskt signifikanta skillnader mellan de två citrathalterna. Återigen var differenserna marginella och utan klinisk betydelse. Payne och medarbetare har jämfört påverkan av olika citrathalter på anti-Xa nivåer i 28 patientprov och fann ingen signifikant skillnad vilket stämmer med vårt resultat (6).

För trombintidsbestämningen fann vi däremot en större skillnad i medeldifferensen jämfört med de övriga analyserna. En svaghet med vår undersökning är avsaknad av prov med förlängda trombintider, varför det inte går att dra säkra slutsatser om den kliniska relevansen av de två olika citrathalters inverkan på analysresultaten.

Vår undersökning visar att det inte föreligger någon betydelsefull skillnad i analysresultat mellan citrathalterna för någon av de rutinanalyser som använts på sjukhuslaboratorier och inom primärvård. Även för de undersökta specialanalyserna ger de två citrathalterna jämförbara resultat med undantag för trombintidsanalysen eftersom inga prover med förlängd trombintid ingått i studien Många specialanalyser har emellertid inte ingått i denna jämförelse och vår slutsats är att varje laboratorium som utför tester som inte medtagits i denna undersökning bör göra egna jämförelser.

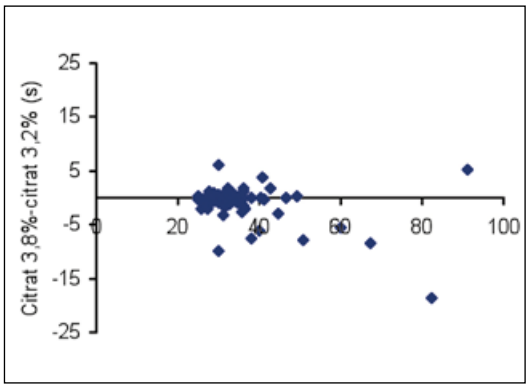
Resultaten som redovisas är giltiga för de reagens som har använts i denna undersökning, men vad vi känner till så finns det inte några större olikheter med andra reagens på marknaden som skulle kunna leda till en annan slutsats än att 3,2% eller 3,8% natriumcitrat i provtagningsrören har liten betydelse för analysresultaten, under förutsättning att rören är korrekt fyllda.

Sammanfattningsvis anser Expertgruppen för Koagulation att det inte finns några nackdelar med en generell övergång till användning av provtagningsrör för koagulationsanalyser med citrathalt 3,2 % i Sverige. Däremot finns det fördelar i form av dels lägre känslighet för interferenser och dels anpassning till internationella riktlinjer. Vi rekommenderar EQUALIS att initiera denna övergång som ett led i kontrollprogrammet för koagulationsanalyser.

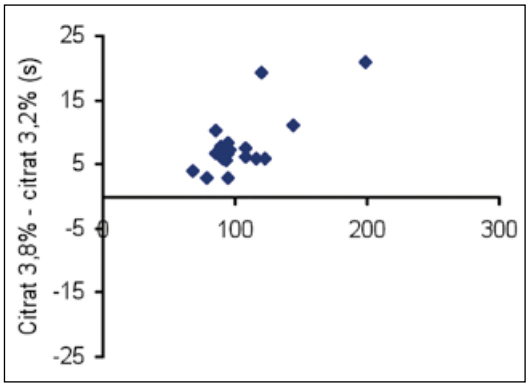
Under övergången till lägre citrathalt bör man emellertid använda samma citrathalt genomgående i forskningsstudier och kliniska prövningar för att undvika eventuella smärre citratberoende olikheter i analysresultaten.

Referenser

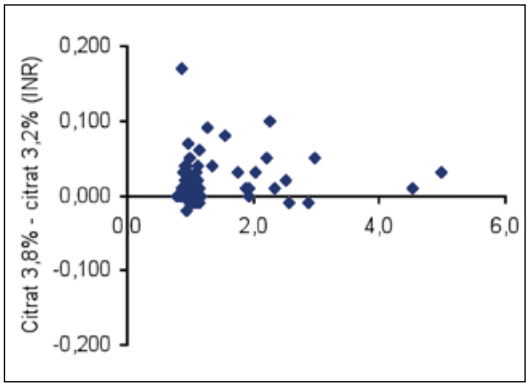
1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing plasma. Approved Guideline., ed 1. NCCLS Documents. H21A. Pennsylvania, USA, 1986.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, Transport and processing of blood specimens for coagulation testing plasma – based coagulation assays and molecular hemostasis assays., ed 5. Approved Guideline. H21-A5. Pennsylvania, USA, 2008.
3. Dorothy M Adcock, David C Kressin, Rickard A Marlar. Minimium specimen volume requirements for routine coagulation testing. Depence on citrate concentration. Am J Clin Pathol. 1998;105:595-9.
4. Adcock D.M. Sample integrity and preanalytical variables. In:Kitchen et al, ed Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis. Blackwell Publishing Ltd, West Sussex, UK. 2009.
5. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Effect of 3.2% vs 3.8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. Am J Clin Pathol.1997;107:105-10.
6. Payne S, Mackinnon K, Keeney M, Morrow B, Kovacs M J. Effect of 3.2% vs 3.8% sodium citrate concentration on anti-Xa levels for patients on therapeutic low molecular weight heparin. Clin Lab Haematol.2003;25:317-9.



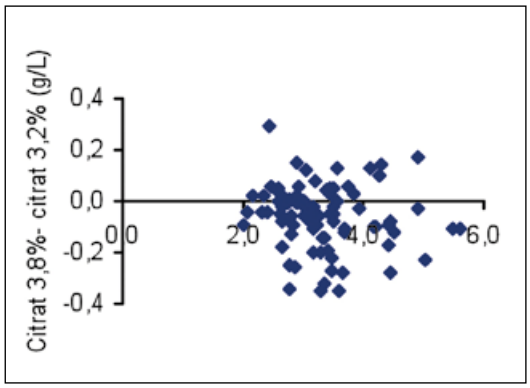
Figur 1. Differensplot. APTT analyserat på normalpersoner och patienter. Medeldifferens = -0,8 s, SD= 3,1, p-värde= 0,017, 95% konf. interv.= -1,5/-0,2 (n= 84).



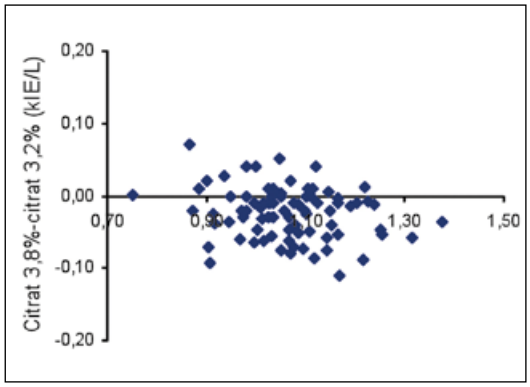
Figur 2. Differensplot. APTT analyserat efter in-vitro heparintillsats. Medeldifferens = 8,1 s, SD= 4,8, p-värde < 0,0001, 95% konf. interv.= 5,6/10,4 (n= 18).



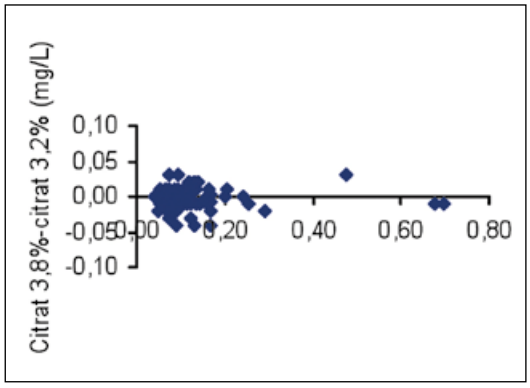
Figur 3. Differensplot. PK(INR) analyserat på normalpersoner och patienter. Medeldifferens = 0,02, SD= 0,03, p-värde < 0,0001, 95% konf. interv.= 0,01/0,02 (n= 84).



Figur 4. Differensplot. Fibrinogen analyserat på normalpersoner och patienter medeldifferens = -0,06, SD= 0,12, p-värde < 0,0001, 95% konf. interv.= -0,09/-0,03 (n= 84).



Figur 5. Differensplot. Antitrombin analyserat på normalpersoner och patienter medeldifferens = 0,02, SD= 0,04, p-värde < 0,0001, 95% konf. interv.= -0,03/-0,01 (n= 84).



Figur 6. Differensplot. D-dimer analyserat på normalpersoner och patienter medeldifferens = 0,00, SD= 0,15, p-värde= 0,056, 95% konf. interv.= -0,06/0,01 (n= 84).

Lineær regresjon med flere variabler

Johan Bjerner, Fürst medisinsk laboratorium, Oslo

"Når jeg går til min lege vil jeg at han skal gi meg den beste medisinen, ikke den beste medisinen som han forstår virkningen av."
Engelsk statistiker om leger og statistiske modeller.

I medisinsk biokjemi har vi ofte flere enn to variabler. Vi vet at gamma-GT er økt både for personer med høyt alkoholinntak og for personer med høy BMI. Hva med en person som har høy BMI, vil alkoholinntak føre til enda høyere gamma-GT eller ikke? Med lineær regresjon kan vi se sammenhenger mellom flere variabler.

Det finnes ikke alltid fasit!

Det finnes dessverre ikke en entydig modell til ethvert problem, uten ofte kan flere ulike modeller være mulige løsninger. Hvilken modell vi bør velge påvirkes av dataene, men også av forhold vi kjenner fra før. Dersom vi modellerer overlevelse for brystkreft etter antall lymfeknuter med metastaser kan det være slik at seks positive lymfeknuter er assosiert med betydelig høyere overlevelse enn fire, fem, syv eller åtte positive lymfeknuter. Vi *vet* at dette sannsynligvis skyldes en statistisk tilfeldighet. En datamaskin eller et statistikkprogram har selvfølgelig ikke slik klokskap. Statistisk analyse er ikke absolutte tall, og vi må venne oss til at forskjellige modeller vil gi varierende svar, og vi må til og med venne oss til at de mest brukte statistikkpakkene vanligvis gir noe forskjellige resultater for samme modell! En må kunne vurdere bruken av modeller (det er ofte fornuftig å teste flere modeller på samme tallmateriale). Foruten *p* bør en være kjent med modellstabilitet og mål for hvor godt modeller passer med data. Diagnostiske plotter er her et nødvendig verktøy for å avgjøre om enkeltobservasjoner ikke passer med valgt modell.

Trinn 1: Legge inn resultatene i et dataark og definere variabler

Vi skal bruke et reelt eksempel, tumormarkøren HE4 som er analysert på prøver fra NOBIDA-banken av Nils Bolstad, Radiumhospitalet, Oslo. Først må alle observasjonene bearbeides og legges inn i et regneark eller statistikkprogram. Standard er at poster (her pasienter) er rader og observasjoner (HE4, alder og kjønn) er kolonner. Hver rad er altså en ny pasient, første kolonne inneholder resultatvariabelen HE4 og kolonnene bortover forklaringsvariablene alder, røyking, kreatinin og BMI m.fl.. Både resultat- og forklaringsvariabler kan være av flere typer. Kontinuerlige størrelser kan legges sammen, halveres og dobles, for eksempel alder, kreatinin og BMI.

Nominalskalastørrelser kan ikke ordnes på en naturlig måte, f.eks land og kjønn. Nominalskalastørrelser (også kalt faktorer) behandles matematisk som forskjellige grupper, dvs. at hvert land er en egen gruppe. Små studier med mange grupper blir ofte vanskelige å tolke. Har vi kun en pasient fra Island og denne pasienten er den eneste personen i studiet som er røyker, er det selvsagt at vi ikke kan si hvorvidt det er røyking eller Island som har fremkalt sykdom hos pasienten.

En tredje mulighet er ordinale størrelser, det vil si ordnede nominalskalastørrelser. Eksempel på ordinale størrelser er utdanningsnivå (WHO definerer ti utdanningsnivåer), røyking (ikke-røyker, 1-5 sigaretter daglig, 6-10 sigaretter daglig, 11+ sigaretter daglig). Selv om ordinale størrelser kan betegnes med tall kan de ikke legges sammen, halveres og dobles. Ordinale variabler inneholder litt mer informasjon enn nominalskalastørrelser, men denne informasjonen er vanskelig å inkludere i en modell. Ofte er det enklere å la ordinale variabler være nominalskalastørrelser, ofte med færre nivåer, for eksempel røykere og ikke-røykere.

De fleste statistiske programmer legger opp til at brukeren selv definerer variabeltype for sine variabler, og dette valget vil selvfølgelig påvirke resultatene. En forutsetning for videre arbeid er at restleddene er nor-

malfordelt. For de fleste analyser i medisinsk biokjemi gjelder at fordelingen i populasjonen/studiepopulasjonen er mer log-normalfordelt enn normalfordelt. For å få normalfordelte restledd bruker vi derfor oftest logaritmene av resultatene. Vi har her målt tumormarkøren HE4 i serum, men i modellen vil vi bruke resultatvariabelen log(HE4), og også forklaringsvariabelen log(kreatinin).

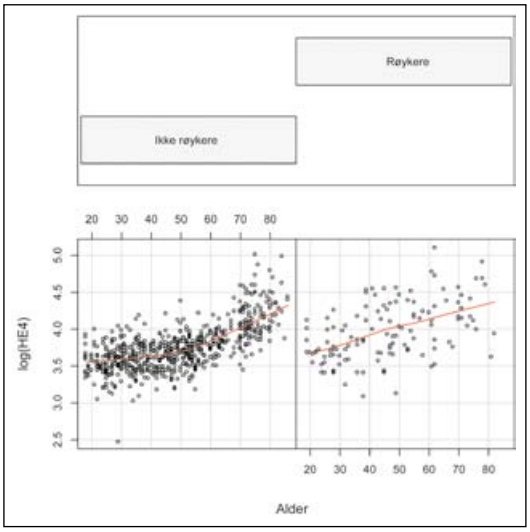
Trinn 2: Manglende data

I en studie er det sjelden at du har alle data (kjenner alle variablene) på alle pasienter. Du må velge om du skal ekskludere alle data fra slike pasienter (”exclude observations listwise”) eller om du skal la resterende data fra slike pasienter være med i beregningene (”exclude observations pairwise”). Dette er et viktig valg. Dersom du velger å beholde data (”exclude observations pairwise”), vil beregningsprogrammet i praksis erstatte manglende data med ”forventede data”. Hvis vi i en studie hvor 20 % er røykere mangler informasjon om røyking på et individ, vil beregningsprogrammet tillegge individet 20 % røyking. Fordelen med å inkludere individer som mangler enkeltdata er åpenbar: vi har flere individer igjen å regne på. Ulempen er at individer som mangler enkeltdata vil skjule/glatte ut forskjeller; dersom det er stor forskjell på HE4-verdier mellom røykere og ikke røykere kommer individet med manglende informasjon å skjule denne forskjellen noe, siden vedkommende blir plassert litt i begge grupper.

Et tredje, mellomalternativ til ”listwise” og ”pairwise” er å inkludere pasienten, men å definere tre grupper, røykere, ikke-røykere og ”uten informasjon om røyking”. Brukervennlige statistikkprogrammer som SPSS er nyttige og bra, men har ofte en standardinnstilling for hvordan ting gjøres, i SPSS er det ”pairwise”. Dette valget har dog stor betydning for sluttresultatet og en bør derfor ikke blindt godta standardinnstillingen. Årsaken til manglende data er viktig: er det tilfeldig (velg ”pairwise), eller er det systematikk i manglene slik at for enkelte land er det ikke målt kreatinin på flere av pasientene, samtidig som det for andre land er målt kreatinin for alle pasienter (velg ”listwise”).

Trinn 3: Finn de sterke sammenhengene først

De fleste programpakker har funksjoner for å plotte alle variabler mot hverandre og funksjoner for å beregne korrelasjoner mellom alle variabler. Vi har



Figur 1
Plotter er gode hjelpemidler for å velge riktig modell. HE4 hos ikke røykere øker tydelig med økende alder, og dette forholdet er ikke en rett linje. En må bruke en kurve i modellen. For røykere er sammenhengen mellom HE4 og alder svakere, slik at røyking og alder interagerer. Vi har en signifikant kombinasjon av alder og røyking, og vi velger derfor å analysere data for røykere og ikke-røykere separat.

i denne artikkelen brukt statistikkpakken ”R”, men stort sett alle funksjoner finnes også i SPSS. En grei begynnelse er å plotte ”alle” variabler mot ”alle”. Dette kan en enten gjøre som flere små plott i en figur, eller som flere figurer. Korrelasjonsfaktoren, dvs. sammenhengen mellom de to variablene som er plottet er også interessant. Først studerer vi sammenhengen mellom resultatvariabelen og de enkelte forklaringsvariablene. Korrelasjonen er i vår studie høyest mellom log(HE4)~alder (0,59) og log(HE4)~røyking (0,25). For en sterk sammenheng er det viktig å kontrollere om denne sammenhengen danner en rett linje. En sterk sammenheng som ikke er rettlinjet tilsier at den må modelleres med et polynom/kurve og ikke en rett linje. Hvis du unnlater å modellere den sterkeste variabelen riktig, vil du risikere å se sammenhenger mellom andre variabler som ikke finnes. For log(HE4) ser vi for ikke-røykere en kraftig økning etter 70 års alder (Figur 1). Forutsetter vi et rettlinjet forhold mellom alder og log(HE4), vil andre parametre som endres med alder (for eksempel kreatinin) risikere å fremstå som signifikante selv om de ikke er det. Deretter ser du etter sterke sammenhenger mellom forklaringsvariablene. Dersom

(Fortsætter side 37)

(Fortsat fra side 37)

to forklaringsvariabler har en sterk sammenheng (for eksempel FSH og LH hos menn), vil oftest kun en av variablene være statistisk signifikant i modellen. Hvilken som blir statistisk signifikant kan være relativt tilfeldig og avhengig av noen få observasjoner.

Modeller med slike sterke sammenhenger mellom forklaringsvariabler er "ustabile" og en bør ikke trekke ugyldige konklusjoner fra ustabile modeller. En slik "ustabilitet" reflekteres ikke i variablenes *p*-verdi, men kan visualiseres ved bagging (se tidligere artikkel om bootstrap i KBN). I HE4-studiet ser vi en sammenheng mellom forklaringsvariablene kjønn og kreatinin. Vi risikerer altså at en reell sammenheng mellom log(HE4) og kjønn kan bli mistolket som en sammenheng mellom log(HE4) og kreatinin, og omvendt kan en reell sammenheng mellom log(HE4) og kreatinin bli mistolket som en sammenheng mellom log(HE4) og kjønn.

Trinn 4: Finn signifikante kombinasjoner av variabler

I statistikk brukes ofte uttrykket "kombinasjon av to variabler". Her menes at variabel A og variabel B begge er signifikante, men at også kombinasjonen av A og B er signifikant. I det amerikanske presidentvalget er etnisitet en signifikant variabel, og også hvilken delstat en bor i. Men også kombinasjonen av etnisitet og delstat er signifikant. Latinamerikanere i California har ofte kommet som illegale innvandrere fra Mexico, ønsker mer liberal innvandringspolitikk og sosial utjevning, og stemmer på demokratene. Latinamerikanere i Florida er ofte flyktninger fra Cuba, ønsker et sterkt forsvar og sanksjoner mot Cuba og stemmer på republikanerne. Vi kan altså ikke forklare stemmene i presidentvalget ved kun etnisitet og delstat, men må ha med kombinasjonen av etnisitet og delstat.

Vi finner kombinasjoner av to forklaringsvariabler ved å plotte to forklaringsvariabler mot resultatvariabelen og se på kurvenes form. Hvis kombinasjonen ikke har betydning bør formene se like ut. Log(HE4) øker tydelig med alder for ikke-røykere, for røykere er ikke økningen like tydelig og spredningen blant røykerne er større enn for ikke-røykere (Figur 1). Kombinasjonen av røyking og alder er altså av betydning. Vi velger derfor å analysere HE4-data for røykere og ikke-røykere separat, alternativt kunne vi ha prøvd å korrigere ved å legge til en variabel røyking×alder.

Trinn 5: Utfør statistisk analyse

Siden kombinasjonen av alder og røyking er signifikant, velger vi å analysere data fra røykere og ikke-røykere separat (vi viser fra nå av bare data fra ikke-røykere). Vi vet også at vi må inkludere en høyere term for alder, siden den sterke sammenhengen mellom log(HE4) og alder ikke er rettlinjet. Vi kan skrive modellen slik:

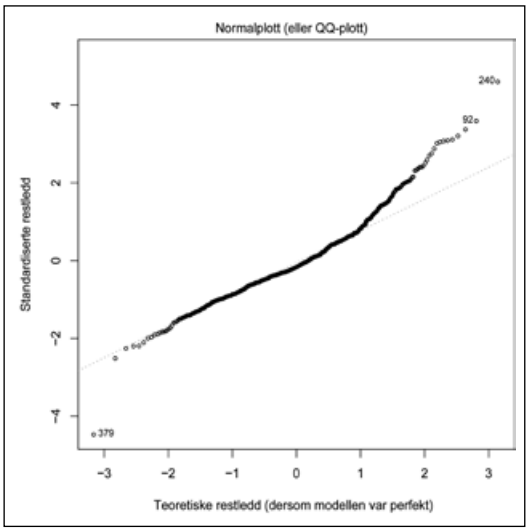
Gitt at vi kjenner en eller flere forklaringsvariabler for pasienten kan vi nå beregne "forventet" log(HE4)

log(HE4)~Alder+Alder^2+Sex+Alkohol+BMI+log(Kreatinin)+FysiskAktivitet+Faste

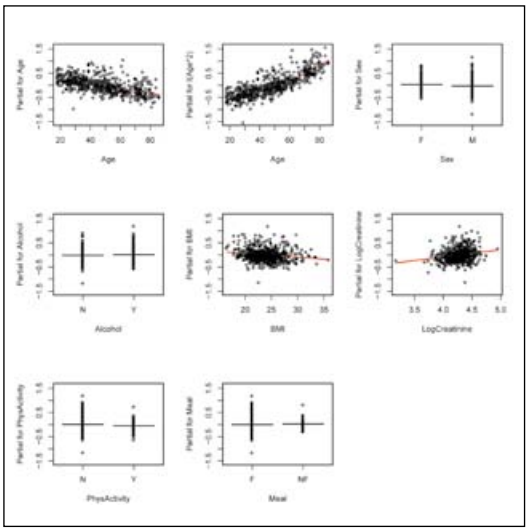
Resultatet er i R eller andre statistikkprogrammer en relativt ubegripelig tabell over koeffisienter:

Variable	Estimate	Std. Error	t value	Pr(>|t|)
(Intercept)	2.8430298	0.3228418	8.806	2e-16 ***
Age	-0.0101618	0.0035522	-2.861	0.00437 **
I(Age^2)	0.0002156	0.0000351	6.143	1.46e-09 ***
SexM	-0.0497535	0.0270023	-1.843	0.06588
AlcoholY	0.0266323	0.0211875	1.257	0.20924
BMI	-0.0153477	0.0037923	-4.047	5.85e-05 ***
log(Creatinine)	0.2968729	0.0730690	4.063	5.48e-05 ***
PhysActivityY	-0.0530966	0.0328390	-1.617	0.10642
MealNF	0.0266022	0.0427655	0.622	0.53414

Vi skal nå forklare tabellen. Til venstre har vi parameterverdiene, altså tall vi kan sette inn i vår modell:
log(HE4)=2,84 – 0,01×Alder + 0,0002×Alder^2 - 0,05×Sex + 0,027×Alkohol – 0,015×BMI + 0,300×log(Kreatinin) – 0,05×FysiskAktivitet + 0,27× Faste



Figur 2
Et normalfordelingsplott (eller QQ-plott) kan vise hvor godt enkeltobservasjoner/pasienter passer med modellen. Et dårlig modellvalg gir gjerne en S-formet kurve, outliers/slengere vil en se lengst ute i kurvehalene. Pasientene med nummer 92, 240 og 379 passer dårligst inn i modellen – og en får sjekke disse pasientene nøye. Stemmer dataene?



Figur 3
Et plott av restleddene viser hvor godt variablene (f.eks alder) passer inn i den modellen vi har valgt. Her følger modellen variablene godt.

og dermed forventet HE4. Den noe merkelige formuleringen -0,05×Sex kommer av at vi betegnet kvinner med 0 og menn med 1. Ved mannlig kjønn skal en altså trekke 0,05 fra log(HE4). Det samme gjelder nominalskalastørrelsene FysiskAktivitet og Alkohol. Noen av variablene fremstår tydelig som uinteressante: f.eks. FysiskAktivitet og Faste. Egne erfaringer tilsier at data oftere mangler for slike relativt uinteressante variabler.

Det er derfor fristende å fjerne uinteressante variabler fra modellen og gjenta beregningene for å redusere "støy" og få mindre problemer med "listwise/pairwise". Hvorvidt vi skal droppe variabler er dog ikke enkelt. En tommelfingerregel kan være å droppe kun de variablene som fremsto som uinteressante både før (a priori) og etter (a posteriori) statistisk analyse. Etter parameterverdiene kommer parametrenes usikkerhet. Usikkerheten er her angitt som standardfeil (standardavvik delt med antall observasjoner). Usikkerhetene for parameterverdiene i lineær regresjon er *t*-fordelt. Hvorvidt variablene er signifikante ("*p*-verdien er under 0,05") er derfor avhengig av effektens størrelse, standardavviket (spredningen i effekt hos individene) og antall observasjoner. Ved et stort antall observasjoner vil til slutt alle variabler bli signifikante. Derfor er det viktig, ikke bare å skjele til *p*, men også til effektens størrelse.

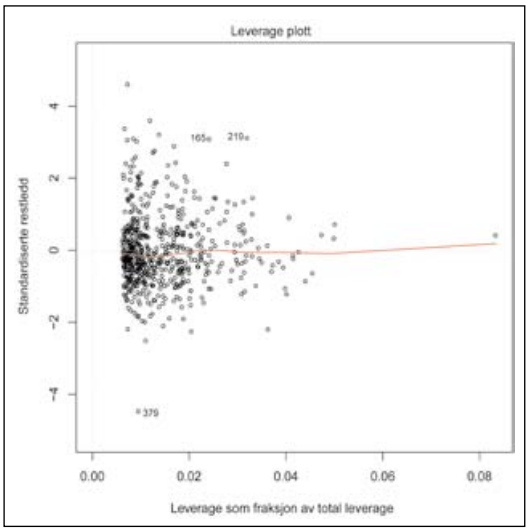
Trinn 6: Ettergransking av valgt modell

Dersom modellen er fornuftig bør restleddene/residualene være normalfordelt. Dette kan vi se på et normalfordelingsplott/QQ-plott (Figur 2). Vi ser at modellen følger data passe godt. Noen observasjoner (92, 240 og 379) passer relativt dårlig med data. Restleddene for de enkelte variablene skal også følge modellen. Vi har også plottet restleddene for alle variabler (Figur 3). Vi ønsker å identifisere slengere/outliers. Vi tenker oss gjerne en slenger som en observasjon som har avvikende verdi i en enkeltanalyse som HE4. I multivariat forstand er dog en slenger en observasjon hvor kombinasjonen av flere variabler er svært usannsynlig. Dersom HE4 øker med alderen og minker med BMI, så vil en ung person med både høy BMI og høy HE4 være en slenger i modellen. Det viktigste er dog ikke hvor store restleddene slengerne har, men hvilken innflytelse disse slengerne har på modellen.

Observasjonene er ikke jevnt fordelt; vi har kanskje flere yngre enn eldre, flere ikke-røykere enn ikke-røykere osv.. Dette gjør at de forskjellige personene i studien vil ha forskjellig innflytelse (leverage) over beregningene i den lineære regresjonen. I et "leverage plot" (Figur 4) kan vi se hvilke observasjoner som har størst innflytelse over sluttresultatet. Vi ser at til tross for at 92, 240 og 379 hadde de største restleddene, er

(Fortsætter side 40)

(Fortsat fra side 39)



Figur 4. Et leverage-plott er viktig for å vise hvorvidt våre statistiske modell er avhengig av kun et fåtall observasjoner. På Y-aksen er restleddene (jo lenger fra Y-aksen, jo dårligere passer dataene med modellen). På X-aksen "leverage", dvs. andelen av innflytelsen dette punktet har på modellen. Punktet med høyest leverage, 0,08, vil altså ha stå for 1/125 av innflytelsen (til tross for at vi har 800 prøver). Det er viktig å identifisere punkter med høy leverage som samtidig ligger langt fra midtstreken. Dette er observasjoner/pasienter som endrer våre konklusjoner i stor grad.

det 165, 219 og 379 som har mest innflytelse på modellen. Vi bør granske disse observasjonene og gjenta våre beregninger uten dem. Hvis resultatet ikke forandres kan vi være sikre på at våre beregninger ikke er kritisk avhengig av et fåtall av observasjonene.

Trinn 7: Formelle tester av valgt modell

Vi ønsker en "fornuftig" modell, men vi har ofte flere "fornuftige" modeller å velge mellom: for HE4 kan vi velge å modellere alder med *alder* eller med *alder+alder²*. En mer kompleks modell vil alltid passe data bedre, men det er fare for overtilpasning (overfitting). Vår komplekse modell blir da alt for godt tilpasset de dataene vi har, men dersom det kommer nye data ville de paradoksalt ha passet bedre til mindre komplekse modeller. Det mest brukte verktøyet for å velge mellom modeller er Akaikes informasjonskriterium (AICc). For mer detaljert beskrivelse henvises til Wikipedia. Modellen med *alder* gir AICc=140,7 og modellen med *alder+alder²* gir AICc=104,2. Akaikes informasjonskriterium viser klart at den mer komplekse modellen har lavere AICc og er å foretrekke.

Generalized linear models (GLM)

Lineær regresjon kan generaliseres (Generalized linear models) til også å omfatte modeller hvor restleddene har andre fordelinger. En trenger da en funksjon som kan omregne restledd med en annen fordeling til en normalfordeling. En slik funksjon benevnes linkfunksjon. GLM løser et viktig problem for oss, nemmelig lineær regresjon når resultatvariabelen er binomial (to mulige utfall), og resultatet av en test er ofte binomialt, for eksempel RF-positiv/RF-negativ eller HIV-positiv/HIV-negativ. Mange resultater med flere nivåer kan også sees som binomiale. En urin-stix kan først sees som enten 0/+ (to utfall) deretter som +/++ osv. For binomiale resultatvariabler bruker en GLM med logit som linkfunksjon. Dette er beregningsteknisk det samme som logistisk regresjon, men GLM er både enklere og mer intuitivt. Med GLM kan vi fint også kombinere både binomiale og kontinuerlige forklaringsvariabler med en binomial resultatvariabel.

Urin-glukose ble testet med Bayer urin-stix med visuell avlesing (eksemplet er hentet fra Petersen PH et al: How to Deal with semi-quantitative tests? Scand J Clin Lab Invest 2009;69(6):667-72). Bayer angir at target skal være 14 (for ++ på urin-stix). Et antall stix ble testet med glukosekonsentrasjoner på 0,4; 2,2; 6,7; 15,6; 19,8 og 57,9 mmol/L. Antallet stix som slår over fra + til ++ ved disse konsentrasjonene er 0, 4, 122, 147, 77 og 4 stix. Hva sier dette om gjennomsnittlig konsentrasjon for utslag og spredningen? Vi har resultatvariabelen (+ eller ++ på stix) og som forklaringsvariabel velger vi log(glukose). Vi velger en GLM-modell med logit som linkfunksjon:

Stix~ log(Glukose) (GLM og logit som linkfunksjon).

Dette gir en mediankonsentrasjon for når urinstix slår over fra + til ++ på 8,9 mmol/L glukose.

Kontraster (contrasts)

En svakhet ved lineær regresjon er at effektene og *p*-verdiene ikke alltid representerer det vi er interessert i. Vålerenga skole hadde dårlige resultater på nasjonale prøver (2009), og vi er interessert i om Vålerenga skole gjør det dårligere enn andre skoler i nærmiljøet (Skolegruppe B). Med lineær regresjon får vi et estimat for om skoletilhørighet er en signifikant variabel for skolene i Skolegruppe B. Men, hva vi egentlig er interessert i er jo hvorvidt Vålerenga skole gjør det dårligere enn de andre skolene i Skolegruppe B. Løsningen er å

bruke kontraster (contrasts). Vi kan vekte (gi kontraster til) de ti andre barneskolene i Skolegruppe B med -1/10 hver og Vålerenga skole med 1. Vi får nå et mål på om Vålerenga skole skiller seg ut.

Offset data

Vi kanskje gjør flere studier innen samme område innenfor rammene av et doktorgradsprosjekt. I det første studiet finner vi effekten av ForklaringsvariabelA på resultatvariabelen med stor nøyaktighet. I neste studie har vi færre observasjoner. Vi kan da hente inn effekten av ForklaringsvariabelA inn i vår regresjonsmodell uten å beregne effekten i modellen. På engelsk heter termen for dette "offset".

A priori og a posteriori: Bonferroni-korreksjon

Dersom vi har mange variabler kan vi tenke oss at vi før (a priori) studiet skriver opp de mest interessante variablene. Når vi etter studiet (a posteriori) ser på variablene må vi huske at når vi har tilstrekkelig mange variabler, vil alltid noen av variablene bli signifikant grunnet statistiske tilfeldigheter. Vi bør derfor velge et lavere *p* for statistisk signifikanse dersom vi forutfor studiet inkluderte mange variabler vi egentlig ikke hadde så stor tro på. Vi kaller dette for Bonferroni-korreksjon.

Random effects, fixed effects og mixed effects models

Alle modeller beskrevet så langt har til felles at de forutsetter uavhengighet mellom restleddene (residualene) og forklaringsvariablene. Det er ofte dette ikke er tilfelle, også i medisinsk biokjemi. Et eksempel kommer her. Vi gir ti elever ved alle skoler i Norge en matematikkprøve. Noen skoler vil gjøre meget gode resultater. En "vanlig" regresjon (her fixed effects modell) tilsier at gjennomsnittet av de ti elevene fra en skole er representativt for skolen og en kan forvente at alle elever på skolen har dette gjennomsnitt. Vi har dog grunn til å tro at for de beste skolene så er det en kombinasjon av at skolen virkelig er god, men også at skolen har vært heldig ved trekningen og at de elever som har tatt prøven er flinkere enn gjennomsnitten ved skolen. Vi mener altså at restleddene er avhengig av skolens resultater (random effects modell). Dersom vi har flere forklaringsvariabler kan vi ha både variabler som beskrives med random effects (skole og elever) og fixed effects (antall undervisningstimer i IT ved aktuell skole). En modell som innholder både random effects og fixed effects benevnes mixed effects model. Altså, hvis vi ikke bruker en mixed effects model her vil vi sannsynligvis overvurdere den reelle forskjellen mellom skolene. Det samme skjer i medisinsk biokjemi. Laboratorier deltar i eksterne kvalitetskontrollprogrammer. Analogt med skoler og elever så vil noen laboratorier ligge over gjennomsnittet. Vi har grunn til å tro at dette skyldes både laboratoriet (skolen) og tilfeldigheter som analysevariasjonen (elevene). Med andre ord er restleddene avhengige av laboratoriet og vi må legge til grunn at de reelle forskjellene mellom laboratoriene derfor er noe mindre enn forskjellene mellom laboratoriene på ekstern kvalitetskontroll. Det frarådes av den grunn (og også av andre grunner) å kalibrere etter resultatene fra ekstern kvalitetskontroll.

Hierarkiske modeller

Mixed effects modeller blir fort kompliserte. Modeller kan være hierarkiske, for eksempel helseregion, fylke, kommune, dersom flere kommuner danner et fylke og flere fylker en helseregion. Her er den hierarkiske strukturen helt regelmessig, det vil si kommunene i et fylke tilhører alle samme helseregion. Modellen er "nested". Hierarkiske strukturer kan også være mer komplekse, f.eks hvis alle kommuner i et fylke ikke inngår i samme helseregion.

PMML – fremtiden?

PMML (Predictive Model Markup Language) er et XML-liknende format for lagring av datamodeller. PMML er laget av Data Mining Group, og er et produsentuavhengig format. Dersom vi gjør dataanalyse som oven, velger datatyper, definerer datatyper, fjerner slengere og velger datamodell, så kan vi lagre våre valg som PMML. Fordelen blir da at vi enkelt kan kontrollere våre beregninger i et annet beregningsprogram. Det ser også ut som at de store databaseprogrammene (for eksempel Microsoft SQL Server) går for PMML. Dette kan bety lett tilgjengelig datakraft for beregninger uten lisensavgifter.

Sluttord

Her kunne vi godt ha fortsatt med ikke-lineære modeller, additive modeller, robuste modeller og probabilistiske modeller. Det gjør vi dog ikke! For de fleste praktiske formål vil en klare seg godt med GLM og mixed effects models, og er dette ikke godt nok – spør en statistiker!

IFCC NEWS

Päivi Laitinen
IFCC Secretary

Päivi Laitinen. (Foto: Veikko Somerpuro).

Life is a mystery. It can take its own course. We all have plans for the near future and long-term goals. We all have dreams we hope to come true. But everything can change in a second or in a short moment. Unexpected, sudden events may change your life, your perspective of life and put your priorities in a new order. How do we cope with a change of plans or with a total change of the future? This is a challenge life brings ahead of us and we have to find ways to deal with the situation.

IFCC General Conference was held in Corfu, Greece on April 16-19,2010. You all know what happened in Iceland on April 14, 2010. A volcano eruption in Iceland affected the lives of hundreds of thousands of people for a few weeks. It also affected the IFCC General Conference.

I flew to Corfu on Wednesday April 14, 2010 for the final organization of the conference. IFCC Executive Board had a meeting scheduled for April 16-17, 2010 and most of the EB members were to arrive on Thursday April 15. IFCC President Graham Beastall was flying early that morning from Glasgow. By noon we started getting messages from Graham Beastall that he had problems with his flight to London because Glasgow was closed due to an ash cloud. Glasgow airport was closed just one hour before his flight. That was the first time I and many others heard of the volcanic eruption in Iceland. The first reaction was ok, fine, Glasgow is closed, this is only one airport. Graham informed us that he is taking a train to London from where he wishes to get a flight the same evening. After a 6-hour train trip he arrived at London Heathrow only to find out that it was closed an hour earlier. Also many other airports were closed by that time. By the evening we all understood that this ash cloud was going to be a big problem for us. IFCC President decided to go back home, there was no way he could have come to Corfu.

The ash cloud meant a change of plans and schedules for those who were in Corfu. About 40% of those registered faced overwhelming difficulties in getting to Corfu and they were not able to come. However, altogether about 150 participants attended the activities. The first two days of the Corfu General Conference were scheduled for internal meetings. Executive Board had its meeting, IFCC Divisions, Committees, Working Groups and Task Forces had also their meetings. Also EFCC had its Executive Board meeting as well as its General Assembly. The scheduled program was run as normal as possible, but a few meetings had to be cancelled because the participants could not come.

The last two days, Sunday and Monday were scheduled for the General Conference for all National Full

and Affiliate Member Societies as well as Corporate Members. We heard reports of the IFCC President given by the Past President, Division Chairs, Treasurer and Corporate Members. Regional Presidents and the Chairs of Task Forces gave also their reports. The second day of the Conference was reserved for interactive workshops of different IFCC projects (Public relations, Making best use of young scientists, Improving communication within IFCC, Environmental responsibility in laboratory medicine, Education and training in laboratory medicine, Getting the best out of conferences, Ethics, Supporting laboratory medicine in the developing world, Reporting HbA1c, Acute and chronic kidney disease, Pharmacogenomics, Point of care testing, Promoting evidence--based practice, Setting standards in laboratory medicine, Promoting preventive medicine, Paediatric laboratory medicine). These all are important topics and the participants attended all these sessions actively. The final session was IFCC Presidents presentation on the future of IFCC. I gave this on Graham Beastall's behalf. There were several important issues in this presentation which IFCC President has addressed in his letter to the National Societies on July 2010. The first issue is the Membership of IFCC. Several years ago the IFCC changed its name to incorporate 'and Laboratory Medicine'. The obvious way to broaden the activities and influence of IFCC is to allow membership from societies and professional bodies that have expertise in areas of laboratory medicine other than clinical chemistry. With the change of name

Nordic interference on IFCC operations

it was hoped areas of laboratory medicine outside IFCC's traditional area of clinical chemistry would join the Federation. However, this has not been achieved. One of the major barriers to broaden the membership to has been the current membership rules for IFCC, which limit Full Membership to one national society per country.

Another issue Graham Beastall wanted to address to the Membership was the composition of and election of the IFCC Executive Board. Presently each EB members can serve two three-year terms. Major points of discussion are to change the Vice-President's position into President-Elect and restricting

(Fortsætter side 44)

Surviving members of IFCC, Corfu, April, 2010.

(Fortsat fra side 43)

President's term to one three-year term. Also better regional representation and the possibility of postal vote are discussed. The third issue is the introduction of differential subscription for Membership. Based on United Nations and World Bank figures there is a 100 fold differential in the national wealth of IFCC members. Some national societies from developing countries have not applied for IFCC membership because they cannot afford the membership dues. Other Full Members have their membership dues paid by wealthy countries, companies or individuals. Other Full Members report falsely low membership numbers in order to reduce their membership subscription. As one illustration an increase from 6 to 7 Swiss Francs per person for those Full Member societies in countries in the upper half of the national wealth league would allow a fee of 5 Swiss Francs or less per person to be introduced for the other Full Member Societies. IFCC President has requested responses from the national societies on this consultation paper by Sept 27, 2010. The date was important because the above mentioned issues are all documented in the Statutes of the Federation. If the Statutes are changed they have to be approved by the Council. The next IFCC Council will be held in Berlin on May 15, 2011 and the proposals for the change of Statutes have to be sent to the Membership 6 months in advance.

I want to address one more important topic which is discussed within IFCC. IFCC President sent a letter to national societies last December asking for nominees to work on "Clinical Laboratories and Environment". The preliminary discussion on this topic was scheduled for Corfu. Environmental issues are now a mainstream concern of our society. Carbon footprints, CO2 emissions, environmental degradation and global warming, are day familiar to all of us from TV and newspapers. All human activity impacts the environment and the clinical laboratory is not exempt from this. Those in Corfu experienced Mother Nature's power in real life. She showed us how important environment and nature are for us, all our lives depend on Mother Nature. We must take good care of her.

Finally I want to remind you of the next Ortho Clinical Diagnostics Conference in Paris on February 26-27, 2011 and the title of the conference is Pregnancy-related Disorders: Present Perspectives and Emerging Challenges. The information on this conference is available on the IFCC website. ICCCLM Berlin is on May 15-20, 2011. (www.ifcc.org)

How did I finally get back home? I have to admit that I travelled quite comfortably by flying like a grasshopper step by step back home. I stayed overnight at hotels and had a shower every morning and nice meals. A 12-hour return turned to a 4-day struggle, queuing, hoping and waiting, and waiting and waiting…… Presently I am discussing with the airline (refused), EU authorities (refused) and finally with Greek authorities (not tried yet) who will cover my extra expenses.

Foto: Henrik Alfthan

OCD Remote Monitoring Center

Delivering back-up 24 hours a day, 7 days a week keeping your machine up and running.

As laboratories become pressed to produce more for less, the value of our Remote Monitoring Centres becomes apparent, reducing downtime is critical to the success of today's laboratories. We are committed to being available to your lab when you need us.

OCD technical support specialists and engineers monitor performance & diagnose issues remotely. When service is required, it is scheduled at the customer's convenience, allowing laboratories to optimize instrument uptime, reduce lab costs and improve efficiency. Using Predictive Monitoring, Proactive Service Response Tracking and Critical Situation Management, we can monitor specific problems that may be developing on your analyser. Using highly advanced predictive alerts, skilled technicians can detect service needs before your instruments performance is compromised.

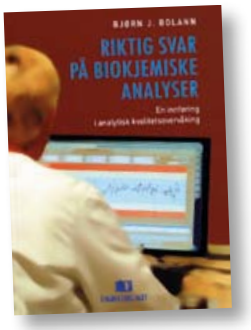
For more information on our Remote Monitoring Centres go to: www.orthoclinical.com

Ortho Clinical Diagnostics
a Johnson & Johnson company

Bokrecension:

Björn J. Bolann. Riktig svar på biokjemiska analyser. En införing i analytisk kvalitetsovervåking.

Elvar Theodorsson, IKE/Klinisk kemi, Linköpings Universitet, 581 85 Linköping, Sverige (elvar.theodorsson@liu.se)



Kvalitetssäkring och kvalitetskontroll är kärnverksamheter som engagerar alla inom Laboratoriemedicin. Tvärt emot rådande uppfattningar handlar kvalitetssäkring och kvalitetskontroll ytterst om välinformerad och klok laboratoriepraxis och till en mycket mindre del om statistik. Statistikens fikonspråk och överdrivet teoretiserande inom den gren av kvalitetskontrollen som tillämpats inom Klinisk kemi har tyvärr skrämt allt för många från att fördjupa sig i detta viktiga ämne.

Björn Bolann har under många år ägnat sig åt studier av och publikationer om kvalitetssäkring och kvalitetskontroll samt tolkning av laboratorieresultat i Klinisk kemi, men också av att hålla uppskattade kurser inom dessa kunskapsområden. Han har nu samlat sitt kursmaterial och erfarenheter i den bok på 132 sidor som är aktuell här. Han skriver i förordet ”Inneholdet spenner fra det elementære (som ingen tör å spörre om) till stoff hvor också de som har gode forkunskaper, kan finne noe å bryne sig på”. Boken lyckas väl med sin tydliga praktiska inriktning – vilket också har varit ett uttalat mål för författaren. Den handlar i huvudsak om kvalitetskontroll och metodjämförelser.

Kvalitetskontroll

Boken ansluter sig till den sedan länge inom klinisk kemi rådande Westgard- filosofin inom kvalitetskontroll som också har starka skandinaviska rötter (1-9). Denna filosofi har lyckas med det veritabla konststycket att skapa omfattande teoribildning och regler kring kvalitetskontroll som är giltiga i enstaka mätserier, men i praktiken helt ignorerar det faktum att mellanserievariation, t ex förorsakad kalibreringar och lotnummerbyten är den viktigaste variationsorsaken som behöver kontrolleras och minimeras. Sewhart insåg detta redan i mellankrigstiden (10, 11) och även Westgards tidigare medarbetare har skrivit om detta utan att skapa någon större debatt (12) eller åstadkomma nytänkande.

Industriell kvalitetskontroll har under senare år fått stå för jordnära praxis och nyskapande inom kunskapsområdet (13-18). Deras litteratur betonar vikten av att förstå variationsorsaker och betydelsen av att identifiera och minimera dessa. Kontrollgränserna sätts så att de inkluderar både inom och mellanserievariation och man fokuserar starkt på att undvika att falskt förkasta serier.

Bolann förklarar variationsegenskaper och kontrollregler på ett vedertaget och bra sätt, men jag saknar ändå en detaljerad beskrivning av det mest elementära, nämligen hur man skapar kontrollgränser helt från första början genom beräkning av medelvärde, standarddeviation och z-score från den initiala serien mätvärden av ett kontrollprov.

Bolanns lägger stor vikt vid begreppet ”totalfel” som definieras som rådande kutymen inom Westgardska skolan. Begreppet är inte entydigt definierat och har inte nått sådant internationellt genomslag att det kommit med i VIM 2008. Ett sympatiskt drag i Bolanns hantering av begreppet är dock att han gör en god ansats att ge ”totalfelet” värdefull användning i praktisk sjukvård.

Bolann beskriver i detalj hur inom- och mellanserievariationerna skall beräknas. Framställningen är – i mina ögon överförenklad och missvisande eftersom den inte tar hänsyn till det sedan länge välkända faktum att inom- och mellanserievariationen inte är oberoende av varandra och att beräkningen är mycket känslig för ojämnt antal observationer i varje serie. Pionjärerna Groth, Aronsson och deVerdier tillsammans med Westgard själv använde ett klart mer robust sätt att göra dessa beräkningar än de Bolann rekommenderar i boken (19).

Bolanns praktiska råd kring kontrollmaterial och deras hantering är kloka och värdefulla, och listan på

påpekanden kring okloka rutiner för kvalitetskontroll visar att författaren inte enbart har goda teoretiska utan även omfattande praktiska erfarenheter av kvalitetskontroll inom laboratoriemedicin.

Metodjämförelser

Beskrivningen lägger klokt nog tyngdpunkten på Bland-Altman/Bias/avvikelse plottar och tonar ned korrelationsanalyser. Vanlig linjär regression behandlas, men ortogonal regression behandlas överraskande styvmoderligt. Passing-Bablok metoden nämns kort, men Demings metod som är den mest använda och rekommenderade nämns tyvärr inte alls (20).

Sedan 2002 finns på den skandinaviska marknaden i ämnet Per Winkels bok ”Statistisk kvalitetsudvikling i klinik og laboratorium”(21). Bolanns bok ”Riktig svar på biokjemiska analyser. En införing i analytisk kvalitetsovervåking” representerar ett välkommet värdefullt tillskott till utbudet på vårt eget språk i ett ständigt aktuellt ämne där läroböcker och kursmaterial behövs för nya generationer verksamma inom klinisk kemi och inom laboratoriemedicin i allmänhet.

Referenser

1. Westgard JO. Assuring the right quality right : verifying the attainment of the intended quality of test results. 1st ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2007.
2. Westgard JO. Basic qc practices : training in statistical quality control for healthcare laboratories. 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.
3. Westgard JO. Six sigma quality design and control : desirable precision and requisite qc for laboratory measurement processes. 2nd ed. Madison, WI: Westgard QC. Inc.; 2006.
4. Westgard JO. Basic planning for quality : training in analytical quality management for healthcare laboratories. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2000.
5. Westgard JO, Barry PL. Basic QC practices : training in statistical quality control for healthcare laboratories. 2nd ed. Madison, WI: Westgard QC; 2002.
6. Westgard JO, Ehrmeyer SS, Darcy TP. CLIA final rules for quality systems : quality assessment issues and answers. 1st ed. Madison, WI: Westgard QC; 2004.
7. Westgard JO, Barry PL. Cost-effective quality control : managing the quality and productivity of analytical processes. Washington, D.C.: AACC Press; 1986.
8. Westgard JO. OPSpecs manual : operating specifications for precision, accuracy, and quality control. 1st ed. Ogunquit, ME: WesTgard Quality Corp.; 1995.
9. Westgard JO. Six sigma quality design and control. 1st ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2001.
10. Shewhart WA. Economic control of quality of manufactured product. New York: D. Van Nostrand Company; 1931.
11. Shewhart WA. Statistical method from the viewpoint of quality control. New York: Dover Publications; 1939.
12. Cembrowski GS, Carey RN. Laboratory quality management : QC [and] QA. Chicago: ASCP Press; 1989.
13. Pyzdek T. What every engineer should know about quality control. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1989.
14. Pyzdek T. Quality Engineering Handbook. Second Edition ed. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2003.
15. Stamatis DH. Six sigma and beyond. Boca Raton, FL: St. Lucie Press; 2001.
16. Wheeler DJ. Understanding Industrial Experimentation. Second Edition ed. Knoxwille: SPC Press Inc.; 1988.
17. Wheeler DJ. Advanced Topics in Statistical Process Control. The power of Shewhart's Charts. Knoxville: SPC Press, Inc.; 1995.
18. Wheeler DJ, Chambers DS. Understanding statistical process control. Second edition ed. Knoxwille, Tennessee: SPC Press; 1992.
19. Aronsson T, Groth T. Nested control procedures for internal analytical quality control. Theoretical design and practical evaluation. Scand J Clin Lab Invest. 1984;44:51-64.
20. Linnet K. Evaluation of regression procedures for methods comparison studies. Clin Chem. 1993 Mar;39(3):424-32.
21. Winkel P. Statistisk kvalitetsutvikling i klinik og laboratorium. Köbenhamn: Ingeniören Böger; 2002.

Den Vandrande Vetenskapskvinnan: Rungstedlund revisited

Linda Hilsted

"I had a farm in Africa…"

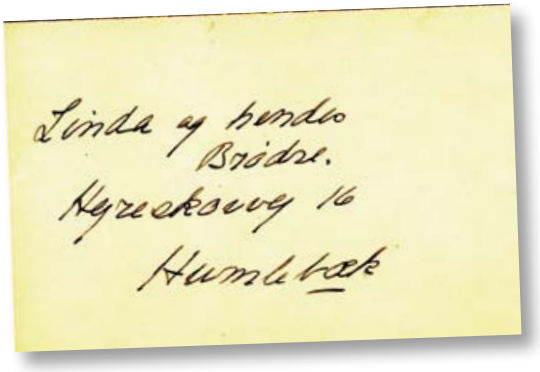
Mens jeg aldrig har været i Ngong Hills i Kenya, så har jeg været på Rungstedlund et par gange som barn – og mange gange i erindringen.

Barndommens erindringer skyldes et tæt venskab mellem min mor og Karen Blixens litterære sekretær, Clara Svendsen. Clara var katolik, min mor var konverteret, og begge beundrede de Karen Blixen grænseløst. Som følge af dette venskab lærte min mor Karen Blixen personligt at kende, og dét fyldte meget i mit barndomshjem. Ud over at der blev talt meget om alle bøgerne – og myterne, og alle de afledte store eksistentielle spørgsmål blev drøftet, så var 'Løvinden' (Clara – og derfor også min mor - brugte dette navn om Karen Blixen i tredje person) et hyppigt emne. Løvindens vaner, helbred, oplæsningsturnéer var en fast og integreret del af konversationen derhjemme.

Jeg forstod noget af magien, da jeg som 5-årig var til te på Rungstedlund. Jeg var i mit fineste tøj og med håret sat op. Formaningerne hjemmefra om at opføre mig godt, holde mig i ro, ikke snakke, undtagen når jeg blev spurgt. – alt sammen unødvendigt, jeg var slået med stumhed. Alt - også Karen Blixen - var så anderledes, fint og også lidt skræmmende.

Et enkelt besøg mere blev det til – meget kort, men det udløste et brev (med foto – se Omslaget) stilet til 'Linda og hendes brødre', underskrevet 'Eders Hengivne Baronesse Blixen' (med 'bredspetsad reservoarpenna' citat: KBN's hovedredaktør). Dette brev er 'a treasured memory', som klart tilhører mig og ikke de tre brødre….

Stemningen i mit barndomshjem omkring Karen Blixen kunne vel nærmest kaldes en kult – eller på nudansk 'hype'. Hovedpersonen selv tog denne betagelse helt for givet – den kom selvfølgelig også fra mange andre kilder. Min mor lavede jævnligt særligt



nærende lækkerier, når 'Løvinden' var rekonvalescent (disse blev kørt med taxa til Rungstedlund), Kgl. skuespiller Erling Schrøder sendte østers og champagne, når baronessens appetit svigtede, der kom dagligt langstilkede røde roser fra forskellige beundrere i ind- og udland. Min far fortalte, at han under et middagsbesøg på Rungstedlund havde bemærket en herre, der før middagen diskret fotograferede i de tilstødende saloner, og hvis ryg han derefter så på vej ud gennem haven. Min far spurgte, hvem denne mand var. Karen Blixen svarede: Åhh jahh, det er min nabo, han fotograferer mine buketter. Han hedder Steen Ejler Rasmussen. Meget begaaavet mand. (Steen Ejler Rasmussen var arkitekt, professor ved Akademiet og internationalt berømt forfatter).

Fra alle biografierne om Karen Blixen ved vi senere, hvilket fascinations-spind, ikke mindst de unge mandlige forfattere ("magistrene") blev vundet ind i. Flere af dem har også selv skrevet om det. Thorkild Bjørnvig fortæller i 'Pagten', at Karen Blixen inviterede ham til at sidde og arbejde på Rungstedlund. Men han følte sig også udstillet, når så døren gik op ind til 'Ewalds stue', hvor han sad og skrev, og Karen Blixen fremviste ham for fnisende seminarister med ordene: Her sidder den berømte digter Thorkild

Bjørnvig. og skriver på sit store værk. Ingen af dem, der har berettet om personlige relationer med Karen Blixen, ville dog have været dem foruden.

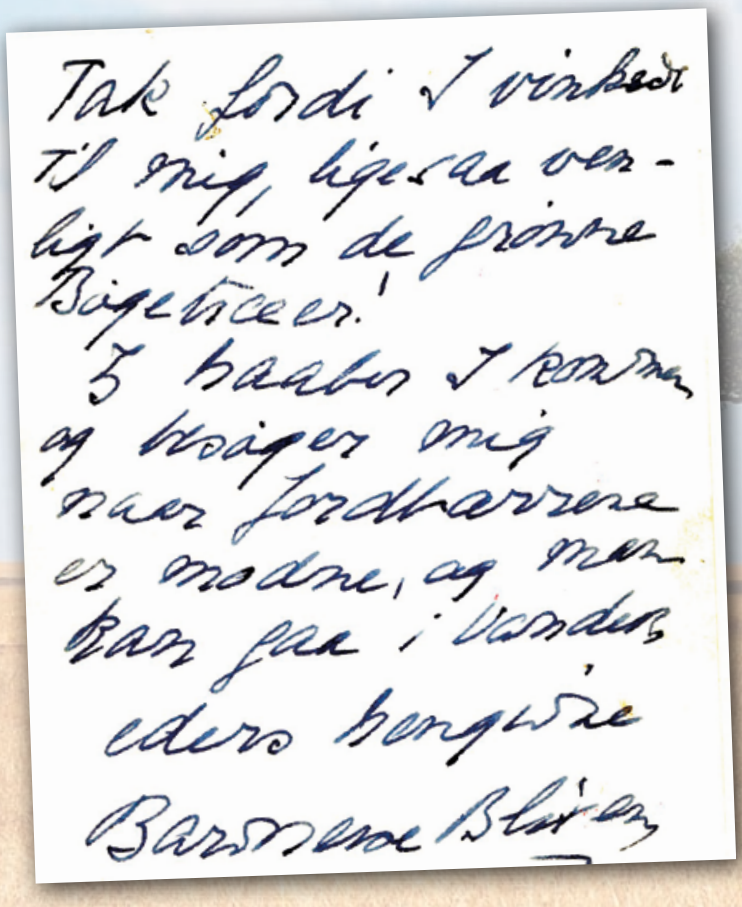
Tilbage til Rungstedlund, som jeg sidst har besøgt for et halvt århundrede siden. Den sande vandrande vetenskapsmannen, KBN's hovedredaktør, var forbi mit hjem i juli og fortalte, at han havde lagt en rose på K.B.s grav på Rungstedlund. Nu var det tid for mig at *go down memory lane*. En sen augustdag, efter lidt regn med frisk vind og en høj himmel med sol, et besøg på museet, og ikke mindst stuerne. Fine luftige rum, smukke empiremøbler, hvide molsgardiner der flyder hen ad gulvene. Friske blomster fra skærehaven i fantastiske buketter. De lave møbler foran kaminen i dagligstuen, der hvor gæsterne sad og drak te. Ewalds stue hvor forfatterinden skrev sine mest berømte værker. Set med voksne øjne: Smukt – men ikke prangende. En bevaret tidslomme. Fotostater med fantastiske fotografier gennem det liv, vi har hørt og læst så meget om. Hendes værker i talrige oversættelser, og et udsnit af hendes eget bibliotek. Parken og fuglereservatet – gaven til danskerne – og hendes grav under det kæmpestore bøgetræ.

Hun fik ikke Nobelprisen – men mange andre der har fået den er glemte. Hendes forfatterskab, hendes hjem og park - og ikke mindst magien lever.

Rungstedlund

I had a farm in Africa…Sådan starter 'Out of Africa', filmen fra 1985 der gjorde Karen Blixen virkelig verdensberømt. Filmen selv, og alt hvad den medførte af nyvakt interesse for forfatterskabet, muliggjorde, at hendes barndomshjem (og senere hjem indtil hendes død i 1962) Rungstedlund, 20 km nord for København, kunne blive istandsat og leve videre. Fra 1991 som en del af "Karen Blixen museet" (http://www.karen-blixen.dk/), åbent for offentligheden. Selv havde hun i 1958 sammen med sine søskende stiftet Rungstedlundfonden, for at udlægge ejendommens have, park og skov som fuglereservat.

Fotos: Linda Hilsted



Tak fordi I vinkede
til mig, ligesaa ven-
ligt som de grønne
Bøgetræer!
Og haaber I kommer
og besøger mig
naar Jordbærrene
er modne, og man
kan gaa i Vanden
eders hengivne
Barnesse Blixen

Redaktionskomitén for Klinisk Biokemi i Norden:

Hovedredaktør: Per Simonsson · Tryk: Clausen Offset

Danmark
Overlæge Linda Hilsted
Klinisk biokemisk afd. KB
Rigshospitalet
Blegdamsvej 9
DK-2100 København Ø
Telefon: +45 35 45 20 16
Telefax: +45 35 45 28 80
E-mail: linda.hilsted@rh.regionh.dk

Finland
Sjukhuskemist Henrik Alfthan
Helsingfors Universitetscentralsjukhus
HUSLAB
Kvinnokliniken
Haartmansgatan 2
FIN-00290 Helsingfors
Telefon: +358 50 4271 457
Telefax: +358 9 471 74806
E-mail: henrik.alfthan@hus.fi

Norge
Overlege Kristin Moberg Aakre
Laboratorium for klinisk biokjemi
Haukeland Universitetssykehus
N-5020 Bergen
Telefon: +47 5597 3188
Telefax: +47 5597 5976
E-mail:
kristin.moberg.aakre@helse-bergen.no

Sverige
Professor Anders Larsson
Avdelningen för klinisk kemi
Akademiska sjukhuset
S-751 85 Uppsala
Telefon: +46 18 6114271
Telefax: +46 18 552562
E-mail: anders.larsson@akademiska.se

Island
Överläkare Ingunn Þorsteinsdóttir
Department of Clinical Biochemistry
Landspitali - University
Hospital Hringbraut
IS-101 Reykjavik
Telefon: +354 543 5033
Telefax: +354 543 5539
E-mail: ingunnth@landspitali.is

Sverige
Docent Per Simonsson
Klinisk kemi Skåne
Skånes Universitetssjukhus
SE-205 02 Malmö
Telefon: +46 4033 1459
E-mail: per.simonsson@med.lu.se

NFKK
Överläkare Ingunn Þorsteinsdóttir
Department of Clinical Biochemistry
Landspitali - University
Hospital Hringbraut
IS-101 Reykjavik
Telefon: +354 543 5033
Telefax: +354 543 5539
E-mail: ingunnth@landspitali.is

Til manuskriptforfattere

Bidrag til Klinisk Biokemi i Norden sendes i elektronisk versjon til den nasjonale redaktøren som er angitt ovenfor. Formen på manuskriptet skal være som beskrevet i Vancouver-aftalen (http://www.etikkom.no/NEM/REK/vancouv.htm). Meddelelser og korte innlegg skrives fortløpende, mens lengre artikler med fordel bør inndeles i avsnitt med en kort overskrift. Tabeller skrives på eget ark sammen med en tekst som gjør tabellen selvforklarende.

Figurer skal være av teknisk god kvalitet med tekst og symboler store nok til at figuren tåler forminskning. Til hver figur skal det finnes en forklarende tekst. Tabeller og figurer sendes i elektronisk form.

Litteraturhenvisninger nummereres i den rekkefølge de angis i manuskript-teksten og skrives som i følgende eksempel (Vancouver-stil):

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

Det faglige innhold i de innsendte manuskripter vil ikke bli vurdert med referee-system. Redaksjonskomiteen vurderer imidlertid alle manuskripter innholdsmessig og redaksjonelt og foreslår eventuelle endringer.

Klinisk Biokemi i Nordens redaktion 2010

Linda Hilsted, Kristin Aakre, Per Simonsson, Palle Wang, Henrik Alfthan, Ingunn Þorsteinsdóttir, Anders Larsson.

Se også KBN's hjemmeside: www.kkno.org

Nordisk Forening for Klinisk Kemi (NFKK)

NFKK har som oppgave å arbeide for utviklingen av det nordisk samarbeide innen klinisk kjemi med spesiell fokus på forskning, faglig utvikling og utdanning. Den består av medlemmene i de vitenskapelige foreningene for klinisk kjemi i Danmark, Finland, Island, Norge og Sverige. Aktiviteten i NFKK foregår i like arbeidsgrupper og komiteer. Foreningen har det vitenskabelige ansvar for Scandinavian Journal of Laboratory and Clinical Investigation (SJCLI), har ansvar for utgivelse av Klinisk Biokemi i Norden, og står bak arrangering av de nordiske kongresser i klinisk kjemi.

Det nåværende styre består av Nete Hornung (Randers), Henrik Jørgensen (Bispebjerg), Tuula Metso (Helsingfors), Harri Laitinen (Helsingfors), Jón Jóhannes Jónsson (Reykjavik), Ingunn Þorsteinsdóttir (Reykjavik), Lars Eikvar (Oslo), Helge Rootwelt (Oslo), Per Simonsson (Malmö), Per Bjellerup (Västerås).
Ordförande: Ingunn Þorsteinsdóttir. Sekreterare: Vakant.

CLINITEK Status Systems ensure flexible, seamless connectivity.

Whether you're in a physician's office or the hospital point of care, the CLINITEK Status® Connect System and CLINITEK Status®+ Analyzer connect you to all aspects of urinalysis testing. Advanced operational controls help reduce risk and drive compliance. And, as your connectivity needs change, Siemens future-ready portfolio has the flexibility to grow with you. Discover five reasons why you should choose Siemens urine analyzers at **www.siemens.com/clinitek**

Answers for life.

SIEMENS

A91DX-9109-A1-4A00

© 2010 Siemens Healthcare Diagnostics Inc. All rights reserved.
CLINITEK Status and all associated marks are trademarks of Siemens Healthcare Diagnostics Inc.