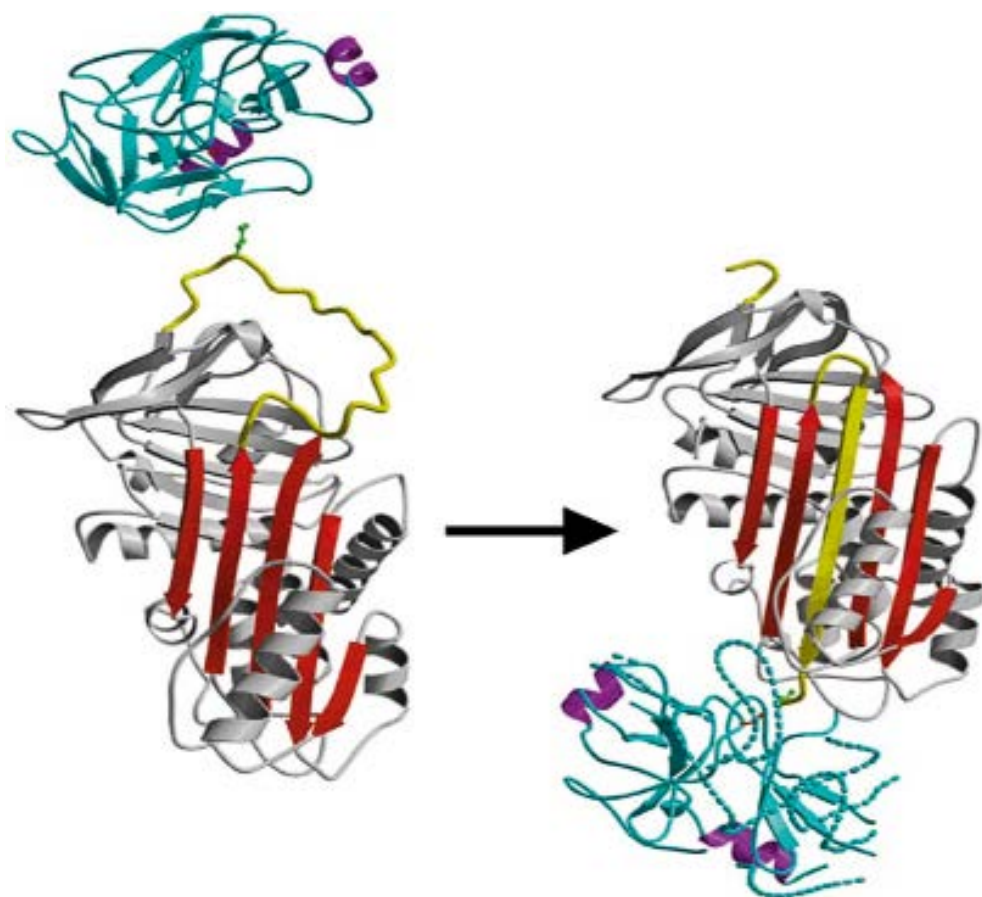


Klinisk Biokemi i Norden



The power of productivity



Benefit from the highest output core laboratory systems with the smallest footprint on the market

The new AU5800 Series Clinical Chemistry Analyser

With the highest throughput chemistry systems available, we can give your laboratory the power to manage variable and increasing workloads without the need for large-scale reorganisation. As the world's proven No.1 automation supplier, our configurations ensure you meet your turnaround targets whilst minimising workforce pressure.



AU5800 Series

www.beckmancoulter.com



INDHOLD

Ordförandespalt	4
<i>Ingunn Þorsteinsdóttir</i>	
Nordic Congress 2014	6
<i>Ola Hammarsten</i>	
Procalcitonin: Er evidens fra store randomiserede kliniske studier nødvendigt før indførelse af biomarkører for sepsis?	8
<i>Theis Itenov og Jens-Ulrik Jensen</i>	
Ny kurs om att skriva vetenskap 2014!	15
<i>Tor-Arne Hagve</i>	
NORDFOND ansökning	16
En fortælling om trekløverpeptider - slimhindens vogtere	18
<i>Mie Hessellund Samson</i>	
En ny och enkel metod för att ta reda på om blodkoagulationen är aktiverad	24
<i>Karin Strandberg och Johan Stenflo</i>	
Helsingpriset 2012 till Sten Steender	35
<i>Per Simonsson</i>	
Doktorgradsavhandling: Diagnosing and monitoring the porphyrias	36
<i>Aasne K. Aarsand</i>	
The role of clinical chemistry in UEMS	40
<i>Lena Norlund</i>	
Kontroll av reagensbatcher med hjälp av frysta patientpooler	43
<i>Anders Larsson och Mats Flodin</i>	
Doktorgradsavhandling: Tyrosinemi type I	46
<i>Yngve Thomas Blikrud</i>	
Den vandrande vetenskapsmannen: At spise cuy i Quito	48
<i>Palle Wang</i>	
Litteraturhänvisningar	50

Omslagsbild:

Figuren visar hur komplexbildningen mellan ett serinproteas och en serinproteashämmare, ett så kallat serpin, går till, t.ex. mellan trombin och antitrombin, som i figuren. Mer om detta finns i artikeln av Karin Strandberg och Johan Stenflo.

Erratum: Klinisk Biokemi i Norden, Nr. 1, Vol. 25, 2013, side 15:

Enheden for Transferrin er fejlagtigt angivet som $\mu\text{mol/L}$ – korrekt enhed er g/L.

Klinisk Biokemi i Norden er medlemsblad for Nordisk Forening for Klinisk Kemi

Ordförandespalt

Ingunn Þorsteinsdóttir



När dessa rader skrivs har jag just kommit hem från EuroMedLab i Milano. Det var en riktigt stor kongress med 4786 deltagare från 101 länder. I jämförelse blir de skandinaviska kongresserna förstas numerärt små. Programmet var fullspäckt med intressanta föredrag inom olika områden. Plenarföredragen och symposierna var speciellt fina. Bl. a. höll huvudredaktören för Clinical Chemistry, Nader Rifai, ett mycket intressant föredrag om etik inom forskning och vetenskaplig publicering. Eftermiddagarna ägnades åt workshops

sponsrade av industrin som också hade en stor utställning. Ytterligare en viktig del av kongresser som denna är förstas att ha möjlighet att träffa kollegor från olika länder, skapa kontakter och utbyta erfarenheter. Det kändes skönt att njuta av en underbar stad med sol och värme efter en kall vår på Island.

Tidskriften, Klinisk Biokemi i Norden, har i 24 år varit en viktig informations- och inspirationskälla inom klinisk kemi i de nordiska länderna. En förutsättning för att tidskriften skall fortsätta frodas och sprida information inom klinisk kemi är att ni läsare fortsätter att dela med er av egna erfarenheter. Om ni har utfört arbete på labbet som ni tror att kan vara av intresse för kollegorna i Norden, ta gärna kontakt med någon i redaktionskommittén. I tidskriften har vi haft glädjen att publicera många artiklar som kanske inte skulle blivit publicerade i de större internationella tidskrifterna, men sprider viktigt information inom klinisk kemi.

Jag vill slutligen påminna om att ansökningstiden för Nordfond har slutdatum den 1 september 2013, och uppmantrar även yngre kollegor att delta på kursen om vetenskapligt skrivande i Finse i Norge, 28 – 31 januari 2014 (se information i tidskriften).



Foto: Henrik Alfthan.

Ready to revolutionize your lab with ultra-integration?



**Now you can, with one patient sample,
one tube, and one system.**

The Dimension Vista® Intelligent Lab System provides fast turn-around-time with the ultra-integration of 4 best-in-class technologies— Photometry, Nephelometry, V-LYTE® multisensor electrolyte detection, and LOCI® advanced chemiluminescence — for simultaneous processing capabilities. www.siemens.com/diagnostics.

Answers for life.

SIEMENS



Nordic congress 2014 in Göteborg

Ola Hammarsten

On behalf of the Organising Committee we want to invite you to the XXXIV Nordic Congress in Clinical Chemistry, which will take place on September 16-19, 2014 at Svenska Mässan in Göteborg.

Our scientific committee is planning an ambitious and interesting program with an overall theme: "Future opportunities in clinical chemistry". This will entail seminars covering good examples of how the laboratory with its wealth of expertise among physicians, chemists and laboratory engineers can further develop as a diagnostic partner. Seminars, plenary sessions and workshops will cover novel aspects of risk assessment and diagnostic tools using biomarkers, genomics and imaging techniques. A special section will be devoted on emerging techniques involving nanotechnology, next generation sequencing and beyond. Posters will be on display close to the seminar rooms in the congress hall and will be highlighted in guided poster walks and prizes. Also, a trade exhibition will take place at the congress venue throughout and industry sponsored seminars will be held as breakfast seminars

and special lunch seminars. Details of the programme will be published on the website of the conference (www.nfkk2014.se) as it develops.

Svenska Mässan and all of the preferred hotels are in the centre of Göteborg. In addition our meeting will have a private entrance in Svenska Mässan close to the Liseberg Amusement Park and walking distance to Götaplatsen and the southern end of the main boulevard Avenyn where the city's culture centre is concentrated, all contributing to make the stay and attendance convenient and fun.

Gothenburg, Sweden's second largest city, is located on the west coast and in the early fall Göteborg usually is at its prime. Closeness to the sea results in top-quality, fresh fish and seafood and possibility to experience river-ferries to view of the city from the water and the archipelago just around the corner. For more information on Göteborg, the official visitor's guide provides good guidance www.goteborg.com.

We hope to see you in Göteborg!



XXXIV Nordic Congress in Clinical Chemistry
16-19 Sep 2014, Göteborg Sweden

HUMAN HEALTH

ENVIRONMENTAL HEALTH

RAPID AND IMPROVED DETECTION OF FETAL CHROMOSOMAL ABNORMALITIES



Prenatal BoBs, a more informative option than FISH and QF-PCR for IVD labs.

Prenatal BoBs™ is a CE-marked IVD product based on BACs-on-Beads technology. In addition to detecting copy number changes of chromosomes 13, 18, 21, X and Y, the product enables detection of 9 additional chromosomal microdeletion regions in which a clear correlation between a loss and an adverse outcome has been demonstrated.

[www.perkinelmer.com/Prenatal BoBs](http://www.perkinelmer.com/PrenatalBoBs)

Prenatal BoBs reagents are not available in the USA and Canada. In other countries please check availability with your PerkinElmer sales representative.

For more information about the assay performance, please contact

Denmark: Annegrete.Pedersen@perkinelmer.com

Finland: Tiina.Vierjoki@perkinelmer.com

Norway: Annegrete.Pedersen@perkinelmer.com

Sweden: Lena.Gottneresson@perkinelmer.com



HUMAN HEALTH

ENVIRONMENTAL HEALTH

SEARCHING FOR COMPACT SOLUTION



chemagic Prepito, a compact automated solution for DNA/RNA isolation.

The chemagic Prepito is based on the chemagen's proven technology for magnetic particle separation and represents the top quality sample preparation system in a compact benchtop instrument. In combination with the chemagic Kits, it delivers high yield and purity of DNA/RNA, and ensures the success of your downstream application.

- 1-12 samples per run
- Small benchtop solution
- Integrated buffer dispensing
- Revolutionary resuspension technology

For more information about the instrument performance and further chemagen DNA/RNA isolation solutions, comprising medium to high throughput applications, please contact:

Denmark: Annegrete.Pedersen@perkinelmer.com

Finland: Tiina.Vierjoki@perkinelmer.com

Norway: Annegrete.Pedersen@perkinelmer.com

Sweden: Lena.Gottneresson@perkinelmer.com

www.chemagen.com

For laboratory use only. Not intended for use in diagnostic procedures.



Procalcitonin:

Er evidens fra store randomiserede kliniske studier nødvendigt før indførelse af biomarkører for sepsis? Kan manglende evidens koste liv?

Theis Itenov¹ og Jens-Ulrik Jensen^{2,3}

¹Anæstesiologisk afdeling, Nordsjællands Hospital, Region Hovedstaden

² Copenhagen HIV Program (CHIP), Rigshospitalet / Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet Københavns Universitet

³ Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Hvidovre Hospital, Region Hovedstaden, København
theis.skovsgaard.itenov@regionh.dk

Diagnostiske biomarkører spiller en central rolle for valg og varighed af behandling inden for mange felter af moderne medicin. Evidensen bag anvendelsen af biomarkører hviler hyppigt på data fra observationelle studier. Randomiserede studier, som undersøger effekten af kombinationen af biomarkører og behandlinger på hårde patientnære effektmål, er relativt sjældne og ofte af en begrænset størrelse. Vi vil med procalcitonin som eksempel diskutere nogle af faldgruberne ved at lade behandling vejlede af diagnostiske metoder evalueret i observationelle studier, samt betydningen af tilstrækkelig sample size i randomiserede studier.



Implementering af diagnostiske biomarkører

Diagnostiske undersøgelser, herunder biomarkører, er en integreret og uadskillelig del af behandlinger inden for mange specialer. Når biomarkormålinger bruges til initiering, justering eller seponering af en behandling, har de også betydning for effekten af denne behandling. Således bør en biomarkør og den behandling, den knytter sig til, ikke vurderes adskilt. Biomarkører er traditionelt blevet introduceret og anvendt i klinisk praksis, uden at der har været solid klinisk evidens fra randomiserede studier om, hvorvidt kombinationen af biomarkør og behandling gavnede eller skadede

patienterne. Ydermere har diagnostiske biomarkører traditionelt været anset som relativt harmløse, og kravene til evidensen bag dem har været betydeligt mindre restriktive end tilfældet er for behandlinger (1). Hovedparten af diagnostiske biomarkører identificeres i observationelle studier. Diagnostiske egenskaber som sensitivitet og specificitet ved forskellige grænseværdier bestemmes og sammenlignes med klassiske og velfunderede statistiske metoder. Dette er et naturligt og uundgåeligt trin i udviklingen af en biomarkør. Et velkendt problem med denne strategi er, at "Gold standard" for den diagnose, man tester, er ufuldkommen. Årsagen til at undersøge en ny diagnostisk metode er ofte netop den gamle metodes utilstrækkelighed(er). En anden og endnu vigtigere mangel ved "diagnostic accuracy" studier er at disse studier ikke siger noget om den kliniske effekt, der vil være af at indføre den nye diagnostiske strategi. Populært sagt: Hvad får patienten med hjem? Observationsstudier med hårde patientnære effektmål kan give et bud på dette, omend de klassiske udfordringer i epidemiologiske studier også her gør sig

gældende, nemlig confounding og bias. Skal en gunstig effekt af en kobling af biomarkør og behandling vises, er det derfor nødvendigt at gennemføre tiltrækkeligt dimensionerede randomiserede kliniske studier.

Procalcitonin hos intensiv patienter

Større observationelle studier har indikeret, at tiden til dækkende antibiotisk behandling er blandt de vigtigste risikofaktorer for død hos patienter med sepsis (2,3). Diagnostiske biomarkører, der tidligt kan identificere patienter med uerkendte infektioner, eller infektion hvor den iværksatte empiriske behandling ikke er dækkende, er derfor efterspurgt. Procalcitonin (PCT) er et 114 AA prohormon for calcitonin, som især i det seneste årti har været tiltagende anvendt til behandlingsvejledning ved respiratoriske infektioner og ved svære bakterielle infektioner (4–6). I et studie med 473 intensivpatienter blev det vist, at PCT over 1,0 ng/ml, som var stigende fra dagen før, såkaldt 'Alert-PCT', er en uafhængig prædikator for død med en hazard ratio på 1,8 [95 % konfidensinterval (CI) 1,3-2,7, $p < 0,002$] (7). I samme studie fandt man, at antallet af dage med 'Alert-PCT' er proportional med risikoen for død. Müller et al. fandt blandt 101 patienter på intensiv afdeling en optimal sensitivitet og specificitet på hhv. 89 % og 94 % for diagnosen sepsis ved en grænseværdi på 1,0 ng/ml (8). Gäini et al. fandt blandt 154 patienter med mistænkt sepsis, at der var minimalt overlap mellem PCT målt hos patienter med og uden bakteriæmi på hhv. 0,6 ng/ml [Interquartil range IQR 0,15-3,9] vs. 14,1 ng/ml [IQR 2,9-31], $p < 0,0001$ (9). Procalcitonin blev på baggrund af disse og andre lignende resultater regnet for at være en lovende biomarkør til at prædiktere sepsis og bakteriæmi, samt for at have prognostisk betydning hos patienter indlagt på intensiv afdeling. Det syntes nærliggende at konkludere, at måling af PCT må gavne patienterne ved at diagnosticere ukontrolleret infektion bedre og tidligere end konkurrerende biomarkører, og således give mulighed for rettidig, dækkende antibiotisk behandling. Disse fund og manglen på sikker klinisk evidens fra randomiserede studier med relevante kliniske effektmål var baggrunden for "the Procalcitonin And Survival Study – PASS". Hypotesen for dette studie var således, at PCT-vejledt pro-aktiv antimikrobiel intervention (empirisk opstart og udvidelse af antibiotika-spektrum hos intensivpatienter med uerkendt infektion) kunne mindske forekomsten af organsvigt og derigennem forbedre overlevelsen (10).

"The Procalcitonin and survival study"

Design: Randomiseret, ublindet kontrolleret multicenterstudie

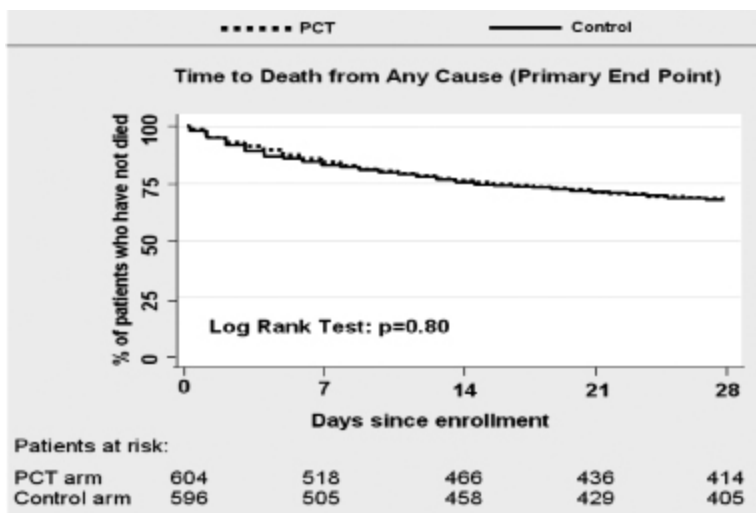
Follow-up tid: 28 dage for det primære effektmål.

Effektmål: Primære: Død efter 28 dage. Sekundære inkluderede varighed af intensivindlæggelse, mekanisk ventilation og nyresvigt.

Patienter: 1200 patienter ≥ 18 år, inkluderet ≤ 24 timer fra indlæggelse intensiv afdeling og forventet indlæggelse på intensiv afdeling ≥ 24 timer. Af analysetekniske årsager blev patienter med P-Bilirubin > 40 mg/



Foto: Henrik Alfthan.



Figur 1: Kaplan-Meier plot fra 'The Procalcitonin and survival study' (10).

dL og P-Triglycerider > 1000 mg/dL ekskluderet. Desuden blev gravide og patienter med forøget risiko ved blodprøvetagning ekskluderet.

Intervention: Pro-aktiv antibiotikastrategi baseret på daglige PCT målinger + standard behandling vs. standard behandling. I den pro-aktive PCT baserede gruppe blev den empiriske antibiotikabehandling udvidet efter en forudbestemt algoritme ved 'alert-PCT' værdier. En 'alert-PCT' er defineret som en PCT over 1,0 ng/ml på dag 1 eller en PCT over 1,0 ng/ml, som ikke var faldet med 10 % fra dagen før. Ved 'alert PCT' blev der også iværksat yderligere diagnostiske undersøgelser for at identificere infektionsfokus (dyrkning, billeddiagnostik mv.).

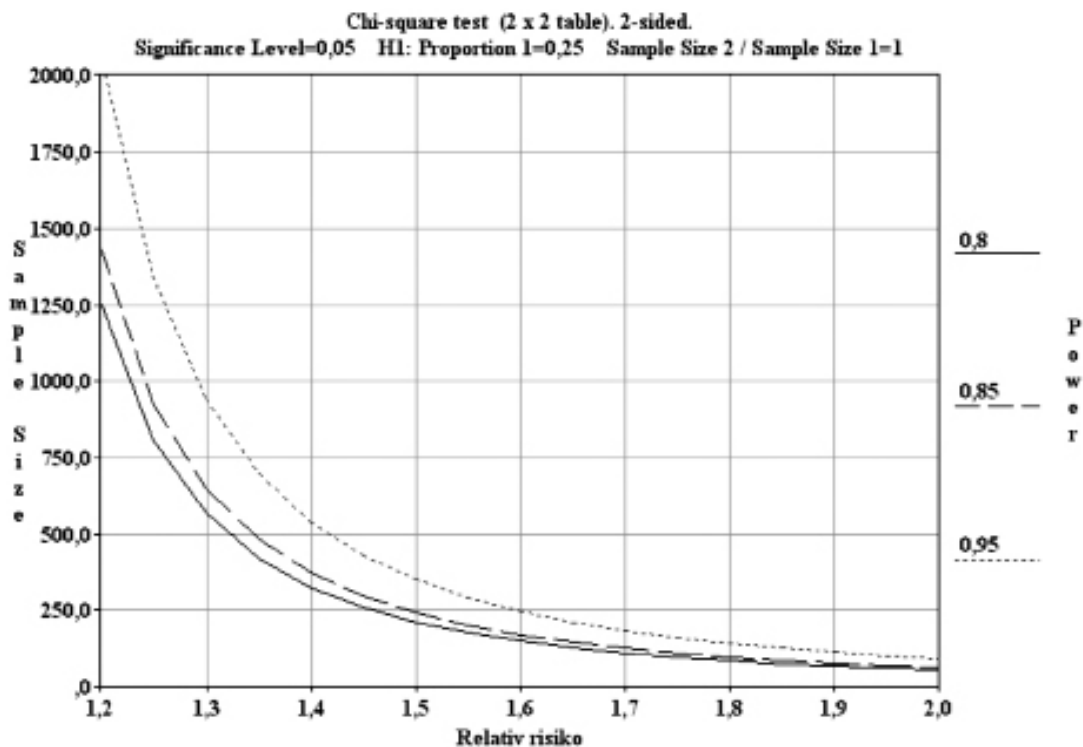
Resultater: Studiet blev gennemført mellem 2006-2010 med follow-up på alle 1200 inkluderede patienter. Efter 28 dage var 190 ud af 604 (31,5 %) patienter døde i PCT-gruppen og 191 ud af 596 (32,0 %) i kontrolgruppen, log-rank test for sammenligning af overlevelseskurver var ikke signifikant, $p = 0,80$. Den relative risiko for død efter 28 dage var 0,98 [95 % CI 0,83-1,16; $p = 0,83$]. Patienterne i PCT-gruppen var i respirator i 65,5 % af dagene under intensiv-indlæggelsen mod 60,7 % i kontrolgruppen, $p < 0,001$. Den gennemsnitlige indlæggelsestid på intensiv var længere i PCT-gruppen med en median på 6 dage [IQR 3-12] vs. 5 dage [3-11] i kontrolgruppen, $p = 0,004$. Et efterfølgende studie på samme population viste, at patienterne i PCT gruppen havde flere dage, 48,1 % vs. 43,4 % (p

< 0,001), med nedsat nyrefunktion ($eGFR < 60$ ml/min/1,72 m²) mellem dag 1-28, og at risikoen for lav nyrefunktion ($eGFR < 60$ ml/min/1,72 m²) på dag 7 var betydeligt forøget: HR 1,7 [95 % CI: 1,2 - 2,4] for et af de antibiotika, som blev ordineret på baggrund af 'Alert-PCT' (11,12).

Konklusion: PASS studiets resultater viste således, trods gunstige fund i observationelle studier, ingen klinisk gavnlige effekt af PCT måling og en pro-aktiv antimikrobiel interventionsalgoritme. Tværtimod pegede resultaterne på, at den intensiverede antibiotiske behandling var skadelig for patienterne.

Kan PCT bruges til at mindske brugen af antibiotika?

En række studier har undersøgt, om PCT kan bruges til at begrænse brugen af antibiotika på intensiv afdelinger. Baggrunden er den tiltagende resistensudvikling overfor antibiotika, samt den ofte meget bredspektrede og langvarige brug af antibiotika på intensiv afdelinger. Den fælles hypotese for disse studier er, at man ved at måle PCT kan reducere antibiotikaforbruget hos intensivpatienter, uden at det medfører en øget mortalitet. Formålet er derfor meget forskelligt fra formålet i PASS-studiet, hvor det var bedre overlevelse. Sample size er i denne sammenhæng essentiel. I figur 2 er vist sammenhængen mellem den mindste relative risiko, det er muligt at udelukke, og sample size ved forskellige power (styrke til at udelukke type II fejl). For at eksemplificere i et hypotetisk studie: 500



Figur 2: Sammenhængen mellem sample size (den angivne sample size er i interventions armen, denne reelle sample size er derfor det dobbelte) og mindste relative risiko, der kan erkendes ved forskellige risici for type II fejl. Der antages risiko for type I fejl på 5 % og forekomst af effektmål (f.eks. død) på 25 % i kontrolgruppen. Grafen er konstrueret med StudySize version 2.0.

patienter på intensiv afdeling randomiseres i en 1:1 ratio mellem en kontrolbehandling og en intervention. På intensiv ligger mortaliteten omkring 25 % efter 28 dage, dette antages at være forekomsten af effektmål i kontrolgruppen. Mortaliteten i interventionsgruppen kan med denne sample size være forøget med en relativ risiko på 1,33 (mortalitets øgning på 33 %) uden at det inden for de givne 'power' (80 %) og signifikansgrænser (5 %) ville detekteres. Med 500 patienter kunne mortaliteten altså øges med 33 %, svarende til en forøgelse fra 25 % absolut mortalitet til 44 %, uden at vi ville kunne se det. Dimensionerede vi studiet til at kunne udelukke en relativ forskel på 15 % med grænser for type I og type II fejl (5 % og 80 %) skulle der inkluderes i alt 2580 patienter. Dertil kommer at risikoen for type I fejl ville være 5 % med en, i denne sammenhæng ikke ubetydelig, risiko for type II fejl på 20 %. Viser vores resultater ingen forskel mellem grupperne, vil der være en 20 % risiko for at resultatet

skyldes tilfældigheder. I equivalence og non-inferiority studier skal man være opmærksom på, at den almindeligt angivne p-værdi er et dårligt mål for den statistiske sikkerhed, og at hvis en forsker eller et firma ønsker at sikre et "non-signifikant" resultat, gøres dette bedst ved at inkludere for få patienter, evt. i kombination med en grad af (intenderet) publikationsbias.

Ovenstående eksempel er inspireret af de publicerede randomiserede studier vedrørende PCT-vejledt antibiotikabesparelse hos intensivpatienter: Fire kliniske kontrollerede randomiserede studier har undersøgt, om det er muligt at reducere antibiotika forbruget uden at forøge mortalitet hos voksne intensivpatienter (Tabel 1)(5,13-15). Den præcise algoritme, hvorefter antibiotikabehandlingen reduceres, varierer fra studie til studie, men overordnet er der anlagt en restriktiv antibiotikastrategi, hvor antibiotika frarådes ved lave PCT værdier eller seponeres ved lave eller faldende værdier. Studierne er generelt af en begrænset

Forfatter (år)	N	Patienter	Effekt mål antibiotika	Resultater antibiotika	Effekt mål mortalitet	Resultater mortalitet	Relativ risiko grænse for mortalitet-detektion**
Hochreiter (2009)(13)	110	Kirurgisk intensiv	Varighed. Mean (SD)	Kontrol: 7,9 dage (0,5) PCT: 5,9 dage (1,7) P-værdi: < 0,001	Hospital	Kontrol: 15/57 (26,3 %) PCT: 14/53 (26,4 %) P-værdi: NS	2,0
Nobre (2008)(5)	79	Svær sepsis / septisk shock	Varighed. Median (range)	Kontrol: 9,5 dage (2-33) PCT: 6 dage (3-34) P-værdi: 0,15	28 dage	Kontrol: 8/40 (20 %) PCT: 8/39 (20,5%) P-værdi: 0,82	2,5
Stoltz (2007)(14)	101	Respirator associeret pneumoni (VAP)	AB frie dage* Median (IQR)	Kontrol: 9,5 (1,5-1,7) AB frie dage PCT: 13 (2-21) AB frie dage P-værdi: 0,038	28 dage	Kontrol: 12/50 (25 %) PCT: 8/51 (15,7 %) P-værdi: 0,327	2,1
Bouadma (2010)(15)	630	Intensiv afdeling, mistænkt infektion	AB frie dage*. Mean (SD)	Kontrol: 11,6 (8,2) AB-fri dage PCT: 14,3 (9,1) AB-fri dage P-værdi: < 0,0001	60 dage	PCT: 92/307 (30,0 %) Kontrol: 82/314 (26,1 %) P-værdi: NS	1,36

Table 1: Studier af PCT baserede antibiotika restriktive strategier på intensivpatienter. *Antibiotika frie dage i live frem til dage 28 efter inklusion. **Den relative risikogrænse er den mindst mulige risikoforøgelse, som vil kunne detekteres med den angivne sample size og gængse grænser for type I og type II fejl (5 % og 80 %). Mortaliteten i kontrolgruppen er taget som reference.

størrelse på 79-630 patienter. Der findes konsistent, som forventeligt, at antibiotikaforbruget er reduceret i PCT gruppen. Mortaliteten i alle studierne angives som uændret mellem PCT og kontrolgrupperne. Den beskedne sample size i studierne gør dog, at ingen af studierne kan udelukke en relativ risiko for død på op til 1,36, svarende til forøget risiko for død i PCT gruppen på 36 %. Dette medfører, at mortaliteten i interventionsgruppen i de forskellige studier kunne være forøget i absolutte tal fra 20-30 % og helt op til 52,6 %, uden at dette ville kunne detekteres.

Anvendelse af procalcitonin på intensiv afdelinger

PASS studiet har givet evidens for at en proaktiv antibiotika strategi baseret på PCT ikke øger overlevelsen, og potentielt har skadelige bivirkninger. Det er muligt, at procalcitonin kan anvendes til at reducere

antibiotika forbruget hos intensivpatienter, men det hidtil største antibiotikabesparelsesstudie hos intensivpatienter viste en 14,9 % relativ overdødelighed ($p=ns$, sample size insufficient til at detektere denne forskel). På nuværende tidspunkt er de udførte studier af en så begrænset størrelse, at endog meget betydelige øgninger i mortaliteten ikke kan udelukkes. Resultater af pågående studier (Clinicaltrials.gov-ID NCT01379547) afventes for at afgøre, om PCT har en rolle i antibiotikabesparelse på intensivafdelinger.

Konklusion

Selvom diagnostiske 'accuracy' studier og kliniske observationsstudier tilsyneladende viser en fordel ved at indføre en biomarkør for sepsis (eller en anden tilstand), så er det især i højrisiko populationer afgørende vigtigt for patientsikkerheden, at der gennemføres randomiserede kliniske studier med passende sample size,



*Name: Svetlana R.
Job: Medical Lab Technician
Mission: Guardian Angel*

*Name: XN-9000
Job: Efficient Analysis
Mission: Pathfinder*



XN
XN

XN-SERIEN ÄR SYSTEMET FÖR DIG ...

när pålitliga hematologireultat räknas. När ett effektivt arbetssätt är viktigt. Då förmågan att vara förberedd på framtidens behov gör ditt laboratorium framgångsrikt ... VARJE DAG

GIVING EVERYTHING. EVERY DAY.

hvor interventionsarmen udsættes for kombinationen af diagnostik og den behandling, der forventes at virke, når biomarkøren viser en abnorm værdi. Speciallæger i klinisk biokemi og andre akademiske medarbejdere bør i samarbejde med klinikere kræve den rette kliniske evidens for indførelse af en ny biomarkør for at undgå alvorlig skade hos patienter.

Referencer

1. Statistical Guidance on Reporting Results from Studies Evaluating Diagnostic Test. FDA 2007.
2. 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.
3. 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.
4. Russwurm S, Wiederhold M, Oberhoffer M, Stonans I, Zipfel PF, Reinhart K. Molecular aspects and natural source of procalcitonin. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:789-97.
5. Nobre V, Harbarth S, Graf J-D, Rohner P, Pugin J. Use of procalcitonin to shorten antibiotic treatment duration in septic patients: a randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:498-505.
6. Schuetz P, Müller B, Stolz D, Tamm M, Bouadma L, Ce L, et al. Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;(9).
7. 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.
8. Müller B, Becker KL, Schächinger H, Rickenbacher PR, Huber PR, Zimmerli W, et al. Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit Care Med* 2000;28:977-83.
9. Gaiini S, Koldkjaer OG, Møller 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:R76.
10. 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.
11. Jensen JU, Hein L, Lundgren B, Bestle MH, Mohr TT, Andersen MH, et al. Procalcitonin-guided interventions against infections to increase early appropriate antibiotics and improve survival in the intensive care unit: a randomized trial. *Crit Care Med* 2011;39:2048-58.
12. Jensen J-US, Hein L, Lundgren B, Bestle MH, Mohr T, Andersen MH, et al. Kidney failure related to broad-spectrum antibiotics in critically ill patients: secondary end point results from a 1200 patient randomised trial. *BMJ Open* 2012 Jan;2:e000635.
13. Hochreiter M, Köhler T, Schweiger AM, Keck FS, Bein B, Von Spiegel T, et al. Procalcitonin to guide duration of antibiotic therapy in intensive care patients: a randomized prospective controlled trial. *Crit care* 2009;13:R83.
14. Stolz D, Smyrniotis N, Eggimann P, Pargger H, Thakkar N, Siegemund M, et al. Procalcitonin for reduced antibiotic exposure in ventilator-associated pneumonia: a randomised study. *Eur Respir J* 2009;34:1364-75.
15. Bouadma L, Luyt C-E, Tubach F, Cracco C, Alvarez A, Schwebel C, et al. Use of procalcitonin to reduce patients' exposure to antibiotics in intensive care units (PRORATA trial): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2010;375:463-74.

Invitation to the "The Arctic Experience 2014" Course in Scientific Writing and Publishing

January 28-31, 2014, Finse 1222, Norway

The Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation (SJCLI) and Nordic Society of Clinical Chemistry (NFKK) hereby invite colleagues from the Scandinavian countries to participate in an extensive course in scientific writing and publishing. The Editorial Board of SJCLI will be responsible for the program.

The aim of the course is to increase the awareness of the participants of the importance of scientific writing and to train them in writing a scientific manuscript.

The course will be organized in both structured lectures and in groups of participants writing a scientific manuscript based on given data and literature.

Finse is the southernmost part of Europe with an arctic climate located at 1222 meter above sea level and only accessible by train, from either Bergen or Oslo (www.finse1222.no and www.finse.com). This remote location has been selected in order to find the necessary calm and tranquility for maximal focus on the activities during the course as well as for team-building and network forming.

The course is open for Scandinavian/Nordic colleagues within the field of medical biochemistry/clinical biochemistry/clinical chemistry, primarily for those in postgraduate specialist training and/or involved in research projects.

The maximum numbers of participants is 16. The official language is English or a language understandable for all participants.

The travel expenses have to be paid by the participants/institutions while the registration fee, housing and meals are financed by NFKK and SJCLI.

Registration

Registration with description of scientific background and present position must be sent before October 31st 2013 to:

Tor-Arne Hagve

E-mail: tor.arne.hagve@ahus.no

Address: Medical Biochemistry, Division of Diagnostic and Technology, Akershus University Hospital, 1478 Lørenskog, Norway

Phone: +47-90510956.

Read more about Finse and the Arctic Experience in KBN

The Arctic Experiences 2008:

KBN nr 2, 2008 http://kbn.nfkk.org/kbn_2008_2/#/16/

The Arctic Experience 2010:

KBN nr 2, 2010 http://kbn.nfkk.org/kbn_2010_2/#/16/

The Arctic Experience 2012:

KBN nr 2, 2012 http://kbn.nfkk.org/kbn_2012_2/#/42/

Den skiløpende vitenskapskvinne-tilbake til utgangspunktet: KBN nr 2, 2012

http://kbn.nfkk.org/kbn_2012_2/#/56/



NORDFOND

– Medel för nordiska samarbetsprojekt 2013

Vad är fondens syfte?

Fondens syfte är att främja utveckling av klinisk kemi och andra laboratoriespecialiteter i Norden. Resultat som uppnåtts via projekt som stöds av fonden skall förmedlas till laboratorier i Norden, helst via *Klinisk Biokemi i Norden*.

Vem kan söka?

Medel kan sökas till projekt som uppfyller fondens syfte och som utförs i samarbete mellan minst två nordiska länder.

Vilka utgiftsposter kan täckas?

NORDFOND-medel skall i första hand täcka utgifter för mötesverksamhet, men kan i viss omfattning också täcka driftsutgifter och andra utgifter.

Vad skall ansökningen innehålla?

Ansökningen skall innehålla:

- En kort resumé
- Projektbeskrivning (max 5 sidor)
- Upplysning om deltagare och deras acceptans för deltagande
- Budget med upplysning om eventuell medfinansiering från andra källor

Hur mycket kan delas ut?

Under år 2013 kan fonden dela ut totalt ca 100 000 DKK.

Vem skall ha ansökningen?

Ansökningar skickas till ordförande i NFKK:

Ingunn Þorsteinsdóttir

Department of Clinical Biochemistry

Landspítali – University Hospital Hringbraut

IS-101 Reykjavík

E-mail: ingunnth@landspitali.is

Ansökningsfristen är 1 september 2013.

Vad lägger man vikten på vid behandling av ansökningar?

- Att det rör sig om ett projekt av god kvalitet.
- Att det är ett samarbete mellan flera nordiska länder.
- Att projektet har betydelse för klinisk kemi och/eller andra laboratorieområden.

När får man svar?

Ansökningarna behandlas av NFKK:s styrelse och svar sänds ut före 31 december 2013.

När skall pengarna användas?

Pengarna skall användas före 1 januari 2016. Eventuella resterande medel betalas tillbaka till NORDFOND.

När skall projektet rapporteras?

Projektet skall rapporteras till NFKK senast 1 januari 2016 och omfatta avslutade räkenskaper och en kort resumé om projektet, eventuellt i form av en artikel, tryckt eller insänd till *Klinisk Biokemi i Norden*.

Var kan man få ytterligare upplysningar?

Ytterligare upplysningar kan fås av styrelsemedlemmar i NFKK. Namn och adresser finns i *Klinisk Biokemi i Norden* eller på NFKK:s websida: www.nfkk.org



Foto: Henrik Alfthan.

En stærk kombination til måling af akutparametre

ABL90 FLEX

- 17 målte parametre, inklusive laktat og bilirubin
- Op til 30 prøver i timen
- Måler på kun 65 µl blod
- Prøveresultat på bare 35 sekunder
- 2 forbrugsvarer, minium vedligeholdelse
- Maksimal opetid - altid klar
- Fuld dataudveksling
- Fuld remote support



AQT90 FLEX

- Analyse af hjerte-, koagulations-, infektions- og graviditetsmarkører fra en enkelt prøve
- Op til 30 prøver i timen
- Overlegen analytisk præcision
- Automatiseret opblanding og måling
- Ingen kontakt med blod eller affald
- Fuld dataudveksling
- Fuld remote support

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

En fortælling om trekløverpeptider - slimhindens vogtere

Mie Hessellund Samson

Klinisk Biokemisk Afdeling, Regionshospitalet Randers, Randers

miesamso@rm.dk



Introduktion

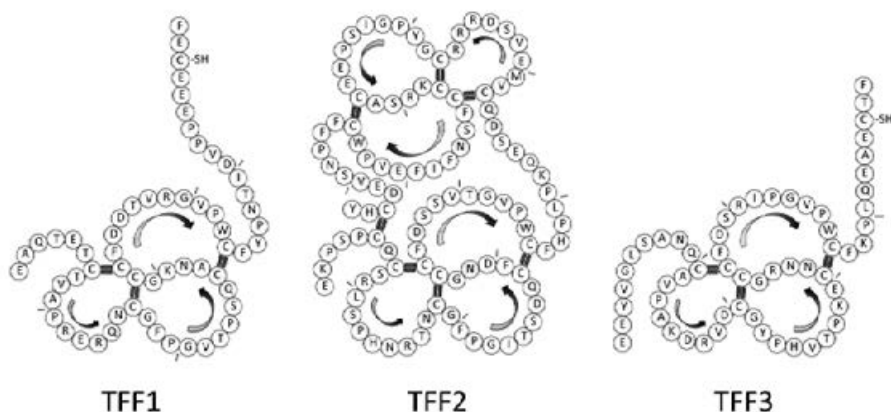
Trekløverpeptidernes eksistens har været kendt siden 1982, hvor det første peptid (TFF2) blev isoleret fra den porcine pancreas i forbindelse med insulinproduktionen på Novo Nordisk i Danmark. Siden er yderligere to peptider kommet til så familien nu, hos pattedyr, omfatter de tre peptider TFF1, TFF2 og TFF3. Peptiderne secernerer til slimhindeoverflader i hele kroppen og deres betydning for beskyttelse og heling af disse overflader er veletableret. Der er i de senere år vist en ændret forekomst af peptiderne ved en lang række både fysiologiske og patologiske tilstande, og disse opdagelser har ført til udvikling af flere immunologiske assays til kvantitering af peptiderne i både sekreter og blod. På baggrund af disse assays er der publiceret mange spændende resultater omhandlende peptidernes potentiale som biomarkører ved flere cancersygdomme og inflammatoriske tilstande. Et problem, der kun har modtaget ringe opmærksomhed, er imidlertid de store

variationer der er imellem de forskellige assays, hvilket vanskeliggør tolkningen af resultaterne.

Undertegnede har igennem et ph.d.-forløb med fokus på peptidernes forekomst i blod og sekreter i forbindelse med human reproduktion, blandt andet udviklet en metode til måling i sekreter og sammenlignet egne assays med kommercielt tilgængelige assays. Disse resultater samt en kritisk gennemgang af litteraturen vedrørende kvantitative målinger af trekløverpeptider er netop publiceret i SJCLI (1). Her bringes en kort gennemgang af egne resultater, de metodologiske problemstillinger og den eksisterende viden om trekløverpeptidernes forekomst og betydning.

Trekløverpeptider

Trekløverpeptider, på engelsk Trefoil Factor Family peptides, forkortet TFF, er små kompakte peptider på mellem 59 og 106 aminosyrers længde. De er opkaldt efter det 42 til 43 aminosyrer lange domæne der, via disulfidbroer danner 3 løkker og som man derfor oprindeligt forestillede sig som en trekløvelignende struktur (figur 1). De mindste peptider, TFF1 og TFF3



Figur 1: Skematisk tegning af de tre trekløverpeptider (TFF1, TFF2 og TFF3) visende primær struktur og position af disulfidbroer.

indeholder ét trekløverdomæne, mens TFF2 indeholder to. De to førstnævnte er til gengæld i stand til at danne dimere gennem en ekstra cystein nær den C-terminale ende. En grundig gennemgang af peptidernes struktur kan findes i (2).

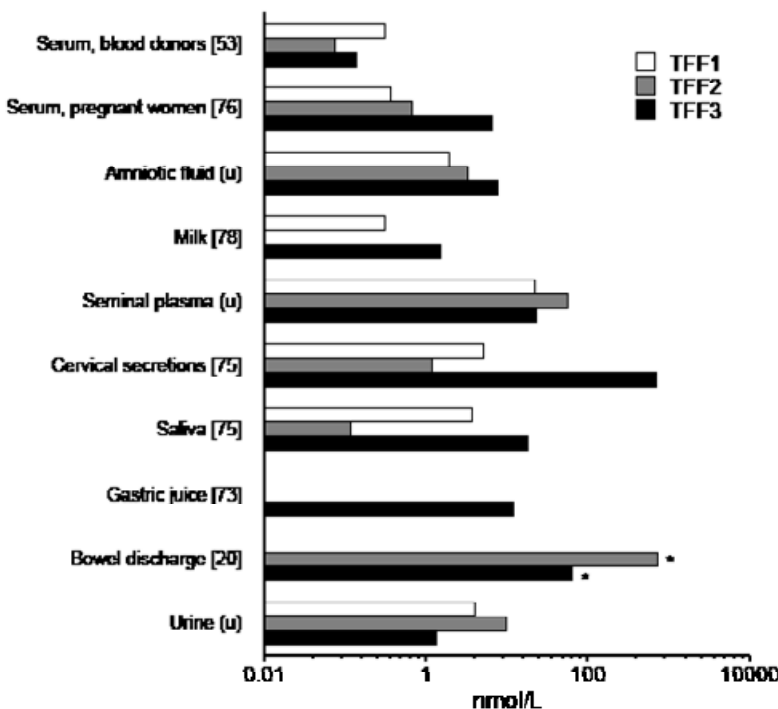
For en generel gennemgang af peptidernes biologiske produktion og funktion henvises til (3), men kort kan det siges, at TFF1 og TFF2 primært produceres i mavesækken, mens TFF3 produceres i bægerceller i den øvrige gastrointestinalkanal. Udenfor gastrointestinalkanalen er TFF3 det dominerende peptid, mens TFF1 og TFF2 er til stede i varierende grad. Peptiderne secernerer til slimhindeoverflader, og produktionen er til en vis grad reflekteret i deres forekomst i både sekreter og blod. Peptiderne er generelt opregulerede ved inflammatoriske tilstande og har muligvis en gavnlig effekt ved behandling af patienter med inflammatoriske tarmsygdomme (4,5). Der ses også en ændret ekspresion af peptiderne ved en lang række solide cancerformer, men deres potentiale som enten tumorsuppressorer eller onkogene er debatteret (6).

Hvordan peptiderne udøver deres funktion er til dels uafklaret. De er vist blandt andet at stimulere cellemigration, angiogenese, hæmme apoptose og være i stand til at ændre sekreters viskositet. Der er dog

endnu ikke klarhed over, hvorvidt peptiderne fungerer som vækstfaktorer gennem receptor-binding, mere mekanisk via interaktion med muciner eller gennem begge mekanismer.

Trekløverpeptider og human reproduktion

Da mit ph.d.-projekt tog form var ELISA-assays for alle tre peptider med tilhørende referenceintervaller i serum etablerede i vores laboratorium (7,8). Vores indledende målinger på serum fra gravide kvinder havde vist forhøjede niveauer af TFF2 og TFF3 og det var endvidere vist, at slimhinden i endocervix var produktionssted for betragtelige mængder TFF3 (9). Disse fund dannede basis for mine egne projekter. Det første viste op til 47 gange forhøjede niveauer af TFF3 i serum fra gravide kvinder (10). Efterfølgende målinger i navlestrengsblod og amnionvæske har ligeledes vist høje niveauer af TFF3, og der er udført immunhistokemi på føtalt væv, placenta og fosterhinder (11). Ingen af disse fund har dog kunnet forklare stigningen i materielle serumkoncentrationer. Peptidernes funktion under graviditeten er således fortsat uvis. En mulig hypotese er, at slimhinden i cervix uteri er kilden til de høje serum koncentrationer under graviditeten og der blev derfor, for at undersøge dette nærmere, udviklet



Figur 2: Mediane koncentrationer af TFF1, TFF2 og TFF3 i forskellige biologiske væsker fra raske individer. Serum, blood donors: N = 298 (TFF1) og N = 300 (TFF2 og TFF3); serum, pregnant women: N = 92; amniotic fluid (indsamlet fra gestationsuge 14 og frem): N = 13 (TFF1), N = 9 (TFF2) og N = 14 (TFF3); modermælk (indsamlet i første uge post partum): N = 32 (TFF1) og N = 37 (TFF3); seminal plasma (sæddonor): N = 4; cervical secretions: N = 18 (medianen af i alt 41 prøver fra 18 forskellige kvinder); saliva: N = 30; gastric juice: N = 14; bowel discharge (fra jejunostomi): N = 8; urine: N = 13; *middel-koncentrationer. Givet efter originalfigur i (1). Tallene i klammer henviser til referencerne som de er opgivet i originalpublikationen; (u) indikerer ikke tidligere publicerede data.

metoder til brug for målinger på cervixsekret. Metoderne er foreløbigt brugt til at beskrive forekomsten af trekløverpeptid i cervixsekret fra ikke-gravide kvinder, hvor der er vist et højt indhold af TFF3 samt en cyklisk variation i koncentrationerne af alle tre peptider (12). Fremtidige studier skal undersøge om peptiderne er af betydning for fertilitet.

Metodemæssige udfordringer

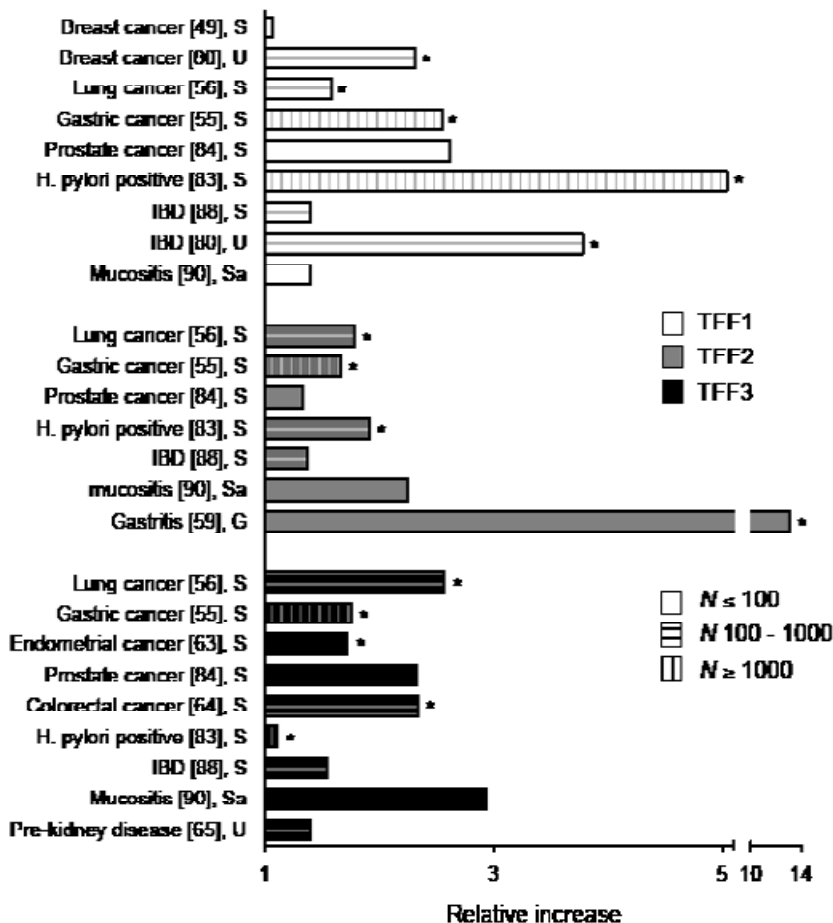
Metodemæssigt bød brugen af de oprindelige serum-assays til sekret-målinger på udfordringer. En validering viste acceptabel linearitet, imprecision og genfinding. De fleste prøver var desuden stærkt fortyndede og således med minimeret matrixpåvirkning. Men, peptiderne har vist sig at eksistere i adskillige molekylære former, og kompleksiteten er derfor stor. Vi ved endnu ikke, trods en overordnet god linearitet, i hvilket

omfang de forskellige former genkendes ekvimolært. Dette gælder i øvrigt også for serummålinger.

Derudover er en standardisering af prøvetagningen en særlig udfordring for sekreter og mulighederne for at kontrollere, om materialet er repræsentativt, er begrænsede.

Under mine studier blev et sæt kommercielle assays tilgængelige og vi valgte, ansporede af vores hidtidige blandede erfaringer, at sammenligne disse med vore egne. Sammenligningerne viste uventede forskelle (13). Igen må de forskellige molekylære former, som vi ikke ved om genkendes ens i forskellige assays, nok forventes at være en del af forklaringen.

Der eksisterer i dag ti immuno-assays for TFF1, seks for TFF2 og ni for TFF3 bedømt på publicerede arbejder. De fleste er in-house assays, kun tre er eller har været kommercielt tilgængelige, men at dømme efter



Figur 3: Relativ stigning i koncentrationerne af TFF1, TFF2 og TFF3 ved tilstande hvor der er påvist et ændret niveau af trekløverpeptid. N, det totale antal individer i undersøgelsen (cases plus kontroller); IBD, inflammatorisk tarmsygdom; S, serum; U, urin; Sa, spyt; G, mavesaft; *middel-koncentrationer; øvrige resultater er vist som stigning i mediane koncentrationer. Gengivet efter originalfigur i (1). Tallene i klammer henviser til referencerne som de er opgivet i originalpublikationen.

internettet er der langt flere på vej. Den relative værdi at disse assays er fortsat uvis. En videre udforskning af de forskellige molekylære former og deres genkendelse i immuno-assays er nødvendig for at sikre valide og sammenlignelige resultater.

Trekløverpeptidernes forekomst og betydning

Hvis man vil se mere generelt på trekløverpeptiderne, hvad ved vi så om forekomsten af peptiderne i blod og sekreter? Vi har med vore assays målt og påvist trekløverpeptider i en lang række forskellige biologiske væsker, herunder urin, sput, mave-, og tarmsaft, og resultaterne er nu publiceret samlet i (1) (figur 2). Det er selvsagt, på baggrund af de ovenfor beskrevne metodologiske vanskeligheder, svært at udtale sig om absolutte koncentrationer. Det synes dog sikkert at konkludere, at peptiderne er til stede i store mængder i de fleste sekreter samt i langt lavere koncentrationer i blod. Det er endvidere tydeligt, både vurderet på egne og andres målinger, at der er en meget stor inter-individual variation.

Som nævnt indledningsvis er der en ændret forekomst af peptiderne ved en lang række forskellige cancersygdomme og inflammatoriske tilstande, og der eksisterer en lang række studier, der beskriver

Forfatteren har gennemført sin ph.d.-uddannelse som en del af et kombineret ph.d.-hoveduddannelsesforløb i specialet klinisk biokemi under forskeruddannelsesprogrammet LabMed på Klinisk Biokemisk Afdeling ved Aarhus Universitetshospital med professor Ebba Nexø som hovedvejleder.

koncentrationer i specielt serum ved disse tilstande. Størst interesse har der været for bryst-, lunge og ventrikel-cancer. Et overblik kan også her findes i (1) (figur 3). Fælles for de fleste fund er, at de absolutte koncentrationsforskelle mellem kontroller og cases er beskedne, og dette, sammenholdt med den store inter-individuelle variation, er nok forklaringen på, at peptiderne endnu ikke har fundet en plads som biomarkører ved disse tilstande.

Konklusion

Vores arbejde med trekløverpeptiderne har primært omhandlet human reproduktion. Igennem det arbejde har vi bidraget til den samlede viden om trekløverpeptidernes forekomst og betydning, men lige så vigtigt er det fokus, vi forhåbentligt har været med til at sætte på



Foto: Henrik Alfthan.

de metodemæssige udfordringer. Trekloverpeptidernes fremtid som biomarkører er måske nok uafklaret, men der hersker ingen tvivl om at kvantitative målinger af peptiderne fortsat vil være et værdifuldt redskab i den videre udforskning af peptidernes biologiske funktion, og at det derfor er nødvendigt, at vi skaber valide assays og enes om en vis standardisering.

Peptiderne har gennem deres beskyttende og helings-fremmende effekt på slimhinder samt deres evne til at ændre sekreternes viskositet et enormt potentiale som terapeutiske mål ved praktisk taget enhver patologisk tilstand, der involverer slimhinder – fra mucositis til infertilitet. Forsat forskning inden for feltet må derfor siges at være både vigtig og vedkommende.

Referencer

1. Samson MH. Quantitative measurements of trefoil factor family peptides: possibilities and pitfalls. *Scand J Clin Lab Invest* 2013;73:193–202.
2. Thim L, May FEB. Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2956–73.
3. Kjelle S. The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:1350–69.
4. Mahmood A, Melley L, FitzGerald AJ, Ghosh S, Playford RJ. Trial of trefoil factor 3 enemas, in combination with oral 5-aminosalicylic acid, for the treatment of mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;21:1357–64.



Foto: Henrik Alfthan.

5. Peterson DE, Barker NP, Akhmadullina LI, Rodionova I, Sherman NZ, Davidenko IS, et al. Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled study of recombinant human intestinal trefoil factor oral spray for prevention of oral mucositis in patients with colorectal cancer who are receiving fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2009;27:4333–8.
6. May FEB. The potential of trefoil proteins as biomarkers in human cancer. *Biomark Med* 2012;6:301–4.
7. Vestergaard EM, Poulsen SS, Grønbaek H, Larsen R, Nielsen AM, Ejksjaer K, et al. Development and evaluation of an ELISA for human trefoil factor 3. *Clin Chem* 2002;48:1689–95.
8. Vestergaard EM, Brynskov J, Ejksjaer K, Clausen JT, Thim L, Nexø E, Poulsen SS. Immunoassays of human trefoil factors 1 and 2: measured on serum from patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Clin Lab Invest*;64:146–56.
9. Wiede A, Hinz M, Canzler E, Franke K, Quednow C, Hoffmann W. Synthesis and localization of the mucin-associated TFF-peptides in the human uterus. *Cell Tissue Res* 2001;303:109–15.
10. Samson MH, Vestergaard EM, Milman N, Poulsen SS, Nexø E. Circulating serum trefoil factors increase dramatically during pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest* 2008;68:369–74.
11. Samson MH, Poulsen SS, Obeid R, Herrmann W, Nexø E. Trefoil factor family peptides in the human foetus and at birth. *Eur J Clin Invest* 2011;41:785–92.
12. Samson MH, Chaiyarit P, Nortvig H, Vestergaard EM, Ernst E, Nexø E. Trefoil factor family peptides in human saliva and cyclical cervical mucus. Method evaluation and results on healthy individuals. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:861–8.
13. Samson MH, Nexø E. Validation of commercial assays for measurements of trefoil factor family peptides in serum. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:2057–60.

Increase efficiency

Inflammatory bowel disease (IBD) or irritable bowel syndrome (IBS)? Differentiate between IBD/IBS quickly and clearly with EliA Calprotectin – the first fully automated calprotectin stool test. High sensitivity, high specificity, and excellent predictive values deliver reliable results and provide early diagnostic guidance. Increase efficiency in autoimmune diagnostics:

EliA™ Calprotectin

COMPLETELY AUTOMATED

EliA™
Excellence in Autoimmunity

www.thermoscientific.com/phadia

Denmark
Tel: +45 70 23 33 06
info-dk.idd@thermofisher.com

Finland
Tel: +358 9 3291 0110
info-fi.idd@thermofisher.com

Norway
Tel: +47 216 732 80
no.idd@thermofisher.com

Sweden
Tel: +46 18 16 60 60
info-se.idd@thermofisher.com

En ny och enkel metod för att ta reda på om blodkoagulationen är aktiverad

Karin Strandberg och Johan Stenflo

Institutionen för Laboratoriemedicin Malmö, Lunds Universitet.

karin.strandberg@med.lu.se

För att kunna ta ställning till vilka patienter som löper risk att drabbas av venös trombos behövs metoder för att bestämma graden av aktivering av blodkoagulation och fibrinolys. Den metod som hittills varit mest använd för ändamålet är D-dimer. Ett problem med D-dimererna är att de inte är kemiskt definierade; de utgör en heterogen grupp av nedbrytningsprodukter av fibrin. Olika kommersiella metoder mäter olika saker, vilket i sin tur gör det svårt att jämföra resultat från olika laboratorier eftersom ingen gemensam standardpreparation finns att tillgå.

Förutom D-dimerer har man använt flera andra metoder i kliniska studier för att mäta graden av aktivering av blodkoagulationen. Ett exempel är fibrinopeptider, som emellertid inte fungerar bra då de har en hög renal clearance. Två andra metoder bestämmer koncentrationen av komplex mellan ett serinproteas och en serinproteashämmare (serpin), t.ex. mellan trombin och antitrombin (1). När ett serinproteas klyver en peptidbindning i ett protein bildas en ester mellan karboxylgruppen hos den aminosyra som blir C-terminal i den nya N-terminala peptiden och -OH gruppen i proteasets aktiva site. Normalt klyvs estern snabbt och substratet, en peptid eller ett protein, är kluvet. Men när klyvningen äger rum i ett serpin slungas det till serpinet bundna proteaset blixtnsnabbt ner till serpinets motsatta pol varvid det denatureras och blir inaktivt. Bindningen mellan proteaset och hämmaren förblir således okluven (Fig. 1). Men för varje komplex som bildas mellan trombin och antitrombin tycks mer än ett tusental antitrombinmolekyler klyvas och bli loopinsatta utan att något komplex bildas. Av kluvet antitrombin är ungefär en promille i komplex med enzymet medan resten är fritt, vilket gör det omöjligt att mäta komplexets koncentration med en monoklonal katcherantikropp mot antitrombin (2). Tyvärr går det inte heller med en katcherantikropp mot trombin då man aldrig lyckats få fram högaffina antikroppar mot trombin, vilka om det gått sannolikt ändå skulle vara oanvändbara på grund av korsreaktion med protrombin.

Ett principiellt annorlunda sätt att gå tillväga för att mäta graden av aktivering av blodkoagulationen är att bestämma den trombingenererande potentialen i blodet/plasman (3). Metoderna bygger på att man *in vitro* mäter förmågan att generera trombin i ett plasmaproov som respons på ett särskilt stimulus. Tidigare utfördes manuella mätningar av det trombin, som bildats genom att det fick klyva ett fluorescerande substrat i en mikrotiterplatta med efterföljande avläsning av fluorescensen. Nu finns det helautomatiserade system, vilket gör metoden användbar även som ett akut test i klinisk rutin.



Karin Strandberg (i hatt, t v) och Johan Stenflo (i hatt, t h) i samband med den förras disputation 2001.

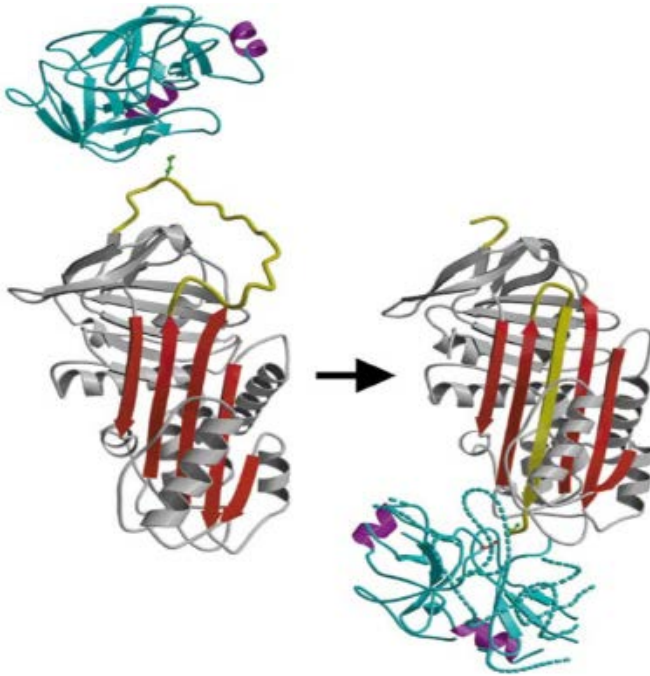


Fig. 1. Figuren visar hur komplexbildningen mellan ett serinproteas och en serinproteashämmare, ett så kallat serpin, går till, t.ex. mellan trombin och antitrombin, som i figuren, eller mellan aktivt Protein C (APC) och protein C hämmaren (PCI). I den vänstra delen av figuren ser vi proteaset överst, blått, och serpinet därunder, rött. Mitt på den gula loopen hos serpinet ser vi den aminosyra vid vilken klyvningen ska ske, arginin, som pekar upp mot enzymet. Vid klyvningen bildas en kovalent bindning mellan hydroxygruppen i enzymets aktiva site och karboxylgruppen i serpinets arginin, vid vilken klyvningen ska ske. Vid normal proteolys klyvs bindningen av en $-OH$ med följd att det bildats ett kluvet substrat och ett fritt enzym. Vid reaktionen mellan proteaset och serpinet hinner inte bindningen mellan aktiva siten i enzymet och karboxylgruppen i den arginin i serpinet, vid vilken klyvningen sker, klyvas innan enzymet kastas ned till den motsatta polen av serpinet. Härvid denatureras enzymet så att bindningen mellan enzym och hämmare inte kan klyvas. Det har alltså bildats ett kovalent komplex mellan serpinet och det nu inaktiverade enzymet. I den högra delen av figuren ser vi hur den klivna, gula loopen i serpinet nu är insatt i den röda, så kallade betapleated sheeten, medan det denaturerade enzymet är längst ner. I stället för en kliven peptidbindning i ett substrat och ett fritt enzym har det i stället blivit ett kovalent komplex mellan substratet/hämmaren och det nu inaktiverade enzymet¹.

Protein C

För drygt 10 år sedan tog vi fram en både enkel och känslig metod för att mäta graden av aktivering av blodkoagulationen, med målsättningen att den skulle vara möjlig att automatisera och därmed kunna införas i klinisk rutindiagnostik. Då var det naturligt att Protein C systemet kom i fokus för intresset; Protein C var ju "fött" i Malmö (4, 5).

Protein C och dess funktion är beskriven i en tidigare artikel, varför det här räcker med att påpeka att Protein C är ett K-vitaminberoende protein, som strukturellt liknar de K-vitaminberoende koagulationsfaktorerna VII, IX och X (4). Liksom dessa är Protein C ett proenzym till ett serinproteas, men med en extremt snäv specificitet. Av zymogenet, Protein C, har vi ungefär 4 mg/L plasma, medan vi endast har cirka 1 µg/L plasma aktivt Protein C (APC) (6). Vi vet också sedan länge att vi inte kan leva utan detta mikrogram APC – utan det dör vi av trombotisk obliterering av vensystemet inom en halvtimme. Det förekommer vid den mycket ovanliga homozygota formen av Protein C brist, men även vid särskilt allvarliga former av sepsis på grund av att Protein C har förbrukats, eller därför att Protein C inte kan aktiveras på grund av endotelskador (7, 8).

I kapillärsystemet binds Protein C till ett membranprotein, den endoteliala Protein C receptorn, och aktiveras av trombin, som är bundet till en annan receptor, trombomodulin (TM) (9). Bindningen till TM gör att trombinet inte kan klyva fibrinogen men väl aktivera Protein C. Trombinet har alltså omvandlats från att ha varit ett prokoagulant enzym till att bli ett antikoagulant enzym. Gemensamt gör de båda receptorerna att den trombin-medierade aktiveringen av Protein C går cirka 20 000 gånger snabbare än vad som varit fallet om proteinerna inte varit bundna till respektive receptor (9).

APC, som är bundet till fosfolipid, klyver tre peptidbindningar i faktor Va (Arg 306, Arg 506 och Arg 679). Klyvningen vid Arg 306 är långsam och helt beroende av närvaro av fosfolipid och av den K-vitaminberoende kofaktorn, Protein S. Inaktiveringen av faktor VIIIa är mer komplicerad och inte bara beroende av Protein S som kofaktor utan även av icke aktiverad Faktor V. Klyvningen av Faktorerna Va och VIIIa leder till en minskad aktivering av såväl faktor X som protrombin och därmed till en nedreglering av blodkoagulationen. (7, 8).



Reduce unnecessary radiation a
New guidelines recommend S100 in the
head injuries





and admissions

the evaluation of mild/moderate

cobas[®]

Life needs answers

En metod för att förutse vilka patienter som löper risk att få venös trombos är den, av Björn Dahlbäck och medarbetare upptäckta resistensen mot aktivt Protein C (APC-resistens) (10). Orsaken till resistensen är att Arg 506 i faktor V är muterad till Gln, varför APC inte kan klyva bindningen. Nedregleringen av blodkoagulationen går därigenom långsammare än normalt, med åtföljande ökad risk att drabbas av venös trombos. APC-resistens går också under namnet Factor V Leiden. Det bör dessutom framhållas att APC har livsviktiga antiinflammatoriska egenskaper. Den som vill veta mer om APC-resistensen och om hur Protein C-systemet fungerar rekommenderas att läsa någon av Björn Dahlbäck's översiktsartiklar (7, 8).

Hos en stor andel av de patienter som drabbas av venös trombos hittar man ingen ärftlig trombofili. En del av dessa patienter kan till och med ha en högre grad av aktivering av blodkoagulationen än flertalet av de patienter som har APC-resistens (Fig. 2). Aktiveringen kan vara orsakad av förvärvade riskfaktorer, såsom cancer eller infektion. En funktionell metod för att fastställa graden av hyperkoagulabilitet skulle kunna vara värdefull i detta sammanhang. Närmast till hands borde vara att bestämma plasmakoncentrationen av APC med hjälp av ett kromogent substrat. Det har emellertid visade sig vara svårt, på gränsen till omöjligt, då plasmakoncentrationen av APC är så låg, knappt 1 mg/L. Upp till ett dygns inkubering med det kromogena substratet kunde krävas innan en avläsning var möjlig (6).

En unik monoklonal antikropp

Eftersom det i praktiken är omöjligt att mäta APC-koncentrationen i plasma kunde ett alternativ vara att mäta koncentrationen av komplexet mellan APC och Protein C-hämmaren, APC-PCI-komplexet. PCI är liksom antitrombin och antitrypsin ett serpin och dess koncentration är cirka 4 mg/L. Komplexet mellan APC och PCI har dessutom samma halveringstid i plasma som APC, cirka 20 minuter, och dess koncentration är ungefär 0,2 µg/L plasma. Eftersom PCI koncentrationen i plasma är mer än tiotusen gånger högre än APC koncentration, och dessutom stabil, så speglas APC koncentrationen av APC-PCI komplexets koncentration. APC-PCI koncentrationen blir således ett mått på blodkoagulationens aktivering. För att kunna mäta APC-PCI koncentrationen behövde vi en monoklonal antikropp mot Protein C/APC och en mot PCI.

Men hur kan APC och PCI stöta på varandra i plasma, i en miljö där de rör sig i tre dimensioner i en miljö som dessutom har en proteinkoncentration på ungefär 60 g/L plasma? Om vi går tillbaka till t.ex. aktiv faktor X och protrombin så såg vi att de, tack vare de K-vitaminberoende karboxyleringarna, rör sig i två dimensioner på ytan av skadade celler eller aktiverade trombocyter. Koagulationen har blivit tvådimensionell, men om vi behandlar patienter med warfarin så minskar affiniteten för fosfolipiden och koagulationen blir mer och mer tredimensionell och hämmas då molekylerna inte stöter på varandra. Om vi nu går över till heparin så ser vi att dimensionliteten har reducerats

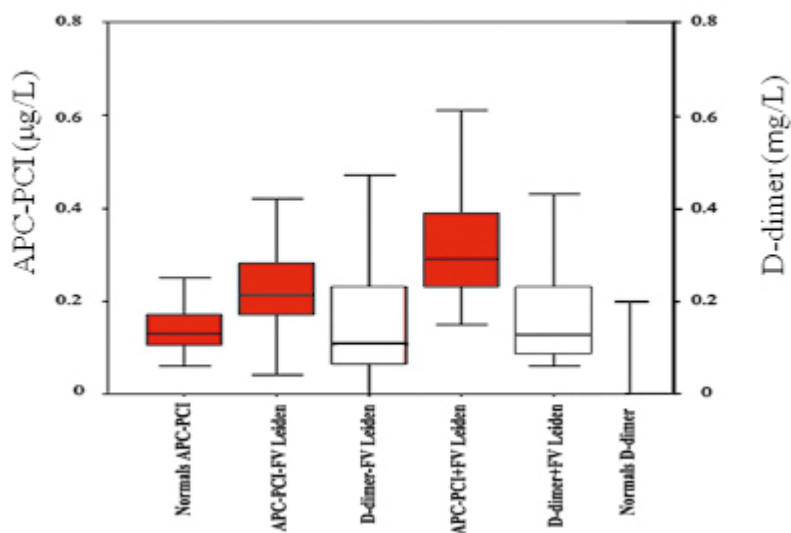


Fig. 2. APC-PCI koncentrationen (röda boxar) hos 80 friska personer (vänster box) och hos patienter som haft en venös trombos. Patienterna i den mellersta av de röda boxarna har inte Faktor V Leiden medan de i den högra röda boxen har Faktor V Leiden. De två ofärgade boxarna visar D-dimerkoncentrationen.

ytterligare ett steg. Både APC och PCI har affinitet för heparin, vilket gör att de träffar på varandra så att APC-PCI-komplexet kan bildas (Fig. 3; 11).

Men hur kunde det vara möjligt att mäta APC-PCI-koncentrationen med en metod baserad på två monoklonala antikroppar? Såväl zymogenet till APC, Protein C, som fritt PCI har ju mer än tiotusen gånger högre plasmakoncentration än APC-PCI-komplexet (2), alltså samma problem som med trombin-antitrombinkomplexet. Om vi t.ex. tar en anti-PCI-monoklonal antikropp som catcher och förutsätter att den har samma affinitet för fritt, icke kluvet, PCI som för PCI i komplex med APC så skulle mindre än en tiondel promille av det PCI som bands till monoklonalen utgöras av APC-PCI-komplex. Resten vore fritt, icke kluvet PCI. Lika illa skulle det gå med en monoklonal mot Protein C som catcher. Men det gick att ta fram en metod för att mäta APC-PCI-komplexet, dessutom en extremt känslig metod.

Eftersom vi visste hur serinproteashämmare, som PCI, fungerar hade vi en chans. Vi insåg att det borde vara möjligt att ta fram en catcherantikropp mot PCI som *endast* kände igen PCI i komplex med APC (12). Som vi redan beskrivit ovan för trombin och antitrombin bildas vid hämningen av proteaset ett kovalent komplex mellan proteaset och serpinet. Man borde kunna göra en monoklonal antikropp vars epitop var belägen på och omkring den insatta peptidkedjan (gul i Fig. 1). En sådan monoklonal skulle inte ha någon affinitet för fritt, icke kluvet PCI. Orsaken till att det borde fungera var att det, till skillnad från hur det förhöll sig med antitrombin, inte finns ett stort molärt överskott av fri/kluven, hämmare som är loopinsatt.

Var är epitopen för monoklonalen?

Nästa fråga att lösa var att försöka ta reda på var i den insatta peptidkedja som epitopen för monoklonalen M36 var belägen. När man immuniserar möss med ett kluvet serpin, t.ex. PCI, bildas ett mycket stort antal antikroppar mot epitoper belägna i olika delar av molekylen. För oss gällde det att hitta de monoklonaler som hade hög affinitet för loopinsatt PCI men ingen affinitet för den inte loopinsatta formen (Fig. 1). Epitopen för dessa monoklonaler måste vara belägen i den insatta gula loopen. För att hitta antikropparna med de önskade egenskaperna märkte vi loopinsatt PCI med ¹²⁵I. Det märkta, loopinsatta PCI sattes till en lösning som hade ett stort överskott av omärkt, icke loopinsatt PCI. Det gjorde att vi *endast* skulle finna de

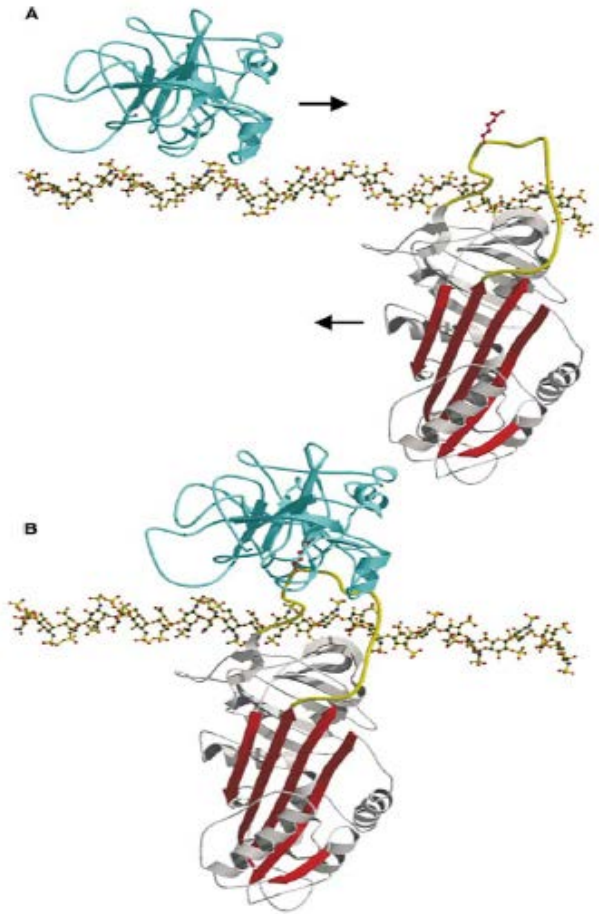


Fig. 3. Heparinmedierad inaktivering av APC. (A) APC överst (blått) och PCI underst (huvudsakligen rött) rör sig, tack vare affiniteten för heparin (gult) mot varandra. (B) När de möts bildas ett komplex och APC slungas ner till under PCI och denatureras som visas i Fig. 12.

monoklonaler som var specifika för den loopinsatta, ¹²⁵I märkta formen, och inte det sannolikt jättelika överskott av monoklonaler, som band både loopinsatt och icke loopinsatt PCI. Vi hittade några och den vi använde som catcher gav vi namnet M36 (12).

En gemensam egenskap hos serpinerna är att de, liksom andra proteiner, är metastabila – sätter man till guanidinhydroklorid, så denatureras serpinet när koncentrationen nått 2 till 3M, så även PCI. Om vi gör samma försök med loopinsatt PCI så denatureras det inte ens vid maximal guanidinhydrokoridkoncentration, d.v.s. 6M (Fig. 4). Loopinsatta serpiner är således exceptionellt stabila (12).

Men man kan göra serpinet stabilt utan att klyva det med ett proteas. Man kan till exempel syntetisera peptiden P1 till P14 och försöka sätta in den i PCI. Hundra gångers molärt överskott av peptiden kan inkuberas med PCI vid 37° C över natt. Om alfaaminogruppen i peptidens aminoterminala aminosyra är acetylerad så blir peptiden inkorporerad i en "pleated sheet", som visas i Fig. 1 och 4. Men om man gör om försöket och sätter till samma överskott av peptiden, men nu utan att först ha acetylerat alfaaminogruppen, så blir inte peptiden insatt i "pleated sheeten". Acetyleringen av den aminoterminala aminosyran får den syntetiska peptiden att likna den peptid som normalt sätts in i betasheeten när hämmaren klyvs och bildar komplex med ett proteas (Se högra delen av Fig. 1 och Fig. 5).

Om vi tittar på Fig. 5 så ser vi vad som händer om vi byter ut t.ex. aminosyra P6, P9 eller P13 i peptiden vi satt in i humant PCI. De tre aminosyrornas sidokedjor pekar utåt, vilket är en förutsättning för att peptiden ska sättas in. Om vi byter ut aminosyrorna P6 och P9 påverkas inte bindningen till den monoklonala antikroppen nämnvärt. Om vi däremot byter ut Arg i position P13 till Thr minskar bindningen av antikroppen kraftigt, vilket visar att epitopen för antikroppen är belägen i anslutning till P13 (12) (Fig. 5).

Den nya analysen

Nu kunde vi göra en sandwichanalys för att mäta APC-PCI-komplexets plasmakoncentration. Som catcher-antikropp hade vi förstås vår anti-PCI monoklonal M36, som var specifik för den loopinsatta formen av PCI, medan vår reporterantikropp var mot Protein C, HPC4. Vi fastnade för att använda den så kallade

DELFLIA-metoden, som utvecklats av det finländska företaget Wallac (13).

Vi använde streptavidinklädda mikrotiterplattor tillsammans med vår biotinylerade catcherantikropp (M36), den som är specifik för loopinsatt PCI. Efter att proven tillsatts och inkubationen pågått i en timme sköljdes plattan och vår Eu³⁺ märkta reporterantikropp mot protein C (HPC4) tillsattes. Efter ytterligare en inkubering och sköljning avlästes fluorescensen. Wallacs metod är unik och bygger på mätning av fluorescensen från Eu³⁺ märkta reporterantikroppar. En millisekund efter excitationen mäts fluorescensen. Fördelen med det är att i stort sett all bakgrundsfluorescens då redan har klingat av. Ett tecken på att metoden skulle fungera bra var att standardkurvan, tack vare de två antikropparnas höga affinitet för loopinsatt PCI respektive Protein C, var helt linjär (13).

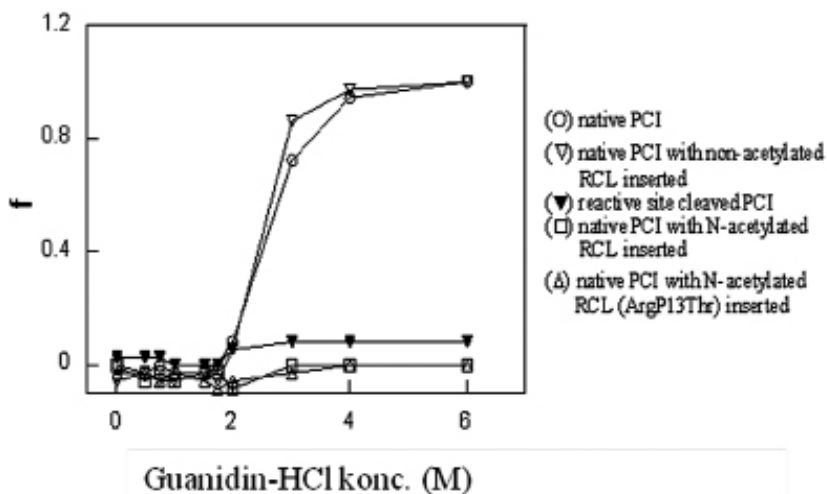
Metoden visar sig vara exceptionellt känslig

Att APC-PCI-metoden är exceptionellt känslig visade sig när vi börja använda den för att undersöka om blodkoagulationen är aktiverad hos patienter med aortaaneurysm.

Aneurysm är ett påtagligt kliniskt problem då cirka fyra procent av män som är 65 år gamla eller äldre har aortaaneurysm. Det är allvarligt då ruptur av aortaaneurysm är en vanlig orsak till plötslig död hos denna grupp. Hos kvinnor är aortaaneurysm långt mindre vanligt.

Den etablerade metoden för att upptäcka aortaaneurysm är att använda ultraljud. Metoden började användas i Lund redan på femtiotalet. Fysiologen Inge

Fig. 4. Denaturering av PCI som en funktion av koncentrationen av guanidinhydroklorid. Denatureringen är mätt som fluorescensemission. Av figuren framgår att nativt PC denatureras vid 2-3 M guanidinhydroklorid liksom PCI som inkuberats med icke N-acetylerad peptid medan kluvet PCI liksom PCI inkuberat med N-acetylerad aminoterminal aminosyra liksom PCI inkuberat N-acetylerad aminoterminal aminosyra med Arg P13 muterad till Thr³.



Edler och fysikern Hellmuth Hertz fick en idé när de besökte Kockums skeppsvarv i Malmö. De såg där hur man använde ultraljud för att upptäcka defekter i svetsfogar. Det dröjde inte länge innan de kunde visa att ultraljud också kunde användas i medicinsk diagnostik, t.ex. för att upptäcka aortaaneurysm (14). På sina håll används metoden i stora populationsstudier för att identifiera de patienter som har aneurysm. Man kan sedan bedöma om risken för att aneurysmet ska rupturera är stor, i vilket fall patienten opereras.

Aortaaneurysm orsakar en lokal turbulens i blodflödet, vilket gör att nästan alla aneurysm är fyllda av trombmassor. På ytan av trombmassorna, som inte är täckta av endotelceller, pågår en ständig aktivering av blodkoagulationen. Det borde leda till att även Protein C systemet är aktiverat.

För att ta reda på om det förhöll sig så inledde vi ett samarbete med kolleger vid kärnkirurgiska kliniken i Malmö (15). Det visade sig genast att patienter med aortaaneurysm hade högre APC-PCI-koncentration än de som inte hade aneurysm (15-17). Koncentrationen var långt högre än hos de patienter som hade venös trombos (Fig. 6). Kanske borde populationsstudier ämnade att upptäcka aortaaneurysm börja med att man mätte APC-PCI-koncentrationen. Det borde minska kostnaderna och göra det möjligt att undersöka mångdubbelt fler patienter än om man bara använder ultraljud (14-16).

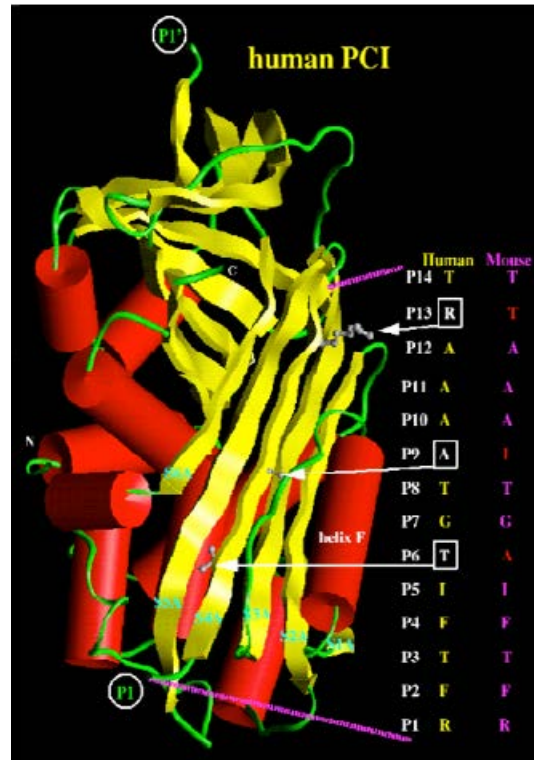


Fig. 5. Schematisk modell av Protein C hämmaren, PCI. Bilden visar hämmaren med insatt loop. Det till P1 (längst ner i bilden) kopplade proteaset är inte med på bilden. Till höger visas loopens sekvens, såväl den humana sekvensen som sekvensen hos en mus. De tre aminosyror som skiljer sig är P6, P9 och P13³.

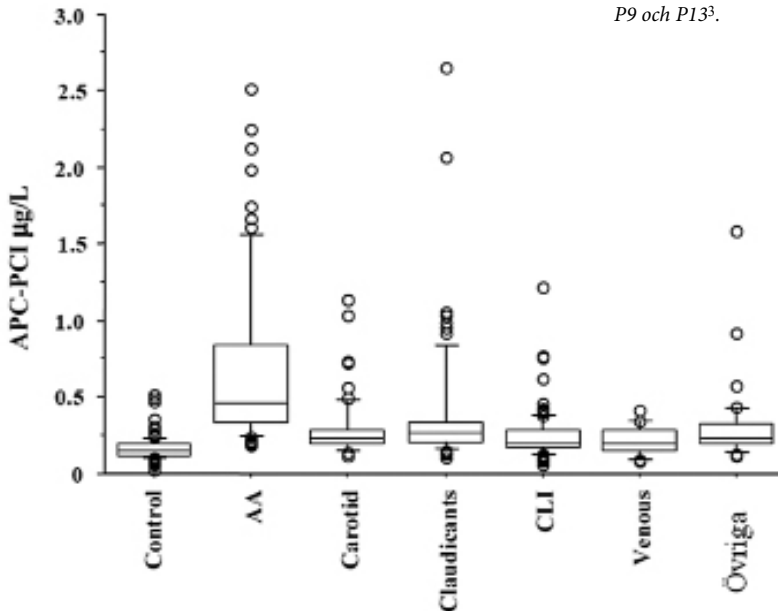


Fig. 6. APC-PCI-koncentrationen hos, från vänster, en kontrollgrupp, patienter med aortaaneurysm, carotissjukdom, claudikatio, venös trombos och slutligen övriga patienter.

Fig. 7. APC-PCI-koncentrationen mätt under en menstruationscykel och vid behandling med två olika sorters p-piller. LNG/EE=30 mg etinylöstradiol och 150 mikrogram levonorgestrel, DG/EE=30 mikrogram etinylöstradiol och 150 mikrogram desogestrel.

Positivt överraskade av resultaten av undersökningen av patienter med aortaaneurysm beslutade vi oss för att ta ännu ett steg. Det är känt sedan sextio-talet att kvinnor som behandlas med p-piller löper en något större risk att drabbas av venös trombos än de kvinnor som inte tar piller (18). Vi började därför mäta APC-PCI-koncentrationen hos kvinnor som tog p-piller (Fig. 7).

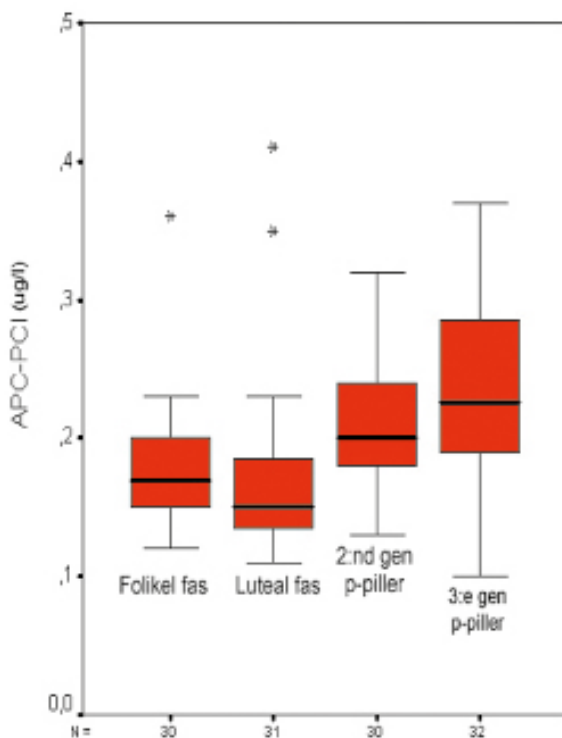
En grupp kvinnor behandlades under en menstruationscykel med två olika sorters p-piller, dels med 30 mikrogram etinylöstradiol och 150 mikrogram levonorgestrel. En andra grupp behandlades med 30 mikrogram etinylöstradiol och 150 mikrogram desogestrel (19). Det är känt att kvinnor som behandlas med desogestrel löper en något högre risk att drabbas av venös trombos än de som tar levonorgestrel. Det visade sig då att den grupp kvinnor som behandlats med desogestrel hade en signifikant högre koncentration av APC-PCI-komplexet än den grupp som behandlats med levonorgestrel (Fig. 7). Desogestrel tycks alltså aktivera blodkoagulationen i högre grad än levonorgestrel. Kanske kan APC-PCI-metoden användas för att identifiera de kvinnor som löper störst risk att få venös trombos av p-piller.

Vad ska man använda APC-PCI-metoden till?

Att APC-PCI-metodens känslighet är exceptionell är



Foto: Henrik Alfthan.



klart, liksom att komplexet är en väldefinierad analyt, vilket möjliggör standardisering. Vi har kunnat visa att metoden skiljer friska från sjuka individer vid flera olika sjukdomstillstånd där koagulationen är aktiverad. I vissa av våra studier har symptomduration hos patienterna varit en faktor som påverkat utfallet, sannolikt till följd av den korta halveringstiden hos APC-PCI-komplexet. Svårigheten med denna och liknande biomarkörer är att de mäter aktiveringsgraden vid tidpunkten för eller strax före provtagningen. För att optimera det prediktiva värdet av en sådan analys kan bestämningen behöva upprepas, vilket kan begränsa användbarheten. Man kan också tänka sig att analysen används som ett komplement till D-dimer vid tex misstänkt DIC. För det talar att metodens specificitet är klart högre än D-dimerer även om sensitiviteten är lägre. Frågan är om man med hjälp av metoden kan göra bättre förutsägelser om sjukdomsutveckling, vilket positivt skulle kunna påverka behandlingen av patienten (20-23).

Behovet av att kunna följa koagulationsaktivering är stort, inte minst i kliniska studier då man vill utvärdera behandlingseffekt eller bedöma risk för insjuknande i venös eller arteriell tromboembolism.

IDS iSYS Menu

Calcitropic Hormones

25-Hydroxy Vitamin D
1,25-Dihydroxy Vitamin D
Intact PTH
Bioactive PTH (1-34)

Bone Turnover

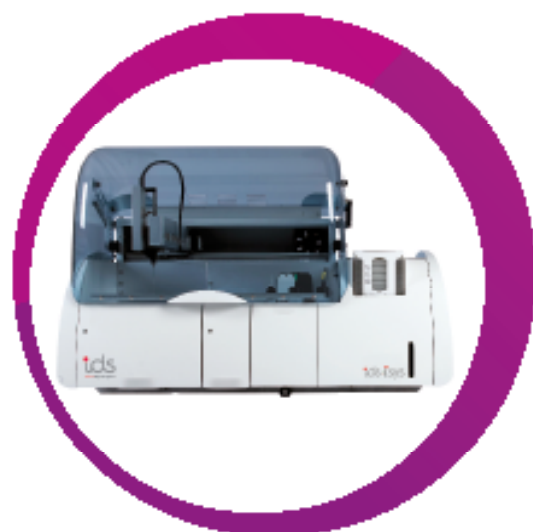
Intact PINP
N-MID[®] Osteocalcin
Ostase[™] BAP
CTX-I (CrossLaps[®])
TRAcP 5b[®] (BoneTRAP[®])

Growth Disorders

hGH
IGF-I
IGFBP-3

Hypertension

Aldosterone
Renin



Immundiagnostik Systems Nordic A/S (IDS Nordic)
International House, Center Boulevard 5, 2300 København S, Denmark
Tel: + 45 44 61 0291 Email: info.nordic@idsplc.com Homepage: www.idsplc.com

• **Master Development.**
• **Diapas** is a registered trademark of **Hydrex** Incorporated, a subsidiary of **Beckman Coulter, Inc.**

IDS- iSYS – Our fully Automated Speciality Analyzer

Referenser

1. Hillarp A, Dahlbäck B, Strandberg K. Lauerells Klinisk kemi i praktisk medicin 2012. Koagulationsrubbingar; 181-209. Redaktion Nilsson-Ehle P, Berggren-Söderlund M, Theodorsson E.
2. Kjellberg M, Ikonomidou T, Stenflo J. The cleaved and latent forms of antithrombin are normal constituents of blood plasma: a quantitative method to measure cleaved antithrombin. *J Thromb Haemost* 2006;4:168-76.
3. Hemker CH. Thrombin generation in whole blood. *Br J Haematol* 2008;141:895-908.
4. Stenflo J. A new vitamin K-dependent protein. *J Biol Chem* 1976;251:355-63.
5. Stenflo J. En resa med Protein C – ett nytt K-vitaminberoende protein. *Klinisk Biokemi i Norden* 2012;25:32-40.
6. Gruber A, Griffin JH. Direct detection of activated Protein C in blood from human subjects. *Blood* 1992;79:2340-8.
7. Dahlbäck B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood*. 2008; 112: 19-27.
8. Dahlbäck B, Villoutreix BO. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett* 2005;579:3310-6.
9. Esmon CT, Owen WG. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of Protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:2249-53.
10. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1004-8.
11. Huntington J, Kjellberg M, Stenflo J. Crystal structure of Protein C inhibitor provides insight into hormone binding and heparin activation. *Structure* 2003;11:205-15.
12. Strandberg K, Kjellberg M, Erb E-M, Persson U, Mosher DF, Villoutreix BO, Stenflo J. Activated Protein C-Protein C Inhibitor complex formation: characterization of a neopeptide provides evidence for extensive insertion of the reactive center loop. *Biochemistry* 2000;39:15713-20.
13. Strandberg K, Kjellberg M, Knebel R, Lilja H, Stenflo J. A sensitive immunochemical assay for measuring the concentration of the activated Protein C-Protein C inhibitor complex in plasma. *Thromb Haemost* 2001;86:604-10.
14. Edler I, Hertz CH. The early work of ultrasound in medicine at the University of Lund. *J Clin Ultrasound* 1977;5:352-6.
15. Kölbel T, Strandberg K, Mattiasson I, Stenflo J, Lindblad B. Activated Protein C-Protein C inhibitor complex: A new biological marker for aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2006;43:935-9.
16. Stenflo J, Kjellberg M, Strandberg K, Svensson PJ, Kölbel T, Lindblad B. The complex between activated Protein C and Protein C inhibitor: A clinically useful indicator of aortic aneurysms? *Blood Cells Mol Dis* 2006;36:118-21.
17. Kölbel T, Strandberg K, Donath T, Mattiasson I, Stenflo J, Lindblad B. Activated Protein C-Protein C inhibitor complex in patients with abdominal aortic aneurysms: Is it associated with diameter and growth rate? *Vasc Endovascular Surg* 2008;42:135-40.
18. Van Vlijmen EF, Brouwer JL, Veeger NJ, Eskes TK, De Graeff PA, Van der Meer J. Oral contraceptives and the absolute risk of venous thromboembolism in women with

Fotnoter

- ¹ Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 407;2000;923-6.
- ² Huntington J, Kjellberg M, Stenflo J. Crystal structure of Protein C inhibitor provides insight into hormone binding and heparin activation. *Structure* 2003;11:205-15.
- ³ Strandberg K, Kjellberg M, Erb E-M, Persson U, Mosher D, Villoutreix BO, Stenflo J. Activated Protein C-Protein C inhibitor complex formation: Characterization of a neopeptide provides evidence for extensive insertion of the reactive center loop. *Biochemistry* 2000;39:15713-29.

single or multiple thromboembolic defects: results from a retrospective family cohort study. *Arch Intern Med* 2007;167:282-9.

19. Bremme K, Hamad RR, Berg E, Strandberg K, Stenflo. The APC-PCI concentration as an early marker of activation of blood coagulation. A study of women on combined oral contraceptives. *Thromb Res* 2012;4:636-9.
20. Elf J, Strandberg K, Svensson P. The diagnostic performance of the APC-PCI complex compared to D-dimer in the diagnosis of deep vein thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 2010;45:465-70.
21. Strandberg K, Astermark J, Björgell O, Becker C, Nilsson PE, Stenflo J. Complexes between activated Protein C and Protein C inhibitor measured with a new method.

Comparison of performance with other markers of hypercoagulability in the diagnosis of deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 2001;86:1400-8.

22. Strandberg K, Stenflo J, Nilsson C, Svensson PJ. APC-PCI complex concentration is higher in patients with previous thromboembolism with Factor V Leiden. *J Thromb and Haemost* 2005;3:2578-601.
23. Strandberg K, Svensson PJ, Ohlin A-K. Venous thromboembolism in carriers of the Factor V Leiden mutation and in patients without known thrombophilic risk factor; prediction of recurrence and of APC-PCI complex concentration and/or soluble thrombomodulin antigen and activity. *Thromb Res* 2007;121:145-51.

Helsingpriset 2012 till Steen Stender

Per Simonsson

Priset till minne av Kristoffer Helsing för årets artikel 2012 går till Steen Stender, Gentofte, för hans fängslande berättelse i nummer 2 om livet och arbetet på resande fot ute i den internationella diplomatin.

Steen är en kontroversiell läkare och forskare. Hans vetenskapliga arbete har inte bara skapat ny kunskap. Han har också tagit ut klinisk kemi på den politiska och juridiska arenan och kämpat mot de förr så ofta tillsatta transfettsyrorna, som livsmedelindustrin har nyttjat för att förlänga hållbarhet på massproducerad kost.

Det är en spännande färd i forna Sovjets värld som Steen beskriver, med nervkittlande förhör i KGB:s gamla lokaler, intrikat fetttsyraanalys, TV-intervjuer,



fördömelse och upprättelse. Kemi möter politik. Något för John le Carré att inspireras av, om han nu är flitig läsare av *Klinisk Biokemi i Norden*.

Kan du inte finna gamla nummer av KBN på ditt skrivbord så går det utmärkt att söka och läsa dem på hemsidan www.nfkk.org.

Steen Stender får ett konstverk som pris, som skall inspireras till att skriva ännu några arbeten för KBN.

Doktorgradsavhandling: Diagnosing and monitoring the porphyrias

Aasne K. Aarsand

Institutt for Samfunnsmedisinske Fag, Universitetet i Bergen og Laboratorium
for Klinisk Biokjemi, Haukeland Universitetssykehus, Bergen
aasne.aarsand@helse-bergen.no



Porphyrias are a heterogeneous group of rare, mainly inherited metabolic disorders characterised by excessive production and excretion of haem precursors, that are caused by abnormal function of the enzymes in the haem biosynthetic pathway (Table 1) (1). In symptomatic patients, the diagnoses depend on the identification of specific patterns of increased haem precursors in urine, faeces and blood (2). The accuracy of the diagnoses thus directly influences the quality of patient care. Notwithstanding, many studies concerning porphyria diagnostics are mainly descriptive in their approach, and high-quality diagnostic performance data is scarce. In most European countries, the full range of porphyria diagnostics is performed by specialised laboratories (3). The overall aim of this thesis was to increase the knowledge on the diagnostic and monitoring performance of porphyria-related markers and on the diagnostic efficiency of European specialist porphyria laboratories.

The use of urinary δ -aminolevulinic acid (ALA) and porphobilinogen (PBG) for monitoring patients with acute intermittent porphyria

Acute intermittent porphyria (AIP) is characterised by life-threatening acute attacks with abdominal pain and neurovisceral symptoms most typically induced by many commonly used drugs or hormonal changes. Experts in the field agree that patients invariably present with increased concentrations of urinary ALA and PBG when in acute attacks, and this is used diagnostically. There is, however, no consensus on or clear evidence for what urinary concentrations, or changes in concentrations, are required to diagnose an acute attack, and most AIP patients have markedly increased ALA and PBG concentrations also in remission (4,5).

In study I, we therefore assessed the biological variation of urinary ALA and PBG in order to improve on the evaluation of serial test results for these markers (6). Samples were collected by a standardised protocol once weekly for ten weeks (short-term study period) for both asymptomatic AIP patients ($n = 15$) and healthy individuals ($n = 15$), extended to two years for the AIP patients (long-term study period; in total 7 samples). The included AIP patients had either been in remission for at least two years ($n = 9$) or had never experienced acute symptoms ($n = 6$). Clinical data were collected with all samples. Examination for outliers and assessment of homogeneity of variances were carried out prior to data analysis. Biological and within-series analytical coefficients of variation were estimated by analysis of variance with the statistical model for repeated balanced sub-sampling. The within-subject biological variations of urinary PBG and ALA per millimole creatinine were 16% - 20% for both study groups in the short-term setting and for PBG 25% in the long-term setting. Based on these estimates and presuming that pre-analytical variation is negligible, reference change values (RCV) for urinary ALA and PBG were 50% (short-term one-sided setting, 97.5% level of confidence). Our study thus shows that substantial variations in ALA and PBG concentrations are apparent in asymptomatic patients and that RCVs must be applied for the evaluation of serial test results in patients with potential acute symptoms or in patients using porphyrinogenic drugs.

Diagnostic strategies for the differentiation of familial and sporadic porphyria cutanea tarda

Porphyria cutanea tarda (PCT) can be familial, caused by mutations in the *uroporphyrinogen decarboxylase* (UROD) gene, or sporadic (Table 1). Measurement of UROD activity in erythrocytes has traditionally been used to differentiate between the two types. In study II,

Table 1. Main clinical presentation and characteristics of the porphyrias.

	Main clinical presentation	Affected enzyme	Gene(s)	Inheritance ^a
Acute symptoms				
ALA dehydratase deficiency ^b	Acute attacks/chronic neuropathy	ALA dehydratase	<i>ALAD</i>	AR
Acute intermittent porphyria (AIP)	Acute attacks	Porphobilinogen deaminase	<i>HMBS</i>	AD
Acute and cutaneous symptoms				
Hereditary coproporphyria (HCP)	Acute attacks and/or skin fragility and blisters	Coproporphyrinogen oxidase	<i>CPOX</i>	AD
Variagate porphyria (VP)	Acute attacks and/or skin fragility and blisters	Protoporphyrinogen oxidase	<i>PPOX</i>	AD
Cutaneous symptoms				
Congenital erythropoietic porphyria (CEP)	Severe photosensitivity Haemolysis	Uroporphyrinogen III synthase	<i>UROS/ GATA-1</i>	AR
Porphyria cutanea tarda (PCT)	Skin fragility and blisters	Uroporphyrinogen decarboxylase	<i>UROD^c</i>	AD/sporadic
Erythropoietic protoporphyria (EPP) - Ferrochelatase-deficient - ALAS2-gain of function mutation	Burning sensation in skin after light exposure (Acute fulminant liver failure)	Ferrochelatase Erythroid ALA synthase	<i>FECH ALAS2</i>	AR X-linked D

^a AR; autosomal recessive, AD; autosomal dominant, D; dominant.

^b ALA; δ -aminolevulinic acid.

^c In addition, sporadic/non-hereditary and toxic variants.

sequencing of the *UROD* gene was used as the reference standard to establish different diagnostic strategies for the differentiation of sporadic and familial PCT and to examine their diagnostic accuracy (7). In our large national sample consisting of more than 240 PCT patients, a *UROD* mutation was identified in over 50% of cases. Using this data as basis showed that *UROD* activity has high diagnostic accuracy for differentiating the two types of PCT. Clinical and laboratory data were also collected for all patients and used to establish other diagnostic models for the identification of familial PCT. In clinical practise, however, these models will be population-dependent and may have low predictive power. Two frequently occurring mutations, c.636+1G>C and c.578G>C, constituted more than 70% of the familial cases in our Norwegian patient cohort. Gene marker studies indicated that the latter is a founder mutation originating in the north-western part of Southern Norway, being the first founder mutation identified for PCT. In most other populations, familial PCT makes up only 20 - 25% of cases (8-12).

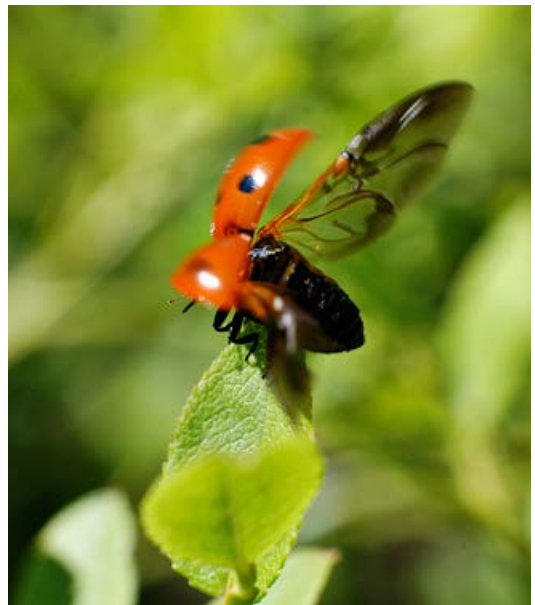


Foto: Henrik Alfthan.

Diagnostic efficiency of European specialist porphyria laboratories

Study III was based on five distributions of a case-based external quality assessment (EQA) scheme including 18 - 21 European specialist porphyria laboratories (13). In every distribution, participants received native urine, faeces and blood samples from a patient with an equivocal porphyria diagnosis, accompanied by a clinical case history. Reporting included pre-analytical (diagnostic strategies based on the clinical case history), analytical (results for all available porphyria-related biochemical laboratory analyses with information on methodology, units and reference limits) and post-analytical (diagnosis, reporting and laboratory report forms) aspects.

Our results showed that the specialist laboratories applied diverse diagnostic strategies for the diagnosis of the porphyrias (Table 2). Large variations in analytical performance were evident in all distributions, also when reported results were normalised by the upper reference limits (Table 2). Overall the quality of the post-analytical phase was high, with most laboratories providing appropriate interpretations of laboratory test results and correct diagnoses. Though it is generally assumed that EQA scheme participation improves performance in clinical laboratories, few published studies are available to document this.

In our study, improvements in the applied diagnostic strategies, a more standardised use of units and sample collection were observed. Presently about 35 specialist porphyria laboratories worldwide participate in this EQA scheme (14).

Conclusions and future perspectives

Quality of care for patients with porphyria diseases is affected by the fact that they are rare diseases with a heterogeneous clinical and biochemical expression. In order to improve the quality of the diagnoses in the laboratory, participation in a case-based EQA scheme assessing all aspects of the diagnostic process may prove useful. Furthermore, methods for biochemical porphyria-related analyses must be harmonised and evidence-based diagnostic criteria and data on their performance established for all the diseases. In order to obtain large enough patient numbers to produce high-quality research, data from across countries must be pooled. The European Porphyria Network (15) has recently launched the European Porphyria Registry (EPR), located at the Norwegian Porphyria Centre in Bergen. The EPR will in future provide an important tool to increase our understanding and thus the quality of care for these potentially chronically debilitating and life-threatening diseases.

Table 2. In two distributions (A and E), samples were from a patient with acute intermittent porphyria. Three first-line analyses are necessary for adequate diagnostics in such cases, and "n" indicates the fraction of laboratories that selected these first-line analyses in light of the accompanying clinical case histories. Analytical results are shown for all EQA scheme participants as means, interlaboratory CVs and results normalised by the upper reference limits (NR).

	A				E			
	n	Mean	CV (%)	NR (median 10 th , 90 th)	n	Mean	CV (%)	NR (median 10 th , 90 th)
Urinary PBG	18/18	53.7 ^a	31.0	46.5 (20.1, 65.3)	21/21	6.1 ^a	64.4	4.1 (0.4, 11.4)
Faecal fractions; coproporphyrin isomer III:I ratio	7/18	0.5	26.2		17/21	0.6	32.6	
Plasma fluorescence scanning	14/18	14/16 ^b			19/21	2/20 ^b		

^a In $\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$.

^b Number of laboratories reporting a positive result out of the total number reporting.

Aasand K. Aarsand disputerte fredag 2. november 2012 for PhD-graden ved Universitetet i Bergen:

Diagnosing and monitoring the porphyrias.

With special emphasis on how to interpret changes in urinary porphobilinogen in acute intermittent porphyria, differentiate sporadic and familial porphyria cutanea tarda and on the performance of specialist porphyria laboratories.

Avhandlingen i sin helhet er tilgjengelig ved henvisning til forfatteren.

References

1. Puy H, Gouya L, Deybach JC. Porphyrias. *Lancet* 2010;375:924-37.
2. Badminton MN, Whatley SD, Deacon AC, Elder GH. The porphyrins and other disorders of porphyrin metabolism. In: Burtis CA, Brunz DE, Ashwood ER, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 5th ed. St Louis: Elsevier Saunders, 2012:1031-55.
3. European Porphyria Network (EPNET). Specialist porphyria laboratory section. <http://www.porphyrria-europe.org/02-for-healthcare/Specialist-Centres/table-spc.asp>, (Accessed June 2013).
4. Kauppinen R, von und zu Fraunberg M. Molecular and biochemical studies of acute intermittent porphyria in 196 patients and their families. *Clin Chem* 2002;48:1891-900.
5. von und zu Fraunberg M, Pischik E, Udd L, Kauppinen R. Clinical and biochemical characteristics and genotype-phenotype correlation in 143 Finnish and Russian patients with acute intermittent porphyria. *Medicine (Baltimore)* 2005;84:35-47.
6. Aarsand AK, Petersen PH, Sandberg S. Estimation and application of biological variation of urinary delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen in healthy individuals and in patients with acute intermittent porphyria. *Clin Chem* 2006;52:650-6.
7. Aarsand AK, Boman H, Sandberg S. Familial and sporadic porphyria cutanea tarda: characterization and diagnostic strategies. *Clin Chem* 2009;55:795-803.
8. Brady JJ, Jackson HA, Roberts AG, Whatley SD, Rowlands GL, Darby C et al. Co-inheritance of mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase and hemochromatosis genes accelerates the onset of porphyria cutanea tarda. *J Invest Dermatol* 2000;115:868-74.
9. Christiansen L, Bygum A, Jensen A, Brandrup F, Thomsen K, Horder M, Petersen NE. Uroporphyrinogen decarboxylase gene mutations in Danish patients with porphyria cutanea tarda. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;60:611-5.
10. Bulaj ZJ, Phillips JD, Ajioka RS, Franklin MR, Griffen LM, Guinee DJ et al. Hemochromatosis genes and other factors contributing to the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. *Blood* 2000;95:1565-71.
11. Mendez M, Poblete-Gutierrez P, Garcia-Bravo M, Wiederholt T, Moran-Jimenez MJ, Merk HF et al. Molecular heterogeneity of familial porphyria cutanea tarda in Spain: characterization of 10 novel mutations in the UROD gene. *Br J Dermatol* 2007;157:501-7.
12. Badenas C, To-Figueras J, Phillips JD, Warby CA, Munoz C, Herrero C. Identification and characterization of novel uroporphyrinogen decarboxylase gene mutations in a large series of porphyria cutanea tarda patients and relatives. *Clin Genet* 2009;75:346-53.
13. Aarsand AK, Villanger JH, Stole E, Deybach JC, Marsden J, To-Figueras J et al. European specialist porphyria laboratories: diagnostic strategies, analytical quality, clinical interpretation, and reporting as assessed by an external quality assurance program. *Clin Chem* 2011;57:1514-23.
14. Norwegian Porphyria Centre. EPNET External Quality Assessment Scheme. <http://www.helse-bergen.no/omoss/avdelinger/napos/european-porphyrria-network/Sider/epnet-eqas.aspx>, (Accessed June 2013).
15. European Porphyria Network (EPNET). <http://www.porphyrria-europe.org/>, (Accessed June 2013).

The role of clinical chemistry in UEMS

Lena Norlund

Sunderby sjukhus, Luleå

lenanorlund@gmail.com

As part of my role in UEMS as president of the section of Laboratory medicine, I have been asked by Klinisk Biokemi i Norden to update everyone on what is currently happening regarding clinical chemistry from a European perspective.



To ensure that there is no confusion, I will first start by providing a summary of what UEMS is. The European Union of Medical Specialists (UEMS) is the oldest medical organisation in EU. It celebrated its 50th anniversary in 2008.

With a current membership of 34 countries, it is the representative organisation of the National Associations of Medical Specialists in the European Union and its associated countries. UEMS

represents over 1.6 million medical specialists in all the various specialities. The organisation also has strong links and relations with the European Commission and Parliament, other independent European Medical Organisations, and the European Medical/ Scientific Societies, see Fig 1.

The structure of UEMS, see Fig. 2 below, consist of a Council responsible for and working through about 40 Specialists Sections and European Boards that address training in their respective Specialty as well as incorporate representatives from academia (e.g. colleges, universities). The President, the Secretary-General, the Liaison Officer, and the Treasurer comprise the people responsible for the routine functioning of the organisation.

By its agreed upon documents, the UEMS sets standards for high quality healthcare practices that are transmitted to the authorities and institutions of the

UEMS political involvement in EU Affairs

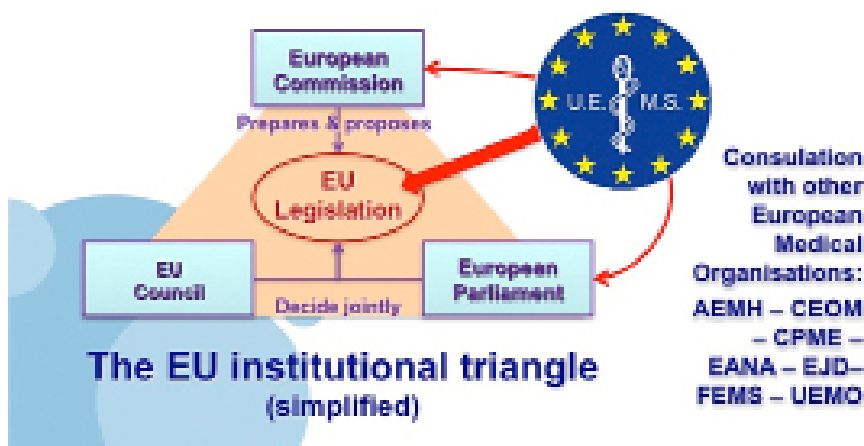
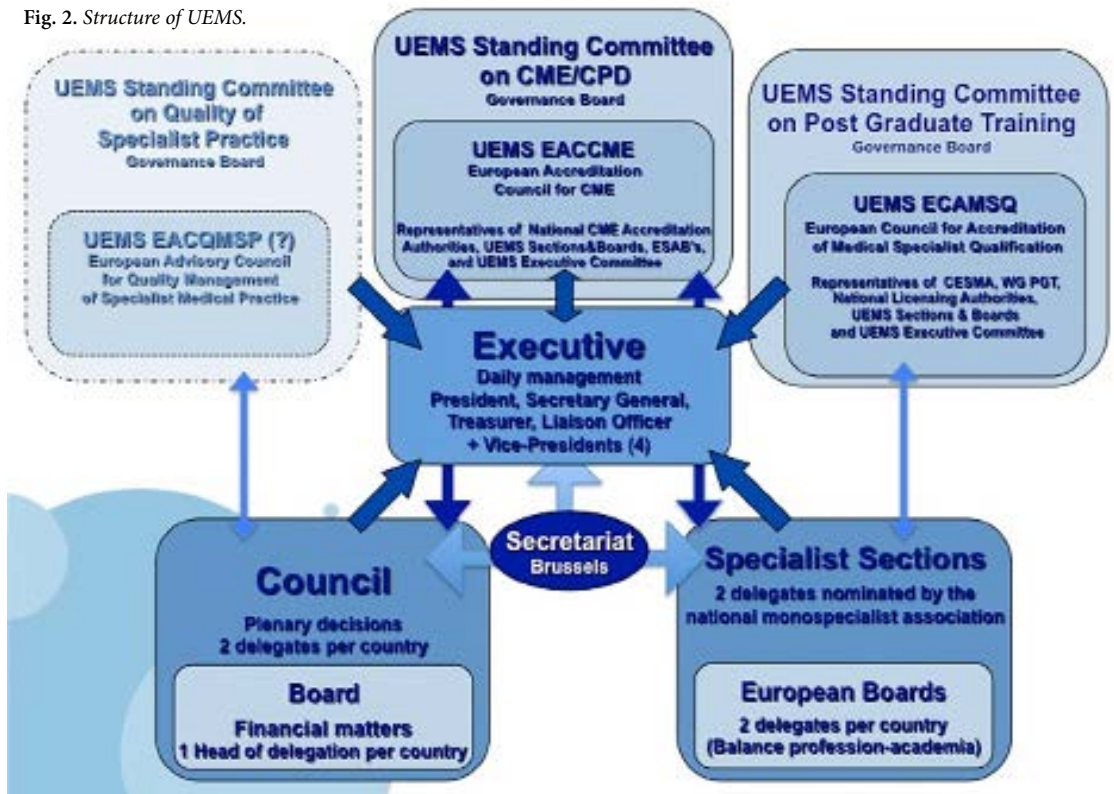


Fig. 1. UEMS political involvement

Fig. 2. Structure of UEMS.



European Union and the National Medical Associations, encouraging and motivating them to implement its recommendations.

Section and Divisions

The various Specialist Sections represent the interests of their particular Specialty. A new Specialist Section is created if at least 1/3 of the member states recognise it as an independent specialty. Each delegation to a Section shall consist of 2 delegates from each member country of the UEMS nominated by their medical association. A Section may create one or more divisions under the responsibility of the main Section, which forms an integral part of its practice, and involves a recognised higher training program.

Key activities carried out are:

- Postgraduate training
- Continuing medical education and professional training
- Quality assurance in medical practice

Our Section of Laboratory Medicine

Laboratory Medicine includes five subdivisions; general laboratory medicine, haematology and transfusion medicine, immunology, clinical chemistry, and genetics. Our section holds two meetings each year, and at these meetings on average around 20 countries are represented.

What are we currently working on?

Our focus is on the education of physicians in the laboratory. The aim is to harmonize the European specialisation so that doctors in the future can work in different countries within the EU without issues. We have written and published a Blue Book where we describe the minimum quality standard for a medical professional to become a specialist. Since this goal is not yet reached we have a “Fellowship of the European Board of Laboratory Medicine/Medical Biopathology” that can be applied for. If a laboratory would like to have an official visitation, to investigate whether a laboratory is of high enough quality to educate doctors to become specialists in laboratory medicine we can supply them with knowledgeable inspectors.

UEMS as such has declared a statement about continued professional education and we therefore assist EACCME (The European Accreditation Council for CME) with the accreditation of educational events in our area of expertise. Furthermore, together with EFLM (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) we arrange a joint congress with the theme of the laboratory being a bridge between the clinicians and the patients. Our next congress will be in Liverpool, England, United Kingdom in 2014. Together with EFLM we also have a working group on guidelines chaired by one of our delegates, Wytze Oosterhuis, MD.

We try to increase the visibility of the physician in the laboratory and have recently had a paper on this subject accepted (1).

We are soon ready to launch our new website to make it easier to follow along what is happening in Europe. I



Fig 3. Picture taken at our latest section meeting in April 2013 in Stuttgart, through the window of the Mercedes-Benz museum.

have learned that even though the speed of European collaboration might feel slow, it is here where things are developing. The last few years we have streamlined our way of working in the section, improving our outcome and the financial situation, which means that we can now offer travel grants to junior physicians to participate in our joint Congresses.

Is there a Nordic voice in UEMS?

The result of our work depends on our delegates' true passion as all work is done in our free time (Fig. 3). Having come this far in the letter, I have finally reached the important question. Clinical chemistry is a small speciality in Europe. In the Nordic countries and in the Netherlands we have a common way of viewing specialties, but since only Finland and Sweden are sending delegates our voice is not very powerful. In the Netherlands the register for physicians has been closed for a couple of years, but it is a long fight that I hope will soon find an amicable solution. Even if we might use the word clinical chemistry we interpret it differently in Europe, e.g. in England haematology is not included in clinical chemistry as it is in Sweden. In most of Europe, the physicians are educated in general laboratory medicine including microbiology, not in a single speciality. At our divisions meetings the clinical chemistry division and the general laboratory medicine division have their meetings together because we realize that our problems and solutions are similar.

My personal view is to emphasize the necessity to have physicians in the laboratories, and that they need to be well educated. Whether they are specialists in Clinical chemistry or General laboratory medicine is of secondary importance.

A short report from each meeting can be found on the Swedish Association for Clinical chemistry's homepage (<http://www.klinisk kemi.org/foereningen/arkiv/internationellt/uems/>).

Greetings from the section of Laboratory medicine with hope to have delegates from all Nordic countries in the future!

References

1. Misbah SA, Kokkinou V, Jeffrey K, Oosterhuis W, Shine B, Shuh A, Theodoridis T. The role of the physician in laboratory medicine: a European perspective. *J Clin Pathol* 2013; 66:432-437.

Kontroll av reagensbatcher med hjälp av frysta patientpooler – Ett bra komplement till våra övriga kontrollprogram

Anders Larsson och Mats Flodin

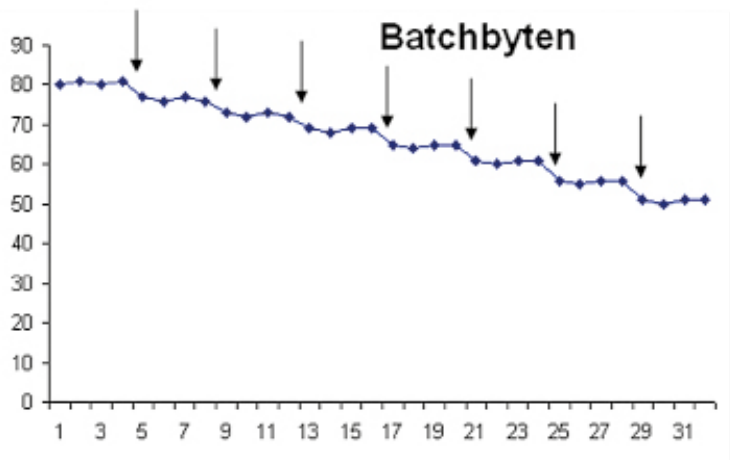
Klinisk Kemi och Farmakologi, Akademiska Sjukhuset, Uppsala

Normalt använder vi oss av en kombination av intern- och externkontroller för att övervaka riktigheten hos våra analyser. Detta fungerar i de flesta fall mycket bra, men som vi vet är inga kontrollsystem ofelbara. Ett problem med externkontroller är att vi analyserar dem ganska sällan vilket innebär att vi kan ha hunnit med att analysera och rapportera ett stort antal prover innan vi får resultaten från den nästa externa kontrollen och vi upptäcker att vi har en avvikelse i analysresultat.

Vi kan också använda oss av patientmedelvärden men även här brukar vi behöva resultat från åtskilliga dagar innan vi reagerar på en avvikelse. Det kan i värsta fall innebära att vi rapporterat tusentals felaktiga resultat innan vi upptäcker att vi lämnar ut felaktiga analysresultat. Allt detta skall ju givetvis stoppas av en väl fungerande internkontroll. Tyvärr är det så att internkontroller inte alltid är helt pålitliga och enligt vår uppfattning är den största risken när reagens och kontroll kommer från samma tillverkare. Den leverantör som inte ser till att deras egna kontroller stämmer överens med reagentset måste ha mycket dåliga rutiner, för att inte säga att de är klantiga. Det innebär att om reagentset har ändrat nivå så kan man nästan utgå från att kontrollen också har ändrat sig i motsvarande grad

och vi kommer därför inte upptäcka förändringar i analysresultaten via internkontrollen. Det är lätt att säga att reagens och kontroll alltid skall vara från olika leverantörer men praktiskt är det inte alltid möjligt att göra så. Eftersom vi i regel bara har två kontrollnivåer så vet vi inte heller om det uppträder avvikelser på andra nivåer med hjälp av internkontrollerna.

Under de senaste åren tycker vi att det blivit betydligt vanligare att kalibreringen av de antikroppsbase- rade metoderna börjat glida iväg från den ursprungliga kalibreringen. För närvarande har vi i Sverige funderingar kring firmakalibreringar av CRP, albumin, antitrypsin, HbA1c och cystatin C, för att bara nämna några metoder. Jag förstår inte varför det händer nu. Beror det på bytet till nya IFCC kalibratorer för prote-



Figur 1. Utfallet av upprepade internkontroller i det fall varje reagensbatch har en något lägre kalibrering än föregående.

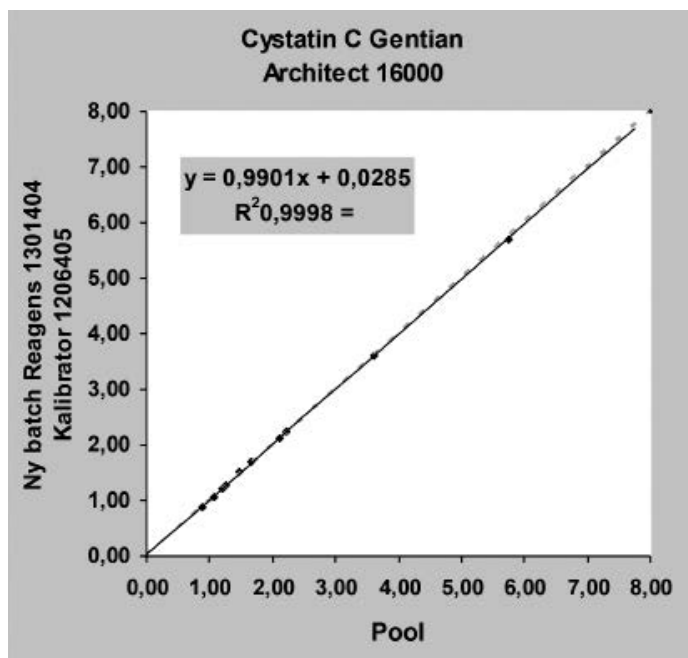
inanalyser och att firmorna då passat på att ändra sina rutiner? Kan det bero på generationsskiften på företagens kvalitetsavdelningar och att den nya generationen inte kommit in i rutinerna? Är det vi som blivit mer observanta på förändringar?

Vi kan bara konstatera att vi tycker att problemen har ökat och att det verkar som om flera av våra leverantörer enbart använder sig av rutiner som bygger på att man jämför resultaten för den nya reagensbatchen med den gamla. Om skillnaderna är inom acceptansgränserna så accepterar man den nya batchen. Problemet är då att om resultaten sjunker med några procent per batch så klarar man acceptansgränserna för den enskilda batchen men efter 10 batcher så har man kanske sänkt nivån med 20 % (Figur 1). För oss på laboratorierna så innebär det att resultaten inom en batch är stabil men vi får en successivt sjunkande trend. Det är en typ av resultatförändring som vi troligen är lite långsamma på att uppmärksamma. Vi har under de senaste 7 åren uppmärksammat att två av de antikroppsbaseade reagensen som användes i Sverige hade sjunkit med 20-25%. Vi utvärderade också ett cystatin C reagens för några år sedan där vi genom att ändra instrumentinställningarna kunde förändra patientresultaten med 50 % utan att påverka resultaten för kontrollerna. En sådan detalj som att vi minskade

pipetteringshastigheten på reagensproben (övriga parametrar oförändrade) kunde förändra resultaten för patientproverna med 20 % utan att påverka kontrollresultaten. Sådant gör oss mycket bekymrade då det är svårt att skydda sig mot den typen av fel. Firman har sedan dess löst problemet, men vår oro finns kvar. Om detta kan hända med reagens från en leverantör vad utesluter att det inte händer med reagens från en annan leverantör?

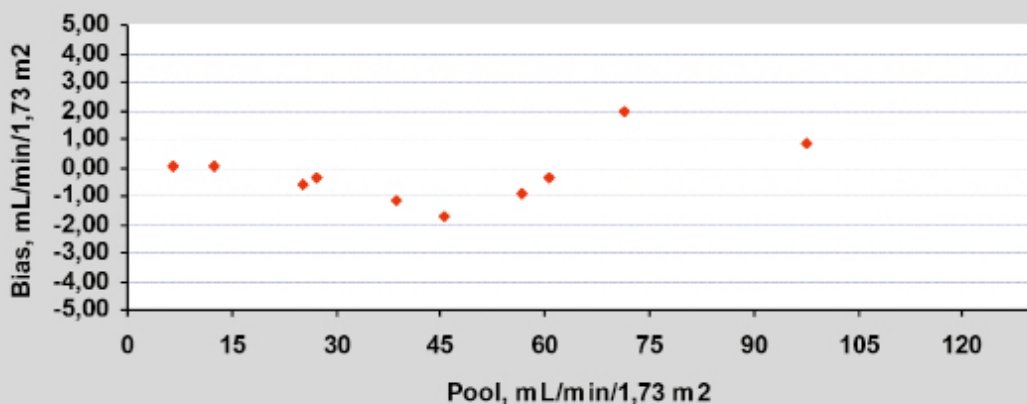
Detta var starkt bidragande orsaker till att vi 2006 införde en batchkontrollrutin där vi analyserade varje ny reagensbatch med frysta patientprover för att försäkra oss om att vi inte hade metodglidningar i vår rutinmetod för cystatin C.

Vi gjorde 10 olika patientpooler som täckte intervallet från < 1 mg Cystatin C/L till > 6 mg Cystatin C/L. Vi valde att ha fler pooler i intervallet 1-1,5 mg/L då de flesta patientproverna ligger inom detta intervall och vi uppfattar det som det kliniskt viktigaste området. Vi ville därför vara extra säkra på att vi inte fick ett nivåskift inom detta intervall. Patientpoolerna frystes ner i ett stort antal rör i -70 frys. I samband med infrysningen åsattes varje pool ett Cystatin C värde. Vi kan sedan ta fram ett nytt rör varje gång vi skall kontrollera en ny batch och slipper problem med påverkan av upprepade frys/tiningscykler.



Figur 2. Resultat från analys av patientpoolerna med den nya reagensbatchen. Batchen uppfyller kvalitetskriterierna enligt våra ursprungliga kriterier (Slope $1,00 \pm 0,03$; Intercept $\pm 0,05$ och Bias $\pm 5\%$).

eGFR, Ny batch 1301404 Kalibrator 1206405



Figur 3. Resultat från analys av patientpoolerna med den nya reagensbatchen. Batchen uppfyller kvalitetskriterierna enligt de reviderade kriterierna.

Vi bestämde oss för 10 pooler när vi lade upp denna kontrollrutin. Det går givetvis att variera antalet punkter man kontrollerar, men det viktiga är att man kontrollerar det område som man tycker är kliniskt viktigt. Fördelen med att göra egna patientpooler jämfört med kommersiella kontroller är att det är lättare att skapa kontroller på lite ”ovanligare” nivåer då vi kan nöja oss med 50 mL per pool eller något liknande. Nackdelen är att metoden är begränsad till analyser som man kan förvara frysta under lång tid.

Hur skall man sedan kontrollera resultaten av dessa batchkontroller? Ursprungligen bestämde vi oss för att göra en linjär regressionsanalys och att varje ny batch skulle uppfylla kvalitetskraven: Slope $1,00 \pm 0,03$; Intercept $\pm 0,05$ och Bias $\pm 5\%$ (Figur 2). Eventuell avvikelser från dessa mål skulle underkännas. Dessa rutiner fungerade bra, men vi började efter ett tag fundera över om dessa kvalitetsmål var optimala. En linjär regressionsanalys tar större hänsyn till de höga resultaten (> 6 mg/L) medan det kliniskt viktiga området är i intervallet 1-1,5 mg/L. I praktiken så har en 10 % avvikelse i cystatin C resultat runt 7 mg/L en mycket liten effekt på det estimerade GFR värdet. Det har medfört att vi för cystatin C har reviderat våra kvalitetsmål för att få större fokus på GFR intervallet 60-90 mL/min/1,73m². Numera omvandlar vi därför cystatin C koncentrationen till ett estimerat GFR och har numera istället följande kvalitetskrav för batchgod-

kännande: eGFR $< 30: \pm 1$ mL/min/1,73m²; 30-60: ± 2 mL/min/1,73m² och 60-90: ± 3 mL/min/1,73m² (Figur 3). De reviderade kriterierna minskar fokus på de höga cystatin C koncentrationerna när vi kontrollerar nya batcher. Vår uppfattning är att de senare kvalitetskraven är bättre anpassade till de kliniska behoven än våra ursprungliga kvalitetskrav. Vi har haft dessa rutiner sedan 2006 och samtliga reagensbatcher som vi använt i rutinen har uppfyllt dessa kvalitetskriterier. Ett krav på en avvikelse på max ± 1 mL/min/1,73m² i intervallet under 30 kan låta som väldigt snävt, men det har aldrig varit något problem att klara detta kriterium. Sannolikt skulle man kunna ha ett ännu snävare kriterium i detta intervall men kliniskt är dock kravet fullt tillräckligt.

Det är givetvis ett merarbete att kontrollera varje ny reagensbatch med patientpooler så vi har bara dessa rutiner för metoder där vi misstänker att det kan förekomma reagensproblem. Arbetet med att köra 10 extra prover när man byter batch är ändå en relativt liten arbetsinsats. Samtidigt är det skönt att känna sig säkra på att varje ny reagensbatch uppfyller våra krav. Det finns ett talessätt att ett gott samvete är den bästa huvudkudden men vetskap om att laboratoriets metoder uppför sig som förväntat är också en bra huvudkudde. Med patientpooler som batchkontroll kan man känna sig säkrare på att metoderna håller den kvalitet som man kan förvänta sig.

Doktorgradsavhandling: Tyrosinemi type I

Yngve Thomas Blikrud

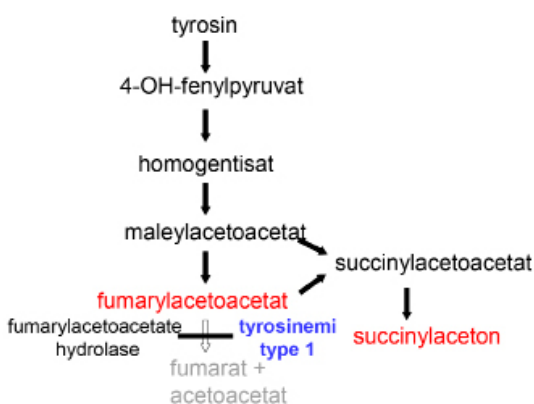
Avdeling for Medisinsk Biokjemi, Oslo Universitetssykehus, Oslo

yngve.thomas.blikrud@ous-hf.no



Yngve Thomas Blikrud forsvarte 30. november 2012 sin avhandling ”Hereditary tyrosinaemia type I, Studies on the molecular genetics and DNA repair enzymes” for graden ph.d. ved Universitetet i Oslo. Magnar Bjørås, Helge Rootwelt og Berit Woldseth var veiledere og arbeidet ble utført ved Avdeling for medisinsk biokjemi, OUS, Rikshospitalet.

Tyrosinemi type I er en medfødt stoffskiftesykdom som forekommer litt hyppigere i Norge enn i de fleste andre land. Den arves autosomalt recessivt, skyldes svikt i enzymet fumarylacetoacetat hydrolase (FAH) som katalyserer siste trinn i tyrosinnedbrytningen (se figur). Blokaden fører til opphopning av skadelige metabolitter som fumarylacetoacetat (FAA) og succinylaceton (SA). Sykdommen oppdages i barnealder og rammer i hovedsak lever, men også nyrer og nervesystem. Tyrosinemi type I er assosiert med ustabil DNA og økt mutasjons-



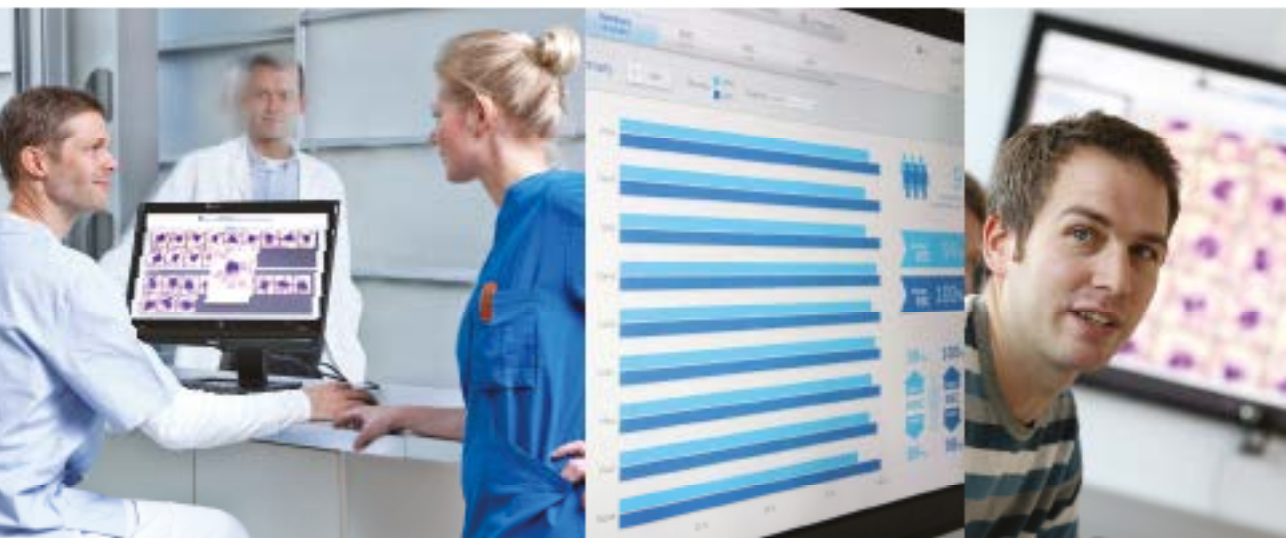
Figur 1. Tyrosin brytes ned i fem trinn hovedsakelig i leverceller. Tyrosinemi type I er en svikt i enzymet FAH som katalyserer siste trinn. Svikten fører til opphopning av blant annet fumarylacetoacetat og succinylaceton.

frekvens i hepatocytter. Den sterkt økte risikoen for hepatocellulært carcinom (HCC) ved tyrosinemi type I er et uttrykk for dette. Et annet uttrykk for høy mutasjonsfrekvens er et merkelig fenomen med spontan korreksjon av medfødte genetiske feil i leverceller hos tyrosinemipasienter som ble beskrevet i 1994. Lever fra tyrosinemi type I-pasienter som var tatt ut pga levercellekreft ble undersøkt. I et stort flertall av disse ble det foruten kreftsvulster påvist cellekloner (ikke kreftceller) som tilsynelatende var blitt friske av sin tyrosinemi type I. Enzymet FAH ble påvist ved immunhistokjemi i disse cellene til forskjell fra vevet omkring. Sekvensering av FAH-genet i de samme cellene viste at én av de to medfødte mutasjonene var korrigert til frisk variant. Den genetiske korreksjonen har blitt forklart som et tilfeldig utslag av økt mutasjonsfrekvens i levercellene hos disse pasientene. Mekanismen bak den økte mutasjonsfrekvensen og den høye kreftfrekvensen er ufullstendig forstått, men opphopning av alkylende metabolitter, oksidativ stress og redusert glutathionkonsentrasjon inngår i patofysiologien.

Ved vårt laboratorium for utredning av medfødt stoffskiftesykdom, som er det eneste i sitt slag i Norge, har 30 norske pasienter fått diagnosen tyrosinemi type I de siste ca. 30 år. I gradsarbeidet blir DNA-forandringer i 19 av disse pasientene beskrevet, det gis en oversikt over mutasjonene i den norske befolkningen inkludert tre små delesjoner som ikke tidligere er beskrevet. Arbeidet viser at det er i alt minst 9 ulike sykdomsgivende mutasjoner i den norske befolkningen, og at 65% av de norske pasientene er sammensatt heterozygote (to ulike sykdomsgivende mutasjoner). Den noe høyere forekomsten av tyrosinemi type I i Norge (1 pr 74.800 levendefødte) sammenlignet med de fleste andre land skyldes dermed et relativt høyt antall sykdomsgivende mutasjoner i befolkningen. Dette til forskjell fra andre deler av verden med økt forekomst hvor årsaken er ”founder effects” eller inngifte.

En alternativ forklaring på fenomenet med spontan

Create a lab full of morphology experts with our NEW product



CellaVision® Proficiency Software is a new sophisticated web-based program for proficiency testing of blood and body fluid differentials, this gives you the benefits of:

- Standardized differentials
- Improved morphology expertise
- Ensured quality throughout the organization

The program is quick to set up and easy to use, and can be accessed from any computer and any location. Simply open a web browser and log in to your account.

Create your free trial account today at www.cellavision-proficiency.com

Join in the world's 1st global morphology test case and see how you compare!

www.cellavision.com
blog.cellavision.com
App: CellAtlas®

CELLAVISION® 

korreksjon av medfødte mutasjoner blir beskrevet i avhandlingen. I én levercelleklon fra én pasient påvises en intragen suppressormutasjon. Pasientens primærmutasjon svekker et spleisesete i FAH-genet. Sekvensering av FAH-genet viser en nyoppstått mutasjon som gir mer effektiv spleising og således motvirker effekten av primærmutasjonen. Funnet støtter antagelsen om økt forekomst av mutasjoner i lever ved tyrosinemi type I og bidrar også til generell forståelse av betingelsene for spleising.

Effektiv DNA reparasjon er en forutsetning for å opprettholde DNA molekylets integritet i cellen. Svekket DNA reparasjon er assosiert med økt mutasjonsfrekvens og fare for cancerutvikling. I avhandlingen gir inhibisjonsstudier av baseutkutterreparasjon (BER) et nytt og viktig bidrag til forståelsen av DNA ustabiliteten ved tyrosinemi type I. Metabolittene FAA og SA undersøkes

som potensielle hemmere av ulike glykosylaser. Arbeidet viser at FAA hemmer flere glykosylaser med felles substratspesifisitet og således første trinn i BER. En slik svekkelse vil bety redusert forsvar mot mutagene DNA-skader. SA viste ikke hemmende effekt. Svekket BER kan således utgjøre en felles mekanisme bak den spontane genetiske korreksjonen og den store faren for leverkreft ved tyrosinemi type I.

Referanser

”Hereditary tyrosinaemia type I, Studies on the molecular genetics and DNA repair enzymes”
Medisinsk fakultet, Universitetet i Oslo. ISBN 978-82-8264-399-3, No. 1436

Den vandrante vetenskapsmannen: At spise cuy i Quito

Palle Wang

”Lediggang er da saa langt fra at være Roden til det Onde, at den snarere er det sande Gode. Kjedsommeligheden er Roden til det Onde, den er det, der maa holdes borte. Lediggang er ikke det Onde, ja man maa sige, at ethvert Menneske, der ikke har Sands derfor, derved viser, at han ikke har hævet sig til det Humane.

(S. Kierkegaard i Enten-Eller)



Det rammer os alle før eller senere. Den dag, hvor afskedsreceptionen og middagen er overstået, rødvinen er båret i kælderen og bøgerne lagt frem til senere læsning.

Så sidder man der og tænker. Hvad F.... skal jeg nu lave?

De fleste svarer: Golf. Men sport har aldrig interessert mig – og hvorfor dog skaffe sig et handicap?

Det er klart, at flere muntre sysler i lediggangen hjælper med at holde Kjedsommeligheden borte. Læsning, musik, kajakroning, finde frem til vækster som dræbersnegle ikke gider æde, KBNs annoncører og regnskaber osv. Per Simonsson tog mig med som gast i flere omgange under hans odysse til Portugal – herligt!

At studere sprog er en interessant mulighed. Det er som en rejse i et ukendt landskab, hvor der af og til dukker pejlemærker op fra andre sprog. Og samtidig en undersøgelse af hvor meget af ens cerebrale kapacitet og indlæringssevne der er tilbage efter alle disse år. Spansk på aftenskole i tre år gav mig en del grammatik og gloser, men ikke taleferdighed endsige forståelse af det talte sprog.

Ecuador er kvintessensen af Sydamerika. Høje bjerge, brede strande, jungle og de enestående Galapagosøer. Folket er venligt og taler et langsomt, tydeligt spansk. Der er mange sprogskoler, flest i Quito, og jeg fandt frem til Cristobal Colon Spanish School der. Skolen havde tilknytning til et ”hostal” og kunne også arrangere ophold hos private familier.

Min underviser, Estefania, var en 26-årig mestizskøn-
hed, som var fuldkommen nådesløs. Mine fortvivlede
forsøg på at komme over på engelsk, som hun forstod
og talte udmærket, lod hende helt kold. Den første uge
talte jeg mere spansk end i de tre år på aftenskolen. To
timers undervisning hver morgen og min hjerne var
blæst. Hun udviste dog en vis forståelse ved at spørge
efter en time: "Quieres café?" Det gjorde jeg. Og så var
der skriftlige opgaver bagefter.

Estefania havde en bachelorgrad i litteratur og en
kærlighed til især argentinsk lyrik. Da jeg fandt ud af
det, kunne jeg lokke hende væk fra verbers bøjninger
og konjunktivs betydning for det rette udtryk af følel-
ser på spansk til samtaler om litteratur og hverdagsliv
i Ecuador.

På hostalet var gæsterne en blandet flok. Der kom
grupper af unge piger, mest fra USA og Canada, hvis
velhavende forældre havde sendt dem på en tre måne-
ders dannelsesrejse til Sydamerika, overvåget af to
erfarne guider. Der var de faste beboere – Frieda, en
irsk pensioneret sygeplejerske, som nu underviste børn
i engelsk på en skole i et slumkvarter, Peter, der var
software engineer fra Los Angeles og som arbejdede i
en bank over nettet, Sylvia fra Berlin, der var ansat i et
rejsebureau i Quito og alle deres venner, der kom forbi.

Den mest flamboyante var Jonathan, en 23-årig fyr,
som var fra Quito og underviste på Friedas skole – og
Frieda med – i spansk. Jonathan havde langt, sort, krøllet

hår og gik i sorte stramme bukser og sort læderjakke.
Den første gang jeg traf ham underviste han os i syda-
merikansk høflighed, vistnok udløst af, at jeg kom ind
i fællesstuen, kiggede mig rundt og sagde "Hi". Man går
rundt til alle, præsenterer sig, giver hånd og spørger til
deres befindende. Og ikke som det amerikanske "How
are you" som ikke indeholder den mindste interesse for
ens fysiske eller psykiske befindende.

Frieda kunne også forklare, hvorfor unge sydameri-
kanere var så dårlige til engelsk. De lærere på hendes
skole, der underviste i sproget, foretrak at tale spansk
med hende – deres engelsk var simpelthen for elendigt.

Værtinden på hostalet, Sra. Julia, havde en tendens til,
som Frieda sagde: "play games with money." Hvis man
fx bor på et hostel fra mandag til lørdag ville vi regne
det for fem overnatninger, men Sra. Julia talte dagene
og så bliver det til seks. Det gik ellers fint at tale spansk
med hende, men i visse situationer blev det umuligt for
hende at forstå hvad jeg mente. Jeg endte med at betale
hvad hun forlangte – værelset kostede kun 13 US\$/dag.

Hvad jeg fik ud af det? Jeg satte min hjerne på prøve
og fandt ud af, at jeg kunne lære spansk til husbehov
(med en masse fejl og kun meget begrænset anvendelse
af konjunktiv), jeg traf en masse sjove mennesker og
lærte et smukt og charmerende land og folk at kende.

Hvad cuy er? Det er marsvin (guinea pigs) som fås
grillet eller i en suppe. Det var en hovedret hos inkaerne
og indgår stadig i den daglige kost i Ecuador.



Til manuskriptforfattere

Litteraturhenvisninger nummereres i den rekkefølge de angis i manuskriptteksten og skrives i Vancouver-stil. Dersom artikkelen har mer en syv forfattere listes de seks første etterfulgt av "et al". Forfatterens etternavn skrives først, deretter initialer (for og mellomnavn), forfatterne skilles ved komma og punktum settes etter siste forfatters initialer evt. etter "et al". Punktum brukes også etter tittel på artikkelen. Journalnavn forkortes som angitt i Pubmed, liste over forkortelser finnes i LinkOut Journals. Etter journalforkortelsen følger et mellomrom, årstall for publikasjonen, et semikolon, volum nummer, et kolon og sidetall. Overflø-dige sidetall fjernes, som vist i eksempelet 1989;49:483-88. Personlige meddelelser (inkludert fullt navn og årstall) og produkt informasjon skal ikke stå i referanselisten men refereres i manuskriptteksten.

Eksempler

Journal artikkel med inntil syv forfattere:

1. Vermeersch P, Mariën G, Bossuyt X. A case of pseudopa-raproteinemia on capillary zone electrophoresis caused by geloplasma. *Clin Chem* 2006;52:2309-11.

Journal artikkel med mer enn syv forfattere:

2. Fiechtner M, Ramp J, England B, Knudson MA, Little RR, England JD, et al. Affinity binding assay of glycohemoglobin by two-dimensional centrifugation referenced to hemoglo-bin Alc. *Clin Chem* 1992;38:2372-9.

Abstrakt:

3. Hortin GL, King C, Kopp J. Quantification of rhesus monkey albumin with assays for human microalbumin [Abstract]. *Clin Chem* 2000;46:A140-1.

Bok kapitler:

4. Rifai N, Warnick GR. Lipids, lipoproteins, apolipoprote-ins, and other cardiovascular risk factors. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 4th Ed. St. Louis: Elsevier Saunders 2006:903-81.

PhD teser:

5. Haughton MA. Immunonephelometric measurement of vitamin D binding protein [MAppSci thesis]. Sydney, Aus-tralia: University of Technology, 1989:87pp.

On-line publisert artikkel som ennå ikke er trykt:

6. Milbury CA, Li J, Makrigiorgos GM. PCR-based methods for the enrichment of minority alleles and mutations. [Epub ahead of print] *Clin Chem* February 6, 2009 as doi:10.1373/clinchem.2008.113035.

Supplement:

7. Castelli WP. Lipids, risk factors and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis* 1996;124 Suppl:S1-9.

Internett kilde:

8. American Association for Clinical Chemistry. AACC con-tinuing education. <http://www.aacc.org/development/ce/pages/default.aspx#> (Tilgjengelig Mars 2012).

Se også NFKK's og KBN's hjemmeside: www.nfkk.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), Tor-Arne Hagve (Oslo), Helge Rootwelt (Oslo), Mattias Aldrimer (Falun) och Per Bjellerup (Västerås).

Ordförande: Ingunn Þorsteinsdóttir. Sekretærer: Tuula Metso.

Redaktionen för Klinisk Biokemi i Norden

Hovedredaktør: Per Simonsson · Tryk: Clausen Grafisk

Danmark

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

Norge

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

Island och NFKK

Överläkare Ingunn Þorsteinsdóttir
Department of Clinical Biochemistry
Landspítali - University
Hospital Hringbraut
IS-101 Reykjavík
Telefon: +354 543 5033
E-mail: ingunnth@landspitali.is

Sverige

Docent Per Simonsson
Klinisk kemi
Labmedicin Skåne
SE-205 02 Malmö
Telefon: +46 768 890504
E-mail: per.simonsson@med.lu.se

Finland

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

Sverige

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



Linda Hilsted, Kristin Aakre Moberg, Per Simonsson, Ingunn Þorsteinsdóttir, Anders Larsson och Henrik Alfthan.



SIEMENS

A91DX-9247-A1-7600 © 2012 Siemens Healthcare Diagnostics Inc. All rights reserved.

Test smarter.

Siemens answers unite clinical and workflow excellence to help you thrive.

siemens.com/test-smarter

Clinical diagnostic testing is part science and part business. Which means its overall performance depends on how well these two integral parts work together. Siemens Healthcare Diagnostics can make that happen. We offer answers that combine the extensive menu of tests you want with the leading-edge technology you need to run them efficiently. Not only do we deliver assays to support your clinical excellence, we commit all our technical know-how to developing innovative

diagnostic solutions that increase productivity. What's more, we provide the education, services, and support that keep you running at your absolute best. So you can unite and transform both clinical and workflow performance to deliver the highest-quality patient care.

Find out how Siemens helps you work better by working with you. Visit siemens.com/test-smarter.

Answers for life.