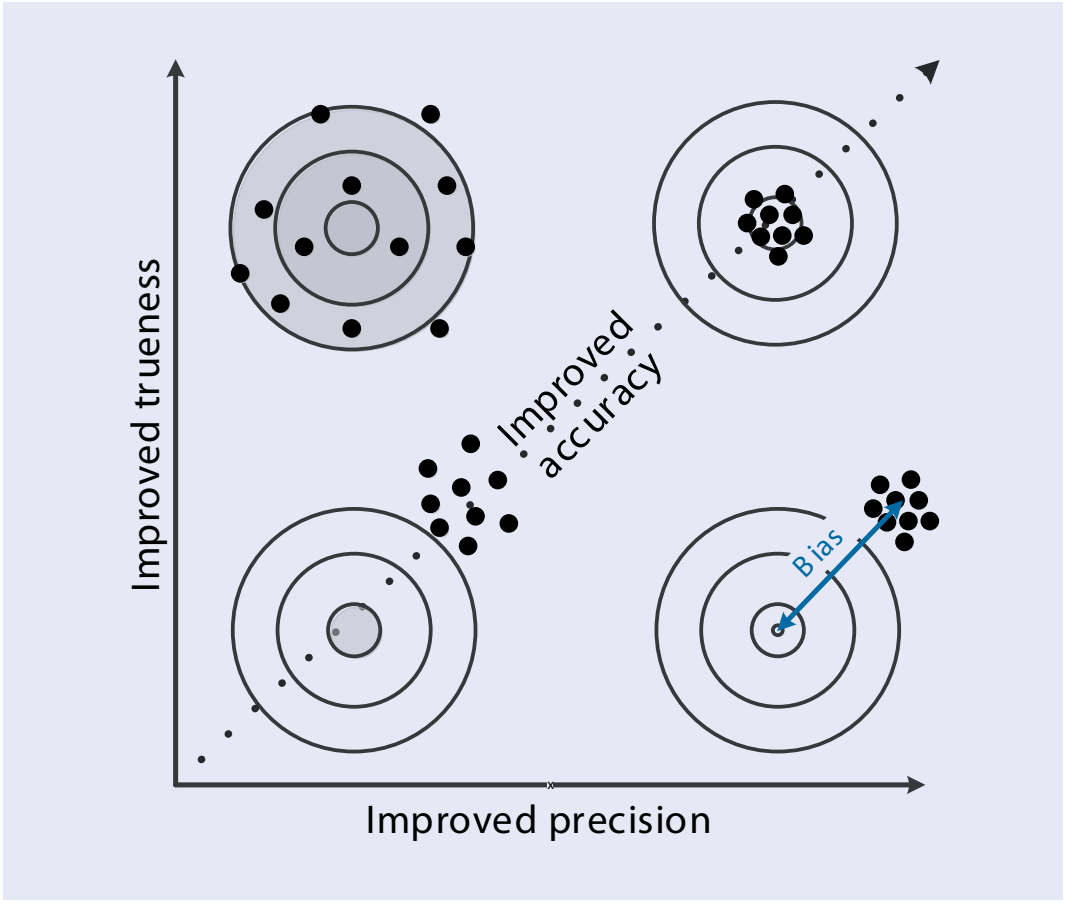
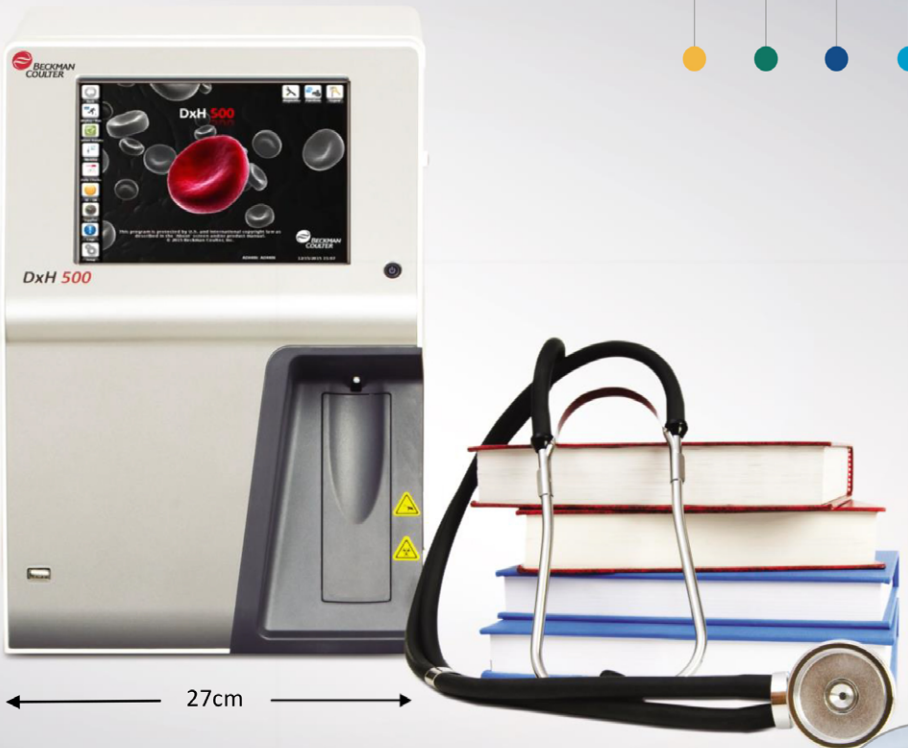
ISSN 1101-2013

Klinisk Biokemi i Norden



Nordisk Forening for Klinisk Kemi

Nr. 1 · vol. 29 · 2017



SIMPLIFY BLOOD ANALYSIS FOR BETTER PATIENT CARE, WHEREVER THE PATIENT IS.

Meeting the requirements of your clinics in a fraction of the space is as easy as 1, 2, 3.

- **One** sample - minimises unnecessary or multiple venous draws with just 12ul of sample required for a full **five part** WBC differential.
- **Two** analytical reagents* - simplifies inventory with fewer reagents than any other FBC system delivering a full WBC differential.
- **Three** touches or less to perform any command – simplifies training requirements with software specifically designed to provide an intuitive interface.

For more information or a demo contact infouk@beckman.com or scan QR code below

BECKMAN COULTER

Move healthcare forward.

*- In addition there is one further on-line consumable for cleaning the system.

INDHOLD

Omslagsbild: Redrawn after a figure in: Stephen L R Ellison, Vicki J Barwick, Trevor J Duguid Farrant, Practical Statistics for the Analytical Scientist : A Bench Guide : Edition 2, Royal Society of Chemistry, 2009, ISBN: 978-0-85404-131-2

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

Ordförandespalt

Yngve Thomas Bliksrud

Av og til må det være lov å tenke på noe annet enn laboratoriemedisin, selv hender det at jeg tenker litt på sjakk. I november 2016 tenkte jeg i grunnen ganske mye på sjakk. Den norske verdensmesteren Magnus Carlsen forsvarte nemlig sin VM-tittel ved å spille til sammen 16 sjakkpartier mot Sergej Karjakin, en fryktet motstander fra Russland, verdens sterkeste sjakknasjon. Det ble en meget jevn og spennende kamp, men Magnus Carlsen forsvarte tittelen og kan stadig kalle seg verdensmester. Hvorfor skriver jeg om dette i ordförandespalt i Klinisk Biokjemi i Norden? Jo, fordi en aldri så liten del av suksessen i dette verdensmesterskapet kan tilskrives et inspirerende eksempel på nordisk samarbeid i et laboratorium! La meg forklare hvordan.

I en slik kamp i sjakk mann mot mann over mange partier er nemlig forberedelsene meget viktige og omfattende. I mange måneder på forhånd gjør ikke spillerne noe annet enn å legge planer for matchen. De studerer motstanders tidligere partier og spillestil i detalj, forsøker å tenke seg særlig hvilke åpningssystemer som motstanderen vil benytte, og ikke minst perfeksjonerer de sine egne yndlingssystemer. I åpningsfasen av et sjakkparti kan man nemlig håpe på å overraske motstanderen og ta styringen med nye og ukjente trekk som er gjennomtestet av mennesker og computere. Det er ikke enkelt å finne de beste svarene på slike forberedte varianter i praktisk spill mens klokken tikker ubønnhørlig.

Før matchen var det nettopp Karjakins forberedelser som kanskje Carlsen fryktet mest. I forberedelsene sto Karjakin nemlig slett ikke alene. Ingen andre land har så mange sterke sjakkspillere som Russland. 9 av 16 verdensmestere i sjakk kommer fra nettopp Russland eller gamle Sovjetunionen. To ganger har Russland/Sovjetunionen stilt opp alene mot resten av verden i en match over 10 bord og vunnet. Med andre ord kunne Sergej Karjakin med letthet etablere et aldeles fryktinngytende sjakklaboratorium av mesterspillere til å hjelpe seg som ingen annen enkeltnasjon kan matche, hvis han ville. Og det ville han.

Hvordan gikk det så for Magnus Carlsen i den skumle åpningsfasen, tråkket han feil i Karjakins minefelt av overraskelser? Langt ifra. Tvert imot var det Carlsen som tok styringen og førte det ene partiet etter det andre i de retningene han selv ville. Ikke en eneste gang fikk Karjakin spilt en av sine giftige forberedelser fra sjakklaboratoriet. Hvordan klarte Carlsen dette? Selvsagt mest fordi han er verdens beste sjakkspiller, men også fordi Carlsen heller ikke var alene før matchen. Også Magnus Carlsen hadde etablert et imponerende sjakklaboratorium til hjelp i forberedelsene. Og ikke minst fikk han hjelp av nordiske venner. Hans viktigste samarbeidspartner er nok Danmarks sterkeste spiller Peter Heine Nilsen. Men også Sveriges sterkeste sjakkspiller Nils Grandelius stilte opp for Magnus Carlsen. Flere medlemmer av Carlsens laboratorium er hemmelige, så vi vet ikke om flere nordiske land er representert. Men det er ikke utenkelig. Island har en imponerende sjakktradisjon med det største antall verdensklassespillere i verden sett i forhold til folketallet. Og Finlands beste spiller Tommi Nyback er en av de få spillere i verden som har slått Magnus Carlsen og stadig har positiv score mot ham.

Norden kan altså måle seg med de største nasjoner både med sine strålende enkelttalenter, men også gjennom et sterkt og fruktbart samarbeid. Nordiske eksepsjonelle sjakktalenter har vi sett før. Faktisk i begge matchene mellom Russland/Sovjetunionen resten av verden var verdenslaget toppet av en nordisk spiller på første bord, i 1970 av Danmarks sjakkgeni Bent Larsen og i 1984 av Sveriges «uslåelige» Ulf Andersson.

La oss bruke de Nordiske triumfene på sjakkbrettet som inspirasjon til mer Nordisk samarbeid i medisinsk/klinisk biokjemi. I dette nummeret av KBN minner vi for eksempel om at NFKK i 2017 arrangerer sitt andre spesialiseringskurs for leger, «The 2nd Nordic Course in specialist training". Alle unge leger bør få det med seg! Og i pausene kan de jo spille noen sjakkpartier?

Abbott

Personalised Solutions

A HEALTHIER HOSPITAL BEGINS WITH A HEALTHIER LAB

How can you help your healthcare system grow? Abbott is dedicated to partnering with you to elevate the health of your healthcare institution. With our personalised solutions consisting of resourceful advocates, harmonised systems, and intelligent insights, we are focused on helping you achieve measurably better healthcare performance.

For more information, please visit AbbottDiagnostics.com, ask your local Abbott Ambassador, or send an email: wired@abbott.com

CHOOSE TRANSFORMATION

Clinical Chemistry | Immunoassay | Hematology | Transfusion | Molecular | Point of Care | Professional Services

XXXVI Nordic Congress in Clinical Chemistry 12-15 June 2018 Helsinki, Finland

Invitation to participate

We are delighted to invite you to the 36th Nordic Congress in Clinical Chemistry, which will take place on 12 - 15 June 2018 in Helsinki, Finland.

We hope to gather all professions in clinical chemistry in the Nordic countries to meet, discuss and share knowledge with the aim of promoting research, education and practice.
Details of the scientific program will continuously be published and updated on our conference website www.nfkk2018.fi.

Our ambition is to present you with information beyond numbers, such as up-to-date topics and examples of the use of biomarkers in risk assessment and diagnosis, day-to-day challenges and best practices in clinical laboratories.

We hope that during this meeting and the planned social programme, you will meet and make friends and establish important future connections with colleagues in the field of clinical chemistry. We are very much looking forward to seeing you in Helsinki in 2018!

On behalf of the Organizing Committee
Solveig Linko

ACUSERA 24•7 Live Online

QC software with real-time peer group statistics

Now automatically calculating Uncertainty of Measurement & Sigma Metrics

www.randox.com/acusera-24-7-interlaboratory-data-management

RANDOX
QUALITY CONTROL

marketing@randox.com

Validation and verification in clinical chemistry

Elvar Theodorsson, Department of Clinical Chemistry and Department of Clinical and Experimental Medicine, Linköping University, Linköping, Sweden
elvar.theodorsson@liu.se

Abstract
Measurement systems used in clinical chemistry are usually manufactured by international companies working according to in vitro directive (IVD) – regulations. This means that medical laboratories do not need to validate commercially available measurement systems, but are obliged to verify that their properties found during the producers validation can be reproduced in the users laboratories. Developments in healthcare and accreditation standards including ISO 15189 focus increasingly on customer needs which may call for the validation of entire conglomerates of laboratories and measurement systems catering for the needs for the same patient population. Such validation practices are, however, still in their infancy.

The purpose of the present paper is to offer practical details on the common practice of verification of single measurement systems and add perspectives on the validation of conglomerates of laboratories and measurement systems. Method validation across conglomerates of laboratories using verified commercially available measurement systems can only be performed by the laboratories – users themselves in their own circumstances. The use of patient samples in split- sample techniques is especially valuable in this contexts in order to avoid compatibility issues.

Introduction

Validation and verification of measurement methods are procedures aiming at establishing realistic expectations with the analyst and confidence with the end-user that the methods are fit for the intended purposes (1, 2).

Measurement systems already validated by their manufacturers need only to be *verified* by the end users in their own circumstances. Verification means that the users study the bias and imprecision of the measurement system and compare their results with the ones observed by the manufacturers during their validation (1, 3-11).

The basic principles and procedures of validation are shared amongst all fields of bioanalysis with some differences in emphasis depending on the particular fields of work (12-14). In the early 1990s the U.S. Food and Drug Administration (FDA) initiated and supported conferences and harmonization work on bioanalytical method validation which in 2001 resulted in the guidelines "FDA Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation" (13, 15). This document is widely used as standard reference for validation of bioanalytical measurement methods in addition to the European EMA Guidelines on Validation of Bioanalytical Methods (16) and the Eurachem guide for method validation (17).

There are theoretically no limits to the extent of validation and verification procedures, but also substantial time- and economic constraints in practice. It is therefore crucial that verification and validation efforts are optimized in order to minimize their cost/benefit ratio.

Method verification

Single laboratory method validation is not needed when a measurement system is manufactured by a company or other responsible source which has performed proper method validation (18, 19) and is providing you with the detailed results of that validation. A study of the bias and imprecision of the new measurement system is needed, establishing whether you are able to reproduce in your own laboratory the data found by the company during method validation.

The most common instance of method verification is when old measurement systems are replaced by new. This is the example dealth with here.

Verifying bias and imprecision

Measurement *bias* is a quantitative concept - the "closeness of agreement between the average of an infinite number of replicate measured quantity values and a reference quantity value" (12). *Trueness* is the corresponding qualitative concept for bias.

Measurement *precision* is a qualitative concept - the "closeness between indications or measured quantity values obtained by replicate measurements on the same or similar objects under the specified conditions of measurement" (12). The quantitative expression of precision is *imprecision* - the standard deviation (SD) or the relative standard deviation (CV/ CV %) of a method.

Method A can be qualitatively expressed to be more or less precise than method B. But when you need to quantify precision, we measure its opposite – the imprecision – by repeated measurements of control- or patient samples.

Measurement *accuracy* is a qualitative concept describing the "closeness of agreement between a measured quantity value and a true quantity value of a measurand" (12). It encompasses both systematic and random error components.

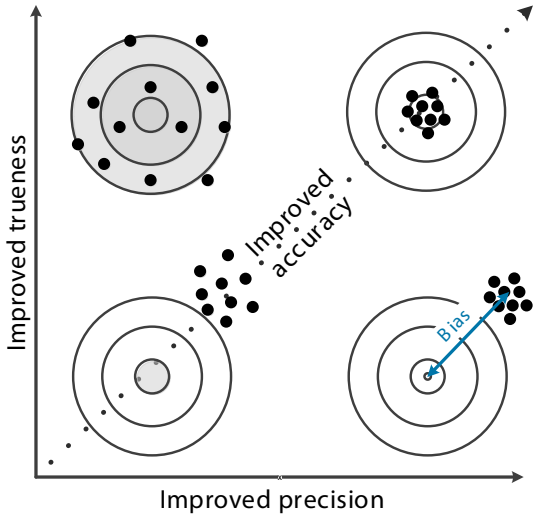


Figure 1: *A graphical illustration (using target analogy) of the qualitative concepts precision and trueness and their combination accuracy. Bias is decreased by increased trueness and precision improved by decreasing imprecision. Accuracy can be improved by improving precision or trueness or both.*

Verification practices have been established over time and are frequently influenced by accreditation- and certification authorities. There is by now a general agreement on what is required (1, 9-11) and supported by guidelines including CLSI EP15 (3) and EP9(20). The European IVD directive (19, 21) requires that the in vitro diagnostic device in the hands of its end users must achieve the performance stated by the manufacturer including analytical sensitivity, limits of detection, diagnostic sensitivity, analytical specificity, diagnostic specificity, accuracy, repeatability, reproducibility and control of known relevant interferences. In practice user verification is usually restricted to comparison of methods experiments to establish bias, replication experiments to establish imprecision and a linearity check to determine the reportable range and sometimes analysing reference samples to verify the reference interval.

Estimating bias

At least 20 natural patient samples having as wide concentration range as possible are commonly measured using both the method being replaced and the new method. Stable materials for internal quality control with known expected concentrations are also measured to estimate imprecision and preferably also appropriate reference materials as independent measures of bias. Larger number of samples than 20 may, however, be required if minute differences between the old and the new method need to be estimated.

The results of the measurements are summarized using bias- Bland-Altman plot and orthogonal/ Deming regression as described below.

Estimating imprecision

Suitable stable materials for internal quality control are measured at two concentration levels in at least 2 replicates for at least 5 consecutive days for estimating imprecision and for establishing initial control limits for the internal quality control procedures.

Summarizing the results

Orthogonal linear regression (22, 23), bias-plot (24, 25) and analysis of variance (26, 27) techniques are used to determine bias, imprecision, matrix effects etc. An example is given below of the results of the analysis of 20 patient samples using two measurement systems. SigmaPlot 12.5 (https://systatsoftware.com/) was used for the purpose in this manuscript, but Analyse-

it (https://analyse-it.com) SPSS (http://www.ibm.com/analytics/us/en/technology/spss/) and MS Excel (https://www.microsoft.com) are examples of highly appropriate alternatives.

Raw data

The raw data used in the current example are listed below

Method 1	Method 2
1,99	2,22
5,03	5,22
1,48	1,78
2,35	2,76
3,25	3,37
3,24	3,39
2,13	2,43
1,12	1,4
1,93	2,11
1,91	2,23
1,36	1,61
0,89	1,03
1,44	1,59
1,66	1,85
2,42	2,59
3,64	3,71
2,44	2,61
1,48	1,6
2,37	2,51
4,33	4,35

Bias plot = Bland-Altman plot

The main purpose of the bias/Bland-Altman graph is to facilitate the graphical interpretation of the data by showing an expanded view of the distribution of the differences between the measurement methods along the entire plotting space. An advantage of the bias/Bland-Altman graph compared to common linear regression is that it uses the entire space available in the graph to illustrate the differences found. In the ordinary linear regression depicted above, most of the space available for the graph is blank since the two methods normally show very similar results distributed along the equal line. The mean of the differences should also be calculated. Optionally the mean difference for each quartile of the data may be calculated to express proportional error and also the "limits of agreement" for the difference data – the mean of the difference (bias) ± 1.96 * standard deviation of the difference (24, 25, 28-30). In Figure 2, the confidence limits are also provided.

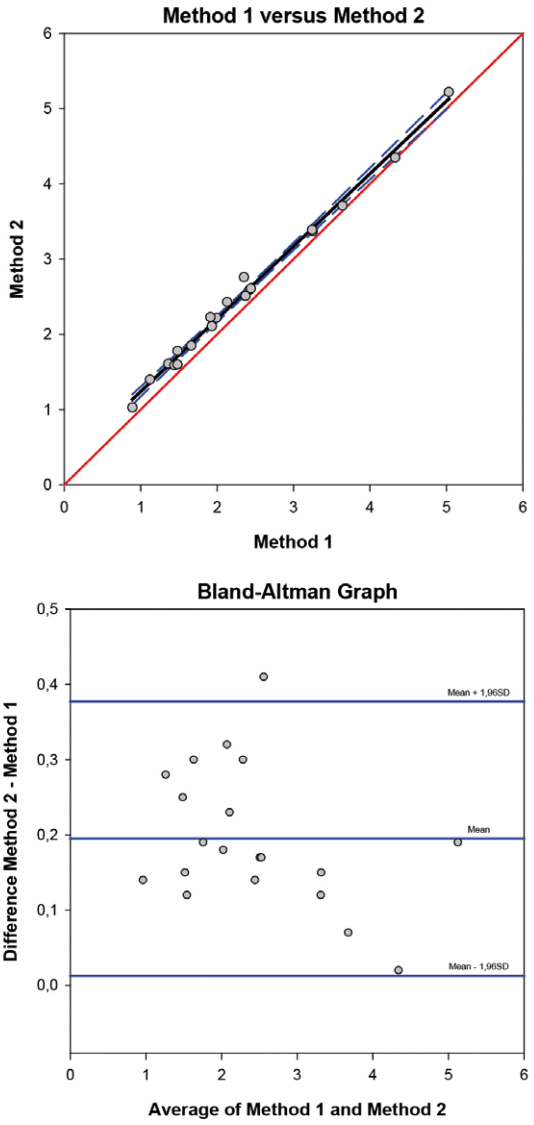


Figure 2: *Bias/Bland-Altman plot (SigmaPlot 12.5) used for summarizing the bias when comparing two measurement methods. The upper graph is an ordinary linear regression which also depicts the equal line in red. The lower graph is the bias/Bland-Altman plot proper which shows the difference between the two measurement methods on the Y-axis and the average of the measurement results of the two methods depicted on the X-axis.*

Ortogonal regression/Deming graph

In ordinal regression commonly available in statistical packages MS Excel etc., all the error are taken to be found in the data on the Y-axis (in the vertical direction) (Figure 3). The regression line is drawn in order to minimize the sum of squared distance from the data points to the regression line in the vertical direction. This method makes for convenient formulas for calculation, but is only fully appropriate in method comparison studies when the method plotted on the X-axis is substantially metrologically superior to the method plotted on the Y-axis, e.g. when comparing a routine method to isotope-dilution masspectrometry.

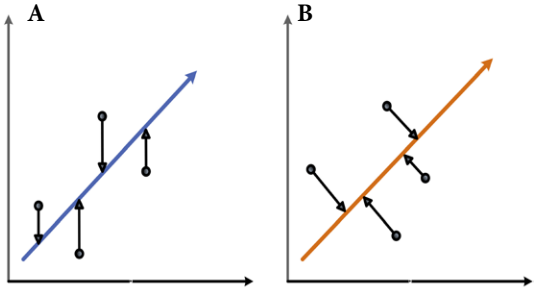


Figure 3: *The basic principles of ordinary linear regression (A) compared to orthogonal/Deming regression (B). The sum of squared distances in the vertical direction is minimized in the ordinary linear regression (A) whereas the sum of the squared distances perpendicular to the regression line (B) is minimized in orthogonal/Deming regression.*

Whan comparing an old method (plotted on the X-axis) with a new method (plotted on the Y-axis) there are ample reasons to suppose that the new method is at least as accurate as the old method. It is therefore reasonable to use orthogonal regression which supposes that the errors occur in both the old and in the new method.

Simple Deming

Regression

fredag, november 04, 2016, 10:26:16

Data Source: Data 1 in Metodjämförelse

X-data: 1-A

Y-data: 2-B

Standard deviation for each X-measurement: 1,0000

Standard deviation for each Y-measurement: 1,0000

Number of observations 20

Number missing 0

Data correlation coefficient 0,9967

Chi-square statistic 0,0710

Reduced chi-square 0,0039

Degrees of freedom 18

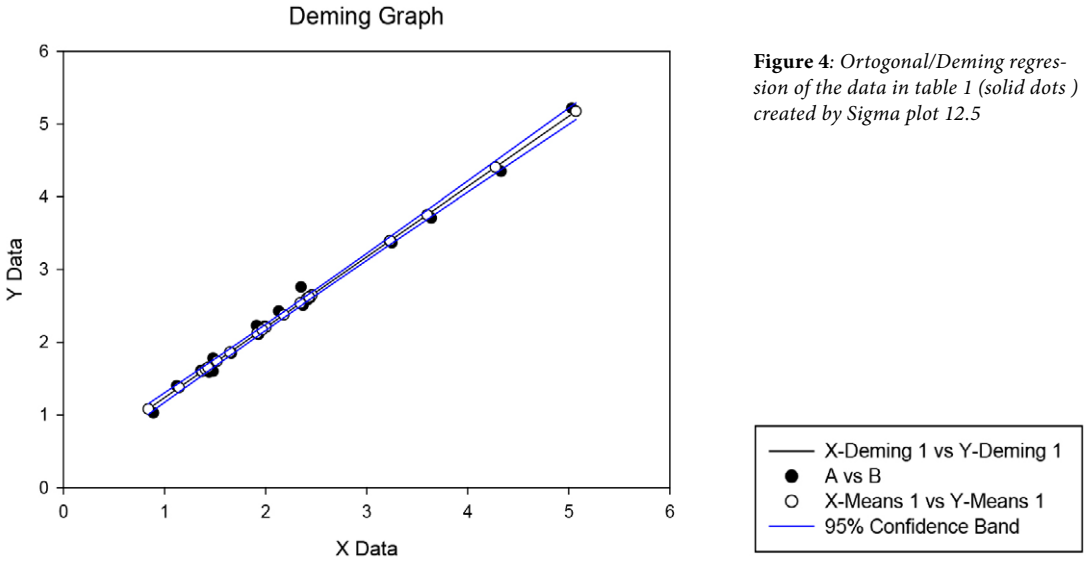


Figure 4: *Ortogonal/Deming regression of the data in table 1 (solid dots) created by Sigma plot 12.5*

	Coefficient	Std. Error	95% Conf-L	95% Conf-U
Intercept	0,2688	0,0473	0,1693	0,3682
Slope	0,9683	0,0186	0,9293	1,0072

The standard deviation for each observation is only known up to some common scaling factor. The standard errors for the parameters have been corrected by an estimate of this factor, the square root of the reduced chi-square.

Hypothesis Testing:
Test for slope = 0
F = 5295,9198 **P** = <0,0001

Test for slope = 1
F = 2,8469 **P** = 0,1088

Table 2: *The parameters of the ortogonal/Deming regression as calculated by SigmaPlot 12.5.*

Recalculating results
For the data above (tables 1 and 2) the slope of the Deming regression line is 0,9683 and the intercept on the Y-axis is 0,2688. This means that if you are measuring samples for a study which extends in time over the change of methods you will multiply the results performed with the new method by 0,9683 and add 0,2688 in order to transform all results to the same measurement level as the one which existed during the time period of the old method.

Provided you wish to transform the results of the old method to the results performed with the new method you subtract 0,2688 from the results of the old method and divide by 0,9683.

Commutability

Commutability is basically a characteristic of samples which expresses their ability to result in very similar measurement results using different measurement systems. More formally it is a property of a material/sample demonstrated by "the closeness of agreement between the relation among the measurement results for a stated quantity in this material, obtained according to two given measurement procedures, and the relation obtained among the measurement results for other specified materials". (31). Natural patient samples are by definition commutable.

When comparing measurement methods during verification and validation, it is crucial to include natural patient samples as commutable materials in a very substantial part of the the procedures in order that the results ultimately measured in the patient samples are comparable.

Medical laboratories process very substantial number of patient samples and have usually material to spare that can be used for maintaining and increasing the quality of the measurement methods used in the laboratory. Medical laboratories therefore have through the availability of patient samples a very substantial advantage compared to the manufacturers of measurement systems and methods when it comes to the availability of patient samples in their quality processes.

Method validation

Method validation (13, 16, 17) is commonly thought of as a highly standardized single linear process, when it actually consists of several dimensions of repetitive sub-processes as depicted in figure 5.

In addition to the repetitive sub-processes for optimation, there are a number of principally different validation processes appropriate for the context that the method(s) will be used in as follows.

Single laboratory method validation
Single laboratory method validation is appropriate when one method is used for a specific purpose in one laboratory (13, 16, 17). This is the type of validation provided by manufacturers to end-users.

Full method validation
Full method validation in a conglomerate of laboratories includes, in addition to the procedures of single laboratory validation, a study of the fitness for purpose of measurement systems in a number of locations, several operators etc. including a study of the performance characteristics of the measurement systems over extended periods of time including the effects of lot-to-lot variations etc.

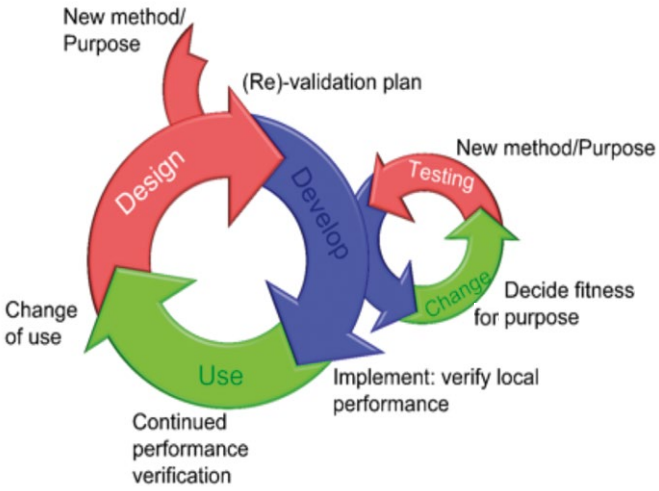


Figure 5: *The sub-processes of method validation. Subsequent to receiving a proposal for a new method a process of method design, followed by method development takes place. The development process in itself is also an iterative process of testing and change (shown to the right) in order to optimize the fitness for purpose of the method. Continued performance testing during the use of the method in practical situations may show need for improvements that subsequently serve as input in a new design process which serves as bases for a new development cycle. Such new cycle is also warranted when the method is put to use in new circumstances. Redrawn figure. Copyright © 2007 LGC Limited – All Rights reserved. Material reproduced from 'Method Validation: Principles and Practice' seminar (September 2007) by permission of LGC Limited. No part of this material may be reproduced without LGC Limited's express consent.*

Full diagnostic validation

Full diagnostic validation is used for establishing the diagnostic properties of the method in health and disease (32-34). It is a major research undertaking demanding that the diagnosis in question is independently established by other methods than the one being tested. It is usually performed by a research team using a single measurement system in order to reduce measurement uncertainty. In contrast, when the method is used in real-life healthcare circumstances, sample from the same patient are likely to encounter several measurement systems with bias and imprecision profiles substantially different from the ones encountered during the original full diagnostic validation study. These properties are commonly more unfavourable regarding diagnostic properties.

Galen and Gambino (35) pioneered in establishing the statistical and epidemiological principles of full diagnostic method validation and showed that "common sense" interpretation of data prevalent in clinical medicine should be replaced by rational principles. Recent excellent literature in the field includes the books by Pepe (36) and Zhou et al. (37).

The basis of characterizing diagnostic performance is to have a well-accepted gold standard for the diagnosis and estimating how well the diagnostic method being validated performs in relation to the gold standard method. Data are depicted in a classical 2x2 table (Figure 7) and the parameters/concepts depicted and defined in table 1 are calculated.

Diagnostic validation in conglomerates of laboratories

Diagnostic validation in conglomerates of laboratories investigates to what extent a conglomerate of measurement systems that samples from a patient are likely to encounter can reproduce the conditions that existed during the original full diagnostic validation. Included in the diagnostic validation are also estimates of the pre- and postanalytical errors which are encountered using systems for registering the incidence of non-conformance. The author is not aware of any reported full diagnostic validation of a conglome-

	Participants			
	With disease	**Without disease**		
Positive test	True positives	False positives (type I error)	Total positive	[PPV]
Negative test	False negatives (type II error)	True negatives	Total negative	[NPV]
	Total with disease	Total without disease		
	[Sensitivity]	[Specificity]		

Figure 6: *A 2x2 table serving as basis for calculating sensitivity, specificity, predictive values and likelihood ratios (Table 1). PPV = positive predictive value, NPV=negative predictive value.*

rate of laboratories, and is not aware of any guidelines or standards for the purpose. It is, however, evident that the sensitivity, specificity, predictive values etc. of measurement results produced by a conglomerate of laboratories may differ from those found during the original full diagnostic validation because the overall measurement uncertainty is larger. In practice conglomerates of laboratories therefore focus on minimizing bias amongst their measurement systems and their imprecision.

Full method validation depends on the healthcare and laboratory organizations

Healthcare laboratories are commonly organised into larger laboratory conglomerates encompassing several physical laboratories catering for diagnostic services for a defined population. This caters for important new opportunities for re-defining the concept of a "laboratory" to encompass all laboratories and measurement methods measuring the same measurand for a population of patients.

A single laboratory validation/verification is sufficient if the same measurement system is always used when analysing all samples from a population of patients (situation "B" in figure 7). However, only one measurement system used for measuring patient samples is seldom the case in clinical chemistry. Patients are commonly diagnosed and treatment combined with monitoring initiated at large University hospitals to be continued at a smaller hospital and one or two primary health-care physicians (Figure 7.)

Summary

Verification of measurement methods already validated by manufacturers is amongst the most common activities in medical laboratories. A practical procedure for verification using at least 20 natural patient samples and measuring stable control samples during one week is presented here, sufficient for most situations. Measurement systems are used in a plethora of different situations where a sample for a patient may encounter several measurement systems over

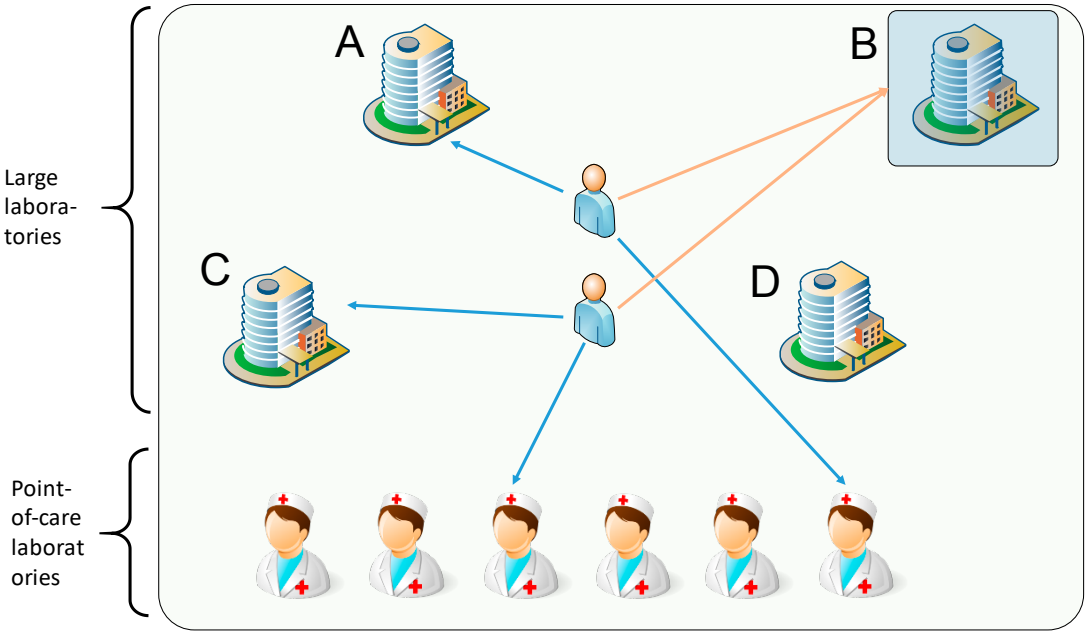


Figure 7: *The consequences of a conglomerate of laboratories catering for a patient population compared to a single laboratory. Hospital laboratory B caters for all samples for measuring a certain analyte. Validation of the single laboratory method validation established by the manufacturer is in this case sufficient. In the case of other analytes measured in more than one hospital laboratory and point of care, there are ample reasons to validate the fitness for purpose for diagnosing and monitoring treatment effects of the conglomerate of laboratories.*

time. Full diagnostic validation of the entire conglomerates of laboratories may become increasingly in demand as healthcare becomes increasingly aware of the need to make sure that the diagnostic properties including reference intervals and decision limits are optimal within conglomerates of laboratories. The use of patient samples in split-sample techniques is especially valuable in this contexts in order to avoid compatibility issues.

References

1. Theodorsson E. Validation and verification ofmeasurement methods in clinical chemistry. Bioanalysis 2012;4:305-20.
2. Theodorsson E, Magnusson B, Leito I. Bias in clinical chemistry. Bioanalysis 2014;6:2855-75.
3. CLSI. EP15-A2 User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
4. Braga F, Panteghini M. Verification of in vitro medical diagnostics (IVD) metrological traceability: responsibilities and strategies. Clin Chim Acta 2014;432:55-61.
5. Dybkaer R. 'Verification' versus 'validation': a terminological comparison. Accredit Qual Assur 2011;16:105-8.
6. Jansen R, Schumann G, Baadenhuijsen H, Franck P, Franzini C, Kruse R, et al. Trueness verification and traceability assessment of results from commercial systems for measurement of six enzyme activities in serum: an international study in the EC4 framework of the Calibration 2000 project. Clin Chim Acta 2006;368:160-7.
7. Sutarno R, Steger H. The use of certified reference materials in the verification of analytical data and methods. Talanta 1985;32:439-45.
8. Haeckel R. Verification, validation and evaluation of analytical procedures in laboratory medicine. Clin Chem Lab Med 2004;42:111-2.
9. Burnett D. Measurement verification in the clinical laboratory: A guide to assessing analytical performance during the acceptance testing of methods (quantitative examination procedures) and/or analysers. London: The Association for Clinical Biochemistry, http://www.acb.org.uk/docs/default-source/committees/scientific/guidelines/measurement-verification/David_Burnett_Editorial.pdf; 2010.
10. Kallner A. On the comparison and verification of measurement results. Klinisk Biokemi i Norden. 2011;4:40-6.
11. Khatami Z, Hill R, Sturgeon C, Kearney E, Breadon P, Kallner A. Measurement verification in the clinical laboratory: A guide to assessing analytical performance during the acceptance testing of methods (quantitative examination procedures) and/or analysers. London: The Scientific Committee of the Association for Clinical Biochemistry, http://www.acb.org.uk/docs/default-source/committees/scientific/guidelines/measurement-verification/Measurement_verification_final_090608.pdf; 2010.
12. JCGM. International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM 3), http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_200_2008.pdf. 3 edition ed: Bureau International des Poids et Mesures; 2008.
13. FDA. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA) 2001. Available from: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf.
14. Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, et al. Workshop/conference report - Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: Best practices for chromatographic and ligand binding assays. Aaps J 2007;9:E30-E42.
15. Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, et al. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. Pharm Res 2007;24:1962-73.
16. Agency EM. Guideline on bioanalytical method validation. London 2011.
17. Magnusson B, Örnemark U. Eurachem Guide:

The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Available from www.eurachem.org.". Eurachem; 2014.
18. FDA. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation, www.fda.gov/downloads/ Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ Guidances/UCM070107.pdf. Rockville: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER),Center for Veterinary Medicine (CVM); 2001. Available from: www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance- ComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf.
19. EU. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices, http:// eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ. do?uri=CELEX:31998L0079:EN:NOT. Eur-Lex, http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUri-Serv.do?uri=CELEX:31998L0079:EN:NOT;1998.
20. CLSI. EP9-A2 Method Comparison and Bias Estimation using Patient Samples Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
21. Stankovic AK, Romeo P. The role of in vitro diagnostic companies in reducing laboratory error. Clin Chem Lab Med 2007;45:781-8.
22. Passing H, Bablock W. Comparison of several regression procedures for method comparison studies and determination of sample sizes. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part II. J Clin Chem Clin Biochem 1984;22:431-45.
23. Deming WE. Statistical adjustment of data. John Wiley & Sons, Inc. 1943.
24. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1986;I:307-10.
25. Altman DG, Bland JM. Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies. Statistician 1983;32:307-17.
26. Aronsson T, Groth T. Nested control procedures for internal analytical quality control. Theoretical design and practical evaluation. Scand J Clin Lab Invest 1984;44:51-64.
27. Kallner A. Laboratory statistics : handbook of formulas and terms. First edition. ed. Amsterdam: Elsevier; 2014. xiv, 139 pages p.
28. Bland J, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. Statistical methods in medical research. 1999;8:135-60.
29. Altman DG, Bland JM. Comparing methods of Measurement. Applied Statistics. 1987;36:224-5.
30. Altman DG, Bland JM. Commentary on quantifying agreement between two methods of measurement. Clin Chem 2002;48(5):801-2.
31. (ISO) IOfS. In vitro diagnostic medical devices— measurement of quantities in biological samples—metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization (ISO); 2003.
32. Bossuyt PM, Reitsma JB, Linnet K, Moons KG. Beyond diagnostic accuracy: the clinical utility of diagnostic tests. Clin Chem 2012;58:1636-43.
33. Bossuyt PM, Cohen JF, Gatsonis CA, Korevaar DA, group S. STARD 2015: updated reporting guidelines for all diagnostic accuracy studies. Ann Transl Med 2016;4:85.
34. Moons KG, de Groot JA, Linnet K, Reitsma JB, Bossuyt PM. Quantifying the added value of a diagnostic test or marker. Clin Chemistry. 2012;58:1408-17.
35. Galen RS, Gambino SR. Beyond normality: The predictive value and efficiency of medical diagnoses. John Wiley and Sons. 1975.
36. Pepe MS. The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction. Oxford: Oxford University Press; 2003. xvi, 302 p. p.
37. Zhou X-h, Obuchowski NA, McClish DK. Statistical methods in diagnostic medicine. New York: Wiley-Interscience; 2002. xv, 437 p. p.

thermoscientific EliA

Focus on diagnostics of autoimmune thyroid diseases

Fully automated tests for thyroid autoantibodies EliA™ anti-TSH-R, EliA anti-TPO, and EliA anti-TG

We have extended our EliA thyroid test panel with the release of EliA anti-TSH-R measuring thyroid stimulating hormone receptor (TSH-R) autoantibodies. The combination of all 3 tests provides reliable diagnostic guidance in autoimmune thyroid diseases.
The tests can be easily integrated into lab routine as they are performed on the fully automated Phadia™ Laboratory Systems.

Just add EliA anti-TSH-R, EliA anti-TPO and EliA anti-TG and start testing.

Find out more at **thermofisher.com/EliA**

ThermoFisher SCIENTIFIC

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 21 67 32 80
no.idd@thermofisher.com

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

Continuous quality control of the blood sampling procedure using a structured observation scheme

Tine Lindberg Seemann, Mads Nybo
Department of Clinical Biochemistry and Pharmacology, Odense University Hospital, Denmark
mads.nybo@rsyd.dk

First published in Biochemia Medica 2016;26(3):337-45.


Introduction

The ongoing vast automation of the laboratories helps reducing the number of errors related to the laboratory, but preanalytical errors remains a challenge, and studies has reported that up to 75% of laboratory errors occur in the preanalytical phase (1,2,3), where the blood sampling procedure is a pivotal area: It is well-known that phlebotomy errors can influence the diagnosis and also affect patient care in a harmful way (4,5), and recent reports on the un-harmonised training in European countries of the personnel performing phlebotomy (6) and the lack of adherence to guidelines by e.g. the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (7) and the International Organization for Standardization (ISO) (8) is therefore alarming (9). The European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PRE) has therefore recommended monitoring phlebotomy quality regularly in order to ensure the quality of the blood collection procedure (9). Quality control (QC) of phlebotomy is however challenging because errors associated with phlebotomy covers a variety of aspects such as patient/sample misidentification, prolonged use of tourniquet, inadequate patient preparation, low blood collection volume, and impeded healthcare worker safety (3). A structured QC assessment of the blood sampling procedure is therefore needed: This will not only assure the blood sampling quality, but also enable documentation of the sampling quality, and last but not least assessment of untrained personnel will make it possible for the laboratory organization to ensure the blood sample quality for *all* samples arriving at the laboratory as requested in the ISO 15189:2012.

A continuous QC of the blood sampling procedure was introduced at our university hospital using a structured observation scheme as suggested by the EFLM WG-PRE (9). The hypotheses were that i) an observational QC would enable identification of some critical issues in the blood sampling procedure, and ii) implementation of corrective actions (education of the staff) would result in better adherence to the guidelines. The aim of our study was to assess the level of compliance with the local phlebotomy guideline, to investigate if the tool could help identifying necessary focus items, and finally to study whether continuous QC of the phlebotomy procedure over time would improve adherence to the phlebotomy guideline.

Materials and methods

The investigation was conducted at Odense University Hospital, Denmark, as an observational study in two phases: a pilot study and a follow-up study.

Pilot study

All staff members performing phlebotomy at Department of Clinical Biochemistry and Pharmacology, Odense University Hospital, Denmark, were observed. At Odense University Hospital the vast majority of blood samples are drawn by professionally trained laboratory technicians, an education that includes

specialised training in phlebotomy. Blood sampling takes place at either the outpatient phlebotomy ward or at the hospital wards, but are carried out by the same phlebotomist staff. Due to work rotation all phlebotomists were not observed the exact same number of times.

During a three-month period (September – November 2014) blood sampling was observed at the outpatient phlebotomy unit and at the hospital wards, respectively. Three blood collections by the same phlebotomist were observed at each session, and all observations were performed by the same trained staff specialist (Tine Lindberg Seemann) using a structured checklist.

The observation checklist for phlebotomy QC was constructed based on the scheme designed by the EFLM WG-PRE (9) and adjusted to local procedures resulting in an observation scheme containing 19 observation items (Figure 1). Observation item #2 concerning patient identification was mandatory to be correct, as it was assessed as potentially severely harmful. If patient identification was performed incorrect, the observer intervened immediately and assured correct identification. Otherwise, this was strictly an observational study without interruption by the observer. Results were recorded as yes/no for all phlebotomists in each setting and later calculated for the two settings, respectively.

Follow-up study

Based on the pilot study the observation scheme was optimised by removing four items that was all correctly performed in the pilot study and altering one item resulting in a new observation scheme containing 15 items (Figure 2). The follow-up study was performed during a three-month period (January – March 2016) by the same procedure as described for the pilot study except the alteration that only two blood samplings were observed at each session (for logistic reasons).

Statistical analysis

The results of the observational study are reported as percentage incorrect phlebotomies per item out of the total number of observations, reported for the phlebotomy ward and the hospital wards, respectively.

Differences between results at the two settings (the phlebotomy ward and the hospital wards) were analysed with Fisher's exact test. Also, changes in observations between the pilot study and the follow-up study was analysed using Pearson's Chi-Square test. A p-value < 0.05 was considered significant; analysis was performed using GraphPad Prism 6 (La Jolla, California, USA).

Results

Pilot study

A total of 126 phlebotomies, 59 at the phlebotomy ward and 67 at the hospital wards, were performed by 39 different phlebotomists. The errors are shown in Figure 3.

- At the phlebotomy ward, the most frequent error was performing hand hygiene contrary to the described procedure (item #3, 42%). Second-most

Foto: Henrik Alfthan.

Quality control on blood sampling Dept. of Clinical Biochemistry and Pharmacology Odense University Hospital		
Observer		
Date		
Phlebotomist		
Sample No	**YES**	**NO**
Item # 1 Is the requisition correctly filled out?		
Item # 2 Was the patient identified according to the CLSI guideline?		
Item # 3 Was the instruction for correct hand hygiene followed?		
Item # 4 Did the phlebotomist assure that the patient was properly prepared (e.g. fasting)?		
Item # 5 Was the tourniquet placed correctly?		
Item # 6 Did the phlebotomist select a suitable venipuncture site?		
Item # 7 Was an appropriate venipuncture device used (not a Safety-Lok™ Blood Collection Set)?		
Item # 8 Was the venipuncture site disinfected properly?		
Item # 9 Was the alcohol allowed to evaporate before the venipuncture?		
Item # 10 Did the venipuncture site remain untouched after disinfection?		
Item # 11 Did the phlebotomist assure that the fist was not clinched when blood flow began?		
Item # 12 Was the tourniquet released immediately after blood flow began?		
Item # 13 Was the correct order of draw followed?		
Item # 14 Were the blood tubes filled properly?		
Item # 15 Were all blood tubes mixed immediately after sampling?		
Item # 16 Was a cotton ball or gauze placed over the venipuncture site after sampling?		
Item # 17 Were syringes etc. disposed correctly immediately after sampling?		
Item # 18 Was the patient advised not to bend the arm?		
Item # 19 Were the tubes labelled in presence of the patient?		

Quality control on blood sampling Dept. of Clinical Biochemistry and Pharmacology Odense University Hospital		
Observer		
Date		
Phlebotomist		
Sample No	**YES**	**NO**
Item # 1 Was the patient identified according to the CLSI guideline?		
Item # 2 Was the instruction for correct hand hygiene followed?		
Item # 3 Did the phlebotomist assure that the patient was properly prepared (e.g. fasting)?		
Item # 4 Was the tourniquet placed correctly?		
Item # 5 Was an appropriate venipuncture device used (not a Safety-Lok™ Blood Collection Set)?		
Item # 6 Was the venipuncture site disinfected properly?		
Item # 7 Was the alcohol allowed to evaporate before the venipuncture?		
Item # 8 Did the venipuncture site remain untouched after disinfection?		
Item # 9 Was the tourniquet released immediately after blood flow began?		
Item # 10 Was the correct order of draw followed?		
Item # 11 Were the blood tubes filled properly?		
Item # 12 Were all blood tubes mixed immediately after sampling?		
Item # 13 Was the venipuncture site inspected for bleeding before the patient left?		
Item # 14 Were syringes etc. disposed correctly immediately after sampling?		
Item # 15 Were the tubes labelled in presence of the patient?		

◀ **Figure 1.**
The questionnaire used in the pilot study.

▲ **Figure 2.**
The questionnaire used in the follow-up study.

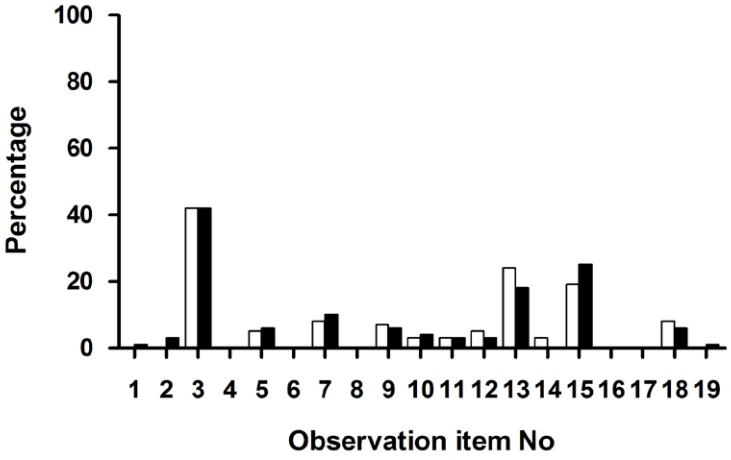


Figure 3.
Results from the pilot study. The numbers on the abscissa refer to the observation items in Figure 1. White bars: Blood sampling item conducted erroneously at the phlebotomy ward; black bars: Blood sampling item conducted erroneously at hospital wards.

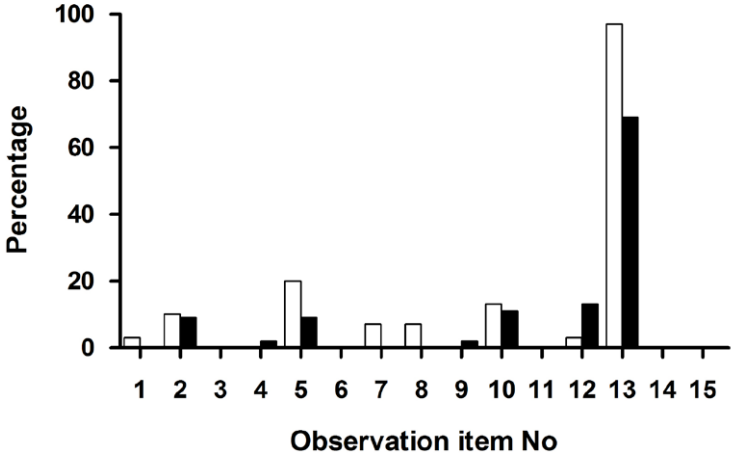


Figure 4.
Results from the follow-up study. The numbers on the abscissa refer to the observation items in Figure 2. White bars: Blood sampling item conducted erroneously at the phlebotomy ward; black bars: Blood sampling item conducted erroneously at hospital wards.

frequent was that 24% did not follow the correct order of draw (item #13), followed by improper mixing of samples by 19% (item #15).

- At the hospital wards, the most frequent error was also 42% performing hand hygiene erroneously (item #3), while the second-most frequent was the 25% that did not mix the samples properly after drawing blood (item #15). Finally, 18% did not follow the correct order of draw (item #13). An infrequent, but crucial error is the patient identification process, which was performed incorrect in two instances at the hospital wards.

Altogether, the three most frequent errors were identical at the two settings. Two of them did however differ significantly between the two phlebotomy settings, as incorrect order of draw were more frequent at the phlebotomy ward (p=0.04), while mixing of tubes were more frequent at the hospital wards (p=0.04). No other errors differed significantly between settings.

Follow-up study

In the follow-up study, a total of 84 phlebotomies, 30 at the phlebotomy ward and 54 at the hospital ward, were performed by 34 different phlebotomists. The errors are shown in Figure 4.

- At the phlebotomy ward, the by far most frequent error was the new item #13, where only one out of thirty inspected the venipuncture site for bleeding before sending the patient off (Figure 4). The second-most frequent error was that 20% did not use the appropriate venipuncture device (item #5),

followed by item #10, where 13% did not use the correct order of draw. At one phlebotomy session, the patient identification process was not performed correct.

- At the hospital wards, the most frequent error was also the new item #13 with 69% not inspecting the venipuncture site correctly. The second-most frequent was item #12, where 13% did not mix the samples properly after drawing, followed by 11% that did not use the correct order of draw (item #10).

The error frequencies that differed significantly between the two phlebotomy settings (phlebotomy ward and hospital ward) were items #13 (p=0.01), #12 (p=0.02), and #5 (p=0.03).

Differences between the pilot study and the follow-up study

The number of phlebotomies with improper hand hygiene were significantly lower in the follow-up study, namely 10% vs 42% (both settings) in the pilot study (p<0.01). Also, lack of tube mixing improved from 19% at the phlebotomy ward to 3% (p<0.01) and from 25% at the hospital wards to 13% (p=0.01). Finally, the number of erroneous order of draw declined significantly from 21% (mean for both settings) to 12% (p=0.01). Unfortunately, the number of samplings using the improper venipuncture device (according to the standard operating procedure) increased significantly from 8% to 20% at the phlebotomy ward (0=0.01), while remaining unaltered at the hospital wards.

Discussion

This observational study describes a continuously used phlebotomy QC system based on the EFLM WG-PRE guideline (9), first during an implementation phase and later in a follow-up phase. The pilot study revealed a number of items in need of focused attention and increased staff teaching, while the follow-up study showed significant improvement for the three major issues found in the pilot study, namely hand hygiene, order of draw and mixing of samples. The QC therefore seems to enable the laboratory to focus on critical key issues, improve sampling quality, and to ensure documentation of the sampling QC.

In the pilot study, hand hygiene was performed erroneously in 42% of the phlebotomies performed at both settings, while the follow-up study showed that the error rate had declined significantly to 10%. In comparison, the EFLM WG-PRE study revealed that 25.8% of the observed phlebotomies deviated from the procedure recommended by CLSI regarding hand hygiene (9). As the error frequency was the same at the phlebotomy ward and at the hospitals ward, the major reason does not seem to have been availability of hand sanitizer, which one could have suspected, but rather missing alertness on the issue. Hand hygiene is traditionally regarded as the single most important infection prevention, and all control measures available must therefore be instituted to improve adherence to the guidelines on this issue. Routine hand hygiene audit by direct observation has been recommended in order to identify local problems and improve practice (10). This is however not specifically related to blood sampling, but rather to health care personnel in general and nurses in particular, where implementation of automated group monitoring has been shown to improve hand hygiene (11). Compatible with this we found a significant improvement using the continuous observational QC described here along with a dedicated focus on the issue.

Another frequent error was the order of draw, where 21% did not follow the correct procedure in the pilot study (24% at the phlebotomy ward and 18% at the hospital ward). There are no good explanation for the significantly higher proportion of incorrect draw-order at the phlebotomy clinic compared to the hospital wards (p=0.03) as one would expect it to be the opposite due to working conditions etc. However, the actual difference in numbers are quite low (14 vs 12 phlebotomies), so it could be a coincidental difference. After the issue was addressed specifically, the frequency of incorrect order of draw fell to 13% at the phlebotomy ward and 11% at the hospital ward. This is a little higher than the error frequency found in the EFLM study (9), where 8.1% did not follow the correct order of draw, and a new procedure has therefore recently been introduced, where the order of draw is shown at the labels following the requisition, which makes the correct order more evident. The importance of a specific order of draw as recommended in the CLSI guideline H3-A6 (7) has often been questioned, and some studies has indicated that incorrect order of draw under ideal phlebotomy conditions does not cause contamination if a closed blood collection system is used (12,13). It is however evident that a significant frequency of sample contamination does occur (14,15), and as this study shows ideal phlebot-

omy conditions are not always present. It is therefore generally recommended to follow the order of draw as stated in the CLSI guideline H3-A6, which is also the procedure at our laboratory.

The third-most frequent error was improper mixing of the samples: 19% did not perform this appropriately at the phlebotomy ward, while the number was 25% at the hospital ward. In comparison, the error frequency in the EFLM study for this item was 30.4% (9). The significant difference between the phlebotomy settings could indicate that the working conditions at the phlebotomy ward are more aligned with proper laboratory standards, whereas sampling at the hospital wards often are performed under more tumultuous conditions. The blood sampling QC offers a possibility to document a possible critical impact on the sampling procedure and the following analysis result. Therefore, the fact that blood sampling conditions are challenging at the hospital wards can be documented in order to obtain optimal working conditions for the phlebotomists. Studies have shown that especially for coagulation testing mixing of the sample is crucial (16), and a recent study showed that 24% of the rejected tests during a year was due to a clotted specimen (17). Results of coagulation testing are often needed fast, and improper mixing must therefore be avoided, e.g. by using an automated roller mixer, which can be transported to the hospital wards (18). In the follow-up study, the error frequency had declined to 3% at the phlebotomy ward and to 13% at the hospital wards. Again, a clear focus on a specific procedure needing improvement appears to have been prosperous, but still there is room for improvement at the hospital wards.

None of these three most frequent errors were in the red zone described in the EFLM study as having the highest combination of impact and probability (9). An error in the red zone is however the patient identification process, which according to the CLSI H3-A6 is crucial, and it relies entirely on the phlebotomist to ensure that the phlebotomy is actually performed on the individual designated on the request form (7). Patient identification was performed incorrect in two instances in the pilot study and once in the follow-up study. In comparison, the frequency of patient identification error was as high as 16.1% in the EFLM study (9), being more frequent among outpatients than at the hospital wards. No matter what, this type of error is unacceptable and must be avoided at all cost. Recently, harmonisation of the patient identification procedure was suggested by the EFLM WG-PRE in order to prevent patient identity mix-up (19), and hopefully such harmonized procedures will improve patient safety in the future.

A new item was introduced in the follow-up study, namely proper inspection of the venipuncture site to assure that bleeding indeed had stopped. The study showed that this was an important issue to include as it was almost neglected at the phlebotomy ward (only correctly performed in one out of 30 phlebotomies), and also very critical at the hospital wards (an error frequency of 69%). This strongly emphasizes that the observation scheme must evolve continuously to exploit new areas, where focus is needed. With renewed focus on this small item, it will hopefully be possible to show improvement in the error frequency for this issue also.

The follow-up study showed that continued focus on critical key issues do result in significant improvements for the three major issues found in the pilot study. It is however not enough to identify and deal with such issues, it is also necessary to maintain focus on the phlebotomy process and future alterations in this pivotal procedure. This study was not designed to demonstrate the possibility of such "maintenance value" using a QC system, but it is our strong believe that it is capable of maintaining the focus on the phlebotomy procedure as it is seen for other QC systems used by the laboratory every day. More importantly, the QC system will also be an important asset outside the laboratory: In the health care system, increasing fiscal demands and a need of faster turn-around times are inevitable, which has increased the interest in having other professionals than trained phlebotomists to perform blood sampling. A likely future scenario is therefore an increased number of decentralised blood samplings (e.g. by doctors or nurses at the hospital wards). From a laboratory point-of-view it will be essential to ascertain the phlebotomy quality, which will be possible through a blood sampling QC.

In conclusion, continuous QC of the blood sampling procedure using a structured observation scheme was feasible and useful. It revealed a number of items that were not conducted compliant with the phlebotomy guideline. Also, it supported significant improvements in the adherence to the recommended phlebotomy procedures and facilitated documentation of the phlebotomy quality.

References

1. Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F. Errors in laboratory medicine. Clin Chem 2002;48:691-8.
2. Plebani M, Laposata M, Lundberg GD. The brain-to-brain loop concept for laboratory testing 40 years after its introduction. Am J Clin Pathol 2011;136:829-33.
3. Lippi G, Banfi G, Church S, Cornes M, De Carli G, Grankvist K, et al. Preanalytical quality improvement. In pursuit of harmony, on behalf of European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working group for Preanalytical Phase (WG-PRE). Clin Chem Lab Med 2015;53:357-70.
4. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? Clin Chem Lab Med 2006;44:750-9.
5. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Franchini M, Guidi GC. Phlebotomy issues and quality improvement in results of laboratory testing. Clin Lab 2006;52:217-30.
6. Simundic AM, Cornes M, Grankvist K, Lippi G, Nybo M, Kovalevskaya S, et al. Survey of national guidelines, education and training on phlebotomy in 28 European countries: an original report by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) working group for the preanalytical phase (WG-PA). Clin Chem Lab Med 2013;51:1585-93.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedures for collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; approved guideline – 6th Ed. CLSI document H3-A6. CLSI: Payne, PA, 2007.
8. ISO 15189:2012. Medical laboratories – Requirements for quality and competence. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 2012.
9. Simundic AM, Church S, Cornes MP, Grankvist K, Lippi G, Nybo M, et al. Compliance of blood sampling procedures with the CLSI H3-A6 guidelines: An observational study by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) working group for the preanalytical phase (WG-PRE). Clin Chem Lab Med 2015;53:1321-31.
10. Gould DJ, Drey NS, Creedon S. Routine hand hygiene audit by direct observation: has nemesis arrived? J Hosp Infect 2011;77:290-3.
11. Conway LJ, Riley L, Saiman L, Cohen B, Alper P, Larson EL. Implementation and Impact of an Automated Group Monitoring and Feedback System to Promote Hand Hygiene Among Health Care Personnel. Jt Comm J Qual Patient Saf 2014;40:408-17.
12. Salvagno G, Lima-Oliveira G, Brocco G, Danese E, Guidi GC, Lippi G. The order of draw: myth or science? Clin Chem Lab Med 2013;51:2281-5.
13. Cornes M, Sulaiman RA, Whitehead SJ, Othonos N, Ford C, Gama R. Incorrect order of draw of blood samples does not cause potassium EDTA sample contamination. Br J Biomed Sci 2012;69:136-8.
14. Cornes M, Davidson F, Darwin L, Gay C, Redpath M, Waldron JL, et al. Multi-centre observational study of spurious hyperkalaemia due to EDTA contamination. Clin Lab 2010;56:597-9.
15. Lima-Oliveira G, Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Picheth G, Guidi GC. Incorrect order of draw could be mitigate the patient safety: a phlebotomy management case report. Biochem Med 2013;23:218-23.
16. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Lima-Oliveira G, Guidi GC, Favaloro EJ. Quality standards for sample collection in coagulation testing. Semin Thromb Hemost 2012;38:565-75.
17. Atay A, Demir L, Cuhadar S, Saglam G, Unal H, Aksun S, et al. Clinical biochemistry laboratory rejection rates due to various types of preanalytical errors. Biochem Med 2014;24:376-82.
18. Aral H, Usta M. Influence of using a roller mixer on rejected samples in coagulation tests. Int J Lab Hematol 2011;33:617-9.
19. van Dongen-Lases EC, Cornes MP, Grankvist K, Ibarz M, Kristensen GB, Lippi G, et al. Patient identification and tube labelling - a call for harmonisation. Clin Chem Lab Med 2016;54:1141-5.

STRIDA-projektet dokumenterar det ökande problemet med nätdroger

Anders Helander
Institutionen för Laboratoriemedicin, Karolinska Institutet
Klinisk Farmakologi och Klinisk Kemi, Karolinska Universitetslaboratoriet, Stockholm
anders.helander@ki.se

Drogtestning utnyttjas inom flera områden i samhället som en viktig objektiv metod för kontroll av alkohol- och narkotikaanvändning och för uppföljning av behandlingsinsatser. Laboratorieanalyser av narkotika inriktas huvudsakligen på ett fåtal enskilda substanser eller substansgrupper – amfetaminer, bensodiazepiner, cannabis, kokain och opiater – vilka länge varit de vanligast förekommande missbruksmedlen och som alla är narkotikaklassade (1). Under senare år har dock utbudet av narkotiska substanser ökat kraftigt, genom försäljning av nya, oklassade strukturvarianter av traditionella droger (”designerdroger”) via öppen Internethandel. De nya substanserna är ofta dåligt dokumenterade ur toxicitetshänseende och inte kliniskt testade, vilket har orsakat problem i sjukvården genom ett ökande antal allvarliga förgiftningar och dödsfall (2). Vilka nya substanser som är inblandade förblir dock ofta okänt, eftersom de inte omfattas av den rutinmässiga drogtestningen (3).

”Nya psykoaktiva substanser”, eller nätdroger

Designerdroger är inget nytt fenomen utan har förekommit tidigare, exempelvis i USA där olika fentanylanaloger orsakade många dödsfall från slutet av 1970-talet. Den nu pågående förekomsten av designerdroger, eller ”nya psykoaktiva substanser” (NPS) som de numera kallas med ett gemensamt namn, startade i slutet av 2008 då örtblandningar avsedda för rökning (rökmixar) med produktnamnet ”Spice”, som gav cannabisliknande symtom utan att innehålla tetrahydrocannabinol, visade sig vara tillsatta med syntetiska cannabinoider (4). En sådan grupp av cannabinoider kallas JWH, efter initialerna på den kemist som ursprungligen utvecklade dem som läkemedelskandidater.

De först identifierade syntetiska cannabinoiderna utreddes och reglerades snart som narkotika, vilket i Sverige måste ske individuellt för varje substans, men Spice-produkterna ersattes då med andra, oklassade strukturvarianter vilket möjliggjorde fortsatt öppen Internethandel av ”legala” droger (4). Denna katt- och råttalek har fortsatt sedan dess, och enbart i JWH-gruppen finns det fler än 450 olika strukturvarianter att välja mellan. Förutom cannabinoider har även andra psykoaktiva substansgrupper introducerats som NPS, inledningsvis i första hand olika stimulantia (exempelvis katinoner) och hallucinogener, men senare även dissociativa droger, bensodiazepiner och opioider. Sedan 2009 har sammanlagt fler än 500 nya, unika droger och hundratals försäljningshemsidor rapporterats i Europa, enligt information från EU:s narkotikakontrollorgan EMCDDA (5).

Spice har kommit att användas synonymt för alla former av rökmixar tillsatta med syntetiska cannabinoider. Andra vanliga namn på NPS är Internetdroger eller nätdroger, eftersom de ofta försäljs genom Internethandel.

STRIDA-projektet

I början av 2010 startade Karolinska Universitetslaboratoriet, Karolinska Institutet och Giftinformationscentralen (GIC) ett ”Samverkansprojekt kring toxicitetsutredning och riskbedömning av Internetdroger baserat på laboratorieanalyser” (STRIDA) i syfte att samla information om förekomst, farlighet och metabolism av NPS, samt sprida kunskap om detta oroväckande drogfenomen (6). Ett annat viktigt mål var att utveckla analysmetoder för NPS, vilka saknades för de flesta nya substanser. STRIDA var en utvidgning av ett pågående projekt om växt- och svampdroger (7).

I STRIDA-projektet insamlas och analyseras blod- och urinprover från patienter med akuta förgift-

ningssymtom som misstänks vara orsakade av NPS. Projektet inkluderar fall från landets akutmottagningar och intensivvårdsavdelningar, efter inledande konsultation med GIC, och drogtestningen är kostnadsfri. Klinisk information från analytiskt bekräftade NPS-förgiftningar sammanställs sedan för utvärdering av substansernas symtombilder och farlighet (8, 9).

Analys av nätdroger

Drogtestning av narkotika sker traditionellt i två steg, först en preliminär sållningsanalys (”screening”) som ofta utförs med ospecifika immunokemiska metoder, och sedan, vid ett positivt screeningresultat, en bekräftande specifik kvantitativ analys (”verifikation”) med masspektrometri (MS). Detta analysförfarande är välutvecklat för de traditionella missbruksmedlen men saknades för NPS (1).

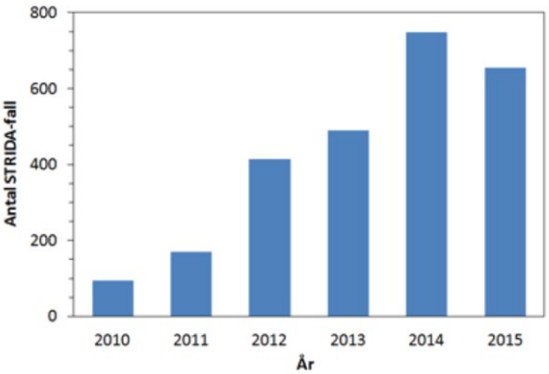
Under utvecklingen av analysrutiner för NPS inom STRIDA-projektet visade det sig visserligen att några immunokemiska rutinmetoder för klassiska drogsubstanser ibland kunde utnyttjas även för preliminär screening av NPS (10, 11), eftersom antikropparna inte klarade av att skilja på de ofta snarlika kemiska strukturerna (korsreaktion). Rutinen för verifikationsanalys med en multimetod baserad på vätskekromatografi kopplat till tandem-MS (LC-MS/MS) blev dock snabbt ohållbar (12), beroende på det stora antalet substanser som löpande måste introduceras och valideras. Under 2014 och 2015 rapporterades årligen ungefär 100 nya substanser i Europa, det vill säga i genomsnitt två i veckan (5). Lösningen blev att istället övergå till en multiscreeningmetod baserad på högupplösande MS (LC-HRMS) (13) eller, för substanser med identisk exakt massa och snarlik retentionstid och för verifikation, LC-HRMS/MS.

I dagsläget omfattas totalt fler än 300 olika missbrukssubstanser (NPS, klassiska droger, växt- och svampdroger, läkemedel, eller deras metaboliter) av analyser i STRIDA-projektet. De nyutvecklade analysmetoderna för NPS har även kommit till nytta för rutinmässig drogtestning, exempelvis inom beroendevården där användning av nya missbruksmedel utgör ett växande problem.

Resultat från STRIDA-projektet

Från starten 2010 till och med 2015 har drygt 2600 förgiftningsfall som misstänkts involvera NPS från akutmottagningar i hela landet inkluderats i STRIDA-projektet. Antalet fall ökade stadigt under de första åren till en högsta årssiffra på 749 under 2014 (Figur 1), vilket alltså motsvarar i genomsnitt två allvarliga förgiftningar varje dag i Sverige. Det ska påpekas att färre än hälften av samtliga telefonkonsultationer från sjukvården till GIC blir STRIDA-fall, eftersom det också krävs att blod- och urinprover skickas in för drogtestning. Det verkliga antalet allvarliga NPS-förgiftningar har följaktligen förmodligen varit minst det dubbla. Den höga årssiffran för 2014 beror sannolikt på att det under hösten det året inträffade ett stort antal allvarliga förgiftningar med nya, högpotenta syntetiska cannabinoider, till exempel MDMB-CHMICA, 5F-CUMYL-PINACA och FUB-AKB48, vilket resulterade i allmänt ökat fokus på NPS-problemet.

Ålderspannet på patienterna i STRIDA-projektet under hela tidsperioden var 8-71 (median 24) år, varav närmare 60% var 25 år eller yngre. Tre fjärdedelar av patienterna var män. I ungefär 80% av alla blod- och urinprover har en eller flera NPS och/eller traditionella drogsubstanser påvisats. Av nya substanser har hundratals syntetiska varianter tillhörande de psykoaktiva kemiska klasserna hittats. Förutom redan nämnda cannabinoider har speciellt förekomsten av opioider på NPS-marknaden skapat stora hälsoproblem, eftersom denna substansgrupp, med typiska och livsfarliga överdossymtom som andningsdepression och medvetandesänkning, är starkt förknippad med drogrelaterad dödlighet (14).



Figur 1. *Årlig statistik över antalet misstänkta allvarliga förgiftningsfall med nya psykoaktiva substanser (”nätdroger”) från akutmottagningar och intensivvårdsavdelningar i Sverige vilka har analyserats i STRIDA-projektet.*

En sådan NPS-opioid är MT-45, en läkemedelskandidat från 1970-talet, som under 2013 introducerades som nätdrog. MT-45 visade sig i vissa fall ha flera allvarliga biverkningar som dövhet, håravfall och albinism, inflammation i hud och hårsäckar, och i efterförloppet även operationskrävande katarakt (15, 16). Andra farliga opioider som blivit allt vanligare är olika strukturvarianter av fentanyl som är extremt potenta substanser vilket innebär stor risk för överdosering och dödsfall. Substanserna säljs ofta i form av nässpray där varje produkt innehåller många dödliga doser (Figur 2). Under de senaste två åren har det inträffat många allvarliga förgiftningar och dödsfall med fentanylanaloger, senast bland annat kopplade till akrylfentanyl (17, 18).

Figur 2. *Oklassade strukturvarianter av den potenta opioiden fentanyl har under senare år sålts som nya psykoaktiva substanser ("nätdroger"), ofta i form av nässpray där varje flaska innehåller många dödliga doser.*

Konklusion

Genom STRIDA-projektet har en välfungerande rutin för löpande övervakning av NPS inom sjukvården etablerats. Den nyutvecklade analysmetodiken baserad på multikomponent-HRMS gör det möjligt att rutinmässigt påvisa ett stort antal nya substanser i urin- och blodprov, vilket inte var möjligt tidigare. Snabb tillgång till referensmaterial är dock ett ständigt problem. Strategin att fokusera på förgiftningsfall inom akutsjukvården identifierar sannolikt "toppen av ett isberg" men samtidigt också de farligaste substanserna. Sammantaget utgör resultaten från STRIDA-projektet ett värdefullt komplement till andra kunskapskällor vid farlighetsbedömning av NPS, som exempelvis resultat från rättsmedicinska undersökningar av drogrelaterade dödsfall.

En viktig anledning till STRIDA-projektets framgång är sannolikt att drogtestningen varit kostnadsfri för sjukvården, vilket möjliggjorts genom forskningsbidrag från Folkhälsomyndigheten. Från 2016 avslutades dock den finansieringen varför projektet har tvingats gå på sparlåga och avslutas nu helt.

Referenser

1. Hansson T, Helander A, Beck O, Elmgren A, Kugelberg F, Kronstrand R. Enhetliga analyser av narkotika i urin krävs för rättssäkerheten. Läkartidningen 2015;112;pii:DLHH.
2. Lindeman E, Hulten P, Ström S, Enlund M, Al-Saffar Y, Helander A. Ökat missbruk av internetdrogen MDPV i Västmanland. Svåra förgiftningsfall har gett sjukvården stora problem. Läkartidningen 2012;109:1954-7.
3. Beck O, Franzen L, Bäckberg M, Signell P, Helander A. Intoxications involving MDPV in Sweden during 2010-2014: Results from the STRIDA project. Clin Toxicol (Phila) 2015;53:865-73.
4. Lindigkeit R, Boehme A, Eiserloh I, Luebbecke M, Wiggermann M, Ernst L, et al. Spice: a never ending story? Forensic Sci Int 2009;191:58-63.
5. EMCDDA. EU Drug Markets Report 2016. In-depth Analysis. 2016; Available from: http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2373/TD0216072ENN.PDF

6. Helander A, Beck O, Hägerkvist R, Hulten P. STRIDA i kampen mot (o)lagliga internetdroger. Läkartidningen 2011;108:2312-5.
7. Björnstad K, Hulten P, Beck O, Helander A. Bioanalytical and clinical evaluation of 103 suspected cases of intoxications with psychoactive plant materials. Clin Toxicol (Phila) 2009;47:566-72.
8. Helander A, Bäckberg M, Hulten P, Al-Saffar Y, Beck O. Detection of new psychoactive substance use among emergency room patients: results from the Swedish STRIDA project. Forensic Sci Int 2014;243:23-9.
9. Helander A, Beck O, Hägerkvist R, Hulten P. Identification of novel psychoactive drug use in Sweden based on laboratory analysis--initial experiences from the STRIDA project. Scand J Clin Lab Invest 2013;73:400-6.
10. Beck O, Rausberg L, Al-Saffar Y, Villen T, Karlsson L, Hansson T, et al. Detectability of new psychoactive substances, 'legal highs', in CEDIA, EMIT, and KIMS immunochemical screening assays for drugs of abuse. Drug Test Anal 2014;6:492-9.
11. Pettersson Bergstrand M, Helander A, Hansson T, Beck O. Detectability of designer benzodiazepines in CEDIA, EMIT II Plus, HEIA, and KIMS II immunochemical screening assays. Drug Test Anal 2016;doi:10.1002/dta.2003.
12. Al-Saffar Y, Stephanson NN, Beck O. Multicomponent LC-MS/MS screening method for detection of new psychoactive drugs, legal highs, in urine-experience from the Swedish population. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2013;930:112-20.
13. Helander A, Beck O, Bäckberg M. Intoxications by the dissociative new psychoactive substances diphenidine and methoxphenidine. Clin Toxicol (Phila) 2015;53:446-53.
14. Simonsen KW, Edvardsen HM, Thelander G, Ojanpera I, Thordardottir S, Andersen LV, et al. Fatal poisoning in drug addicts in the Nordic countries in 2012. Forensic Sci Int 2015;248:172-80.
15. Bradley M, Hasselblad A, Norlen L, Lapins J, Bäckberg M, Helander A. Akut kutant symtomkomplex med efterföljande katarakt - Nätdrogen MT-45 kan vara orsaken. Läkartidningen 2016;113;pii:DTAF.
16. Lindeman E, Bäckberg M, Personne M, Helander A. MT-45 – en livsfarlig och potentiellt ototoxisk internetdrog. Läkartidningen 2014;111:1712-5.
17. Bäckberg M, Beck O, Jonsson KH, Helander A. Opioid intoxications involving butyrfentanyl, 4-fluorobutyrfentanyl, and fentanyl from the Swedish STRIDA project. Clin Toxicol 2015;53:609-17.
18. Helander A, Bäckberg M, Beck O. Intoxications involving the fentanyl analogs acetylfentanyl, 4-methoxybutyrfentanyl and furanylfentanyl: results from the Swedish STRIDA project. Clin Toxicol (Phila) 2016;54:324-32.

Foto: Henrik Alfthan.

For meget af det gode: spædbørn forgiftede af D-vitamintilskud

Pia Bükmann Larsen[1], Fie Juhl Vojdemann[2]
[1]Klinisk Biokemisk Afdeling, Slagelse Sygehus
[2]Klinisk Biokemisk Afdeling, Bispebjerg-Frederiksberg Hospital
pibl@regionsjaelland.dk
fie.juhl.vojdeman01@regionh.dk

Figur 1: *Inno Pharmas D-dråbeprodukt.*

Vi kan som læger på de klinisk biokemiske afdelinger få skudt i skoene, at vi gemmer os væk med vores analyser og forskning. En alvorlig sag fra i sommer viser imidlertid, at vi kan spille en central rolle ved håndtering af potentielle medicinske katastrofer. I sommeren 2016 blev der i Danmark konstateret flere tilfælde af D-vitaminforgiftning hos børn i alderen 0-2 år pga. utilsigtet overdosering af D-vitamintilskud. Vi beskriver her, hvordan vi i Østdanmark (Region Hovedstaden og Sjælland) håndterede sagen.

Kort om sagens forløb

Fredag den 22. juli alarmerede Sundhedsstyrelsen (SST) og Styrelsen for Patientsikkerhed om, at virksomheden Inno Pharma, der producerer en række kosttilskud på økologisk basis, havde solgt D3-vitamindråber med 75 gange højere koncentration af D-vitamin end deklareret (1, 2). Det blev opdaget på baggrund af en svær forgiftning påvist hos et barn indlagt på børneafdelingen på Odense Universitetshospital. D3-vitamindråbeproduktet (Figur 1) var blevet solgt i detailhandlen og over internettet i et omfang af ca. 300 flasker i alt, over en periode på fire måneder. SST udsendte den 25. juli en skrivelse via regionernes akutte medicinske koordinationscentre (AMK) til hospitalerne i Danmark. Den foreskrev, at børn, der var blevet givet de pågældende D-vitamindråber, skulle have taget blodprøver til måling af ioniseret calcium og D-vitamin. Beskeden formidlede AMK dog ikke til de biokemiske afdelinger, som hørte om sagen via patienter og praktiserende læger. Nye guidelines fra SST blev udsendt d. 27. juli, hvor en repræsentant fra klinisk biokemi havde været inddraget ved udarbejdelsen (3). Guidelines blev forsøgt udbredt via Dansk Selskab for Klinisk Biokemi (DSKB) og lokalt regionalt, men grundet sommerferie skete det med nogle dages forsinkelse.

Hvordan løste vi udfordringen på de klinisk biokemiske afdelinger?

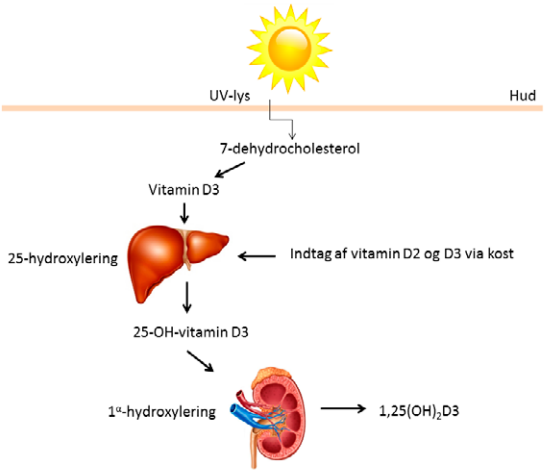
På de klinisk biokemiske afdelinger var vi involverede både i diagnostikken og dermed afklaringen af problemets omfang, og i opfølgningen af de forgiftede børn. Prøvetagning på små børn er udfordrende, og vi vidste ikke hvor mange patienter, vi kunne forvente i de enkelte ambulatorier. For at opnå et tilstrækkeligt blodvolumen til analyserne, måtte bioanalytikerne ty til kapillærblodprøve i hælen på nogle af de helt små børn. Kapillærblodprøverne er 'åbne' prøver,

og pH stiger derfor. Stigende pH vil øge andelen af proteinbundet calcium og dermed udløse et fald i koncentrationen af frit calcium (6). Et højt pH vanskeliggør måling af ioniseret calcium på ABL, da der ikke automatisk korrigeres for pH ved pH > 7,60. For at få et nogenlunde skøn af niveauet af ioniseret calcium, måtte vi derfor foretage beregning af ioniseret calcium ud fra formlen (Radiometer):

$$Ca^{2+}\ (7{,}4) = Ca^{2+}\ [1\text{-}0{,}53 \times (7{,}40\text{-}pH)]$$

Det var nødvendigt at udgive svar med forbehold til rekvirenten i denne akutte situation for at kunne håndtere de forgiftede børn i henhold til SSTs anbefalinger. Prøverne med højt indhold af 25-OH-vitamin D3 (eller -D3+D2) (i nogle tilfælde > 2000 nmol/L), måtte fortyndes ud og genanalyseres. En del af de høje værdier blev præciseret vha. massespektrometri. Det var nødvendigt for klinikerne at følge niveauet af 25-OH-vitamin D og effekten af deres behandling, og evt. systemmæssige spærringer på gentagne D-vitaminanalyser skulle derfor løbende fjernes.

I Danmark anbefaler SST tilskud af D-vitamin til personer i risiko for mangel, herunder børn i alderen 0-2 år. Anbefalingen er 10 µg (400 IE) som D-vitamindråber (5). Indholdet i fem dråber af D3-dråbeproduktet fra Inno Pharma var 75 gange højere end den anbefalede dosis til børn i alderen 0-2 år. På D3-dråbeproduktet var fem dråber angivet som den anbefalede dosis, men ikke hvor meget D-vitamin det svarede til. De børn, hvis forældre har fulgt Sundhedsstyrelsens anbefalinger vedrørende D-vitamintilskud, har indtaget 750 µg i stedet for 10 µg dagligt. Toksisk dosis for børn < 9 år er angivet til > 250 µg (10.000 IE) dagligt i > én uge (3). SST anslog i august, at ca. 150 børn under 2 år havde indtaget de fejlproducerede D-dråber. Heraf havde 87 et D-vitaminniveau >150 nmol/L, hvoraf 18 børn havde svær hypercalcæmi med ioniseret calcium >1,49 mmol/L (SST).



Figur 2. *Dannelse og omsætning af D-vitamin.*

Kort om dannelse og omsætning af D-vitamin

D-vitamin spiller sammen med parathyreoideahormon (PTH) en central rolle for reguleringen af koncentrationen af frit calcium. Mængden af frit calcium er nøje reguleret, og selv små forskydninger kan være klinisk betydende og større forskydninger livstruende. Den primære kilde til D-vitamin er den endogene produktion, der sker ved eksponering af huden for sollys. En mindre andel stammer fra kosten, og endelig indtages en varierende mængde som kosttilskud. D-vitamin kan opdeles i cholecalciferol (vitamin D3) og ergocalciferol (vitamin D2). En skematisk oversigt over dannelse og omsætning af D-vitamin er vist i Figur 2. Den aktive metabolit calcitriol ($1,25(OH)_2D3$) dannes ved 1α-hydroxylering i nyrerne, hvilket er stramt reguleret af PTH og underlagt negativ feedback af $1,25(OH)_2D3$, calcium, fosfat og fibroblast-vækstfaktor. Det betyder, at koncentrationen af $1,25(OH)_2D3$ ikke nødvendigvis er svært forhøjet ved hypercalcæmi eller direkte korreleret til koncentrationen af frit calcium i blodet (7). Halveringstiden af cirkulerende 25-OH-vitamin D3 er 2-3 uger (6), hvorimod den i fedtvæv er omkring to måneder. Halveringstiden for den aktive metabolit $1,25(OH)_2D3$ i blod er blot femten timer (8).

Hvorfor er et højt indtag af D-vitamin farligt?

$1,25(OH)_2D3$ inaktiveres af enzymet 24-hydroxylase. Kapaciteten af dette enzym er mindre hos spædbørn end hos voksne individer. Dermed er spædbørn i

særlig risiko for forhøjet niveau af $1,25(OH)_2D3$ ved større indtag som kosttilskud (9). Spædbørn ernæres af modermælk/modermælkserstatning, som er rig på calcium, og der kan potentielt absorberes store mængder calcium på kort tid, som vil vedligeholde hypercalcæmien. Der er gennem tiden rapporteret flere tilfælde af D-vitaminforgiftning hos enkeltpersoner eller mindre grupper af både voksne og børn (10-22). Symptomerne på forgiftning hos børn er relativt uspecifikke og relaterer sig til hypercalcæmien. Der ses nedsat appetit, dårlig trivsel, sløvhed, irritabilitet, dehydrering og polyuri. Hypercalcæmi kan resultere i udfældninger af calcium i nyrer og centralnervesystemet samt ved meget høje calciumniveauer kardielle arytmier og hjertestop. Langtidseffekterne af overdosering af D-vitamin til mennesker er ikke klarlagt. Risikoen for varige skader på nyrer og i centralnervesystemet er ikke velbeskrevet, og humane forsøg er uetiske. Overdoseringsforsøg på dyr har resulteret i arteriosklerose på baggrund af mineralisering, samt knoglesmerter og muskulær svaghed (23).

Regler om kontrol af kosttilskud versus lægemidler

Producenten af D3-vitamindråberne markedsførte produktet som et kosttilskud (24). Kosttilskud beskrives af Lægemiddelstyrelsen som "… produkter, der supplerer den normale kost med næringsstoffer, fx almindelige vitamin- og mineralpræparater". Kosttilskud skal overholde fødevarelovgivningen og under denne *Kosttilskudsbekendtgørelsen,* men kosttilskud skal *ikke* godkendes før markedsføringen (25). Ifølge Fødevarestyrelsens bekendtgørelse om kosttilskud må indholdet af D-vitamin i kosttilskud maksimalt være 10 µg som anbefalet daglig dosis. Anmeldelsen af et kosttilskud til den lokale fødevareregion skal ske ved, at der skal indsendes "en model af den mærkning, der anvendes for varen". Der er *ikke* krav til regelmæssig kontrol af indholdet af aktivt stof, hverken i den danske lovgivning (26) eller i et tilhørende EU-direktiv (27). Forgiftningssagen beskrevet her viser, at denne udeladelse af kontrol kan have alvorlige konsekvenser.

Hvad kan vi lære af denne sag?

Vi beskriver her er et eksempel på, hvordan de klinisk biokemiske afdelinger kan udfylde en central rolle ved håndtering af potentielle katastrofer berørende andre specialer og afdelinger, og at vi kan blive 'glemt' i planlægningen af et katastrofeberedskab. Tidlig orientering og involvering af klinisk biokemiske afdelinger bør ske ved en fremtidig lignende sag, om nødvendigt på nationalt plan. På de klinisk biokemiske afdelinger var vi i direkte kontakt med rekvirenter af forhøjede D-vitaminanalyser, og vi kommunikerede løbende med regionens børneafdelinger. Samarbejdet mellem de biokemiske afdelinger og børneafdelingerne har været velfungerende og fleksibelt. Overalt var der stor velvillighed til at bidrage og sikre den bedst mulige håndtering af forløbet. I skrivende stund er de fleste af de involverede børn i et opfølgende forløb på deres lokale børneafdeling og er blevet tilbudt at indgå i et forskningsprojekt iværksat nationalt med en repræsentant fra klinisk biokemi (Fie Juhl Vojdeman). Dermed sikres det, at vi får størst muligt fagligt udbytte af forgiftningssagen i form af ny viden, og at evt. D-vitaminforgiftede patienter i fremtiden får den optimale behandling.Kontrollen med kosttilskud har tydeligt vist sig at være utilstrækkelig. Fremadrettet bør disse produkter enten klassificeres som lægemidler og høre ind under gældende lovgivning herfor inklusiv krav til batchkontrol, eller reglerne for kontrol af kosttilskud bør tilføres krav til batchkontrol. Sagen forventes at få et politisk efterspil.

Referencer

1. Forgiftninger fra D-vitamindråber af mærket "Inno Pharma vitamin D3-dråber" [press release]. Sundhedsstyrelsen, 08-03-2016 2016.
2. Risiko for alvorlig forgiftning med D-vitamindråber hos spædbørn København: Styrelsen for patientsikkerhed; 2016 [updated 07-26-2016. Available from: https://stps.dk/da/nyheder/2016/risiko-for-alvorlig-forgiftning-med-d-vitamin-draaber-hos-spaedboern.
3. Brot C. Forholdsregler ved mistanke om D-vitaminforgiftning. Sundhedsstyrelsen; 2016. p. 3.
4. Høringsversion: Hypercalcæmi ved D-vitaminintoksikation: Udredning og behandling(2016).
5. D-vitamin - Forebyggelselse af D-vitaminmangel: Sundhedsstyrelsen; 2010 [Available from: https://sundhedsstyrelsen.dk/da/sundhed-og-livsstil/ernaering/~/media/042768A1C12E4087921229339592D509.ashx.
6. Risteli Winter WE, Kleerekoper M, Risteli L.

sysmex

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

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

XN

XN-SERIEN ÄR SYSTEMET FÖR DIG ...

när pålitliga hematologiresultat 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.

www.sysmex.se/xn

Bone and mineral metabolism. In: Burtis CAA, E.R.; Bruns, D.E., editor. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 5th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2012.
7. Vogiatzi MG, Jacobson-Dickman E, DeBoer MD, Drugs, Therapeutics Committee of The Pediatric Endocrine S. Vitamin D supplementation and risk of toxicity in pediatrics: a review of current literature. J Clini Endocrinol Metab 2014;99:1132-41.
8. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. Am J Clin Nutr 2008;88:582S-6S.
9. Schou AJ, Schmidt IM, Christensen H, Johannesen J, Main K, Boas M et al. Hypercalcæmi ved D-vitamin-intoksikation: Udredning, behandling og opf.lgning: Dansk Pædiatrisk Selskab; 2016 [Available from: http:// www.paediatri.dk/images/dokumenter/vejl_hoering/D_vitaminforgiftning_og_hypercalcaemi_Behandling_og_udredning.pdf.
10. Anik A, Catli G, Abaci A, Dizdarer C, Bober E. Acute vitamin D intoxication possibly due to faulty production of a multivitamin preparation. J Clin Res Pediatr Endocrinol 2013;5:136-9.
11. Barrueto F, Jr., Wang-Flores HH, Howland MA, Hoffman RS, Nelson LS. Acute vitamin D intoxication in a child. Pediatrics 2005;116:e453-6.
12. Bothra M, Jain V. Vitamin d intoxication: too much of a good thing! Indian Pediatr 2013;50:429-30.
13. Chiricone D, De Santo NG, Cirillo M. Unusual cases of chronic intoxication by vitamin D. J Nephrol 2003;16:917-21.
14. Conti G, Chirico V, Lacquaniti A, Silipigni L, Fede C, Vitale A, et al. Vitamin D intoxication in two brothers: be careful with dietary supplements. J Pediatr Endocrinol Metab 2014;27:763-7.
15. Kaptein S, Risselada AJ, Boerma EC, Egbers PH, Nieboer P. Life-threatening complications of vitamin D intoxication due to over-the-counter supplements. Clin Toxicol 2010;48:460-2.
16. Kara C, Gunindi F, Ustyol A, Aydin M. Vitamin D intoxication due to an erroneously manufactured dietary supplement in seven children. Pediatrics 2014;133:e240-4.
17. Koutkia P, Chen TC, Holick MF. Vitamin D intoxication associated with an over-the-counter supplement. N Engl J Med 2001;345:66-7.
18. Liborio AB, Nasserala JC, Gondim AS, Daher EF. The case: renal failure in a bodybuilder athlete. Diagnosis: Nephrocalcinosis secondary to exogenous vitamin D intoxication. Kidney Int 2014;85:1247-8.
19. Mannheimer B, Torring O, Nathanson D. [Vitamin D intoxication caused by drugs bought online. Sky high daily dosage for six months resulted in severe hypercalcemia]. Läkartidningen. 2015;112.
20. Marins TA, Galvao Tde F, Korkes F, Malerbi DA, Ganc AJ, Korn D, et al. Vitamin D intoxication: case report. Einstein (Sao Paulo). 2014;12:242-4.
21. Nasri H, Mubarak M. Renal injury due to vitamin D intoxication; a case of dispensing error. J Renal Inj Prev 2013;2:85-7.
22. Radlovic N, Lekovic Z, Ristic D, Radlovic V, Djuricic G, Dimitrijevic A, et al. Case report of acute vitamin D intoxication in an infant. Srp Arh Celok Lek 2014;142:736-9.
23. Vitamin D: MICROMEDEX Healthcare Series; [cited 2001 04-30-2001]. Available from: https://www.micromedexsolutions.com/home/.
24. Gjelstrup J. Tilbagekaldelse af Vitamin D-dr. ber: Inno Pharma; 2016 [Available from: http://innopharma.dk/tilbagekaldelse-og-udtalelse.
25. Lægemidddel eller ikke lægemiddel: Lægemiddelstyrelsen; 2013 [updated 04-11-2013. Available from: https://laegemiddelstyrelsen.dk/da/godkendelse/definitioner-paa-medicin/laegemiddel-eller-ikke-laegemiddel.
26 Bekendtgørelse om kosttilskud: Fødevareministeriet; 2003 [Available from: https://www.retsinformation.dk/Forms/R0710.aspx?id=7822.
27. Europaparlamentets og -r.dets direktiv 2002/46/EF af 10. juni 2002 om indbyrdes tilnærmelse af medlemsstaternes lovgivninger om kosttilskud (E.S-relevant tekst) De Europæiske Fællesskabers Tidende; 2002 [L183/51:[Available from: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:183:0051:0057:DA:PDF.

ThermoFisher SCIENTIFIC

Smart infection diagnosis

Early identification of clinically relevant bacterial infections is crucial to improving patient outcomes. Furthermore, identifying patients that benefit from antibiotic treatment and monitoring of antibiotic treatment is recommended for a patient centered therapy. The determination of the infection and sepsis parameter **Procalcitonin (PCT)** with the immunoassay analyzer Samsung LABGEO IB10 allows now for **rapid and reliable decision making 24/7** in acute care settings.

Samsung IB B·R·A·H·M·S PCT at point of care

- For more information visit us at thermoscientific.com/brahms

Contact Petra Östlund | petra.ostlund@thermofisher.com | + 46 (0)8 594 691 30

SAMSUNG

Kobalaminstatus i svangerskap, ammeperiode og spedbarnsalder

Ingrid Torsvik[a], Anne-Lise Bjørke-Monsen[b]
[a]Barne og Ungdomsklinikken, Haukeland Universitetssykehus, Bergen, Norge
[b]Laboratorium for Klinisk Biokjemi, Haukeland Universitetssykehus, Bergen, Norge
anne-lise.bjorke.monsen@helse-bergen.no


Kobalaminmangel har tradisjonelt vært knyttet til eldre mennesker og assosiert med ulike nevrodegenerative tilstander, som gir nevropsykiatriske symptomer før de typiske hematologiske endringene manifesterer seg med anemi, økt MCV og hypergranulerte neutrofile leukocytter [1]. I den senere tid har det imidlertid kommet flere rapporter som tyder på at kobalaminmangel er hyppig også hos unge kvinner [2] og spedbarn [3]. En adekvat kobalaminstatus er nødvendig for normal fertilitet og et godt svangerskapsutfall og mangel er assosiert med økt risiko for preeklampsi, prematur fødsel, lav fødselsvekt og nevralrørsdefekter hos barnet [4]. Kobalaminmangel i spedbarnsalderen er vist å kunne ha en negativ påvirkning på psykomotorisk utvikling [5].

Spedbarnets kobalaminstatus er avhengig av mors status under svangerskapet og postpartum, så lenge barnet fullammes [3, 6]. Svangerskap og spedbarnsalder, og til en viss grad også ammeperiode, er preget av fysiologiske endringer som påvirker biokjemiske parametre i varierende grad [7]. Tolkning av kobalaminstatus kan derfor være vanskelig hos gravide og ammende kvinner og spedbarn..

Endringer av kobalaminstatus i svangerskap og ammeperiode

Serum kobalamin reduseres under hele svangerskapet og stiger postpartum [8]. Det reduserte serumnivået i svangerskapet skyldes økt plasmavolum, økt glomerulær filtrasjon [7] og endret nivå av bindeproteinet haptokorrin, som følge av økt østrogennivå [9]. I tillegg taper mor kobalamin ved at vitaminet transporteres aktivt over placenta og lagres i fosteret, og nivået i navlestrengsblod i siste trimester er 2-3 ganger høyere enn i maternelt blod [10].

Begge de metabolske markørene homocystein (tHcy) og metylmalonsyre (MMA) er lavere i svangerskapet enn hos ikke gravide kvinner og de stiger postpartum [11]. Nivået av tHcy er redusert allerede fra svangerskapsuke 8 og reduseres ytterligere til 30-60% av ikke-gravide verdier i andre trimester[12]. Deretter holder tHcy seg stabil eller stiger frem mot fødselen [13], men tHcy nivået er lavere hos gravide som tar kobalamin eller folattilskudd i svangerskapet.

MMA nivået er redusert i første og andre trimester og stiger i tredje til nivå ofte over det man ser hos ikke-gravide kvinner [13, 14]. Holotranskobalaminnivået er rapportert å være stabilt [13] eller stige [15] i svangerskapet, med en reduksjon postpartum [16].

Hemodynamiske og hormonelle svangerskapsinduserte endringer antas å være normalisert 5 til 6 uker etter fødselen [17]. Imidlertid er amming assosiert med hormonelle endringer, som for eksempel økning av prolaktinnivået [18]. Nivået av både kobalamin, tHcy og MMA stiger postpartum og ofte til verdier over det man ser hos ikke-gravide kvinner [8, 19]. Kvinner som ammer har således et høyt nivå både av kobalamin og av de metabolske markørene. Kobalamin i morsmelk er korrelert til mors serumnivå og en mulig forklaring på de biokjemiske endringene man ser postpartum, er at amming medvirker til at intracellulært kobalamin frigjøres til blodet, noe som sekundært vil medføre en økning av kobalaminnivået i morsmelken, men da på bekostning av mors

Foto: Christine Roth.

intracellulære kobalaminstatus. Mors kobalaminnivå holdes stabilt utover i ammeperioden, men er redusert ved langvarig amming [20]. Kobalaminnivået i morsmelk er høyt de første ukene etter fødsel, og reduseres utover i ammeperioden [16].

Endringer i kobalaminstatus hos spedbarn og eldre barn

Nivåene av kobalamin, folat, tHcy og MMA endrer seg betydelig gjennom barnealderen. I løpet av de første ukene etter fødsel reduseres kobalaminnivået i serum, samtidig som tHcy og MMA nivåene stiger [21]. De laveste kobalamin og de høyeste tHcy og MMA verdiene ses mellom 6 uker og 6 måneder. Etter 6 -8 måneders alder stiger serum kobalamin og når en topp ved 3-7 år, mens tHcy synker og forblir lavt frem til det gradvis begynner å stige ved 7 års alder. MMA nivået stiger i ukene etter fødsel og kan, spesielt hos barn som ammes, nå svært høye nivåer, uavhengig av kobalaminnivået. MMA er derfor ingen god parameter på kobalaminstatus hos spedbarn. Etter spedbarnsalderen faller MMA og forblir lav gjennom hele barndommen (< 0,26 μmol/L). Folatnivået er svært høyt hos spedbarn og faller først i 1-3 års alder gradvis mot de verdiene man ser i serum hos eldre barn og voksne [21].

I spedbarnsalderen er således folatnivået høyt, mens kobalaminnivået er lavt. Dette er bakgrunnen for at tHcy, som påvirkes både av kobalamin og folatstatus, hovedsakelig er en kobalaminmarkør i spedbarnsalderen, mens den hos eldre barn og voksne hovedsakelig er en folatmarkør.

Kobalaminmangel hos spedbarn og effekt av tilskudd

Kobalaminnivået i morsmelk reduseres fra 2-4 måneder postpartum og flere studier har vist at kobalaminmangel er vanlig hos spedbarn som fullammes utover 4 måneder [16, 22]. Omkring 66 % av norske fullammede spedbarn under 6 måneders alder har et moderat lavt serum kobalamin og et høyt plasma tHcy, forenlig med en biokjemisk kobalaminmangel [21].

Symptomer på kobalaminmangel hos barn varierer med barnets alder, med grad og varighet av mangel. Publiserte kasuistikker har vist at alvorlig kobalaminmangel kan gi permanente kognitive utviklingsdefekter [5]. Også moderat kobalaminmangel hos spedbarn er vist å gi diffuse og uspesifikke symptomer, som irritabilitet, forsinket motorisk utvikling, spisevegring, obstipasjon og manglende trivsel [23].

Randomiserte intervensjonsstudier med kobalamintilskudd har vist at det er mulig både å endre den biokjemiske profilen og bedre grovmotorisk utvikling hos spedbarn med en moderat kobalaminmangel [22, 24, 25]. Spedbarn som ved 6 ukers alder fikk 400 µg kobalamin intramuskulært, hadde ved 4 måneders alder et 39% lavere plasma tHcy nivå enn de barna som ikke fikk tilskudd. I gruppen som fikk kobalamin var 97,5 persentilen for plasma tHcy 6,5 µmol/L ved 4 måneders alder, og dette nivået er foreslått som en aksjonsgrense for kobalaminmangel hos spedbarn [24]. Barn som fikk kobalamin viste en signifikant bedring i grovmotorisk utvikling allerede etter 3 uker [22, 25], noe som er en indikasjon på at en adekvat kobalaminstatus i spedbarnsalderen er viktig for normal motorisk utvikling.

Konklusjon

En adekvat kobalaminstatus er viktig for et optimalt svangerskapsutfall og utvikling av spedbarn. Kobalaminmangel er vist å være hyppig, også hos unge mennesker og spedbarn i vår del av verden. I svangerskap og spedbarnsperiode skjer det store fysiologiske endringer som kan vanskeliggjøre tolkningen av kobalaminstatus. Som et ledd i oppfølgingen av gravide kvinner og spedbarn, er det derfor nødvendig å etablere spesifikke aksjonsgrenser for kobalaminmangel hos disse pasientgruppene.

Referanser

1. Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Podell ER, Marcell PD, Stabler SP, Allen RH. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N Engl J Med* 1988,318:1720-8.
2. Quay TA, Schroder TH, Jeruszka-Bielak M, Li W, Devlin AM, Barr SI, Lamers Y. High prevalence of suboptimal vitamin B12 status in young adult women of South Asian and European ethnicity. *Appl Physiol Nutr Metab* 2015, 40:1279-1286.
3. Bjorke-Monsen AL, Ueland PM: Cobalamin status in children. *J Inherit Metab Dis* 2011,34:111-119.
4. Allen LH: Multiple micronutrients in pregnancy and lactation: an overview. *Am J Clin Nutr* 2005,81:1206S-1212S.
5. Dror DK, Allen LH: Effect of vitamin B12 deficiency on neurodevelopment in infants: current knowledge and possible mechanisms. *Nutr Rev* 2008,66:250-5.
6. Bjorke Monsen AL, Ueland PM, Vollset SE, Guttormsen AB, Markestad T, Solheim E, et al. Determinants of cobalamin status in newborns. *Pediatrics* 2001,108:624-30.
7. Costantine MM: Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy. *Front Pharmacol* 2014,5:65.
8. Milman N, Byg KE, Bergholt T, Eriksen L, Hvas AM. Cobalamin status during normal pregnancy and postpartum: a longitudinal study comprising 406 Danish women. *Eur J Haematol* 2006,76:521-5.
9. Riedel B, Bjorke Monsen AL, Ueland PM, Schneede J. Effects of oral contraceptives and hormone replacement therapy on markers of cobalamin status. *Clin Chem* 2005,51:778-81.
10. Perez-D'Gregorio RE, Miller RK. Transport and endogenous release of vitamin B12 in the dually perfused human placenta. *J Pediatr* 1998,132(3 Pt 2):S35-42.
11. Murphy MM, Molloy AM, Ueland PM, Fernandez-Ballart JD, Schneede J, Arija V, Scott JM. Longitudinal study of the effect of pregnancy on maternal and fetal cobalamin

status in healthy women and their offspring. *J Nutr* 2007,137:1863-7.
12. Ueland PM, Vollset SE: Homocysteine and folate in pregnancy. *Clin Chem* 2004,50:1293-5.
13. Greibe E, Andreasen BH, Lildballe DL, Morkbak AL, Hvas AM, Nexø E. Uptake of cobalamin and markers of cobalamin status: a longitudinal study of healthy pregnant women. *Clin Chem Lab Med* 2011,49:1877-82.
14. Bae S, West AA, Yan J, Jiang X, Perry CA, Malysheva O, et al. Vitamin B-12 status differs among pregnant, lactating, and control women with equivalent nutrient intakes. *J Nutr* 2015,145:1507-14.
15. Koebnick C, Heins UA, Dagnelie PC, Wickramasinghe SN, Ratnayaka ID, Hothorn T, et al. Longitudinal concentrations of vitamin B(12) and vitamin B(12)-binding proteins during uncomplicated pregnancy. *Clin Chem* 2002,48(6 Pt 1):928-933.
16. Greibe E, Lildballe DL, Streym S, Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L, et al. Cobalamin and haptocorrin in human milk and cobalamin-related variables in mother and child: a 9-mo longitudinal study. *Am J Clin Nutr* 2013,98:389-395.
17. Milman N: Postpartum anemia I. definition, prevalence, causes, and consequences. *Ann Hematol* 2011,90:1247-1253.
18. Ostrom KM. A review of the hormone prolactin during lactation. *Prog Food Nutr Sci* 1990,14:1-43.
19. Dostalova L. Vitamin status during puerperium and lactation. *Ann Nutr Metab* 1984,28:385-408.
20. Shapiro J, Alberts HW, Welch P, Metz J. Folate and vitamin B12 deficiency associated with lactation. *Brit J Haemat* 1965,11:498-504.
21. Monsen AL, Refsum H, Markestad T, Ueland PM. Cobalamin status and its biochemical markers methylmalonic acid and homocysteine in different age groups from 4 days to 19 years. *Clin Chem* 2003,49:2067-75.
22. Torsvik IK, Ueland PM, Markestad T, Midttun O, Monsen AL. Motor development related to duration of exclusive breastfeeding, B vitamin status and B12 supplementation in infants with a birth weight between 2000-3000 g, results from a randomized intervention trial. *BMC Pediatr* 2015,15:218.
23. Zengin E, Sarper N, Caki Kilic S. Clinical manifestations of infants with nutritional vitamin B deficiency due to maternal dietary deficiency. *Acta Paediatr* 2009,98:98-102.
24. Bjorke-Monsen AL, Torsvik I, Saetran H, Markestad T, Ueland PM. Common metabolic profile in infants indicating impaired cobalamin status responds to cobalamin supplementation. *Pediatrics* 2008,122:83-91.
25 Torsvik I, Ueland PM, Markestad T, Bjorke-Monsen AL. Cobalamin supplementation improves motor development and regurgitations in infants: results from a randomized intervention study. *Am J Clin Nutr* 2013,98:1233-40.

Foto: Henrik Alfthan.

Medisinsk biokjemisk forskning i Norge anno 2016

Tor-Arne Hagve
Tverrfaglig Laboratoriemedisin og Medisinsk Biokjemi, Akershus Universitetssykehus og Institutt for Klinisk Medisin, Campus Ahus, Universitetet i Oslo
tor-arne.hagve@ahus.no

Fagområdet "medisinsk biokjemi og fysiologi" ble formelt godkjent som medisinsk spesialitet i 1946. Etter det har spesialiteten endret navn, via klinisk kjemi, til medisinsk biokjemi. Det meste av laboratorieaktiviteten på sykehus var i de tidlige år knyttet til de kliniske avdelinger der hver avdeling hadde sitt lille laboratorium. På Ullevål sykehus ble det i tillegg til de lokale laboratorier etablert et Sentrallaboratorium så tidlig som 1937, mens Rikshospitalet fikk sin egen laboratorieavdeling først i 1953. Asbjørn Følling ble sistnevnte avdelings første sjef samt landets første professor i medisinsk biokjemi. Det var først i begynnelsen av 1960 årene at forskningsaktiviteten innen fagområdet medisinsk biokjemi tok av og ikke unaturlig var det fokus på regulering av biokjemiske/metabolske prosesser særlig vinklet mot arvelige stoffskiftesykdommer. For eksempel ble Institutt for klinisk biokjemi (IKB) UiO/Rikshospitalet etablert i 1961 hvor det i tidens løp er påvist flere nye arvelige stoffskiftesykdommer og som var pionerer innen feltet, også internasjonalt. I denne tiden ble det på alle universitetssykehusene etablert forskerstillinger med rekruttering av entusiastiske unge talenter og en betydelig økning i forskningsaktivitet. Medisinsk biokjemi har alltid blitt sett på som en medisinsk spesialitet som gir god anledning til forskning og utvikling og har tradisjonelt vært attraktiv for forskningsaktive leger.

I dag er det i "Norsk forening for medisinsk biokjemi" (fagmedisinsk forening under Den norske legeforening) 140 medlemmer og av disse har 72 doktorgrad (PhD). På universitetssykehusene er det totalt fire professor I-, ni professor II- og fem førsteamanuensis stillinger.

Den strukturerte og langsiktige forskningsaktiviteten foregår naturlig nok i all hovedsak på universitetssykehusene. I 2015 ble det fra de medisinsk biokjemiske miljøene på universitetssykehusene publisert 103 artikler i internasjonale indekserte tidsskrifter og for 32 av disse var første- og/eller sisteforfatter fra fagområdet medisinsk biokjemi. Dette er i god overenstemmelse med resultatene fra en undersøkelse fra 2005 som viste at bare 20% av artikler publisert fra de medisinsk biokjemiske miljøer på de store sykehus i Sverige utgikk primært fra denne spesialiteten (1). En senere upublisert undersøkelse som omfattet 30 sykehus i Norden viste likeledes at ca. 30% av publiserte artikler hadde førsteforfatter fra medisinsk biokjemi, og at det ikke var forskjell mellom universitetssykehus og andre større sykehus. Dette kan tolkes dithen at for 70-80% av publiserte artikler er medisinsk biokjemi "bare" del-leverandør av analyseresultater til klinisk initierte studier og i beste fall medforfatter på publikasjoner. Dette kan synes som mye. Men, det er ikke unaturlig at medisinsk biokjemi er involvert i kliniske prosjekter. Det ble i 1996 hevdet at laboratorieanalyser er viktig for 60-70% av alle diagnoser som stilles (2). Med bakgrunn i den betydelige teknologiske utviklingen som har preget laboratoriefagene de siste ti-år er denne andelen sannsynligvis betydelig høyere i dag. Laboratorieanalyser er selvsagt sentral i en stor del av den kliniske forskning og medvirkning som aktiv medforfatter fra laboratoriene er viktig for alle parter, under forutsetning av at Vancouverreglene følges. Laboratorieavdelingen bør involveres så tidlig som mulig i et klinisk prosjekt, helst i forbindelse med utforming av protokoll, og senere i registrering og prosessering av data samt utforming av manuskript. Det er imidlertid en bevisst strategi i fagmiljøet at det er nødvendig å satse mer på egeninitiert forskning.

I 2007 ble de vitenskapelige programmene på to kongresser (Nordisk og Europeisk) gjennomgått for å kartlegge fokusområder for forskning og utvikling (3) og følgende generelle problemstillinger peket seg ut: klinisk nytte av nye biomarkører, sammenligning

av analytiske metoder, forbedring av metoder og prosedyrer, kvalitetssikring, forbedring av referansematerialer, etablering av biobanker, og utvikling, utprøving og etablering av ny teknologi. De siste årene har det vært mye fokus på nye gentester og nyvinninger innen kromatografi (massespektrometri) og avansert flowcytometri, samt fokus på genomics, proteomics og metabolomics og den tilhørende behandling av "big data". For å få et bedre bilde av nåtid og fremtid er det nedenfor gitt i kortform noen eksempler på de forskningsområdene som de medisinsk biokjemiske miljøene på norske universitetssykehus angir å arbeide med nå:

- Studier av metabolomet og proteomet i biologiske væsker ved endokrinologiske sykdommer og medfødte metabolske sykdommer
- Metodeutvikling av immunoassays: Etablering og validering av nye analyser spesielt med tanke på analysering av legemidler og tumormarkører
- Studier av ekstracellulære vesikler i biologiske væsker
- Inflammasjons og koagulasjonsmarkører ved meningokokksykdom
- Identifisering og karakterisering av hemoglobinopatier
- Hormonell dysfunksjon etter kreftbehandling
- Metylerende argininvarianter og deres betydning som kardiovaskulære risikomarkører
- Statistisk kvalitetskontroll i laboratoriet – utvikling av forbedrede metoder
- Laboratoriediagnostikk av svangerskapsdiabetes
- Regulering av jernstoffskiftet, særlig i forhold til anemi og hemokromatose
- Betydning av komplementsystemet for koagulasjonsaktivering i en human fullblodsmodell for sepsis
- Tannhelse, kosthold, inflammasjon og biomarkører ved akutt intermitterende porfyri
- Betydningen av mikro RNA og komplementsystemet for inflammasjon i en human fullblodsmodell
- Bruk av biomarkører i forbindelse med sykdom i hjerte, nyresykdom, porfyrisykdom, allergi, koagulasjonsforstyrrelser samt mikronæringsstoffer og preanalyse
- Nytte av ulike betennelsesmarkører (CD64, PCT, hepcidin, copeptin) ved postoperativ infeksjon
- Undersøkelse av SNPs i osteopontin genet som markører for utvikling av brystkreft
- Påvisning av blaster ved automatisert differensialtelling
- Kolorektal kreft: tidlig deteksjon ved hjelp av ikke-invasive biomarkører og overvåking av intestinal bakterieflora
- Analyse av glykert albumin hos pasienter med diabetes mellitus hvor HbA1c ikke er egnet
- Miljøgifter og helseskade
- Serumkonsentrasjonen av vitamin Ds betydning ved ulike sykdomstilstander og calsitriols cellulære effekter.

Hvilken kvalitet har så medisinsk biokjemisk forskning? Det er vanskelig å bestemme og beskrive kvaliteten på forskningsaktivitet. H-indeks oppfattes av mange som et brukbart, men ikke optimalt mål på forskningskompetanse. Aktive medlemmer i "Norsk forening for medisinsk biokjemi" hadde i 2012 en gjennomsnittlig h-indeks på 10 (range 0-29) hvorav de med universitets tilknytning (professorer og amanuenser) hadde 18 (3-29) og overleger uten universitetstilknytning hadde 5 (0-23). Gjennomsnittlig antall publikasjoner var i de respektive tre gruppene 22, 68 og 15. Dette sier kanskje lite fordi det er intet

å sammenligne med. Denne type bibliometriske data finnes ikke for andre spesialiteter i Norge, og det finnes lite data internasjonalt. Leseren kan selvsagt sammenligne resultatene ovenfor med sin egen (og kollegers) h-indeks og dermed få et visst inntrykk av nivået på forskningskompetanse innen medisinsk biokjemi (www.webofknowledge.com). Det er imidlertid klare indikasjoner på at kompetansenivået og forskningsaktiviteten innen medisinsk biokjemisk i Danmark er høyere enn i Norge vurdert ut fra h-indeks og antall publikasjoner. Professor I har i gjennomsnitt publisert 223 artikler i Danmark (4) mens tilsvarende tall er 96 i Norge (3). Noe av denne forskjellen kan skyldes at forskning er organisert ulikt i Norge og Danmark, ved at "medisinsk biokjemi" inkluderer mer basal forskning i sistnevnte enn det som er tradisjon i Norge.

Hvilken retning bør medisinsk biokjemisk forskning ha for fremtiden? For det første må man være bevisst at en stor del av resultatene fra de mange samarbeidsprosjektene som til enhver tid går i laboratoriene er nyttig både for fagmiljøene, helsevesenet og pasienten. Det er viktig at det fortsettes med denne type samarbeidsforskning, og det bør gjøres mer.

For det andre må det fokuseres mer på egeninitierte prosjekter. Det er vanligvis klinikken som tar initiativ til samarbeidsprosjekter hvor laboratoriet bidrar med betydelige ressurser både intellektuelt, økonomisk og praktisk mens gevinsten er begrenset til et navn midt i en lang rekke medforfattere. Det bør være vel så naturlig at de kliniske avdelinger bidrar med pasienter til laboratoriets egne, velfunderte prosjekter, eksempelvis ved utprøving av nye biomarkører.

Og helt til slutt: Den mest siterte artikkel noensinne innen alle fagområder er OH Lowrys artikkel fra 1951 som beskriver metode for proteinkvantitering med 326.750 siteringer (Web Of Knowledge juli 2016) (5). Den mest siterte artikkel i Norge er kanskje ikke uventet også fra laboratoriemedisin med 14.970 siteringer (6). Den omhandler Arne Bøyums utvikling av metode for separering av blodceller. Laboratoriemedisin har noe å strekke seg etter.

Foto: Henrik Alfthan.

Referanser

1. Hagve TA. Publiseringsmønsteret innen fagområdet medisinsk biokjemi i Norden. Klinisk biokemi i Norden 2005;3:32-4 (www.nfkk.org).
2. Forsman RW. Why is the laboratory an afterthought for managed care organizations? Clin Chem 1996;42:813-6.
3. Hagve TA. Hva er medisinsk biokjemisk forskning? Klinisk biokemi i Norden 2007;4:4-9 (www.nfkk.org).
4. Jørgensen HL, Larsen B, Ingwersen P, Rehfeld JF. Forskningsaktiviteten for speciallæger i klinisk biokemi.
5. Lowry OH, Rosenborough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265-74.
6. Bøyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes form human blood. Scand J Clin Lab Invest 1968; Suppl 97:77-89.

Artikkelen er tidligere publisert i "LVS Info" nr. 3, 2016

Den vandrande vetenskapsmannen

Hepatit som konst - konst som hepatit

Per Simonsson
Siemens Healthcare AB
per.simonsson@siemens-healthineers.com

Levern må, för oss biokemister, vara metabolismens konung men när kungen abdikerar väntar skammen.

Det är heroiskt att överleva en hjärtinfarkt, men skamligt att stå i kö för en levertransplantation. Hepatologi doftar surt av massivt alkoholintag, intravenöst missbruk, oskyddat sex. Och nu – med dagens explosion av fettlever – soffsittande, sockermissbruk och övervikt. Så det har ansetts lämpligast att diskret dölja de drabbade, undanhålla diagnosen från alla utom de närmast sörjande. För få tillstånd är så undangömd som leversjukdom.

Nu vill hepatologin börja synas. Det vill patientföreningarna också. Kan diabetologerna och diabetikerna få plats i rampljuset och tillförsäkras tillbörlig respektabilitet så kan väl också hepatologin.

De finns goda skäl. Hepatit B och C skall nu utrotas, det lovar WHO, med vaccination och med nya läkemedel. Leversjukdomarna som orsakas av vår tids

Julia Llerana "Undetectable" (Foto: Per Simonsson)

levnadsvanor skall upp på distriktsläkarnas agenda så att framtida cirroser kan förebyggas. Leverpatienterna skall inte längre förpassas till gastroenterologins väntrum.

European Association for the Study of Liver har startat ett spännande projekt. De vill blanda konst och vetenskap, konst och medicin. Närmare bestämt hepatit C. De vill ge ett nytt perspektiv på sjukdomen. Tillsammans med konststudenter i Valencia har de skapat ett internationellt närverk av unga konstnärer som gett sig ut ur ateljéerna, träffat riktiga patienter, ansikte mot ansikte. Vid tio olika konstakademier runt om i värden har 77 studenter lyssnat, funderat och fattat penseln, eller kameran. Metod och tonart spänner brett. Liksom sjukdomen i sig, från hopp till trivialiteter, från humor till förtvivlan.

Resultatet är en utställning vid den internationella leverkongressen i Barcelona våren 2016. Det har blivit en spännande samling möten med människorna bakom levervärdena, ett möte mellan konstnär och patient. Färger och mönster, olja och foto, konkreta ansikten och abstrakta ytor. Det är sällan några direkta hepatologiska avbildningar, med undantag av ett svartvitt porträtt i olja av en levertransplanterad mans buk, med ärr och allt, och en rosa Jesus som håller fram en rosa lever.

Här visas ett broderi över en leverutrednings alla ringlande stigar. Och en stor duk över den gamle patienten, med 40 års anamnes. Duken går i rött, mannen står med ena handen på fiolen och med ett kranium på bordet invid. Där har den legat, ständigt påminnande genom alla dessa decennier. Men står gör han fortfarande, den gamle patienten, och spelar sin fiol.

Det finns bara ett verk med mer direkt labmedicinsk koppling: Julia Lleranas "Undetectable", där fotografier av en bergtopp speglar sig i analyssvar från ett virologiskt laboratorium. Den unga konstnären resonerar kring våra laboratoriesvar: 600 000 viruskopior/mL det kan ju liknas vid 600 000 cm, vilket är det samma som 6000 meter, vilket är ett högt berg, ett mycket högt berg. Där står den sjuke ensam och utsatt. För att sen, efter lång terapi, återvända till oss andra, vi som lever bekvämt vid havsytan.

Så kan man också se ett labsvar. Analysresultatets siffror omtolkade till ett tillstånd: 6 000 meter över havet. Kallt, ensamt.

På den vindpinade och syrefattiga bergstoppen är det inte fråga om genotyp eller fibrosmarkör. Där är det människan bakom siffrorna som får stå och frysa. Där står människorna som vi är till för att hjälpa med våra analyser. Människorna, inte deras levervärden. På hepatologernas kongress har de stigit ner, likt inkräktare i vetenskapens vita kongresskorridorer. Plötsligt uppdykande ansikten i forskningens svala högborg. På stora dukar och i diskreta teckningar.

Så kan också leversjukdom illustreras, eller kanske snarare tolkas, när levervärdena inte längre räcker.

Perspectives – Art, Live diseases and Me

European Association for the Study of Liver, Barcelona 13-17 April 2016

Utställningen finns också samlad i en katalog, som gavs till kongressens alla deltagare.

Foto: Henrik Alfthan.

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". Forfatternes 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. Overflødige sidetall fjernes, som vist i eksempelet 1989;49:483-8. 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 pseudoparaproteinemia 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 hemoglobin 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, apolipoproteins, 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, Australia: 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 continuing 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: Henrik Jørgensen (København), Line Rode (København), Petra Anttila (Seinäjoki), Tommi Vaskivuo (Uleåborg), Ísleifur Ólafsson (Reykjavík), Leifur Franzson (Reykjavík), Helge Rootwelt (Oslo), Yngve Thomas Bliksrud (Oslo), Per Bjellerup (Västerås), Ola Hammarsten (Gothenburg), Lutz Schwettmann (Ålesund).
Ordförande: Yngve Thomas Bliksrud (Oslo).

Redaktionen för Klinisk Biokemi i Norden

Hovedredaktør: Ingunn Þorsteinsdóttir · Tryk: Clausen Grafisk

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

Norge
Overlege Helle Borgstrøm Hager
Sentrallaboratoriet
Sykehuset i Vestfold, Postboks 2168
3003 Tönsberg
Telefon: +47 33 34 30 53
helle.hager@siv.no

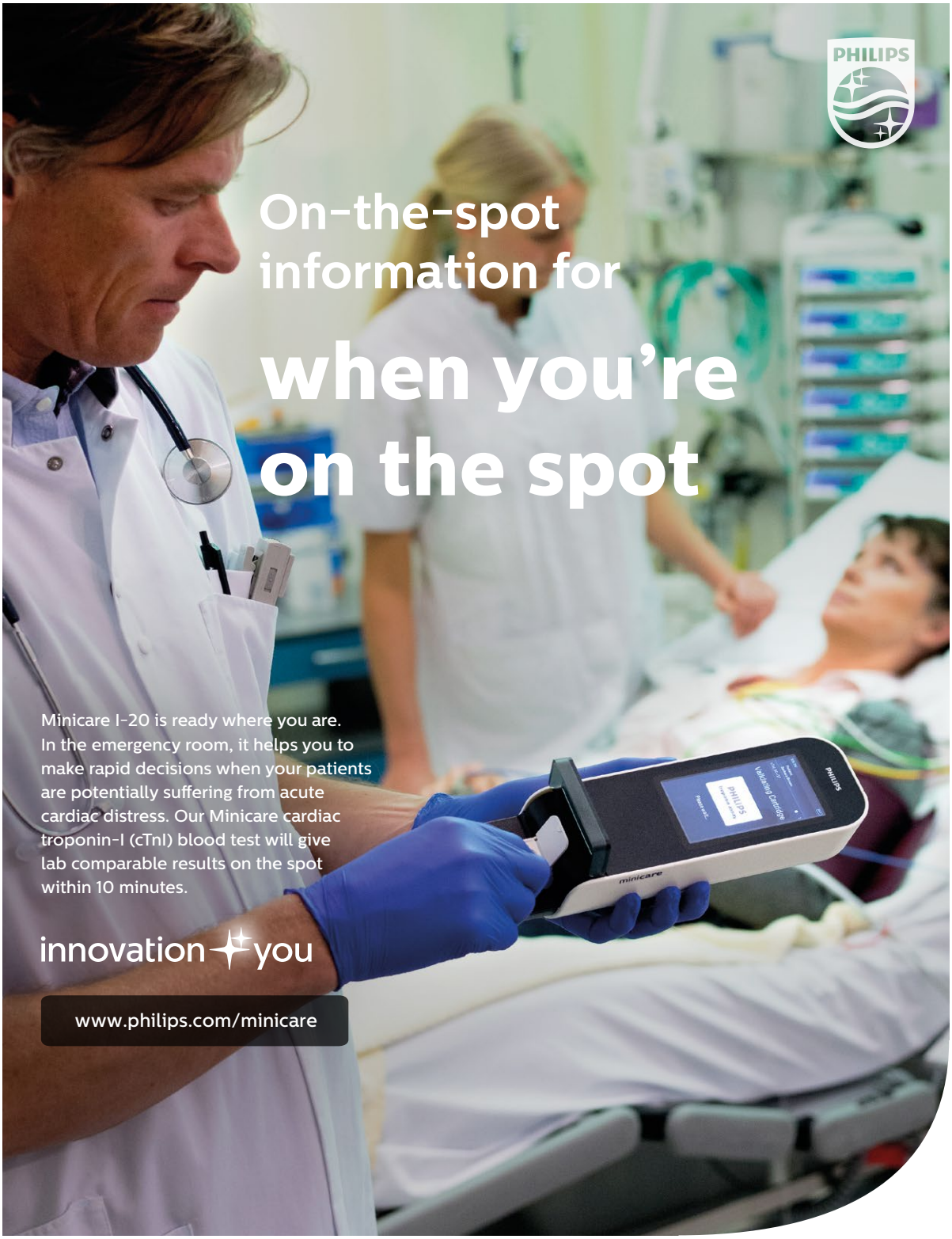
Island
Överläkare Ingunn Þorsteinsdóttir
Department of Clinical Biochemistry
Landspitali - University
Hospital Hringbraut
IS-101 Reykjavik
Telefon: +354 543 5033
ingunnth@landspitali.is

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

Finland
Sjukhuskemist Henrik Alfthan
Helsingfors Universitetscentralsjukhus
HUSLAB
Topeliusgatan 35
FIN-00290 Helsingfors
Telefon: +358 50 4271 457
henrik.alfthan@hus.fi

NFKK
Overlege Yngve Thomas Bliksrud
Avdeling for medisinsk biokjemi
Oslo universitetssykehus HF
Rikshospitalet
Postboks 4950 Nydalen 0424 Oslo
Telefon: +47 23 07 41 13
yngve.thomas.bliksrud@ous-hf.no

Från vänster kring bordet Helle, Linda, Henrik, Anders, Ingunn och Yngve.



Minicare
cardiac troponin-I

PHILIPS

SIEMENS Healthineers

Good News: You're automating your lab. Best News: We perform over 900 workflow consultations each year.

Siemens Healthineers consultants ensure that your automation solution—from concept to completion—will help you deliver the outcomes you demand.

siemens.com/automation-leader

You've decided to automate your lab, but what's the next step? How do you find the right partner to meet your growth and productivity needs?

With nearly two decades of automation experience, Siemens will work closely with your team to define and help you achieve your goals. Utilizing our Lean analysis tools and proprietary simulation models, our healthcare consultants help establish new processes, redefine workflow, and improve staff utilization. And our project management team partners with you to make sure your implementation is a success.

As your long-term partner, Siemens will be there—from design and implementation to ongoing optimization of your laboratory's performance. That's why so many customers have trusted us for their first and replacement automation solutions. You can always expect our commitment to a seamless transition to your new solution, giving you confidence and peace of mind. And that's the best news of all.

Get more good news at **siemens.com/automation-leader.**