

National undersøgelse af Cobalamin i lave koncentrationer 2022

Revision 1, se addendum 1 for flere oplysninger

Kære laboratorie.

Tak fordi du var med i en national undersøgelse af cobalamin (herefter kaldet vitamin B12).

Indhold

Problematik og formål	1
Undersøgelsen	2
Deltagere	2
Prøvemateriale	2
Analyse	2
Målinger	2
Resultatindberetning	2
Forklaring af grafik	2
Targetværdier	3
Acceptgrænser	3
Statistik og grupperinger	4
Outliers	4
Resultater og observationer	4
Analyseniveauet for Vitamin B12 i Danmark	4
Deltagere	4
Outliers	4
Targetværdier for vitamin B12	4
Beslutningsgrænserne er ikke ens	5
Nedre beslutningsgrænse i forhold til målt koncentration	5
Øvre beslutningsgrænse i forhold til målt koncentration	6
Nedre og øvre beslutningsgrænser - gruppering efter gråzoneområde	6
Forskelle mellem instrumenter - gruppering efter instrumentgruppe	7
Forskelle mellem analytiske metodeprincipper - gruppering efter analytiske metodeprincip	7
Effekt af om der laves opfølgende metylmalonat-målinger - gruppering efter reflex-princip	8
Hvilken acceptgrænse er realistisk	9
Præcision i Danmark på vitamin B12 målinger	10
Methylmalonat niveau	11
Mulighed for at harmonisere cut-off, beslutningsgrænser og referenceinterval	11
Opsummering	12
Konklusion	12
Spørgsmål	13
Tak	13
Bilag 1 Instruktion og indrapporteringsformular	14
Addendum 1	17

Problematik og formål

Vitamin B12 anvendes til forskellige diagnostiske formål, men pernicios anæmi er en af de vigtigste. Forskellige steder i Danmark er der *forskellige* beslutningsgrænser for, hvornår vitamin B12 er normal eller lav. I

gråzone-området, der findes imellem den laveste normale koncentration og den højeste lave koncentration, er det forskelligt, om der foretages en opfølgende P-methylmalonat (MMA)-undersøgelse ('reflex-test'). Da de eksisterende kvalitetssikringsprogrammer ikke inkluderer prøver i det lave koncentrationsområde, der udløser MMA-undersøgelser, og analysekvaliteten og overensstemmelsen mellem laboratorier derfor ikke kendes, blev den aktuelle undersøgelse lavet som et tilbud. Det er DEKS, der efter opfordring fra Videnskabeligt Udvalg for Kvalitet under DSKB (VUK) lavede undersøgelsen.

Formål

Resultatet kan bruges til at vurdere, om det er muligt at harmonisere beslutningsgrænser og referenceintervaller.

Ingen internationale referencematerialer

Et væsentligt problem er, at der ved vitamin B12-målinger, ikke er nogen internationale referencematerialer ('gold standard'), så den sande vitamin B12-koncentration kan fastlægges og alle metoder/instrumenter der-ved kan standardiseres. Dette betyder, at national harmonisering og nationalt niveau er det bedste, der kan opnås.

Undersøgelsen

Deltagere

Alle laboratorier i Danmark, der deltog i et eller flere kvalitetssikringsprogrammer, der inkluderer vitamin B12, fik tilbud om at deltage gratis i undersøgelsen.

Prøvemateriale

Der blev udsendt to prøver mærket Prøve A og Prøve B. Prøverne blev sendt på tøris fra DEKS den 15. marts 2022 og skulle opbevares ved -80 °C indtil analyse. Der var mindst 0,3 mL i Prøve A hhv. Prøve B. Materialet var poollet serum fra single donations prøver, fra patienter der har været henvist til vitamin B12 analyse. Koncentrationerne var tilnærmet områderne nær beslutningsgrænserne under hensyntagen til at undgå nedre målegrænse for nogle instrumenter.

Analyse

Prøverne skulle tøs op inden analyse og derefter vendes forsigtigt mindst 10 gange i hånden eller på vendeapparat. Måling skulle være udført indenfor 2 timer efter optøning som beskrevet i en medsendt håndteringsinstruktion (se Bilag 1)

Målinger

Alle deltagere blev bedt om at måle koncentrationen af vitamin B12 på hver prøve flere gange, gerne 3-5 gentagne bestemmelser, da man derved minimerer den tilfældige fejl. Hvis volumenet var tilstrækkeligt, blev deltagerne også bedt om at måle MMA 1 enkelt gang.

Resultatindberetning

Alle metodeoplysninger, oplysninger om lokale beslutningsgrænser og de gentagne målinger blev indberettet via en medsendt formular (se Bilag 1).

Forklaring af grafik

I rapporten er der på de sidste sider en grafisk præsentation af laboratoriets egne data således, at der både er histogrammer og Youden plot. Der er følgende elementer:

Histogram for målinger af vitamin B12 koncentration

Det var muligt at indberette gentagne målinger, hvilket betyder, at det er middelværdien af egne gentagne målinger, der er anvendt til at tegne histogrammet. Middelværdien anvendes også i beregninger af afvigelse og i en række statistiske oversigter. Middelværdien er vist med \diamond i grafikken. Samtidig er alle de gentagne målinger vist med \times .

Under histogrammet er der vist statistik for middelværdi, spredning og antal deltagere for alle deltagere og for egen instrumentgruppe.

Youden plot for målinger af vitamin B12 koncentration

Her er alene middelværdien af de gentagne målinger anvendt og den er vist med \diamond .

Histogram og Youden plot for P-CV (cobalamin) - spredning af målinger på vitamin B12

Ud fra de gentagne målinger er den relative spredning (CV%) udregnet. Denne CV% er plottet i et histogram for at vurdere, hvor god en præcision, der er hos de danske laboratorier. Præcisionen er også vist i et Youden plot.

Histogram for methylmalonat

Bemærk, at der kun er målt MMA i enkeltbestemmelse. Der vises histogrammer som beskrevet for vitamin B12, men med den forskel, at det er den målte værdi, der vises med \diamond .

Targetværdier

For *Vitamin B12*, er den anbefalede targetværdi, der vises i histogrammerne, angivet med et (R). Værdien er beregnet som et gennemsnit af alle instrumentgruppers middelværdier. Er der blot et enkelt laboratorie i en instrumentgruppe udelades gruppen af beregningerne. At der anvendes en instrumentgruppe middelværdi skyldes at der ikke findes et internationalt referencemateriale, og det således ikke er muligt at bestemme den sande koncentration af prøverne. Der er således tale om en national konsensus-target-værdi, idet det antages at hvert instrument har sin egen sporbarhed.

Det er den samme targetværdi, der anvendes til at opbygge Youden plottet.

For *P-CV (cobalamin)*, altså præcision/impræcision på vitamin B12, sættes targetværdien arbitrært til 1%, da det ideelle er, at have en lav CV uanset hvordan andre laboratoriers præcision er. Targetværdien er angivet med (R) og er vist i histogrammerne.

For *MMA* er den anbefalede targetværdi, der vises i histogrammerne angivet med et (M). Værdien er beregnet som et gennemsnit af alle laboratoriers målinger.

Acceptgrænser

Acceptgrænsen for vitamin B12 kan sættes ud fra den biologiske variation, og den skal ligge i intervallet 25-33 pmol/L¹. Acceptgrænsen skal vælges, så hovedparten af deltagerne kan overholde den, da målet er national harmonisering. Denne fremgangsmåde betyder, at grænsen reelt er baseret på et princip ud fra biologisk variation, og hvad der er analytisk muligt såfremt der benyttes godt udstyr (state-of-the-art princippet).

Acceptgrænserne for P-CV (cobalamin), skal vælges så hovedparten af deltagerne er inden for grænserne. Acceptgrænserne for MMA blev fastsat alene ud fra biologisk variation. Grænsen er 21% (1).

¹ Med udgangspunkt i et populations-referenceinterval på 200-600 pmol/L, svarende til nyere litteratur (2), kan dette interval findes, idet 4 x standard-deviationen på populationen er 400 pmol/L [600-200 pmol/L], hvorfor 1 standard-deviation svarer til 100 pmol/L. Kravet til bias er da 25-33 pmol/L, idet $\frac{1}{4} \times 100 \text{ pmol/L} = 25 \text{ pmol/L}$ eller $\frac{1}{3} \times 100 \text{ pmol/L} = 33 \text{ pmol/L}$ (3) (4).

Statistik og grupperinger

Middelværdi, SD og CV% udregnes for alle resultater samt for de aktuelle metodegrupper.

Acceptinterval beregnes på baggrund af targetværdierne og den valgte acceptgrænse.

Ud fra indberettede metodeoplysninger grupperes data på flere måder for at se, om der er sammenhænge og forskelle. Der grupperes efter instrumenter, gråzoneområder, analytiske metodeprincipper og MMA-reflex-procedure.

Outliers

Outliers blev identificeret alene ud fra ekspertskøn, da formålet var at vurdere overensstemmelsen nationalt.

Resultater og observationer Analyseniveauet for Vitamin B12 i Danmark

Ud fra de indberettede oplysninger om analytisk metodeprincip, instrument, gråzoneområde og eventuel MMA-måling, der efterfølger vitamin B12-målingen, samt de indberettede måleresultater er følgende resultatet af undersøgelsen.

Deltagere

I alt valgte 26 laboratorier at deltage

Outliers

Der blev ikke identificeret outliers.

Targetværdier for vitamin B12

Targetværdien for vitamin B12 er en national konsensusværdi, og er fastsat som gennemsnittet af de fire instrumentgrupper, som beskrevet i Tabel 1. Der er kun et laboratorium der anvender Beckman Coulter DXI, hvorfor Beckman Coulter instrumentgruppen ikke er medtaget i beregningen af targetværdien

Tabel 1. Targetværdier for vitamin B12 anvendt i rapporten for hhv. Prøve A og Prøve B. Targetværdien er beregnet som middelværdierne af hver instrumentgruppe og er således en national konsensusværdi.

Instrumentgruppe	Sample A		Sample B	
	Middelværdi [pmol/L]	Targetværdi [pmol/L]	Middelværdi [pmol/L]	Targetværdi [pmol/L]
Abbott Alinity	143,5	152,3	241	246
Roche Cobas	156,1		266	
Siemens Atellica	179,4		250	
Siemens Dimension Vista	130,2		227	

Beslutningsgrænserne er ikke ens

Det ses, at der anvendes forskellige gråzoneområder blandt de danske laboratorier. Ved gråzone forstås det område der findes imellem den laveste normale koncentration og den højeste lave koncentration.

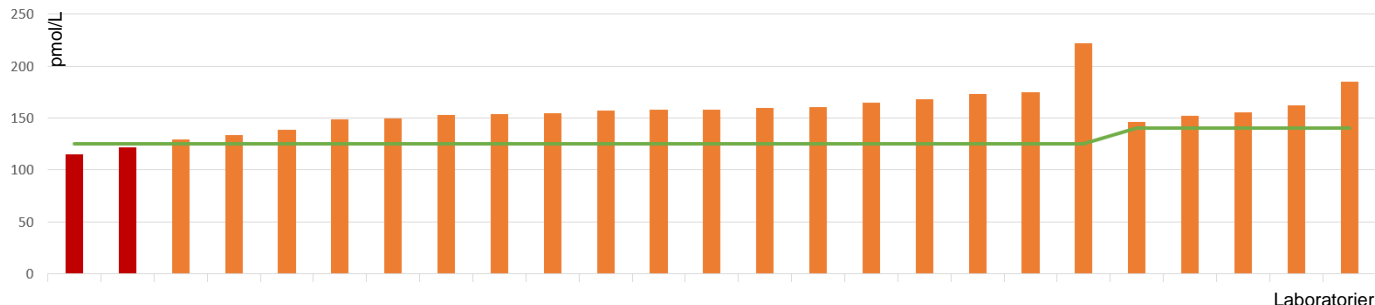
Tabel 2. Gråzoneområder, der anvendes i Danmark og antallet af laboratorier, der anvender et givet gråzoneområde.

Gråzoneområde	Antal laboratorier der anvender gråzoneområdet
125-200	1
125-220	5
125-250	14
140-200	5

Ved forskellige gråzoneområder, forventes det, at de laboratorier der måler lavt har lavere grænser i deres gråzoner, end laboratorier der måler højere, hvis patienter skal klassificeres ens hvad angår vitamin B12 mangel. Dette undersøges i afsnittene 'Nedre beslutningsgrænse', 'Øvre beslutningsgrænse' og 'Nedre og øvre beslutningsgrænser', hvor der ses isoleret på den nedre beslutningsgrænser, isoleret på den øvre beslutningsgrænse og begge grænser samtidig. Et laboratorie anvender ikke gråzoneområde.

Nedre beslutningsgrænse i forhold til målt koncentration

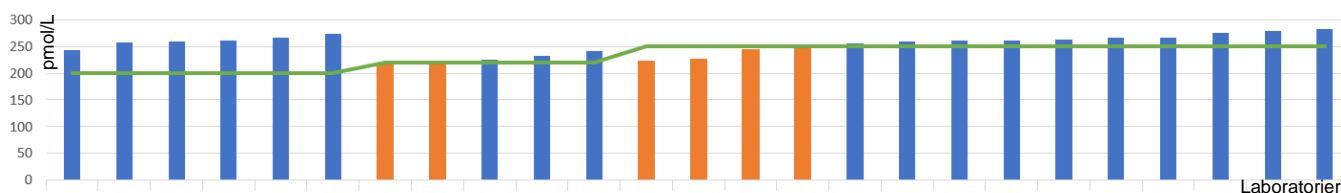
Når den målte værdi på Prøve A afbildes med en gruppering efter, om man har 125 eller 140 pmol/L som nedre grænser, fås Figur 1. Søjlerne viser hvert laboratories målte (gennemsnits-)værdi, arrangeret efter stigende koncentration. Den grønne linje er den nedre gråzone-grænse på hhv. 125 og 140 pmol/L



Figur 1. Prøve A. Gennemsnit af målinger indenfor hvert laboratorium (søjle) mod laboratoriets egen nedre grænse for gråzonen (grøn streg). Orange søjler er dem, der er inde i egen gråzone. De røde søjler er, hvor målingen ifølge egne grænser tolkes som vitamin B12-mangel. Laboratoriernes rækkefølge er sorteret efter stigende koncentration, inden for hver gråzone-grænse.

Sammenligner man måleniveauerne for nedre grænse alene, synes der ikke at være belæg for, at der skal være mere end en fælles grænse, da de, der har den højeste grænse, ikke måler markant højere end andre, og dem der har den laveste grænse, ikke måler markant lavere end andre.

Øvre beslutningsgrænse i forhold til målt koncentration



Figur 2. Prøve B. Gennemsnit af målinger indenfor hvert laboratorium (søjle) mod laboratoriets egen øvre grænse for gråzonen (grøn streg). Orange søjler er dem, hvor koncentrationen er inde i egen gråzone. Blå søjler er, hvor målingen ifølge egne grænser tolkes som værende tilstrækkelig for vitamin B12. Laboratoriernes rækkefølge er sorteret efter stigende koncentration, inden for hver gråzone-grænse.

Sammenligner man måleniveauerne for øvre grænse alene, synes der ikke at være belæg for, at der skal være mere end 1 fælles grænse.

Nedre og øvre beslutningsgrænser - gruppering efter gråzoneområde

Ser man på nedre og øvre beslutningsgrænse samtidig, ses det, at dem der har gråzoneområdet 125-220 pmol/L måler lavere end de laboratorier, der anvender andre gråzoneområder (Tabel 3). For de fem laboratorier, der anvender gråzoneområdet 125-220 pmol/L, er instrumentfordelingen: 4 Siemens Dimension Vista og 1 Siemens Atellica.

Tabel 3. For hvert gråzoneområde for hhv. Prøve A og Prøve B ses gennemsnit (middel), spredning (SD), relativ spredning i procent i forhold til gennemsnit (CV) og antal laboratorier (N).

Prøve, komponent	Middel, pmol/L	SD	CV	N
Prøve A, P-Cobalamin (vitamin B12); stofk.				
125-200	152,6	-	-	1
125-220	132,6	19,4	14,6	5
125-250	162,4	19,4	12,0	14
140-200	159,8	15,0	9,4	5
Prøve B, P-Cobalamin (vitamin B12); stofk.				
125-200	243	-	-	1
125-220	226	10,7	4,7	5
125-250	258	17,8	6,9	14
140-200	263	6,6	2,5	5

Opsummering omkring nedre og øvre beslutningsgrænser

Når målingerne fra laboratorierne sammenlignes med gråzoneområderne, ses den forventede sammenhæng imellem måleniveauet og grænserne i gråzoneområdet ikke (Figur 1 og Figur 2).

Ud fra dette er det nærliggende at foreslå en fælles national grænse, med den bemærkning at de laboratorier, der i dag anvender gråzoneområdet 125-220 pmol/L, adskiller sig ved at måle lavere end øvrige laboratorier (Tabel 3).

Forskelle mellem instrumenter - gruppering efter instrumentgruppe

Der findes ikke et internationalt referencemateriale for vitamin B12, så det understreges, at den sande koncentration ikke kendes.

Hvert laboratorie oplyste, hvilket instrument de anvendte og disse er derefter grupperet i følgende fem instrumentgrupper:

Abbott Alinity med 2 instrumenter (Alinity og Alinity ci).

Beckman Coulter med 1 instrument (DXI 800)

Roche Cobas med 12 instrumenter (Cobas, Cobas 6000, Cobas 8000 og Cobas E-model).

Siemens Atellica med 6 instrumenter (Atellica, Atellica IM og Atellica Solution).

Siemens Dimension Vista med 5 instrumenter (Dimension Vista og Dimension Vista 1500).

Middelværdien af hvert laboratories gentagne målinger er anvendt til beregningerne for instrumentgrupperne (Tabel 4).

Siemens Dimension Vista måler lavest på begge prøver². Prøve A måler Siemens Dimension Vista forskelligt fra Siemens Atellica, som gennemsnitligt måler højst koncentration. Dette kan skyldes, at der anvendes to forskellige analytiske metodeprincipper: Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay (LOCI) (4 ud af 5 Dimension Vistas anvender LOCI) og Kemilluminescens mikropartikel immunassay (CMIA) på Atellica. Siemens Atellica måler lidt højere koncentrationer end de øvrige instrumentgrupper på Prøve A. Roche Cobas måler lidt højere koncentrationer end de øvrige instrumentgrupper på Prøve B (Tabel 4 og Figur 3).

Tabel 4. For hver instrumentgruppe for hhv. Prøve A og Prøve B ses gennemsnit (middel), spredning (SD), relativ spredning i procent i forhold til gennemsnit (CV) og antal laboratorier (N).

Prøve, komponent	Middel, pmol/L	SD	CV	N
Prøve A, P-Cobalamin (vitamin B12); stofk.				
Abbott Alinity	143,5	7,3	5,1	2
Beckman Coulter DXI	120,8	-	-	1
Roche Cobas	156,1	5,7	3,7	12
Siemens Atellica	179,4	22,5	12,5	6
Siemens Dimension Vista	130,2	14,5	11,1	5
Prøve B, P-Cobalamin (vitamin B12); stofk.				
Abbott Alinity	241	22	9,1	2
Beckman Coulter DXI	204	-	-	1
Roche Cobas	266	7	2,7	12
Siemens Atellica	250	20,1	8,0	6
Siemens Dimension Vista	227	10,9	4,8	5

Forskelle mellem analytiske metodeprincipper - gruppering efter analytiske metodeprincip

Hvert laboratorie oplyste hvilket analytisk metodeprincip de anvendte, og disse er derefter grupperet ind i tre principgrupper. Dette er nødvendigt, da beskrivelserne af eget analytiske metodeprincip varierer, også for samme instrumenttype. I principgruppen elektrokemilluminescensimmunassay (ECLIA) er følgende principper oplyst af laboratorierne: 'Elektrokemilluminescensimmunoassay', 'kompetitiv' og 'kompetitivt analyseprincip'.

² Laboratoriet med Beckman Coulter DXI måler lavest, men er ikke en gruppen og medtages derfor ikke, når gruppernes koncentrationsniveauer sammenlignes.

I principgruppen luminescent Oxygen Channeling Immunoassay (LOCI) har alle oplyst, at de anvender 'Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay'.

I principgruppen kemiluminescens immunassay (CMIA) er følgende principper oplyst af laboratorierne: 'Kompetitiv Immun Analyse', 'Immunoenzymatisk analyse' og 'kemiluminescens immunassay'.

Som forventet, når man ser på de forskellige analytiske metodeprincipper, CMIA, ECLIA og LOCI, så følger de ofte instrumentgruppen idet de er confounded.

Tabel 5. For hver analytisk metodeprincipgruppe for hhv. Prøve A og Prøve B ses gennemsnit (middel), spredning (SD), relativ spredning i procent i forhold til gennemsnit (CV) og antal laboratorier (N).

Prøve, komponent	Middel, pmol/L	SD	CV	N
Prøve A, P-Cobalamin (vitamin B12); stofk.				
Elektrokemiluminescensimmunoassay (ECLIA)	156,1	5,7	3,7	12
Kemiluminescensimmunassay (CMIA)	163,7	27,6	16,8	10
Luminescent Oxygen Channeling immunoassay (LOCI)	124,5	8,4	6,7	4
Prøve B, P-Cobalamin (vitamin B12); stofk.				
Elektrokemiluminescensimmunoassay (ECLIA)	266	7	2,6	12
Kemiluminescensimmunassay (CMIA)	243	21,9	9,0	10
Luminescent Oxygen Channeling immunoassay (LOCI)	223	7,1	3,2	4

Laboratorier, der anvender LOCI, måler som gruppe lavere end øvrige (Tabel 5). Dette passer med observationen ovenfor (afsnittet 'Forskelle mellem instrumenter...'), nemlig at Siemens Dimension måler lavere end de øvrige instrumentgrupper³⁴.

Effekt af om der laves opfølgende metylmalonat-målinger - gruppering efter reflex-princip

Forskelle i niveauer kunne forklares ved, at der i nogle laboratorier laves opfølgende MMA-målinger for at afklare Vitamin B12 status, mens andre laboratorier ikke laves en opfølgende MMA-måling. Der er fire forskellige fremgangsmåder blandt laboratorierne:

- Der foretages ikke en opfølgende MMA-målinger ('ingen reflex').
- Der foretages automatisk en MMA-måling, når den målte vitamin B12 koncentration ligger i gråzoneområdet ('reflex').
- Rekvirenten kan vælge at bestille vitamin B12 målingen, så der enten foretages en automatisk MMA-måling, når den målte vitamin B12 koncentration ligger i gråzoneområdet ('reflex afhængig af rekvirent'), eller at der ikke laves MMA-måling uanset vitamin B12 koncentrationen ('ingen reflex').
- Den fjerde og sidste mulighed er, at laboratoriet selv kan vælge, om der skal foretages en opfølgende MMA-måling, eller at der ikke skal laves en måling ('reflex valgfri').

Middelværdier af vitamin B12 koncentrationerne er grupperet efter reflex-princip i Tabel 6.

Umiddelbart ses der ikke noget mønster i hvordan der vælges om der udføres reflex-test.

³ Der er kun et laboratorium med Beckman Coulter DXI, hvorfor der ikke er tale om en gruppe af laboratorier, og der ses derfor bort fra Beckman Coulter i denne sammenhæng.

⁴ Da den sande koncentration ikke kendes, er det lige så korrekt at sige, at de andre instrumentgrupper måler højere end Siemens Dimension Vista.

Tabel 6. Gruppering efter oplyst praksis for eventuelt opfølgende methylmalonat-målinger i forbindelse med måling af vitamin B12. For hver praksis for hhv. Prøve A og Prøve B ses gennemsnit (middel), spredning (SD), relativ spredning i procent i forhold til gennemsnit (CV) og antal laboratorier (N).

Prøve, komponent	Middel, pmol/L	SD	CV	N
Prøve A , P-Cobalamin (vitamin B12); stofk.				
Ingen reflex	151,6	17,4	11,4	9
Reflex	155,7	4,4	2,9	5
Reflex afhængig af rekvirent	181,5	27,7	15,2	4
Reflex valgfri	145,5	19,9	13,6	7
Prøve B , P-Cobalamin (vitamin B12); stofk.				
Ingen reflex	249	18,5	7,4	9
Reflex	257	20,0	7,8	5
Reflex afhængig af rekvirent	258	17,7	6,8	4
Reflex valgfri	249	24,3	9,8	7

Det er heller ikke muligt at finde et mønster, hvis data deles op efter *både* gråzoneområdet, og om der laves opfølgende MMA-måling (data ikke vist)

Hvilken acceptgrænse er realistisk

Der er forskelle mellem instrumentgrupperne og den sande koncentration af prøverne kendes ikke. Baseret på en targetværdi på gennemsnittet af de fire instrumentgrupper og et acceptinterval, der bør være mellem 25-33 pmol/L, kan følgende Youden plots laves. Med acceptgrænse på ± 30 pmol/L, som anvendt i rapporten og grafikken herunder (Figur 3) er hovedparten af laboratorierne inden for grænserne.

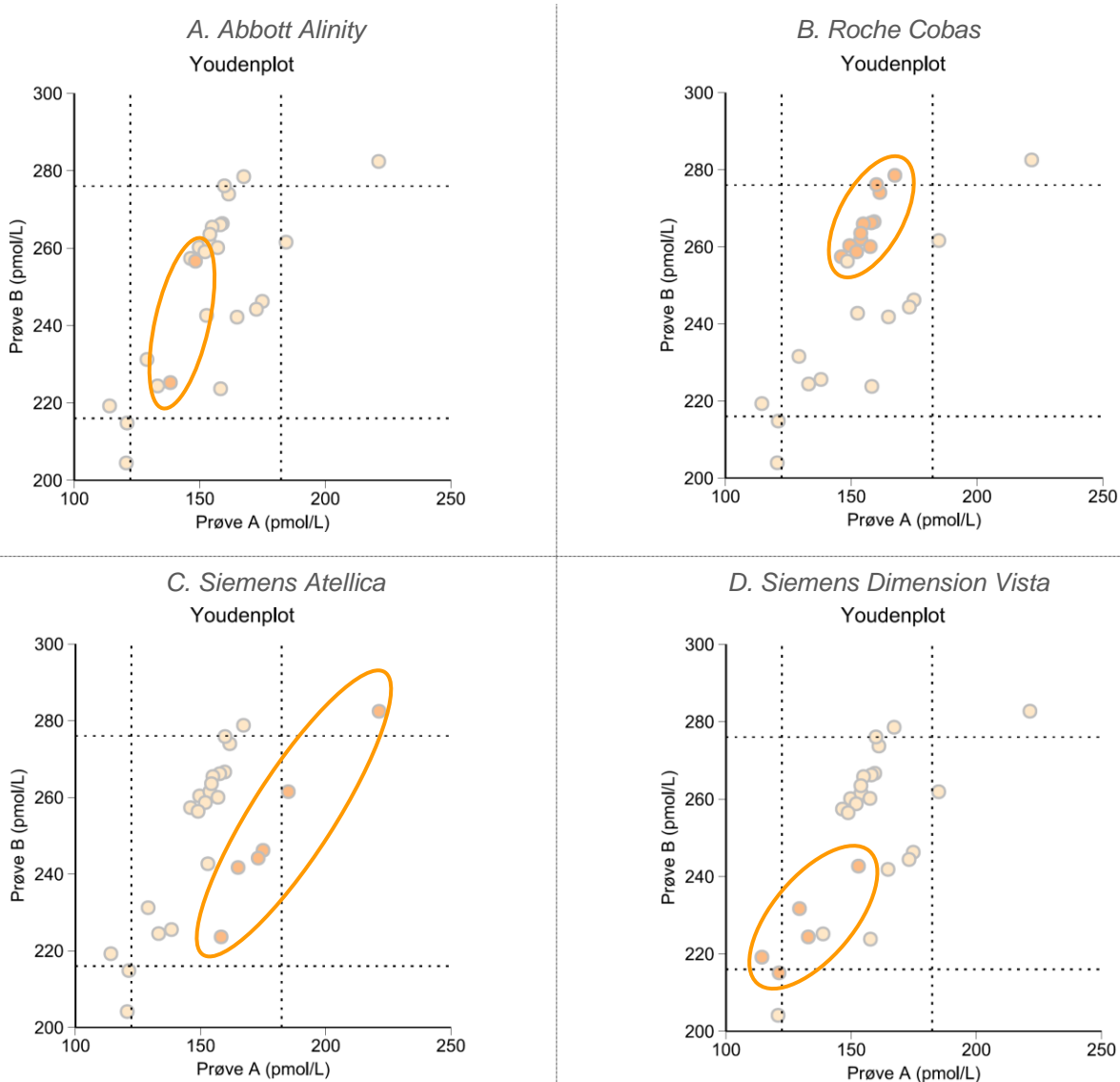
Med en acceptgrænse på ± 30 pmol/L er der ud af 26 laboratorier:

- 3 laboratorier der er uden for acceptintervallet på både Prøve A og Prøve B.
- 2 laboratorier der er uden for acceptintervallet for Prøve A, men inden for acceptintervallet for Prøve B.
- 1 laboratorie der er uden for acceptintervallet for Prøve B, men inden for acceptintervallet for Prøve A

Betragtes instrumentgrupperne med flere laboratorier og ikke enkelt-laboratorier, forekommer det ikke at være et urealistisk mål, at alle i en given instrumentgruppe, kan være inden for acceptgrænserne.

En snævrere acceptgrænse på 25 pmol/L er ikke realistisk i forhold til state-of-the-art princippet (observation af hvad der er analytisk muligt, såfremt der benyttes godt udstyr) der anvendes i denne undersøgelse.

Figur 3 Youden plot for middelværdier af vitamin B12 målinger. Hver prik viser et laboratories måling på Prøve A og Prøve B (middelværdi af flere målinger). Underplot A, B, C og D viser de samme data, men fremhæver de forskellige instrumentgrupper. Cirklerne fremhæver niveauet af en given instrumentgruppe. Lodrette og vandrette stiplede streger er en acceptgrænse på ± 30 pmol/L i forhold til den fastsatte target-værdi. Der er ikke vist en figur for Beckman Coulter.



Præcision i Danmark på vitamin B12 målinger

Ud fra de gentagne målinger på vitamin B12 er det muligt at bestemme præcisionen (CV%) i det koncentrationsområde, der er nær gråzoneområdet, idet både Prøve A og Prøve B er repræsentanter herfor.

Ud fra histogrammerne og Youden plottet kan state-of-the-art præcisionen for danske laboratorier observeres.

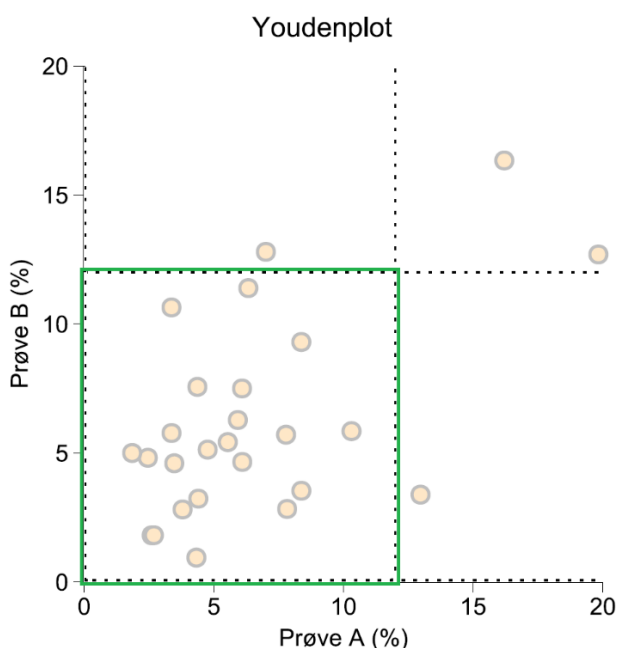
Der ses store forskelle mellem laboratoriernes CV%. Nærmere undersøgelser med opdeling i analytisk metodeprincipper, gråzoneområder og reflex-princip viser ingen sammenhænge (grafik ikke vist). Opdeling efter instrumentgrupper (der er den opdeling, der er anvendt i egen grafik) påviser ikke sammenhænge, der er relateret til instrument-type.

For Prøve A ses at præcisionen varierer mellem 1,9% og 19,9%, hvor middelværdien er 6,5%. Spredningen (SD) mellem laboratorierne er 4,3.

For Prøve B ses en spredning mellem 1% og 16,3%, hvor middelværdien er 6,2%. Spredningen mellem laboratorier er 3,8.

Ved observation ses, at et acceptinterval på 0-12% vil indeholde de fleste laboratorier, idet der er 3 ud af 26 laboratorier, der har en præcision større end 12% på Prøve A. Ligeledes er der 3 laboratorier, der har en præcision, større end 12% på Prøve B.

Figur 4. Youden plot for præcision af de gentagne målinger på vitamin B12. Hver prik viser et laboratories præcision på Prøve A og Prøve B. De lodrette og vandrette stiplede streger er en acceptgrænse på maksimalt 12 %. Den grønne firkant er sat for at fremhæve området inden for acceptgrænserne



Methylmalonat niveau

Det var valgfrit at måle MMA. Der var kun 2 laboratorier, der målte MMA.

Årsagen til, at kun få laboratorier målte MMA, kan skyldes at:

- Mængden af prøvemateriale krævet til gentagne målinger af vitamin B12 gjorde, at der ikke var nok serum til MMA-måling.
- MMA-måling krævede, at prøven blev sendt til et andet laboratorie.

Der blev i gennemsnit målt 0,46 $\mu\text{mol/L}$ på Prøve A og 0,37 $\mu\text{mol/L}$ på Prøve B. Målingerne kan ses i grafiken.

Mulighed for at harmonisere cut-off, beslutningsgrænser og referenceinterval

Data fra denne undersøgelse kan anvendes til at besvare spørgsmålene om eksisterende praksis og den analytiske kvalitet giver mulighed for at have fælles referenceinterval, harmoniserer gråzoneområde / beslutningsgrænser. Såfremt dette skal være muligt, skal der være nationale krav til analysekvaliteten for både bias og præcision. Når sådanne kvalitetskrav efterfølgende overholdes af laboratorierne, giver det sikkerhed for, at der et tilstrækkeligt harmoniseret analyseniveau, der tillader fælles referenceinterval, fælles cut-off / gråzoneområde og fælles beslutningsgrænser. At kravene overholdes, bør følges og dokumenteres med eksterne kvalitetssikringsprogrammer.

Opsummering

Ud fra data indsamlet fra deltagende laboratorier i denne undersøgelse ses at:

- der er forskelle imellem gråzoneområder for vitamin B12 (Tabel 2).
- der er forskellig praksis i forhold til om der foretages MMA-måling i forbindelse med vitamin B12-målinger og hvilke kriterier der anvendes for MMA-måling (Tabel 6).
- der er forskellig praksis for, om man måler MMA på samme laboratorie, hvor vitamin B12-målingen foretages, eller prøven skal sendes til et andet laboratorie.
- det er forskelligt, hvilke instrumenter og hvilket analytisk metodeprincip der anvendes til vitamin B12-målingen.

Resultaterne på de to udsendte prøver giver mulighed for at vurdere om der for vitamin B12 er bias/systematiske forskelle for forskellige grupper, der kan dannes ud fra oplysninger oplyst af deltagerne.

Targetværdierne for vitamin B12 på de to udsendte prøver er bestemt ud fra gennemsnittet af de 4 instrumentgrupper der hver især indeholder to eller flere laboratorier.

I rapporten ses følgende systematiske forskelle for vitamin B12:

- Når der grupperes efter gråzoneområde, ses at de 5 laboratorier, der har et gråzoneområde på 125-220 pmol/L, måler lavere end andre laboratorier, uden det vides, om det er de andre, der reelt måler for højere (Tabel 3). Af de fem laboratorier anvender 4 Siemens Dimension Vista og 1 Siemens Atellica.
- Når der grupperes efter analytisk metodeprincip ses at metodeprincipgruppen der anvender LOCI måler lavere end de øvrige (Tabel 5)
- Når der grupperes efter instrument, ses at den instrumentgruppe der indeholder Siemens Dimension Vista-instrumenter måler lavere (Figur 3D)
- Det er reelt samme observation, der foretages i ovenstående tre punkter, idet Siemens Dimension Vista er eneste instrument, der anvender LOCI som analytisk metodeprincip og også anvender en gråzone på 125-220 pmol/L
- Når der grupperes efter instrumenter, ses at instrumentgruppen med Siemens Atellica måler lidt højere end de andre instrumentgrupper på Prøve A (Figur 3C).
- Når der grupperes efter instrumenter, ses at instrumentgruppen med Roche Cobas måler lidt højere end de øvrige instrumentgrupper på Prøve B (Figur 3B)
- Alle observerede forskelle er beskedne, når vi betragter hhv. instrumentgrupper, grupperinger efter analytiske metodeprincipper, grupperinger efter gråzoneområder eller grupperinger efter MMA-reflex-principper.

Når præcisionen af de gentagne bestemmelser på vitamin B12 betragtes:

- er der forskelle mellem laboratorier, hvor nogen har meget stor præcision og andre en meget lille præcision. Spændet er mellem 1% og 19,9%, når begge prøver betragtes (Figur 4)
- ses der ingen forskelle, der kan forklares med instrumentgrupper, grupperinger efter analytiske metodeprincipper, grupperinger efter gråzoneområder eller grupperinger efter MMA-reflex-principper.

Der var to laboratorier, der målte MMA, og der drages ingen konklusioner på baggrund af de data.

Konklusion

Data i denne rapport tyder på, at gråzoneområder kan harmoniseres til et område.

Der observeres ikke nogen analytisk årsag til, at der er forskelle i praksissen med at foretage MMA-måling i forbindelse med vitamin B12-målinger.

Data i rapporten tyder på, at et acceptinterval på ± 30 pmol/L for vitamin B12 er realistisk at overholde for alle instrumentgrupper. Dette acceptinterval skal ses i forhold til en targetværdi, der er fastlagt som gennemsnit af instrumentgrupperne.

Ud fra spredningen af de gentagne målinger af vitamin B12 ses forskelle mellem laboratoriernes præcision. Forskellen synes ikke at være relateret til instrumentvalg. En fælles øvre grænse for præcision kan derfor indføres. I denne rapport er der valgt en grænse på 12% som maksimal CV.

Det er derfor nærliggende at lave en national harmonisering af gråzone-område og referenceinterval. Dette kræver fælles kvalitetskrav. En udmelding om krav til analysekvalitet for vitamin B12 vil komme fra DSKB efter indstilling fra Videnskabeligt Udvalg for Kvalitet (VUK) under DSKB. *Revision 1*: Denne anbefaling er nu godkendt og er tilgængelig på DSKB's hjemmeside (<https://dskb.dk/udvalg-for-faglige-anbefalinger/>).

Spørgsmål

Eventuelle spørgsmål vedrørende rapporten rettes til kemiker Morten Pedersen, Telefon: 3863 4404, e-mail: morten.pedersen@deks.dk.

Tak

Tak til Overbioanalytiker Karin Flø Jensen, Biokemi og Immunologi, Sygehus Lillebælt, Vejle og Overbioanalytikere Dorthe Magaard og Lisbeth Andreasen, Klinisk Biokemisk Afdeling, Rigshospitalet, København for indsamling af serum.

På vegne af VUK og DEKS
Morten Pedersen, Kemiker DEKS
Sanne Schou, Bioanalytiker DEKS

Referencer

1. Moeller J, Rasmussen K, Christensen L. External quality assessment of methylmalonic acid and total homocysteine. *Clin Chem*1999;45:9:1536-152.
2. Abildgaard A, et al. Reference intervals for plasma vitamin B12 and plasma/serum methylmalonic acid in Danish children, adults and elderly. *Clin Chim Acta*. 2022;525:62-8.
3. Gowans EM, et al. Analytical goals for the acceptance of common reference intervals for laboratories throughout a geographical area. *Scand J Clin Lab Invest*. 1988;48(8):757-64.
4. Ross JW. A theoretical basis for clinically relevant proficiency testing evaluation limits. Sensitivity analysis of the effect of inherent test variability on acceptable method error. *Arch Pathol Lab Med*. 1988;112(4):421-34.

Bilag 1 Instruktion og indrapporteringsformular.

Dette blev medsendt med prøverne til deltagerne

Kære laboratorie.

Tak fordi du vil være med i en national undersøgelse af cobalamin (herefter kaldet vitamin B12)

Prøvemateriale og sikkerhed

Der er to prøver mærket Prøve A og Prøve B.

Materialet er serum-pools fra patienter der har været henvist til vitamin B12 analyse.

Prøverne skal håndteres med samme forholdsregler som patientprøver.

Opbevaring og holdbarhed

Materialet skal opbevares ved -80 indtil analyse.

Deadlines

Prøverne er sendt fra DEKS den 15. marts.

Materialet skal analyseres senest onsdag d. 23. marts.

Der kan indberettes resultater til og med fredag d. 25. marts.

Instruktion før måling

Prøverne skal tøs op inden analyse. Efter optøning vendes forsigtigt mindst 10 gange i hånden eller på vendeapparat. Måles indenfor 2 timer.

Målinger

Du skal måle hver prøve flere gange: Vi anbefaler 3-5 gentagne bestemmelser, da vi ønsker at minimere den tilfældige fejl i denne undersøgelse. Noter alle resultater.

Mål vitamin B12 (Cobalamin) 3 til 5 gange.

Hvis volumenet er stort nok så mål også gerne methylmalonat 1 enkelt gang, ellers udelad målingen af methylmalonat.

Resultatindberetning

Alle gentagne målinger indberettes via den medsendte formular. På formularen skrives dine metodeoplysninger og oplysninger om lokale beslutningsgrænser og referenceintervaller.

Formularen sendes via mail til morten.pedersen@deks.dk.

Når data er analyseret, vil du modtage en rapport der viser hvordan analyseniveauet er i Danmark. Senere vil der komme en gennemgang af, om det er muligt at harmonisere cut-off og beslutningsgrænser.

Næste udsendelse

Der er kun planlagt denne ene udsendelse.

Spørgsmål

Eventuelle spørgsmål vedrørende materialer, analyse eller indrapportering rettes til bioanalytiker Sanne Schou, Telefon: 38 63 44 05, e-mail: sanne.schou@deks.dk eller kemiker Morten Pedersen, Telefon: 38 63 44 04, e-mail: morten.pedersen@deks.dk.

Baggrund

Vitamin B12 anvendes til forskellige diagnostiske formål, men pernicios anæmi er en af de vigtigste. Forskellige steder i Danmark er der *forskellige* beslutningsgrænser for, hvornår en lav vitamin B12 udløser en opfølgende P-methylmalonat-undersøgelse.

Da de eksisterende kvalitetssikringsprogrammer ikke inkluderer prøver i det lave koncentrationsområde der udløser methylmalonat-undersøgelser og analysekvaliteten og overensstemmelsen mellem laboratorier derfor ikke kendes, er dette tilbud lavet.

På vegne af VUK og DEKS

Morten Pedersen, Kemiker DEKS

Sanne Schou, Bioanalytiker DEKS

INDBERETNING

National undersøgelse af Cobalamin i lave koncentrationer 2022

DEKSnummer		Kontakttelefon	
Kontaktperson		Email	
Laboratorie- navn		By	

Udfyld oplysningerne om jeres apparatur og nedenstående tabel med jeres målinger

Basisoplysninger Udfyldes med oplysninger om jeres instrument

Instrument	
Model	
Producent	
Analytisk princip	
Reagens (navn, producent og LOT)	
kalibrator (navn, producent og LOT)	
Analytisk range (hvad er måleområdet)	
CV på interne kontroller (i %)	

Målinger: Cobalamin/ Vitamin B12. Udfyld med de 3-5 gentagne målinger

	Enhed	1. måling	2. måling	3. måling	4. måling	5. måling
Prøve A						
Prøve B						
Eventuelle kommentarer:						

Måling: Methylmalonat (kun hvis der er nok prøvematerialer)

	Enhed	1. måling	Eventuel kommentar
Prøve A			
Prøve B			

DEKSnummer	
------------	--

Kliniske oplysninger Udfyld med hvilke kliniske beslutningsgrænser anvender i lokalt efter måling af Vitamin B12

	Interval som området dækker	Områdets betydning (fx "B12-mangel", "Normal")
Område 1		
Område 2		
Område 3		
Område 4		

Eventuel opfølgende undersøgelse

Er der et koncentrationsområde hvor I laver en opfølgende undersøgelse med fx MMA og er det valgfrit eller er det en reflex-analyse?

(X) Vi har *ikke* et koncentrationsområde hvor der laves opfølgende undersøgelser

(X) Vi *har* et koncentrationsområde hvor der laves opfølgende undersøgelser

Beskriv området og hvilke opfølgende undersøgelser der laves

--

(X) Den opfølgende undersøgelser er tvungen/en reflex-analyse (dvs *ikke valgfri*)

(X) Den opfølgende undersøgelser er valgfri

Andre kommentarer:

Addendum 1

Ved en fejl, er resultater fra to laboratorier (to datasæt) for vitamin B12 ikke er medtaget i første udgave af rapporten. Ingen af de to laboratorier har målt MMA, så alle ændringer i denne rapport vedrører alene vitamin B12.

Der ene laboratorie anvender Siemens Atellica

- Derfor er flere figurer og opsummeringer revideret og de instrument-grupper, reflex-grupper og princip-grupper de er med i, har fået deres data revideret.
- Der er lavet en mindre justering af targetværdierne på vitamin B12 på ca 1pmol/L, da middelværdien af Siemens Atellica-gruppen er ændret

Targetværdi for Vitamin B12 (pmol/L)	Før (i udgave 1 af rapporten)	Nu (værdien i denne reviderede rapport)
Prøve A	153,4	152,3
Prøve B	247	246

- Og dermed blev acceptområdet også justeret med forskellen

Det andet laboratorie anvender Beckman Coulter DXI 800.

- Dette kunne betyde, at der kom en ekstra instrumentgruppe, og targetværdierne skulle udregnes ud fra 5 grupper og ikke 4. Men da der skal være flere laboratorier i en gruppe, for at gruppen er repræsentativ, medtages Beckman Coulter ikke i beregningen af targetværdien.
- Deres resultater vises i grafikkerne
- Deres resultatet indgår i beregningen af princip-grupper (det er CMIA-gruppen)
- Deres resultater indgår IKKE i beregningen af gråzoneområder, reflexgrupper, og om de er indenfor eller udenfor gråzoneområdet, da de ikke har et gråzoneområde
- Der er derfor foretaget justeringer af flere figurer, tabeller og opsummeringer

Konsekvens for dem der fik den første udgave af rapporten

Ovenstående betyder, at alle laboratorier flyttes ca. 1 pmol/L i forhold til targetværdien og acceptgrænserne for Vitamin B12.

På graferne for CV% er der kommet to ekstra datapunkter. De ligger begge så det ikke ændre noget i forholdt til et nationalt krav til CV%. To ekstra datapunkter ændre intet for laboratorier der modtog første udgave af rapporten, da målet altid er at have en lav CV%.

Konsekvens for anbefalingerne fra DSKB efter VUKs indstilling

VUK har vurderet, at de reviderede data ikke påvirker de anbefalinger for vitamin B12, der var indstillet til DSKB, og som er publiceret på DSKBs hjemmeside (<https://dskb.dk/udvalg-for-faglige-anbefalinger/>)

Component	Mean	Sd	CV	sem	N	Outliers
P-Cobalamin (Vitamin B12); stofk. ['Prøve A']						
<i>Reference Target</i>	152,3					
Alle	154,2	21,8	14,13	4,27	26	0
Abbott Alinity	143,5	7,3	5,09	5,16	2	0
Beckman Coulter	120,8				1	0
Roche Cobas	156,1	5,7	3,65	1,646	12	0
Siemens Atellica	179,4	22,5	12,52	9,17	6	0
Siemens Dimension	130,2	14,5	11,14	6,48	5	0
P-Cobalamin (Vitamin B12); stofk. ['Prøve B']						
<i>Reference Target</i>	246					
Alle	250	21,4	8,56	4,2	26	0
Abbott Alinity	241	22	9,13	15,54	2	0
Beckman Coulter	204				1	0
Roche Cobas	266	7	2,64	2,02	12	0
Siemens Atellica	250	20,1	8,02	8,19	6	0
Siemens Dimension	227	10,87	4,8	4,86	5	0
P-CV (Cobalamin) ['Prøve A']						
<i>Reference Target</i>	1					
Alle	6,54	4,29	65,6	0,841	26	0
Abbott Alinity	13,42	9,11	67,9	6,44	2	0
Beckman Coulter	7,73				1	0
Roche Cobas	6,34	4,36	68,8	1,258	12	0
Siemens Atellica	6,06	2,89	47,8	1,182	6	0
Siemens Dimension	4,61	1,545	33,5	0,691	5	0
P-CV (Cobalamin) ['Prøve B']						
<i>Reference Target</i>	1					
Alle	6,23	3,84	61,7	0,754	26	0
Abbott Alinity	12,72	0,0807	0,635	0,0571	2	0
Beckman Coulter	5,66				1	0
Roche Cobas	5,81	3,65	62,8	1,053	12	0
Siemens Atellica	6,3	3,19	50,7	1,303	6	0
Siemens Dimension	4,65	4,27	91,7	1,908	5	0
P-Methylmalonat; stofk. ['Prøve A']						
Alle	0,455	0,0488	10,73	0,0345	2	0
Cobas 8000	0,489				1	0
Dimension Vista 1500	0,42				1	0
P-Methylmalonat; stofk. ['Prøve B']						
Alle	0,366	0,00849	2,32	0,006	2	0
Cobas 8000	0,372				1	0
Dimension Vista 1500	0,36				1	0

P-Cobalamin (Vitamin B12); stofk. Instrument: Cobas 8000		Metode: Elektrokemiluminescensimmunoassay (ECLIA) Gråzone: 125-250		Instrumentgruppe: Roche Cobas Principgruppe: Reflex valgfri																																					
<p>Prøve A</p> <p>Eget resultat: 153,75 pmol/L (afv. 1,0%). 153,75 er middel af (x) 151; 153; 154; 157 Referenceværdi (R): 152,3 pmol/L</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Middel</th> <th>sd</th> <th>CV%</th> <th>SEM</th> <th>N</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Instrumentgruppe</td> <td>156,1</td> <td>5,70</td> <td>3,7</td> <td>1,6</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>Alle</td> <td>154,2</td> <td>21,78</td> <td>14,1</td> <td>4,3</td> <td>26</td> </tr> </tbody> </table>			Middel	sd	CV%	SEM	N	Instrumentgruppe	156,1	5,70	3,7	1,6	12	Alle	154,2	21,78	14,1	4,3	26	<p>Prøve B</p> <p>Eget resultat: 261,75 pmol/L (afv. 6,4%). 261,75 er middel af (x) 256; 260; 264; 267 Referenceværdi (R): 246 pmol/L</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Middel</th> <th>sd</th> <th>CV%</th> <th>SEM</th> <th>N</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Instrumentgruppe</td> <td>266</td> <td>7,00</td> <td>2,6</td> <td>2,0</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>Alle</td> <td>250</td> <td>21,41</td> <td>8,6</td> <td>4,2</td> <td>26</td> </tr> </tbody> </table>			Middel	sd	CV%	SEM	N	Instrumentgruppe	266	7,00	2,6	2,0	12	Alle	250	21,41	8,6	4,2	26	<p>Youdenplot</p>	
	Middel	sd	CV%	SEM	N																																				
Instrumentgruppe	156,1	5,70	3,7	1,6	12																																				
Alle	154,2	21,78	14,1	4,3	26																																				
	Middel	sd	CV%	SEM	N																																				
Instrumentgruppe	266	7,00	2,6	2,0	12																																				
Alle	250	21,41	8,6	4,2	26																																				
P-CV (Cobalamin) Instrument: Cobas		Metode: Kompetitivt Gråzone: 140-200		Instrumentgruppe: Roche Cobas Principgruppe: Ingen reflex																																					
<p>Prøve A</p> <p>Eget resultat: 4,4 % (afv. 338,2%) Referenceværdi (R): 1 % Acceptinterval (R ± 1100%): 0,00 - 12,00 %</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Middel</th> <th>sd</th> <th>CV%</th> <th>SEM</th> <th>N</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Instrumentgruppe</td> <td>6,34</td> <td>4,36</td> <td>68,8</td> <td>1,3</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>Alle</td> <td>6,54</td> <td>4,29</td> <td>65,6</td> <td>0,8</td> <td>26</td> </tr> </tbody> </table>			Middel	sd	CV%	SEM	N	Instrumentgruppe	6,34	4,36	68,8	1,3	12	Alle	6,54	4,29	65,6	0,8	26	<p>Prøve B</p> <p>Eget resultat: 3,3 % (afv. 227,1%) Referenceværdi (R): 1 % Acceptinterval (R ± 1100%): 0,00 - 12,00 %</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Middel</th> <th>sd</th> <th>CV%</th> <th>SEM</th> <th>N</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Instrumentgruppe</td> <td>5,81</td> <td>3,65</td> <td>62,8</td> <td>1,1</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>Alle</td> <td>6,23</td> <td>3,84</td> <td>61,7</td> <td>0,8</td> <td>26</td> </tr> </tbody> </table>			Middel	sd	CV%	SEM	N	Instrumentgruppe	5,81	3,65	62,8	1,1	12	Alle	6,23	3,84	61,7	0,8	26	<p>Youdenplot</p>	
	Middel	sd	CV%	SEM	N																																				
Instrumentgruppe	6,34	4,36	68,8	1,3	12																																				
Alle	6,54	4,29	65,6	0,8	26																																				
	Middel	sd	CV%	SEM	N																																				
Instrumentgruppe	5,81	3,65	62,8	1,1	12																																				
Alle	6,23	3,84	61,7	0,8	26																																				
P-Methylmalonat; stofk. Instrument: Cobas 8000		Metode: Ikke oplyst Gråzone: 125-250		Instrumentgruppe: Cobas 8000 Principgruppe: Reflex valgfri																																					
<p>Prøve A</p> <p>Eget resultat: 0,489 μmol/L (afv. 7,6%) Middelværdi af alle (M): 0,455 μmol/L Acceptinterval (M ± 21%): 0,359 - 0,550 μmol/L</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Middel</th> <th>sd</th> <th>CV%</th> <th>SEM</th> <th>N</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Instrumentgruppe</td> <td>0,489</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Alle</td> <td>0,455</td> <td>0,05</td> <td>10,7</td> <td>0,0</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table>			Middel	sd	CV%	SEM	N	Instrumentgruppe	0,489				1	Alle	0,455	0,05	10,7	0,0	2	<p>Prøve B</p> <p>Eget resultat: 0,372 μmol/L (afv. 1,6%) Middelværdi af alle (M): 0,366 μmol/L Acceptinterval (M ± 21%): 0,289 - 0,443 μmol/L</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Middel</th> <th>sd</th> <th>CV%</th> <th>SEM</th> <th>N</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Instrumentgruppe</td> <td>0,372</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Alle</td> <td>0,366</td> <td>0,01</td> <td>2,3</td> <td>0,0</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table>			Middel	sd	CV%	SEM	N	Instrumentgruppe	0,372				1	Alle	0,366	0,01	2,3	0,0	2		
	Middel	sd	CV%	SEM	N																																				
Instrumentgruppe	0,489				1																																				
Alle	0,455	0,05	10,7	0,0	2																																				
	Middel	sd	CV%	SEM	N																																				
Instrumentgruppe	0,372				1																																				
Alle	0,366	0,01	2,3	0,0	2																																				