

Tillförlitliga referensintervall krävs för värdering av P-ALP

NYA PEDIATRISKA REFERENSINTERVALL FÖR ALKALISKT FOSFATAS HAR KLINISK BETYDELSE FÖR ATT HITTA RÄTT TILL DIAGNOSEN

Tillförlitliga referensintervall är av central betydelse inom laboriemedicinsk diagnostik för bedömning och tolkning av analysresultat. Generellt innebär skapandet av referensintervall att referensvärden hämtas från subjektivt friska individer (referensindivider), helst grupperade efter ålder, kön och etnisk grupp, i en referensgrupp som representerar en referenspopulation [1].



Per Magnusson, forskningschef, adjungerad professor, Diagnostikcentrum, Universitetssjukhuset i Linköping; klinisk kemi, institutionen för klinisk och experimentell medicin, Linköpings universitet
 ● per.magnusson@regionostergotland.se

I praktiken skiljer sig inte begreppet »referensvärde« från det tidigare begreppet »normalvärde«, som övergavs eftersom »normal« kunde tolkas som »statistiskt normalfördelad«, »vanlig« eller »inte sjuk«. Referensintervall brukar anges med 95 procents konfidsgrad, där percentilnivåerna 2,5 procent och 97,5 procent (motsvarar medelvärdet $\pm 1,96$ SD) markerar de nedre och övre referensgränserna. Ett referensintervall ska inte betraktas som definitiva gränsvärden mot det patologiska.

Vid återkommande provtagning är kunskaper om patofysiologiska mekanismer och analyternas egenskaper, framför allt den intraindividuell variationen, viktiga för att avgöra om ett mätvärdes förändring är slumpmässig eller inte [2].

Med utgångspunkt från nya pediatrika referensintervall för alkaliskt fosfatasa

(ALP) vill jag i denna medicinska kommentar problematisera frågor kring mätning av ALP hos barn och ungdomar och beskriva den kliniska betydelsen.

Olika isoenzymer och isoformer

ALP är ett enzym som härrör från osteoblasterna i skelettet men även från lever, placenta, tunntarm och tumörvävnad, och därför kan förhöjda nivåer av P-ALP ibland vara svårtolkade. Vävnadsospecifikt ALP (tissue-nonspecific; TNALP) ut-

trycks av genen ALPL framför allt i skelett och lever, vilka benämns isoformer av samma TNALP-isoenzym. För benspecifikt ALP finns fyra benspecifika isoformer beskrivna (B/I, B1x, B1 och B2) med strukturella och funktionella skillnader [3-5].

Alla TNALP-isoformer har samma proteinstruktur, och den strukturella skillnaden beror på posttranslationella glykosyleringar. Utöver vävnadsospecifikt ALP finns också tre vävnadspecifika ALP-gener som uttrycks i tunntarmen (ALPI), placenta (syncytiotrofoblaster) (ALPP) och testis (ALPL2) [3].

Hos friska vuxna individer härrör P-ALP främst från skelett och lever, ungefär i förhållandet 1:1, och en mindre fraktion (<10 procent) är intestinal ALP [6]. Barn och ungdomar har betydligt högre ALP-nivåer än vuxna, framför allt under tillväxtspurt, vilket härrör från skelettets benbildande osteoblaster [7]. Det är därför essentiellt att kliniska laboratorier använder sig av ålders- och könsspecifika referensintervall vid utlämnande av provsvar för P-ALP [8].

P-ALP används främst vid diagnostik och uppföljning av skelettsjukdomar associerade till ökad osteoblastaktivitet samt lever- och gallvägssjukdomar. Det är förstås en glidande skala vad gäller förhöjda ALP-nivåer och värden i övre referenskvartilen, men generellt kan lätt förhöjda ALP-aktiviteter ses vid osteomalaci, osteosarkom och under frakturläkning. Förhöjda till kraftigt förhöjda ALP-nivåer ses vid Pagets sjukdom (osteitis defor-

»Det är min förhoppning att Equalis rekommendation för ålders- och könsspecifika barnreferensintervall för P-ALP implementeras nationellt.«

mans), skelettmetastaser med hög osteoblastaktivitet och avancerad rakit. Kroniskt njursjuka patienter har ofta rubningar i mineralmetabolismen, vilket leder till sekundär hyperparatyroidism som kan ge skelettförändringar och förhöjda ALP-nivåer [3].

Ofta skelettmisbildning vid hypofosfatasi

Benspecifikt ALP är av central betydelse för mineraliseringsprocessen i skelettet. Mutationer i ALPL-genen, som kodar för TNALP, ger sjukdomen hypofosfatasi (OMIM [Online mendelian inheritance in man]: 146300, 241500, 241510). Hypofosfatasi karakteriseras som en ärftlig ämnesomsättningssjukdom (mutation som leder till minskad funktion, »loss of function«), som leder till nedsatt mineralisering av skelettet med rakitliknande manifestationer.

Vanliga symtom är skelettmisbildningar, upprepade frakturer och tandavvikelser, men även muskelförsvagning förekommer [9]. Till dags dato finns 340 mutationer i den internationella databasen (http://www.sesep.uvsq.fr/03_hypo_mutations.php), spridda över hela ALPL-genen; ca 72 procent är missensmutationer.

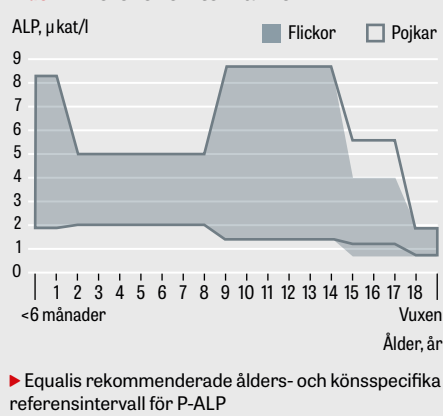
Sjukdomens svårighetsgrad varierar stort, allt från tidig avlossning av mjölk-tänder till svåra skelettmisbildningar in utero medförande dödfödsel. Hypofosfatasi indelas i sex olika former, där sjukdomens debut fungerar som riktlinje för klassificeringen:

- perinatal letal
- perinatal benign

HUVUDBUDSKAP

- Hypofosfatasi är en genetisk defekt av genen ALPL som kodar för isoenzymet vävnadsospecifikt alkaliskt fosfatasa (TNALP), som uttrycks i skelett och lever.
- Tillförlitliga ålders- och könsspecifika referensintervall, inkluderande nedre gränser, är essentiella för den kliniska bedömningen av alkaliskt fosfatasa i plasma.
- En fraktur kan tillfälligt ge högre värden av alkaliskt fosfatasa och maskera de lindrigare formerna av hypofosfatasi.
- Bisfosfonater är kontraindicerade vid hypofosfatasi.

FIGUR 1. Referensintervall för P-ALP



- infantil
- juvenil
- adult
- odonto hypofosfatasi.

De svårare formerna av hypofosfatasi är sällsynta, och förekomsten är ca 1 person per 100 000–300 000 födslar, medan ca 1 person per 6 370 individer i Europa beräknas ha måttlig/svår hypofosfatasi [10]. De lindrigare formerna av adult hypofosfatasi och odonto hypofosfatasi är betydligt vanligare, men de flesta har inte fått sin diagnos verifierad.

Det förekommer att dessa patienter felaktigt får diagnosen osteoporos eller lindrig osteogenesis imperfecta, eftersom de har fragilitetsfrakturer. Bisfosfonater är kontraindicerade då de kan förvärra symtomen [11], eftersom de till strukturen liknar pyrofosfat (naturligt substrat för ALP), som finns i överskott hos patienter med hypofosfatasi och hämmar mineraliseringsprocessen. Nyligen har det rapporterats att 1 av 250–300 individer skulle kunna vara anlagsbärare i USA och Europa [12], men det är högst osäkert om samma prevalens förekommer i Sverige.

På Socialstyrelsens uppdaterade informationssida om hypofosfatasi (www.socialstyrelsen.se/ovanligadiagnoser/hypofosfatasi) framgår behandlingsstrategier och behovet av stöd för personer med sjukdomen.

Läkemedlet asfotas alfa, en rekombinant form av TNALP, finns sedan 2008 tillgängligt för personer med hypofosfatasi, vars första symtom visat sig före 18 års ålder. Under 2016 publicerades positiva resultat från en långtidsuppföljning (5 år) [13].

Låga nivåer av P-ALP mest utmärkande

Låga nivåer av P-ALP, s k hypofosfatsemi, är det mest utmärkande laboratoriemedi-

cinska kännemärket för hypofosfatasi, men det kan även finnas andra orsaker till lågt P-ALP, tex magnesiumbrist, celiaki, svår sepsis och svår näringsbrist [9, 14, 15]. Kraftigt sänkta nivåer kan tyda på någon av de allvarligare sjukdomsformerna, medan lätt sänkta nivåer kan tyda på lindrig hypofosfatasi. Vid odonto hypofosfatasi är P-ALP-nivåerna vanligen normala.

Ur klinisk synvinkel är det viktigt att känna till att fraktur tillfälligt kan ge högre ALP-värden och maskera de lindrigare formerna av hypofosfatasi. Vid klinisk misstanke om hypofosfatasi och P-ALP-nivåer som är verifierat låga eller i nedre kvartilen av referensintervallet, bör diagnostiken kompletteras med analys av benspecifikt ALP och även P-pyridoxal-5'-fosfat (PLP), vilket är den aktiva formen av vitamin B₆.

P-pyridoxal-5'-fosfat är, precis som pyrofosfat, ett naturligt substrat för ALP och finns i förhöjda mängder i blodet hos patienter med hypofosfatasi. Analys av U-fosfoetanolamin (PEA) har genom åren använts som ett komplement till P-pyridoxal-5'-fosfat, men det bör noteras att U-fosfoetanolamin inte är ett naturligt substrat för ALP [16] och att provet har betydligt lägre sensitivitet för hypofosfatasi än P-pyridoxal-5'-fosfat [9].

Diagnosen hypofosfatasi bör verifieras med genetisk diagnostik av ALPL-genen [9].

Specifika barnreferensintervall behövs

Publicerade ålders- och könsspecifika referensintervall för ALP beskriver signifikanta skillnader mellan pojkar och flickor under puberteten, men även skillnader mellan olika åldrar [8, 17, 18]. En granskning av några av de i landet förekommande referensintervallen för P-ALP genomfördes under maj månad 2017. Stora skillnader finns mellan olika sjukhus/laboratorier, där några rapporterar tydliga ålders- och könsspecifika variationer under barn- och ungdomsåren, medan andra inte skiljer på barn och ungdomar under pubertetsåren.

Noterbart är också att vissa laboratorier inte anger en nedre referensgräns för P-ALP, dvs P-ALP-aktivitet på 0,0 µkat/l rapporteras som »inom referensintervallet«. Det bör observeras att anledningen till de olika referensintervallen inom landet inte är metodberoende, eftersom metoden för P-ALP harmoniserades nationellt år 2004 [19, 20].

Med användningen av felaktiga referensintervall ökar risken för felaktiga kliniska bedömningar, inkorrekta diagnoser och felmedicinering, vilket leder till signifikant försämrad livskvalitet. Felaktig nedre gräns för P-ALP kan leda till att personer med hypofosfatasi förblir odia-

gnostiserade eller felaktigt diagnostiserade med osteoporos.

Det nordiska samarbetsprojektet NORIP (Nordic Reference Interval Project), omfattande 102 nordiska laboratorier, samlade in prov från ca 3 000 personer (vuxna från 18 år) och beräknade referensintervall för ett flertal analyser [21]. Dessa referensintervall implementerades framgångsrikt under 2004 vid de flesta medicinska laboratorier i Norden. Motsvarande NORIP-projekt med prov från barn och ungdomar (5–19 år, n = 1 429) presenterades 2013 [22]. Signifikant för NORIP-projekten är att de anger en nedre referensgräns för P-ALP.

Expertgruppen för allmän klinisk kemi inom Equalis har i ett försök att harmonisera rapporteringen för P-ALP nyligen tagit fram en rekommendation för ålders- och könsspecifika barnreferensintervall (<http://www.equalis.se/sv/vaar-verksamhet/rekommendationer/>) (Figur 1). Rekommendationen baseras på en svensk studie med 699 barn och ungdomar i åldrarna 6 månader till 18 år [23].

Det är min förhoppning att Equalis rekommendation för ålders- och könsspecifika barnreferensintervall för P-ALP implementeras nationellt. ○

- Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Per Magnusson bedriver, utöver grundtjänsten, konsultverksamhet i egen firma. Konsultarvoden har erhållits från Alexion Pharma Nordics AB och Meda AB. Inga aktier eller tillgångar ägs i något av dessa företag.

Citera som: Läkartidningen. 2017;114:ETTH

REFERENSER

- Solberg HE. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1987;25:645-56.
- Theodorsson E, Grankvist K, Nilsson-Ehle P. Tolkning av analysresultat. I: Nilsson-Ehle P, Berggren Söderlund M, Theodorsson E, redaktörer. *Laurells Klinisk kemi i praktisk medicin.* 9:e uppl. Lund: Studentlitteratur; 2012. p. 23-51.
- Sardiwal S, Magnusson P, Goldsmith DJA, et al. Bone alkaline phosphatase in CKD-mineral bone disorder. *Am J Kidney Dis.* 2013;62(4):810-22.
- Halling Linder C, Enander K, Magnusson P. Glycation contributes to interaction between human bone alkaline phosphatase and collagen type I. *Calcif Tissue Int.* 2016;98(3):284-93.
- Haarhaus M, Brandenburg V, Kalarantar-Zadeh K, et al. Alkaline phosphatase: a novel treatment target for cardiovascular disease in CKD. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(7):429-42.
- Magnusson P, Degerblad M, Sääf M, et al. Different responses of bone alkaline phosphatase isoforms during recombinant insulin-like growth factor-I (IGF-I) and during growth hormone therapy in adults with growth hormone deficiency. *J Bone Miner Res.* 1997;12(2):210-20.
- Andersson B, Swolin-Eide D, Magnusson P, et al. Short-term changes in bone formation markers following growth hormone (GH) treatment in short prepubertal children with a broad range of GH secretion. *Clin Endocrinol.* 2015;82(1):91-9.
- Adeli K, Higgins V, Nieuwesteeg M, et al. Biochemical marker reference values across pediatric, adult, and geriatric ages: establishment of robust pediatric and adult reference intervals on the basis of the Canadian Health Measures Survey. *Clin Chem.* 2015;61(8):1049-62.
- Whyte MP. Hypophosphatasia - aetiology, nosology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(4):233-46.
- Mornet E, Yvard A, Taillandier A, et al. A molecular-based estimation of the prevalence of hypophosphatasia in the European population. *Ann Hum Genet.* 2011;75(3):439-45.
- Cundy T, Michigami T, Tachikawa K, et al. Reversible deterioration in hypophosphatasia caused by renal failure with bisphosphonate treatment. *J Bone Miner Res.* 2015;30(9):1726-37.
- Whyte MP. Hypophosphatasia: enzyme replacement therapy brings new opportunities and new challenges. *J Bone Miner Res.* 2017;32(4):667-75.
- Whyte MP, Madson KL, Phillips D, et al. Asfotase alfa therapy for children with hypophosphatasia. *JCI Insight.* 2016;1(9):e85971.
- McKiernan FE, Shrestha LK, Berg RL, et al. Acute hypophosphatasemia. *Osteoporos Int.* 2014;25(2):519-23.
- McKiernan FE, Dong J, Berg RL, et al. Mutational and biochemical findings in adults with persistent hypophosphatasemia. *Osteoporos Int.* 2017;28(8):2343-8.
- Halling Linder C, Narisawa S, Millán JL, et al. Glycosylation differences contribute to distinct catalytic properties among bone alkaline phosphatase isoforms. *Bone.* 2009;45(5):987-93.
- Magnusson P, Häger A, Larsson L. Serum osteocalcin and bone and liver alkaline phosphatase isoforms in healthy children and adolescents. *Pediatr Res.* 1995;38(6):955-61.
- Colantonio DA, Kyriakopoulou L, Chan MK, et al. Closing the gaps in pediatric laboratory reference intervals: a CALIPER database of 40 biochemical markers in a healthy and multiethnic population of children. *Clin Chem.* 2012;58(5):854-68.
- Simonsson P, Mårtensson A, Rustad P. Nya gemensamma nordiska referensintervall inom klinisk kemi. Bättre bas för klinisk bedömning och samarbete. *Läkartidningen.* 2004;101:901-5.
- Strømme JH, Rustad P, Steensland H, et al. Reference intervals for eight enzymes in blood of adult females and males measured in accordance with the International Federation of Clinical Chemistry reference system at 37 degrees C: part of the Nordic Reference Interval Project. *Scand J Clin Lab Invest.* 2004;64(4):371-84.
- Rustad P, Felding P, Franzon L, et al. The Nordic Reference Interval Project 2000: recommended reference intervals for 25 common biochemical properties. *Scand J Clin Lab Invest.* 2004;64(4):271-84.
- Hilsted L, Rustad P, Aksglaede L, et al. Recommended Nordic paediatric reference intervals for 21 common biochemical properties. *Scand J Clin Lab Invest.* 2013;73(1):1-9.
- Ridefelt P, Gustafsson J, Aldrimer M, et al. Alkaline phosphatase in healthy children: reference intervals and prevalence of elevated levels. *Horm Res Paediatr.* 2014;82(6):399-404.

SUMMARY

Age- and gender-specific reference intervals are pivotal to ensure appropriate interpretation of plasma alkaline phosphatase activities in the lower range

Hypophosphatasia (HPP) is an inborn error of metabolism caused by loss-of-function mutations of the ALPL gene that mainly express alkaline phosphatase (ALP) in bone and liver. The clinical expression of HPP is highly variable and is classified into six different forms mainly affecting bone and tooth mineralization. The prognosis for each of these HPP forms depends upon the severity of the skeletal disease which reflects the age at presentation. The biochemical hallmark of HPP is low plasma ALP activity (hypophosphatasemia); however, HPP is often misdiagnosed because of low awareness and sometimes absence of age- and gender-specific ALP reference intervals. Children and adolescents have higher ALP levels in comparison with adults. Reliable reference intervals are pivotal for any clinical laboratory test. Harmonized age- and gender-specific plasma ALP reference intervals ought to be used to ensure appropriate interpretation of plasma ALP activities in the lower range.