

# **PRAKTISK KURS I HEMATOLOGI**

## **Modul 1**

(Revidert jan-20.)

## INNHALDSFORTEGNELSE

OPPLYSNINGER OM LABORATORIEKURSET OG KURSHEFTET	s. 3
BLODETS FYSIOLOGI	s. 4
PROGRAM FOR KURSØVELSENE	s. 7
ATTESTASJONER BLODKURS	s. 8
BLODKURSETS METODEBESKRIVELSER	s. 9
APENDIX:	s. 42
SPØRSMÅL SOM BØR KUNNE BESVARES ETTER KURSET	s. 56

## OPPLYSNINGER OM LABORATORIEKURSET OG KURSHEFTET

Timeplan over kursdagene finnes via Mine studier. *Det forutsettes at studentene har lest den aktuelle del av kursheftet før de møter til selve kurset.* På kurssalen blir det kun gjennomgått de praktiske metodene.

*Pass på at du i løpet av kursdagen skriver under på oppmøteskjema.*

De som bytter kursdag med andre studenter, eller som planlegger å gjøre ferdig øvelser på kveldstid, må melde fra om dette til kursledelsen i forkant av oppmøte. Møt opp i tide, gjennomgangen av kursdagens metoder starter presis.

Studentene oppfordres til å føre og levere inn *rapportskjema* over alle øvelsene (slik at vi kan samle inn data til statistikk). *Rapportskjema* innleveres så snart alle analysedata foreligger (innleveringskassett i kurssalen/ postkasse utenfor). Ettersom det er ulikt hvor raskt dere jobber med øvelsene, vil vi ikke ha oppsummering eller konklusjon på slutten av labdagene. Vi samler alle resultater til statistikk og gjennomgang med konklusjon, på en forelesning etter alle kursdagene.

Laboratoriekurset er et ferdighetskurs, og undervisningen er lagt opp slik at de fleste metodene blir repetert i løpet av 3 kursdager. Du trenger underskrift på at du har utført 80 % av metodene kurset omhandler, for å få godkjent kurs.

For å få godkjent alle ferdigheter; *ta vare på en kladd eller kopi (f.eks. vha kamera på Smartphone).*

Legg merke til at for de diagnostiske blodanalyser (3. dag av "blodkurs") må det godkjennes at dere har funnet riktig svar, før dere kaster blodprøven. På de andre dagene godtas upresise verdier, men vi oppfordrer til å tenke igjennom utførelsen og oppgi feilkilder.

## BLODETS FYSIOLOGI

### **Innledning**

Kurset i blodets fysiologi skal bl.a. illustrere og "problematisere" blodcellenes fysiologi. Dere skal få *kunnskaper* om forandringer i blodet ved hardt muskelarbeid, blodtap, leukemier, beinmargsskade, infeksjon, etc.

Dessuten er det meningen at kurset skal gi *ferdigheter* i (i) noen hematologiske metoder, (ii) refleksjon over laboratoriemetoders usikkerhetsfaktorer (vurder verdiene dine mot referanseverdier) og (iii) planlegging og samarbeid i grupper.

Vi ønsker en våken holdning til mulige feilkilder ved analysene og en vurdering av deres størrelse. Dere måler i flere tilfeller på eget blod, og ved avvik fra referanseområdet skal dere tenke igjennom og oppgi feilkilder.

Det er lagt opp til at grupper à 3 studenter skal utføre alle øvelsene. Unntak fra denne gruppestørrelsen må også følges av flere datainnsamlinger (f.eks. flere differensialtelling) på dag 2 og 3. På blodkursdag 2 kan det være en fordel å være 4 på laget.

Hver *student* leverer inn rapportskjema for dag 1. Dag 2 er det gruppevis innlevering. Rapportskjemaene finnes i kursheftet, og ekstra skjemaer legges frem på kurssalen. Husk å samle opp de signaturene dere trenger. Når minst 8 av 10 metoder er utført får dere godkjent blodkurset. (Lever inn attestasjonsarket med minst 8 stempel.)

Tredje kursdag må rapportskjema med data og forslag til diagnose forevises kursledelsen i løpet av kursdagen. Godkjennelse forutsetter riktig "diagnose", og denne må godkjennes før dere kaster blodprøven.

*Rapportskjemaene på dag 1 og dag 2 må leveres inn snarest mulig og i hvert fall innen kl. 14 første virkedag etter at kursøvelsene er utført.*

## Litt om laboratorie-arbeidet

På dette kurset, liksom i senere legevirkosomhet, vil dere komme mye i kontakt med *blod*. Folk som arbeider daglig med blod, kan bl.a. være utsatt for smitte med hepatittvirus (virus som kan gi leverbetennelse) og AIDS-virus (HIV) (som bl.a. kan infisere T-hjelpelymfocytter og gi immunsvikt). Selv om dette er en liten fare for dere i blodkurset, er det lurt at dere allerede *med én gang innarbeider gode laboratorievaner*. Unngå blodsøl; behandle det som om det var avføring! Unngå stikkskader! Husk at kanylen er spiss i begge ender. Fokuser på oppgaven når dere håndterer kanyler eller glassutstyr med blod.

Følgende klipp fra “Instruks for arbeid med biologisk materiale” som gjelder for et rutinelaboratorium ( Med. Biokjemi, v/ Kjetil Taskén), må også gjelde for student-laboratoriet:

På bakgrunn av økende forekomst av forskjellige typer viral hepatitt og HIV-smittede pasienter, må vi vente at en del av det humane organiske materiale vi mottar, kan være smitteførende. **I utgangspunktet betraktes derfor ALT mottatt materiale som potensielt smittefarlig** (vev, blodprøver, m.m.). De samme regler gjelder også for behandling av blod og blodprodukter (som ”buffy coats”) fra normale blodgivere.

**HIV-viruset er relativt robust. Det kan overleve en viss tid ved romtemperatur og kan til og med tåle frysing. Det drepes av varme (85°C, 1 time) og av de fleste brukte desinfeksjonsmidler. Det er derfor viktig at man er svært nøye med å hindre blodsøl, både under arbeid i sterilbenk og også under annet arbeid med prøvene, slik som sentrifugering. Videre er huden den viktigste barriere mot smitte, man bør derfor være spesielt oppmerksom om man har sår på fingre, eksemmer eller likn. som gjør at denne naturlige barrieren brytes.**

Ved alt arbeid med humant biologisk materiale gjelder følgende regler:

1. **Det skal brukes hansker!** Vær oppmerksom på at hanskene kan bli forurenset under bruk. Bytt derfor hansker ofte, og bytt straks hvis du søler dem til. Vær spesielt observant ved sår på fingrene. Gjenstander som telefoner, dørhåndtak og laboratorieutstyr skal ikke berøres med hanskene, med mindre man vet at de er **helt rene**. Hygienisk **håndvask** er et av de viktigste smitteforebyggende tiltak ved laboratoriearbeid. Hansker kan være utette og håndvask er derfor viktig selv om man har brukt hansker. Foreta derfor alltid håndvask etter avsluttet prosedyre, også når du har brukt hansker.

2. Benytt briller/munnbind, eller dra ned dekselet foran sterilbenken, slik at blodsprut i ansiktet unngås.

3. Bruk i størst mulig grad engangsutstyr. Utstyr (stativer, annet småutstyr m.v.) som har vært i kontakt med biologisk materiale autoklaveres hvis mulig eller vaskes og inkuberes 1 time ved 85°C. Utstyr som ikke tåler varme, dekontamineres i bad med 5 % hypokloritt-løsning i 1 time, deretter vask i 70 % sprit og skylling. Hypokloritt-løsning oppbevares på kjølerommet.

.....

5. Ved søl på benk eller sentrifuger: Fukt området med 5 % kloramin 1 time og vask med 70 % sprit. Ved daglig vask av benk (uten synlig søl) er det tilstrekkelig med 70 % sprit.

.....

8. For apparatur som er i kontakt med blodprodukter gjelder egne sikkerhets og dekontamineringsprosedyrer.

9. Egen prosedyre for risikoavfall for Domus Medica skal iakttas.

.....

11. Ved evt. stikk- og skjæreskader med utstyr som har vært i kontakt med biologisk materiale, eller ved søl av blod på slimhinner eller sår, følges egen tiltaksprosedyre fra HMS-avdelingen ..... Det minnes videre om at det ved skader skal fylles ut skadeskjema.

Forøvrig gjelder Helsedirektoratets prosedyre HD 15.12.86: “AIDS - forholdsregler mot smitte med HIV i laboratoriet” og senere revisjoner av denne for generell omgang med blodprodukter og HIV-infisert materiale spesielt.

**Kast eller rens med kaldt vann pipetter, reagensglass, sprøyter etc. så snart dere ikke har bruk for dem lenger.** Bruk laboratoriefrakk. (Blod på klær fjernes best med kaldt vann). Vask gjerne huden med 70 % etanol, klorhexidin eller Pyrisept før dere stikker eller skjærer i den. Bruk ikke samme skalpell eller kanyle til mer enn én person! Spis ikke på kurssalen. Behandle sprøytespisser, glass- og annet avfall som angitt på oppslag på kurssalen.

*Kapillærblodprøver* tas fra stikksår som lages med engangslansett. Den første bloddråpen brukes ikke, men tørkes bort. Man skal stikke litt til siden for midten av fingertuppen på 3. eller 4. finger. (Det gjør mindre vondt å stikke i underkant av øreflippen, men den må være rød og godt gjennomblødd (gni!) for at verdiene vi finner, skal være representative.) Se figurene s. 12.

Ved *blodprøvetaking fra vene* benytter vi gjerne vakuumbør med EDTA-løsning/pulver (eller citrat- eller heparintilsetning, se også oversikt over fargekoder i Appendix). Fjern den korte hetten fra nålen og skru nålen på plast-holderen. Plassér vakuumbøret i vacutainerholderen, men press ikke nålen helt gjennom korken ennå. Fjern hetten fra innstikksnålen og punktér venen, evt. etter vask av huden med alkohol og anlegning av venestase. Punkter så vakuumbøret med nålen, og børet vil automatisk fylle seg med blod slik at antikoagulans/blod-forholdet blir riktig (totalt f.eks. 5 ml). Når glasset ikke fyller seg mer, trekkes det ut av holderen (som holdes i samme stilling) og innholdet *blandes*. Et evt. neste rør kan fylles på samme måte fra nålen som fortsatt står inne i venen. *Venestasen (gummislangen) tas bort før nålen trekkes ut.* For noen prøver er det viktig at stasen lettes like etter at vakutainerbøret begynner å fylles med blod. Nålen trekkes ut når blodtakingen er avsluttet, innstikk-stedet komprimeres (helst flere minutter) med en vattdott, og armen heves (men bøyes ikke).

Dyktige/øvede venepunktører bruker så lite venestase som mulig og opphever den straks blodet renner ut i vacutainerbøret. Pga utadfiltrering av væske fra kapillærene ved økt hydrostatisk trykk vil nemlig konsentrasjonen av høymolekylære stoffer - inklusive proteinbundne småmolekylære ioner etc. – og celler øke under langvarig stase.

Mye av utstyret, og flere av de forskjellige øvelsene, kan dere lese mer om på oppslag som henger rundt omkring på kurssalen, utstyret står ofte sammen med en orientering om anvendelsen. Studér disse oppslagene - de sier også hvilke pipetter etc. som kan kastes (i avfallsbeholder) etter engangs- evt. éndags-bruk.

Som nevnt *må kursheftet studeres nøye før hver kursdag!* Gjennomgåelsen på kurset vil i høyden dreie seg om kortfattede apparat-, utstyrs- og prosedyre-demonstrasjoner og ikke inneholde teoriomtale.

## DAGSPROGRAM FOR KURSØVELSENE:

Det kan være hensiktsmessig å utføre øvelsene i rekkefølgen som er angitt her. *Utstyret til øvelsene finnes i plastkurv på arbeidsbenken eller på bordene foran første benkerad.*

Alle øvelser utføres av studenter i tremannslag, og som dobbelt-analyse av hver blodprøve, om ikke annet er presisert. (Rapportskjemaene indikerer også hvilket antall analyser som kreves.)

### 1. dag:

- Hemoglobinkonsentrasjon bestemt med HemoCue fra blodprøven som står ved stasjonen (NB! **1 analyse** per student, sammenlign med de andre på laget).
- Elektronisk telling av røde blodceller og analyse av EVF (hematokrit) ditt eget blod.  
**Dobbeltprøver.**
- Retikulocyt-telling på vitalfarget utstryk. Trippeltelling (dvs. én telling per student, sammenlign med de andre på laget). Bruk blodprøven som står ved stasjonen, farg med vitalfarge, lag utstryk, bruk mikroskop og se over omtrent 500 røde blodceller. Hos en frisk person vil du finne omtrent 1 % retikulocytter.
- Alle studenter skal i løpet av kursdagen utføre venepunksjon på prøvearm, som forberedelse til kursdag 2.

### 2. dag:

**NB! Dere skal ta 2 blodprøver av løps- eller sykkel-personen.** Dere må finne den på laget med enklest vener til det fysiske arbeidet.

**PBL-gruppe 13-18:** En student per 3-mannslag skal løpe 1 time med høy intensitet. Veneblodprøver og samtidig pulstelling på 2 tidspunkter: i hvilesituasjon (ved kursstart) og 2,5-3 timer etter løpet (ca. kl. 15:30) (se s. 22). Det er greit med 4 på laget.

**PBL-gruppe 1-12:** En student per 3-mannslag skal gi blod i hvilesituasjon, sykle intenst i 5 min og deretter gi en ny blodprøve umiddelbart etter syklingen. Husk pulstelling rett etter venepunksjon. Det er greit med 4 på laget.

Alle kurspartiene utfører:

- Automatisk leukocyt-konsentrasjon og WBC diff. i fullblod før og etter trening (1 prøve pr lag, før og etter).
- Måling av hemoglobin før og etter trening (1 prøve pr lag, før og etter).
- Hemostase-test. Automatisk APTT på citratplasma (sentrifugert prøve), (1 prøve pr lag, før og etter).
- Manuell differensialtelling av leukocytter i farget utstryk fra før løp/sykling. Lag og tell i 1 utstryk pr student på laget fra blod tappet før fysisk arbeid (3 utstryk for 3-mannslag, 4 utstryk for 4-mannslag.)

Forøvrig utfører hver student i gruppen én analyse av hver av de to blodprøvene:

- EVF (hematokrit). (Totalt 6 målinger ved 3-mannslag, 8 målinger på 4-mannslag.)

### 3. dag:

Sykdoms/tilstands-diagnose v.hj.a. utlevert blod- og evt. avføringsprøve. Rapportskjemaet godkjennes ikke uten at riktig diagnose stilles.

- 3-mannslagets analyseprogram fremgår av rapportskjemaet.

Hver student setter dessuten opp på eget blod:

- senkningsreaksjonen (enkeltpørve).

### 4. dag:

Forelesning. Gjennomgåelse, konklusjon og kursevaluering i auditoriet. Oppsummeringen vil bli lagt ut på Mine Studier, og regnes som pensum.

**Attestasjoner Blodkurs (i stedet for ferdighetseksamen)**

Studentens navn:

---

**Sign.****Kapillærblodprøvetaking:**

---

**Venepunksjon:**

---

**Hemoglobinmåling (Hgb):**

---

**Hematokritmåling (EVF):**

---

**Elektronisk telling av røde og hvite blodceller og  
cellekonsentrasjonsutregning:**

---

**Retikulocyttfarging og -telling:**

---

**Laging av blodutstryk og differensialtelling:**

---

**APTT (aktivert protrombintid):**

---

**Sette opp og avlese senkningsreaksjonen (SR):**

---

**Diagnose av ukjent blodprøve/blodutstryk  
(kursdag 3):**

---

**Godkjent Blodkurs, dato: \_\_\_\_\_ Signatur (lærer/kursinstruktør):**

---



**BLODKURSETS METODEBESKRIVELSER**

	SIDE
Blodkurs Dag 1.....	10
HEMOGLOBIN (Dag 1).....	10
TELLING AV BLODCELLER (Dag 1 og 2).....	14
Erytrocyttvolumfraksjonen - EVF (Hematokrit, Hct, PCV) (Dag 1).....	16
RETIKULOCYTT-TELLING (Dag 1).....	17
ARBEIDSFORSØK (Dag 2).....	22
ELEKTRONISK TELLING AV WBC (Dag 2).....	23
UTSTRYK OG DIFFERENSIALTELLING (Dag 2).....	25
KOAGULASJONSTEST; APTT (Dag 2).....	27
Blodkurs Dag 3.....	35
SENKNINGSREAKSJONEN (Dag 3).....	35
«DIAGNOSTISKE NØTTER».....	37
PÅVISNING AV OKKULT BLOD I FÆCES (Dag 3).....	39
Attestasjoner Blodkurs .....	8
APPENDIX: .....	42
USIKKERHETSVURDERING, MÅLEFEIL OG LITT STATISTIKK .....	42
Uttrykk og Utstyr.....	53
SPØRSMÅL som bør kunne besvares etter alle kursdagene (inkludert oppsummeringen) er over. .....	56

## Blodkurs Dag 1

Kursdagen skal gi dere kunnskap om de røde blodcellenes fysiologi. Metodene dere skal igjennom er:

- Måling av hemoglobin vha azid-methemoglobin-metoden
- Blodprøvetaking fra fingertupp (kapillær blodprøvetaking)
- Elektronisk telling av røde blodceller
- Måling av EVF (Erytrocytt Volum Fraksjon), også kjent som hematokrit
- Beregning av MCV
- Telling av % retikulocytter vha mikroskopi, og hvordan lage blodutstryk
- Venepunksjon på prøvearm

Kjennskap til endring i erytrocyttenes morfologi, blant annet karakterisert ved MCV – *Mean Corpuscular Volume*, kan også være et hjelpemiddel når det gjelder å klassifisere en anemi. Vi vil demonstrere blodprøvetaking fra fingertupp og venepunksjon på kursdag 1, men dere bør på forhånd ha sett instruksjonsvideoer som finnes via timeplanen.

### HEMOGLOBIN (Dag 1)

Hemoglobin (hgb/Hb) er blodets oksygentransportør. Nedsatt hgb-konsentrasjon i blodet (anemi) kan medføre slapphetsfølelse etc., og kan skyldes forskjellige patologiske prosesser som blodtap, hemolyse eller nedsatt produksjon (p.g.a. benmargssvikt, enkelte nyresykdommer eller manglende byggestener og kofaktorer som jern, vitamin B<sub>12</sub> etc.). Mange generelle sykdommer, som betennelser og kreft, forårsaker anemi (sekundær anemi), og hemoglobinnmåling er blant de vanligste laboratorie-prøver i praksis. Hgb-målinger utføres også ved kontroll av eller mistanke om polycytemi.

**Utførelse:** Alle på laget skal ta en prøve til hemoglobin fra EDTA-rør som ble tatt under demonstrasjon av venepunksjon. **Bland blodet godt før uttak av prøve!** Bruk en pasteurpipette for å avsette en liten dråpe blod på plastsiden av en bit benkepapir. (Sett lokket på EDTA-røret for å unngå uttørking.) Fyll spesialkyvetten helt, i ett, uten å etterfylle. (Luftbobler inne i kyvetten vil gi en lavere verdi.) Vent deretter ca. 40 sekund slik at reagensene rekker å reagere med blodet. Benytt HemoCue kolorimeter for å måle. Resultatene noteres i rapportskjemaet, sammen med alle de andre resultatene.

**Hemometeret:** Vi anvender azid-methemoglobin-metoden, som trolig er den vanligste metoden til hgb-måling i norsk allmennpraksis i dag. Reagensene oppløser (hemolysierer) de røde blodcellene. Hemoglobin blir av natrium-nitritt omdannet til methemoglobin som igjen reagerer med natrium-azid til azidmethemoglobin. Det er azidmethemoglobin man så måler i kolorimeteret.

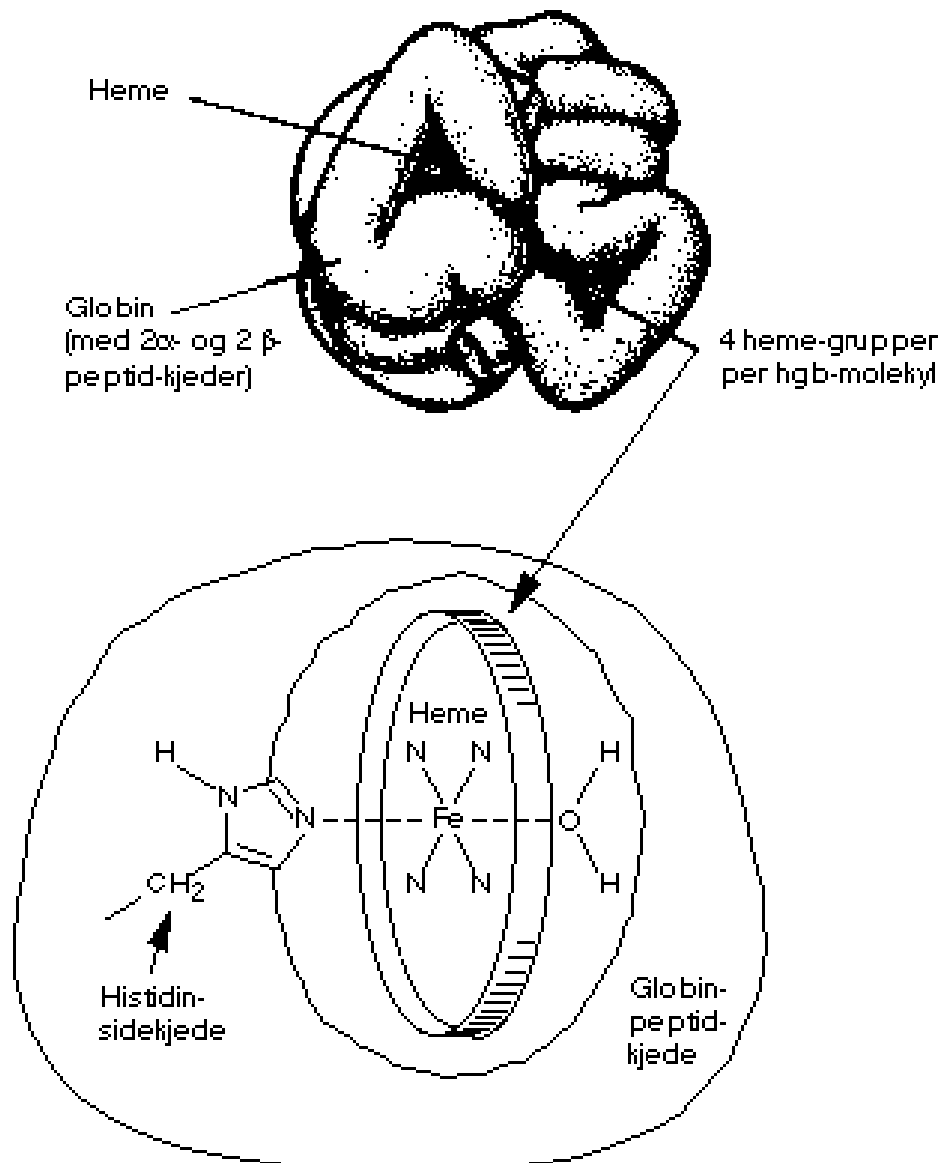
*Se også side 12 og 13 for fremgangsmåte ved blodprøvetaking til hemoglobin-måling fra fingertupp.*

*Referanseområder:*

**Menn: 13,4 - 17,0 g/100mL; Kvinner: 11,7 - 15,3 g/100mL.** (I "riktig gamle dager" var 100% = 14.8 g/100 mL).

P.g.a. væsketap fra blodet ved utadfiltrasjon gjennom kapillærveggen finnes normalt hemoglobinkonsentrasjonen gjerne høyere (f. eks. 1.5 g/100 mL) etter legemlige anstrengelser. P. g. a. utadfiltrasjon i beina er den normalt også ca. 5 % høyere hos oppegående eller sittende personer enn hos liggende.

## HEMOGLOBIN -MOLEKYLET



## Hgb-måling med HemoCue

La kyvetten fylles fullstendig med én gang. Etterfyll aldri en kyvette! (For å unngå luftbobler.)



Tørk av overskudd av blod på utsiden av kyvetten. Pass på at ikke noe blod suges ut av kyvetten.



Vent 40-45 sekunder for å la reagensene i kyvetten virke. Du kan se mot lyset at sirkelen inne i kyvetten klarer opp. Sett mikrokyvetten inn i fotometeret.



Vent til dere ser 3 streker i display ( - - - ) og lukk kyvetteskuffen. Prøven skal analyseres innen 10 minutter etter at kyvetten er fylt.

Resultatet kan avleses etter 15-45 sekunder.

Angående måling av Hgb fra kapillærprøve; hvis en annen prøve skal taes fra samme stikksted, må dette gjøres umiddelbart etter at den første er tatt. Tørk da bort restene etter den første bloddråpen og ta den nye prøven fra en ny bloddråpe.

(På kurset bruker vi måling fra venepunksjon av 1 student pr parti.)

## *Blodprøvetaking fra fingertupp*



**1.** Pass på at pasienten sitter bekvemt. Har pasienten kalde hender, bør de varmes i varmt vann. For at blodet skal kunne sirkulere uhindret, bør en ikke stikke i en finger med ring. Ved å se til at alle finger er utstrakte, uten å være anspente, unngår man uønskede staseeffekter.



**2.** Bruk enten **langfinger eller ringfinger** (uten ring) for prøvetaking. Vask prøvetakingsstedet med desinfeksjonsmiddel og la det tørke.



**3.** Stryk lett med tommelen fra siste fingerledd og opp mot fingertuppen. Dette stimulerer blodtilførselen opp mot prøvetakingsstedet.



**4.** Her har tommelen blitt strøket lett opp mot fingertuppen. Stikk på siden av fingertuppen, der er blodtilførselen best og smertefølelsen minst.



**5.** Tørk av de to, tre første bloddråpene. Dette stimulerer blodtilførselen. Om nødvendig, press igjen med tommelen til nytt blod trenger frem. Unngå å "melke" fingeren.

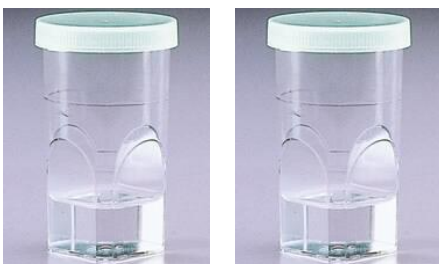


**6.** Pass på at bloddråpen er stor nok til å fylle kvyetten eller glassrøret helt. Sett spissen mot midten av bloddråpen.

## TELLING AV BLODCELLER (Dag 1 og 2)

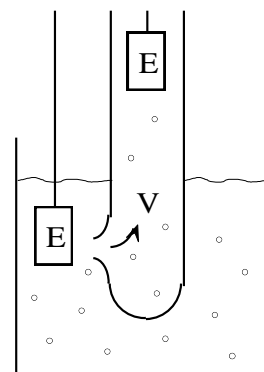
Det er flere grunner til at vi er interessert i å telle blodceller. **Anemi** kan bety nedsatt konsentrasjon av erythrocytter eller nedsatt hemoglobinmengde pr. erythrocytt. Erythrocyttkonsentrasjonen er derfor viktig å kjenne når det gjelder å finne ut hvilken type anemi man står overfor (se spørsmålene lenger bak i kursheftet). I en anemiutredning bruker du antall erythrocytter sammen med EVF (som sier noe om volumet av de røde blodcellene) til å finne MCV. Høye konsentrasjoner av RBC måles ved polycytemi eller uttørring.

**Elektronisk telling av celler.** Erythrocytter, leukocytter og - litt vanskeligere - trombocytter kan også telles raskt og presist *elektronisk*. En slik teller, Coulter Counter, vil bli brukt på kurset. En instruktør vil utføre selve målingen for dere.



Alle skal ha fått utdelt slike telleglass med elektrolytt, som dere skal fortynne blodet i. Ta med merkede telleglass til coulter counteren. Husk dobbeltprøver.

En elektrisk strøm ledes gjennom cellesuspensjonen mellom 2 elektroder. Cellesuspensjonsmediet består av natriumklorid i vann (= elektrolytt), - tilsatt et "såpestoff", f.eks. saponin, som hemolyserer erythrocyttene når hvite blodceller skal telles. Den ene elektroden er inne i et glassrør, den andre ute i cellesuspensjonen. Strømmen må passere gjennom en kapillæråpning i glassrøret for å nå fra den ene elektroden til den andre. Gjennom denne åpningen (diameter 70-100  $\mu\text{m}$ ) suges et visst volum cellesuspensjon i løpet av ca. 20 sekunder. Hver gang en partikkel passerer den trange åpningen, endres motstanden i mediet (cellesuspensjonen) mellom de 2 elektrodene. En slik passasje registreres på et skop, og antall impulser over en viss størrelse (variabel "terskel") registreres av et telleverk.



E = elektroder  
 V = væskestrøm  
 med partikler,  
 gjennom  
 kapillæråpning

### Utførelse:

Telling av erythrocytter (RBC): De tre studentene på laget hjelper hverandre med dobbeltprøver fra alle til RBC-tellingen og EVF. Husk at blodet må raskt ut av ikke-antikoagulasjons-behandlet glass (det vil si 20- $\mu\text{L}$ -pipetten til telling av antall RBC); etterpå har man god tid på seg. Det er viktig at blodprøvene tas fra snitt som blør fritt, og at de første 1-2 dråpene kasseres. **Bruk dobbeltprøver. Fyll glassrøret helt, unngå luftbobler!** 20  $\mu\text{L}$  blod (engangs-glasspipetter) blandes godt ut i 10 mL saltvann\*. 20  $\mu\text{L}$  av blandingen fortynnes videre med nye 10 mL saltvann, d.v.s. vi teller en 250 000 ganger fortynnet blodprøve. Apparatet (Coulter counter) teller partikler (her: celler) i 100  $\mu\text{L}$  av fortynningen/blodløsningen. V.h.j.a. disse opplysningene og tallet som du har notert deg, skal du regne ut antall røde blodceller pr. L blod.

Det er noen som foretrekker kalkulator til utregningen, og en slik ber vi dere ta med selv.

*Referanseverdi erythrocytter:*

**Menn:  $4.25-5.71 \times 10^{12}/\text{L}$  . Kvinner:  $3.94-5.16 \times 10^{12}/\text{L}$ .**

Kraftigere legemsøvelser kan heve nivået ca. 10 % (hemokonsentrasjon), emosjoners innflytelse er uviss. Man trenger nøyaktige erythrocytt-verdier, fordi de skal benyttes til beregningen av gjennomsnittlig erythrocyttvolum, MCV (se rapportskjemaet).

(\*Hint: 1  $\mu\text{L}$  = 1/1000 mL = 1 milliontedels liter (L) =  $1 \times 10^{-6}$  L. 1 mL = 1000  $\mu\text{L}$  = 1 tusendels liter =  $1 \times 10^{-3}$  L. 1L = 1000 mL = 1 000 000  $\mu\text{L}$ . Eksempel: dersom apparatet teller 2000 celler pr 100 $\mu\text{l}$  (dvs. 20 celler/ $\mu\text{l}$ ) og fortynningen er 250 000 ganger ( dvs. 5 000 000 celler/ $\mu\text{L}$  blod), og dere skal regne om fra  $\mu\text{L}$  til L, blir resultatet  $5 \times 10^{12}$  celler/L.)

## Erytrocyttvolumfraksjonen - EVF (Hematokrit, Hct, PCV) (Dag 1)

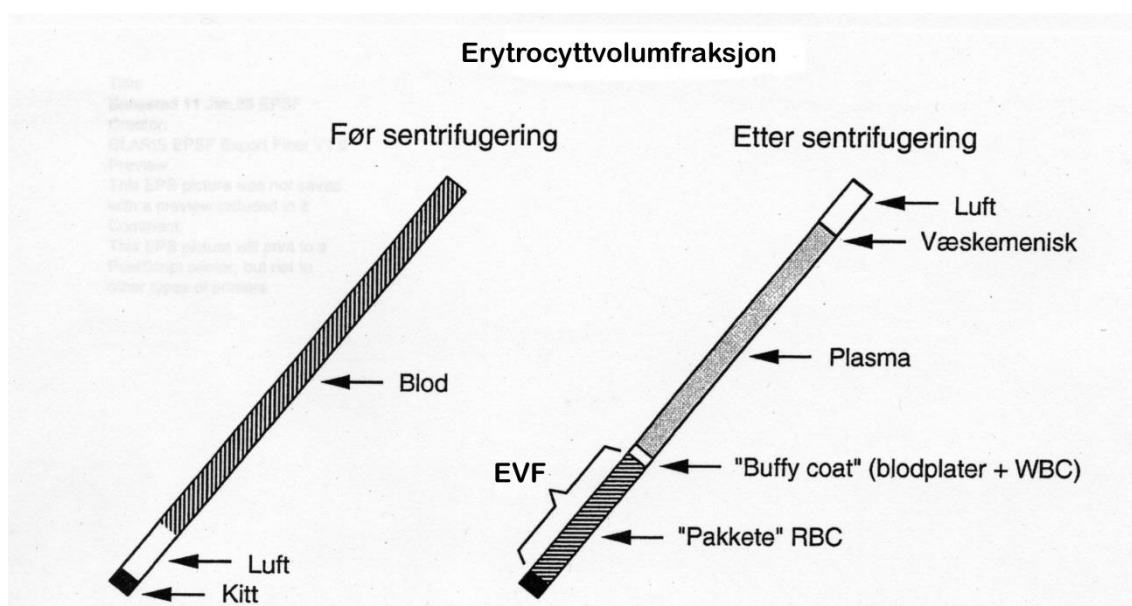
EVF er den volumfraksjon av fullblod som utgjøres av røde blodceller. Denne måles etter kraftig sentrifugering av heparinisert blod. Volumet av de tettpakkede røde blodceller måles da i forhold til det totale volum. Størrelsen på EVF sier det samme som hemoglobin-konsentrasjonen hos et friskt menneske, men i visse anemier kan størrelsen på de røde blodcellene endres, og erytrocyttvolumfraksjonen må måles sammen med andre parametre. Brukes også til diagnostikk av polycytemi. Metoden er meget nøyaktig og presis, fordi blodmengden og evt. luftbobler i rørene ikke påvirker EVF-verdien. På kurset skal dere bruke en spesialskive for måling av EVF. Bruksanvisning ligger fremme ved måleskivene.

Den metoden vi bruker på blodkurset, er den såkalte referansemetoden for Erytrocyttvolumfraksjon, men i praksis blir EVF beregnet ut fra målinger på antall erytrocytter pr liter og den gjennomsnittlige størrelsen på en erytrocytt målt i liter:  $EVF = MCV \times (\text{erytrocytter/L})$

**Utførelse:** Prøvene skal tas fra fingertupp.

De tre studentene hjelper hverandre med dobbeltprøver fra alle til EVF og RBC-tellingen. Fyll 2 stk. 20 $\mu$ l rør til RBC-telling først. To ferdig hepariniserte kapillærrør (hematokritrør) fylles så ca. 3/4 fulle med blod fra fingertupp. De tettes med spesialvoks i den enden som er fri for blod (så kittet ikke blir blodtilblandet; det må da kasseres). Rørene sentrifugeres i 5 min med 10.000 r.p.m. i særskilt sentrifuge; NB 2 lokk og kittenden utover! Vær sikker på at det innerste lokket sitter godt. Avlesningen skjer på en måleskive, og resultatene (dobbeltprøver) noteres på rapportskjema.

**Referanseverdier: Menn 0.40-0.50. Kvinner 0.35-0.46.**



Målemetoden for erytrocyttvolumfraksjon illustrerer dessuten at blodet består av ca. 40 % blodlegemer og ca. 60 % blodplasma.



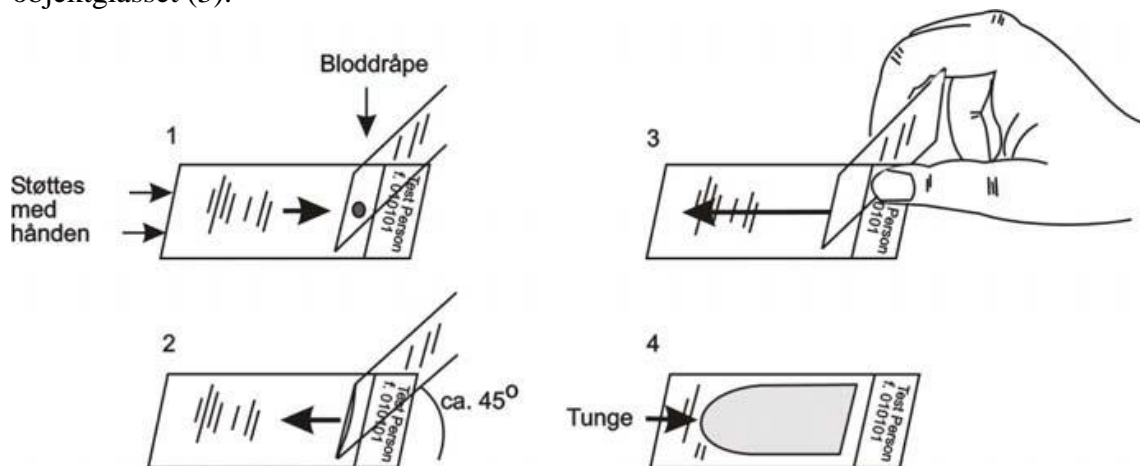
## RETIKULOCYTT-TELLING (Dag 1)

Retikulocytter er unge, røde blodceller som nylig er kommet over i blodsirkulasjonen fra produksjonsstedet i beinmargen. De har ennå ikke kvittet seg med hele sitt proteinsyntese-apparat (RNA), som kondenseres til punkter og nettverk (retikkel) ved vitalfarging. Retikkelet farges av basiske blå farger. Tellingene av dem kan brukes til å avgjøre om en anemi skyldes benmargssvikt eller blødning/hemolyse.

### Utførelse:

Hver student lager flere utstryk av fremsatt "student-blod" tatt ved demonstrasjon av venepunksjon og teller retikulocytter i de(t) beste av dem.

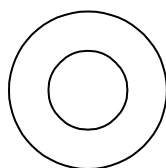
Like mengder fargevæske (briljantkresylblått) og kapillær- eller veneblod blandes i et reagensrør. La stå ca. 10 min. Bland, med lett knipsing mot glasset eller med pasteurpipette. En *liten* bloddråpe fra blandingen plasseres ved hjelp av f.eks. en pasteurpipette et par cm fra enden (eller rett ved skriveflaten) av et *helt rent* objektglass (1). Sett utstryksglasset med kanten ned mot objektglasset litt nærmere midten enn bloddråpen. Når utstryksglasset som trekkes inn til bloddråpen kommer i kontakt med denne, skal blodet trekke seg ut langs kanten på utstryksglasset (2). Deretter føres utstryksglasset jevnt, raskt og lett *fra* bloddråpen slik at blodet fordeler seg på objektglasset (3).



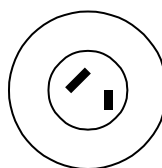
Ved riktig dråpestørrelse skal blodet ende i en "tunge" et par cm fra enden av objektglasset.

Vift straks utstryket tørt, med hurtige bevegelser. *Det planslipte utstryksglasset skal vaskes og legges i en flaske med 5 % kloramin; det skal brukes om igjen!*

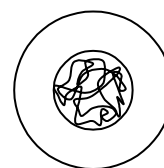
Tell retikulocytter v.h.j.a. 100x forstørrelse, bruk immersjonsolje, spør før bruk dersom dere ikke kjenner til bruken av immersjonsolje. Oljen tørkes etterpå forsiktig av linsen med bløtt linsepapir fuktet med rensesvæske!



RBC



Retikulocytter



Før dere tar på immersjonsolje, må dere bruke noen minutter på å finne et godt område av preparatet å telle i. Start med å fokusér på 10x objektiv, finn et område hvor erytrocyttene ligger jevnt spreidd, «skulder til skulder», i hvert fall ikke i doble lag. Gå videre til 40 x, og fokuser på ny, før dere setter objektivet vekk fra preparatet, legger på en liten dråpe immersjonsolje, og skrur til 100 x-objektivet. NB! Aldri la 40x eller 10x objektivene komme i kontakt med oljen.

Retikulocyt-prosenten telles manuelt som andel retikulocytter av totalt antall celler, delt på 100. Retikulocytter skal inneholde minst 2 distinkt blå korn eller tråder. Det finnes ofte krystalliknende artefakter i erytrocyttene, som da kan likne retikulocytter. Artefakt-inklusjonene - men ikke ekte retikkel - forandrer farge fra lyst til mørkt ved bruk av fininnstillings-(mikrometer-)skruen. Siden det ofte er relativt få retikulocytter, er det gjerne nødvendig å telle mange synsfelt for å få et rimelig nøyaktig resultat. Den relative feilen (les mer om feilkilder i slutten av heftet) er mye større for retikulocyt-tallet enn for RBC-tallet (som vi derfor ikke trenger telle nøyaktig, men anslår):

Du kan telle retikulocytter i hvert tilstøtende synsfelt, men totaltall av RBC f.eks. bare i hvert 5. felt. Du må «se over» minst 500 RBC totalt. Dersom vi teller  $n$  retikulocytter i 6 synsfelt og totalt antall RBC (erytrocytter + retikulocytter)  $R$  i 2 synsfelt (som brukes til å anslå at det er  $R \cdot 6/2$  RBC i de feltene der du har tallet retikulocytter), finner du retikulocyt-prosenten ved å dividere de to tallene med hverandre,  $\cdot 100$  %. Sagt på en annen måte: Du har tallet retikulocytterne i 6 synsfelt ( $n$ ) og anslått RBC-mengden i disse feltene som gjennomsnittstallet i de to feltene du virkelig telte, multiplisert med 6.

Prøv å vurdere størrelsen på retikulocytterne i forhold til modne erytrocytter. Sammenlign med de 2 andre på laget.

*Referanseverdi for voksne: **0.5-1.5 % av alle erytrocytter.***

Typiske sykdomstilstander som kan øke retikulocyt-prosenten, er blødningsanemier eller hemolytisk anemi. Så lenge produksjonsstedet i benmargen har normal funksjon, og det er nok byggestener tilgjengelig, vil blødningsanemier eller vedvarende ødeleggelse av erytrocyttene (hemolyse) føre til akselerert erytropoiese. Ved benmargsvikt vil erytropoiesen være nedsatt. Nyresvikt vil også gi lav retikulocyt-prosent.

## LITT OM ANEMI

Kroppens *hemoglobinmengde* opprettholdes under normale forhold nær konstant. Nedsatt oksygen-levering fra det arterielle blodet stimulerer ny-dannelsen av røde blodceller. Dette skjer først og fremst via dannelsen av *erythropoietin* (EPO), som bl.a. stimulerer umodne erytroblasten i benmargen til ekstra celledelinger og til å modnes til erythrocytter. Nyrene "sanser" nedsatt oksygentilførsel fra blodet (f.eks. få erythrocytter eller lav oksygentensjon). De utskiller da økte mengder EPO.

I likhet med hemoglobinnmengden vil også *blodvolumet* søkes opprettholdt konstant. Derfor synker hemoglobinkonsentrasjonen i løpet av det første døgnet etter en akutt blødning. En viktig mekanisme her er "*autotransfusjonen*", der væske i løpet av timene etter en blødning trekkes inn i kapillærene fra intercellulærrummet. Dette skyldes det *senkede kapillær-hydrostatiske trykk* p.g.a. arteriolekonstriksjon og evt. arterielt blodtrykksfall. *Senere vil økt væskeinntak og nedsatt væsketap* gjennom nyrene gjenopprette organismens væskebalanse.

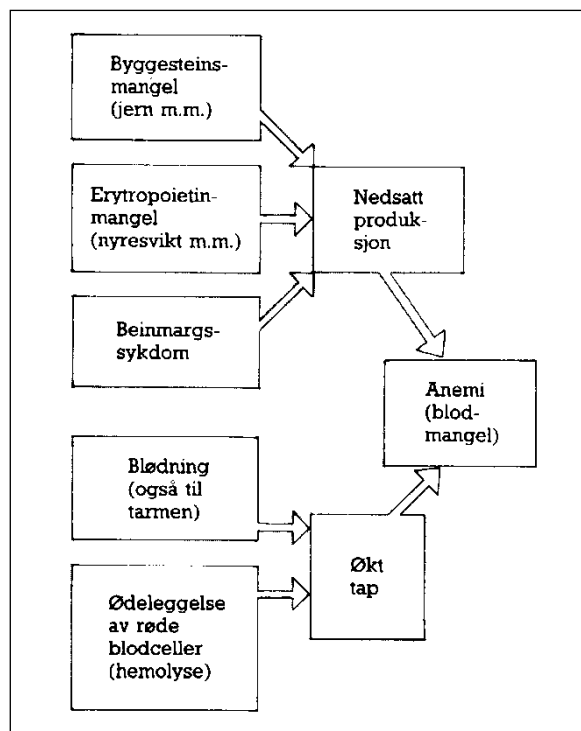
*Anemi* er en tilstand med nedsatt totalmengde hemoglobin i blodet. Den skyldes nedsatt konsentrasjon av røde blodceller eller redusert hemoglobinninnhold i hver rød blodcelle. Ofte vil det foreligge en blanding av disse to forhold.

Det finnes ulike typer anemi. Vi kan bruke bankkonto-betraktninger for å forklare hvordan anemi oppstår. Saldo, "penger i banken", synker når uttaket er større enn innskuddet. **Anemier**

**kan derfor skyldes både liten produksjon av blodceller i benmargen og økt blodtap.**

Produksjons-svikt p.g.a. jernmangel er vanlig; likeså p.g.a. lav EPO-produksjon ved nyresykdommer.

Visse cytokiner som kan utskilles i økt mengde ved kroniske infeksjoner og kreftsykdommer, kan hemme erythropoesen i benmargen. Økt blodtap er heller ikke helt sjeldent (sterke menstruasjons-blødninger, blødning til tarmen fra skjøre blodkar i tykktarmskreftsvulst). Blod-tap ved at røde blodcellers celledemembran ødelegges (hemolyse) ses derimot ikke så ofte.



De røde blodceller kan generelt sett hemolyseres ved (i) endring av osmolariteten i den omgivende væske, (ii) medikamentell eller toksisk påvirkning (f.eks. enzymer i slangegift), (iii) immunologiske reaksjoner rettet mot erythrocyttene (som evt. er

forandret ved at de har bundet til seg legemidler) og (iv) mekaniske påkjenninger (f.eks. ved kunstige ventiler i hjertet eller løp på hardt underlag med harde skosåler). I en *blodprøve* kan hemolyse påvises ved at blodplasmaet fortsatt er rødfarget etter at blodcellene er sentrifugert ned (se på plasma i hematokrit-røret). I *organismen* vil ikke hemoglobin nødvendigvis forekomme fritt i sirkulasjonen. De membranskadede erythrocytter kan tas opp og nedbrytes i det mononukleære fagocyt-system (= det retikuloendoteliale system, RES), vesentlig i milten, altså ekstravaskulært. Blodplasmaet er da klart.

*Retikulocyttemengden* i blodet brukes gjerne som et mål på produksjonshastigheten av erythrocytter i benmargen. Retikulocyttemengden, men ikke prosenten, er litt høyere hos menn, ettersom mannlige kjønnshormoner stimulerer EPO-produksjonen. (Les mer om dette i *Blodcellenes Fysiologi*, av H.B. Benestad.)

**R1: RAPPORTSKJEMA FOR ERYTROCYTT-FORSØKENE I "BLODKURSET" (1. DAG)**

Studentens navn: \_\_\_\_\_ PBL-gruppe nr: \_\_\_\_\_ Prøvedato \_\_\_\_\_

(Navn på resten av studentene på laget: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_)Angi resultatene av *dobbelt- og trippel-*målingene, og dessuten medianverdiene! Husk rett benevning!Resultat av hemoglobinmålingen (trippelprøver per lag av blod tappet under venepunksjon), 1 pr student på laget:

\_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ &amp; \_\_\_\_\_ ; median: \_\_\_\_\_

Resultat av EVF-målingene (hematokrit, dobbeltprøver av eget kapillærblod), som fraksjon, 2 desimaler:

\_\_\_\_\_ &amp; \_\_\_\_\_ ; median: \_\_\_\_\_

Resultat av elektronisk telling av erytrocytter [RBC] (dobbeltprøver av eget kapillærblod), 1 desimal:

\_\_\_\_\_ &amp; \_\_\_\_\_ ; median: \_\_\_\_\_ /L

Vis ved hjelp av verdiene for EVF og erytrocyttkonsentrasjon hvordan du kan beregne din:

**MCV** (mean cell volume), gjennomsnittlig erytrocyttvolum (**normalt 82 - 112 fL**, femtoliter =  $10^{-15}$ L):**Resultat av retikulocyt-tellingene (mikroskopiering) på vitalfarget blod, 2 desimaler:**

(3 replikatverdier/1 pr student på laget): \_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ %

Medianverdi: \_\_\_\_\_ %

Venepunksjon på prøvearm utført under veiledning \_\_\_\_\_

*Veileders initialer*

Godkjent: \_\_\_\_\_ Ikke godkjent: \_\_\_\_\_ Dato: \_\_\_\_\_ Sign.: \_\_\_\_\_

NB. Rapportskjema leveres inn straks etter at alle data foreligger og evt. utregninger er utført. Ekstra rapportskjemaer er lagt fram.

## ARBEIDSFORSØK (Dag 2)

Med øvelsene fra denne dagen får vi belyst en viktig kompliserende faktor for vurderingen av leukocyt-konsentrasjoner i klinikken, nemlig **den fysiologiske leukocytose**. Dere skal også undersøke hvordan hemostasen påvirkes av fysisk arbeid. Forsøkspersonene skal løpe (1 time) eller sykle (5 minutter). Pass på at dere velger den på laget med best vener til det fysiske arbeidet. Blod skal tappes i hvilesituasjon, rett etter aktiviteten for den som sykler eller (ca) 3 timer etter løp. Samme medstudent må utføre venepunksjon før og etter sykkeløkten. I teorien skal disse situasjonene gi 2 ulike fysiologiske leukocytoser, og det er viktig å få med seg konklusjonen etter at resultatene fra hele kullet er samlet inn. Plasmakoagulasjonen skal vurderes ved hjelp av en koagulasjonsprøve, APTT (Aktivert partiell tromboplastintid).

- A. **LØPING:** Utføres av PBL-gruppe 13-18. Start med å ta en venepunksjon (2 rør) i hvilesituasjon av den ene studenten på laget som skal ut og løpe. Først må et vakuurrør med Na-citrat fylles (blå kork), deretter skal et EDTA-rør fylles. Noter samtidig pulsen. Husk å merke rørene med navn og «Før» eller «Etter». Gruppen starter med å utføre målinger fra første blodprøve klokken 11:30, dere passer selv på når det har gått 3 timer etter avsluttet løp. Deretter tar dere en ny blodprøve (2 vakuurrør), og analyserer prøven fra etter arbeid slik at vi kan finne ut noe om fysisk arbeids eventuelle innvirkning på blodets konsentrasjon av hvite og røde blodceller, og hvordan APTT eventuelt påvirkes.
- B. **SYKLING:** Utføres av PBL-gruppe 1-12. Start med å ta en venepunksjon (2 rør) i hvilesituasjon av den ene studenten på 3(4)-mannslaget som skal sykle. Først må et vakuurrør med Na-citrat fylles (blå kork), deretter skal et EDTA-rør fylles. Noter samtidig pulsen. Husk å merke rørene med navn og «Før» eller «Etter». Studenten skal utføre et hardt arbeid på ergometersykel i 5 minutter. Sett motstanden relativt høyt, og tråkk til det svir. På syklene der det kan leses av effekt (W), noterer dere det, alternativt beskriv intensiteten. Deretter tar dere en ny blodprøve rett etter sykling (2 rør), og analyserer begge prøvene slik at vi kan finne ut noe om fysisk arbeids eventuelle innvirkning på blodets konsentrasjon av hvite og røde blodceller, og hvordan APTT eventuelt påvirkes.

A og B. Han/hun bør være avslappet når første blodprøve tas i 1 Na-citrat vakuurrør og 1 EDTA- vakuurrør. Tell pulsen samtidig med at blodprøvene tas.

- A. Ny blodprøve og pulstelling 3 timer etter løpet.
- B. Den neste blodprøven tas på samme måte like etter avsluttet sykling. Ta tiden fra siste sykkeltråkk til første bloddråpe renner i det første vakuumrøret. Tell pulsen samtidig med at blodprøvene tas.

A og B. Blodprøvene før og etter fra vakuumrørene med EDTA (lilla kork) skal analyseres v.h.j.a. automatisk telling av totalt antall WBC og differensial-telling av hvite blodceller. Dessuten tas triplikatprøver fra hver blodprøve til måling av EVF og måling av hemoglobin. Blodprøvene før og etter fra vakuumrørene med Na-citrat (blå kork) skal undersøkes for mulige endringer i hemostasen ved å måle APTT. Se også rapportskjema som skal fylles ut, og spørsmål som skal besvares på journalarket.

### **ELEKTRONISK TELLING AV WBC (Dag 2).**

HemoCue WBC DIFF er et system for in vitro-diagnostikk som brukes til kvantitativ bestemmelse av konsentrasjonen av hvite blodlegemer (WBC) i kapillært eller venøst blod. Tilsvarende instrumentet for måling av hemoglobin skal vi også her bruke spesialkyvetter. Kyvettene til WBC DIFF inneholder et hemolyserende middel som løser opp de røde blodcellene og et fargestoff, metylenblått, som farger de hvite blodcellene. Et kamera i instrumentet tar 37 bilder av kyvetten, på forskjellige steder, og cellene blir telt med bildeanalyse og klassifisert i hver subgruppering.

#### **Utførelse av telling av leukocytter (WBC):**

Telling av leukocytter (WBC) vha HemoCue WBC DIFF fra fullblod tappet før og etter trening: Planlegg arbeidet. Instrumentet bruker ca. 5 minutter pr måling, og kyvetten tørker inn dersom du fyller mer enn 1 minutt før måling. Bland blodet fra EDTA-rør godt før prøveuttak, og overfør en passe stor dråpe til baksiden av oppklippet benkepapir. Fyll spesialkyvetten for WBC DIFF uten etterfylling, og pass på at det ikke kommer luft med i kyvetten. HemoCue WBC DIFF oppgir både totalt antall leukocytter i  $10^9/L$  og en 5-punkts differensialtelling: nøytrofile granulocytter, lymfocytter, monocytter, eosinofile granulocytter og basofile granulocytter. Ta med utskrift fra Instrumentet (både  $10^9/L$  og %). Enkeltp prøve pr lag.

*Referanseverdier for leukocyttkonsentrasjonen er hos voksne ca. 3,5 - 10,0 x  $10^9/L$ .* Barn har gjerne noe høyere totalverdier og flere lymfocytter enn voksne. Lavest konsentrasjon finnes gjerne om morgenen; etter hardt muskelarbeid heves nivået. Emosjoner kan også føre til økt leukocytall, med liknende mekanisme som kroppsarbeidet (økt adrenalin og hjertets minuttvolum). Måltider påvirker trolig ikke leukocyttnivået.

Instrumentet Coulter Counter som er beskrevet under dag 1 (s. 14-15) kan også brukes til å telle WBC. For å telle hvite blodceller må de røde blodcellene lyses, og det gjøres i vårt tilfelle vha Zapoglobin som er et såpestoff. Stoffet er allerede tilsatt de utdelte telleglassene.

*Alternativ og frivillig telling av leukocytter (WBC) vha Coulter Counter fra fullblod tappet før og etter trening: Bruk antikoagulert veneblod. Husk! Bland blodet i EDTA-røret godt før uttak. 20 µL blod fortynnes i 10 mL medium med 6 dråper "Zapoglobin" (hemolyserer RBC), som er tilsatt på forhånd. Bland godt og lag dobbeltprøver. Vi bruker samme apparatinnstilling som for telling av RBC, dvs celler pr 100µl. Noter verdien fra telleren og regn ut antall hvite blodceller pr. L blod. Merk at det ikke er like stor fortynning som for telling av RBC. Dobbeltprøver pr lag.*

Kjennskap til konsentrasjonen av **leukocytter, WBC**, er ofte viktig i praktisk medisin. En mengde patologiske tilstander er ledsaget av avvik fra normal leukocyttkonsentrasjon i blodet. Ved de vanligste bakterielle infeksjonssykdommer øker tallet av sirkulerende *nøytrofile granulocytter*, dessuten sees ofte ikke helt modne granulocytter, spesielt stavkjernede, i blodet («venstreforskyvning»).

De nøytrofile granulocytter har kort levetid både i blod (halveringstid ca. 7 timer) og i vev (maks. 1-2 døgn). De er fagocytterende og kan drepe og bryte ned oppspiste mikrober. Fagosom-membranen og nøytrofile granula inneholder de nødvendige enzymer etc. for disse funksjonene (oksidaser, peroksidaser, kationiske proteiner, lactoferrin, sure hydrolaser, alkalisk fosfatase, lysozym, etc.). Granulocyt-produkter frigjøres ikke bare til endocytosevakuolene, men også til ekstra-cellulært vev, som dermed kan skades. *Eosinofile granulocytter*, med tydelig større korn enn de nøytrofile, finnes i øket mengde i blod og affiserte vev ved visse overømfintlighets-tilstander (allergi) og ved parasitt-infeksjoner. Funksjonen er til dels ukjent, men bl.a. cytokinet eotaxin og histamin synes å tiltrekke de eosinofile granulocytter, som antas å drepe parasitter og bidra til vevsskaden ved allergiske reaksjoner som bronkial astma.

*Basofile granulocytter* vet man enda mindre om. De er trolig funksjonelt beslektet med mastcellene som finnes i alt løst bindevev og som bl.a. inneholder histamin, andre betennelsesmediatorer og heparin i granula. *Monocytter* dannes i beinmargen, sirkulerer få dager eller timer i blodet og utvikler seg til makrofager i vevene. *Lymfocytter* er morfologisk pregløse, men funksjonelt forskjellig-artede. De kan være kortlivede (dager) eller lang-livede (opptil flere år, "hukommelses-celler"). De langlivede utgjør majoriteten i blodet. Lymfocytter dannet i thymus (T-lymfocytter) er effektorceller i det *cellulære immunsvaret*. B-lymfocytter fra beinmargen sørger for det humorale immunsvaret, ved at de utvikles til plasmaceller som lager immunoglobuliner (antistoffene). *Non-T-non-B-mononukleære leukocytter* (dvs. bl.a. NK-celler) spiller kanskje viktige roller i forkastelsesreaksjoner. De har gjerne mer cytoplasma enn de typiske lymfocytene, samt cytoplasmatiske granula. Lymfocytter finnes i økt mengde i blodet ved en del virussykdommer og kroniske sykdommer. Antallet kan synke bl.a. hos kreft-pasienter som behandles med cellegifter.

Ettersom fysiologiske leukocytoser kan føre til en like stor endring i antall leukocytter som en betennelse, er det viktig å kjenne til dette fenomenet.



**Trombocytter**, *blodplater*, dannes fra benmargens megakaryocytter. De er viktige for hemostasen først og fremst ved at de kan danne en forseglende plateplugg. De inneholder også visse koagulasjonsfaktorer og er ansvarlige for koagelretraksjonen. Man skal alltid se til at de er til stede i blodutstryk som differensialtelles. Normalt skal du se omtrent en trombocytt pr. 20 erythrocytter. Utstryk av blod fra punksjonssår er mindre egnet til dette. Platene klumper seg lett og adhererer dessuten til sårrendene. EDTA-blod tatt med venepunksjon er meget bedre til bedømmelse av platetallet i blodutstryk. I klinikken telles blodplatene elektronisk.

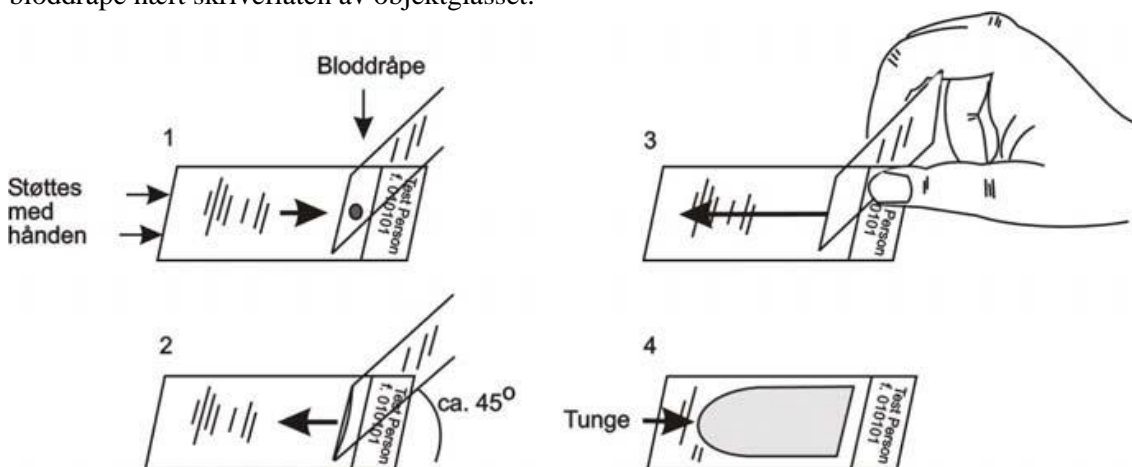
## UTSTRYK OG DIFFERENSIALTELLING (Dag 2)

Differensialtelling av hvite blodceller foretas for at man skal kunne beregne konsentrasjonen av de ulike leukocytt-typer. Man finner den prosentvise fordeling av de forskjellige leukocytt-typer i et farget blodutstryk. *Les i histologi-læreboken om leukocyttenes morfologiske kjennetegn.* Dessuten kan dere gjerne gå inn på:

<http://meddev.uio.no/elaring/fag/anatomi/dloph5/mikro/index.php?articleID=3179> (Blod og Benmarg). Repetér cellenes morfologi før kurset!

### Utførelse:

Utstryket skal lages som på dag 1 for retikulocytt-telling, men vi lager utstryket før farging. Bland blodet i EDTA-røret (med blod tappet før trening) godt før uttak, og sett av en liten bloddråpe nært skriveflaten av objektglasset.



Straks etter utstrykningen lufttørkes preparatet hurtig ved energisk vifting. Lag flere utstryk fra vakuumrøret med EDTA-blod tatt før trening, og velg ut de tre beste til farging:

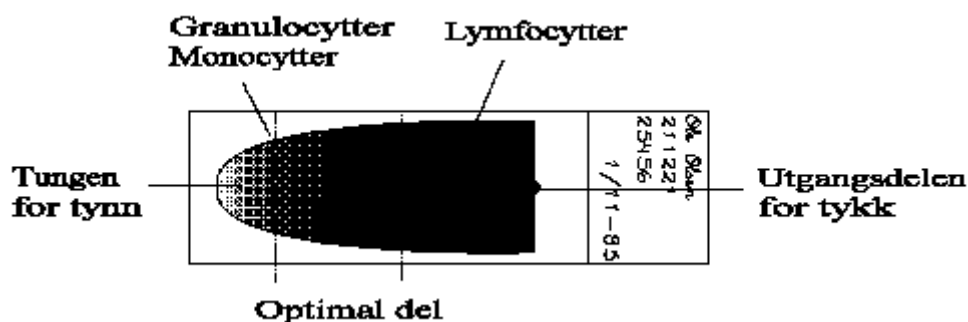
1. Fargeløsningene finnes i separate fargebeholder, på fargestasjonen.
2. Dypp blodutstryket 5 ganger à 1 sekund i fiksérbadet og la resterende fiksérvæske suges av, dvs. trykk enden av objektglasset mot et håndklepapir.
3. Dypp objektglasset i rødt fargebad, 5 ganger à 1 sekund. La overskudd av fargeløsning suges av.
4. Dypp objektglasset i blått fargebad, 5 ganger à 1 sekund. La resterende fargeløsning suges av.
5. Preparatet skylles så *forsiktig* i en skål med vann. (Vannet må være rent. Bytt det ofte.)
6. Preparatet viftes tørt.

Objektglassene kan farges enkeltvis eller mange samtidig, i holder. Fikservæsken som består av metanol, må byttes oftere enn fargevæskene. Fargevæskene byttes ved utfelling, eller dersom fargen gir avvik fra normal fargetone. Den røde og blå fargeintensiteten på utstrykene kan varieres ved å variere antall dypp i de respektive bad. Bruk imidlertid aldri færre dypp enn 3 i noe bad. Utstryket undersøkes i mikroskop, med oljeimmersjonslinse (100x forstørrelse). **NB!** Oljen fjernes fra linsen med renevæske når dere er ferdige.

*Hver student teller minst 100 hvite blodceller i utstryk av blod tatt før ergometersykling eller løp. Utfør de andre målingene før dere går til histosalen, for mikroskopering.*

**Husk! Det planslipte glasset vaskes og legges i en flaske med 5 % kloramin; det skal brukes om igjen!**

Tradisjonelt skjer tellingen fra side til side på tvers av preparatet, fordi cellene angivelig ikke fordeler seg likt i utstryket, slik at monocytter og granulocytter konsentreres noe ut mot kantene og i "halen". Det er litt større tetthet av hvite blodceller langs sidekantene, slik at mikroskoperingen går raskere her, og cellene er dessuten gjerne bedre strukket ut her, så det er lettere å se forskjellen på de ulike mononukleære cellene.



Helst bør man også ha med en kategori for ødelagte og uklassifiserbare leukocytter under differensialtelling.

Notér også erytrocytenes utseende og se etter om det er omtrent normalantall blodplater til stede (ca. én blodplate pr. 20 røde blodceller). Inspisér de rødes utseende inne i utstryket, 1-2 cm fra enden av det, fordi de vil ha kunstig god fargemetning og mangler den sentrale oppklaring i enden av preparatet og ytterst i sidekantene.

Hver student skriver inn ett sett verdier på rapportskjemaet i tabellen for differensialtelling. Sammenlign med referanseverdiene.

*Referanseverdier for leukocyttypene ( WBC x % ved differensialtellingen):*

	Relative verdier i %	Absolutte verdier x10 <sup>9</sup> /L
Segmentkjernede granulocytter	45 - 60	1,6 - 6,0
Stavkjernede granulocytter	5 - 10	0,2 - 1,0
Lymfocytter	20 - 45	0,7 - 4,5
Monocytter	2 - 8	0,1 - 0,8
Eosinofile	1 - 6	0,0 - 0,6
Basofile	<2	< 0,2

Som en frivillig øvelse kan dere differensialtelle i utstryk av blod fra etter trening; det må da telles minst 100 celler. Dette kan evt. gjøres på eget blod sammen med andre frivillige øvelser og trening i blodprøvetaking dersom dere blir tidlig ferdig på dag 3.

Bruk verdiene fra automatisk differensialtelling for å se fordelingen av hvite blodlegemer i blodet etter trening, og fyll ut resultatene i tabellen å rapportskjema for dag 2.

## KOAGULASJONSTEST; APTT (Dag 2)

Hemostase er en fellesbetegnelse for de prosesser som forhindrer eller stanser blødninger. Skjematisk kan de hemostatiske prosesser deles i tre:

1. Vasokonstriksjon av skadede og nærliggende blodårer.
2. Dannelse av blodplateplugg.
3. Plasmakoagulasjon (fibrindannelse).

Disse tre typer prosesser vil gjensidig understøtte og influere hverandre.

Vasokonstriksjon og dannelse av blodplateplugg kalles den primære hemostase, og fibrindannelsen kalles den sekundære.

*Vasokonstriksjonen* skyldes dels lokal mekanisk og kjemisk påvirkning av blodårenes glatte muskulatur (bl.a. av frigjort tromboxan og serotonin), dels en reflektorisk nervøs påvirkning av denne muskulaturen, via det sympatiske nervesystem.

*Blodplatenes evne til å danne plugg* som tetter igjen defekter i lederte blodårer, har størst betydning for den normale hemostase. Det må være tilstrekkelig mange normalt funksjonerende blodplater i blodet for at blødningen skal stanse på vanlig tid (ca. 10 % av normalkonsentrasjonen). Dannelse av en blodplateplugg starter umiddelbart etter at en karvegg er skadet.

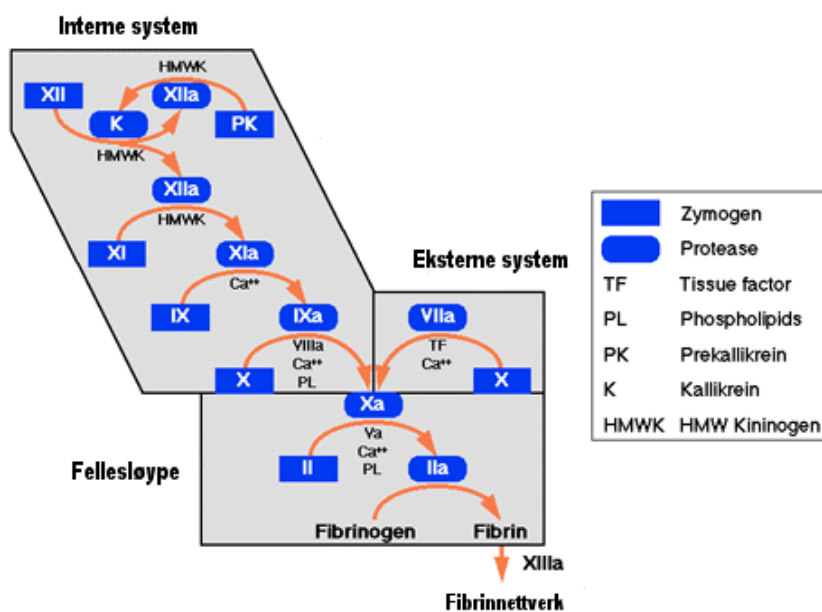
*Plasmakoagulasjon:* Fibrindannelsen skjer som siste ledd i en kjede kjemiske prosesser. De fleste av disse er av enzymatisk natur. To kjeder av kjemiske prosesser kan hver for seg lede til fibrindannelse. I den ene kjeden, *det interne ("intrinsic") system*, inngår bare koagulasjonsfaktorer som normalt finnes i blodet. Prosessen kan da bl.a. utløses ved at blod kommer i kontakt med "fremmed" overflate (glass, kollagén, skadet endotel, etc.). Dermed "aktiveres" en av faktorene (XII), og reaksjonene starter opp. Denne reaksjonsveien er sjelden relevant *in vivo*. Den andre reaksjonskjeden, *det eksterne ("extrinsic") system*, startes ved at en faktor som normalt ikke finnes i plasma (vevsfaktor, "tissue factor" = TF), ved vevslesjoner kommer i kontakt med blod. TF er en komponent i cellemembraner (særlig rikelig i lunger, hjerne og placenta, men finnes også i den aktiverte monocytts og i endotelcellers cellemembran). De to koagulasjonssystemene griper inn i hverandre (se Fig. Koagulasjonskaskaden).

Defekter i det interne system (f.eks. blødersyke - mangel på faktor VIII eller IX) gir alvorligere hemostasesvikt enn defekter i det eksterne system. Fibrin kan derimot dannes raskere av det eksterne enn av det interne system.

Når plasma er koagulert, vil en ny prosess, *fibrinolyse*, bevirke at koagelet langsomt løses opp igjen. Fibrinolysen starter umiddelbart etter at koagelet er dannet, men prosessen skjer langsomt. Fibrinolysen motvirker eksessiv og uhensiktsmessig plasmakoagulasjon, og på en slik måte at blodstansningen likevel blir effektiv og permanent. Som en noe senere mekanisme kommer den permanente vevsreparasjon på skadestedet (fibroblast- og endotel-celle-proliferasjon, etc.). Trombin, som fører til dannelse av fibrinnettverk, aktiverer også plasmin.

Fibrinolyse kan testes ved å måle konsentrasjonen av D-dimer, som er et spaltningsprodukt av fibrin. Analysen inngår ikke lenger i «blodkurset».

### Koagulasjonskaskaden:



HMW – High Molecular Weight

Under plasmakoagulasjonen er det et internt og et eksternt system. Det eksterne systemet trigges av vevsfaktorer (vevstromboplastin, VII og Ca<sup>2+</sup>) som frigjøres under en vevsskade. Det interne systemet aktiveres av kontakt mellom faktor XII og kollagen-fibre (eller fremmed flate).

Begge systemene kan aktivere, alene eller i kombinasjon, plasma faktor X, som sammen med andre faktorer omdanner protrombin (FII) til trombin, som i sin tur omdanner fibrinogen (F I) til fibrin. Systemene har dermed en fellesløype fra X -> Xa.

Både det eksterne og det interne system er nødvendige for normal hemostase.

APTT-testen dere skal bruke, er følsom for koagulasjonsfaktormangler i det indre koagulasjonssystem og felles reaksjonsvei, men det er først og fremst mangel på FVIII og FIX (som mangler i henholdsvis hemofili A og B), som forlenger APTT-tiden, bortsett fra personer som får K-vitamin-antagonister, siden Warfarin (Marevan®) reduserer faktorene II, VII, IX og X. Prøven er ufølsom for defekt faktor VII og XIII. APTT kan også brukes som metode for måling av heparineffekt, siden heparin aktiviserer anti-trombin. Prøvematerialet til testen er citratplasma fra den som har trent og et APTT-reagens med ellaginsyre og fosfolipider fra dyrehjerne. Kalsiumioner tilsettes for å starte reaksjonen.

### **Testprinsipp:**

APTT-testen er basert på aktivering av plasmaet vha en kontaktaktivator (ellagsyre – negativt ladet) i nærvær av fosfolipider, som en erstatning for aktiverte blodplater. Den er en spkalt «Clot-test». Etter blanding og inkubering ved rett temperatur tilsettes et overskudd av kalsiumioner. Koaguleringstiden som oppnås, vil bestemmes av mengden koagulasjonsfaktorer som er til stede i plasmaprøven.

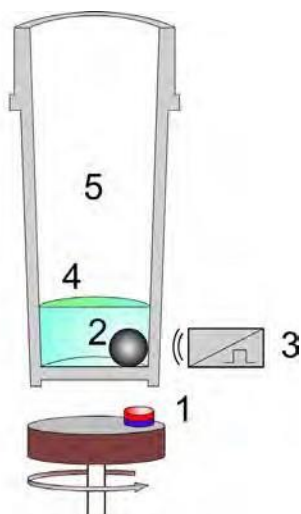
På denne måten vil nedsatt konsentrasjon eller funksjon av noen av de involverte faktorene, (sjeldnere spesifikke eller uspesifikke hemmere i prøven), gi en økning av koagulasjonstiden.

Referanseområdet for APTT er satt etter måling på friske, ustressede, personer som har vært i ro minst 20 minutter før blodprøvetaking. Det er kjent at APTT reduseres umiddelbart etter hardt fysisk arbeid, men at verdien normaliseres ganske raskt etter anstrengelsen.

Venøst blod tappes i vacutainerrør tilsatt 3,2 % natriumcitrat. Bland blod og antikoagulant forsiktig ved hjelp av vending av røret, minst 5 ganger. Merk rørene med navn (og E eller F), og sett dem i stativ fremme på kateteret. Vi sentrifugerer de korkede rørene ved romtemperatur i minst 10 minutter ved 3000 rcf. Prøver der det endelige forholdet mellom Na-citrat og prøve ikke er korrekt (dvs. ikke nok blod), eller hemolyse (rødt plasma) vil gi feil prøvesvar.

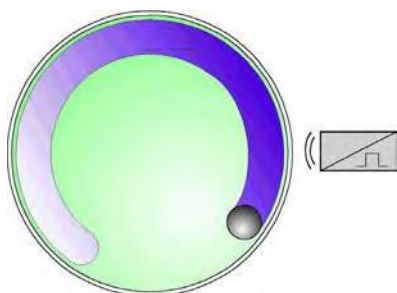
**Referanseområde: 25-39 sekunder.**

## Automatisk metode - Måleprinsipp



En motor-drevet magnet (1) plassert under en kyvette (5) i målekammeret gjør at stålkulen (2) roterer i en bane langs kanten av bunnen på kyvetten (Fig. 1). En sensor (3) overvåker bevegelsen til stålkulen. Roteringen sørger dessuten for god blanding av prøvematerialet (4).

Fig. 1 APTT



Når koagulasjonen starter, vil viskositeten i prøven endres, og påvirke bevegelsen til kulen. Dannelse av fibrinnettverket vil føre til at stålkulen stanser.

Koagulasjonstiden i sekunder vil vises i display.

Fig. 2 APTT

### Utførelse av testen:

La APTT-reagens og kalsiumløsning forvarmes i 37°C.  
Skift til ny pipettespiss mellom alle reagensene.

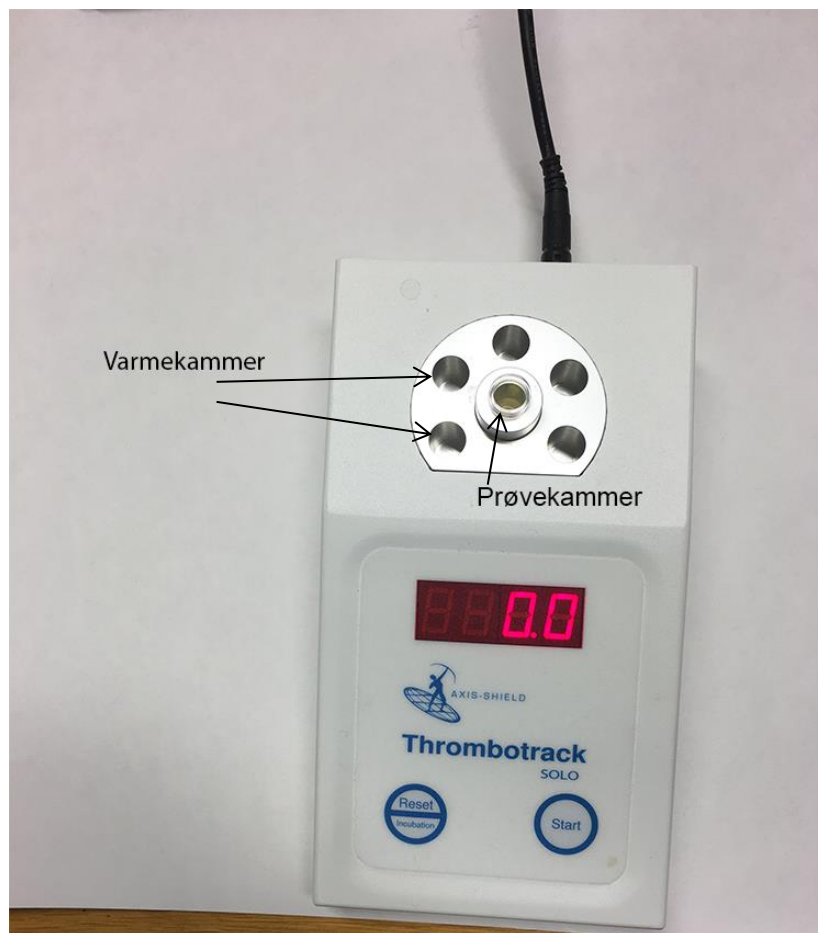
- Tilsett 1 (pass på at det er bare 1) stålkule vha dispenserpenn til en tom kyvette.
- Tilsett 100µL APTT-reagens og 100µL platefritt citratplasma (fra sentrifugert prøve) til kyvetten og sett den i et varmekammer i apparatet i 3 minutter. Apparatet holder 37°C.



Til APTT brukes blodplatefritt citratplasma, dvs. etter sentrifugering skal dere bare bruke det gule plasmaet.

Unngå å bevege for mye på røret. Unngå å stikke pipettespissen ned i laget med celler.

- Etter 3-5 minutter: flytt kyvetten med prøven til prøvekammeret. Mål opp 100 $\mu$ L kalsiumløsning.



- Trykk Reset , deretter Start på apparatet. Thrombotrack starter nedtelling fra 3 til 1, og lager en pipelyd når kalsiumløsningen skal tilsettes i kyvetten.
- Observer det som skjer i kyvetten. Apparatet stopper selv.
- Notér tiden i sekunder.

Enkeltp prøve. 1 fra Før aktivitet, og 1 fra etter aktivitet.

Til klinisk bruk må hvert laboratorium opprette sitt eget referanseområde i henhold til det utstyret som benyttes, på grunn av forskjeller på analyseinstrument, laboratorier og lokalpopulasjoner. Det er bare VIII og IX som er klinisk relevant å se på fra dagens test.

Heparin er en naturlig forekommende antikoagulant (finnes i mastcellekorn og basofile granulocyttkorn). Det er et polysakkarid som kan reagere med plasmafaktoren anti-trombin (III). Komplekset kan inaktivere trombin og flere andre koagulasjonsfaktorer. Effekten av heparin-injeksjon kommer meget raskere enn effekten av vit. K-antagonistene, og heparin brukes derfor når rask antikoagulasjon er ønskelig.

Tips: Les gjennom HEMOSTATISK ORDLISTE i BLODCELLENES FYSIOLOGI for raskt overblikk over faktorene og vanlige uttrykk som gjelder hemostasen.



## R2: RAPPORTSKJEMA FOR LEUKOCYTT-FORSØKENE (2. DAG).

A (Løp):  B(Sykkel):  (kryss av)

Prøvedato: \_\_\_\_\_

Forsøksperson: Treningstilstand (meget veltrenet/veltrenet/middels/sofagris). M/K

B: Sykkelarbeidets intensitet: \_\_\_\_\_

B: Tid fra avsluttet sykling til blod renner inn i første vakutainerrør: \_\_\_\_\_ sek.

A: Karakterisering av løpet (bl.a. hvor hardt i forhold til treningstilstanden):

\_\_\_\_\_

**NB.** Hele lagets/gruppens resultater (d.v.s. bl.a. 3 diff.tellingsresultater

Fra Før-prøven) og studentenes navn skal føres inn, og ett rapportskjema leveres pr. lag.

**Stud.navn/ PBL-gruppe nr:**

\_\_\_\_\_ PBL-gruppe nr: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ PBL-gruppe nr: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ PBL-gruppe nr: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

← Manuelle Differensialtelling (%) →

	Puls (enkelt- telling)	EVF (%)	Hb (g/ 100mL)	Diff-telling i utstryk etter arbeid er en frivillig øvelse.						
				Seg. kjern.	Stav kjern.	Lymfo.	Mono.	Eos.	Baso	
Før arbeid										
Medianer										
Etter arbeid 0 min./ 3h										
Medianer										

WBC automatisk Diff	Leukoc. kons. (10 <sup>9</sup> /L)	Nøytrofile (%)	Lymfo. (%)	Mono. (%)	Eos. (%)	Baso (%)
Før arbeid						
Etter arbeid						

Før opp medianverdiene i tabellen under. Regn ut v.hj.a. medianverdiene antall milliarder av hver **leukocyttype**, i milliarder celler pr. liter blod, dvs. kombinér diff.-% og leukocyttkons. Før og Etter arbeid. Deretter beregner dere *forskjellene*, "Etter-minus-før" (evt. med minustegn) for alle parametrene:

					Manuell Differensialtelling ( $10^9/L$ )				
	Puls	EVF	Hb (g/100mL)	Leukoc.kons. ( $10^9/L$ )	Seg. ( $10^9/L$ )	Stav ( $10^9/L$ )	Lymfo. ( $10^9/L$ )	Mono. ( $10^9/L$ )	Eos. ( $10^9/L$ )
Før arbeid (Medianer)									
Etter arbeid (Medianer) *									
Etter-minus- før-verdier:*									
					Automatisk Differensialtelling ( $10^9/L$ )				
					Nøytrofile ( $10^9/L$ )	Lymfo. ( $10^9/L$ )	Mono. ( $10^9/L$ )	Eos. ( $10^9/L$ )	
Før arbeid (Aut. måling)									
Etter arbeid (Aut. måling)									
Etter-minus-før-verdier:									

\* Frivillig øvelse, manuell diff. -telling etter fysisk arbeid.

Er erytrocyttenes fargemetning, størrelse og form i blodutstrykene normale? \_\_\_\_\_

Er trombocyt-antallet, vurdert ut fra blodutstrykene, normalt eller patologisk senket? \_\_\_\_\_

### Resultater APTT:

	APTT (sek.)
FØR arbeid	
ETTER arbeid	
Etter-minus-før-verdier:	

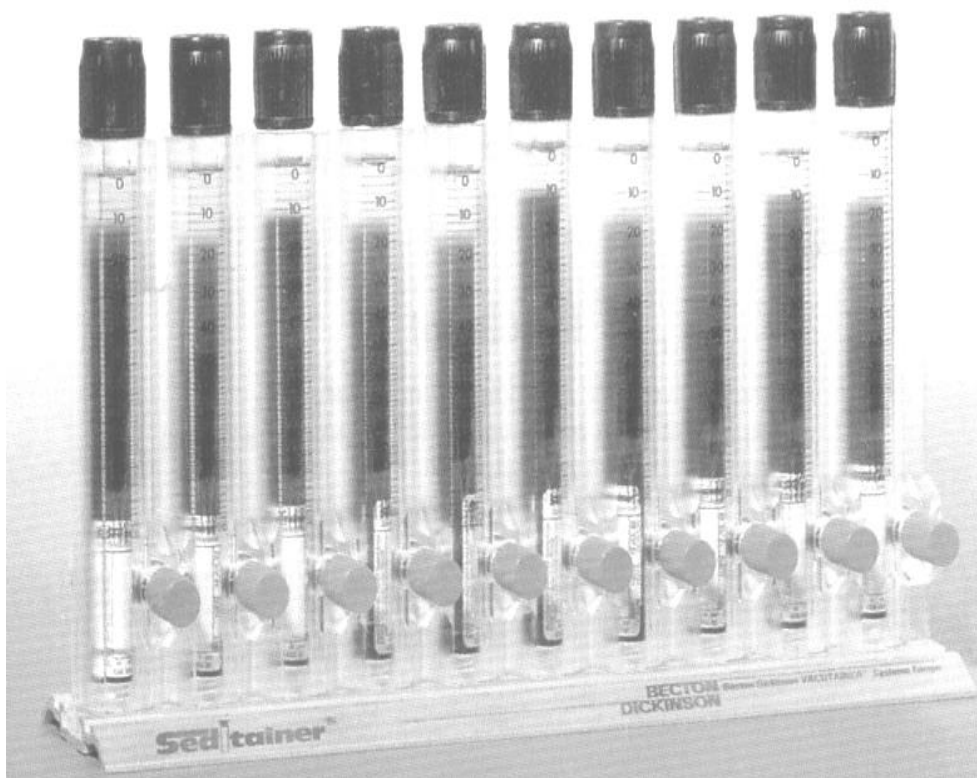
Husk at endringen kan være negativ, og marker i så fall dette.

Godkjent: \_\_\_\_\_ Ikke godkjent: \_\_\_\_\_ Dato: \_\_\_\_\_ Sign.: \_\_\_\_\_

## Blodkurs Dag 3

### SENKNINGSREAKSJONEN (Dag 3)

**Mekanismen for erythrocytt-sedimenteringen (SR).** Erythrocytter (RBC) er tyngre enn plasma. Sedimenteringshastigheten økes svært ved RBC-klumping til "pengerull-dannelse" ("rouleaux"-formasjon). De viktigste faktorer som stimulerer "pengerull-dannelse", er plasmaproteiner med høy molekylvekt og langstrakt form, slike som fibrinogen (et viktig akutt-fase-protein) og dernest  $\alpha_2$ - og  $\gamma$ -globuliner. Størrelse og form på erythrocyttene spiller også en rolle. Små erythrocytter danner lettere pengeruller enn normalt store celler. "Pengerulldannelse" øker også når EVF synker (anemi), mens polycytemi gir lavere SR. Jernmangel-anemi-RBC kan imidlertid angivelig ha nedsatt tendens til rulldannelse. Målingen av SR blir feil dersom blodet tilblandes for mye citrat-løsning (fortynning av plasmaproteiner, men også fortynning av antall RBC).



**Betydning:** Empirisk test. Fullstendig uspesifikt fenomen, men økt SR avspeiler oftest endringer i plasmaproteinkonsentrasjonen. Tross dette har testen opplagt klinisk verdi som "screening test" på inflammatoriske og visse neoplastiske (kreft-) sykdommer og som indikator på sykdomsutviklingen, f.eks. ved leddgikt og kroniske infeksjoner.

**Utførelse:**

**1. Seditainer-rør:** Silikonert vakuumbør med 1.3 ml citratløsning, indre diameter: ca. 9 mm, blodsøylens lengde 100 mm. Røret har en ikke-lineær skala for at resultatet skal samsvare med standardmetode-resultatene. Seditaineren fylles automatisk med 5.2 ml blod ved venepunksjon, som ved bruk av vanlige vakutainere (vakuumbør). Bland grundig ved å snu opp-ned minst 8 x (evt. også romtemperatur-ekvilibrering, om røret har stått i kjøleskap). Røret settes deretter i spesialstativ og avleses etter *nøyaktig* 60 min. Blodet kan angivelig lagres inntil 6 timer ved romtemperatur og 24 timer i kjøleskap før det blandes igjen og settes opp til senkning.

**2. Standardmetode:** Rett, vel 20 cm langt glass- eller plastrør, 2.5 mm indre diameter; blodsøylens lengde 200 mm; røret kalibrert i mm fra 0 til 150 mm. Testen bør utføres innen 2 timer etter at blodet er tatt. Etter *god blanding* i vakuumbøret like etter blodtakingen overføres blodet til glassrøret. Røret settes *eksakt* vertikalt og står uforstyrret ved romtemperatur i 60 min. SR er definert som høyden av den klare plasmasøylen over blodcellesøylen avlest etter 1 time (enhet: mm/1 time). I disse AIDS-tider bruker vi ikke denne metoden, men beskrivelsen er gitt for å skaffe sammenlikningsgrunnlag med seditainer-metoden.

**Feilkilder:** Økning i SR med temperaturen. Ved fortynning av blodet kan både kons. av RBC og kons. av plasmaproteiner bli for lave. SR kan derfor både være nedsatt eller økt.

*Referanseverdier:* **Menn: 0-15 (> 50 år: 0-20), kvinner: 0-20 (> 50 år: 0-25) mm/time.** SR øker med alderen, over 60 år kan både menn og kvinner ha verdier på ca. 20 uten spesiell årsak. Forhøyede verdier også ved anemi og svangerskap. Lave verdier (0) ved koagulasjon eller polycytemi.

Lar man SR-røret stå til neste dag, kan man få en pekepinn på (men intet *godt* mål for) EVF. Gjør dette som en frivillig øvelse - f.eks. ett rør pr. 3-mannslag - og sammenling resultatet med EVF-verdien som ble målt på dag 1.

### «DIAGNOSTISKE NØTTER»

Ved hjelp av de analysemetodene dere har lært hittil, skal dere samarbeide om planlegging og gjennomføring av undersøkelser på en utlevert blodprøve (pluss evt. avføringsprøve), supplert med utlevert retikulocyt%, SR-verdi og ferdiglagde utstryk fra blodet.

Fra hvilken av følgende personer/pasienter stammer sannsynligvis det utdelte testmaterialet (blod og evt. utstrykspreparat og avføring)? *Analyseresultatene skal noteres i rapportskjema* og det diagnostiske resonnement skal beskrives og kommenteres. Det er ikke nok å liste opp funnene, dere må vise hvordan dere kom frem til svaret. Var det noen avvikende funn - noe som *ikke* stemte? Skjemaet vises frem til en av kursinstruktørene. Ikke kast prøven før diagnosen er godkjent!

*Undersøkelsen må gjentas dersom svaret er galt.*

1. Frisk, 22 år gammel mannlig medisinstudent som nylig har tatt vaksine.
2. Kvinnelig, 23 år gammel medisinstudent som lenge har hatt sterke menstruasjonsblødninger.
3. Mann, 60 år, med kronisk myelogen (granulocytær) leukemi, ukontrollert dannelse av granulocytter som «oversvømmer» organismen. Mange flere leukocytter enn normalt i blodet, inklusive umodne granulocytter. (Se oppslag på kurssal om typiske laboratoriefunn og cellenes morfologi inkludert forstadier via Mine studier).
4. Mann, 70 år, med kronisk lymfatisk leukemi (mange lymfocytter i blodet, ofte ødelagt i utstryk). Se lærematerialet nevnt under pasient 3.
5. Barn, 4 år, med akutt lymfatisk leukemi (anemi og lymfoblaster i blodet; se lærematerialet ovenfor).
6. Mann, 40 år, med akutt myelogen leukemi (anemi og myeloblaster/promyelocytter i blodet; se lærematerialet).
7. Mann, 45 år, med benmargsaplasi etter langvarig medikamentforbruk (se kompendiet «Blodcellenes fysiologi og hemostasen»).
8. Kvinne, 30 år, med hudblødninger p.g.a. allergisk trombocytopeni (svært få blodplater i blodet).
9. Mann, 70 år, med anemi p.g.a. tykktarmskreft.
10. Kvinne, 65 år, med anemi p.g.a. kronisk nyrebekkenbetennelse. (Gjentatte, øvre urinveisinfeksjoner.)
11. Mannlig medisinstudent, 23 år, fra filariasis-endemisk område. Filariasis er en parasitt- (orme-)sykdom.

NB: Enkeltprøve av hemoglobin, dobbeltprøve av blod i avføring (2 prøver finnes på hvert utleverte prøveark) og den elektroniske leukocyt-tellingen, trippelprøver av EVF og diff.telling:: Se rapportskjema for dag 3. Utfør differensial-telling etter alle andre undersøkelser er gjort

I tillegg tas denne kursdagen senkningsreaksjonen (SR) på hver student.

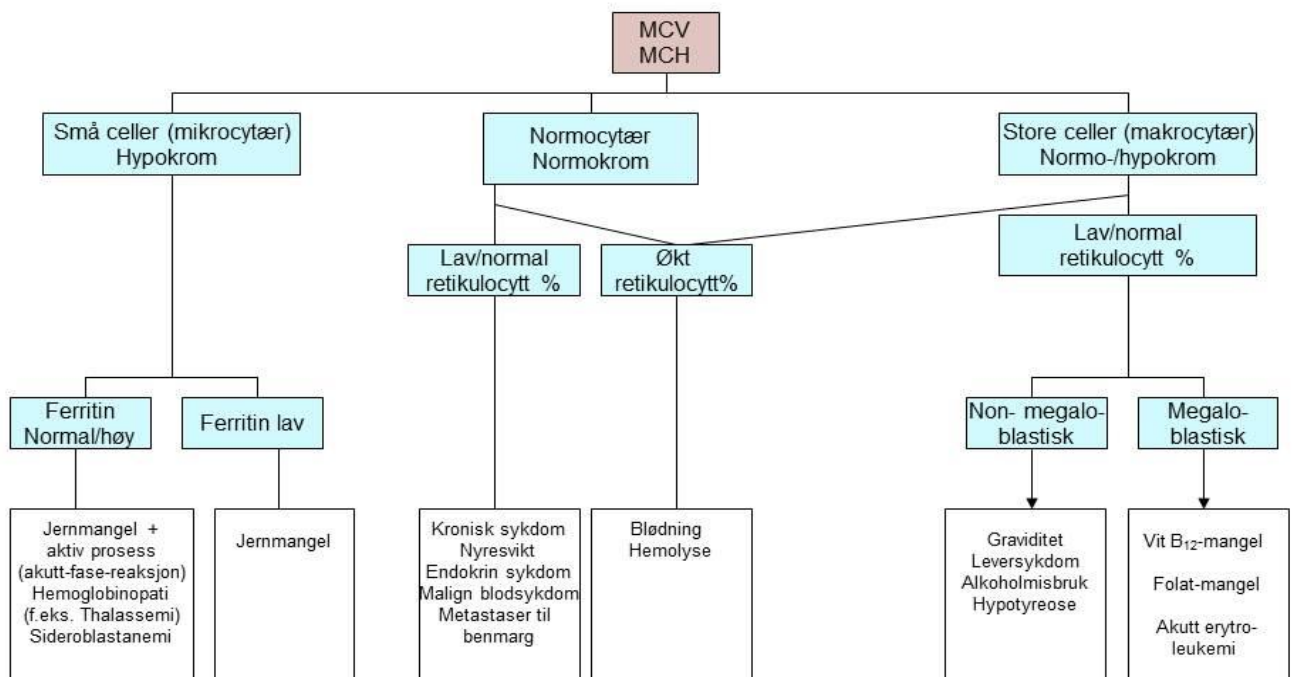
## ELEKTRONISK TELLING AV WBC (Dag 3).

Elektronisk telling av leukocytter (WBC) vha Coulter Counter fra den utleverte blodprøven. Husk! Bland blodet i EDTA-røret godt med pasteurpipette før uttak. 20 µL blod fortynnes i 10 mL medium med 6 dråper "Zapoglobin" (hemolyserer RBC), som er tilsatt på forhånd. Bland godt og lag dobbeltprøver. Vi bruker samme apparatinnstilling som for telling av RBC, dvs celler pr 100µl. Noter verdien fra telleren og regn ut antall hvite blodceller pr. L blod. Merk at det ikke er like stor fortykning som for telling av RBC.

## LITT MER OM ANEMIUTREDNING

Ved anemi av ukjent årsak er en nøyaktig sykehistorie meget viktig, som nesten alltid i medisinen. Sykehistorien supplert med metoder fra "blodkurset" kan ofte føre dere ganske langt i en anemi-utredning. Dere kan diagnostisere at det foreligger en *anemi*, *anemiens grad* (hgb, EVF), og *intensiteten av reparasjonsforsøkene* (retikulocyt-prosentsen, som for øvrig også kan gi holdepunkter ang. årsaken, etiologien). Dere skal også kunne klassifisere tilstanden i henhold til følgende skjema:

### Morfologisk klassifikasjon av noen utvalgte anemityper på grunnlag av erytrocytt-volum (MCV) og innhold av hemoglobin (MCH), med utgangspunkt i lav hemoglobin.



*Blodutstryket* kan også gi den øvede kliniker viktig tilleggsinformasjon. Fravær av blodplater kan bety at trombocytopeni-betingede blødninger kan være en mulig forklaring på anemien. I praksis telles trombocytter imidlertid elektronisk, omtrent som de hvite blodcellene. Videre vil f.eks. funn av leukemiske celler i utstryket fortelle henne at en leukemisk prosess i benmargen kan ha undertrykket den normale produksjonen av røde og hvite blodceller og av blodplater. Store røde blodceller, med større grad av formvariasjon enn vanlig, bringer tanken hen på bl.a. pernisiøs anemi.

*Blødningstidsbestemmelsen* gir et mål på blodplatenes blodstansningsfunksjon. Andre hemostasetester må også utføres når det er tale om patologisk blødningstendens.

*De hyppigste kroniske anemier* i Norge er jernmangelanemi og anemier sekundært til andre sykdommer. Både ved jernmangel og sekundære anemier er serumjern-konsentrasjonen gjerne lav. Men ved jernmangelanemier er den totale jernbindingskapasitet økt (TIBC), mens den ved de sekundære anemier er normal eller nedsatt.

*Serum-ferritin-konsentrasjonen* kan måles immunologisk. Den gjenspeiler ofte, men ikke alltid, størrelsen av organismens jerndepoter. Jernkonsentrasjon, jernbindingskapasitet og serum ferritinkonsentrasjon måles verken i blodkurset eller av allmenpraktikeren - men svært ofte i spesiallaboratorier. Derimot kan vi f.eks. ved hjelp av SR og *leukocyt-tellingene* få holdepunkter for eller imot noen av de sykdommene som gir sekundær anemi. Videre bør en allmenpraktiker kunne undersøke på *okkult (skjult) blod i avføringen*, fordi både magesår/"katarr" og kreft i magesekk og spesielt i tykktarm er tilstander som ofte gir blødning.

### **PÅVISNING AV OKKULT BLOD I FÆCES (Dag 3)**

Et friskt menneske taper 1-2 ml blod pr. døgn via tarmkanalen. Man vil gjerne at en god metode skal avsløre en beskjedent økning utover det normale tapet, f.eks. 10 ml. De fleste metodene er basert på pseudo-peroxidase-aktiviteten til hemoglobin og dets jern-porfyrin-derivater, ved at de katalyserer oksidasjonen av et ufarget organisk molekyl (f.eks. benzidin, tetrametyl-benzidin, orto-toluidin eller guajak) til et farget molekyl (blå-grønt for benzidin-stoffene). Reaksjonen foregår - slik vi skal foreta den med tetrametyl-benzidin (det klassiske reagens, benzidin, kan være kreftfremkallende) - i eddiksurt miljø og med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> som oksygendonor. Reagenser med bruksanvisning til anbefalte prosedyrer kan man oftest få via apotekene.

Reaksjonen er altså en test på en enzymaktivitet i avføringen, og man kan tenke seg *falskt negative utslag* dersom reagensene er for gamle, dersom blodet er ujevnt tilblandet avføringen, dersom det er blandet ut i en særdeles stor døgnmengde fæces, eller dersom det er meget reduserende (antioksidativt) C-vitamin til stede. *Falske positive resultater* kan man f.eks. få dersom noe av utstyret man bruker, har vært i kontakt med blod, eller dersom pasienten har spist kjøtt- eller blodmat i løpet av de siste tre døgn før prøvetakingen.

Såfremt blødningen ikke kommer fra den aller nederste delen av tarmkanalen (hemorroider etc.), vil blodet omdannes og gjøre avføringen *svart* (= *melena*). Inntak av jerntabletter, blåbær etc. vil også gi svart avføring, men ikke positiv benzidin-reaksjon.

#### **Utførelse av blod i fæces-test, (v.hj.a. tetrametyl-benzidin-reaksjonen):**

1 dråpe tetrametyl-benzidinreagens og 1 dråpe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% dryppes omtrent samtidig på en fæces-flekk. Pass på at tutene på flaskene ikke kontakter hverandre eller væsken som er dryppet på filterpapiret! Stoppeklokken settes i gang under den siste reagenstilsetningen. Dersom det fremkommer blågrønn farge umiddelbart etter pådryppingen, angis resultatet som + momentant. Fargeutvikling som kommer *i løpet av 15 sekunder*, angis som + og antall sekunder til fargen ses, f.eks. +10". Fargeomslag etter mer enn 15 sekunder angis som -.

*Referanseverdier: -, dvs. mer enn 15 sekunder.*



**R3: RAPPORTSKJEMA FOR SR og "DIAGNOSTISKE NØTTER" (3. DAG)**

Prøvedato: \_\_\_\_\_

Navn: \_\_\_\_\_

Seditainer-(SR)verdi : \_\_\_\_\_

Navn: \_\_\_\_\_

Seditainer-(SR)verdi : \_\_\_\_\_

Navn: \_\_\_\_\_

Seditainer-(SR)verdi : \_\_\_\_\_

Resultater utlevert blod, etc. fra ett av kasesene fra side 37 (utfør og angi de replikatanalyser som det er anvist plass til i tabellen):

←—Differensialtelling (%)—→

Blod-prøve-kode-nr.	Hgb g/100 mL	EVF	Re-tik. %	Leuko-cytter 10 <sup>9</sup> /L	Seg. nøy-tro.	Stav nøy-tro.	Lymf.	Mono.	Eos.	Annet	Trom-boc. *	SR mm/t	Blod i av-før.

\* Angi om trombocytallet virker normalt eller nedsatt

Overveielser og observasjoner:

---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---



---

Diagnose: \_\_\_\_\_

Prøven godkjent: \_\_\_\_\_ **NB! Signatur på attestasjonsarket.**  
**(Ikke kast blodprøven før prøven er godkjent!)**

Rapportskjema godkjent: Dato: \_\_\_\_\_ Sign.: \_\_\_\_\_

Et rapportskjema pr gruppe forevises for godkjenning. Alle studentenes for- og etternavn må være påført.

## APPENDIX:

### USIKKERHETSVURDERING, MÅLEFEIL OG LITT STATISTIKK

H.B. Benestad & J.-G. Iversen

#### Årsaker til variasjon

Dersom vi måler en variabel, f. eks hemoglobinkonsentrasjon i blodet, i et utvalg av befolkningen, vil vi finne en viss spredning av måleresultatene. Denne variasjonen skyldes til dels at folk i utgangspunktet har ulike hemoglobinverdi (*biologisk variasjon*), til dels usikkerhet ved selve målemetoden (*måleusikkerhet*). Den biologiske variasjonen kan gjøres mindre ved å avgrense utvalget til en mer ensartet gruppe, f. eks. ved å undersøke personer av samme alder og kjønn. Med i den biologiske variasjon hører også at samme person kan ha ulike hemoglobinkonsentrasjon til ulike tider.

#### Litt om usikkerhetsvurdering

Ved gjentatte målinger av én bestemt størrelse (f.eks. hemoglobin-konsentrasjonen) hos én person vil de enkelte målingene ikke gi det samme resultat hver gang. Ofte, men slett ikke alltid, vil måleresultatene være normalfordelt (også kalt Gauss-fordelt). En slik fordeling er symmetrisk rundt en "midtverdi" og har en bestemt "klokkeform".

1. **Lokalisering.** Uavhengig av den type fordeling våre observasjoner følger, vil vi kunne karakterisere dem med en **lokaliseringsparameter** pluss et uttrykk for *usikkerheten* i denne lokalisasjonen. Som lokaliseringsparameter bruker vi *medianen* (i tradisjonell statistikk brukes gjerne den aritmetiske middelværdi i stedet), fordi medianen påvirkes mindre enn middelværdien av "ville verdier" – som ikke inntreffer rent sjeldent i studentøvelser! Medianverdien er den tallverdimessig midterste av våre målinger (ved ulike antall målinger), eller gjennomsnittet av de to midterste (ved like antall). Usikkerheten i lokaliseringen av medianen angir vi med et *konfidensintervall*. Dette er beregnet matematisk på grunnlag av våre n antall målinger. Litt forenklet kan vi si at den "sanne" medianverdien ligger med sannsynlighet (gjerne ca. 0.95) i det intervallet vi har bestemt. Tabell 1 gir konfidensintervaller for medianen for ulike antall (3-50) målinger av én størrelse. Vi vil av denne tabellen ikke alltid kunne fastsette et konfidensintervall nøyaktig på 0.95. Hvis vi ønsker det, må vi interpolere. Eks.: 7 målinger av hemoglobinkonsentrasjonen hos samme person gir følgende verdier: 14.4, 14.6, 14.8, 14.8, 14.9, 15.0, 15.3 g/100 mL. Medianen er 14.8 g/100 mL. Av Tabell 1 leser vi at den sanne medianverdien ligger mellom ytterverdiene 14.4 og 15.3 g/100 mL med 0.984 sannsynlighet. Men vi må nøye oss med en sannsynlighet på 0.875 hvis vi velger 14.6 og 15.0 som yttergrenser. Ved hjelp av lineær interpolering finner vi 0.95 (95%) konfidensintervallet: 14.5-15.2.

**Konfidensintervallet** angir altså påliteligheten av medianestimatet og reduseres med økende antall målinger. Konf.int. er til hjelp når vi skal sammenlikne medianverdiene fra to ulike grupper av målinger (f.eks. to studenters hemoglobinkonsentrasjon).

Dersom den ene gruppens 95% konf.int. ikke inkluderer den andre gruppens medianverdi, og omvendt, er det i hvert fall en signifikant forskjell ( $P < 0.05$ ) mellom de to grupper av data. Hvis bare den ene medianen faller utenom den andre gruppens 95% konf.int., kan forskjellen mellom de to gruppene likevel være statistisk signifikant på 5%-nivå, men dette må undersøkes v.h.j.a. for eks. en Wilcoxon's to-utvalgs rangtest (eller den ekvivalente Mann-Whitney).

Hvis vi har foretatt parvise sammenlikninger, f.eks. mellom blødningstiden før og etter hardt arbeid, kan vi for hvert slikt par av data finne en differanse (i eksemplet: tidsforskjell). Vi kan så, som ovenfor forklart, finne median av differansene og dens 95% konfidens-intervall. Dette er nyttige verdier – liksom medianer med sine konf.int. i sin alminnelighet – for også disse sier oss noe om både **biologisk og statistisk signifikans**: Vi får vite om differansen er signifikant forskjellig fra null (når 95% konf.int. *ikke* inkluderer eller omfatter denne verdien) og om den kan være så stor at den er interessant eller viktig.

2. **Spredning**. Av og til er vi ikke interessert i å sammenlikne to grupper av målinger for å avgjøre om det er en statistisk signifikant forskjell mellom dem, men vi vil istedenfor karakterisere spredningen av parallelle måleresultater, f.eks. for å kunne gi et uttrykk for hvor presis en målemetode er. I disse tilfellene velger vi ikke å angi lokaliseringsparameter pluss lokalisasjonsusikkerheten (konf.int.), men bruker lokaliseringsparameteren pluss et spredningsmål som ikke blir relativt smalere når antallet målinger øker. Vi har valgt **kvartilintervallet**, som fremkommer på følgende vis:

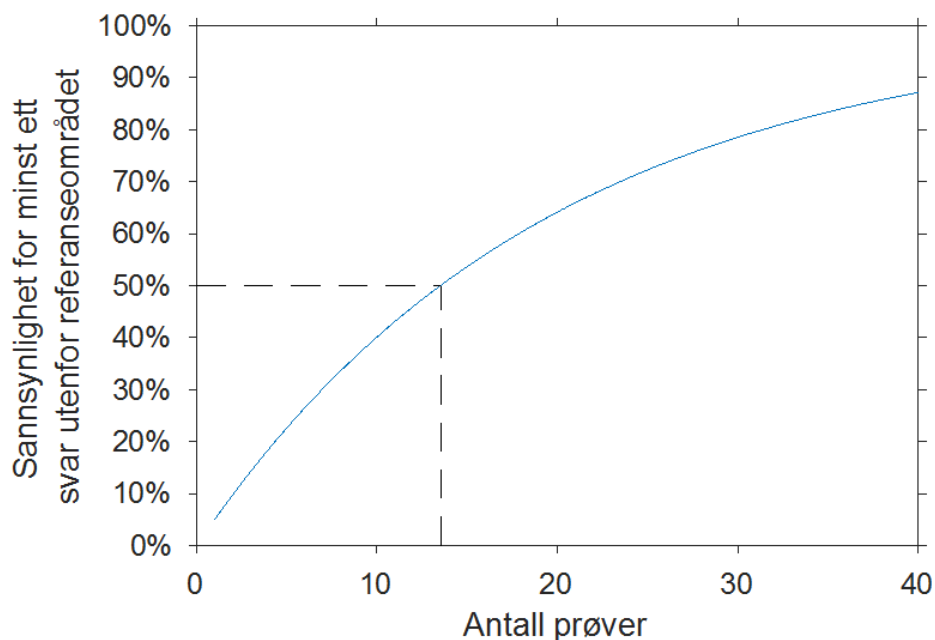
1. Alle måledata rangeres fra den minste til den største verdien.
2. Kvartilintervallets grenser settes slik at den nedre og øvre firedelen av verdiene faller utenfor, dvs. intervallet kommer til å omfatte halvparten av alle måledata. Evt. må det interpoleres.

I den vanligere brukte *parametriske statistikk*, som baserer seg bl.a. på normalfordelinger av måledata, brukes gjerne aritmetisk middelværdi ( $= \sum x_i / n$ , der  $x_i$  representerer enkeltmålinger og  $n$  er antall enkeltmålinger) istedenfor medianverdi; med standardavvik (SD - "standard deviation") som mål på spredning og standardfeil (SEM - "standard error of the mean") som usikkerhetsmål på middelværdien. Alternativt opererer man her også med 95% konf.int., som er tilnærmet lik middelværdien  $\pm 2$  SEM (unntatt når det er få observasjoner, da bør man bruke en t-tabell for å finne faktoren foran SEM).

Variansen, som er  $SD^2$ , er lik det gjennomsnittlige kvadratavviket fra middelværdien (d.v.s. i praksis setter vi  $SD^2 = \sum(x_i - \bar{x})^2 / (n-1)$ ).  $SD = \sqrt{(\sum(x_i - \bar{x})^2 / (n-1))}$ . Videre er  $SEM = SD/\sqrt{n}$ . Siden det er den *relative* spredningen av måledata vi oftest er interessert i, angir vi gjerne  $SD$  som fraksjon eller prosent av middelværdien (gj.sn.), og kaller denne størrelsen for variasjonskoeffisienten,  $CV$  ("coefficient of variation").  $CV = SD / \text{gj.sn.} (* 100\%)$ .  $CV$  er et hendig mål for spredning av data og kan brukes selv om vi ellers har valgt å operere med ikke-parametrisk statistikk (d.v.s. medianer og rang-tester, som Wilcoxon's).

En formel som er nyttig når vi vil bestemme  $SD$ , men bare har en stor samling dobbelt-prøver (og ikke mange parallell-målinger), er denne:  $SD = \sqrt{(\sum d^2 / 2n)}$  (der  $d$  er differansen mellom duplikatresultatene i hvert par og  $n$  er antall par).

*Den inter-individuelle variasjonen av en biologisk variabel i en gruppe normale personer* brukes til å bestemme øvre og nedre "normalverdier" (f.eks. for hgb) – referanseverdiene. Disse grenseverdiene omfatter de midtre 95% av normalpersonenes verdier. Det betyr at 5% av en normalbefolkning faller utenfor dette såkalte referanseområdet. Ved laboratorie-"screening" med multikanalers analyse-apparater vil derfor 1 av 20 analysesvar p.g.a. "tilfeldig spill" gi en "unormal" verdi. Hvis man tar flere prøver blir det derfor etterhvert stor sannsynlighet for at ett eller flere prøvesvar faller utenfor referanseområdet, selv om dette ikke skyldes patologi. Hvis prøvesvarene er uavhengige av hverandre vil sannsynligheten for dette gis av formelen  $P = 1 - 0,95^n$  hvor  $n$  er antallet prøver man tar. Lager man en graf som fremstiller denne sammenhengen (se under), finner man at det er over 50% sannsynlig at man får minst én verdi utenfor referanseområdet når man har tatt 13 prøver. Dette er det viktig å være klar over; ellers påføres forsøkspersonen eller pasienten en masse ekstraanalyser for å kontrollere "unormale" prøver ("*Odysses-syndromet*", eller etter hans latinske navn: "*Ulysses-syndromet*").



Når vi skal angi et **referanseområde**, må først måledata rangeres fra minst til størst, som ved bestemmelsen av kvartilintervallet. Grensene for området legges slik (ofte v.h.j.a. lineær interpolering) at 2.5% av verdiene faller under nedre grense og 2.5% over øvre grense. (For andre analyser angis bare en øvre eller nedre grense. Når det f.eks. bare gis en øvre grense, som for aktiviteten av leverenzymmer i blodplasma, vil 2.5% av de normale referansepersonene ha verdier over denne.)

## Målefeil

Ved våre målinger har vi to hovedtyper feil som kan gi utslag i interkvartilintervallet/SD eller i medianens/gjennomsnittets størrelse.

### a. Systematiske feil

Systematiske feil gir "usanne" verdier og gir metoden en *dårlig lokalisering eller nøyaktighet* (engelsk: "accuracy"). Disse feilene forskyver median og konfidensintervall i en bestemt retning uten nødvendigvis å forandre bredden av konfidensintervallet eller størrelsen på SD. Eks.: blodtaking fra kald øreflipp, gal kalibrering av hemoglobin-kolorimeteret, visse typer grove feil (= iakttaker-feil) (slike som bruk av 0.025 mL i stedet for 0.020 mL pipetter). Også enkelte typer *psykologiske feil*: feildiagnostisering av monocytter i en differensialtelling (fordi man vet at det skal være flere lymfocytter enn monocytter i blodet). Flere samvirkende systematiske feil kan forsterke hverandre eller også faktisk motvirke hverandre. Det siste alternativet kan være vanskelig å oppdage. Andre typer av "grove feil" og psykologiske feil faller inn under de tilfeldige feil (se nedenfor).

Noen systematiske feil kan man unngå ved å lage seg en *standardprosedyre* for målingen; f.eks. kan man på forhånd bestemme seg for hvilken "mikroskoperingskurs" man skal følge i utstryks-preparatet. Andre systematiske feil kan det være vanskelig å unngå: f.eks. kan man få *dårlig reproduserbarhet* mellom målinger fra én dag til den neste fordi nye reagenser må tillages. De nye reagensene kan ikke bli helt identiske med de gamle. Skal man i slike tilfelle foreta sammenlikninger mellom to grupper målinger, må disse naturligvis være foretatt på noenlunde samme tidspunkt (og av samme person og på samme måte). Det er klok politikk ikke bare i rutinelaboratorier, men også i forskningslaboratorier å etablere en omfattende *kvalitetskontroll*. Man bør f.eks. regelmessig inkludere analyser av "standardprøver" med kjent sammensetning.

### b. Tilfeldige feil

Disse kan skyldes begrenset målenøyaktighet av apparatur, unøyaktige avpipetteringer, etc., og kan ikke elimineres – men minskes – ved øvelse, bruk av mer fintmålede apparatur, nøyaktigere pipetter o.s.v. Dette vil redusere spredningen i målingene, og dermed snevre inn konfidensintervallet. Også flere gjentatte målinger av samme størrelse vil som nevnt redusere konfidensintervallets bredde, jf. økning av  $n$  i Tabell 1. Summen av

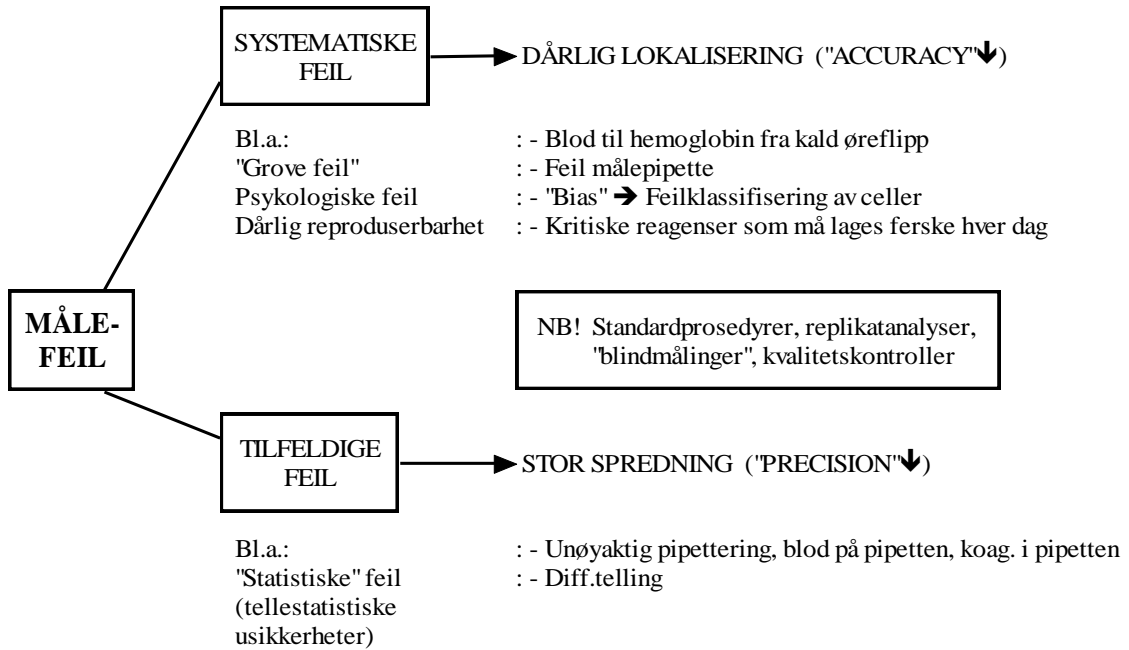
tilfeldige feil bestemmer *spredningen av målepunktene eller presisjonen* (engelsk: "precision").

*Tellestatistiske usikkerheter* kommer også i denne kategorien av feil. Disse kan man aldri unngå helt i målinger hvor tilfeldige prosesser kommer inn. Slike tilfeldige prosesser kan f.eks. være spørsmålet om en bestemt celle vil komme med i et uttatt volum, eller om et spesielt atom i et radioaktivt mineral vil desintegreere innen en viss tidsperiode. Disse tellestatistiske feilene opptrer f.eks. ved telling av blodceller i en Coulter-teller. Ved å foreta mange slike optellinger vil man finne at disse tallene følger en bestemt matematisk fordeling som er asymmetrisk og som kalles *Poisson-fordeling*. Og feilen reduseres ved å øke antall tellinger.

Gitt det primære telletallet, vil man matematisk kunne beregne et 95% konfidens-intervall for denne tellingen, d.v.s. vi kan angi et intervall hvor det "sanne" tallet vil ligge, med 95% sannsynlighet. Ved lave tellinger er dette konfidensintervallet asymmetrisk omkring telletallet, og kan leses ut av egne tabeller (se f.eks. Tabell 2). Ved høye telletall ( $= n$ ) blir konfidensintervallet tilnærmet symmetrisk (d.v.s. fordelingen nærmer seg en normalfordeling) og kan beregnes ut fra formelen  $n \pm 2 \sqrt{n}$ . M.a.o., har man talt 1.000 celler, er sjansen ca. 95% for at det "sanne" tallet skal ligge mellom  $1000 \pm 2 * \sqrt{1000}$ , eller  $1000 \pm 63$ . Det er her viktig å være oppmerksom på at konfidens-intervallet alltid beregnes ut fra det primære telletall, f.eks. 1000 celler i eksempelet, og ikke det omregnede tall,  $1 \times 10^9$  celler/L. Man ser også at ved å øke  $n$ , vil konfidensintervallet prosentvis utgjøre en stadig mindre del av  $n$ . Man kan altså praktisk talt eliminere de tellestatistiske usikkerhetene ved å benytte svært høye telletall. I praksis har det dog liten hensikt å øke telletallet av leukocytter i en blodprøve fra f.eks. 1.000 (med et 0.95 konfidensintervall på 12.6%) til 10.000 (med et konfidens-intervall på 4%) hvis usikkerheten ved tilmåling av volum, prøvetaking, etc. likevel gir en stor usikkerhet i resultatene.

*En tilfredsstillende karakterisering av en gruppe målinger* må i tillegg til median/gjennomsnitt og konfidensintervall også angi *hvor mange enkeltmålinger* som er foretatt ( $n$ ), og tallene må *benevnes*. F.eks.:  $1.12 (1.00-1.25) \times 10^9$  leukocytter/L (median, 95% konfidensintervall),  $n = 20$ . Konfidensintervallet bestemmer hvor mange "gjeldende sifre" som skal være med i medianverdien. Vi runder av slik at differansen mellom konfidensintervallets grenser bare får *2 gjeldende sifre* (0.25), og skriver 1.12 (1.00-1.25). Følgende angivelse ville gitt et falskt inntrykk av presisjonen:  $1.1224 (1.0015-1.2468) \times 10^9$  (leukocytter)/L.

## SAMMENFATNING:



Lokaliseringsparameter	Angivelse av usikkerhet/spredning	Antall målinger	Benevning
Median	(95%) konfidensintervall ± SEM		
Gjennomsnitt	Interpersentilintervall 2.5 - 97.5 (referanseområdet) 25 - 75 (kvartilintervallet) ± SD	n = ...	SI-systemet

## Samvariasjon

*Høyde og vekt.* Du har lagt merke til at folk varierer i vekt og vil undersøke dette nærmere. Du veier derfor en gruppe studenter, og ikke overraskende finner du stor variasjon. Begavet som du er, antar du at noe av grunnen til variasjonen er at personene har ulik høyde. Hvis du på noen måte kunne korrigere for variasjonen i høyde, så ville variasjonene i vekt, som skyldes ulik grad av fedme e.l., vise seg å ikke være så store. Følgelig både måler og veier du studentene, og resultatene for hver enkelt kan f.eks. være som vist i tabell 3 og figur 1.

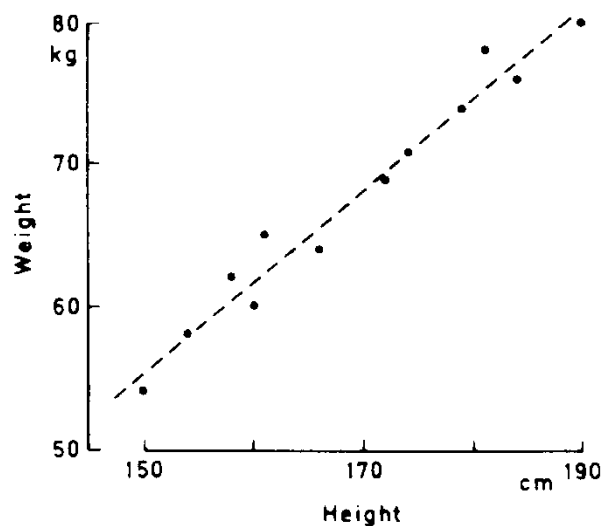
Som ventet finner du en klar sammenheng mellom studentenes høyde og deres vekt.

**Tabell 3**

Målinger av høyde og vekt  
i en gruppe på 12 studenter

Høyde (cm)	Vekt (kg)
150	54
154	58
158	62
160	60
161	65
166	64
172	69
174	71
179	74
181	78
184	76
190	80

**Figur 1**



På figuren er det mulig å trekke en rett linje slik at alle målepunktene ligger enten på eller temmelig nær den. Denne **regresjonslinjen** konstrueres slik at summen av kvadratene av (de vertikale) avstandene fra hvert enkelt punkt til linjen blir så liten som mulig (minste kvadraters metode). Denne summen forteller oss noe om i hvilken grad variasjonen i vekt skyldes andre faktorer enn forskjell i høyde. Med andre ord kan ulik vekt tilskrives 1) variasjon på grunn av at studentene har ulik høyde (illustrert ved den rette linjen), og 2) variasjon av andre grunner (illustrert ved hvert enkelt punkts avvik fra denne linjen). Hvis alle punktene lå på linjen, ville det bety at variasjonen i høyde kunne forklare all vektvariasjon. På den andre siden, kunne vi tenke oss at det var så vanskelig å tilpasse en rett linje til punktmassen at en linje parallell med x-aksen ville være like bra som noen annen. Da ville punktenes avvik fra den rette linjen være den



samme som den opprinnelige variasjonen (beskrevet som avvik fra en middelvei). Det vil si, det er ingen sammenheng mellom høyde og vekt.

I statistikken uttrykkes ofte variasjon ved hjelp av en kvadratsum (k.s.). Den beregnes her ved å legge sammen kvadratet av forskjellen mellom hver enkelt observasjon ( $x_i$ ) og gjennomsnittsverdien ( $\bar{x}$ ). Variansen ( $\text{var } x$ ) er da den gjennomsnittlige kvadratsummen, og standardavviket ( $SD\ x$ ) er kvadratrotten av variansen igjen,  $SD\ x = \sqrt{\text{var } x}$ . Hvis vi ser på variasjonen i vekt ( $y$ ) i vårt materiale og beregner k.s. får vi 773 ("total k.s."). Om vi nå konstruerer regresjonslinjen og beregner k.s. som summen av kvadratavvik fra denne linjen, får vi bare 27 ("residual k.s."). (Denne linjen er jo, som nevnt over, nettopp konstruert ved å gjøre denne summen så liten som mulig.) Forskjellen mellom total k.s. og residual k.s. ( $773 - 27 = 746$ ) blir kalt k.s. på regresjonen. Vi kan få et tallmessig uttrykk for samvariasjonen mellom  $y$  og  $x$  (vekt og høyde), ved å beregne forholdet mellom den siste k.s. og total k.s.. Altså:  $k.s. \text{ på regresjonen} / \text{total k.s.} = r^2 (= 746 / 773 = 0,965)$ .

Disse betraktninger blir i statistikken brukt i to sammenhenger. For det første kan vi beskrive en mulig lineær samvariasjon mellom  $x$  (uavhengig variabel) og  $y$  (avhengig variabel) ved å konstruere en regresjonslinje, eller mer presist estimere parametrene  $a$  og  $b$  i likningen  $y = ax + b$ . Det er også mulig å estimere standard avvik og konfidens-intervall til disse parameterestimaterne. Ved en slik **regresjonsanalyse** antar vi 1) en lineær samvariasjon mellom  $x$  og  $y$ , og 2) normalfordeling av  $y$  verdiene om regresjonslinjen. Det er verdt å merke seg at dersom vi bytter om den avhengige og uavhengige variabel vil vi få andre estimater av  $a$  og  $b$ . Regresjonen av vekt på høyde gir altså en annen regresjonslinje enn regresjonen av høyde på vekt. Gitt at det er en sammenheng mellom  $x$  og  $y$ , vil stigningskoeffisienten på regresjonslinjen ( $a$ ) angi hvordan denne sammenhengen er.

For det andre kan vi rette oppmerksomheten mot det gjensidige forholdet mellom de to variablene. **Korrelasjonskoeffisienten**,  $r$  (se  $r^2$  over) er et mål på graden av sam-variasjon mellom de to variablene. Den kan variere mellom  $+1$  og  $-1$ , slik at  $+1$  betyr fullstendig positiv korrelasjon,  $0$  ingen korrelasjon og  $-1$  fullstendig negativ korrelasjon. Det siste betyr at alle punktene faller på en rett synkende linje ( $a < 0$ ), slik at  $y$  faller når  $x$  stiger. I vårt eksempel med høyde og vekt kan vi beregne korrelasjonskoeffisienten ,  
 $r = \sqrt{0,965} = 0,983$ . En  $r$ -verdi som er så nær  $1$ , viser en sterk samvariasjon mellom høyde og vekt.

Før man gjør regresjons- eller korrelasjonsanalyse, kan det være fornuftig å plote observasjonene inn i en  $x,y$ -graf (som i fig. 1) ("scatterplot"). Man kan da få et godt visuelt inntrykk av om og evt. hva slags sammenheng det er mellom de to variablene. Dersom sammenhengen ikke er lineær, men kanskje heller beskrives av f. eks. en sigmoid kurve, må man bruke andre metoder til å avgjøre graden av samvariasjon.

**Samvariasjon ved sammenlikning av metoder.** På kurset ble tidligere hemostase-endringer etter inntak av acetylsalicylsyre målt med to forskjellige metoder – *Ivy* (en blødningstest: hvor lenge blør et standardisert snitt i underarmen?) og *Cephotest* (= APPT) . Vi kan ønske å finne ut om det er noen samvariasjon mellom disse metodene og derfor foreta en korrelasjonsanalyse av samhørende «Før minus etter»-verdiene . Ser det ut som om Ivy- og Cepho-testene måler de samme sidene ved hemostasemekanismene ?

Ved å gjøre en *regresjonsanalyse* på de to gruppene av måledata for Cephotest, bestemt på to ulike måter (automatisk og manuelt), kunne vi ha sammenliknet de to metodene og funnet ut om de ga identiske resultater. En regresjonlinje som går gjennom origo og har stigningskoeffisient 1 ("*identitetslinjen*"), ville vise at det ikke er noen systematisk forskjell mellom de to, mens en stigningskoeffisient forskjellig fra 1 eller et intercept forskjellig fra 0 kan vise at den ene måten (metoden) systematisk gir høyere verdier enn den andre. En *korrelasjonskoeffisient* nær 1 vil også indikere at det er godt samsvar mellom de to metodene (men gir ingen informasjon om systematisk avvik, slik som regresjonslinjen gjør).



**TABELL 2**








**Differensialtelling:** øvre og nedre 95% konfidensintervall-grenser for celler av én bestemt type i blanding med andre celler, forutsatt at a% av denne typen celler er funnet blant n talte celler totalt. Tallene angir prosentverdier.


n				
a	100	200	500	1000
0	0 - 4	0 - 2	0 - 1	0 - 1
1	0 - 6	0 - 4	0 - 3	0 - 2
2	0 - 8	0 - 6	0 - 4	1 - 4
3	0 - 9	1 - 7	1 - 5	2 - 5
4	1 - 10	1 - 8	2 - 7	2 - 6
5	1 - 12	2 - 10	3 - 8	3 - 7
6	2 - 13	3 - 11	4 - 9	4 - 8
7	2 - 14	3 - 12	4 - 10	5 - 9
8	3 - 16	4 - 13	5 - 11	6 - 10
9	4 - 17	5 - 15	6 - 12	7 - 11
10	4 - 18	6 - 16	7 - 14	8 - 13
15	8 - 24	10 - 21	12 - 19	12 - 18
20	12 - 30	14 - 27	16 - 24	17 - 23
25	16 - 35	19 - 32	21 - 30	22 - 28
30	21 - 40	23 - 37	26 - 35	27 - 33
35	25 - 46	28 - 43	30 - 40	32 - 39
40	30 - 51	33 - 48	35 - 45	36 - 44
45	35 - 56	38 - 53	40 - 50	41 - 49
50	39 - 61	42 - 58	45 - 55	46 - 54

## Uttrykk og Utstyr

- Blodlegeme: Erytrocytter (røde blodlegemer eller RBC), Leukocyter (hvite blodlegemer eller WBC) og Trombocytter (blodplater)
- Plasma: Fullblod minus blodlegemer
- Serum: Plasma minus fibrinogen og koagulasjonsfaktorer.
- EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) : Brukes som antikoagulant fordi den binder  $\text{Ca}^{2+}$  meget effektivt og hemmer på den måten koagulasjon. Skal brukes på blodkurset til alle konsentrasjonsmålinger, og til å lage utstryk.
- Natriumcitrat: Antikoagulant som EDTA, men viker ikke så sterkt på bindingen av  $\text{Ca}^{2+}$ , ett citration binder ett Ca-ion. Skal brukes på blodkurs dag 2, til APTT, en koagulasjonstest, og Dag 3 til senkningsreaksjonen.
- Heparin: Naturlig forekommende antikoagulant som virker på flere trinn i koagulasjonsprosessen. Heparin aktiverer anti-Thrombin III som hindrer koagulasjonskaskaden. Irreversibel prosess. Heparin produseres av basofile granulocytter og mastceller.

### Oversikt over noen fargekoder for vacutainer-rør og tilsetninger:

Rørtype	Tilsetning	Kork farge
Rør uten tilsetning	Ingen (brukes f.eks til CSF)	Hvit 
Koagulasjonsrør	Natrium-citrat 3,2% eller Natrium-citrat 3,8%	Lyseblå 
Serum rør	Koagulasjonsaktivator	Rød 
Heparin rør	Litium-heparin, Natrium-heparin, Ammonium-heparin eller Litium-heparin og separasjonsgel	Grønn 
EDTA rør, hematologi	EDTA-K2 eller EDTA-K3	Lilla 
Glukose rør	EDTA og Natrium-fluorid eller Natrium-heparin og Natrium-fluorid (og andre tilsetninger)	Grå 
Blodtypingsrør	ACD-A, ACD-B, CPDA	Gul  (tabell fortsetter neste side)

<b>Senkningsrør</b>	Natrium-citrat 3,2%	<b>Sort</b> 
---------------------	---------------------	---

- Kyvettene dere skal bruke til **Hemoglobin-måling** finnes i boksene som vist på bildet:



- **Vacutainer-holdere** ser slik ut:



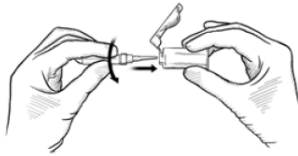
Dere må selv montere kanylen.

## Kortfattet brukerveiledning

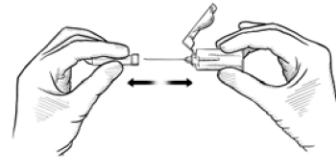
### VACUETTE® Sikkerhetsrørholder QUICKSHIELD



Fjern det grå dekselet fra ventildelen av kanylen (vri og dra).



Sett ventildelen på kanylen loddrett inn i rørholderen slik at den sorte el. hvite prikken vender oppover og beskyttelsesskjoldet på holderen vender til den siden man ønsker å ha det under prøvetakingen. Skru kanylen inn i rørholderen. Kontroller at kanylen er godt festet slik at den ikke løsner under bruk.



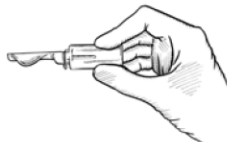
Trekk av beskyttelseshylsen på kanylen.



Utfør venepunksjon.



Press beskyttelsesskjoldet over kanylen med tommel eller pekefinger umiddelbart etter at kanylen er trukket ut av åren.



Beskyttelsesskjoldet låses fast over kanylen med et hørbart "klikk".



Kast rørholderen med kanyle i en dertil egnet beholder.

**SPØRSMÅL som bør kunne besvares etter alle kursdagene (inkludert oppsummeringen) er over.**

**Dag 1.**

1. Nevn generelle feilkilder for hemoglobinmåling:
2. Se på statistikken over kullets resultater fra dag 1. Hva sier henholdsvis konfidensintervallene og kvartilintervallene om målingers pålitelighet ?
3. Hvordan beregnes MCV, og hvilken betydning har verdien?
4. Hva kan en høy retikulocytprosent tyde på?

**Dag 2.**

5. Beregn hemokonsentreringen (mL minsket blodvolum) i løpet av sykkelarbeidet på dag 2. Bruk medianverdien for EVF-forandringen (kullets resultater), anta at totalt blodvolum var 5L før syklingen, EVF før arbeid er gitt av medianen fra dag 1, de røde blodcellene var uforandret i antall og volum i sirkulasjonen i løpet av syklingen.
6. Hva er årsaken til hemokonsentreringen?
7. Hvilke leukocyt-konsentrasjoner forandrer seg prosentvis mest like etter syklingen? Tre timer etter løpsøvelsen? Hva kan årsakene tenkes å være ?
8. Hvilken klinisk situasjon kan leukocyt-resultatene (i) like etter kortvarig sykling - og i enda høyere grad - (ii) 3 timer etter løpet minne om?
9. Hva tester henholdsvis APTT og D-dimer?
10. Angi kjente og erfarte feilkilder for APTT. Kryss av de feilkildene som var mest aktuelle for dere.
11. Hvordan påvirkes koagulasjonstiden av hardt fysisk arbeid eller stress?
12. Hvorfor brukes det rør med Na-citrat som antikoagulant til koagulasjonstester?

**Dag 3.**

13. Hvordan påvirkes SR av a) nedsatt erytropoiese b) flere RBC enn normalt (polycytemi) c) økt plasmakonsentrasjon av fibrinogen?

14. En av pasientundersøkelsene fra dag 3 ga følgende tabellresultat:

Hgb g/100 mL	EVF	Re-tik. %	Leuko-cytter 10 <sup>9</sup> /L	Seg. nøy-tro. (%)	Stav nøy-tro. (%)	Lymf (%)	Mono (%)	Eos (%)	Annet (%)	Trom-boc.	SR mm/t	Blod i av-før.
10,2	0,33	3,8	5,3	51	2	43	3	1	0	Norm.	40	+
	0,32		4,9	53	1	42	4	0	0	Norm.		+
	0,32			51	2	41	4	2	0	Norm.		

Gruppen fant ut at det var sannsynlig at prøven kom fra pasient nr 9. De hadde også vurdert pasient nr 2. Hva er begrunnelsen?