

PRAKTISK KURS I HEMATOLOGI

3. SEMESTER

(Revidert August -14. Evt. feil meldes til A. Maghazachi,
e-post azzam.maghazachi@medisin.uio.no)

INNHOLDSFORTEGNELSE

OPPLYSNINGER OM LABORATORIEKURSET OG KURSHEFTET	s. 3
BLODETS FYSIOLOGI	s. 4
PROGRAM FOR KURSØVELSENE	s. 7
BLODKURSETS METODEBESKRIVELSER	s. 8
APENDIX:	s. 38
SPØRSMÅL SOM BØR KUNNE BESVARES ETTER KURSET	s. 45

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.

Første kursdag er obligatorisk, derfor starter kursdagen med opprop.

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. De som kommer for sent må melde i fra etter gjennomgang.

Studentene oppfordres til å føre og levere inn *rapportskjema* over alle øvelsene, og innlevering på dag 1 er obligatorisk. De som får 3 godkjente rapporter kan bestille attestasjon av opplæringen i hematologiske teknikker. *Rapportskjema* innleveres så snart alle analysedata foreligger (innleveringskasset i kurssalen/ postkasse utenfor). Ikke godkjente skjema vil bli tilbakelevert raskt for retting; godkjente skjema tilbakeleveres så snart vi har notert verdiene til statistikken. 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.

Det hender at rapportskjemaer forsvinner; *ta vare på en kladd eller kopi.*

Retterne vil kontrollere at resultatene finnes, men vil bare for de diagnostiske blodanalyser (3. dag av "blodkurs") la være å godkjenne rapporten p.g.a. upresise verdier. Dårlig besvarte spørsmål er derimot grunn til å refusere rapportskjemaet.

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 feilkilder.

Det er lagt opp til at grupper à 3 studenter skal utføre alle øvelsene. Unntak fra gruppestørrelse må også følges av flere datainnsamlinger (f.eks. flere differensialtelling) på dag 2 og 3 dersom dere vil ha godkjent rapport.

Hver *student* leverer inn rapportskjema for dag 1, de andre dagene er det gruppevis innlevering. Rapportskjemaene finnes i kursheftet, og ekstra skjemaer legges frem på kurssalen.

Tredje kursdag må rapportskjema med data og forslag til diagnose forevises kursledelsen i løpet av kursdagen. Godkjennelse forutsetter riktig "blod-diagnose", og denne må være underskrevet før dere forlater salen dag 3. Deretter legges rapportskjemaet i innleveringskassetten på kurssalen, som de andre dagene.

Skjemaene 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, er bl.a. 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 laboratievaner*. Unngå blodsøl; behandle det som om det var avføring! Unngå stikkskader! Fokuser på oppgaven når dere håndterer kanyler eller glassutstyr med blod.

Følgende klipp fra "Instruks for arbeid med biologisk materiale" som gjelder for et rutinelaboratorie (IK-område Inst. 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 el. 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% hypokloritt 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 bygning for preklinisk medisin 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.

Kapillærbloodprøver 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. 11.

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 ikke bort før skifte av glass, men før nålen trekkes ut.* Nålen trekkes ut når blodtakingen er avsluttet, innstikk-stedet komprimeres (helst flere minutter) med en vattedd, 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.

Ettermiddagene når kurssalen er åpen, kan benyttes til å ta igjen det forsømte p.g.a. sykefravær e.l. for å kvalifisere til kursbevis.

Som nevnt *må kursheftet studeres nøye før hver kursdag!* Gjennomgåelsen før 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 benken 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 på fremsatt studentblod (NB! 1 analyse per student, sammenlign med de andre på laget).
- Elektronisk telling av røde blodceller og Hematokrit-måling på hver students eget blod. Dobbeltprøver.
- Retikulocyt-telling på vitalfarget utstryk. Trippeltelling (dvs. én telling per student sammenlign med de andre på laget). Bruk fremsatt veneblod, farg med vitalfarge og lag utstryk og tell minst 200 celler. Hos en frisk person vil du da se 1-3 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. Gjør dere selv tjenesten med å finne en på laget med enkle vener.

PBL 7-12: En student per 3-mannslag skal løpe 1 time med høy intensitet (evt. på ski om vinteren). Veneblodprøver og samtidig pulstelling på 2 tidspunkter, i hvilesituasjon (ved kursstart) og 2,5-3 timer etter løpet (ca. kl. 15:00) (se s. 20).

PBL 1-6 og 13-18: En student per 3-mannslag skal gi blod i hvilesituasjon, sykle intenst i 5 min og deretter gi en ny blodprøve umiddelbart etter syklingen;

Alle kursparti gjennomgår:

- Måling av leukocyt-konsentrasjon før og etter fysisk arbeid (NB! dobbeltprøver per lag).
- Måling av hemoglobin før og etter fysisk arbeid. (Enkeltprøve.)

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

- Hemostase-test. APTT. (1 analyse per student på laget før trening + en 1 analyse per student på laget etter trening)
- Hematokrit. (Totalt 6 målinger ved 3-mannslag, 8 målinger på 4-mannslag)
- Differensialtelling av leukocytter i farget utstryk. Lag og tell 1 utstryk pr student på laget før arbeid, og 1 etter. (Totalt 6 utstryk for 3-mannslag, 8 utstryk for 4-mannslag)
- Hemostase-test. APTT. (1 analyse per student på laget før trening + en 1 analyse per student på laget etter trening)

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 (Enkeltprøve).

4. dag:

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

BLODKURSETS METODEBESKRIVELSER

	SIDE
Blodkurs Dag 1	9
HEMOGLOBIN (Dag 1)	9
TELLING AV BLODCELLER (Dag 1 og 2)	13
HEMATOKRIT (Hkt; "Pakket cellevolum", PCV) (Dag 1)	15
RETIKULOCYTT-TELLING (Dag 1)	16
 ARBEIDSFORSØK (Dag 2)	 20
ELEKTRONISK TELLING AV WBC (Dag 2)	21
UTSTRYK OG DIFFERENSIALTELLING (Dag 2)	23
KOAGULASJONSTEST; APTT (Dag 2)	25
 Blodkurs Dag 3	 31
SENKNINGSREAKSJONEN (Dag 3)	31
«DIAGNOSTISKE NØTTER»	33
PÅVISNING AV OKKULT BLOD I FÆCES (Dag 3)	35
 APPENDIX:	 38
USIKKERHETSVURDERING OG MÅLEFEIL	38
Målefeil	39
SAMMENFATNING:	41
Uttrykk og Utstyr	42

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 eller kapillær blodprøvetaking
- Elektronisk telling av røde blodceller
- Måling av hematokrit (PCV, packed cell volume)
- 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 Volum*, 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 Mine studier.

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 B₁₂ etc.). Mange generelle sykdommer, som betennelser og kreft, forårsaker anemi (sekundær anemi), og hemoglobinmåling 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 dråpe blod på plastsiden av en bit benkepapir. Fyll spesialkyvetten helt, 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.

Kolorimeteret (Hemometeret): Vi anvender azid-methemoglobin-metoden, som trolig er den vanligste metoden til hgb-måling i norsk allmennpraksis i dag. Reagensene oppløser (hemolyserer) 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.

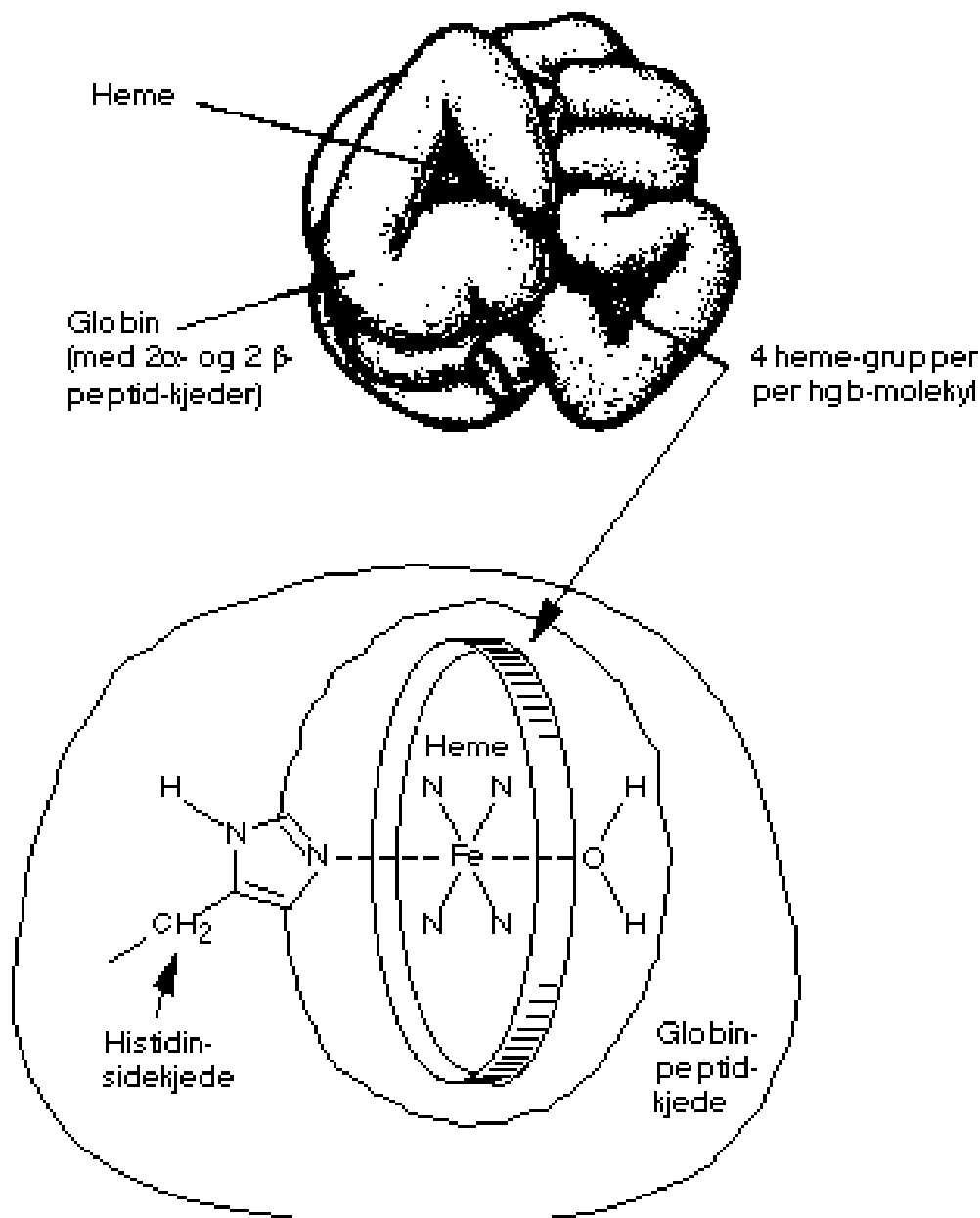
Se også side 11 og 12 for fremgangsmåte ved blodprøvetaking til hemoglobin-måling fra fingertupp.

Referanseområder:

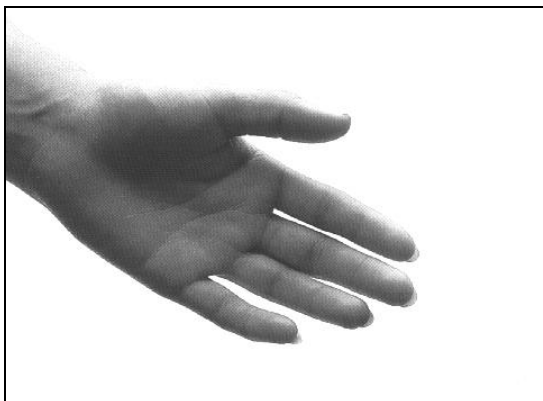
Menn: 13,4 - 17,0 g/100mL; Kvinner: 11,7 - 15,3 g/100mL. (I "riktig gamle dager" var 100% = 14.8 g/100 mL).

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.

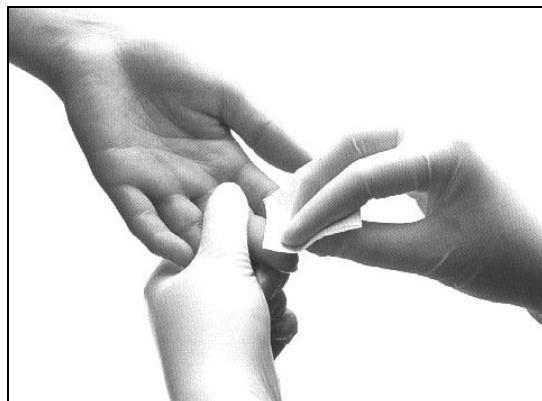
HEMOGLOBIN -MOLEKYLET



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 fingre 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.



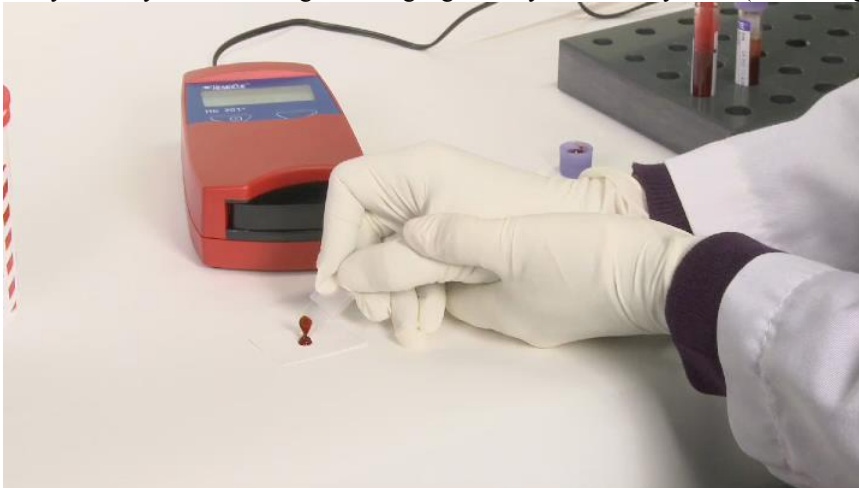
- 5.** Tørk av de to, tre første bloddråpene. Dette stimulerer blodtilførselen. Om nødvendig, press igjen med tommelen til nytt blod trenger frem. Unngå å «melke» fingeren.



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

Hgb-måling med HemoCue

La kyvetten fylles fullstendig med en 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 klarner 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.

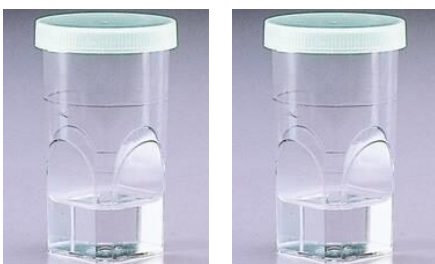
Resultatet kan avleses etter 15-45 sekunder.

Ved 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.)

TELLING AV BLODCELLER (Dag 1 og 2)

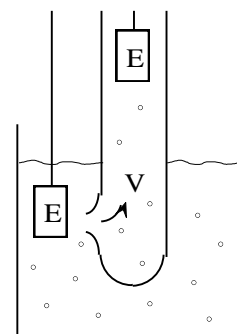
Det er flere grunner til at vi er interessert i å telle blodceller. **Anemi** kan bety nedsatt konsentrasjon av erythrocytter eller nedsatt hemoglobinmengde pr. erythrocytt. Erythrocyttkonsentrasjonen er derfor viktig å kjenne når det gjelder å finne ut hvilken type anemi man står overfor (se spørsmålene lenger bak i kursheftet). I en anemiutredning bruker du antall erythrocytter sammen med hematokritverdien (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 celleduspensjonen mellom 2 elektroder. Celleduspensjonsmediet består av natriumklorid i vann (= elektrolytt), - tilsatt et "såpestoff", f.eks. saponin, som hemolysere erytrocyttene når hvite blodceller skal telles. Den ene elektroden er inne i et glassrør, den andre ute i celleduspensjonen. Strømmen må passere gjennom en kapillæråpning i glassrøret for å nå fra den ene elektroden til den andre. Gjennom denne åpningen (diameter 70-100 μm) suges et visst volum celleduspensjon i løpet av ca. 20 sekunder. Hver gang en partikkel passerer den trange åpningen, endres motstanden i mediet (celleduspensjonen) 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 erytrocytter (RBC): De tre studentene på laget hjelper hverandre med dobbeltprøver fra alle til RBC-tellingen og PCV. Husk at blodet må raskt ut av ikke-antikoagulasjons-behandlet glass (det vil si 20- μL -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 μL blod (engangs-glasspipetter) blandes godt ut i 10 mL saltvann*. 20 μL 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 μL 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 det ber vi dere ta med selv.

Referanseverdi erytrocytter:

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

Kraftigere legems-øvelser kan heve nivået ca. 10% (hemokonsentrasjon), emosjoners innflytelse er uvisst. Man trenger nøyaktige erytrocytt-verdier, fordi de skal benyttes til beregningen av gjennomsnittlig erytrocyttvolum, MCV (se rapportskjemaet).

(*Hint: 1 μL = 1/1000 mL = 1 milliontedels liter (L) = 1×10^{-6} L. 1 mL = 1000 μL = 1 tusendels liter = 1×10^{-3} L. 1L = 1000 mL = 1 000 000 μL . Dersom apparatet teller 2000 celler pr 100 μL , fortynningen er 250 000 ganger, og dere skal regne om fra μL til L blir resultatet 5×10^{12} celler/L.)

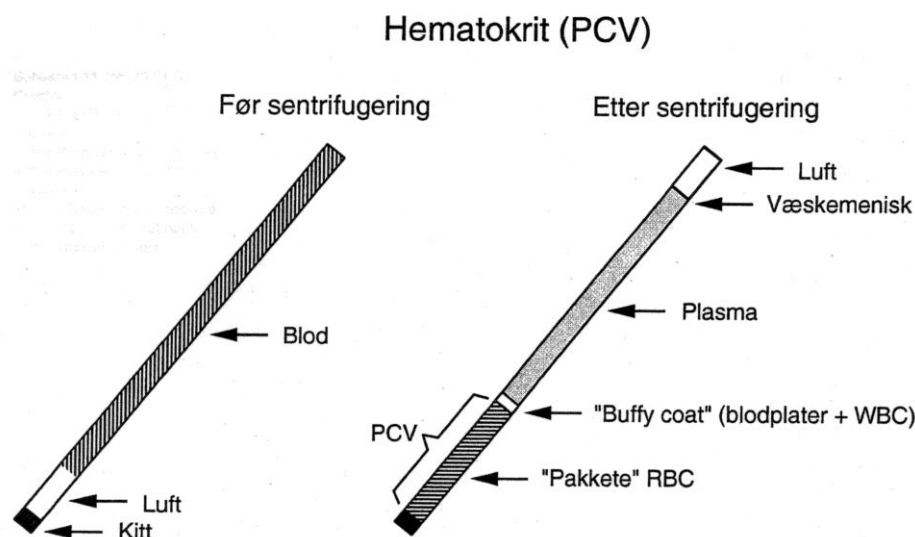
HEMATOKRIT (Hkt; "Pakket cellevolum", PCV) (Dag 1)

Hematokrit 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. Hematokrit følger størrelsen på hemoglobin hos et friskt menneske, men i visse anemier kan størrelsen på de røde blodcellene endres, og hematokrit 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 PCV-verdien. På kurset skal dere bruke en spesialskive for måling av hematokrit. Bruksanvisning ligger fremme ved måleskivene. Den metoden vi bruker på blodkurset er den såkalte referansemetoden for hematokrit, men i praksis blir hematokrit beregnet ut fra målinger på antall erythrocytter pr liter, og den gjennomsnittlige størrelsen på en erythrocytt målt i liter. $PCV = MCV \times (\text{erythrocytter/L})$

Utførelse: Prøvene skal tas fra fingertupp.

De tre studentene hjelper hverandre med dobbeltprøver fra alle til PCV og RBC-tellingen. Fyll 2 stk. 20 μ l rør til RBC-telling først. To ferdig hepariniserte kapillærrør (hematokritrør) fylles 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 hematokrit illustrerer dessuten at blodet består av ca. 40 % blodlegemer og ca. 60 % blodplasma.

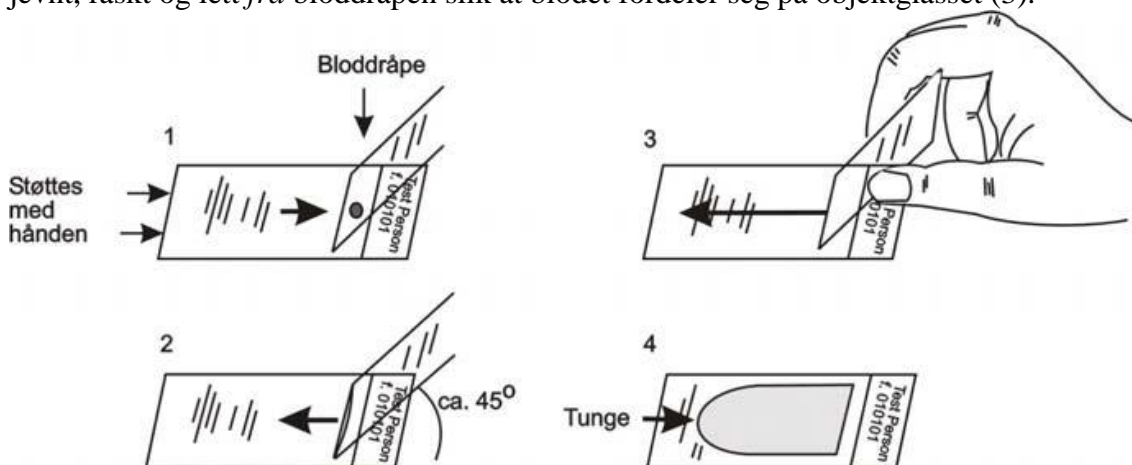
RETIKULOCYTT-TELLING (Dag 1)

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. Tellingen 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.

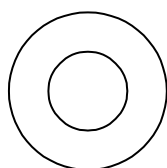
2 dråper fargevæske (briljantkresylblått) og 2 dråper kapillær- eller veneblod blandes i et reagensrør med pasteurpipette. La stå ca. 10 min Bland, med lett knipsing mot glasset eller med pasteurpipette. En *liten* bloddråpe fra blandingen plasseres ved hjelp av f.eks. en pasteurpipette et par cm fra 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 kommer i kontakt med bloddråpen, 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).



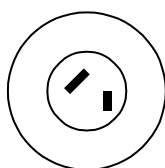
Ved riktig dråpestørrelse skal blodet ende i en "tunge" et par cm fra enden av objektglasset.

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

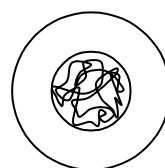
Vift ustryket tørt, med hurtige bevegelser. Innstill først mikroskopet med 40x forstørrelse. Tell retikulocytter v.h.j.a. 100x forstørrelse, bruk immersjonsolje. Oljen tørkes etterpå forsiktig av linsen med bløtt linsepapir fuktet med rensesvæske!



RBC



Retikulocytter



I et område av preparatet hvor erytrocyttene ligger jevnt spredd, telles retikulocytprosenten. Retikulocytter skal inneholde minst 2 distinkt blå korn eller tråder. Det finnes ofte krystalliknende artefakter i erytrocyttene, som kan likne retikulocytter. Artefakt-inklusionene - 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.

Tell minst 200 celler. Skill mellom erytrocytter og retikulocytter. Prøv og vurder størrelsen på retikulocytene i forhold til modne erytrocytter. Regn ut estimatet av retikulocytprosenten.

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

Typiske sykdomstilstander som kan øke retikulocytprosenten er blødningsanemier eller hemolytisk anemi. Så lenge produksjonsstedet i beinmargen har normal funksjon, og det er nok byggestener tilgjengelig, vil blødningsanemier eller vedarende ødeleggelse av erytrocyttene (hemolyse) føre til akselerert erytropoies. Ved beinmargsvikt vil erytropoiesen være nedsatt.

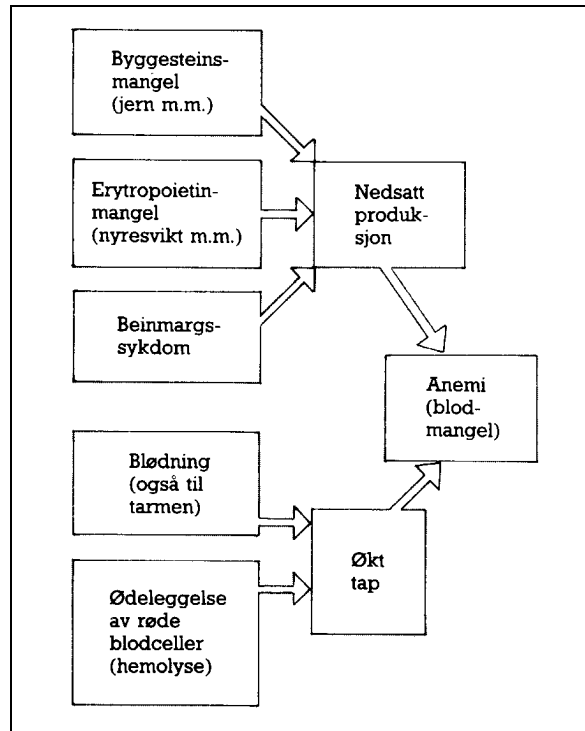
LITT OM ANEMI

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 dannelse av *erythropoietin* (EPO), som bl.a. stimulerer umodne erytroblaste i benmargen til ekstra celledelinger og til å modnes til erytrocytter. Nyrene "sanser" nedsatt oksygentilførsel fra blodet (f.eks. få erytrocytter eller lav oksygentensjon). De utskiller da økte mengder EPO.

I likhet med hemoglobinmengden 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 intercellulærrømmet. 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 hemoglobininnhold 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 ben-margen 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 erythropoiesen 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 cellemembran 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: _____ Prøvedato _____

(Navn/PBL 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 fremst studentblod):

_____ ; _____ & _____ ; median: _____

Resultat av hematokritmålingene (PCV) (dobbeltprøver av eget kapillærblod):

_____ & _____ ; median: _____

Resultat av erytrocyttellingene (dobbeltprøver av eget kapillærblod):

_____ & _____ ; median: _____ /L

Vis ved hjelp av verdiene for PCV 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 på vitalfarget blod:**

(3 replikatverdier!): _____ ; _____ ; _____ %

Medianverdi: _____ %

Venepunksjon på prøvearm utført under veiledning _____

Sign.

Godkjent: _____ Ikke godkjent: _____ Dato: _____ Sign.: _____

Godkjent: _____ Ikke godkjent: _____ Dato: _____ Sign.: _____

NB. Alle rapportskjemaene utfylles in duplo, - ett til kladd og oppbevaring av data og ett til innlevering 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). Blod skal tappes i hvilesituasjon, rett etter aktiviteten for den som sykler eller (ca) 3 timer etter løp. I teorien skal disse situasjonene gi 2 ulike fysiologiske leukocytoser, og det er viktig å få med seg konklusjonen etter resultatene fra hele kullet er samlet inn.

Plasmakoagulasjonen skal vurderes ved hjelp av en koagulasjonsprøve, APTT eller Aktivert partiell tromboplastintid.

- A. **LØPING:** Utføres av kulletts første parti (9/9). 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 hvilepuls. Husk å merk rørene med navn. Gruppen starter med å utføre målinger fra første blodprøve etter gjennomgåelsen, dere passer selv på når det har gått 3 timer etter avsluttet løp. Deretter tar dere en ny blodprøve, 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 gruppene som møter 11/9. Start med å ta en venepunksjon (2 rør) i hvilesituasjon av den ene studenten på 3-mannslaget som skal sykle. Først må et vakuurrør med Na-citrat fylles (blå kork), deretter skal et EDTA-rør fylles. Noter samtidig hvilepuls. Studenten skal utføre et hardt arbeid på ergometersykkel 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, 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 vakuumrør og 1 EDTA- (ca. en dråpe) vakuumrør. Tell pulsen samtidig med at blodprøvene tas.

A. Blodprøve og pulstelling før og 3 timer etter løpet.

B. Den neste blodprøven tas på samme måte like etter avsluttet sykling, gjerne ta med prøvetakingsutstyr og en stol til å sette like ved sykkelen, for å unngå forsinkelser. 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. elektronisk telling (s.14 og s.21) og differensial-telling av hvite blodceller. Dessuten tas triplikatprøver fra hver blodprøve til hematokritmåling 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).

Instrumentet er beskrevet under dag 1 (s. 13-14) . 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.

Utførelse:

Telling av leukocytter (WBC): Vi skal undersøke antikoagulert veneblod. Husk! Bland blodet i EDTA-røret godt før uttak. 20 µL blod fortynnes i 10 mL medium med 6 dråper "Zapoglobin" (hemolysierer RBC), som er tilsatt på forhånd. Bland godt og lag dobbeltprøver. Vi bruker samme apparatinnstilling som for telling av RBC, dvs celler pr 100µl. Regn ut antall hvite blodceller pr. L blod. Merk at det ikke er like stor fortykning som for telling av RBC.

Referanseverdier for leukocyttkonsentrasjonen er hos voksne ca. 3,5 - 10,0 x 10⁹/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 øket leukocyttertall, med liknende mekanisme som kroppsarbeidet (økt adrenalin og hjertets minuttvolum). Måltider påvirker trolig ikke leukocyttnivået.

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 fagociterende 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.). Granulocytt-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 immunglobuliner (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 lymfocyttene, 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 erytrocytter. 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.

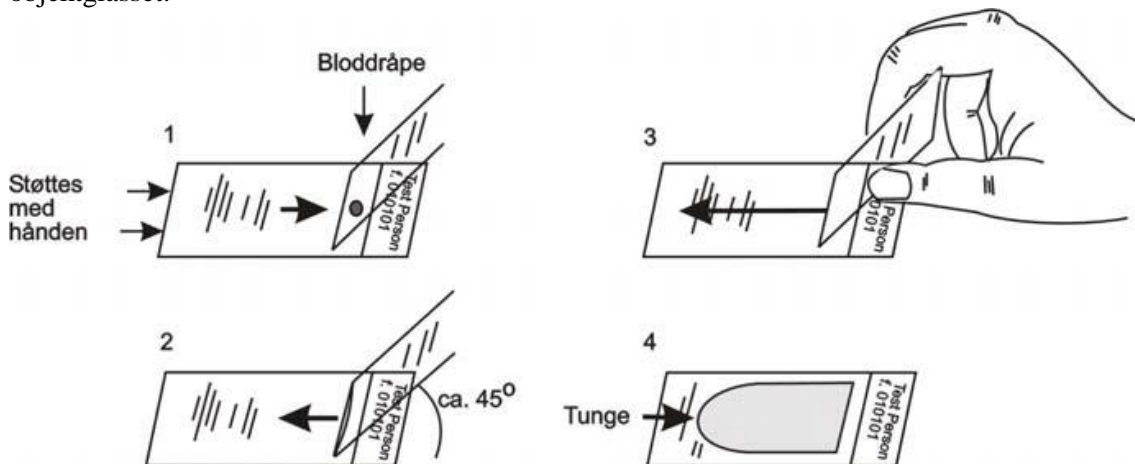
UTSTRYK OG DIFFERENSIALTELLING (Dag 2)

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

<http://www.med-utv.uio.no/dlophp5/mikro/>, 3. semester, Histologi, og velg Blod og Benmarg. Repetér cellenes morfologi før kurset!

Utførelse:

Utstryket skal lages som på dag 1 for retikulocyt-telling, men vi lager utstryket før farging. Bland blodet i EDTA-røret 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 hvert vakuummør og velg ut de tre beste til farging:

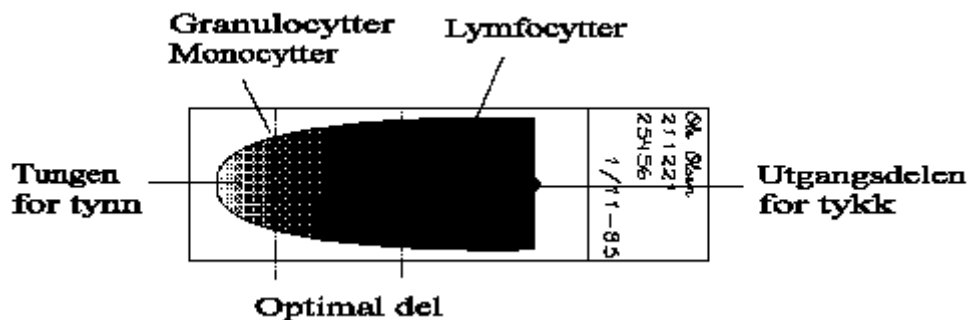
1. Fargeløsningene finnes i separate fargebad, på fargestasjonen.
2. Dypp blodutstryket 5 ganger à 1 sekund i fiksérbadet og la resterende fiksérvæske suges av, dvs. trykk enden av objektglasset mot et håndklepapir.
3. Dypp objektglasset i rødt fargebad, 5 ganger à 1 sekund. La overskudd av fargeløsning 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.
6. Preparatet viftes tørt.

Objektglassene kan farges enkeltvis eller mange samtidig, i holder. Fiksérvæsken 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. NB! Oljen fjernes fra linsen med renevæske når dere er ferdige.

Hver student teller minst 100 hvite blodceller i utstryk av blod tatt før og 100 hvite blodceller tatt etter ergometersykling eller løp.

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 erythrocyttenes 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.

Som en frivillig øvelse kan dere differensialtelle utstryk av eget blod; det bør da telles minst 200 celler. Dette kan evt. gjøres sammen med andre frivillige øvelser og trening i blodprøvetaking en av de dagene det ikke arrangeres kurs, men kurssalen er åpen og instruktør tilgjengelig ved behov.

Referanseverdier for leukocyttypene (WBC x % ved differensialtellingen):

	Relative verdier i %	Absolutte verdier $\times 10^9 / L$
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

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.

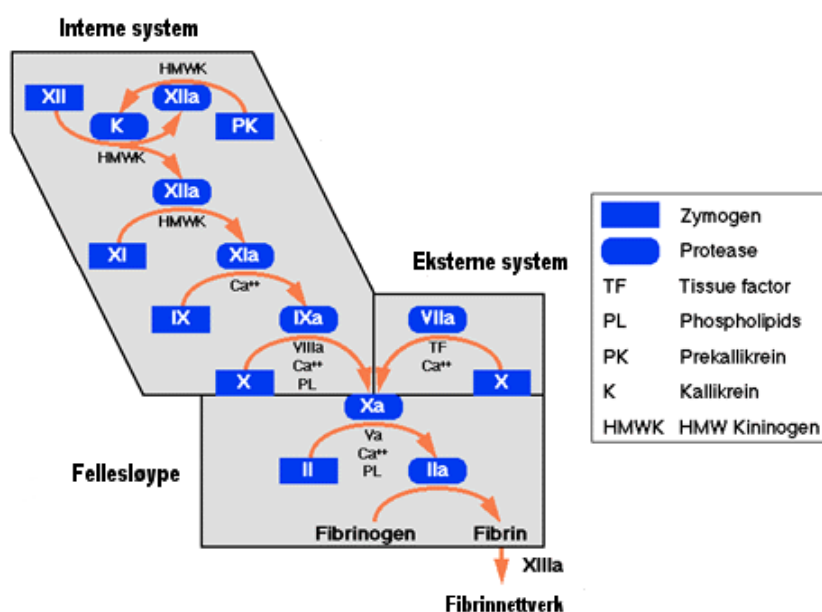
Plasmakoagulasjon: Fibrindannelsen skjer som siste ledd i en kjede kjemiske prosesser. De fleste av disse er av enzymatisk natur. To kjeder av kjemiske prosesser kan hver for seg lede til fibrindannelse. I den ene kjeden, *det interne ("intrinsic") system*, inngår bare koagulasjonsfaktorer som normalt 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 med D-dimer (som ikke skal brukes på dette kurset).

Koagulasjonskaskaden:



HMW – High Molecular Weight

Koaguleringsprosessen omfatter det ekstrinsiske og det intrinsiske system fordi begge er nødvendige for normal hemostase. Aktivert partiell tromboplastintid (APTT) er en test som omfatter følgende plasmakoaguleringsfaktorer: II, V, VIII, IX, X, XI og XII samt fibrinogen. Testen avhenger også av at kontaktfase (kallikrein, høymolekylær kininogen) er tilstede. APTT-Reagenset inneholder buffer, ellaginsyre= kontaktfaseaktivator (som erstatter for den negative overflaten etter translokering) og fosfolipider fra dyrehjerne. Kalsiumioner fra samme kit tilsettes for å starte reaksjonen.

APTT-testen dere skal bruke er følsom for koagulasjonsfaktormangler i det indre koagulasjonssystem og felles reaksjonsvei, men det er først og fremst FVIII- og FIX-mangler som forlenger APTT-tiden hos personer som ikke får K-vitamin antagonist. (Prøven er ufølsom for defekt faktor VII og XIII.) APTT kan også brukes som metode for måling av heparineffekt og for visse typer av fosfolipidantistoffer (Lupus Antikoagulant).

Testprinsipp:

APTT-testen er basert på aktivering av plasmaet vha en kontaktaktivator (ellagsyre – negativt ladet) i nærvær av fosfolipider (cephalin) som en erstatning for blodplatefaktor 3. Etter blanding og inkubering ved rett temperatur tilsettes et overskudd av kalsiumioner. Koaguleringstiden som oppnås vil bestemmes av mengden koaguleringsfaktorer som er til stede i plasmaprøven.

På denne måten vil et underskudd av noen av de involverte faktorene, (eventuelle spesifikke eller uspesifikke intrinsiske systemhemmere i prøven), samt behandling med medikamenter som påvirker syntetiseringen av noen av disse faktorene eller som forbedrer hemmingen av dem (heparin), produsere en økning av koaguleringstiden.

Det er viktig at plasma og reagenser holder **37°C under gjennomføring av testen**. Reagenset må blandes ved vending rett før bruk. Referanseområdet for APTT er satt etter måling på friske ustressede, personer som har vært i ro minst 20 minutter før blodprøvetaking. Det er et godt kjent at APTT reduseres umiddelbart etter hardt fysisk arbeid, og at verdien normaliseres ganske raskt etter anstrengelsen.

Prøvemateriale:

Til APTT brukes blodplatefritt citratplasma. Venøst blod innhentes i vacutainerrør tilsatt 3,2 % natriumcitrat. Bland blod og antikoagulant forsiktig ved hjelp av vending av røret, minst 5 ganger. Sentrifuger de korkede rørene ved romtemperatur i minst 15 minutter ved 2500 rcf. Kast eventuelle prøver med hemolyse. Prøver der det endelige forholdet mellom Na-citrat og prøve ikke er korrekt (ikke nok blod) vil gi feil prøvesvar.

Utførelse av testen:

APTT skal utføres på citratplasma. Merk rørene med navn, og sett dem i stativ fremme på kateteret. Etter sentrifugering skal dere bare bruke det gule plasmaet. Utfør bestemmelse av APTT på "Før"- og "Etter"-plasma – som trippelprøver manuelt, ved vannbad. Jobb nøyaktig, hjelp hverandre med tidtakingen.

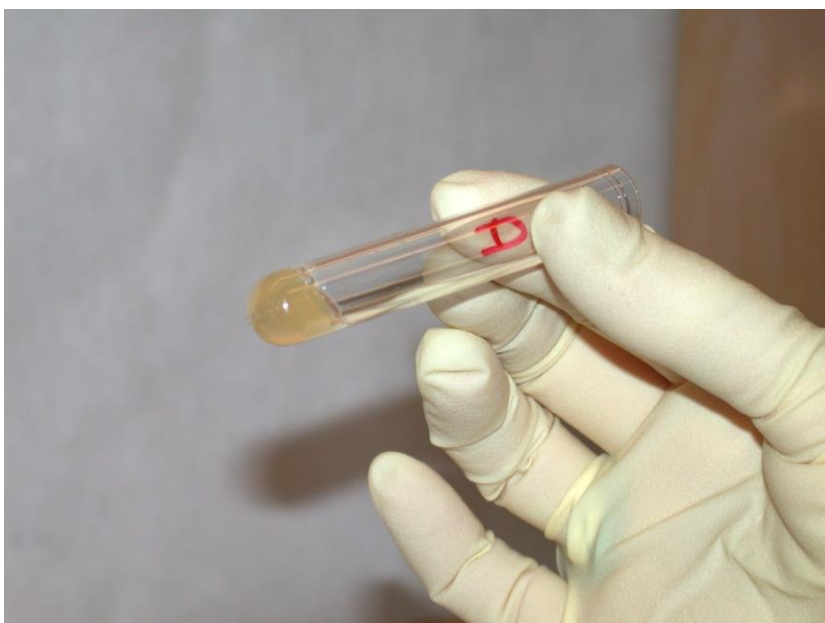
Bland DG-APTT-reagenset ved hjelp av vending før bruk. Pipetteringsnøyaktighet er viktigere for blod (plasma) enn for reagenser, ettersom faktorene vi tester for er tilstede kun i plasmaprøven.

Kalsiumklorid (DG-CaCl₂ 0,025 M) og APTT-reagenset skal preinkuberes ved 37 °C, la blandingen stå i vannbad. Det er viktig å holde prøven i 37 °C etter plasma og reagens er blandet. Når glasset skal opp av vannbadet og "bikkes" på, må du derfor jobbe og observere hurtig, og være rask med å plassere prøverøret i vannbad etter å ha «bikket» på det.

- Pipetter 0,10 mL (=100 μ L) av citratplasma i et plastrør, vha engangsspisser av plast.
- Tilsett 0,10 mL DG-APTT og bland ved å knipse lett på bunnen av røret.
- Inkuber i 3 minutter, ved 37 °C. Plasmaprøvene må ikke forbli ved 37 °C i mer enn 5 minutter!
- Tilsett 0,1 mL kalsiumklorid [0,025 M] mens reagensrøret holdes i 37°C og start en stoppeklokke i samme sekund.

Ca²⁺ i overskudd vil starte koaguleringsprosessen. Observer koaguleringen. Hold plastrøret ned i vannbadet de første 15 sekundene. Deretter tar du opp glasset og bikker det en gang hvert 2.5-3 sekunder til fibrinnett dannes. (Røret må tilbake i vannbad mellom bikingen.) Unngå å riste på røret. Da løser du opp fibrinnett. Dannelsen av fibrinnett observeres som en overgang fra gjennomsiktig, gul væske til en geleaktig og noe hvitere væske. Stopp klokken, noter tiden.

Referanseområde: 25-39 sekunder.



Det krever øvelse å se koagelet. Alle i 3-mannslaget bør utføre manuell APTT.

Til klinisk bruk må hvert laboratorium opprette sitt eget referansespekter 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: B: (kryss av)

Prøvedato: _____

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

B: Sykkelarbeidets intensitet: _____

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

_____**NB.** Hele lagets/gruppens resultater (d.v.s. bl.a. henholdsvis 3+3 diff.tellingsresultater for de 2 blodprøvene) og studentenes navn skal føres inn, og ett rapportskjema leveres pr. lag.**Stud.navn/PBL-gruppe:**

_____	PBL: _____
_____	PBL: _____
_____	PBL: _____

		←————— Differensialtelling (%) —————→										
		Puls (enkelt- telling)	PCV	Hb	Leukoc. kons. (10 ⁹ /l)	Seg.		Stav	Lymfo.	Mono.	Eos.	Baso
						kjern.	kjern.					
Før arbeid												
	Medi- aner:											
Etter arbeid	0 min./ 3h											
	Medi- aner:											

Regn ut v.h.j.a. medianverdiene *forskjellene*, "Etter-minus-før" (evt. med minustegn): NB! For hver **leukocytttype** angis forskjellene i *milliarder celler pr. liter blod*, dvs. kombiner diff.-% og leukocyttkons.:

A/B (Sett sirkel)	Puls	PCV	Hb	Leukoc.kons.	Seg. (10 ⁹ /l)	Stav (10 ⁹ /l)	Lymfo. (10 ⁹ /l)	Mono. (10 ⁹ /l)	Eos. (10 ⁹ /l)
Etter-minus- før-verdier:									

Er erythrocyttenes fargemetning, størrelse og form i blodutstrykene normale? _____

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

B: Tid fra avsluttet sykling til blod renner i første vakutainerrør: ____sek.

Resultater:

	A/B	APTT (sek)		
		Manuelt		
FØR arbeid				
ETTER arbeid	3/0 h			

ETTER-minus-FØR-resultater for forsøkspersonen:

Puls: ____/min.

APTT (bruk medianverdiene fra de manuelle avlesningene): ____ sek.

Husk at differansen evt. kan bli negativ, og markér i tilfelle dette.

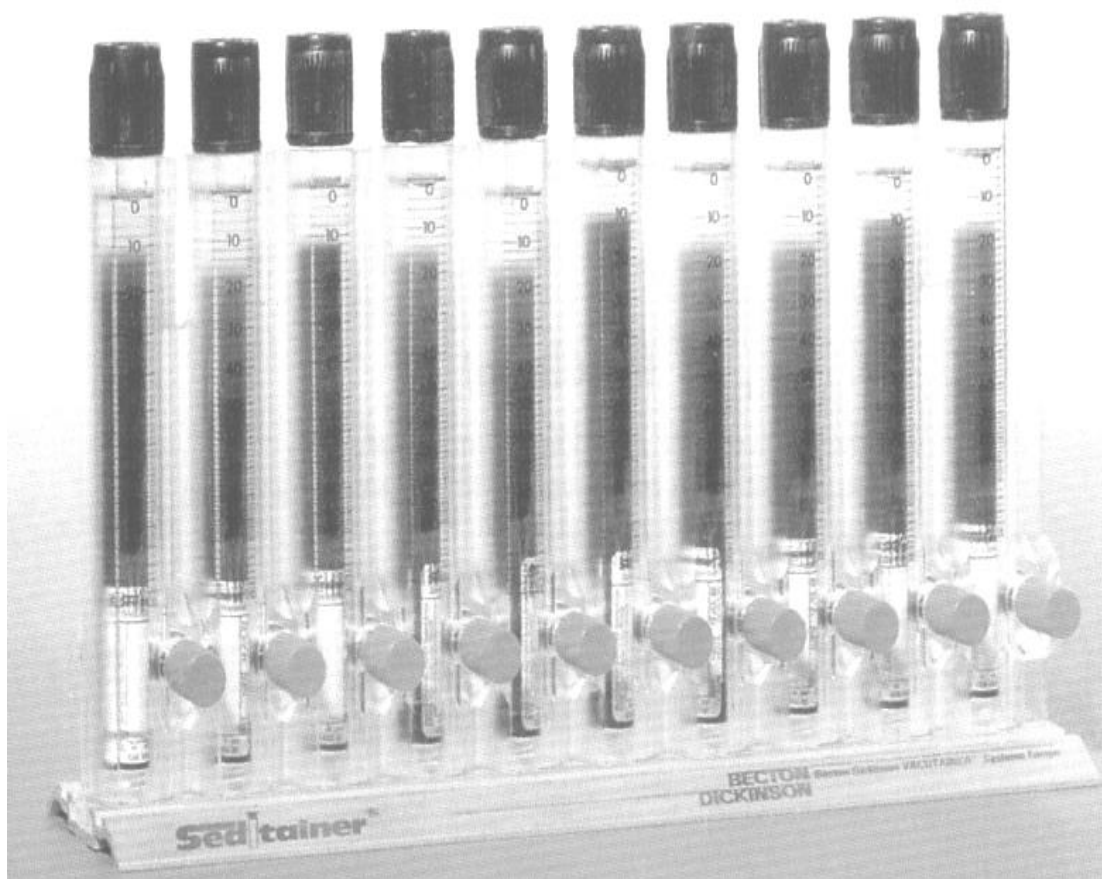
Godkjent: _____ Ikke godkjent: _____ Dato: _____ Sign.: _____

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 α_2 - og γ -globuliner. Størrelse og form på erythrocyttene spiller også en rolle. Små erythrocytter danner lettere pengeruller enn normalt store celler. "Pengerulldannelse" øker også når hematokrit 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 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 snu opp-ned minst 8 x (evt. også romtemperatur-ekvilibrering, om røret har stått i kjøleskap), 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, fortykning av blodet ved for lavt blod/citrat-løsnings-forhold (se tidligere). Ved fortykning av blodet kan både kons. av RBC eller kons. av plasmaproteiner bli lavere enn reelt. 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) hematokritverdien. Gjør dette som en frivillig øvelse - f.eks. ett rør pr. 3-mannslag - og sammenling resultatet sammen med PCV-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 ferdiglagede 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. Var det noen avvikende funn - noe som *ikke* stemte? Skjemaet leveres til en av kursinstruktørene; etter godkjenning legges det i innleveringskassetten. Ikke kast prøven før diagnosen er godkjent!

Undersøkelsen må gjentas dersom svaret er galt og du vil ha kursattest.

1. Frisk, 22 år gammel mannlig medisinstudent.
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 forsstadier 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.

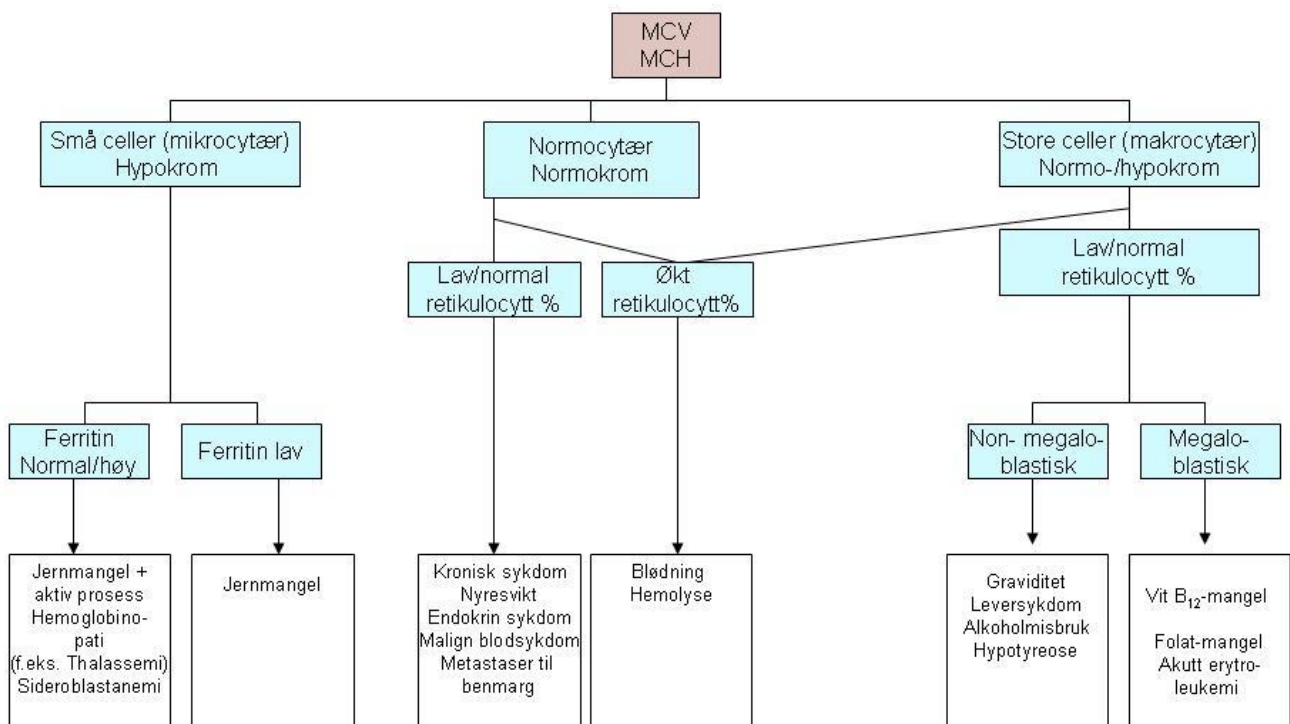
NB: Trippelprøver av PCV og diff.telling; enkeltprøve av hemoglobin, dobbeltp prøve av blod i avføring (2 prøver finnes på hvert utleverte prøvemark) og den elektroniske leukocyt-tellingen: Se rapportskjema for dag 3.

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

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, PCV), og *intensiteten av reparasjonsforsøkene* (retikulocyttdisprosenten, 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 erythrocytt-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 produksjon 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 blodstansnings-funksjon. 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 tykktarm er vanlige 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 beskjeden 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, tetramethyl-benzidin, orto-toluidin eller guajakk) 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 H₂O₂ som oksygendonor. Reagenser med bruksanvisning til de til enhver tid 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 døgningde fæces, eller dersom det er meget 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.

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

1 dråpe tetrametyl-benzidinreagens og 1 dråpe H₂O₂ 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)

Navn på studentene i gruppen:

Prøvedato: _____

Seditainer-(SR)verdier :

_____ PBL-gruppe: _____

_____ PBL-gruppe _____

_____ PBL-gruppe _____

Resultater utlevert blod, etc. en av casene fra side 33 (utfør og angi de replikatanalyser som det er anvist plass til i tabellen):

Blod-prøve-kode-nr.	Hgb g/100 mL	PCV	Re-tik. %	Leuko-cytter $10^9/L$	←—Differensialtelling (%)—→						Trom-boc. *	SR mm/t	Blod i av-før.
					Seg. nøy-tro.	Stav nøy-tro.	Lymf.	Mono.	Eos.	Annet			

* Angi om trombocytallet virker normalt eller nedsatt

Overveielser og diagnoser:

Prøven godkjent: Dato: _____ Sign.: _____

(Ikke kast blodprøven før prøven er godkjent!)

Rapportskjema godkjent: Dato: _____ Sign.: _____

NB! Hvert lag leverer inn ett godkjent rapportskjema. Alle studentenes for- og etternavn må være påført.

APPENDIX:

USIKKERHETSVURDERING OG MÅLEFEIL

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".

Lokalisering. Som lokaliseringsparameter bruker vi *medianen* (i tradisjonell statistikk brukes gjerne den aritmetiske middelværdi i stedet), fordi medianen påvirkes mindre enn middelværdien av "ville verdier". Medianverdien er den tallverdimessige 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.

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.

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.

Variansen, som er SD^2 , er lik det gjennomsnittlige kvadratavviket fra middelverdien (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 middelverdien (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).

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 leverenzymet 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 konfidensintervallets relative bredde eller i medianens 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. Eks.: blodtaking fra kald øreflipp, gal kalibrering av hemoglobin-kolorimeteret, visse typer grove feil (= iaktaker-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).

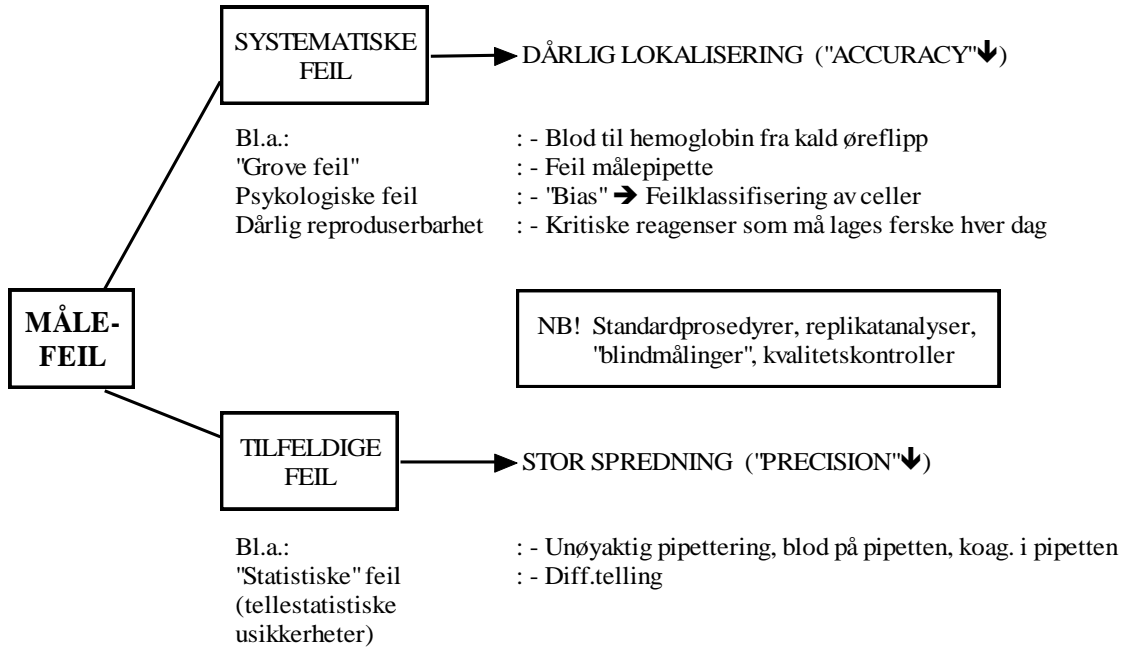
Noen systematiske feil kan man unngå ved å lage seg en *standardprosedyre* for målingen; f.eks. kan man på forhånd bestemme seg for hvilken "mikroskoperingskurs" man skal følge i utstryks-preparatet. Andre systematiske feil kan det være vanskelig å unngå: f.eks. kan man få *dårlig reproduserbarhet* mellom 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 samme dag (og av samme person og på samme måte). Det er klokke 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*.

SAMMENFATNING:











Lokaliserings- parameter	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

Uttrykk og Utstyr

- Blodlegeme: Erytrocytter (røde blodlegemer eller RBC), Leukocyter (hvite blodlegemer eller WBC) og Trombocyter (blodplater)
- Plasma: Fullblod minus blodlegemer
- Serum: Plasma minus fibrinogen
- EDTA (EthyleneDiamineTetraacetic Acid) : Brukes som antikoagulant fordi den binder Ca^{2+} meget effektivt og hemmer på den måten koagulasjon.
- Natriumcitrat: Antikoagulant som EDTA, men viker ikke så sterkt på bindingen av Ca^{2+} , ett citration binder ett Ca-ion.
- Heparin: Antikoagulant som virker på flere trinn i koagulasjonsprosessen. Heparin aktiverer anti-Thrombin III som hindrer koagulasjonskaskaden. Irreversibel prosess.

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)

Senkningsrør	Natrium-citrat 3,2%	Sort 
--------------	---------------------	--

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



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



Dere må selv montere kanylen.

- **Vacutainer-holder uten beskyttelse** (brukes på video for å se bedre, brukes på prøvearm.)

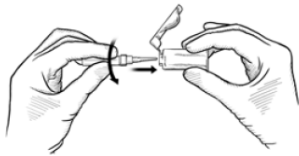


Kortfattet brukerveiledning

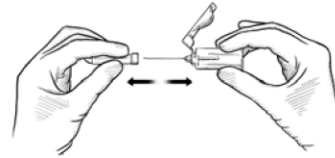
VACUETTE® Sikkerhetsrørholder QUICKSHIELD



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.



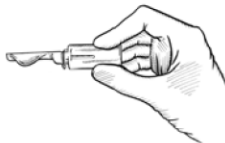
Trekk av beskyttelseshylsen på kanylen.



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.

 med · kjemi

Tlf.: 66 76 49 00 • Fax: 66 79 49 01 • E-post: firmapost@med-kjemi.no

Rev. 03, 11.10.2010

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 PCV-forandringen (kullets resultater), anta at totalt blodvolum var 5L før syklingen, PCV 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 erythropoiese 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	PCV	Retik. %	Leukocytter $10^9/L$	Seg. nøytro. (%)	Stavnøytro. (%)	Lymf (%)	Mono (%)	Eos (%)	Annet (%)	Tromboc.	SR mm/t	Blod i avfør.
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?