

# **PRAKTISK KURS I HEMATOLOGI**

## **3. SEM., Oslo-96**

(Revidert juni -05. Evt. feil meldes til H.B. Benestad,  
e-post [h.b.benestad@medisin.uio.no](mailto:h.b.benestad@medisin.uio.no))

## INNHALDSFORTEGNELSE

OPPLYSNINGER OM LABORATORIEKURSET OG KURSHEFTET	s. 3
BLODETS FYSIOLOGI	s. 4
APENDIX: USIKKERHETSVALDERING, MÅLEFEIL OG LITT STATISTIKK	s. 42
JOURNALARK FOR BLODETS FYSIOLOGI	s. 53

## OPPLYSNINGER OM LABORATORIEKURSET OG KURSHEFTET

Timeplan over kursdagene finnes i semesterboken. *Det forutsettes at studentene har lest den aktuelle del av kursheftet før de møter til selve kurset. Dere bør også ha satt dere inn i instruksjonsprogrammet i blodprøvetaking på PC-stuen:*

<http://www.med.uio.no/ferdighetssenteret/multimedia/Kap/Kap.dcr>

<http://www.med.uio.no/ferdighetssenteret/multimedia/Ven/Ven.dcr>

Studenter som ønsker attestasjon av opplæringen i hematologiske teknikker, f.eks. med tanke på lønnet arbeid som laboratorieassistenter i studietiden, må ha (i) vært til stede på alle 4 kursdagene og (ii) levert inn tilfredsstillende rapportskjemaer. Derfor starter kursdagen med opprop. De som kommer for sent, som bytter kursdag med andre studenter, eller som tar igjen forsømte øvelser på kveldstid, må melde fra om dette til kurslederen. **Første kursdag er obligatorisk.**

Studentene oppfordres til å føre og levere inn *rapportskjema* over alle øvelsene. *Rapportskjema* innleveres så snart alle analysedata foreligger (innleveringskassetten i kurssalen; postkasse utenfor). Ikke godkjente skjema vil bli tilbakelevert raskt for retting; godkjente skjema tilbakeleveres først etter kursgjennomgåelsen.

Frist for innlevering av frivilling *journal* er 2 uker etter kursgjennomgangen for hele kullet. Bare den aktuelle journaldels "svarsider" skal leveres, i en samleperm *påskrevet navn og PBL-parti*. Journalene leveres (og tilbakeleveres) på bord i korridoren utenfor rom 2314 (2 etasjer over disseksjonssalene i DM). Journalene rettes som om de var skriftlige eksamensbesvarelser, og kan derfor gi tilbakemelding om hvordan lærerne ønsker seg formuleringen av fysiologiske resonnementer. Journalen kan leveres inn som et gruppearbeide, og alle oppgavene trenger ikke nødvendigvis være besvart. Det hender at rapportskjemaer og journaler forsvinner; *ta vare på en kladd eller kopi.*

Retterne vil kontrollere at resultatene finnes, men vil bare for de diagnostiske blodanalysers del (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 av de vanligste hematologiske metoder i klinisk medisin, (ii) refleksjon over laboratoriemetoders usikkerhetsfaktorer, og (iii) planlegging og samarbeid i grupper.

Kurset inneholder nesten halvparten av det laboratorierepertoar man mener en interessert almenpraktiker bør beherske ("Tidsskrift for Den norske lægeforening", nr. 16, 1979, s. 858).

Vi ønsker en våken holdning til mulige feilkilder ved analysene og en vurdering av deres størrelse (se Appendix). Øvelse i usikkerhetsvurdering kommer vel med i legepraksis, der denne type vurderinger dessverre ofte blir neglisjert.

Grupper à 3 studenter skal utføre alle øvelsene.

Etter hver kursdag bør hvert 3-mannslag levere inn rapportskjema, men hver *student* leverer inn rapportskjema for dag 1. 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". 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 laboratorievaner*. Unngå blodsøl; behandle det som om det var avføring!

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 laboratoriestyr 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 skylning. 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 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., 4. eller. 5. 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. 10.

Ved *blodprøvetaking fra vene* benytter vi gjerne vakuumsør med EDTA-løsning/pulver (eller citrat- eller heparintilsetning). Fjern den korte hetten fra nålen og skru nålen på plast-holderen. Plassér vakuumsøret i holderen, 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 vakuumsøret med nålen, og søret 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 beholderen (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 vattdott, og armen heves (men bøyes ikke).

Dyktige venepunktører bruker så lite venestase som mulig og opphever den straks nålen er inne i venen. 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 til de forskjellige øvelsene er montert, sammen med en orientering om anvendelsen, på oppslag som henger på kurssalen. Studér disse oppslagene - de sier også hvilke pipetter etc. som kan kastes (i avfallsbeholder) etter engangs- evt. éndags-bruk.

Ettermiddagene når kurssalen er åpen, benyttes ikke bare til å ta igjen det forsømte p.g.a. sykefravær, men også til ekstra *ferdighetstrening* i de forskjellige teknikkene, alt etter behov hos den enkelte student.

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. Kursheftet er laget så detaljert at øvelsene kan gjennomføres uten lærerhjelp, ved hjelp av heftet pluss oppslag på kurssalen.

## DAGSPROGRAM FOR KURSØVELSENE:

Det kan være hensiktsmessig å utføre øvelsene i rekkefølgen som er angitt her. *Utstyret til øvelsene finnes i plastbakk på arbeidsbenken eller på benken vis á vis tavlen.*

Alle øvelser utføres av studenter i tremannslag og som dobbelt-analyse for hver student av hver blodprøve, der intet annet er presisert. (Svarark-skjemaene indikerer også hvilket antall analyser som kreves.)

### 1. dag:

- Hemoglobinkonsentrasjon bestemt med HemoCue på fremsatt studentblod (NB 1 analyse per student).
- Hematokritmåling og elektronisk telling av røde blodceller på hver students eget blod.
- Retikulocyt-telling på vitalfarget utstryk fra utlevert anemisk blod. Trippeltelling (dvs. én telling og ett utstryk fra blod/fargeblandingen per student).

### 2. dag:

**Dagens første kursparti:** En stud. per 3-mannslag skal løpe 1 time med høy intensitet (evt. på ski om vinteren). Veneblodprøver og samtidig pulstelling på 2 tidspunkter, like før løpet og 3 timer etter (ca. kl. 1500) (se s. 21). På  **neste kursparti**  skal én stud. per 3-m.-lag sykle intenst i 5 min (se s. 21); forøvrig som for første kursparti:

- Måling av leukocyt-konsentrasjon (NB dobbeltprøver per lag).

Forøvrig foretas én analyse av hver student av hver av de to blodprøvene:

- Hematokrit.
- Differensialtelling av leukocytter i farget utstryk.

### 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 (NB enkeltprøve).

### 4. dag:

Hemostase-tester:

- Cephotest.
- Undersøkelse av fibrinolyse.
- Frivillig: TT.

Hovedoppgaven denne dagen går ut på å studere mulige effekter av kort og hard kroppsanstrengelse på blodkoagulasjonen (Cephotest) og fibrinolysen. To 3-mannslag skal arbeide sammen om dette. En av de 6 studentene skal sykle hardt (jf. øvelsen dag 2) i 5 min. Det tas veneblodprøver (vakutainere med citrat-antikoagulert blod) til Cephotest og undersøkelse av fibrinolyse (D-dimer-test) av syklisten før (2 vakutainere) og etter (2 vakutainere) syklingen. 3-mannslag I foretar Cephotesten, 3-mannslag II D-dimer-analysene. Planlegg på forhånd hvem som skal arbeide sammen, og hvem som skal sykle! Lagene orienterer hverandre om prosedyrene og om resultatene. I den grad det blir tid til det, kan studentene bestemme Cephotest-tiden på eget blod.

### 5. dag:

Gjennomgåelse og kursevaluering i auditoriet. Kursheftets Appendix (Usikkerhetsvurdering, målefeil og litt statistikk) må være lest senest til denne dagen, helst tidligere!

**BLODKURSETS METODEBESKRIVELSER**

	SIDE
Hemoglobin (hgb)	9
Hematokrit (PCV)	13
Telling av blodceller	16
Retikuloctytt-telling	17
Differensialtelling av hvite blodceller	21
Senkningsreaksjonen (SR)	25
Blod i fæces	29
Cephotest	35
TT-test	36
Fibrinolyse	38



## HEMOGLOBIN (1. dag)

Hemoglobin (hgb) 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, 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 hemoglobinmåling er blant de vanligste laboratorie-prøver i praksis.

### Utførelse:

**Kolorimeteret (Hemometeret):** Vi skal anvende 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.

### Hemoglobinmåling med Hemocue.

Fremgangsmåten er forklart punktvis og illustrert på s. 12. Punktvis bruksanvisning er hengt opp ved måleapparatene.

Hvert 3-mannslag tar en trippelprøve av fremsatt studentblod. Resultatene noteres i rapportskjemaet, sammen med alle de andre resultatene.

### Referanseområder:

Menn: 12.5-17.0 g/100 mL; kvinner: 11.5-16.0 g/100 mL. (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.

Det er viktig at blodprøvene tas fra snitt som blør fritt, og at de første 1-2 dråpene kasseres. Dette gjelder også ved telling av røde og hvite blodceller etc.

## *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.

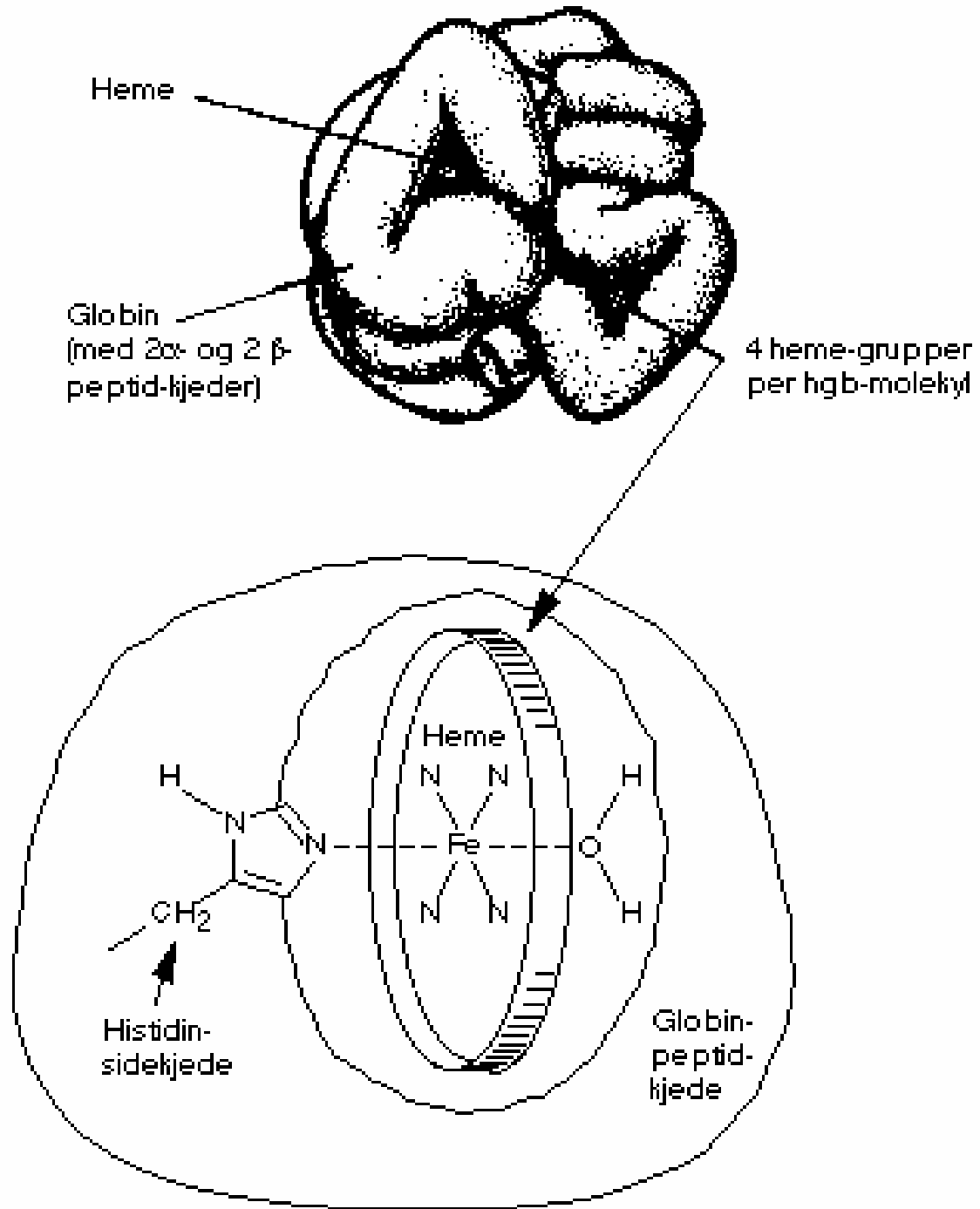


**5.** Tørk av de to, tre første bloddråpene. Dette stimulerer blodtilførselen. Om nødvendig, press igjen med tommelen til nytt blod trenger frem. Unngå å «melke» fingeren.

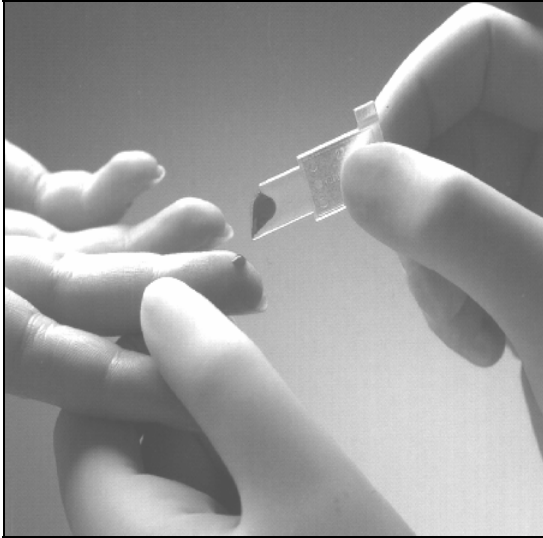


**6.** Pass på at bloddråpen er stor nok til å fylle kyvetten helt. Sett kyvettespissen mot midten av bloddråpen.

## HEMOGLOBIN -MOLEKYLET



## *Hgb-måling med HemoCue*

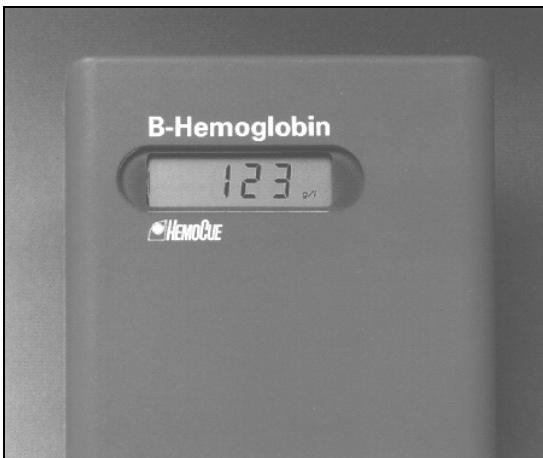


La kyvetten fylles fullstendig med en gang. Etterfyll aldri en kyvette.

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



Sett mikrokyvetten inn i fotometeret. Sett løkket på kyvetteboksen. Prøven skal analyseres umiddelbart, senest 10 minutter etter at kyvetten er fylt.



Resultatet kan avleses etter 15-45 sekunder. 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.

## HEMATOKRIT (Hkt; "Pakket cellevolum", PCV) (1. DAG)

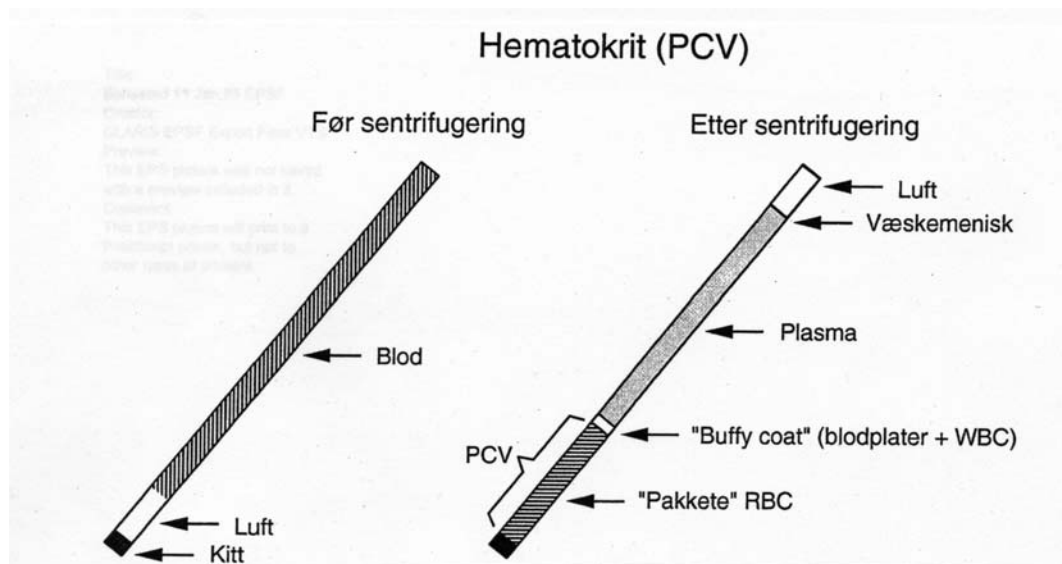
Hematokrit er den volumfraksjon av fullblod som utgjøres av røde blodceller. Denne måles etter kraftig sentrifugering av heparinisert blod. Volumet av de tettpakkede røde blodceller måles da i forhold til det totale volum. Metoden er meget nøyaktig og presis, fordi blodmengden og evt. luftbobler i rørene ikke påvirker PCV-verdien.

### Utførelse:

De tre studentene hjelper hverandre med dobbeltprøver fra hverandre til PCV og RBC-tellingen. Husk at blodet må raskt ut av ikke-antikoagulasjons-behandlet glass (det vil her bare si 20- $\mu$ L-pipetten til telling av antall RBC); etterpå har man god tid på seg.

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). Sentrifugeres i 5 min med 10.000 r.p.m. i særskilt sentrifuge; NB 2 lokk og kittenden ut mot gummiringen!). Avlesningen skjer ved hjelp av linjal (mm lengde av erythrocytt-søyle divideres med mm lengde av hele væskesøylen) eller på en måleskive (som kan være en utfordring til den teknisk innsiktsfulle student!).

*Referanseverdier:* Menn 0.39-0.50. Kvinner 0.35-0.46.



## TELLING AV BLODCELLER (1. og 2. DAG)

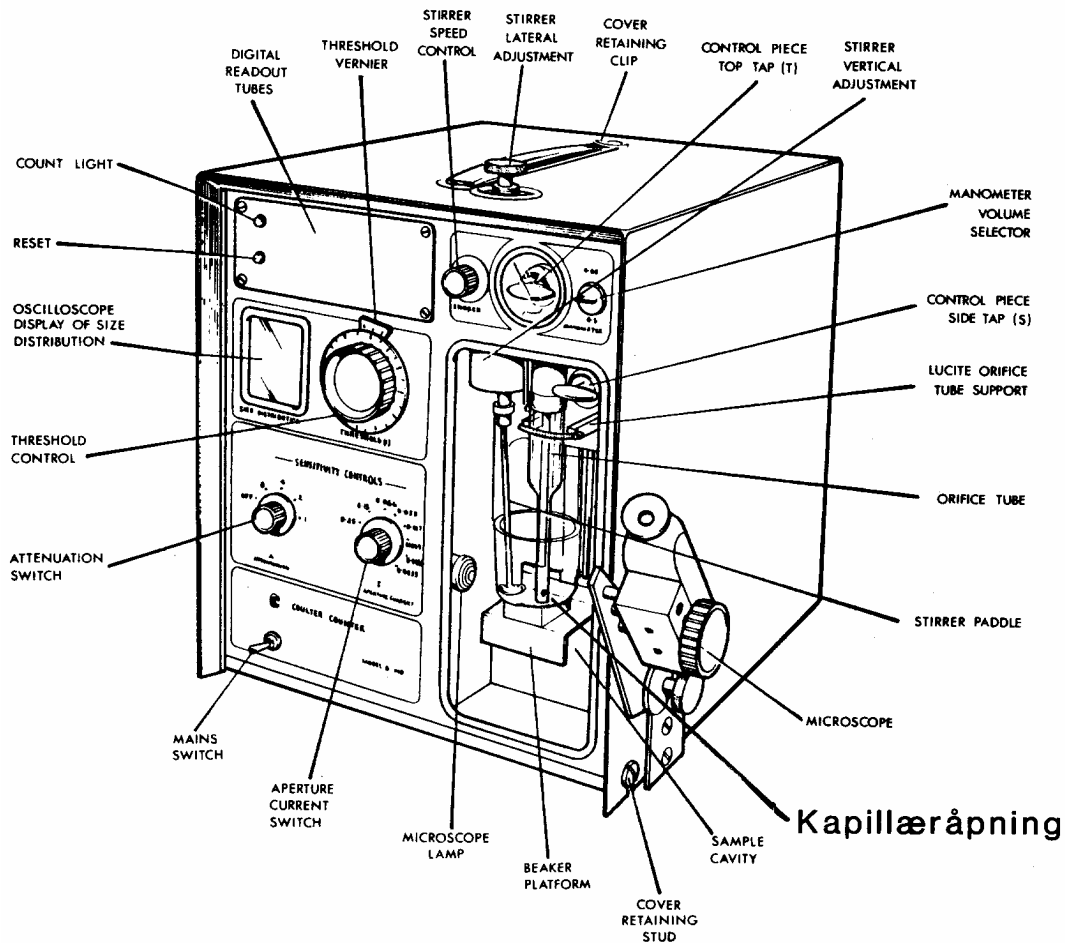
**Anemi** kan bety nedsatt konsentrasjon av erythrocytter eller nedsatt hemoglobinmengde pr. erythrocytt. Erythrocyttkonsentrasjonen er derfor viktig å kjenne når det gjelder å finne ut hvilken type anemi man står overfor (se spørsmålene lenger bak i kursheftet).

Kjennskap til konsentrasjonen av **leukocytter** 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.). 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 økt 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.

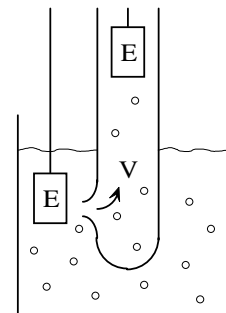
**Trombocytter**, *blodplater*, dannes fra benmargens megakaryocytter. De er viktige for hemostasen først og fremst ved at de kan danne en forseglende plateplugg. De inneholder også visse koagulasjonsfaktorer og er ansvarlige for koagelretraksjonen. Man skal alltid se til at de er til stede i blodutstryk som differensialtelles. 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.

## COULTER COUNTER MODEL D INDUSTRIAL



**Elektronisk telling av celler.** Erythrocytter, leukocytter og - litt vanskeligere - trombocytter kan også telles enkelt og presist *elektronisk*. En slik teller, Coulter Counter, vil bli brukt på kurset.

En elektrisk strøm ledes gjennom cellesuspensjonen mellom 2 elektroder. Cellesuspensjonsmediet består av natriumklorid i vann (= elektrolytt), - tilsatt et "såpestoff", f.eks. saponin, som hemolysere 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:**

1. **dag:** Telling av erytrocytter (RBC): Vi skal undersøke kapillærblod fra fingertupp, minst dobbeltprøver: 20  $\mu\text{L}$  blod (vanlige engangs-pipetter) blandes godt med 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 (dvs. celler) i 100  $\mu\text{L}$  av blodfortynningen. V.h.j.a. disse opplysningene og telletallet som du har notert deg, skal du regne ut antall røde blodceller pr. L blod.
2. **dag:** Telling av leukocyter (WBC): Vi skal undersøke antikoagulert veneblod : 20  $\mu\text{L}$  blod fortynnes i 10 mL medium med 6 dråper "Zapoglobin" (hemolyserer RBC), som er tilsatt på forhånd. Blandes. Samme apparatinnstilling som for telling av RBC.

*Referanseverdi erytrocytter:*

Menn:  $4.2-5.6 \times 10^{12}/\text{L}$ . Kvinner:  $3.9-5.1 \times 10^{12}/\text{L}$ .

Kraftigere legems-øvelser kan heve nivået ca. 10% (hemokonsentrasjon), emosjoners innflytelse er uviss. Man finner gjerne ca. 5% høyere verdier i vene- enn i kapillærblod (jf. sirkulasjonsforelesningene).

Man trenger nøyaktige erytrocytt-verdier, fordi de skal benyttes til beregningen av hemoglobininnholdet pr. celle etc. (se rapportskjemaet).

*Referanseverdier* for leukocyttkonsentrasjonen er hos voksne ca.  $3.3-11 \times 10^9/\text{L}$ . 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.

(\*For de som måtte trenge det:  $1 \mu\text{L} = 1/1000 \text{ mL} = 1 \text{ milliontedels liter (L)} = 1 \times 10^{-6} \text{ L}$ .

$1 \text{ mL} = 1000 \mu\text{L} = 1 \text{ tusendels liter} = 1 \times 10^{-3} \text{ L}$ .

$1 \text{ nL (nanoliter)} = 1/1000 \mu\text{L} = 1 \times 10^{-9} \text{ L}$ .

$1 \text{ pL (pikoliter)} = 1/1000 \text{ nL} = 1 \times 10^{-12} \text{ L}$ .

$1 \text{ L} = 1000 \text{ mL} = 1.000.000 \mu\text{L} = 1.000.000.000 \text{ nL} = 1.000.000.000.000 \text{ pL}$ .  $10^{12} \text{ pL} = 1 \text{ L}$ .

Når 20  $\mu\text{L}$  has opp i 10 mL, blir fortynningen – ja, hva blir den? 500x? Når den samme fortynningen gjentas, hva blir da den totale fortynningen? Hvorfor må vi multiplisere telletallet på coulter-telleren både med den inverse verdien av fraksjonen av en liter som vi teller partikler i (her 100  $\mu\text{L}$ , dvs.  $1/10.000 \text{ L}$ ), og fortynningen, for å finne partikler per liter?)



## RETIKULOCYTT-TELLING (1. DAG)

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

### Utførelse:

Hver student lager flere utstryk av fremsatt "anemi-blod" og teller retikulyocytter i det 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 pastørpipette. Det lages utstryk med et planslipt glass (eller mellom to rene objektglass). Utstrykene lufttørres straks. Utstrykene skal nå mikroskoperes. Innstill helst først mikroskopet med de svakere forstørrrelsene. Tell retikulyocytter v.h.j.a. oljeimmersjonslinsen. Oljen tørkes etterpå forsiktig av linsen med bløtt linsepapir fuktet med rensed bensin.

I et område av preparatet hvor erytrocyttene ligger jevnt spredd, telles retikulyocytprosenten. Retikulyocytter skal inneholde minst 2 distinkt blåe korn eller tråder. Det finnes ofte krystalliknende artefakter i erytrocyttene, som kan likne retikulyocytter. Artefakt-inklusionene - men ikke ekte retikkel - forandrer farge fra lyst til mørkt ved bruk av fininnstillings-(mikrometer-)skruen. Siden det ofte er relativt få retikulyocytter, er det gjerne nødvendig å telle mange synsfelt for å få et rimelig nøyaktig resultat.

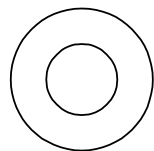
**Hvis retikulyocytprosenten er lav – men det er den ikke i det fremsatte "anemi-blodet"** – kan vi for å spare arbeid telle erytrocyttene i hvert 5. av de synsfeltene vi har telt retikulyocytter i. Vi regner disse hvert 5. synsfelt som representative for alle sammen. (I sykehusmikroskop finnes gjerne et spesialokular, Millers okular, med et avgrenset felt lik 1/10 av hele synsfeltet. Man kan da telle retikulyocytene i hele synsfeltet og alle røde celler i de tilsvarende 10%-feltene. Så regner man med at det total-celletallet man har telt retikulyocytter blant, er 10 ganger større enn det man faktisk telt opp). I større analyseapparater bestemmes retikulyocyt-antallet v.h.j.a. væskestrømscytometri.

Dersom vi teller  $n$  retikulyocytter i  $a$  synsfelt (gjennomsnitt  $n/a$  pr. synsfelt) og  $N$  RBC totalt (erytrocytter + retikulyocytter) i  $b$  synsfelt (gjennomsnitt  $N/b$  pr. synsfelt), blir retikulyocytprosenten:

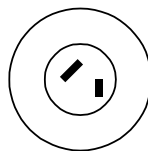
$$\frac{n/a * 100\%}{N/b} = \frac{n \cdot b}{a \cdot N} * 100\%$$

Man bør se over så mange celler at man tilsammen finner *minst* 50 retikulyocytter, for å få et noenlunde presist estimat av retikulyocytprosenten.

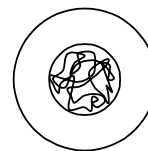
*Referanseverdi* for voksne: 0.2-2% av alle erytrocytter.



RBC



Retikulyocytter



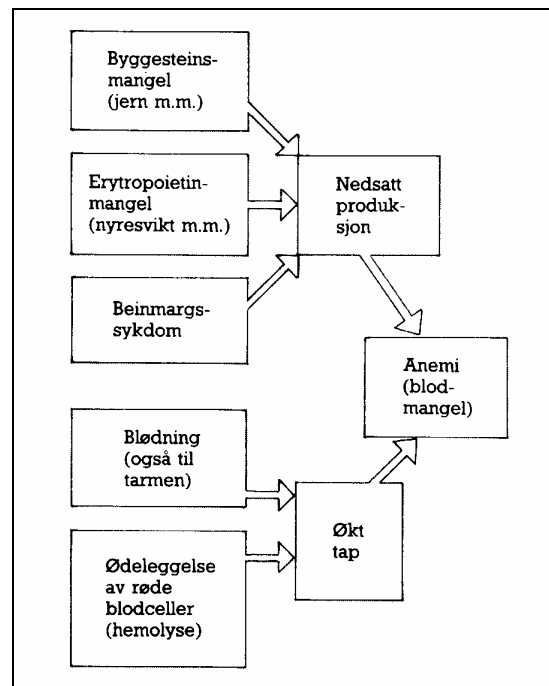
## LITT OM ANEMI

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 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 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 hemoglobinnhold 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 EP-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 menstruasjonsblødninger, 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.

**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!Resultat av hemoglobinmålingen (trippelprøver per lag av fremst studentblod):

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

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

\_\_\_\_\_ &amp; \_\_\_\_\_ ; median (= gjen.snitt): \_\_\_\_\_

Resultat av erytrocyttellingene (dobbeltprøver av eget kapillærblod):

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

Vis ved hjelp av de funne verdier for PCV og erytrocyttkonsentrasjon hvordan du kan beregne din:

**MCV** (mean cell volume), gjennomsnittlig erytrocyttvolum (normalt 80-95 fL, femtoliter =  $10^{-15}$ L):**Resultat av retikulocyt-tellingene på utlevert "anemisk blod":**

(3 replikatverdier!): \_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ %

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

Godkjent: \_\_\_\_\_ Ikke godkjent: \_\_\_\_\_ Dato: \_\_\_\_\_ 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 (2. DAG)**

- A. **SYKLING:** En av studentene på 3-mannslaget skal utføre et hardt arbeid på ergometersykkel (250-300 W = 1500-1800 kpm/min) i 5 min, slik at vi kan finne ut noe om fysisk arbeids eventuelle innvirkning på blodets konsentrasjon av hvite og røde blodceller. W = Bremskraft (leses av på siden av sykkelen) x omdreininger/min (leses av på speedometeret). Utføres av kursdagens andre parti.
- B. **LØPING:** En av studentene på 3-mannslaget skal løpe 1 time, så langt som mulig. *Start løpet like etter siste forelesning, etter å ha tatt den første blodprøven.* (Viktig for å spare tid!) Utføres av kursdagens første parti.

Med disse øvelsene får vi belyst en viktig kompliserende faktor for vurderingen av leukocyt-konsentrasjoner i klinikken, nemlig den *fysiologiske leukocytose*.

**Utførelse:**

- A. og B. Han/hun bør være avslappet når første blodprøve tas i EDTA- (ca. en dråpe) eller heparinholdig (tørrestoff) vakuumsprøyte.
- A. Den neste blodprøven tas på samme måte *like* etter avsluttet sykling, mens studenten ennå sitter på sykkelen. Tell pulsen samtidig med at blodprøvene tas.
- B. Blodprøve og pulstelling før og 3 timer etter løpet.
- A. og B. Blodprøvene skal analyseres v.h.j.a. elektronisk telling (s.14) og differensialtelling av hvite blodceller (s. 19). Dessuten tas triplikatprøver fra hver blodprøve til hematokritmåling (s. 11). Se også rapportskjema som skal fylles ut, og spørsmål som skal besvares på journalarket.

**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 gå inn på:

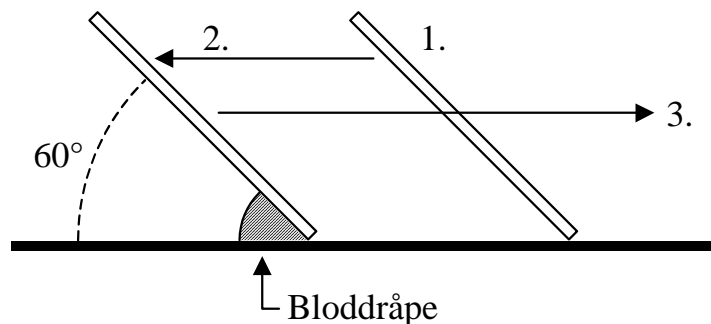
[www.med.uio.no/wwwtimeplan/fag/anatomi/histo/histokurs3sem2002.htm](http://www.med.uio.no/wwwtimeplan/fag/anatomi/histo/histokurs3sem2002.htm), kurs nr 3:

Blod og benmarg, og lær dere cellenes morfologi!

**Utførelse:**

En *liten* bloddråpe (fra fingertupp-såret, eller fra vakuumsprøyten) plasseres ved hjelp av f.eks. en pasteurpipette et par cm fra enden av et *helt rent* objektglass. Utstryket lages ved hjelp av et like rent og planslipt, tykt dekkglass, som bør være smalere enn objektglasset. *Det planslipte glasset vaskes og legges i en flaske med 5% kloramin; det skal brukes om igjen!*

Dekkglasset føres fra stilling 1 til 2, slik at bloddråpen spres i vinkelen mellom de to glassene. Den trekkes deretter ut i et jevnt tynt sjikt ved at dekkglasset føres mot stilling 3 med en jevn bevegelse (varer ca. ett sekund). *Hurtig bevegelse gir tykt utstryk, langsom*



*bevegelse tynt utstryk! Straks etter utstrykningen lufttørkes preparatet hurtig ved energisk vifting (eller bruk av elektrisk vifte, eller trykkluft-uttaket). Lag flere utstryk fra hvert vakuumsrør og velg ut de tre beste til farging:*

1. Fyll COLOR-RAPID-løsningene i separate fargebad.
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 oppløsning A, 5 ganger à 1 sekund. La overskudd av fargeløsning suges av.
4. Dypp objektglasset i oppløsning B, 5 ganger à 1 sekund. La resterende fargeløsning suges av.
5. Preparatet skylles så *forsiktig* i en skål med vann. 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.

Undersøkes i mikroskop, med oljeimmersjon. Oljen fjernes fra linsen med rensed bensin.

*Hver student teller minst 100 hvite blodceller i utstryk av blod tatt før og 100 hvite blodceller tatt på hvert av to tidspunkter etter ergometersykling eller løp.*

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". Norske hematologer hevder at fordelingen av de viktige leukocyttypene er praktisk talt den samme langs sidekanten og i midtaksen, - hvis man holder seg til den *distale halvparten av et vellykket utstrykspreparat*. 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.

Notér også erytrocyttenes 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 tabellerer alle lagets verdier på ett rapportskjema (ta vare på kladden!). Ett skjema (med alles fulle navn påført) leveres inn pr. 3-mannslag.

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):*

Nøytrofile segm.kj.:	2.0 – 7.5 x 10 <sup>9</sup> /L
- " - stavkj.:	0 – 0.5 “
Lymfocytter:	1.5 – 4.0 “
Monocytter:	0.2 – 0.8 “
Eosinofile:	0.0 – 0.4 “
Basofile:	0.0 – 0.1 “

**R2: RAPPORTSKJEMA FOR LEUKOCYTT-FORSØKENE (2. DAG). A: B: (kryss av)**

Prøvedato: \_\_\_\_\_

Forsøksperson: Høyde \_\_\_\_\_ cm Vekt: \_\_\_\_\_ kg.

**A:** Sykkelarbeidets effekt: \_\_\_\_\_ W (= rpm [leses av på speedometeret] x bremsekraft [leses av på siden av ergometersykkelen])

**B:** 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	PCV	Leukoc. kons. (10 <sup>9</sup> /l)	Seg. kjern.	Stav kjern.	Lymfo	Mono.	Eos.	Baso
Før arbeid										
	Medi- aner:									
Etter arbeid	A: ca. 0 min, B: ca. 3 hr									
	Medi- aner:									

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

	Puls	PCV	Leukoc.kons.	Seg.	Stav	Lymfo.	Mono.	Eos.
A: Etter-minus-før-verdier:								
B: Etter-minus-før-verdier								

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

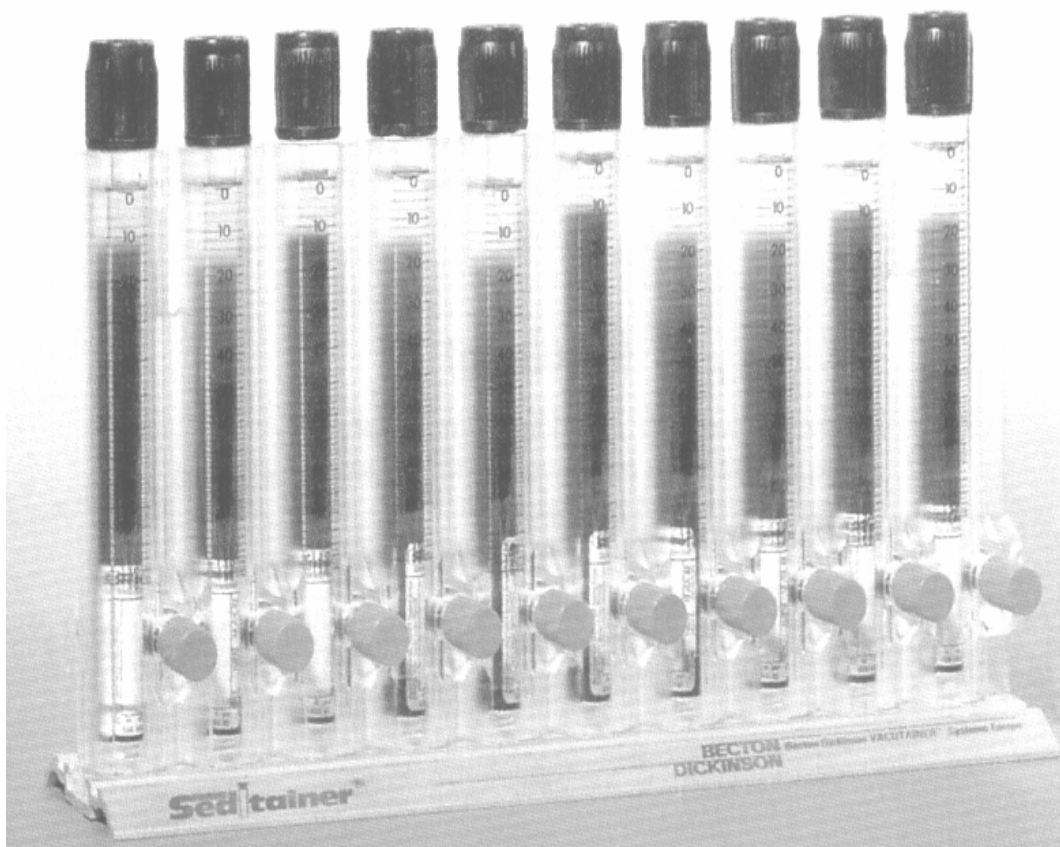
Er *trombocyt*-antallet, vurdert ut fra blodutstrykene, normalt eller patologisk senket? \_\_\_\_\_

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

## SENKNINGSREAKSJONEN og DIAGNOSTISKE "NØTTER" (3. DAG)

**Mekanismen for erytrocytt-sedimenteringen (SR).** Erytrocytter (RBC) er tyngre enn plasma. Sedimenterings hastigheten 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.

"Pengerulldannelse" øker også når hematokrit synker (anemi). Jernmangel-anemi-RBC kan imidlertid angivelig ha nedsatt tendens til rulldannelse. SR blir angivelig også mindre dersom blodet tilblandes for mye citrat-løsning (fortynning av plasmaproteiner).



**Betydning:** Empirisk test. Fullstendig uspesifikt fenomen, men økt SR avspeiler oftest endringer i plasmaproteinkonsentrasjonen. Tross dette har testen opp-lagt 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. 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 vakuumburet 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.

**2. Seditainer-rør:** Silikonert vakuumbur 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 (vakuumbur). Settes etter grundig blanding (og romtemperatur-ekvilibrering, om røret har stått i kjøleskap) i spesialstativ og avleses etter 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.

**Feilkilder:** Økning i SR med temperaturen, nedsatt ved for lavt blod/citrat-løsningsforhold (se tidligere).

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 rapportér resultatet sammen med PCV-verdien som er målt tidligere på forsøkspersonens blod, nederst på skjema R3.

**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.

### «DIAGNOSTISKE NØTTER»

Ved hjelp av de analysemetodene dere har lært hittil, skal dere samarbeide - i 3-mannslag - om planlegging og gjennomføring av undersøkelser på en utlevert blodprøve (pluss evt. avføringsprøve), supplert med utlevert SR-verdi og ferdiglagede celleutstryk fra blodet.

Fra hvilken av følgende personer/pasienter stammer sannsynligvis det utdelte testmaterialet (blod og evt. utstrykspreparat og avføring)? *Analyseresultatene skal noteres i rapportskjema R3* 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.

*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 utdelt oversikt ang. laboratoriefunn ved leukemier og fargebilder av typiske celler).
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.
11. Mannlig medisinstudent, 23 år, fra filariasis-endemisk område i India. Filariasis er en parasitt- (orme-)sykdom.

NB: Trippelprøver av PCV og diff.telling; dobbeltprøver av hemoglobin, retikulocytter, blod i avføring (2 prøver finnes på hvert utleverte prøveark) og den elektroniske leukocyt-tellingen: Se skjema R3.

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

## LITT MER OM ANEMIUTREDNING OG OM PÅVISNING AV OKKULT BLOD I FÆCES (v.hj.a. tetramethyl-benzidin-reaksjonen)

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* (retikulocytprosenten, 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)

MCV↓	Normal MCV	MCV ↑
Jernmangelanemi Thalassemi (sviktende globinsyntese)	Blødning (akutt) Hemolyse Sekundære anemier (dvs. ved infeksjoner; cancer; "binde-vevssykdommer" =autoimmunsykdommer, f.eks. av typen leddgikt)	Pernisiøs anemi (=vit B <sub>12</sub> -mangel)

*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* (se senere) 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 almenpraktikeren - men svært ofte i spesiallaboratorier. Derimot kan vi f.eks. ved hjelp av SR og *leukocytt-tellingene* få holdepunkter for eller imot noen av de sykdommene som gir sekundær anemi. Videre bør en almenpraktiker 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.

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, 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  $H_2O_2$  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 døgnmengde 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:**

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 filtrerpapiret! 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. (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 <sup>9</sup> /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.: \_\_\_\_\_

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

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

## HEMOSTASE

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.

Disse tre typer prosesser vil gjensidig understøtte og influere hverandre.

*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. Pluggdannelsen, som lettes av vasokonstriksjon i området, omfatter flere faser. Skjematisk kan hendelsesforløpet inndeles slik:

1. *Adhesjon* av platene til skadet karvegg og vev utenfor karet, spesielt til kollagene fibriller.
2. *Aggregasjon* av platene til hverandre. Bl.a. vil ADP i små mengder (fra platene selv eller fra andre skadede celler) stimulere platene til å eksponere reseptorer for fibrinogen, som dermed kan aggregere platene. Under dette stadiet i platepluggdannelsen dreier det seg om en reversibel aggregasjon, som senere går over til irreversibel aggregasjon. Prosessen blir irreversibel når trombin og fibrin dannes i "platesfæren", dvs. når såkalt "viskøs metamorfose" inntreffer.
3. *Forsterkning* av den tettende plugg ("tromben") med fibrin. I denne fase av hemostasen kommer således plasmakoagulasjonen for fullt inn i samspillet.

*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 s. 34, der "kontaktfaktor" XII – som kan aktivere XI – er sløyet, siden den neppe spiller noen rolle her *in vivo*).

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 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.).

Plasmakoagulasjonen skal vurderes ved hjelp av en koagulasjonsprøve, Cephatest.

Fibrinolysen måles med NycoCard® D-dimer, som er en hurtigtest for bestemmelse av fibrin-degraderingsproduktet D-dimer i plasma.

## **FORSØK PÅ HEMOSTASEINTERVENSJON (4. DAG)**

### **Utførelse :**

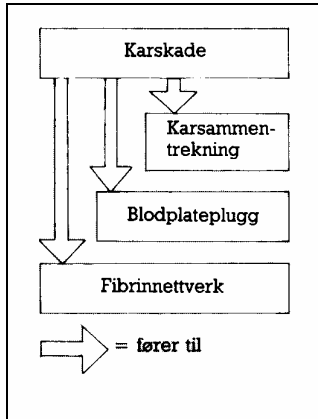
Som en lagøvelse (2 x 3 studenter) skal dere undersøke om hard sykling (som dag 2, sykle inntil utmattelse, *minst* 5 min., s. 21) (i) påvirker plasmakoagulasjonen (Cephatest); jf. spørsmålet om bl.a. hardt kroppsarbeid kan utløse hjerteinfarkt; og (ii) affiserer plasma's fibrinolytiske aktivitet. (Se dagsprogrammet, s. 7 og rapportskjemaet som viser hvilke data som skal tabuleres.)

Utfør parvise sammenlikninger - "Etter" (sykling) med "Før"!

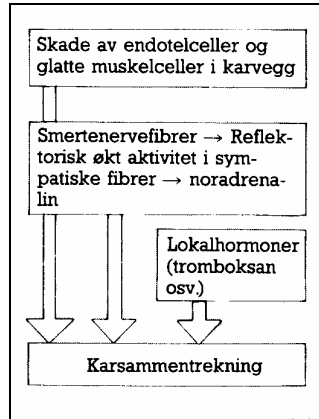
Hver student kan foreta en Cephatest på eget blod, med "manuell avlesning", i den utstrekning tiden tillater. Som enda en frivillig øvelse, som ikke skal rapporteres på R4, kan dere utføre TT-test på eget blod. Owrens thrombotest (TT) brukes til å kontrollere antikoagulasjonsbehandling i klinikken – resultatet oppgis i INR-enheter (og noen kaller selve testen INR).



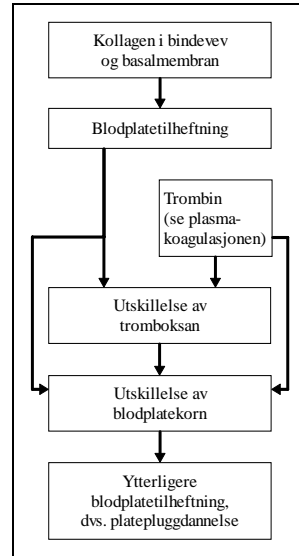
## Blodstansning «i fugleperspektiv»



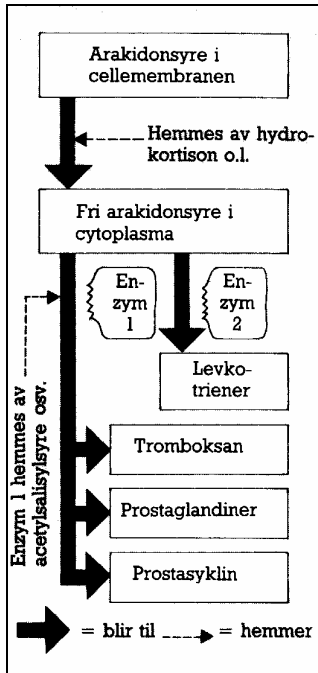
Blodstansningsmekanismene.



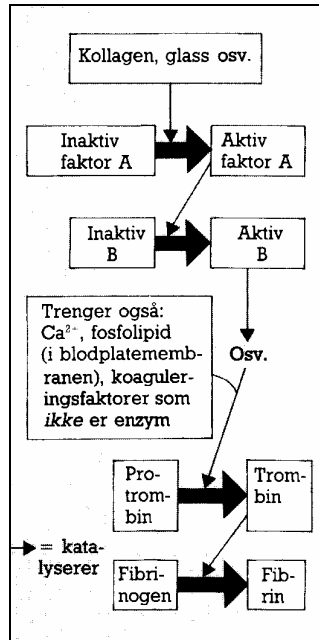
Tre mekanismer for karsammentrekning etter vevsskade.



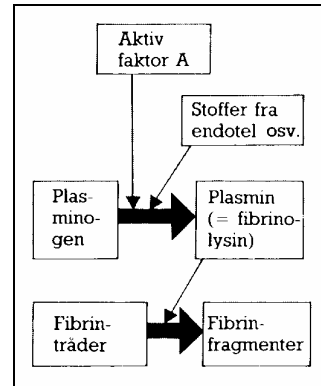
Dannelse av blodplateplugg der karveggen er skadet.



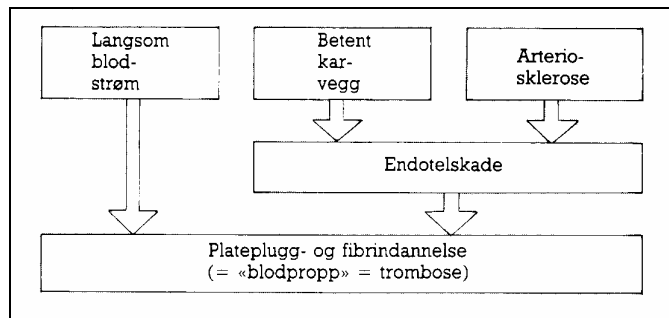
Forskjellige lokalhormoner dannes fra arakidonsyren.



Blodlevringen = (blod/plasma)koagulasjonen = fibrindannelsen.

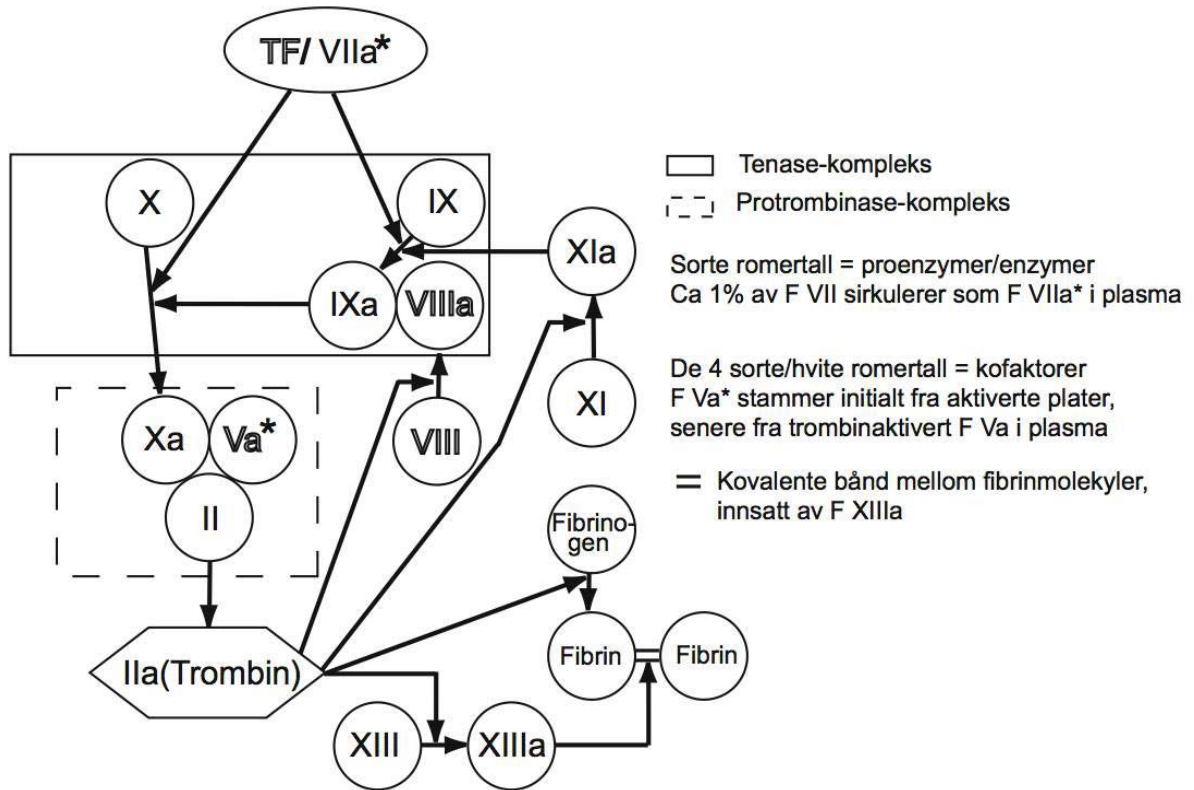


Fibrinnettbrytning.



Tre faktorer som fremmer dannelse av «blodpropp». Arteriosklerose = «åreforkalkning».

## Koagulasjonskaskaden



## CEPHOTEST (4. DAG)

Prøven tester faktor XII, XI, IX og VIII i det interne system, samt faktor X, V, II og I (fibrinogen) i "fellesløypa" for de to systemer. Reagenset er en stabil, vandig løsning av fosfolipid fra dyrehjerner, tilsatt et ellag-syrederivat som er en kraftig, løselig faktor XII-aktivator. Prøven er ufølsom for defekt faktor VII og XIII.

Cephotest brukes bl.a. til å kontrollere heparin-behandling i klinikken. 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.

I denne og lignende prøver finnes alle koagulasjonsfaktorene i overskudd i reagenset, med unntak av dem vi er interesserte i å måle. Prøveresultatet avhenger derfor av mengden av disse faktorene i blodet eller plasmaet som settes til reagenset. En følge av dette blir at pipetteringsnøyaktighet er viktigere for blod (plasma) enn for reagenser.

Prinsippet for Cephotest er at man blander citratplasma (hvor  $\text{Ca}^{++}$  er bundet) til cephotest-reagenset. Man setter så til  $\text{Ca}^{++}$  i overskudd og måler tiden til koagulasjon inntre, ved  $37^{\circ}\text{C}$ .

Cephotest er en såkalt aktivert partiell tromboplastintid (APTT)-test.

### Utførelse:

Cephotest gjøres på blod fra «vakuumsrør» med lyseblå kork (inneholder 0.5 ml 0.11 mol/L Na-citrat; tar i tillegg 4.5 mL blod).

Til koagulasjonsprøven brukes pipetter med engangsspiss (brukes flere ganger til reagensene, én gang til blodet), av typen Eppendorf- eller Oxford-pipette. Blodet i citratvakuutaineren sentrifugeres hardt i ca. 5 min. To glass med like mye blod i settes i sentrifugen, på hver sin side. Hastighetsspaken settes til høyre (max. hast.) for å starte sentrifugen; reverseres etter 5 min. Bruk f.eks. en sprøytespiss som stikkes ned i gummikorken, for å få rørene ut av de for store rørholderne i sentrifugen.

### Manuell avlesning :

0.10 mL av citratplasmaet pipetteres opp i et dvergarenglass med indre diameter ca. 8 mm. Det tilsettes 0.10 mL ferdig fremsatt Cephotest-reagens. Blandes og står i vannbad ( $37^{\circ}\text{C}$ ) i minst 6 min. Så tilsettes 0.10 mL 20 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  oppløsning (som også bør være forvarmet). Blandes godt og raskt, ved å rykke i glasset én gang. Tiden fra  $\text{Ca}^{++}$ -tilsetningen til koagulasjonen inntre (d.v.s. væskeoverflaten begynner å bevege seg tregt) måles med en stoppeklokke. Man tar glasset opp og bikker det én gang hvert 2.5-5 sekunder etter at 15 sekunder har gått. Husk at temperaturen hele tiden skal være  $37^{\circ}\text{C}$  i reaksjonsblandingen!

### Automatisk avlesning :

Koagulasjonstiden for noen av Cephotest-prøvene skal på kurset utføres med et apparat som registrerer resultatene automatisk. Analysen utføres av en kursinstruktør.

*Referanseverdier:* 27-35 sekunder.

## THROMBOTEST (TT) AD MODUM OWREN (4. DAG)

Denne testen er gjort følsom for nedsatt konsentrasjon av 4 koagulasjonsfaktorer (II (= protrombin), VII, IX og X) som har endel felles egenskaper (syntese i leveren, inneholder aminosyrer med to frie  $\text{COO}^-$ -grupper, til kompleksbinding av  $\text{Ca}^{++}$ ). De reduseres i biologisk aktivitet under den type antikoagulasjonsbehandling som motvirker vit. K-effekten på syntesen av "dobbel-  $\text{COO}^-$ -aminosyre".

Prøveresultatet er avhengig av både det interne og det eksterne system. Reagenset er nemlig sammensatt slik at det interne og det eksterne system hver bidrar omtrent likt til trombindannelsen. Thrombotestreakenset inneholder cephalin som trenges i det interne system, samt et "svakt" TF-reagens (fordi trombindannelsen normalt skjer raskere for det eksterne enn for det interne system). Det inneholder også et plasma som er rikt på alle koagulasjonsfaktorer (inklusive  $\text{Ca}^{++}$ ) bortsett fra nettopp de fire som skal testes.

### Utførelse (NB frivillig, og uten rapportering av resultatet!):

TT gjøres på blod fra samme sort vakuurrør som Cephotest, det med lyseblå kork (inneholder 0.5 mL 0.11 mol/L Na-citrat; tar i tillegg 4.5 mL blod).

TT-prøven utføres i prinsipp som Cephotest-prøven, med følgende forskjeller: 0.25 mL thrombotestreakens pipetteres opp i dvergreagensglass (ikke TT-rør!) og settes i vannbad ved  $37^\circ\text{C}$  i minst 3 min. 0.05 mL citratblod avpipetteres og blåses eller sprøytes ned i reagensglasset, idet pipettespissen som i Cephotesten holdes mot glassveggen like ovenfor reagensets overflate. Det skal blandes raskt med reagenset ved å rykke i glasset én gang. Samtidig med utblåsningen startes stoppeklokken, og glasset settes så på plass i vannbadet igjen. Glasset bør stå i 30 sekunder, deretter tas det opp og bikkes ( $70^\circ$ ) hvert 3. sekund. Koagulasjonstiden registreres. Eventuelt gjøres avlesningen automatisk – spør kursleder. Utfør helst en dobbeltp prøve.

Koagulasjonstiden i sekunder brukes til å regne ut "International Normalized Ratio", INR, som er pasientens koagulasjonstid dividert med et normalblods koagulasjonstid, målt med et WHO-standardisert reagens.

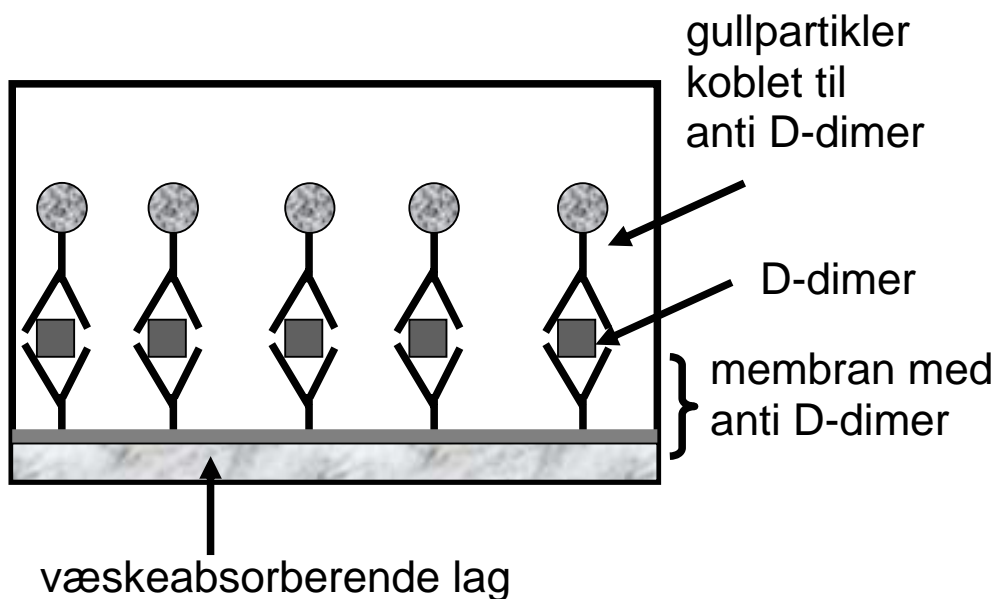
*Referanseverdier:* INR < 1,2

## FIBRINOLYSE (4. DAG)

Fibrinolyse begrenser som nevnt hemostasen. Stimulert fibrinolyse er også blitt en viktig del av akuttbehandlingen av hjerteinfarkt og andre blodpropps-(trombose-)sykdommer. Ambulansepersonell kan sende pasientens EKG over mobiltelefon eller radio til akuttmottaket i sykehuset. Hvis det foreligger ST-hevning, kan de få beskjed tilbake om å sette f. eks. 50 mg x 2 alteplase (Actilyse®, t-PA = "tissue plasminogen activator") intravenøst, som to bolusinjesjoner. I beste fall oppløses da tromben i koronararterien og pasienten spares for et infarkt.

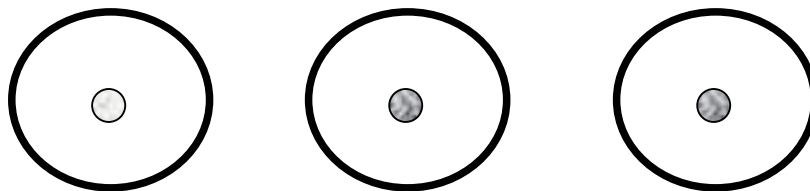
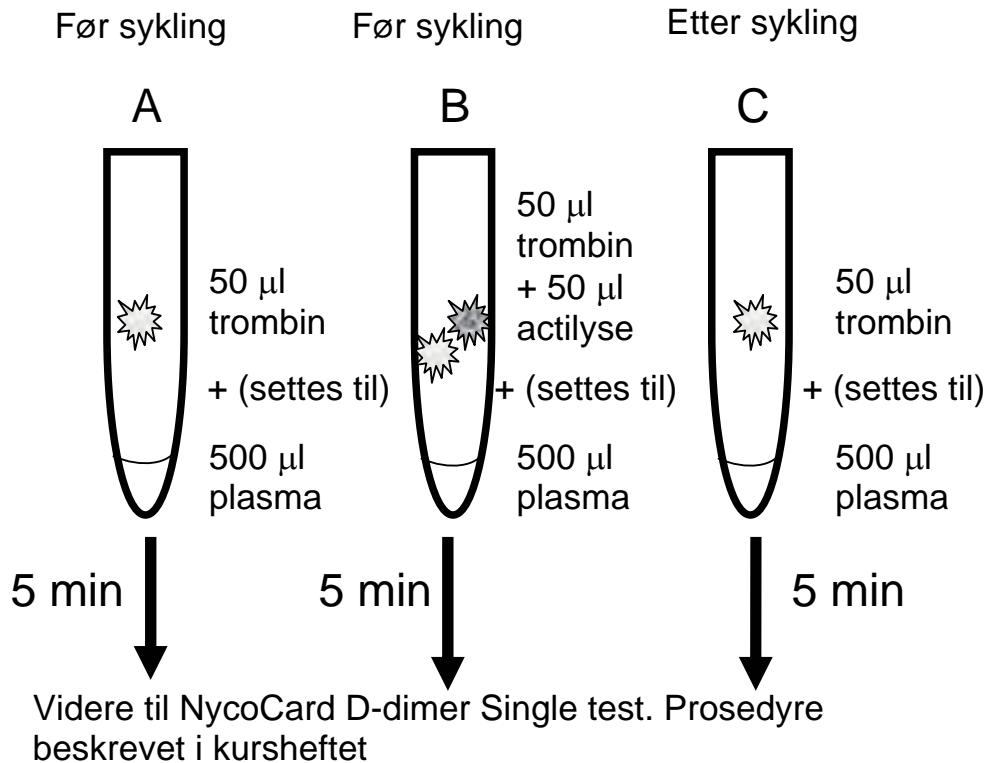
Virkingen av t-PA er illustrert i figuren s. 40. Plasminogen, som er adsorbent til fibrinet i koagelet, omdannes til det proteolytiske enzymet plasmin (fibrinolysin) av t-PA, som også "setter seg på" fibrinet. Plasmins oppløsning av fibrinet fører til dannelse av det løselige fragmentet D-dimer, som vi kan påvise med en enkel *in vitro*-test (NycoCard<sup>®</sup> D-dimer). Økt mengde av D-dimer i blodet sees ved fibrinolytiske tilstander, som sepsis og dyp venetrombose. Testen dere skal utføre, er derfor en viktig diagnostisk test i klinikken.

NycoCard<sup>®</sup> D-dimer er basert på et immunologisk testprinsipp, vist skjematisk i figuren nedenfor. Testbrikken har et hull med en membran som inneholder D-dimer-spesifikke antistoffer. Når plasma tilsettes, suges det gjennom membranen og ned i det underliggende, væskeabsorberende laget, mens D-dimer-molekylene i plasmaet vil bindes til antistoffene i membranen og holdes tilbake. Konjugatet som så tilsettes, består av små, rødfargede gullpartikler bundet til D-dimer-spesifikke antistoffer. Når dette konjugatet suges gjennom membranen, vil konjugatet fanges opp av D-dimer-molekyler fra plasmaet som allerede er bundet der. Overflødig konjugat blir fjernet ved hjelp av den påfølgende vaskeprosessen. Membranen får en rødfarge som er proporsjonal med D-dimer-konsentrasjonen i plasmaet. Intensiteten av rødfargen skal avleses med NycoCard<sup>®</sup> READER, men kan også vurderes ganske nøyaktig visuelt mot en avlesningsskala.



**NycoCard® D-dimer-prosedyre:**

1. Forvask. Tilsett 0,05 mL (50 µL) vaskeløsning i testhullet. Unngå å røre membranen i testhullet med pipettespissen. Vent til prøven er sugd gjennom membranen.
2. Studentprøve. Tilsett 0,05 mL plasma (se nedenfor, punkt A-C) til det forvaskete testhullet. Prøven skal absorberes i kortet innen 45 sekunder.
3. Konjugat. Tilsett 0,05 mL konjugat i testhullet. Konjugatet skal også absorberes i kortet i løpet av 45 sekunder
4. Vask. Tilsett 0,05 mL vaskeløsning i testhullet. Om kortet blir kontaminert rundt testhullet, tørk av forsiktig med håndklepapir.



Manuell eller automatisk avlesning

**Lagøvelsen: utførelse av sykling, prøvetaking og plasmabehandling:**

Still inn ergometersykkelen så den passer til forsøkspersonen (se s. 21). Mens hun eller han er avslappet og i ro, utføres en venepunksjon. Tell samtidig pulsen. Fyll to citrat-vakutainere med blod, ett glass til Cephotest (3-mannslag I), ett til fibrinolysestudier (3-mannslag II). Studenten sykler hardt i 5 min. Fyll to

nye citrat-vakutainere med blod umiddelbart etter avsluttet sykling, gjerne mens forsøkspersonen ennå sitter på ergometersykkelen, igjen ett glass til Cephotest, ett til fibrinolysestudier. Ta tiden fra avsluttet sykling til blodet fyller det første vakutainerrøret og tell nok en gang pulsen på forsøkspersonen. Alle 4 vakutainerrørene sentrifugeres med høyeste hastighet, som beskrevet under Cephotesten.

3-mannslag I: Utfør Cephotesten (s.35) på "Før"- og "Etter"-plasma – som trippelprøver manuelt og enkeltprøve (v/ kursinstruktør) automatisk. Hold dere orientert om hva fibrinolyse-laget gjør.

3-mannslag II: Pipetter citratplasmaet fra "Før"- og "Etter"-rørene over i nye plastglass. 0.5 mL-porsjoner skal koaguleres ved å tilsette 0,05 mL trombinløsning til hvert plastglass – 2 glass med "før"-plasma (A og B nedenfor), 1 med "etter-plasma" (C-prøven); jf. figuren ovenfor. Ta tiden når trombinet tilsettes!

Reaksjoner og analyser utføres ved romtemperatur. Dere trenger altså 3 Nycocard Single test-brikker:

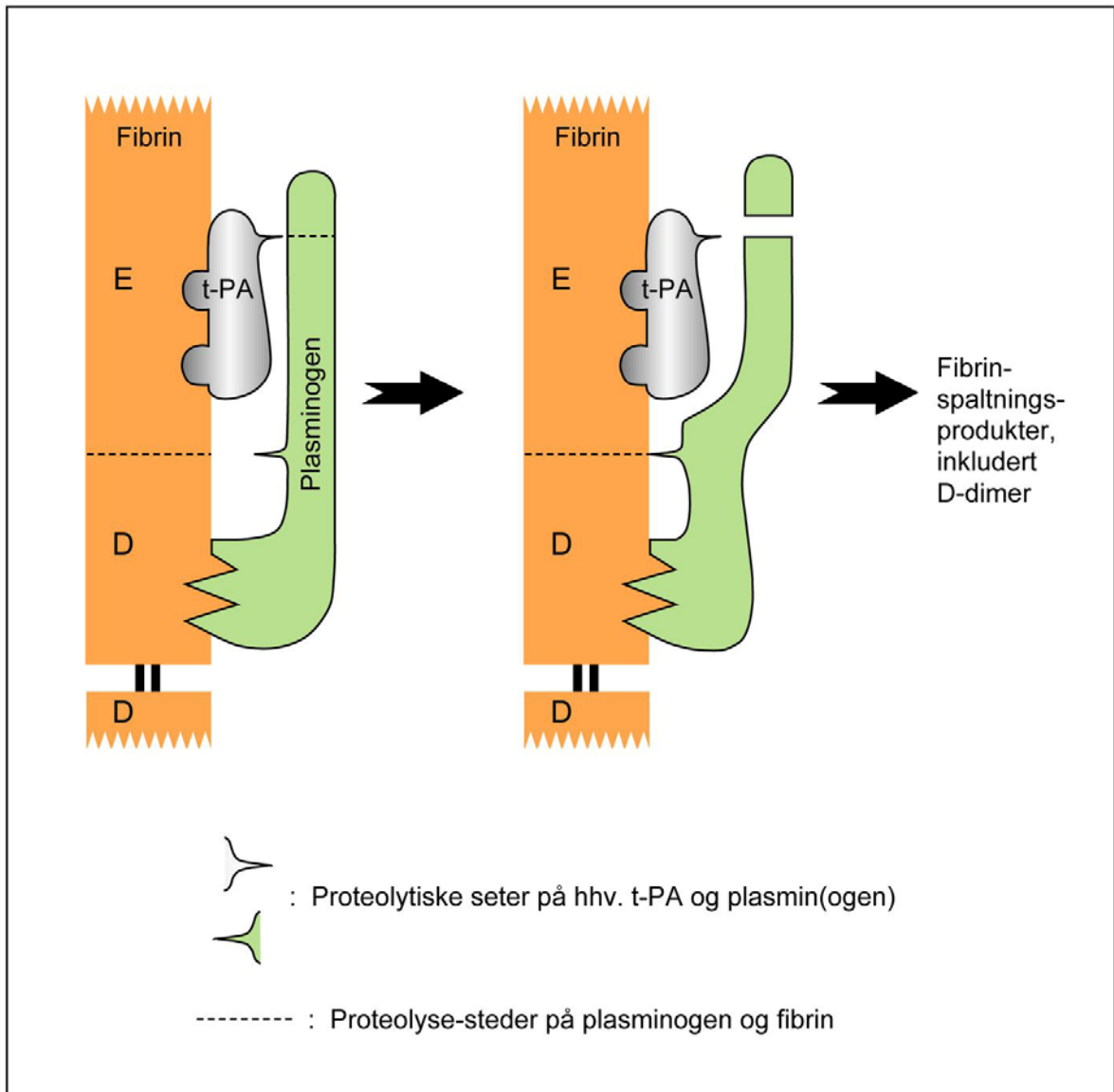
A. "Før"-plasma, rør 1: Test på tilstedeværelse av fibrinolyse, dvs. D-dimer-konsentrasjon i væskefasen, 5 min etter trombintilsetningen.

B. "Før"-plasma, rør 2: Samtidig med trombintilsetningen tilsettes 0,05 mL Actilyse (= t-PA). Test på D-dimer 5 min etter tilsetningene. Observér hvordan det går med fibrinkoaglene i rørene 1 og 2.

C. "Etter"-plasma: Test på fibrinolyse (D-dimer-måling med 0,05 mL=50 µL reaksjonsblanding uten fibrinklumper, som for A og B) 5 min etter tilsetningen av trombin.

*Referanseverdi:* < 0,3 mg/L for normalplasma (selvfølgelig uten trombin- og Actilyse-tilsetning).

Dere 6 studenter som har arbeidet sammen om hemostaseundersøkelsene, skal diskutere resultatene og prøve å forstå dem. Og altså, sammenfatningsvis: Tre av dere skal undersøke med Cephotest ett "før-blod" og ett "etter-blod" fra syklisten (trippelprøver manuelt; enkeltprøve automatisk). Tilsvarende skal tre av dere studere fibrinolyse i ett "før-blod" og ett "etter-blod" fra syklisten. Hver student kan utføre Cephotest på eget blod (enkeltpøve; manuelt). Hvert 3-mannslag fyller ut fullstendige rapportskjemaer, med syklistdata for både Cephotest og fibrinolyse og eventuelle, individuelle Cephotestdata – slik det også fremgår av skjemaet.





**R4: RAPPORTSKJEMA FOR HEMOSTASEFORSØKENE (4. DAG)**

Navn	PBL-gruppe	Cephotest (sekunder)

**Beskrivelse av kroppsarbeidet (syklingen) :**

Forsøkspersonens vekt: \_\_\_\_ kg Høyde: \_\_\_\_ cm Kjønn: \_\_\_\_ Alder: \_\_\_\_

Arbeidets varighet: \_\_\_\_ min Effekt: \_\_\_\_ W. Tid fra avsluttet sykling til blod renner i første vakutainerrør: \_\_\_\_ sek. Treningstilstand (meget veltrenet/veltrenet/middels/sofagris):

**Resultater:**

	Puls	D-dimer (mg/L)			Cephotest (sek)		
		A	B *	C	Manuelt		Automa-tisk.
FØR sykling				XXXXXX XXXXXX			
ETTER sykling		XXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXX					

\* Eneste prøve der trombin er tilsatt sammen med Actilyse.

**ETTER-minus-FØR-resultater for syklisten:**

**Puls:** \_\_\_\_/min. **Cephotest** (fortrinnsvis "automat-verdiene", subsidiært medianverdiene fra de manuelle avlesningene: anfør hvilke data som er brukt!): \_\_\_\_ sek.

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

**Konklusjoner:**

*Kroppsanstrengelsens virkning på koagulasjonshastigheten, målt v.h.j.a. Cephotest:*

*Kroppsanstrengelsens virkning på konsentrasjonen av vevs-plasminogen-aktivator (t-PA) i blodet:*

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

## APPENDIX:

**USIKKERHETSVURDERING, MÅLEFEIL OG LITT STATISTIKK**

H.B. Benestad &amp; 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 middelvei i stedet), fordi medianen påvirkes mindre enn middelveien av "ville verdier". 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 (gjerner 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-testen).

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 ; 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 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).

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). 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 analyseapparater vil derfor 1 av 20 analysesvar p.g.a. "tilfeldig spill" gi en "unormal" verdi. Dette er det viktig å være klar over; ellers påføres forsøkspersonen eller pasienten en masse ekstraanalyser for å kontrollere "unormale" prøver ("*Odyssevs-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 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 hemoglobinkolorimeteret, 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 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**

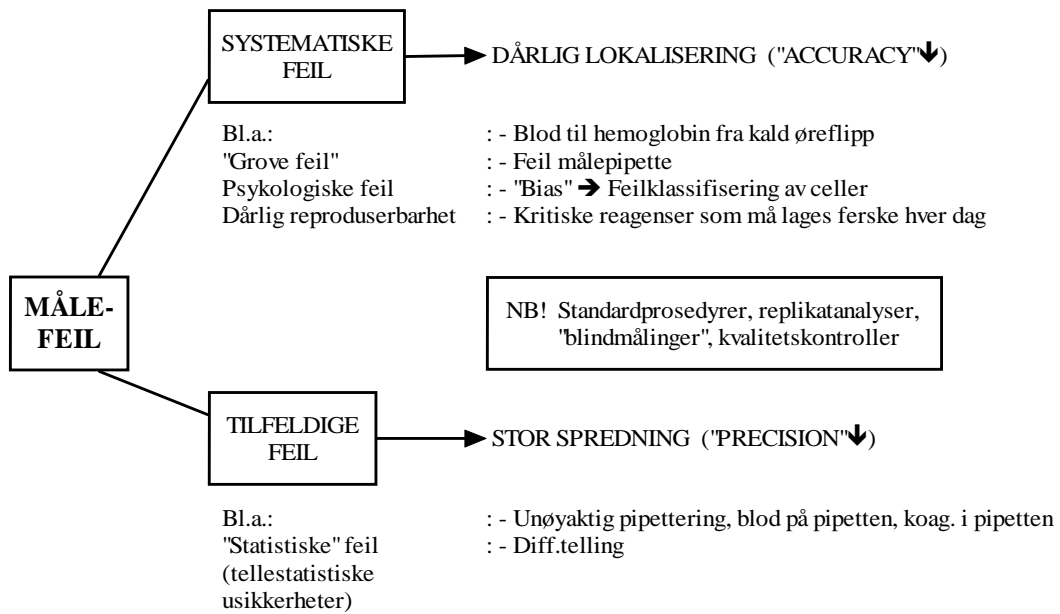
Disse kan skyldes begrenset målenøyaktighet av apparatur, unøyaktige avpipetteringer, etc., og kan ikke elimineres - men minskes - ved øvelse, bruk av mer fintmålende apparatur, nøyaktigere pipetter o.s.v. Dette vil redusere spredningen i målingene, og dermed snevre inn konfidensintervallet. Også flere 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 desintegre innen en viss tidsperiode. Disse tellestatistiske feilene opptrer f.eks. ved telling av blodceller i en Coulter-teller. Ved å foreta mange slike opptellinger vil man finne at disse tallene følger en bestemt matematisk fordeling som er asymmetrisk og som kalles *Poisson-fordeling*.

Gitt det primære tallet, 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 tallet, og kan leses ut av egne tabeller (se f.eks. Tabell 2). Ved høye tallet (=  $n$ ) 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 tallet, 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 telle-

tall. I praksis har det dog liten hensikt å øke tallet av leukocytter i en blodprøve fra f.eks. 1.000 (med et 0.95 konfidensintervall på 12.6%) til 10.000 (med et konfidensintervall 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 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.

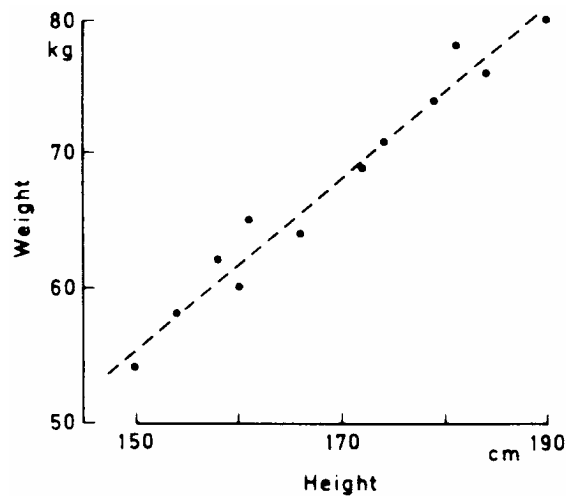
Som ventet finner du en klar sammenheng mellom studentenes høyde og deres vekt.

**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 ( $\text{SD } x$ ) er kvadratrotten av variansen igjen,  $\text{SD } x = \sqrt{\text{var } x}$ . 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. på regresjonen / 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 måles hemostase-enderinger etter inntak av acetylsalicylsyre med to forskjellige metoder (Ivy og Cephotest). Vi ønsker nå å finne ut om det er noen samvariasjon mellom disse metodene. Foreta en korrelasjonsanalyse av de samhørende «Før minus etter»-verdiene til nr. 1-studentene i rapportskjema R4. 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, se R4), 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

**JOURNAL I BLODETS FYSIOLOGI**

**Navn:** \_\_\_\_\_ **Parti:** \_\_\_\_\_

*Innlevering av "blodjournalen" er frivillig. Journalen skal være lett å lese. Den kan gjerne leveres som et gruppearbeid. Innleveringsfrist avtales med kursledelsen.*

**HEMOGLOBINMÅLINGENE FOR DET FREMSATTE BLODET:**

Feilkilder generelt for hemoglobinmåling:

Kryss av for de feilkildene dere tror er viktige. Hva sier henholdsvis

1. konfidensintervallene og
2. kvartilintervallene om målingers pålitelighet ?

**ARBEIDSFORSØKET :**

Beregn hemokonsentreringen (mL minsket blodvolum) (vis hvordan!) i løpet av det 5-minutter-lange sykkel-arbeidet, ved hjelp av medianverdien for PCV-forandringen for kullet, under følgende forutsetninger:

- Totalt blodvolum var 5 l før syklingen.
- Hvile-hematokrit var lik ditt partis medianverdi dag 1.
- De røde blodcellene var uforandret i antall og volum i sirkulasjonen i løpet av syklingen.

Hva er årsaken til hemokonsentreringen ?

Beregn de *relative* (dvs. prosentvise) konsentrasjonsøkningene for de tre leukocyttypene som dere har regnet ut absolutte forandringer for i blodet (i) like *etter syklingen* og (ii) tre timer *etter løpet*. (Bruk kulletts resultater, som er delt ut, og midtpunktet av referanseverdi-spennene som er angitt under “Differensialtelling av hvite blodceller” – dvs. i milliarder per liter: 4,75 for segmentkjernede nøytrofile granulocytter, 0,25 for de stavkjernede og 2,75 for lymfocytene.) Hvilke leukocyt-konsentrasjoner forandrer seg prosentvis mest like etter syklingen ? Tre timer etter løpsøvelsen? Hva kan årsakene tenkes å være ?

Hvilken klinisk situasjon kan leukocytt-resultatene (i) like etter kortvarig sykling - og i enda høyere grad - (ii) 3 timer etter løpet minne om? Forklar!

**HEMOSTASETESTENE:**

Angi feilkilder for koagulasjonstesten og fibrinolysetesten. Kryss av de feilkildene som var mest aktuelle for dere.

Hvordan ser det ut til at hard sykling - hvis denne «intervensjonen» i det hele tatt hadde noen effekt - påvirker hemostasen? Hva er i korte trekk teorien for virkningsmåten(e) ? Ta utgangspunkt i de oppnådde resultatene for hele kullet.

Angi korrelasjonen (bruk utdelt oversikt over kulletts resultater) mellom

1. Cephotest-resultatene etter løp, bestemt henholdsvis manuelt og automatisk. Hvordan er overensstemmelsen? Forklar resultatet.
2. Økningen i puls i løpet av syklingen (som uavhengig variabel, x) og endringen i Cephotest-tiden (avhengig variabel, y). Hvordan tolker du resultatet?
3. Endringen i Cephotest-tiden (som uavhengig variabel, x) og spontan-fibrinolytisk aktivitet (D-dimer-konsentrasjonen) 5 minutter etter trombintilsetning (avhengig variabel, y), begge verdier etter løpingen. Hvordan tolker du resultatet?

### **USIKKERHETSVURDERING:**

Prøv å rangere følgende prøver som dere har utført, etter presisjon, dvs. grad av spredning av målepunktene (kulletts resultater), og begrunn rekkefølgen: hemoglobinkons., PCV, erytrocyttkons., differensialtelling av nøytrofile segmentkjernede granulocytter, differensialtelling av stavformede granulocytter, Cephotest.

Tror dere noen av disse prøvene gir en dårlig lokalisering (nøyaktighet) av de "sanne" verdiene? Begrunn svaret.