



NTNU

Kunnskap for en bedre verden

Bacheloroppgave

BI301305 Bacheloroppgave

**Videobasert kompendium for laboratoriekurs i
immunhematologi og transfusjonsmedisin til bruk ved
Bioingeniørutdanning ved NTNU Ålesund**

Kandidatnummer: 602, 612 og 608

Totalt antall sider inkludert forsiden: 64

Innlevert Ålesund, 26.05.2016

Obligatorisk egenerklæring/gruppeerklæring

Den enkelte student er selv ansvarlig for å sette seg inn i hva som er lovlige hjelpemidler, retningslinjer for bruk av disse og regler om kildebruk. Erklæringen skal bevisstgjøre studentene på deres ansvar og hvilke konsekvenser fusk kan medføre. **Manglende erklæring fritar ikke studentene fra sitt ansvar.**

Du/dere fyller ut erklæringen ved å klikke i ruten til høyre for den enkelte del 1-6:		
1.	Jeg/vi erklærer herved at min/vår besvarelse er mitt/vårt eget arbeid, og at jeg/vi ikke har brukt andre kilder eller har mottatt annen hjelp enn det som er nevnt i besvarelsen.	<input checked="" type="checkbox"/>
2.	Jeg/vi erklærer videre at denne besvarelsen: <ul style="list-style-type: none">• ikke har vært brukt til annen eksamen ved annen avdeling/universitet/høgskole innenlands eller utenlands.• ikke refererer til andres arbeid uten at det er oppgitt.• ikke refererer til eget tidligere arbeid uten at det er oppgitt.• har alle referansene oppgitt i litteraturlisten.• ikke er en kopi, duplikat eller avskrift av andres arbeid eller besvarelse.	<input checked="" type="checkbox"/>
3.	Jeg/vi er kjent med at brudd på ovennevnte er å <u>betrakte som fusk</u> og kan medføre annullering av eksamen og utestengelse fra universiteter og høgskoler i Norge, jf. Universitets- og høgskoleloven §§4-7 og 4-8 og Forskrift om eksamen.	<input checked="" type="checkbox"/>
4.	Jeg/vi er kjent med at alle innleverte oppgaver kan bli plagiatkontrollert i Ephorus, se Retningslinjer for elektronisk innlevering og publisering av studiepoenggivende studentoppgaver	<input checked="" type="checkbox"/>
5.	Jeg/vi er kjent med at høgskolen vil behandle alle saker hvor det forligger mistanke om fusk etter NTNUs studieforskrift.	<input checked="" type="checkbox"/>
6.	Jeg/vi har satt oss inn i regler og retningslinjer i bruk av kilder og referanser på biblioteket sine nettsider	<input checked="" type="checkbox"/>

Publiseringsavtale

Studiepoeng: 15

Veileder: Universitetslektor Sahar Olsen og Overingeniør Heidi Engstrøm

Fullmakt til elektronisk publisering av oppgaven

Forfatter(ne) har opphavsrett til oppgaven. Det betyr blant annet enerett til å gjøre verket tilgjengelig for allmennheten ([Åndsverkloven §2](#)).

Alle oppgaver som fyller kriteriene vil bli registrert og publisert i Brage med forfatter(ne)s godkjenning.

Oppgaver som er unntatt offentlighet eller båndlagt vil ikke bli publisert.

Jeg/vi gir herved NTNU i Ålesund en vederlagsfri rett til å gjøre oppgaven tilgjengelig for elektronisk publisering:

ja nei

Er oppgaven båndlagt (konfidensiell)?

ja nei

(Båndleggingsavtale må fylles ut)

- Hvis ja:

Kan oppgaven publiseres når båndleggingsperioden er over?

ja nei

Er oppgaven unntatt offentlighet?

ja nei

(inneholder taushetsbelagt informasjon. [Jfr. Offl. §13/Fvl. §13](#))

Dato: 26/05-2016

Forord

Dette prosjektet er blitt til etter ønske om flere instruksjonsvideoer som studenter og lærere kan dra nytte av innen laboratoriefagene ved bioingeniørutdanningen ved NTNU Ålesund. Oppgaven tar for seg instruksjonsvideoene innen immunhematologi og transfusjonsmedisin.

Gruppen vil gjerne takke Universitetslektor Sahar Olsen og Overingeniør Heidi Engstrøm ved avdeling for biologiske fag for muligheten til å gjennomføre dette prosjektet. Vi takker også Marie Hatlevik Tvedt, Solfrid Skeie og Heidi Kristin Heggenes Johannesen for godt samarbeid under prosjektet med tanke på fordeling av utstyr og rom.

Sammendrag

Denne oppgaven er verken kvalitativ eller noen studie. Oppgaven har som formål å gi et hjelpemiddel til studenter ved bioingeniørutdanningen ved NTNU Ålesund, mer spesifikt et hjelpemiddel til laboratorieøvelse i fagene immunhematologi og transfusjonsmedisin.

Oppgaven har vært rettet mot produksjon av instruksjonsvideoer og tilhørende kompendium som resultat. Når det er sagt så har det også vært nødvendig å se på teori som ligger bak denne typen læring og en vil opplyse om forskjellige teoretiske aspekter som omhandler læring via visuelle hjelpemidler og læring gjennom instruksjon.

I slutten av oppgaven vil det bli gått gjennom prosessen og hvordan produksjonen av video og kompendium er foregått for reproduserbarhet.

Innholdsfortegnelse

2 TEORI.....	3
2.1 HVA ER LÆRING.....	3
2.2 LÆRINGSFORMER OG HVORDAN EN LÆRER.....	3
2.2. LÆRINGSPYRAMIDEN	4
2.3 LÆRING VED INSTRUKSJON	5
3.1 MATERIALE	6
3.2 FILMING	7
3.3 REDIGERING	7
3.4 TILLAGING AV KOMPENDIUM I IMMUNHEMATOLOGI OG TRANSFUSJONSMEDISIN	8
4 RESULTAT.....	9
6 KONKLUSJON	13
7 REFERANSER	14

1 Innledning

Valget falt på denne oppgaven da man her fikk mulighet til å vise og oppdatere seg på kunnskap innen immunhematologi og transfusjonsmedisin og man fikk tilegne seg ny kunnskap innen filming, redigering og pedagogikk. Oppgaven virket utfordrende, variert og spennende, og tiltalte på grunnlag av dette. Gruppen måtte tilegne seg ferdigheter og kunnskaper innen videoredigering og pedagogikk, noe som har vært en lang og lærerik prosess.

Med dagens IKT-muligheter er det mengder av informasjon i form av audio- og videoklipp av forelesninger, teori og praktiske teknikker. Det finnes derimot kun noen få videoer innen laborieteknikker som er spesielt laget for bruk i bioingeniørutdanningen ved NTNU i Ålesund. Flere relevante laborieteknikkvideoer er savnet, og danner dermed grunnlaget for denne bacheloroppgaven, hvis hensikt er å gjøre noe med akkurat dette innenfor fagfeltene immunhematologi og transfusjonsmedisin.

Kompendiet og de tilhørende instruksjonsvideoene er laget etter ønske fra Universitetslektor Sahar Olsen og Overingeniør Heidi Engstrøm. Det at instruksjonsvideoer og medfølgende kompendium er laget for å bruke til læring medfører at en konkret problemstilling vil være vanskelig å formulere. En vil da heller se på ulike pedagogiske teorier knyttet til læring via visuelle og auditoriske stimuli og hvilken effekt det kan ha for studenter som kan ta i bruk dette, men vi har ikke hatt mulighet til å utføre noe studie av hvilken effekt det faktisk har.

Teorien i oppgaven går da igjennom noen relevante pedagogiske aspekter som for eksempel visuell læring, hvordan vi tilegner oss kunnskap og hvordan instruksjon fungerer pedagogisk. Senere i oppgaven i "Materialer og metoder" vil det bli gjennomgått alt det praktiske rundt oppgaven, etter dette kommer diskusjonsdelen som tar for seg tolking av teori og resultat-del som er kompendiet med dets tilhørende instruksjonsvideoer.

2 Teori

2.1 Hva er læring

For å gå videre i teoridelen i denne oppgaven blir det nødvendig å definere et sentralt begrep, nemlig *læring*. Her presenteres en dekkende og vanlig definisjon av læring:

"Læring er en relativt varig endring i mentale strukturer som skjer som et resultat av individets samspill med omgivelsene" (1).

2.2 Læringsformer og hvordan en lærer

Hattie og Yates (2, s.115) sier:

"Laboratoriestudier viser at vi alle lærer godt dersom læringen foregår i en multi-modulær måte eller at vi får læringen inn via forskjellig media. Hjernen vår er satt opp utrolig bra på den måten at den integrerer informasjon fra forskjellige kilder og spesielt om kildene er forskjellige media. Sterk læring skjer når bilder og tekst blir kombinert."

Dette er ikke nødvendigvis sant i alle tilfeller. Relevansen og sammenhengen av informasjon som blir sendt gjennom disse mediene har stor betydning for hva som blir oppfattet. Spørsmålet om samsvar mellom disse kalles *relevansproblemet* (1). Eksempelvis vil en bioingeniørstudent antageligvis lære dårligere av en instruksjonsvideo hvis videoklipp av øvelse blir lagt sammen med irrelevant tekst, og stemmen over forklarer noe vidt forskjellig fra både teksten og bildene. Det optimale er om alle mediene samsvarer i relevans.

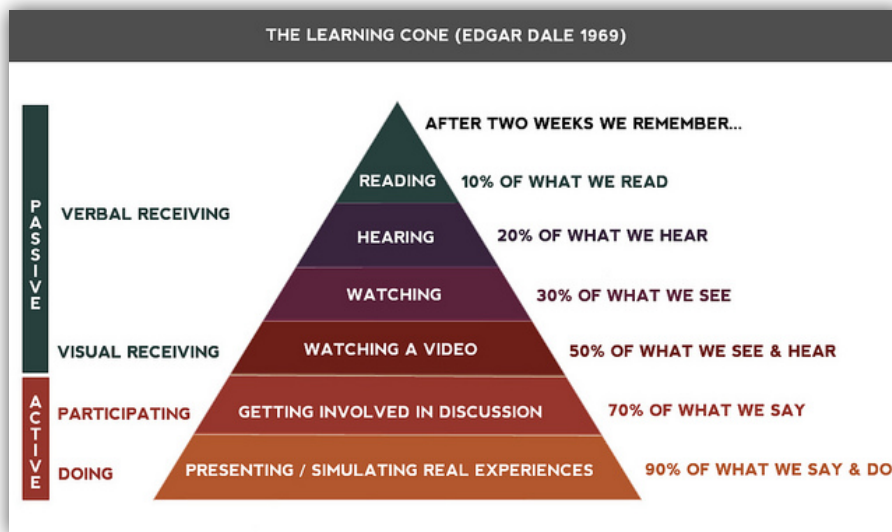
Fokuset når en forsøker å lære noe blir lett forstyrret. Ved å lytte til musikk mens man prøver å lære noe, vil det mentale fokuset bli ødelagt, og læringen vil gå tregere (2).

Det hevdes også at det er forskjell på elevers forutsetninger for å lære. Noen er flinkere til å lære verbalt, mens andre visuelt (1). Kunnskapsforskjellen mellom svake og sterke elever kan dermed reduseres hvis fokuset flyttes fra verbal til visuell (1). Det kan ut i fra dette tenkes at en ved å gå over til flere visuelle hjelpemidler i undervisning kan øke gjennomsnittlig kunnskapsnivå i en klasse.

Visuell informasjon vil også kunne være til hjelp som en knagg for nye ord og uttrykk (1). I lys av oppgavens tema, vil en instruksjonsvideo om transfusjonsmedisin være til hjelp med å forbinde ord og uttrykk med det visuelle som representerer disse.

I boken “Visible learning and the science of how we learn” sier forfatterene Hattie og Yates at konsentrasjonsgrensen før tankene begynner å vandre ligger mellom 15-20 minutt for de fleste (2)

2.2. Læringspyramiden



Figur 1: Bildet viser læringspyramiden (3)

Læringspyramiden er en visuell fremstilling av hvor mye elever sitter igjen med av kunnskap etter å ha utprøvd ulike metoder for å tilegne seg kunnskap (4). Den varianten som er presentert her viser i prosent hvor mye kunnskap eleven sitter igjen med etter to uker. Pyramiden har vært diskutert, og det hevdes at det ikke er grunnlag for å fastslå prosentene som står skrevet ved hver etasje (5). Likevel er den benyttet i stor grad (6), og dersom en ikke anser den som en sannhet og ikke tar prosenttallene så høytidelig, kan en heller se på trinnene som en implikasjon på at læring ved arbeid, forberedelse og praktisk utførelse antageligvis er den beste måten å lære på (4). Dette

stemmer også overens med Hattie og Yates, som skriver at det er mulig å lære en god del fra passive læringserfaringer, men ved å gjøre noe aktivt med det en lærer, vil det bli husket på (2).

2.3 Læring ved instruksjon

Det er godt etablert at for å tilegne seg kunnskap, vil nybegynnere ha nytte av klare steg-for-steg instruksjoner og et fravær av problemløsende oppgaver (2).

For å sette dette i riktig kontekst - bioingeniørstudentens - er studenten en nybegynner i ethvert nylig påbegynt fag, og laboratoriefaget innen immunhematologi og transfusjonsmedisin byr på mange nye uttrykk og utfordringer i læringsveien. Dreyfus og Dreyfus hevder at læring ved instruksjon er nyttig på begynnernivå, og at læring slik skjer gradvis med introduksjoner til nye fenomener. Dette er begrunnet med at læring forutsetter deltaking i yrkesoppgavene og begynnende yrkesidentifisering (7). Bioingeniørstudiet er en yrkesutdanning og yrkesrelevante instruksjoner kan bidra til å fremme ferdigheter i arbeidslivet.

“Den viktigste enkeltfaktoren som påvirker læring er hva eleven allerede vet, fastslå dette og lær ham deretter” - David Ausubel (2)

I kompendiet har vi utdypet at informasjon og teori ikke avviker fra fagene immunhematologi og transfusjonsmedisin og det kunnskapsnivået studentene skal sitte med ved tredje år. Det vil være som et påbygg på allerede eksisterende lærdom fra tidligere innen bioingeniørutdanningen. For å sitere Hattie og Yates sier de at ny kunnskap vil fort bli avlært dersom den kunnskapen den bygger på ikke er tilstrekkelig (2).

3 Materialer og metoder

3.1 Materiale

Ved oppstart av dette bachelorprosjektet ble det nødvendig å skaffe riktig utstyr og ordne tilgang til redigeringsrom og laboratoriet for å kunne gjennomføre planlagt oppgave i samarbeid med veiledere.

Det ble benyttet et digitalt videokamera av typen *Sony Handycam HDR*, minnekort, en adapter for å feste kamera til mikroskop, et lite bordstativ i metall, et noe større sort gulvstativ og en selfie-stang. Et rom innredet for e-læringsprosjekter og opptak av audio og video ble booket kontinuerlig under arbeid med redigering. Redigeringsprogrammet som ble brukt var *Camtasia Studio 8*.

Forarbeidet til produksjon gikk ut på å planlegge og fordele oppgavene prosjektet skulle ha. Da det var endelig ble det nødvendig å skrive manus. Gruppen valgte å tegne storyboard som er en grafisk fremstilling av et filmprosjekt (8). Storyboarder er en enkel, men god visuell forklaring på ønsket kameravinkel, hva og når det skiftes kameravinkel og hva hvert klipp skal inneholde.

Til forsøkene var det som regel reagenser tilgjengelig. Gelkort til typing av ABO måtte bestilles inn.

Det ble ført logg for hver dag.

3.2 Filming

Selve filmingen foregikk i et laboratorie på NTNU Ålesund. Det ble tapet fast en lang kamerastang, “selfie-stang” på toppen av laboratoriebenken dette fordi kameraet skulle stå stabilt og på denne måten ble det lite bevegelse og uro i bildet. Det ble benyttet fugleperspektiv over benk med unntak av filming av sentrifuge og noen pipetteringer- da var vinkelen fra siden for bedre visuell opplevelse.

3.3 Redigering

Introene til instruksjonsvideoene har en varighet på cirka fem sekunder der navnet på hvert laboratorieforsøk innenfor transfusjonsmedisin blir introdusert der det benyttes tekststørrelse 48, mørk grå farge, sidestilt og avsluttes med en *Fade through black* for overgang til film.

“*Fade through black*” er også brukt i hvert scenskifte.

Det ble valgt en blåtone i alle filmer, fargevalg, blå nummer 7.

Musikken ble valgt fra arkivet til programmet *Camtasia studio 8* og heter “*La ti Da*”.

Det blir mye klipping av film, der det ble ønskelig å fjerne overflødig materiale er det brukt “*fade through white*” for en glidende overgang. Dette gir en mer flytende film. Under pipettering viser videoene først metoden i vanlig fart for deretter “*fast forward 300x*”. Dette for å redusere lengden på filmene. Det blir zoomet inn med “*zoom and pan*” der det er ønskelig å vise bedre frem hva som gjøres i filmen. All informasjonstekst er i farge hvit for bedre synlighet i størrelse 20 og skrifttype Arial.

Det er benyttet kvinnehender under forsøkene og en mannstemme på voice-over med “*Enable volume leveling*” og “*Noise reduction*” som fjerner støy i stemmen. All medielyd fra innspilling ble fjernet før voice-over ble spilt inn på redigeringsrommet og lagt på video.

Der det ble nødvendig å tegne er det brukt en *Wacom cintiq 13 HD Tegnebrett*. Programmet som er brukt til tegning er *SmoothDraw*. Opptak av tegninger er gjort i *Camtasia Recorder*, og lagt som eget spor i *Camtasia Studio 8*. Dette ble gjort i flere av filmene.

3.4 Tillaging av kompendium i immunhematologi og transfusjonsmedisin

Kompendium i immunhematologi og transfusjonsmedisin er et tilhørende teorihefte til instruksjonsvideoene. Der er teorien knyttet opp mot laboratorieforsøkene og der finnes fremgangsmetode til hvert enkelt forsøk.

Under tillaging av kompendiet ble det brukt lærebok i transfusjonsmedisin, *Modern Blood Banking & Transfusion Practises*, 6 edition, Denise M. Harmening. Transfusjonsveilederen av Helsedirektoratet og Store Norske Leksikon på nett. Det ble valgt å ta bilder selv av det som er mulig, av IgG- og IgM-molekyl og fremside er dette hentet fra Wikipedia, referanser er oppgitt.

Det ble brukt Word for utforming, med røde flotte farger som skal gi en assosiasjon til fargen på blod.

4 Resultat

Prosjektets resultat er film og kompendium. Filmen medfølger på minnepenn og kompendium kommer for seg selv som del 2.

Navn på kompendium og filmer:

”Kompendium i Transfusjonsmedisin og immunhematologi.”

10 videoer til transfusjonsmedisin laboratoriekurs:

- Cellesuspensjon
- ABO-typing på gelkort
- ABO-typing på bioplate
- Rh-D typing i coombsrør
- RH-fenotyping og Kell typing på gelkort
- Screening for irregulære blodtypeantistoff
- Identifisering av blodtypeantistoff
- Enkelt forlik
- Utvidet forlik
- Direkte antiglobulintest (DA T)

5 Diskusjon

Instruksjonsvideoene formidler informasjon via tekst, bilde og lyd. I følge Hattie og Yates bidrar dette til sterk læring. Av egne erfaringer fra å ha sett lignende typer videoer brukt for læring er vi enige i påstanden. Filmene er blitt redigert med den hensikt at riktig informasjon blir formidlet. Voiceover på filmene skulle blant annet forsikre at riktig informasjon ble gitt på riktig sted i filmene og at irrelevant informasjon for forsøkene ble fjernet. Dette for å unngå relevansproblemet.

Vi har imidlertid brukt musikk til videoene. Pedagogisk viser det seg at musikk til arbeid virker forstyrrende. Musikken som er brukt har ingen tilknytning til det som blir formidlet, og er dermed irrelevant auditorisk informasjon. I dette tilfellet forsøkte vi å redigere en video uten musikk, og den fremsto da som monoton og tung å følge med på. Musikken er nedtonet med lavt volum, og har lav grad av variasjon, slik at den i minst mulig grad skal flytte fokuset fra det som blir kommunisert og være et relevansproblem.

Ved å ha instruksjonsvideoer tilgjengelig til enhver tid kan en gå tilbake og se igjennom dersom man er usikker på noe i et forsøk i forkant av laboratorieøvelsen. Det kan for noen, i følge Imsen, være et nyttig hjelpemiddel å ha øvelsene visuelt. Studenten kan lettere danne seg et bilde av hvilket utstyr som skal brukes og hvordan det skal brukes. Det kan være en fordel å i forkant av en laboratorieøvelse å ha knyttet ord og uttrykk til det visuelle. For eksempel er det ikke gitt at en student vet hvordan et gelkort ser ut, og ved å se en instruksjonsvideo som går igjennom forsøket og utstyret på forhånd, kan det muliggjøre en lettere orientering av utstyr og utøvelse av øvelsen.

Vi har redigert filmene for å minimere mest mulig av pauser der man har mulighet til å miste fokuset. Det at filmene er korte og ligger på lengde på omtrent tre til syv minutter gjør at vi holder oss godt innenfor konsentrasjonsgrensen. Av egen erfaring er ikke lange filmer å foretrekke da vi gjennom utdanningen har sett instruksjonsvideoer i ulike fag, der vi føler fokuset fort forsvinner.

Læringspyramiden viser et tenkt utbytte og ikke et faktisk utbytte av læring. Den har som nevnt fått mye kritikk men kan muligens gi en pekepinn i riktig retning av hva som kan være riktig for læring. I følge denne, vil studentene ha stort utbytte av å se videoer med tilhørende lydklipp. Enda større utbytte vil de ha dersom de diskuterer hva de har lært ved å se disse videoene, og

helst ved å lese tilhørende teori. Når laboratorieforsøkene blir utført, får de utprøvd denne nylig tilegnede kunnskapen i praksis, og ifølge læringspyramidens nederste trinn og Hattie og Yates er dette den mest effektive formen for læring.

Av egen erfaring har man i løpet av tre år observert gang på gang at enkelte drar nytte av kontinuerlig veiledning gjennom laboratoriearbeid. Erfaringsmessig er steg-for-steg læring en god type læring innen nye emner i immunhematologi og transfusjonsmedisin. I forkant av lab er det ikke uvanlig at lærer går igjennom forsøket og forklarer nøye i detalj hva som skal gjøres og hva de ulike elementene som skal brukes til forsøket er. Ved denne instrueringen kan det fort bli trangt om plassen og vanskelig å få med seg instrueringen, og vi har observert i flere tilfeller at enkelte glemmer deler av instruksjonen.

Muligens kan studenten ved hjelp av instruksjonsvideoer bli mindre avhengig av veiledning fra lærer, ved at en da har fått instruksjon i forkant av øvelsen, og har hatt mulighet til å pause og spole tilbake underveis der det går for fort, eller en blir nødt til å tenke igjennom det som blir gjennomgått. En kan få dypere forståelse for fagene og bygge på den eksisterende kunnskapen, noe som nevnt er effektivt for læring.

Et problem med disse videoene er at siden de bygger på tidligere kunnskap, vil elevene som ikke har forkunnskapene ikke forstå innholdet, og vil i følge Hattie og Yates mest sannsynlig glemme instruksjonen kort tid etter den har blitt sett. Derimot ville instruksjonsvideoene blitt svært lange om de skulle presentert all relevant teori og informasjon som er bakgrunnen for forsøkene, og ville oversteget en konsentrasjonsgrense på 15-20 minutter. Studenter med de relevante forkunnskapene ville da antageligvis fått mindre utbytte av videoene.

Kameraoppsettet er gjennomtenkt i forhold til hvordan budskapet i videoene ville komme best frem, det var ønskelig å vise frem laboratorieforsøk og ikke enkeltpersoner derfor sentreres filming kun på hender og arbeidsbenk. Blåtone i filmene er kun en personlig preferanse fra gruppen da dette visuelt gir inntrykk av en renere film. Dette er gruppens personlige mening og det er ingen vitenskapelig årsak til valget.

Under filming var laboratoriet under bruk, men vi fikk lov å filme samtidig som undervisning foregikk de dagene det ble overlapping. Med tanke på voiceover og fjerning av lyd fra selve innspillingen ville det ikke ha noe å si at det ble støy i klippene fra andre kilder enn oss. Da

forskene gikk over tid var lysforholdene også ulike, ene øyeblikket var det klar sol og andre øyeblikket var det mørkt. Dette påvirket fargene på filmen. I retroperspektiv ville det øke kvaliteten på filmingen i et lystett rom, eventuelt mer lysnøytralt rom.

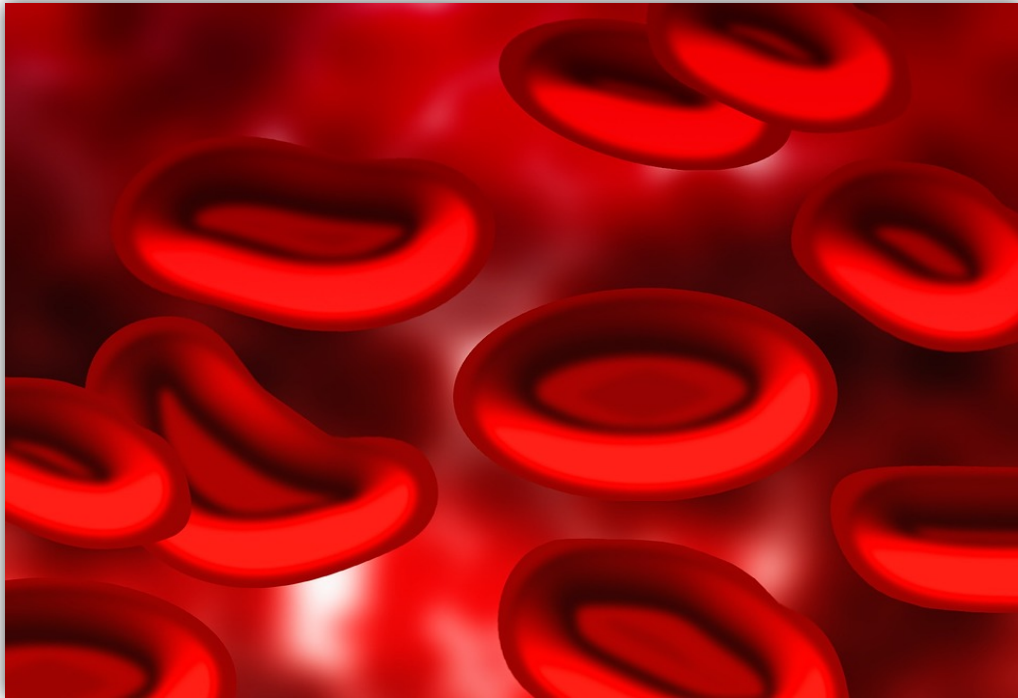
6 Konklusjon

Målet med denne oppgaven var å produsere et produkt som studenter ved bioingeniørutdanningen ved NTNU Ålesund kunne dra nytte av i undervisningsformål under laboratoriekurs i immunhematologi og transfusjonsmedisin.

Gruppen har i denne oppgaven diskutert teorier rundt læring knyttet opp mot instruksjonsvideoer og praktisk arbeid, og har kommet frem til at resultatet kan være et nyttig supplement til faget, men vi vet ikke hvilken nytte dette vil ha i praksis, siden oppgaven ikke baserer seg på en empirisk undersøkelse. På grunnlag av dette vil gruppen anbefale at Avdeling for biologiske fag ved NTNU Ålesund å arbeide videre rundt det om instruksjonsvideoer for studenter, og samtidig oppfordre avdeling for biologiske fag å se nærmere på nytten ved å forhøre seg med studenter om deres erfaring og praktisk nytte av slike metoder for læring.

7 Referanser

1. Gunn Imsen, Elevens verden: Innføring i pedagogisk psykologi. 3.utg. Oslo, Universitetsforlaget ; 2003. 423 s.
2. Hattie J, Yates GCR. Visible learning and the science of how we learn. 1.utg. New York: Routledge; 2014. 349 s.
3. BI Learning, [hentet 16-05-16] tilgjengelig fra: http://bilearninglab.no/wp-content/uploads/2013/08/dale_cone.jpg
4. Jeppesen JB, læringspyramiden, EMU Danmark. 2014 08 [hentet 16-05-16] Tilgjengelig fra: <http://www.emu.dk/modul/l%C3%A6ringspyramiden>
5. Skaare SD, Vil forkaste læringspyramiden, Høgskolen i Lillehammer, 2009 10, [hentet 16-05-16] Tilgjengelig fra: <http://forskning.no/pedagogiske-fag-skole-og-utdanning/2009/10/vil-forkaste-laeringspyramiden>
6. IKT og læring, Læring i Hordaland. 2013 09 [hentet 16-05-16] Tilgjengelig fra: <https://www.laringihordaland.no/digital-grunnkompetanse/blog/tag/studieteknikk-2/>
7. Hilde Hiim, Kapittel 4: Tre teorier om yrkesutdanning. Praksisbasert yrkesutdanning: hvordan utvikle relevant yrkesutdanning for elever og arbeidsliv? Oslo: Gyldendal akademisk; 2013. s.61-77.
8. Wikipedia, Storyboard, 2016 04 [hentet 15-05-16] Tilgjengelig fra: <https://en.wikipedia.org/wiki/Storyboard>



Kompendium i Immunhematologi og Transfusjonsmedisin

Utarbeidet av: Frank Moe Gjerde, Paulina Sande, Torgeir Rauø Sandvik, studenter ved Bioingeniørutdannelsen ved NTNU Ålesund.

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD	4
1 INNLEDNING	5
1.1 TIL OPPLYSNING	5
1.2 OPPBYGNING AV KOMPENDIET	6
1.3 OM INSTRUKSJONSVIDEOENE	7
1.4 HVA ER TRANSFUSJONSMEDISIN?	8
2 TEORI	2
2.1 ABO-TYPING	2
2.1.1 Antigener.....	2
2.1.2 Antistoffer.....	3
2.1.3 Agglutinasjon	4
2.2 D-TYPING.....	5
2.3 SCREENING FOR IRREGULÆRE BLODTYPEANTISTOFF	6
2.4 IDENTIFISERING AV IRREGULÆRE BLODTYPEANTISTOFF	8
2.4.1 Andre klinisk viktige blodtypesystem utenom ABO og Rh	9
2.5 ENKELT FORLIK	10
2.6 UTVIDET FORLIK	11
2.7 DIREKTE ANTIGLOBULINTEST	12
3 MATERIALE OG METODE	13
3.1 HYGIENE OG SIKKERHET	13
3.2 CELLESUSPENSJONER.....	14
3.2.1 Hensikt.....	14
3.2.2 Materiale og metode	14
3.2.3 Fremgangsmåte	14
3.3 ABO-TYPING PÅ BIOPLATE	16
3.3.1 Hensikt.....	16
3.3.2 Materiale og metode	16
3.4 ABO OG RH-TYPING PÅ GELKORT	20
3.4.1 Hensikt.....	20
3.4.2 Materiale og metode	20
3.4.3 Fremgangsmåte	20
3.4.4 Avlesning.....	21
3.5 RH-TYPING I COOMBSRØR	23
3.5.1 Hensikt.....	23
3.5.2 Materiale og metode	23
3.5.3 Fremgangsmåte	23
3.6 RH-FENOTYPING OG KELL TYPING PÅ GELKORT	25
3.6.1 Hensikt.....	25

3.6.2	<i>Materiale og metode</i>	25
3.6.3	<i>Fremgangsmåte</i>	25
3.6.4	<i>Avlesing</i>	26
3.7	SCREENING FOR IRREGULÆRE BLODTYPEANTISTOFF	27
3.7.1	<i>Hensikt</i>	27
3.7.2	<i>Materiale og metode</i>	27
3.7.3	<i>Fremgangsmåte</i>	28
3.8	IDENTIFISERING AV BLODTYPEANTISTOFF	29
3.8.1	<i>Hensikt</i>	29
3.8.2	<i>Materiale og metode</i>	29
3.8.3	<i>Fremgangsmåte</i>	29
3.8.4	<i>Avlesning</i>	31
3.9	ENKELT FORLIK	32
3.9.1	<i>Hensikt</i>	32
3.9.2	<i>Materiale og metode</i>	32
3.9.3	<i>Fremgangsmåte</i>	32
3.10	UTVIDET FORLIK	34
3.10.1	<i>Hensikt</i>	34
3.10.2	<i>Materiale og metode</i>	34
3.10.3	<i>Fremgangsmåte</i>	35
3.10.4	<i>Avlesning</i>	35
3.11	DIREKTE ANTIGLOBULINTEST	36
3.11.1	<i>Hensikt</i>	36
3.11.2	<i>Materiale og metode</i>	36
3.11.3	<i>Fremgangsmåte</i>	36
3.11.4	<i>Avlesning</i>	36
4	REFERANSER	38

FORORD

Dette kompendiet er laget for laboratoriekurset i faget immunhematologi og transfusjonsmedisin for tredje års studenter ved bioingeniørutdanning ved NTNU i Ålesund og skal virke som et hjelpemiddel i kurset.

Målet med kompendiet er å samle kursets viktigste laboratorieforsøk i et hefte med tilhørende instruksjonsvideoer. Hensikten er å fremme læring og gjøre det enklere for studenten å forstå og gjennomføre de ulike forsøkene selvstendig på laboratoriet, og øke den generelle forståelsen for transfusjonsmedisin hos fremtidige bioingeniører.

1 INNLEDNING

1.1 TIL OPPLYSNING

Innholdet i dette kompendiet er rettet mot tredje års Bioingeniørstudenter ved NTNU Ålesund og er dermed tilpasset deres nivå og forutsetter at kunnskap tilegnet tidligere i studiet er kjent av studenten på forhånd. Teorien som blir gjennomgått vil derfor fokusere på relevante forsøk med tilhørende teori. Dersom noen av temaene som bygger på elementer fra andre fag skulle være uklare, anbefales det å gå tilbake til tidligere relevante temaer fra pensum innen biokjemi, genetikk og immunologi for å friske opp dette først. Til kompendiet følger instruksjonsvideoer hvor hver øvelse blir gjennomgått og forklart. Det vil være nyttig å lese teorien før en ser disse videoene for å lettere forstå hvorfor øvelsene blir utført og hva som er hensikten bak.

Alle prosedyrer som vil bli presentert i dette kompendiet er opprinnelig kvalitetssikringsprosedyrer (EQS) hentet fra Blodbanken ved Ålesund sykehus, Helse Møre og Romsdal. Disse er modifisert og tilpasset undervisningsformål med tanke på tilgjengelig utstyr ved bioingeniørutdanningen ved NTNU i Ålesund.

1.2 OPPBYGNING AV KOMPENDIET

Kompendiet er bygget opp på en slik måte at det starter med å gi en rask innføring i hva transfusjonsmedisin er og hvilket formål faget har. I kapittel 2 presenteres de teoretiske aspektene som er nødvendige for hvert av laboratorieforskene. Oppdelingen er gjort med den hensikt å samle relevant teori for hvert forsøk under overskrifter med samme tittel som laboratorieforsøket. Eksempelvis er all teori knyttet til forsøket “screening for irregulære blodtyper” samlet under tilhørende kapittel som bærer samme navn. I senere forøk hvor den samme teorien som skrevet tidligere er relevant, blir den ikke gjentatt. Grunnen til en slik struktur er at studenten lett kan forberede seg til hvert forsøk ved å lese den teorien som er forventet kjent før øvelsen skal utføres, og samtidig bevare enkelheten til frittstående prosedyrer uten gjentakning av tidligere teori.

Den konkrete fremgangsbeskrivelsen til hvert forsøk presenteres under kapittel 3 - materiale og metode - og er i praksis en skriftlig utgave av instruksjonsvideoene. Kapittelet inneholder også en liten oppsummering av kvalitetssikring på et laboratorium hvor transfusjonsmedisin foregår.

1.3 OM INSTRUKSJONSVIDEOENE

Videoene er ment som en guide til hvordan forsøkene *kan* gjøres, ikke som en fasit på hvordan de *skal* gjøres. I hovedsak kan forsøkene utføres slik de blir vist frem, men det blir foretatt noen friheter for å tydeliggjøre hva som foregår. For eksempel blir prøvemateriale i noen tilfeller løftet opp mot kameraet. Dette er for å oppnå god synliggjøring av hva som blir gjort. Når forsøket blir utført, bør alt foregå på benk.

Man ønsker å gjøre leseren oppmerksom på at når fortellerstemme sier Rhesus, menes det egentlig Rh-D, da dette er rett benevning.

1.4 HVA ER TRANSFUSJONSMEDISIN?

Enkelt forklart handler transfusjonsmedisin om hvordan blodets antigener og antistoffer kan reagere med hverandre.

Det er mange ulike sykdomstilstander som fører til at man må på sykehus for å få en planlagt transfusjon, eller ulykker som fører til at man trenger øyeblikkelig transfusjon.

I praksis er blodbanken ansvarlig for blodet som blir levert til pasient med transfusjonsbehov. Dette skal være kompatibelt med blodgiverens antistoffer, derfor er en grunnleggende god forståelse for deres mulige interaksjoner og konsekvenser svært viktig for nåværende og kommende blodbankpersonell. Utfallet kan bli svært alvorlig og mulig dødelig dersom kunnskapen og prosedyrene ikke er gode nok. Derfor har sykehusene kvalitetssikring av prosedyrer de må innrette seg under(1).

Veileder for transfusjonstjenesten i Norge er en viktig håndbok i sikring av riktige arbeidsprosedyrer på laboratoriet innenfor transfusjonsmedisin.

“Transfusjonstjenestens mål er å sikre at pasienter som trenger blodkomponenter og blodprodukter kan få det. Transfusjonstjenesten skal videre sikre et høyt beskyttelsesnivå for blodmottakere og blodgivere, herunder hindre smitte og trygge sikkerheten og kvaliteten på humant blod og blodkomponenter uansett anvendelsesformål(1).”

2 TEORI

2.1 ABO-TYPING

2.1.1 ANTIGENER

ABO-systemet er det viktigste av blodtypesystemene. Det er det eneste systemet hvor en har naturlig forekomst av antistoff mot det eller de antigen av A, B eller AB en selv ikke har på blodcellene(2).

På cellemembranen til erytrocyttene har man noe som kalles H-substans. Alle de røde blodcellene har H-substans med unntak av de med en svært sjelden fenotype - Bombay fenotypen. Disse har en sjelden genotype som ikke gir anlegg for å kunne danne H-substans og derav ingen av A eller B antigenene. H-substans er H-antigen som ved hjelp av enzymer omdannes til A eller B antigener. Dersom man har blodtype O, vil H-antigenet stå uforandret. Disse antigenene vil være ulike hverandre alt ettersom hvilke gener en arver. Man har gruppene A, B, AB, O og i sjeldnere tilfeller, undertyper av A(2).

Blodtypene A, B, AB og O har alle utgangspunkt i H-substans med samme grunnklosser.

På A, B og AB har denne basen påkoblet forholdsvis N-Acetylgalactosamin som gir antigen A og galactose som gir antigen B. Dersom en person har blodtype AB vil denne personen ha både det ene og det andre antigenet uttrykt på sine erytrocytter(2).

I noen tilfeller kan en person ha en subtype av A-antigenet. I disse tilfellene skrives blodtypen som A₂, A₃ og videre A_x, hvor x er ett nummer for typen, A₁ er den normale varianten. Etter A₂ er blodtypen sjeldnere og sjeldnere jo høyere tallet blir og en fokuserer ikke så ofte på disse, A₂ i seg selv er en sjelden blodtype. Dersom personen har arvet gener for både A₂ og B får denne personen blodtype A₂B. Genene som uttrykker A og B er dominante ovenfor O slik at du må arve O fra begge foreldre for å få blodtype O.

Eksempelvis, dersom man arver A fra den ene av foreldrene og O fra den andre vil du få blodtype A og være bærer av genet som ikke koder for A eller B-antigen(2).

Klinisk kan man bestemme blodtype til en person på ulike måter. Genteknologisk eller serologisk. Serologisk metode ved bruk av bioplate eller gelkort er en utbredt teknikk som brukes ved de fleste blodbanker i Norge.

Ved å benytte seg av bioplate bestemmes blodtype til en pasient ved å blande pasientplasma med kjente kontrollceller av type A og B, og pasient-erythrocytter med kjente antistoffer kjøpt fra eksterne laboratorier. Dette gjør man på bioplater som er rekker av plastbrett med brønner hvor reaksjonen skjer og det vil gi oss agglutinasjoner som indikerer hvilken blodtype pasient har alt ettersom hvilke antigen-antistoff bindinger som oppstår.

Ved å benytte seg av gelkort med mikrobrønner innsatt med forskjellige kjente antistoff, vil dette gi oss agglutinasjoner alt ettersom hvilken blodtype pasient har. Når man sentrifugerer disse kortene vil ikke de agglutinererte celler klare å synke ned i gelen og man leser av reaksjonene ved å sammenligne styrken på agglutinasjonsreaksjonen med ID-Card, avlesningsplansje.

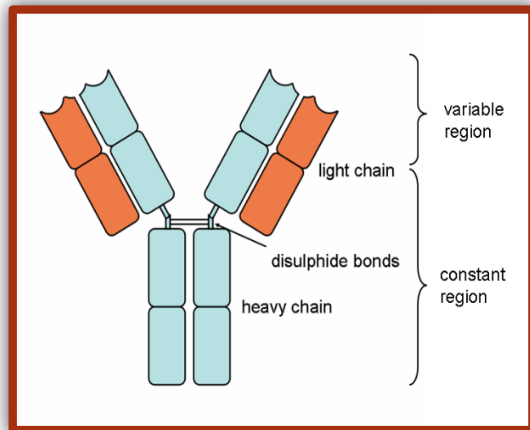
I begge tilfellene testes pasientplasma mot erythrocytter for å sjekke hvilke antistoff det har og erythrocyttene mot antistoff for hvilke antigen de har, om de har noen.

2.1.2 ANTISTOFFER

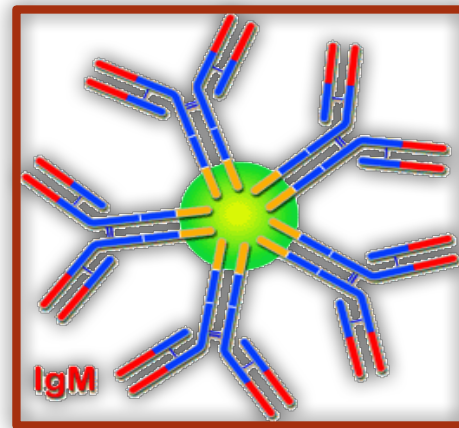
Man kan dele fullblod grovt inn i to deler, med fokus på blodcellene med deres antigener og plasma med dets antistoffer. Blant antistoffene har man anti-A og anti-B og anti-AB. Har man blodtype O, vil man ha antistoffene anti-A, -B og -AB. Om man har blodtype AB vil man ha både A-antigen og B-antigen på erythrocyttens cellemembran og man har da ingen antistoffer mot A eller B. Antistoffene Kan være av klasse IgG men er hovedsakelig av klasse IgM.

Klinisk innen blodbank-faget bruker man anti-A og anti-B for å påvise A og B-antigener sin tilstedeværelse på erythrocyttene. For å påvise en AB-blodtype ser man etter positivt svar hos både A og B. Man bruker som regel ikke AB-antistoff da A- og B-antistoffene er så sensitive at selv AB-blodtyper med svakt uttrykt A eller B vil gi klart utslag(2).

Bildene nedenfor illustrerer to ulike immunglobulin, IgG og IgM, de har ulikt antall bindingssteder. Deres egenskaper bør være kjent fra faget immunologi.



Figur 1: Bildet viser et IgG molekyl med bindingssteder for to antigen(3).



Figur 2: Bildet viser IgM molekyl med bindingssteder for ti antigen(4).

2.1.3 AGGLUTINASJON

Seradiagnostisk metode baserer seg på antigen - antistoff reaksjon in vitro(5). En agglutinasjon er en immunologisk respons der immunforsvaret går til angrep på fremmedlegemer. Det er ulike faktorer som spiller inn på en antigen - antistoffreaksjon: Avstand, antigen - antistoff forhold, pH, temperatur og immunglobulintype. Et immunglobulin, også kalt antistoff er et proteinkompleks produsert av plasmaceller og har spesifisitet mot antigen.

Agglutinasjon er binding som oppstår mellom erythrocytter og IgG eller IgM, dette ved at antistoffmolekylet vil feste seg på erythrocyttens antigenbindingssete. Det er IgM-molekylene som er størst med flest bindingssteder, det har en større påvirkning på erythrocyttens zetapotensial, derav en mer effektiv agglutinerer enn IgG(2).

2.2 D-TYPING

Rh systemet er sammen med ABO-systemet de viktigste blodgruppesystemene. Innenfor D-typing ser man på de fem viktigste antigenene, C, c, D, (d), E og e(2). Det finnes ikke noe lille-d antigen, lille-d viser til fravær av D-genet, men brukes når det skal beskrive genotypen innen Fisher-Race systemet. Når det er snakk om Rh-positiv eller Rh-negativ menes det tilstedeværelse eller fravær av D-antigenet(2). Man har et sett med gener fra hver av foreldre hvor man arver liten eller stor C, liten eller stor E og tilstedeværelse eller fravær av stor D. Ved å kombinere disse to får man en genotype som for eksempel Cde/CDe. Dette er et eksempel på klassifikasjon i Fisher-Race systemet og Cde/CDe inneholder stor D, det vil si denne personen har genet for D gjør at denne personen uttrykker antigenet D på sine erytrocytters cellemembran. På samme måte kan man lese at denne personen har genene for C-antigen og e-antigen(2).

Klinisk for å teste en pasient for D-antigenet kan man utføre Rh-D test i Coombs rør hvor det benyttes pasientens erytrocytter og tilsetter anti-D reagens. Dersom pasienten har D-antigenet uttrykk på sine erytrocytter vil anti-D og pasientens erytrocytter danne en synlig agglutinasjon. Skal man ha en utvidet profil av pasientens genotype benyttes det gelkort kjøpt fra eksterne laboratorier innsatt med antistoff mot D, C, c, E, e og en autokontroll som skal være negativ da man her tester pasientens plasma mot pasientens erytrocytter(2).

2.3 SCREENING FOR IRREGULÆRE BLODTYPEANTISTOFF

Antistoffscreening-teknikk utføres på gelkort med screeningceller.



Figur 3: Bildet viser de tre screeningceller fra BIO-RAD

Gelkortet har opptil seks brønner som hver inneholder dextran acrylamiddel og anti-IgG.



Figur 4: Bildet viser Coombs Anti-IgG gelkort



Figur 5: Bildet viser ID Diamed sentrifuge

De tre screeningcellene som blir brukt er tre celler med kjent fenotype og alle de klinisk viktige antigen, Rh (C, D, E, c, e), Duffy (Fy^a og Fy^b), Kidd (Jk^a og Jk^b) og MNS. Antigenene bør være homozygotforekommende på minst en av cellene(1). Det blir pipettert i hver brønn og deretter tilsatt pasientens serum eller plasma. Gelen ligger nederst i brønnene og prøvematerialet øverst. Dette skal inkuberes ved 37 grader i 15-30 minutter for å sensibilisere cellene. Sentrifugeringen bidrar med å tvinge materialet ned i gel som inneholder anti-IgG. De agglutinerte cellene vil være for store til å passere og blir da fanget i gelen. Derfor vil en positiv reaksjon ligge øverst i gel.

Dersom det ikke har oppstått agglutinasjon vil ikke cellene møte motstand i gel og samle seg nederst i brønnen.

Resultatvurdering: Dersom man har positivt resultat på screening vil viderearbeidet være å identifisere hvilke irregulære blodtypeantistoff som er tilstede i prøven.

2.4 IDENTIFISERING AV IRREGULÆRE BLODTYPEANTISTOFF

Ved positiv screening er det nødvendig å identifisere hvilke irregulære blodtypeantistoff plasmaprøven har. Dette gjøres ved å benytte seg av et 11 cellers panel som inneholder O-erythrocyttsuspensjoner med kjente antigener. Det blir også her benyttet gelkort av typen Coombs anti-IgG som vist i kapittel 2.3 *Figur 4*.

Ved behov kan man supplere med NaCl, enzym kort.

Dette forsøket benytter seg av samme prinsipp som screening. Agglutinasjon er positiv reaksjon.



Figur 6: Bildet viser et 11-cellepanel.



Figur 7: Bildet viser NaCl, Enzym og kuldeagglutinasjonskort

2.4.1 ANDRE KLINISK VIKTIGE BLODTYPESYSTEM UTENOM ABO OG RH

2.4.1.1 KELL

Kell-systemet er det som ofte kommer etter Rh-systemet med tanke på immunogenisitet. K-antistoffet er det mest vanlige etter ABO og Rh-D antistoffene. Antistoffene til dette blodtypesystem kan forekomme som resultat av svangerskap eller en transfusjon. De antigenene man oftest ser etter her er K, k, Kp^a, Kp^b, Js^a og Js^b(2).

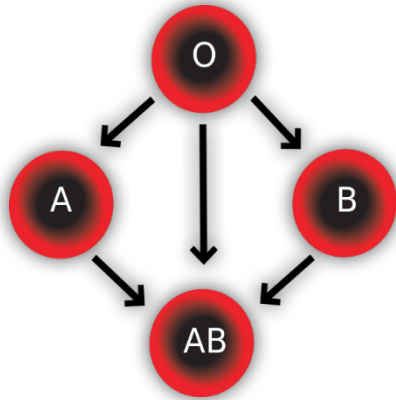
2.4.1.2 DUFFY

Innenfor Duffy-systemet finnes det flere antigener. De to mest forekommende og aktuelle er Fy^a og Fy^b. Anti-Fy^a er tre ganger sjeldnere enn Anti-K, mens Anti-Fy^b er tyve ganger så sjeldent som Anti-Fy^a igjen. Disse antistoffene er som regel av klasse IgG og er ofte assosiert med HDN og akutte eller forsinkede hemolytiske transfusjonsreaksjoner(2).

2.4.1.3 KIDD

Innenfor Kidd-systemet finnes det bare tre antigen, blant disse er det Jk^a og Jk^b som er de mest aktuelle antigenene. Antistoffene til disse er ikke vanlige og dannes som regel av en transfusjon eller svangerskap og som regel er de av IgG-klasse men kan forekomme som IgM-klasse(2).

2.5 ENKELT FORLIK



Figur 5: Bildet viser en skisse på hvilke erythrocytter blodgiver kan gi til pasient. O-kan gi til alle, A til AB, B til AB.

Å utføre et enkelt forlik er en enkel men avgjørende saltvannsteknikk som utføres på pasienten for å teste for ABO-forlikelighet med blodgiver(1).

Testen utføres før det blir utgitt blod til transfusjon. Den blir brukt som en siste sjekk på ABO-kompatibilitet mellom blodgiver og pasient. Dette muliggjør påvisning av antistoffer i pasientens serum som kan reagere med donorens erythrocytter, som ikke ble funnet under antistoff-screening grunnet manglende korresponderende antigen i screeningcellene. Det er sjelden det skjer, siden det i 99% av tilfellene vil bli oppdaget antistoff ved screening for irregulære antistoffer. Men likevel, på

grunn av den resterende prosenten og de alvorlige følgene en uforlikelighet kan ha, er det viktig å utføre en slik test for å være helt sikker på at blodet er forlikelig. Enkelt forlik er tilstrekkelig i forkant av transfusjon dersom ingen antistoffer blir funnet under en antistoff-screening. Noen få pasienter har også IgM antistoffer mot f.eks. Lea, P1 og MNS systemets antigen. Om giveren også har dette kan det gi positivt forlik(1).

Om det skulle oppstå agglutinasjon i enkelt forlik, er ikke donor og pasient forlikelig.

2.6 UTVIDET FORLIK

Dersom en pasient får positivt resultat under screening for irregulære blodtypeantistoffer, kreves det at utvidet forlik foretas før transfusjon kan finne sted(1). Dette må gjøres for å hindre at pasientens antistoffer angriper erytrocyttene i det transfunderte blodet, altså at det ikke oppstår en transfusjonsreaksjon. Eksempler på konsekvenser av slike reaksjoner - som ikke bør skje - er symptomer som feber, frysninger, smerter i bryst eller rygg. I verste fall kan det føre til agglutinasjon av blodet, nyresvikt, bevisstløshet eller død(6).

I transfusjonsveilederen står det og vi siterer.

”Erytrocyttkonsentrat til en pasient med kjent/identifisert irregulært blodtypeantistoff av klinisk betydning skal være fra blodgiver som er typet negativt i to separate prøver for det aktuelle antigenet. Den ene typingen kan erstattes av utvidet forlikelighetsprøve, dersom antistoffet reagerer med alle testceller (både homo- og heterozygote) som er positive på det aktuelle antigen med LISS indirekte antiglobulinteknikk i den aktuelle prøve. Unntak: ved påvisning av Kidd-antistoffer skal typingen utføres to ganger i tillegg til utvidet forlikelighetsprøve(1).”

2.7 DIREKTE ANTIGLOBULINTEST

DAT brukes for å se etter sensibiliserte erythrocytter hos en pasient. En erythrocytt er blitt sensibilisert når globulinene binder seg til antigen på erythrocyttens cellemembran. I DAT bruker man antistoffreagens som er spesifikk for IgG- og C3d-globulinene våre. Reagenset vil binde seg til globulinene som er bundet til erythrocyttene og man kan se synlig agglutinasjon dersom DAT er positiv(2).

Det utføres DAT når det er mistanke om transfusjonsreaksjon av transfundert blod, Hemolytisk sykdom hos nyfødt(HDN) og når det er mistanke om en autoimmun, eller medisin-indusert, hemolytisk anemi(AIHA). Ved positiv DAT bruker man et cellepanel, sammen med en kontroller, for å bestemme om det er IgG eller C3d som har sensibilisert cellene.

DAT utføres på celler som er vasket, dette betyr at man har fjernet alt antistoff i overskudd fra en prøve og vil sitte igjen med eventuelt sensibiliserte celler.

3 MATERIALE OG METODE

3.1 HYGIENE OG SIKKERHET

Hendene vaskes før alle forsøk. Laboratoriefrakken skal lukkes, ermer på bekledning skal ikke rekke lengre enn frakkens og langt hår skal være oppsatt. Det skal benyttes benkepapir under hvert forsøk.

Pipettering skal foregå på benk i stativ da dette gjør pipettering mer stødig. Ved pipettering av små volum kan det være nyttig å støtte hånden med motsatt hånd, og det skal ikke i pipetteres i høyde med øynene. Grunnen til dette er for å minimere risikoen for blodsøl og dermed smitte, ødelegging av biologisk materiale og eventuell kontaminering av andre prøver. Om det blir nødvendig å se på reagens, blodprøver og lignende kan man bøye seg ned. I de ulike forsøkene vil man arbeide med ulike blodtyper, celleduspensjoner med ulike blodgrupper, tilsette diluenter til de ulike og pipettere suspensjoner eller plasma til gelkort/enzym/saltvann.

Det byttes pipettespisser for å unngå kontaminering av prøvemateriale med rester fra forrige spiss - såkalt carryover.

Det brukes ulike reagens under ulike forsøk, disse skal man unngå å søle i øynene eller munnen. Om det skulle likevel skje at det oppstod søl i øyet, følg prosedyre for øyeskyll. Ved synlig blodsøl på benk, kastes benkepapiret og erstattes med nytt. Blodsøl på hendene vaskes bort med såpe og vann.

Det kan være smart å ikke rydde opp arbeidsplassen før alle resultat er inne, tilfelle man er nødt til å ta opp igjen et forsøk.

Risikoavfall som brukte kanyler kastes i liten gul avfallsbøtte med lokk på benk, annet avfall som blodprøver eller brukte reagenser og lignende kastes i stor gul avfallsdunk på gulv og lukkes. Disse blir forseglet og sendt til destruksjon. Alt annet avfall skal i vanlig søppel.

Blodmaterialet man bruker under forsøkene skal behandles med respekt.

Retningslinjer her er hentet og formulert fra HMS prosedyrer ved bioingeniørutdanningen ved NTNU Ålesund og studenten bør gjøre seg kjent med disse før en starter med laboratorieforsøk.

3.2 CELLESUSPENSJONER

3.2.1 HENSIKT

Dette er et forberedende laboratorieforsøk der cellesuspensjonen studentene lager skal brukes videre i kurset. Cellesuspensjonene lages ved å vaske fullblod med PBS og deretter fortynne med en konserveringsløsning hvis hensikt er å konservere cellene.

3.2.2 MATERIALE OG METODE

- Kjente erythrocytter med A Rh-negative celler
 - Kjente erythrocytter med B Rh-positive celler
 - Cellstab
 - 10 mL plastrør /m kork
 - Engangspipetter
 - Tusj til merking
 - PBS, husk å merke begeret.
-

3.2.3 FREMGANGSMÅTE

1. De rørene cellesuspensjonene skal inneholde merkes med
 - a. Blodtype
 - Gruppenavn
 - Dato
 - 5% cellesuspensjon
2. Pipetter av plasma fra pilotglass i et eget rør, dette skal merkes med *plasma og 4 siffer av tappenummer*. Skal ikke brukes videre i dette forsøket.
3. Pipetter over 1mL erythrocytter fra bunnen av pilotglasset og overfør til sitt respektive rør, husk å sjekke merkingen nøye.

A- Celler til merket A celler, B+ celler til merket B celler.
4. Fyll røret med PBS, ca. trekvart fullt og bland godt med engangspipette.
5. Sentrifugeres i 5 minutter ved 3000 RPM. Husk balanse!
6. Pipetter av supernatanten, den væsken som ligger over bunnfall med en engangspipette.
7. Gjenta steg 4, 5 og 6 slik at vaskingen totalt er gjort 3x.

8. Skal lage en 5% celsesuspensjon av de resterende vaskede erythrocyttene. Dette gjøres ved å tilsette Cellstab. Bruk formelen $C1 * V1 = C2 * V2$
2. $V1 =$ Volum av resterende celler etter vask
3. $C1 = 65\%$
4. $C2 = 5\%$
5. $V2 =$ Regn ut
9. Tilsett utregnet mengde Cellstab i hvert av rørene og bland godt.
10. Korkene settes på og cellene oppbevares i kjøleskap.

3.3 ABO-TYPING PÅ BIOPLATE

3.3.1 HENSIKT

Hensikten med dette forsøket er å lære en manuell metode for bestemmelse av pasientens blodtype innenfor ABO-systemet ved å blande pasientens erythrocytter med kjente antistoffer, og pasientens plasma med kjente antigener i brønner på bioplate.

3.3.2 MATERIALE OG METODE

- Anti A og Anti B reagens
- Bioplater
- Beholder m/løkk
- Sentrifugert EDTA-blod
- A Rh- og B Rh+ 5% cellesuspensjon
- Engangspipetter
- Trepinner
- Coombs rør
- Tusj

3.3.3 FREMGANGSMÅTE

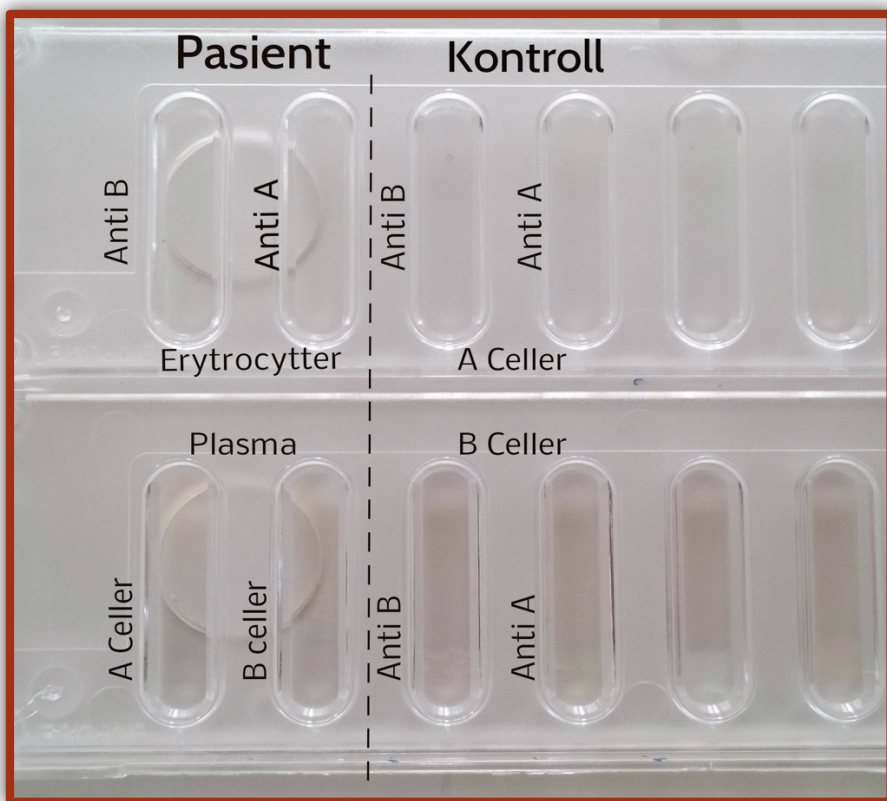
Bioplatene plasseres i beholder og markeres etter følgende oppsett:

Pasient

De to øverste brønnene skal være til pasientens erythrocytter med Anti B i brønn 1 og Anti A i brønn 2. De to nederste skal inneholde pasientens plasma med A celler i brønn 3 og B celler i brønn 4.

Kontroll

A- celler til Anti B i brønn 1 og 3 og B+ celler til Anti A i brønn 2 og 4.



Figur 9: Bildet viser inndeling av Bioplate. Pasient skal bestå av erytrocytter og plasma.

1. Coombs røret merkes med pasient-ID og pipetter av plasma fra EDTA-glasset med engangspipette til røret.
2. Drypp 1 dråpe Anti B og Anti A i hver sine brønner
3. Drypp to dråper pasientplasma med pipette i brønn 3 og 4
4. Drypp to dråper 5% cellesuspensjon A celler i brønn 1 og 2 kontrollfelt og brønn 3 pasientfelt.
5. Drypp to dråper 5% cellesuspensjon B celler i brønn 2 og 3 kontrollfelt og brønn 4 pasientfelt.
6. Ta frem to trepinner og overfør erytrocyttene til brønn 1 og 2 i pasientfelt. Bland ved hjelp av pinnene.
7. Bland alle brønnene med hjelp av trepinner. Bruk nye i til hver brønn!
8. Legg på lokket og inkuber på benk i 5 min. Deretter leses bioplatene av for agglutinasjon, noter resultatet i tabell s. 19.

3.3.4 RESULTAT

Resultatet vurderes ut ifra om det har oppstått en agglutinasjon eller ikke. Der det er agglutinasjon har man en positiv reaksjon.

Tabell for resultat:

Pasient ID	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 4	Konklusjon
Pasient 1					
Pasient 2					
Kontroll A- celler					
Kontroll B- celler					

3.4 ABO OG RH-TYPING PÅ GELKORT

3.4.1 HENSIKT

Hensikten med dette forsøket er å bestemme pasienters blodtype innenfor ABO- og RhD-systemet ved bruk av gelkort.

3.4.2 MATERIALE OG METODE

- Diaclon ABO/Rh-gelkort
- A- celler og B+ celler i ca 1 % cellesuspensjon (fortynnes fra 5% Cellesuspensjon)
- Automatpipetter
- Pipettespisser
- Plastrør
- ID-kort sentrifuge
- PBS
- Pasientprøve i EDTA-rør
- Tusj til merking
- ID-Card avlesningsplansje

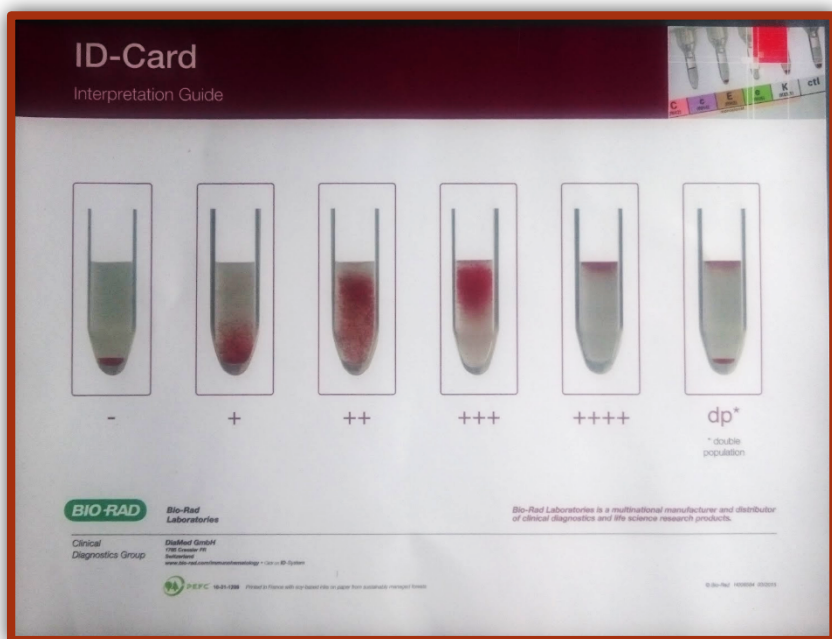
3.4.3 FREMGANGSMÅTE

1. Merk gelkortet med pasient ID.
Merk rørene:
Rør 1 - Plasma Rør 2 - 1% pasientceller
Rør 3 - 1% A- cellesuspensjon
Rør 4 - 1% B+ cellesuspensjon
2. Lag til cellesuspensjon av pasientens celler ved å pipettere 50 µl av cellene til 500 µl PBS i et 5 ml plastrør. Bland godt!
3. Lag 1 % fortynning av A og B celler, bruk formelen $C1 * V1 = C2 * V2$, du trenger totalt 50mikroliter av hver.
4. Pipetter 10 µl av pasientens celler fra punkt 2 til brønn 1 og 2 og 3 og 4
5. Pipetter 50 µl av pasiententplasma til brønn 5 og 6
6. Pipetter 50 µl av 1 % A₁ Rh-neg celler til brønn 5, husk å bytte pipettespisser!

7. Pipetter 50 μ l av 1 % B Rh+pos celler til brønn 6, husk å bytte pipettespisser!
8. Inkuber i romtemperatur i 10 min
9. Sentrifuger i 10 min på ID-sentrifuge
10. Les av resultat og noter i egen tabell på s.22

3.4.4 AVLESNING

Les av resultatet ved hjelp av ID-Card avlesningsplansje



Bildet viser ID-Card plansje til avlesning. Fra venstre negativt resultat mot høyre sterkere og sterkere positiv. Helt til høyre: DP betyr dobbel populasjon kan komme av forurensning.

Tabell for resultat:

Pasient	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 4	Brønn 5	Brønn 6	Konklusjon

3.5 RH-TYPING I COOMBSRØR

3.5.1 HENSIKT

Hensikten med dette forsøket er å finne ut om D-antigenet (Rh) er tilstede i pasientprøven.

3.5.2 MATERIALE OG METODE

- Diaclon Anti-D reagens
 - EDTA-blod
 - 3 stk. Coombs rør
 - Immufuge
 - Trepinner
 - Forstørrelsesspeil
 - Engangspipetter
 - A og B 5% celleduspensjon
 - Tusj til merking
-

3.5.3 FREMGANGSMÅTE

1. Merk rørene:

Rør 1: - kontroll

Rør 2: + kontroll

Rør 3: Pasient ID

2. Tilsett 1 dråpe Diaclon Anti-D i hvert rør
3. Ta frem en engangspipette og pipetter over 1 dråpe B- celleduspensjon i Coombs rør merket negativ kontroll
4. Bytt pipette og pipetter 1 dråpe A+ celleduspensjon i Coombs rør merket positiv kontroll
5. Erytrocyttene fra pasientprøven overføres rør merket Pasient ID med trepinner.
6. Bland godt slik at man får en homogen løsning!
7. Sentrifugeres i Immufuge 1000G i 30 sekunder

8. Les av resultatet ved å forsiktig prøve å løse opp knappen. Benytt forstørrelsespeilet for å se resultatet tydeligere.
9. Noter resultat. Agglutinasjon/ikke agglutinasjon

3.6 RH-FENOTYPING OG KELL TYPING PÅ GELKORT

3.6.1 HENSIKT

Hensikten med dette forsøket er å påvise følgende antigen: D, C, E, c, e og antigen typing på Kell.

Dette gjøres på alle nye blodgivere og ved utredning av blodtypeantistoff hos pasienter/gravide som har Rh+ og/eller Kell.

3.6.2 MATERIALE OG METODE

- **Diaclon** Rh-subgroups + K gelkort
- Romtemperert **ID-Diluent 1**
- EDTA blod, prøve
- 5 ml plastrør
- Automatpipette
- Pipettespisser

3.6.3 FREMGANGSMÅTE

Start forsøket med å merke gelkortet med pasientens ID og røret med 5% suspensjon+Pasient ID

1. Det skal lages til en 5% suspensjon med ID-Diluent 1. Tilsett 0,5mL ID-diluent 1 i merket rør.
2. Tilsett 50 µL fullblod *eller* 25 µL pakkede erythrocytter, bland forsiktig!
3. Ta av folien på de brønnene som skal brukes.
4. Pipetter over 10µL suspensjon i hver av brønnene, kortet skal stå i stativ.
5. Sentrifuger 10 minutter
6. Les av resultatet ved hjelp av ID-Card avlesningsplansje og noter i tabell s.26

3.6.4 AVLESING

Kun 4+ positive godkjennes. Dersom det ikke viser fullt 4+ godkjennes ikke resultatet og typingen gjøres på nytt.

Tabell for resultat:

Pasient ID	C	D	c	E	e	Kell	Kontroll	Rh-Genotype

3.7 SCREENING FOR IRREGULÆRE BLODTYPEANTISTOFF

3.7.1 HENSIKT

Hensikten med forsøket er å påvise irregulære blodtypeantistoff i pasientens plasma, som man skal ta hensyn til ved en eventuell transfusjon eller ved graviditet. Påvisningen skjer ved å teste plasma fra pasient mot tre screeningceller.

Cellene i cellepanelet er av **blodtype O** og inneholder utvalgte antigen som sammen dekker de klinisk mest viktige blodtypesystem. Screeningene blir utført med **Indirekte Antiglobulin Teknikk** på gelkort.

Antistoffscreening blir utført på

- Alle pasienter der det er rekvirert gruppe/antistoffscreening
- Alle nye blodgivere
- Alle svangerskapskontroller
- Blodgivere som har vært gravide siden siste blodtapping
- Blodgivere som er transfundert siden siste blodtapping

3.7.2 MATERIALE OG METODE

- Sentrifugert EDTA-blod
- ID anti-IgG Gelkort
- Screeningceller, S1, S2, S3 med tilhørende skjema
- PBS, merk begeret
- Anti D og Anti Fya brukes som kontroller
- Tusj
- Automatpipetter
- Pipettespisser

3.7.3 FREMGANGSMÅTE

Del kortet i to deler, bruker tre brønner pr pasient. Merk delen du skal bruke med pasient ID og hver brønn merkes; s1, s2 og s3.

1. Screeningscellene blandes godt ved å forsiktig rulle de mellom håndflatene.
 2. Pipetter 50 μ L screeningceller i hver sin brønn, husk å bytte pipettespisser!
 3. 25 μ L pasientplasma pipetteres i hver sin brønn, skift pipettespiss mellom hver pipettering.
 4. Inkuberes 15-30 minutter ved 37°C.
 5. Sentrigugeres i 10 minutter
 6. Avles for agglutinasjon og notér ned graderingen av resultatet på vedlagt antigendiagram.
-

3.8 IDENTIFISERING AV BLODTYPEANTISTOFF

3.8.1 HENSIKT

Hensikten med forsøket er å identifisere irregulære blodtypeantistoff og gjøres ved positiv antistoffscreening.

Man identifiserer oftest med indirekte antiglobulin teknikk, men man kan vurdere å utføre identifisering ved hjelp av saltvanns- og enzymteknikk i tillegg.

Ved indirekte Antiglobulin teknikk på anti-IgG kort påvises det antistoff av både IgM og IgG klasse. Ved saltvannsteknikken påviser man IgM-antistoffer.

Ved enzymteknikk på saltvannskort forsterkes reaksjonene med Rh og Kell-antistoff, mens reaksjoner med antistoffer i Duffy (Fy^a og Fy^b)- og MNS-systemet blir ødelagt.

3.8.2 MATERIALE OG METODE

- ID-Coombs anti-IgG gelkort
- DiaMed NaCl/ Enzym-kort (kun ved behov)
- ID-diluent 1 (brukes kun ved bruk av enzymteknikk)
- Id- cellepanel, 11 celler
- PBS, merk begeret!
- Tusj
- Automatpipetter
- Pipettespisser
- EDTA-blod
- Vedlagt antigendiagram

3.8.3 FREMGANGSMÅTE

I dette forsøket trengs to stk gelkort. Starter med å merke kortene med pasient-ID og hver brønn med s1, s2 s11.

Screeningcellene må blandes godt før bruk ved å rulle de forsiktig mellom håndflatene.

Indirekte Antiglobulin Teknikk

1. Pipetter 50µL testceller fra cellepanelet i hver sine brønner, husk å bytte pipettespisser!
2. Tilsett 25µL pasientplasma/serum i alle 11 brønner
3. Inkuber ved 37 °C i 15-30 minutt
4. Sentrifuger i 10 minutt
5. Les av resultatet og noter ned svarene på antigendiagram. Svarene graderes fra negativ til 4+.

Enzymteknikk

1. Det trengs to stk NaCl kort til hver prøve. Disse merkes med pasient-ID. Brønnene nummereres fra 1 til 11.
2. Pipetter 50 µL testceller i hver sine brønner, husk å bytte pipettespiss!
3. Tilsett 25 µL plasma/serum i alle brønnene
4. Tilsett 25 µL ID-diluent 1 i alle brønner
5. Innkuber ved 37 °C i 15-30 minutt
6. Sentrifuger i 10 minutt
7. Les av resultatet og noter ned svarene. Svarene graderes fra negativ til 4+.

Saltvannsteknikk

1. Det trengs to stk NaCl kort til hver pasientprøve. Disse merkes med pasient-ID. Brønnene nummereres fra 1 til 11.
2. Pipetter 50 µL testceller i hver sine brønner, husk å bytte pipettespiss!
3. Tilsett 25 µL plasma/serum i alle brønnene
4. Inkuber ved (4°C), på benk (20°C) eller ved 37°C i 15 min
5. Sentrifuger i 10 minutt
6. Les av resultatet og noter ned svarene. Svarene graderes fra negativ til 4+.

3.8.4 AVLESNING

Kortene leses av på begge sider, bruk gelkortene og skriv ned resultatet. Ta deretter frem skjemaet og eliminer de ulike antistoff til du sitter igjen med riktig resultat.

3.9 ENKELT FORLIK

3.9.1 HENSIKT

Hensikten med forsøket er å gjøre en test hvor en undersøker om pasient er forlikelig med blodgiver. Dette gjøres ved en enkel agglutinasjonstest. Dersom resultatet blir positivt sier man at pasient og blodgiver ikke er forlikelig. Ønsket resultat er negativ, da sier man at pasient og blodgiver er forlikelig.

3.9.2 MATERIALE OG METODE

- Tusj
 - Ett Coombsrør
 - Pasientplasma fra sentrifugert EDTA-rør
 - Blodtype forlikelig pilotglass merket med tappenummer
 - Engangspipetter
 - PBS, merk begeret
 - Forstørrelsesspeil
-

3.9.3 FREMGANGSMÅTE

Merk Coombsrøret med pasientens ID og tappenummer fra pilotglass, fire siffer. Det er pilotglassets erytrocytter som skal benyttes i dette forsøket. Avpipetter plasmaet om det ikke allerede er gjort.

1. Drypp 3-4 dråper PBS i coombsrør
2. Tilsett blodlegemer med pinne fra pilotglass til samme coombsrør
3. Vask blodgivercellene ved å fylle Coombsrøret halvveis opp med PBS, sentrifugere i 20 sekund og hell av vaskevannet.
4. Rist så opp “knappen” i bunnen
5. Tilsett 4 dråper plasma fra pasientprøve og bland forsiktig slik at blodlegemer og plasma blandes

6. Inkuberes i 5 minutter i romtemperatur, sentrifugeres så i 20 sekunder og leses av for agglutinasjon.

Ved positivt enkelt forlik

1. Kontroller pasientidentiteten på glass og sjekk om forlikelig blod er valgt i samsvar med pasientens blodtype og med pilotglass.
2. Utfør enkelt forlik ved 37° C. Forvarm pasientplasma, blodgiverceller samt utstyr og reagens. Dette gjøres ved mistanke om at pasienten har kuldeantistoff spesielt hvis det har vært problem med ABO-typing.
3. Hvis negativt enkelt forlik ved 37°C
 - a. Det positive enkle forlik i romtemperatur skyldes mest sannsynlig **et svakt kuldeantistoff**.
 - b. Gjør utvidet forlik i tillegg. Det negative utvidede forliket godkjennes.

Hvis positivt enkelt forlik ved 37°C:

Dette kan skyldes **et sterkt kuldeantistoff som også reagerer ved 37° C**. Gjør utvidet forlik. Hvis utvidet forlik blir negativt, utleveres blodet. Anmerk på blodposen: Kuldeantistoff, bruk blodvarmer.

Hvis noen av de utvidede forlikene er positive, gjøres ny typing, antistoffscreening med en annen teknikk enn IAT (for eksempel saltvann 4°C, 20°C) og DAT på pasienten, og pilotglasset.

3.10 UTVIDET FORLIK

3.10.1 HENSIKT

Hensikten med dette forsøket er å finne forlikelig blod til en pasient med antatt eller påvist irregulært blodtypeantistoff.

Utvidet forlik gjøres ved bestilling av blod i disse tilfeller:

- Ved positiv antistoffscreening
- Ved positiv DAT test på pasientens blod
- Ved tidligere påvist spesifikke blodtypeantistoff
- Ved autoantistoff problematikk
- Ved problem med enkelt forlik
- Til pasienter som har hatt alvorlig transfusjonsreaksjon som kan skyldes blodtypeantistoff

Utvidet forlik på gelkort avdekker uforlikelighet mellom pasient og blodgiver på grunn av immunantistoff (IgG). Til utvidet forlik brukes indirekte antiglobulin teknikk som påviser IgG-antistoffer hos mottaker, mot antigener på blodgiverens erythrocytter.

I praksis avdekker man også ABO-uforlikelighet fordi IgM-antistoffer agglutinerer spontant og blir hengende i gelen ved sentrifugering.

3.10.2 MATERIALE OG METODE

- EDTA-plasma fra pasient
- ID-Anti IgG gelkort
- PBS, merk begeret!
- Pilotglass fra blodgiver med forlikelig blodtype
- 5 ml plastrør
- Automatpipetter
- Pipettespisser
- Coombs rør

3.10.3 FREMGANGSMÅTE

Du skal lage en 0,8 % suspensjon av blodgiverens erythrocytter. Erythrocyttene skal mangle antigenet pasient har antistoff mot.

1. Pipetter 10 μ L godt blandet fullblod fra blodgivers pilotglass over i 0,5 mL PBS
2. Merk én brønn på et anti-IgG gelkort med pasientens ID og blodgivers tappenummer
3. Pipetter 50 μ L av 0,8 % suspensjonen fra blodgiver i brønn 1
4. Pipetter 25 μ L plasma fra pasient over i samme brønn
5. Inkuber i 15-30 min ved 37°C
6. Sentrifuger i 10 min i DiaMed sentrifuge

3.10.4 AVLESNING

Les av kortet fra begge sider.

Ingen agglutinasjon betyr negativt resultat og godkjent forlik.

Agglutinasjon betyr positivt resultat og ikke godkjent forlik.

Blodposen kan IKKE utleveres om det ikke er godkjent forlik.

3.11 DIREKTE ANTIGLOBULINTEST

3.11.1 HENSIKT

Hensikten med Direkte Coombs test, DAT, er å finne ut om pasientens egne erythrocytter er dekket med egne antistoff, dvs. bundet blodtypeantistoff og eventuelt komplement på erythrocyttene in vivo. Hensikten med monospesifikk Coombs er å finne ut om autoantistoffet er IgG eller C3d (komplement).

3.11.2 MATERIALE OG METODE

- DC-screening II gelkort
 - Sensibiliserte celler
 - Plastrør
 - Automatpipette
 - Pipettespisser
 - PBS, merk begeret!
-

3.11.3 FREMGANGSMÅTE

Lag en 0,8 % fortynning av de ferdig vaskede celler.

1. Bland 10 μL av de ferdig vaskede cellene til 0.5 mL PBS.
 2. Pipetter 50 μL celleduspensjon til 3 brønner i DC-screening II gelkortet. Husk å bytte pipettespiss mellom hver brønn.
 3. Sentrifuger 10 minutt i DiaMed sentrifuge
 4. Les av resultatet og noter i tabell s. 37
-

3.11.4 AVLESNING

Kortet leses av på begge sider for agglutinasjon. Brønner merket med kontroll skal alltid være negativ.

- Positivt reaksjon i brønn merket med IgG indikerer at autoantistoffet er av IgG klasse
- Positivt reaksjon i brønn merket med C3d indikerer at autoantistoffet er komplement

Tabell for resultat:

	DAT	IgG	C3d	Kontroll
Positiv kontroll				
Negativ kontroll				
Pasient ID:				
Pasient ID:				

4 REFERANSER

1. Veileder for transfusjonstjenesten i Norge [Internett]. Helsedirektoratet.no. [Hentet 05-05-16]. Tilgjengelig fra: <https://helsedirektoratet.no/retningslinjer/veileder-for-transfusjonstjenesten-i-norge>
2. Harmening, D. (2012). *Modern blood banking and transfusion practices*. Philadelphia: F.A. Davis
3. Fil:Antibody je2.png [Internett]. - Wikimedia Commons. [Hentet: 05-05-16]. Tilgjengelig fra: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1369130>
4. How many different types of immunoglobulins are known? [Internett]. How many different types of immunoglobulins are known? [Hentet: 03-05-16]. Tilgjengelig fra: <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmun/cuarto3.htm>
5. Serodiagnostikk – Store medisinske leksikon [Internett]. Store norske leksikon. Morten Harboe [Hentet: 03-05-16]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/serodiagnostikk>
6. transfusjonsreaksjon – Store medisinske leksikon [Internett]. Store norske leksikon. Frode Vartdal; [Hentet: 03-05-16]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/transfusjonsreaksjon>