

Synne Dalen Jordet
Magnhild Lofthus
Ane Carina Norum

Evaluering av den in vitro hemostatiske profilen av leukocyttfiltrert fullblod under lagring ved 4 °C målt ved hemostatiske-, metabolske- og hematologiske parametere

Bacheloroppgave i bioingeniørfag
Mai 2019

Synne Dalen Jordet
Magnhild Lofthus
Ane Carina Norum

Evaluering av den in vitro hemostatiske profilen av leukocyttrert fullblod under lagring ved 4 °C målt ved hemostatiske-, metabolske- og hematologiske parametere

Bacheloroppgave i bioingeniørfag
Mai 2019

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

Forord

Bacheloroppgaven ble skrevet i forbindelse med fullføringen av bioingeniørutdanningen ved Institutt for bioingeniørfag, Fakultet for naturvitenskap, ved NTNU i Trondheim. Prosjektet ble gitt av overlege ved Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin (AIT) på St. Olavs hospital, Aurora Maria Fernandez Espinosa, og gikk over perioden 11. mars 2019 til 20. mai 2019. Prosessveileder var Anne Lise Hjertø, førstelektor ved Institutt for bioingeniørfag.

Vi ønsker til slutt å rette en stor takk til Aurora og Anne Lise for god og konstruktiv rådgivning gjennom prosessen. I tillegg vil vi takke de fagansvarlige bioingeniørene Ingvild Ahne Teigum og Bente Vik Sletta ved blodbanken St. Olavs hospital for nyttig veiledning på laboratoriet, samt professor ved NTNU og overlege ved AIT Vibeke Videm for god hjelp med behandling av statistiske data.


Trondheim, 20. mai 2019



Synne Dalen Jordet



Magnhild Lofthus



Ane Carina Norum

Sammendrag

Bakgrunnen for denne oppgaven er Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin ved St. Olavs hospital sitt vedtak om å samarbeide med luftambulansen med å forsyne dem med leukocyttrerte fullblodsposer. Det er bestemt at blodposene skal kastes etter 15 dager dersom de ikke blir transfundert. Det er derfor ønskelig å se på i hvilken grad det oppstår endringer i den hemostatiske profilen, og hvordan disse eventuelt samsvarer med endringene i de metabolske- og hematologiske parametere i fullblodspose.

Det ble benyttet 15 fullblodsposer i prosjektet. Blodet ble tappet på et fullblodstappesett med et integrert trombocytbesparende filter for å fjerne leukocytter. Blodposene ble lagret i en tidsperiode på 15 dager, og analysert på dag 1, 4, 9 og 15.

Analyseresultatene fra TEG lå betydelig utenfor oppgitte referanseområder allerede på dag 1. Det ble funnet signifikante endringer i MA-verdiene og α -vinklene under lagringsperioden, men ingen signifikante endringer for R-verdiene. Det ble sett på assosiasjonen mellom enkelte parametere, der resultatene viste god assosiasjon mellom MA og antall trombocytter, og glukose og laktat, mens ingen assosiasjon mellom α -vinkel og fibrinogen.

Mulige årsaker til de dårlige MA- og α -resultatene kan være filtreringsprosessen, da filteret, som i utgangspunktet skal være trombocytbesparende, kan medføre en reduksjon av antall trombocytter. Andre mulige årsaker kan være selve leukocyttreringen, da leukocytterne spiller en viktig rolle i den hemostatiske prosessen. Fjerning av leukocytterne kan derfor ha en negativ effekt på fullblodets hemostatiske funksjon in vitro.

Videre studier er nødvendig for å bekrefte disse funnene. Det kan da være interessant å se på endringer i filtrert mot ufiltrert fullblod fra samme blodgiver. Først og fremst med tanke på at leukocytterne kan spille en større og viktigere rolle i den hemostatiske prosessen hos pasienter med traumatiske blødninger, enn det man har trodd. Basert på funnene bør også holdbarheten til fullblod revurderes.

Abstract

This study have been designed based on the decision by the Department of immunology and transfusion at St. Olavs hospital to supply The Norwegian Air Ambulance Foundation with whole blood for prehospital administration. The whole blood units shall be thrown away after a period of 15 days, given that the units have not been transfused. Therefore, it is useful to look at the hemostatic -, metabolic- and haematological parameters change during storage.

In total, 15 whole blood units were analyzed. The blood was obtained in a collection set with a filter to reduce leukocytes but the keeping most part of the platelets. The whole blood units were stored in a time period of 15 days and analyzed on day 1, 4, 9 and 15.

The results from the TEG analysis were outside normal reference ranges already on day 1. There were statistically significant differences over time for the MA-values and α -angles. Meanwhile, there were no significant difference for the R-values over time. The results showed good association between MA and the number of thrombocytes, and between glucose and lactate, but no association between α -angle and fibrinogen.

TEG results were unexpectedly low for MA and α -angle. A possible reason for this may be the filtration process, even if it is supposed to be platelet-saving, it may lead to a considerable reduction of the number of platelets in the blood unit. Another possible reason might be that the leukocytes play an important role in the hemostatic process. Leukocyte depletion may therefore have a detrimental effect on the hemostatic properties of whole blood in vitro.

Further studies are warranted to assert the importance of these findings. There might be interesting to examine changes in leukoreduced whole blood compered to non-leukoreduced whole blood from the same donor. The durability of the whole blood units should also be reconsidered, based on these findings.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Innholdsfortegnelse	IV
1.0 Innledning	1
<i>1.1 Transfusjonstjenesten i Norge</i>	<i>1</i>
<i>1.2 Blodkomponenter og blodprodukter</i>	<i>2</i>
1.2.1 Plasma.....	2
1.2.2 Erytrocytter.....	3
1.2.3 Leukocyttter.....	3
1.2.4 Trombocyttter.....	3
1.2.5 Leukocyttfiltrert fullblod.....	4
<i>1.3 Trombocyttenes rolle i hemostasen</i>	<i>5</i>
1.3.1 Endring av trombocytffunksjon under lagring.....	6
<i>1.4 Evaluering av den in vitro hemostatiske profilen av leukocyttfiltrert fullblod</i>	<i>6</i>
1.4.1 Metabolske parametere.....	6
1.4.2 Hematologiske parametere.....	8
1.4.3 Tromboelastografi.....	8
<i>1.5 Problemstilling</i>	<i>10</i>
2.0 Materiale og metode	11
<i>2.1 Prøvemateriale</i>	<i>11</i>
<i>2.2 Prøvehåndtering</i>	<i>12</i>
2.2.1 Tilleggsundersøkelse utført på dag 0.....	12
<i>2.3 Analysemetoder</i>	<i>12</i>
2.3.1 Hemostatiske parametere (TEG).....	12
2.3.2 Metabolske parametere (pH, glukose, laktat og kalium).....	13
2.3.3 Hematologiske parametere (antall trombocyttter, Hb og fibrinogen).....	14
2.3.4 Beregning av hemoglobin (g) per enhet blod.....	14
<i>2.4 Statistiske metoder</i>	<i>14</i>
<i>2.5 Resultatvurdering</i>	<i>15</i>
3.0 Resultater	16

3.1 Endringer av målte parametere i leukocyttrert fullblod under lagring	16
3.2 Assosiasjon mellom utvalgte parametere.....	20
3.3 Tilleggsundersøkelse utført på dag 0.....	21
4.0 Diskusjon.....	22
5.0 Konklusjon.....	26
6.0 Referanser	27
7.0 Vedlegg	31
<i>Vedlegg 1: Pakningsvedlegg for IMUFLEX-WB-SP blodposesett til tapping av fullblod</i>	<i>32</i>
<i>Vedlegg 2: Prosedyre for utførelse av tromboelastografi (TEG) ved Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin ved St. Olavs hospital.....</i>	<i>33</i>
<i>Vedlegg 3: Prosedyre for blodgassmåling på blodgassinstrument Epoc ved Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin ved St. Olavs hospital, 2019.....</i>	<i>37</i>
<i>Vedlegg 4: Valideringsplan for filtrert fullblod ved Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin ved St. Olavs hospital, 201</i>	<i>40</i>
<i>Vedlegg 5: T-test med gjennomsnitt for to parvise utvalg, kalium</i>	<i>42</i>
<i>Vedlegg 6: Rådata til beregning av signifikante endringer med tid.....</i>	<i>43</i>
<i>Vedlegg 7: Rådata til beregning av assosiasjoner</i>	<i>44</i>

1.0 Innledning

Blod er en ferskvare. Det er et levende, biologisk materiale som ikke kan erstattes eller fremstilles kunstig – det må gis. Som blodgiver kan man gi nok blod til å redde tre liv. Det er mange pasienter som er avhengig av blodoverføring for å overleve, og dermed er dette et livsviktig helsetilbud som blodgiverne tilfører Norge ⁽¹⁾. I dag har vi 30 godkjente blodbanker rundt om i landet som sørger for organisering av blodgivere og opprettholdelse av en tilstrekkelig blodbeholdning, som inneholder alle nødvendige blodtyper og blodkomponenter til enhver tid ⁽²⁾.

1.1 Transfusjonstjenesten i Norge

Transfusjonstjenestens formål er å kvalitetssikre blodkomponenter og blodprodukter, i tillegg til å ivareta blodgiverens og mottakerens sikkerhet med tanke på komplikasjoner og risiko for smitte. For å oppnå dette stilles strenge medisinske krav til blodgiverne ⁽³⁾.

For å kvalifisere seg som blodgiver i Norge må man være mellom 18 og 65 år, veie over 50 kg, føle seg frisk og at man ikke er i noen risikogruppe for sykdommer som kan overføres med blod ⁽³⁾.

Forskjellige evalueringsprosedyrer er med på å sikre egnede blodgivere. Evalueringen skjer før hver giving ved hjelp av et spørreskjema som er utarbeidet av Helsedirektoratet og en samtale med faglig kvalifisert helsepersonell. Ved nyregistrering skal det opplyses godt om alle forhold rundt blodgivingen; tappeprosedyrer, hvilke komponenter som framstilles, mulige konsekvenser og bivirkninger, samt informasjon om de ulike testene som utføres på blodet – ABO-typing, Rh(D)-typing, antistofscreening og -identifisering, med flere. Det utføres jevnlig serologiske undersøkelser av blodet etter infeksjonsparametere, som HIV og hepatitt, for å hindre smitteoverføring. Positivt utslag på markører for disse virusene medfører at man utelukkes som blodgiver. I tillegg holdes det et øye med blodtrykk, puls, og hemoglobin- og ferritinverdier. Jernmangel ses på som den største risikoen ved å være blodgiver, og man får derfor nøye oppfølging og tilbud om jerntabletter dersom dette er nødvendig ⁽³⁾.

Blodgiving skal være frivillig og uten betaling, og det er krav om skriftlig samtykke fra blodgiveren før tapping og testing av blodet ⁽³⁾.

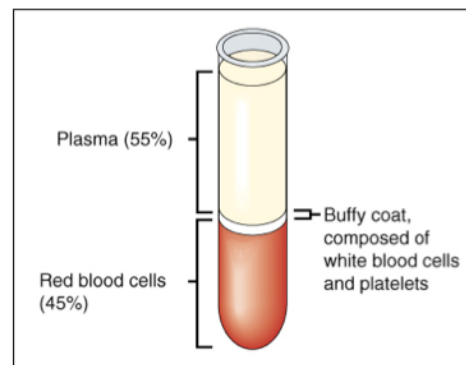
1.2 Blodkomponenter og blodprodukter

Et menneske på 70 kg har rundt 5-6 liter blod i kroppen. Blodet består av forskjellige komponenter som effektivt kan benyttes til behandling. Komponentene kan anvendes sammen eller hver for seg, avhengig av sykdom og tilstand ⁽⁴⁾.

I transfusjonsmedisinsk sammenheng skilles det mellom «komponenter» og «produkter». I blodforskriften omtales blodkomponenter som de bestanddelene fra blodet en kan fremstille ved ulike separasjonsmetoder. Disse komponentene er først og fremst plasma, erytrocytter, leukocytter og trombocytter. For at blod skal kunne benyttes til behandling må det produseres blodprodukter fra de ovenfornevnte komponentene ⁽³⁾.

Det finnes ulike metoder for fremstilling av blodprodukter. Man kan enten utføre aferese eller tappe fullblod fra blodgivere. Aferese er en metode som benyttes for å tappe ut enkelte blodkomponenter som man er interessert i, mens øvrige komponenter transfunderes tilbake til giveren ⁽³⁾.

Ved fullblodstapping overføres blodet i en pose med antikoagulerende middel, citrat-phospat-dextrose (CPD). Etter sentrifugering vil fullblodet kunne separeres i plasma, erytrocytter og buffycoat, som består av leukocytter og trombocytter. Se figur 1.1. De respektive komponentene overføres til egne poser ved hjelp av en blodseparator.



Figur 1.1: Fordelingen av komponenter i blodet etter sentrifugering. Plasma og erytrocytter utgjør størstedelen av blodvolumet. Leukocytter og trombocytter utgjør ca. 1 % ⁽³⁰⁾.

1.2.1 Plasma

Plasma utgjør væsken i blodet som er igjen etter at man har fjernet alle blodceller ved sentrifugering. Væsken består hovedsakelig av vann, men også næringsstoffer, avfallsstoffer, salter og hormoner. I tillegg finnes viktige proteiner som antistoffer, koagulasjonsfaktorer og albumin ⁽⁴⁾. Alt plasma som tappes i Norge sendes til et utenlandsk firma, Octapharma, for virusinaktivering og patogenreduisering ⁽⁵⁾. Plasmaet må fryses ned innen 24 timer etter tappetidspunkt. Det fryses ved $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ og kan oppbevares i inntil 2 år. Plasma benyttes blant annet ved store og akutte blødninger, alvorlige brannskader og til behandling av blødere ⁽³⁾.

1.2.2 Erytrocytter

Hovedoppgaven til erytrocyttene er å frakte oksygen fra lungene og rundt til alle kroppens celler. Erytrocyttkonsentratene skal være leukocytteredusert, se delkapittel 1.2.3, og inneholde lite plasma. Konsentratene tilsettes SAGMAN-væske bestående av henholdsvis saltvann, adenin, glukose og mannitol for optimale lagringsbetingelser, og oppbevares ved $4\text{ °C} \pm 2^\circ$ i inntil 35 dager. Erytrocytter benyttes i behandling til personer med anemi ⁽³⁾.

1.2.3 Leukocyter

Leukocyttene utgjør en del av immunforsvaret vårt, hvor de responderer på infeksjoner og skade. Leukocyter brukes ikke i transfusjonssammenheng, da disse blodcellene kan bære på antigener og virus som kan virke skadende på mottakeren. Alt blod som brukes ved transfusjon skal derfor være leukocytteredusert. Leukocyttene fjernes ved hjelp av spesialfiltrering ⁽⁴⁾.

1.2.4 Trombocyter

Trombocyttene sirkulerer i blodet, og reagerer raskt på skader i blodåreveggen ved å reparere og stanse blødning. Trombocyttkonsentrater fremstilles fra buffycoater og skal, som erytrocyttkonsentratene, også være leukocytteredusert. Trombocyttkonsentratene lagres på vippe ved $22\text{ °C} \pm 2^\circ$ i inntil fem døgn. Holdbarheten kan forlenges til sju døgn dersom det er mulig å utføre bakteriologiske kontroller eller patogenreduksjon ⁽³⁾. Trombocyter gis blant annet til traumepasienter med aktive blødninger, profylaktisk til kreftpasienter som får cellegiftbehandling og til pasienter med sykdommer som forårsaker et unormalt lavt antall trombocyter eller defekte trombocyter ⁽⁴⁾.

Årsaken til den korte holdbarheten til trombocyttkonsentratene i forhold til de andre blodkomponentene, kommer av risikoen for bakterievekst og infeksjonsfare hos mottakeren. Bakgrunnen for lagring ved 22 °C er studier som viser at denne typen oppbevaring optimaliserer viabiliteten til trombocyttene etter transfusjon. Lagringsmetoden har derimot vist seg å gå på bekostning av den hemostatiske aktiviteten til trombocyttene, altså hvordan de responderer på skade og blødning ⁽⁶⁾.

I senere tid har det blitt utført holdbarhetsstudier av trombocyttkonsentrater lagret ved 4 °C ⁽⁷⁾. Bakterier trives svært dårlig ved lave temperaturer og har dermed mindre mulighet til å kontaminere blodet. I tillegg lagres allerede andre blodprodukter på denne måten, noe som tilsier at oppbevaringsmulighetene allerede er praktisk tilrettelagt. Studiene har også vist at lagring ved 4 °C gjør trombocyttene mer hemostatisk aktive. Som forventet oppstår en

nedgang i viabiliteten over tid, men hos pasienter med pågående blødning sirkulerer trombocytene lenge nok til å få utført jobben de skal – nemlig å stanse blødningen. I tillegg sees en nedsatt metabolisme hos blodcellene, noe som er positivt, da aldringen til blodcellene utsettes ⁽⁶⁾.

1.2.5 Leukocyttrert fullblod

For å sikre at pasienter med store og aktive blødninger får tilpasset transfusjonsterapi, overføres en kombinasjon av blodkomponenter som likner mest mulig på fullblod, og som inneholder mest mulig av blodets normale koagulasjonsfaktorer. Med «fullblod» menes blod med alle tilhørende komponenter, slik man finner det i kroppen. Et stadig mer aktuelt alternativ til den tradisjonelle bruken av blodkomponenter er bruk av fullblod.

Fullblod benyttes i veldig liten grad ved behandling i Norge i dag, men på grunn av erfaringer fra forsvaret i USA, har fagmiljøet innenfor transfusjon fått en økende interesse rundt dette. I krigssituasjoner hvor ferskt fullblod var det eneste blodproduktet som var tilgjengelig, fant de ut at pasientene som fikk overført fullblod hadde en bedre overlevelse sammenliknet med transfusjonsterapi med blodkomponenter. Spesielt innen akuttmedisin har det blitt mer aktuelt å ta i bruk fullblod til prehospital behandling av traumepasienter, kvinner med postpartum blødning og ved kirurgi ⁽⁸⁾.

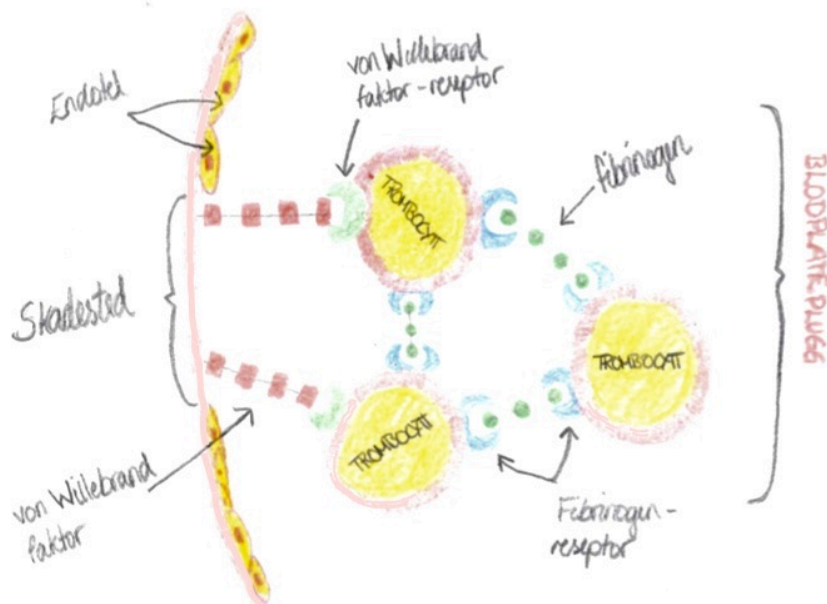
En utfordring rundt bruk av fullblod til transfusjon, er at leukocytter også er tilstede i blodet. Leukocytene kan forårsake overføring av antigener og virus, som kan føre til immunologiske og inflammatoriske transfusjonsreaksjoner. De mest vanlige er milde reaksjoner som f.eks. febrile og allergiske reaksjoner. For å minske risikoen for transfusjonsreaksjoner er det anbefalt å bruke spesielle filtre for å redusere antallet leukocytter til mindre enn 1.0×10^6 per enhet erytrocytter. I dag har man filtre som er varsom mot trombocytene og bevarer deres funksjon. Dette er viktig da trombocytene er essensielle i hemostasen ⁽⁹⁾.

Lagringsbetingelsene for leukocyttrert fullblod ved St. Olavs hospital er beskrevet i «Valideringsplan for filtrert fullblod», se vedlegg 4, og oppgir at fullblod skal lagres ved 2-6 °C i inntil 15 dager. Dette er basert på studier som har vist at trombocytter i fullblod, som er oppbevart ved 4 °C, kan vise hemostatisk effekt opp til dag 15 ⁽¹⁰⁾. I motsetning til trombocyttkonsentratene som kun er holdbare i 5-7 dager.

1.3 Trombocyttenes rolle i hemostasen

Hemostasen er et komplekst system der samspillet mellom blodkaret, trombocytterne, koagulasjonsfaktorer, aktivatorer og hemmere er viktig. Hemostasen blir delt inn i tre ulike faser, primær hemostase, sekundær hemostase og fibrinolyse. Den primære hemostasen har som funksjon å danne trombocyttplugg og det er her funksjonen til trombocytterne er viktig (11).

Det første som skjer ved en skade er at blodkaret trekker seg sammen. Dette reduserer blodstrømmen til området og subendotelet vil komme i kontakt med blodet. I subendotelet ligger Von Willebrand faktor (VWF), som har fangarmer som trekker til seg trombocytterne, dette kalles adhesjon. Trombocytterne blir aktivert og under aktiveringa blir blant annet reseptorer for fibrinogen vist fram. Fibrinogen, som er et protein som finnes løst i blodet og den viktigste koagulasjonsfaktoren, fester seg til reseptorene og videre får man en trombocyttaggregasjon (11).



Figur 1.2: De ulike komponentene i den primære hemostasen; von Willebrand-faktor som kommer ut fra skadestedet i endotelet, reseptorene for VWF på trombocytterne, og fibrinogen som er festet til fibrinogenreseptorene på trombocytterne. Dette utgjør blodplatepluggen.

Etter danning av platepluggen må denne forsterkes, der målet er å omdanne fibrinogen til fibrin ved hjelp av trombin. Omdanningen skjer ved en rekke koagulasjonsfaktorer der det skjer en kaskade av reaksjoner. Det er flere ulike aktiveringer av reaksjonen som gjør at en til slutt sitter igjen med fibrin. Fibrinet er viktig da det legger seg utenpå trombocyttpluggen som

et nettverk og forsterker pluggen. I tillegg er det en faktor som gjør at fibrinet blir kryssbundet og med det holder seg sterkere ⁽¹¹⁾.

Det tredje trinnet i hemostasen er fibrinolyse, nedbrytingen av fibrin, der plasmin er proteinet som hjelper til med denne prosessen. Plasminogen er den inaktive formen av plasmin og ved hjelp av tissue plasminogen aktivator (TPA) blir plasminogen omdannet til plasmin. Når fibrinolysen har gjort jobben vil hele karet være reparert, lukket igjen og hemostasen er utført ⁽¹¹⁾.

1.3.1 Endring av trombocytffunksjon under lagring

I tiden fra blodet tappes fra giveren og til det transfunderes til mottakeren, utsettes blodproduktet for mekanisk stress som kommer av blant annet fremmede overflater og hard behandling ved filtrering. Det oppstår biokjemiske, strukturelle og funksjonelle forandringer hos blodcellene under lagring, som med en samlebetegnelse er kjent som «storage lesion». Disse endringene kan påvirke trombocytffunksjonen etter transfusjon, og er derfor viktig å kontrollere. Trombocytterne kan aktiveres ved fysisk stimuli in vitro. For å unngå uhensiktsmessig aktivering spiller derfor lagringsbetingelsene en viktig rolle. Platelet storage lesion (PSL) er assosiert med nedsatt in vivo viabilitet og hemostatisk aktivitet. Forandringene har flere årsaker og er ikke fullt ut forstått. Det primære målet er å bevare platenes struktur, form og funksjon gjennom fremstilling og lagring ⁽¹²⁾.

1.4 Evaluering av den in vitro hemostatiske profilen av leukocytfiltrert fullblod

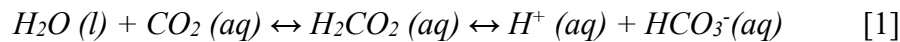
Det er et økende behov for transfusjon av trombocytter, men tilgjengeligheten er derimot begrenset. Dette kommer av den korte holdbarheten på grunn av dagens lagringsmetoder av trombocyttkonsentrat ⁽¹²⁾. Dermed blir fullblod, som stiller andre krav til lagring, vurdert som et bedre alternativ. Det finnes flere måter å evaluere trombocyttenes tilstand i fullblod på, blant annet ved å se på cellenes metabolisme og hematologiske forandringer.

1.4.1 Metabolske parametere

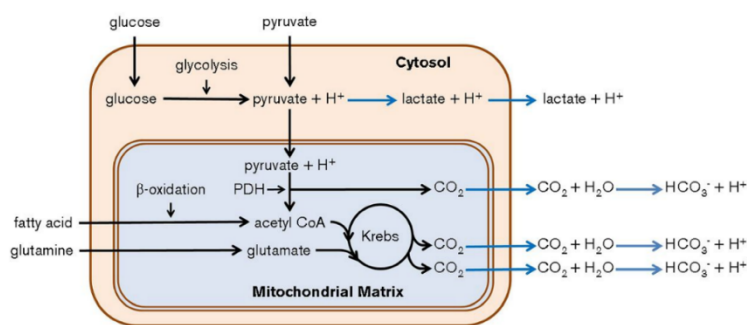
Alle kroppens celler trenger energi for å fungere. Energien dannes fra næringsstoffer gjennom kjemiske prosesser i metabolismen. Sentrale parametere i metabolismen er blant annet glukose, laktat og kalium. For at cellene skal fungere normalt er det også nødvendig med fysiologisk pH. Det er disse parameterne som skal måles på i denne bacheloroppgaven.

Blodcellenes respirasjon foregår via to metabolske veier, hvor sluttproduktet i begge veiene er karbondioksid (CO₂). CO₂ er en flyktig syre som kan påvirke pH i blodet. IMUFLEX-WB-SP

blodposene, nærmere beskrevet i kapittel 2.1, er ikke permeable for oksygen og karbondioksid, noe som ikke tillater gassutveksling med omgivelsene. Opphopningen av CO_2 fører til en høyreforskyvning i Henderson-Hasselbach's likning, se likning [1]. Dette gir økt dannelselse av frie hydrogenioner (H^+) og dermed en lavere pH ⁽¹³⁾.



Ved normal pH opprettholder blodcellene energiomsetningen sin så lenge det er glukose tilstede. I glykolysen blir glukose omdannet til laktat, samtidig som det produseres H^+ , se figur 1.3. H^+ blir videre omdannet til CO_2 og H_2O ved hjelp av bikarbonat (HCO_3^-) som finnes i plasma. Omdannelsen skjer etter likning [1] ⁽¹³⁾.



Figur 1.3: Oversikt over trombocyttenes respirasjon ⁽³¹⁾.

Cellenes metabolske prosesser vil medføre endringer i de biokjemiske parameterne under lagring. Glykolysen vil gi en nedgang i glukosekonsentrasjonen og en økning i laktatkonsentrasjonen. Hvis laktatkonsentrasjonen blir for høy, kan dette resultere i en rask nedgang i pH. En pH lavere enn 6,0 assosieres med nedsatt levedyktighet hos trombocyttenes ⁽¹³⁾.

Kalium er en elektrolytt som er livsnødvendig for mennesker. Klinisk hyperkalemi hos pasienter som har fått transfundert store volum erytrocyttkonsentrat er en kjent komplikasjon. Dette kan i verste fall forårsake hjertestans da overskuddet av kalium fører til elektrolytt- og syre/base-forstyrrelser hos pasienten. Kalium er dermed en viktig parameter å følge med på, også ved oppbevaring og transfusjon av fullblod ⁽¹⁴⁾. Erytrocytter inneholder rundt 20 ganger så mye kalium som plasma ⁽¹⁵⁾. De påvirkes av lagringsbetingede forandringer som kan føre til irreversible strukturelle forandringer i cellemembranen. I membranen finnes det Na/K-pumper som er viktige for opprettholdelsen av den intracellulære elektrolyttkonsentrasjonen. Disse pumpene er sensitive for lave temperaturer, og under slike forhold kan det oppstå lekkasje av kalium fra disse pumpene som gir en gradvis økning av kalium ekstracellulært ⁽¹⁵⁾.

1.4.2 Hematologiske parametere

De hematologiske parameterne som skal måles i denne bacheloroppgaven er antall trombocytter, hemoglobin og fibrinogen.

Da trombocytterne har kort levetid in vivo vil dette også påvirke levetiden under lagring in vitro⁽¹⁷⁾. Derfor vil det være en naturlig nedgang i antallet trombocytter i blodposene over tid. I tillegg påvirker de lagringsbetingede endringene trombocyttenes morfologi, altså form og størrelse. Disse endringene kan gi utslag på celtellingen, da impedansprinsippet baserer seg på morfologien til blodcellene, se delkapittel 2.3.3. Antall trombocytter har også noe å si for styrken på koagelet i hemostasen og er dermed en viktig parameter å analysere.

I denne oppgaven måles hemoglobin (Hb) først og fremst for å følge med på hemolysegrad, og om verdiene i blodposene oppfyller kvalitetskravet for Hb per enhet. Kravet til fullblodsposer er i valideringsplanen for filtrert fullblod utarbeidet av St. Olavs hospital, oppgitt til å være >43 gram Hb per enhet, se vedlegg 4.

Fibrinogen betegnes som en av de viktigste koagulasjonsfaktorene, som nevnt tidligere i delkapittel 1.3, og er essensiell for opprettholdelse av hemostasen og koageldannelse. Den er også den første koagulasjonsfaktoren som faller til kritiske nivåer, <1,0 g/L, ved massive blødninger⁽¹⁸⁾. Det er dermed en viktig parameter å analysere ved koagulasjonsforstyrrelser. I dag kan fibrinogen transfunderes med plasma eller som konsentrat.

1.4.3 Tromboelastografi

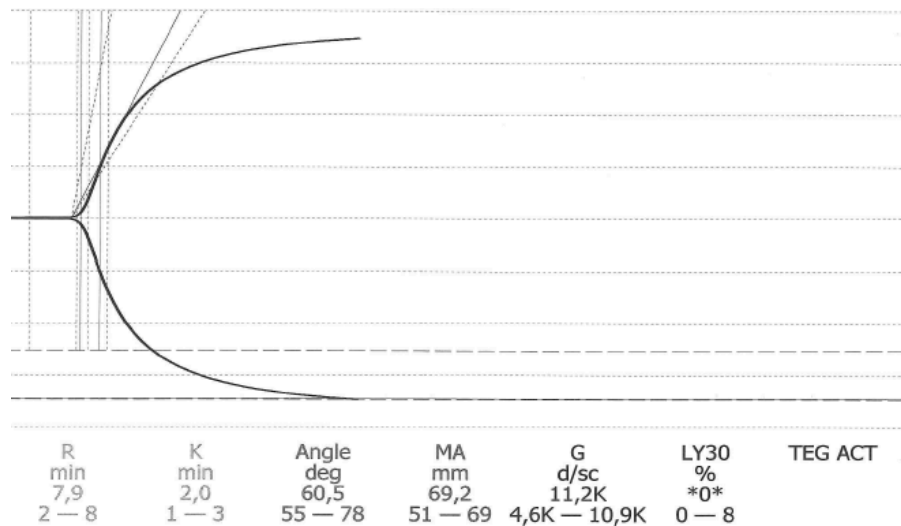
Tromboelastografi, TEG, er en analysemetode som benyttes for å undersøke en pasients koagulasjonsstatus. Det benyttes i situasjoner som ved traumer med massive blødninger, blødninger ved hjertekirurgi, levertransplantasjoner, blødninger etter fødsel eller uventede store blødninger. Det grafiske bildet man får av analysen, TEG-profilen, gir informasjon om den blødende pasienten har størst behov for trombocytter, fibrinogen eller koagulasjonsfaktorer⁽¹⁹⁾.

Metoden bygger på å simulere koagulasjonsprosessen in vitro og få et mest mulig korrekt bilde på hele den hemostatiske prosessen i prøven. For å kunne måle det cellulære bidraget i koagulasjonen utføres TEG i fullblod. Kalsiumklorid og koalin fungerer som aktivatorer for koagulasjon. Koalin blandes med citratblod og dette pipetteres videre over i en kopp med kalsiumklorid. Koppen roterer med en bestemt vinkel som holder en temperatur på 37 °C. En stålpinne er festet til den roterende koppen og ved hjelp av en sensor registreres motstanden i prøven og koagelets viskoelastiske egenskaper måles. Denne motstanden er forårsaket av

dannet fibrin, som ved kryssbindinger danner det hemostatiske koagelet. Signalene fra detektoren omgjøres til en grafisk kurve ⁽²⁰⁾.

Fra kurven kan man lese av ulike variabler, der de tre variablene reaksjonstiden (R), maksimal amplitude (MA) og koagulasjonsvinkelen (α -vinkel), anses som de av størst klinisk nytte.

Figur 1.4 viser disse variablene i en normal TEG-kurve.



Figur 1.4: Eksempel på en normal TEG-kurve. Referanseområdet for hver variabel er angitt under pasientens verdi. R forteller om innholdet av koagulasjonsfaktorer i pasientens blod, MA, er den maksimale avstanden mellom linjene til kurven og α (angitt som «Angle deg» i figuren) viser til hvor raskt styrken til koagelet øker over tid.

Reaksjonstiden, R, er tiden det tar fra analysestart til dannelse av fibrin, målt i minutter. R-verdien er avhengig av konsentrasjonen og funksjonen til koagulasjonsfaktorene. En forlenget reaksjonstid sees derfor blant annet ved lave nivåer av koagulasjonsfaktorer. I prøver fra pasienter som har mottatt heparin i behandling, vil heparin i prøven også kunne hemme koagulasjonsfaktorer og gi forlenget R-verdi ⁽²⁰⁾.

MA-verdien, som oppgis i millimeter, viser til den maksimale styrken til koagelet som blir dannet og gjenspeiler trombocytffunksjonen. En antar at 80 % av MA-verdien er forårsaket av trombocytffunksjonen og 20 % skyldes fibrinogenninnholdet. En lav MA-verdi tyder på et svakt koagel, og gjenspeiler dårlig trombocytffunksjon eller redusert nivå av funksjonelle trombocytter. Høy MA tyder på et sterkt koagel og sees ved trombofili ⁽¹⁹⁾.

Koagulasjonsvinkelen, α , viser hvor bratt kurven stiger etter koagulasjonstiden, R. Den viser altså til hvordan styrken til koagelet øker over tid. Vinkelen er avhengig av fibrinogen, funksjonelle trombocytter og koagulasjonsfaktorer. Verdien henger i stor grad sammen med

fibrinogeninnholdet og brukes i veiledning av fibrinogenterapi. α -vinkelen tolkes i sammenheng med MA-verdien. En lav MA-verdi og en lav α -vinkel kan gi mistanke om lavt fibrinogennivå i prøven ⁽¹⁹⁾.

1.5 Problemstilling

Sykehuset Innlandet og Haukeland Sykehus er de sykehusene i Norge som i dag benytter leukocyttfiltrert fullblod til transfusjon innen akuttmedisin. I 2017 bestemte også ledelsen ved Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin på St. Olavs hospital seg for å etablere et prosjekt for validering av leukocyttfiltrert fullblod. I tillegg har luftambulansen kommet med forespørsel om filtrert fullblod til oppbevaring om bord i helikopter og ved akuttmottaket.

Målet med denne oppgaven er å evaluere den in vitro hemostatiske profilen av leukocyttfiltrert fullblod under lagring. Samt finne ut i hvilken grad det oppstår endringer av TEG-parametere og hvordan disse samsvarer med eventuelle endringer i de hematologiske parameterne; antall trombocytter, fibrinogen og hemoglobin, og de ulike metabolske parameterne; pH, glukose, laktat og kalium.

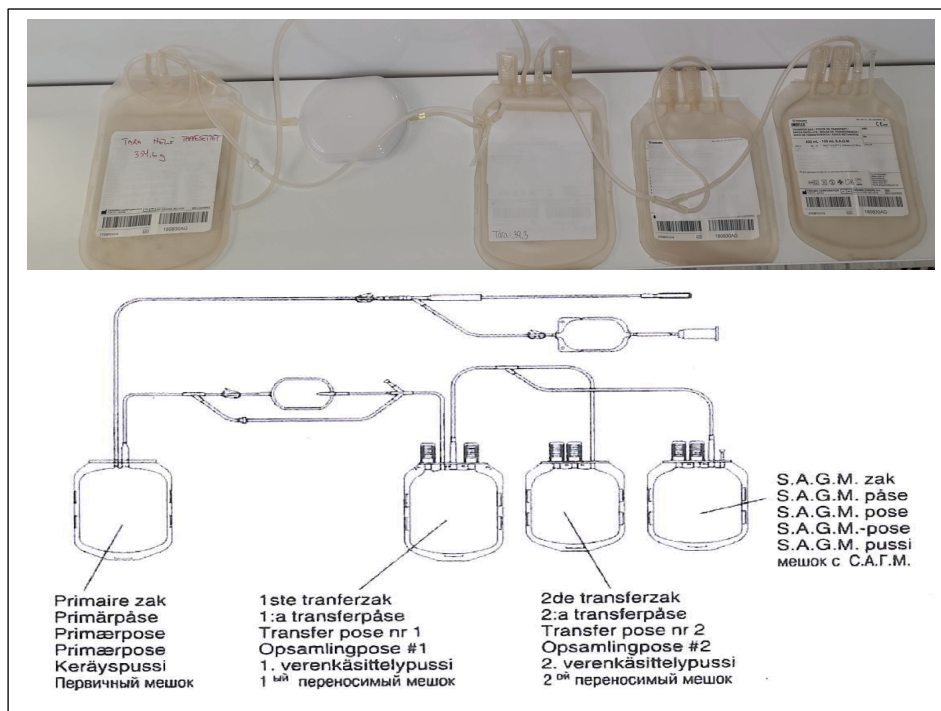
2.0 Materiale og metode

2.1 Prøvemateriale

I denne oppgaven ble det benyttet 15 fullblodsposer fra friske blodgivere. Tappingen ble utført av personell på blodbanken ved St. Olavs hospital. Blodet var både av blodtype A, B og O og alle var Rh(D)-positive.

Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin ved St. Olavs hospital har validert et spesielt tappesett, IMUFLEX-WB-SP, til bruk ved tapping av fullblod. Se figur 2.1. Disse posene ble benyttet til tapping av blodgiverne og ble transportert fra blodbanken via rørpostsystemet til laboratoriet. Videre ble de lagt på en kjøleplate som holdt 20 °C.

Fullblodsposene lå på platen i minimum 2 timer før filtrering. Filtreringen av fullblodet ble gjennomført i henhold til pakningsvedlegget, se vedlegg 1. Målet er å fjerne leukocytene fra resten av blodet ved å føre det gjennom et filter.



Figur 2.1: IMUFLEX-WB-SP blodposesett til tapping av fullblod. Settet inneholder en primærpose som er tilsatt 63 mL antikoagulantløsningen CPD, to oppsamlingsposer, en pose som inneholder SAGMAN-løsning, i tillegg til et integrert trombocytbesparende filter for filtrering av leukocytter. Filteret sees som den hvite boksen mellom primærposen og oppsamlingspose nr. 1.

Etter endt filtrering ble oppsamlingspose nr. 1 sveiset av de resterende posene. For å oppnå standardiserte betingelser ble dette gjort på samme sted før veiing. «Sampling site coupler» ble også satt inn før veiingen for å oppnå lik tara ved alle veiingene. Dette blir gjort for å

finne vekten på blodet for å kunne beregne Hb (g) per enhet blod. Til slutt ble blodposene lagt til lagring ved 4°C og var dermed klare til å bli analysert på de aktuelle dagene.

2.2 Prøvehåndtering

For å undersøke den hemostatiske profilen i fullblodsposeene ved TEG-analyse, ble det brukt citratblod. Fra hver blodposeenhet ble det derfor tatt ut blod på et Na-citratrør til TEG-analyse på bestemte dager. Det ble benyttet samme type prøverør til analysering av fibrinogen, men tatt på egne glass. For analysering av hemoglobin og antall trombocytter ble det benyttet EDTA-blod. For analysering av de metabolske parameterne glukose, laktat, pH og kalium ble det tatt blodprøver direkte fra fullblodsposeene ved hjelp av en sprøyte.

De nevnte parameterne ble testet på ulike dager for å se på eventuelle endringer under lagring ved 2-6 °C. Testene foregikk på dag 1, 4, 9 og 15. Tappedagen for blodposene ble satt til dag 0.

2.2.1 Tilleggsundersøkelse utført på dag 0

Ved analysering av de fem første blodposene ble det registrert at de fleste TEG-verdiene lå utenfor oppgitte referanseverdier allerede på analysedag 1. Basert på disse uventede dårlige TEG-resultatene, ble det gjennomført en tilleggsundersøkelse på blodpose nr. 6-10 for å avdekke eventuelle tekniske feil ved behandling og analysering av prøvematerialet.

Undersøkelsen gikk ut på å utføre TEG-analyser på dag 0 av prøver tatt rett fra blodgiverne, fra blodposene rett før filtrering og fra blodposene rett etter filtrering.

2.3 Analysemetoder

2.3.1 Hemostatiske parametere (TEG)

Kontroll

- TEG 5000 Hemostasis System, Level I Control (Haemoscope)
- TEG 5000 Hemostasis System, Level II Control (Haemoscope)

Reagenser

- TEG 5000 Hemostasis System Koalin Reagent (Haemoscope)
- TEG 5000 Hemostasis System 0,2 M CaCl₂ (Haemoscope)

Utstyr

- Instrument: Tromboelastograf® Modell 5000, MTAnr. 47485. Software Versjon 4.2.3 (Haemoscope)
- TEG 5000 Disposable Cups and Pins (Haemoscope)

Analyseprinsipp

Se avsnitt 1.4.3.

Framgangsmåte

Utførelsen av TEG-analysen ble gjort i henhold til prosedyre, se vedlegg 2. Analysering av kontroller ble utført en gang per uke av personale ved blodbanken St. Olavs hospital.

2.3.2 Metabolske parametere (pH, glukose, laktat og kalium)

Kalibrator

- Kalibratorvæske som ligger inne i hvert enkelt kort (Simens Healthineers)

Kontroll

- Eurotrol GAS-ISE Metabolites level 1 og 3 (Simens Healthineers)

Utstyr

- Instrument: Epoc® Blood Analysis System (Simens Healthineers)
- BGEM testkort for Epoc (Simens Healthineers)
- Sprøyter (1-2mL) med tilhørende kanyler (Simens Healthineers)

Analyseprinsipp

For de metabolske parameterne skjer alle reaksjonene på Epoc testkort som inneholder et område som blir kalt «sensor module». Denne delen består av en rekke med 14 elektroder med 14 tilhørende hull der prøven vil legge seg, og avhengig av hvilken analyse som blir målt, blir det enten brukt potensiometri, amperimetri eller konduktometri. Analysene kalium og pH blir målt ved hjelp av potensiometri der kortet registrerer endringer i spenning mellom referanseelektrode og elektroder som er følsomme for analytten. For glukose og laktat blir det benyttet amperimetrisk måling der kortet registrerer endringer i strømstyrke mellom to elektroder påtvunget en konstant spenning, hvorav den ene er følsom for analytten⁽²⁾.

Fremgangsmåte

Testkortet ble ført inn i Epoc Reader og kalibreringen av kortet ble gjort automatisk ved innsettelse. Når kalibreringen er utført, kan prøvemateriale tilsettes. Dette ble gjort ved å hente opp en liten mengde prøvemateriale fra blodposen ved hjelp av en sprøyte og avsatt i et lite hull i testkortet. Konsentrasjonen av analyttene ble beregnet i Epoc Reader, for deretter å bli sendt til Epoc Host med en liten skjerm som en kan lese resultatene fra.

2.3.3 Hematologiske parametere (antall trombocytter, Hb og fibrinogen)

Analysering av fibrinogen, hemoglobin og antall trombocytter ble utført av bioingeniører på Avdeling for medisinsk biokjemi (AMB) ved St. Olavs hospital.

Hemoglobinkonsentrasjon og antall trombocytter i fullblodspose ble analysert på Sysmex XN 9000. Instrumentet benytter en cyanidfri fotometrisk metode (SLS) for kvantifisering av hemoglobin. For kvantifisering av antall trombocytter benyttes metoden impedans, som bygger på et motstandsprinsipp. Blodceller blandes med en væske og føres gjennom en kanal mellom to elektroder. I kanalen går det også en elektrisk strøm. Idet en celle passerer gjennom kanalen registreres dette som en motstand som er proporsjonal med størrelsen på cellen. På denne måten skilles de ulike cellenetyper på størrelse og kan telles⁽²²⁾.

Fibrinogenkonsentrasjonen i fullblodspose ble analysert på ACL TOP 750, der analysen bygger på Clauss metode. Clauss metode går ut på å måle hastigheten av koageldannelse. Citratplasma fortynnes for å unngå optisk interferens på grunn av den gule egenfargen. I tillegg tilsettes et overskudd av trombin, slik at fibrinogen i prøven kan omdannes til fibrin. Omdannelsen detekteres optisk, og hastigheten til platepluggdannelsen er invers proporsjonal med fibrinogenkonsentrasjonen⁽²³⁾.

Da disse analysene ble utført ved AMB, er ikke analyseprinsippene beskrevet nærmere.

2.3.4 Beregning av hemoglobin (g) per enhet blod

For beregning av Hb per enhet ble følgende formler benyttet:

Formel for beregning av volum fullblod i posen:

$$\frac{\text{Bruttovekt filtrert fullblod inkl.CPD (g)} - \text{tara filtrert fullblodspose (g)}}{\text{Spesifikk vekt fullblod (g/dl)}} \quad [2]$$

Formel for beregning av mengde Hb (g) per enhet:

$$\frac{\text{Hb (g/dl)} * \text{volum fullblod (mL)}}{100} \quad [3]$$

2.4 Statistiske metoder

Programvaren «Microsoft Office Excel 2016, versjon 1903» ble benyttet til behandling av rådata. Det ble laget spredningsdiagram for de målte parameterne med beregnede gjennomsnittsverdier og standardavvik på de ulike analysedagene. I tillegg ble det laget diagrammer som viser assosiasjon mellom bestemte parametere. For kalium ble det utført en

T-test med gjennomsnitt for to parvise utvalg, da dataene fra dag 9 og dag 15 ikke kan benyttes. Dette kommer av at den maksimalt målbare verdien på analyseinstrumentet som ble brukt var på 12 mmol/L og flertallet av prøvesvarene på disse dagene var på >12 mmol/L.

For å kunne vurdere om det oppstod signifikante endringer for de ulike parameterne under lagring, ble det utført en analyse kalt «linear mixed models» på programvaren «Stata, versjon 15». Denne typen analyse tar hensyn til at prøvene er tatt fra samme blodpose flere ganger, og at det dermed er en viss korrelasjon mellom prøvesvarene. I tillegg tar analysen hensyn til at tiden mellom hver prøvetakning ikke er like lang, grunnet de bestemte analysedagene 1, 4, 9 og 15. Dag 4, 9 og 15 ble sammenliknet med dag 1 og gir dermed svar på eventuelle endringer som oppstår med tid. Det ble også gjort statistiske beregninger av assosiasjonen, altså samsvaret, mellom bestemte parametere. Disse var MA og antall trombocytter, α -vinkel og fibrinogen, og glukose og laktat.

2.5 Resultatvurdering

Det ble beregnet gjennomsnittsverdier ut fra rådataene for hver enkelt dag. Sammen med spredningen av tallmaterialet og beregnede standardavvik for de analyserte parameterne, ble disse plottet inn i diagrammer. Dette ble gjort for å se på utviklingen til de ulike parameterne gjennom lagringsperioden.

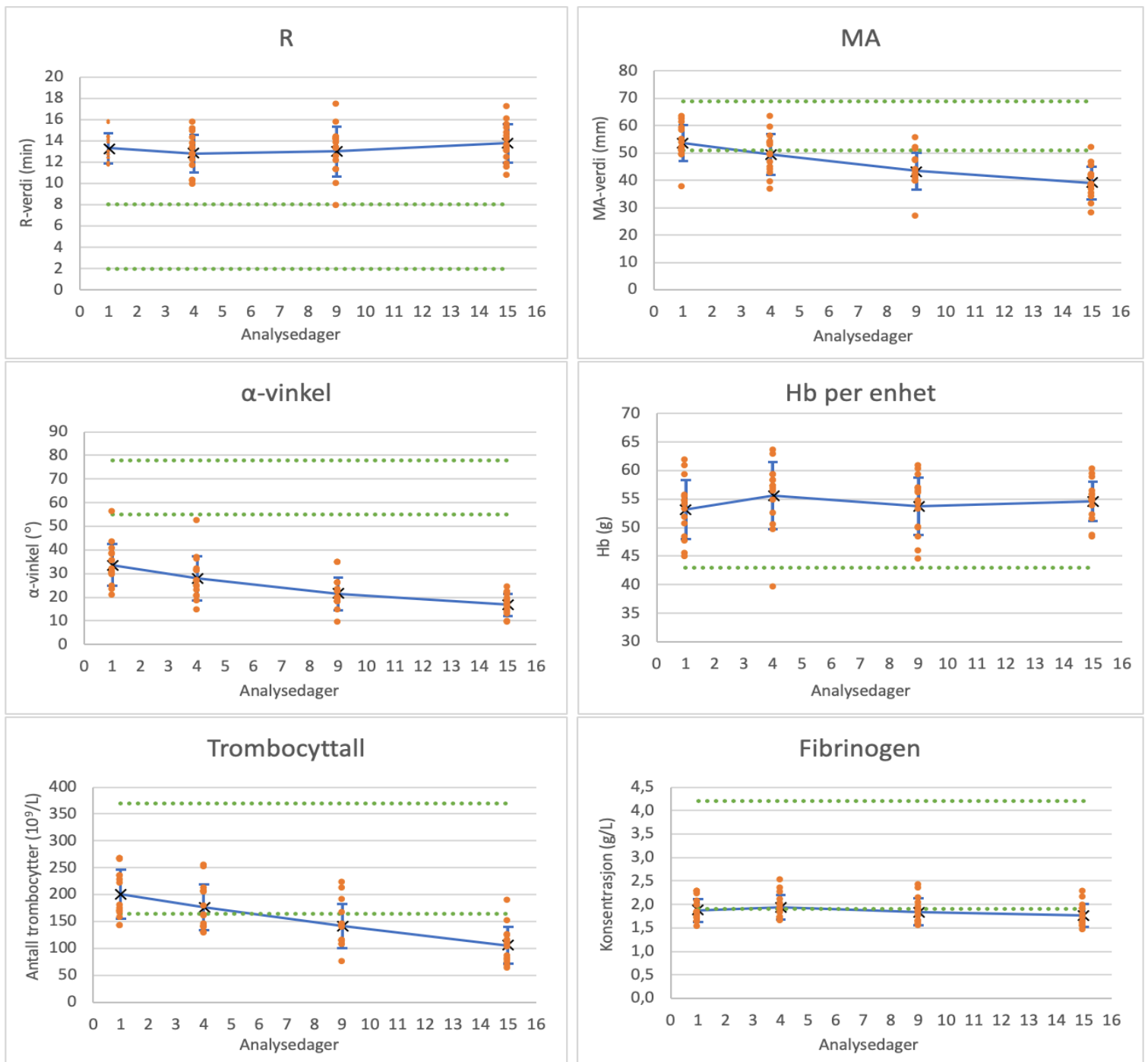
For å se på om de eventuelle endringene var signifikante eller ikke, ble det beregnet p-verdier for de ulike parameterne. P-verdier under 0,05 tyder på signifikante endringer. I tillegg ble prosentvis endring beregnet for å vurdere hvor store de eventuelle endringene var. For å se på om assosiasjonen mellom de bestemte parameterne, som nevnt i delkapittelet over, var signifikant ble det også her beregnet p-verdier hvor verdier under 0,05 tyder på signifikant assosiasjon mellom de valgte parameterne.

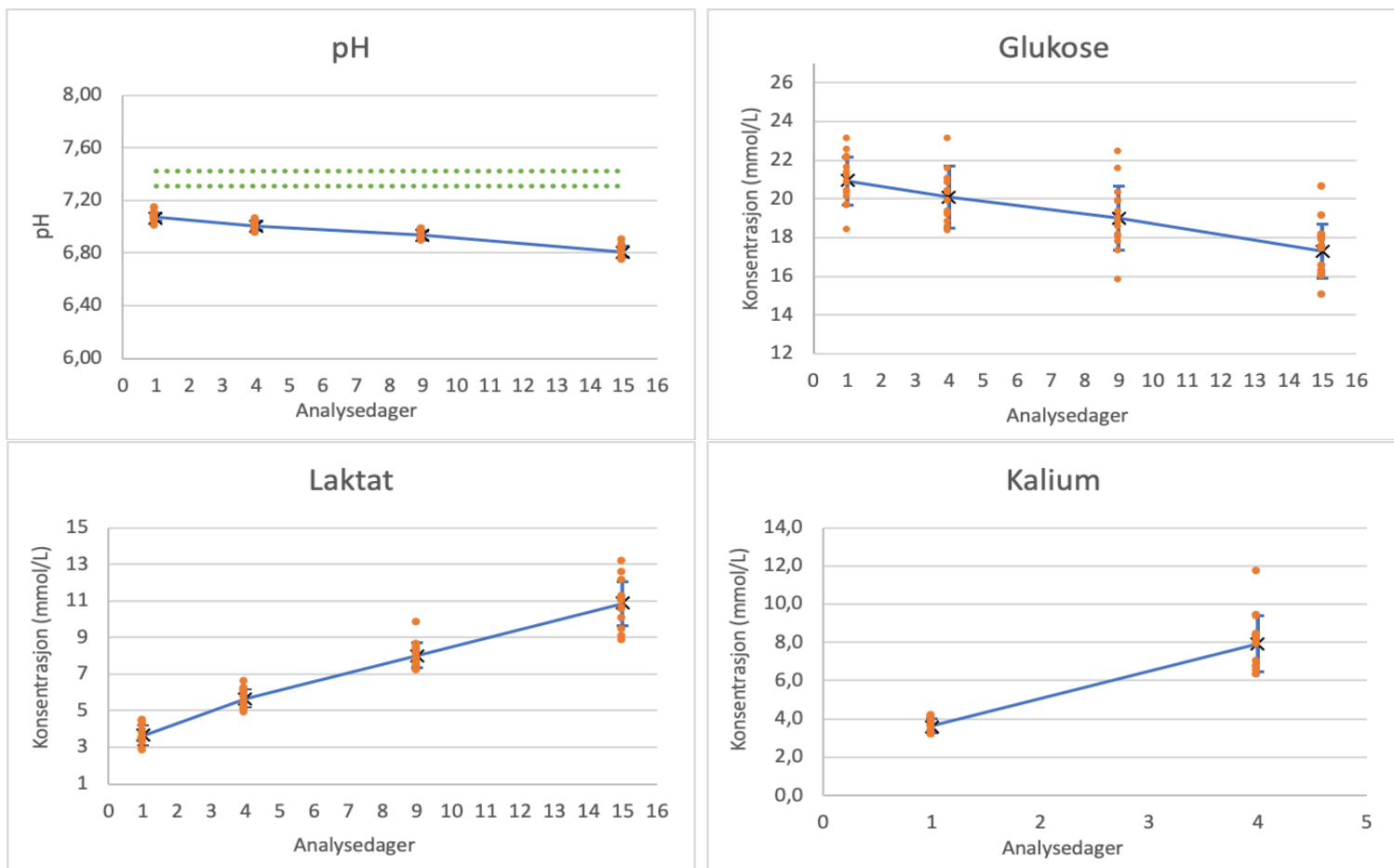
Referanseområdene blir brukt for å vurdere hvorvidt verdiene ligger i normalområdene for de ulike parameterne, og kan dermed gi en indikasjon på holdbarheten til parameterne i fullblodspose.

3.0 Resultater

For å evaluere den hemostatiske profilen av leukocytffiltrert fullblod i en lagringsperiode på inntil 15 dager, ble blod fra 15 blodgivere analysert for hemostatiske, hematologiske og metabolske parametere på fire ulike dager etter tapping. Endringene blir framstilt i figur 3.1 og tabell 3.1 under. Det ble også sett på hvordan den hemostatiske profilen samsvarer med bestemte metabolske og hematologiske endringer, vist i figurene i delkapittel 3.2.

3.1 Endringer av målte parametere i leukocytffiltrert fullblod under lagring





Figur 3.1: Målinger av hemostatiske, hematologiske og metabolske parametere for 15 fullblodsposer på analysedag 1, 4, 9 og 15. \pm ISD er vist ved blå vertikale linjer og gjennomsnittsverdier for hver enkelt analysedag er vist ved X. Grønne stiplede linjer viser referanseområder eller referanseverdier for de enkelte parametere. Referanseområdene for glukose, laktat og kalium er ikke tatt

Tabell 3.1: Middelerverdi og spredningsmål (\pm ISD) for alle målingene på de fire ulike dagene, samt prosentvis endring under lagringsperioden.

Parameter	Dag 1	Dag 4	Dag 9	Dag 15	%-endring mellom dag 1 og dag 15
	mean \pm SD	mean \pm SD	mean \pm SD	mean \pm SD	mean \pm SD
R (min)	13,3 \pm 1,4	12,8 \pm 1,8	13,0 \pm 2,3	13,8 \pm 1,8	4,4 \pm 17,4
MA (mm)	53,7 \pm 6,6	49,6 \pm 7,4	43,4 \pm 6,8	39,0 \pm 6,0	-26,7 \pm 11,5
α (°)	33,7 \pm 9,0	27,8 \pm 9,3	21,4 \pm 6,8	16,7 \pm 4,5	-47,9 \pm 18,8
Hb/enhet (g)	53,1 \pm 5,2	55,6 \pm 5,9	53,7 \pm 5,1	54,6 \pm 3,5	3,6 \pm 11,4
Trombocytall (*10 ⁹ /L)	201 \pm 46	176 \pm 43	141 \pm 41	106 \pm 34	-47,0 \pm 12,1
Fibrinogen (g/L)	1,9 \pm 0,2	1,9 \pm 0,3	1,8 \pm 0,3	1,8 \pm 0,2	-5,9 \pm 4,5
pH	7,1 \pm 0,03	7,1 \pm 0,03	6,9 \pm 0,03	6,8 \pm 0,04	-3,7 \pm 0,7
Glukose (mmol/L)	20,9 \pm 1,2	20,1 \pm 1,3	19,0 \pm 1,7	17,3 \pm 1,4	-17,4 \pm 4,0
Laktat (mmol/L)	3,6 \pm 0,5	5,7 \pm 0,5	8,0 \pm 0,7	10,8 \pm 1,2	202,8 \pm 48,5
Kalium (mmol/L)	3,6 \pm 0,4	7,9 \pm 1,5	- *	- *	118,2 \pm 21,5

* Spredningsmål for kalium er ikke beregnet på dag 9 og 15 da maksimalt målbare grense på instrumentet var 12 mmol/L og verdiene på disse dagene overskrider dette.

Tabell 3.2: P-verdier til de ulike parameterne, som viser til graden av likheten mellom utvalgene. P-verdier er hentet fra rådata i vedlegg 6.

Parameter	Dag 4	Dag 9	Dag 15
	p-verdi	p-verdi	p-verdi
R (min)	0,23	0,60	0,41
MA (mm)	0,08	<0,001	<0,001
α (°)	<0,01	<0,001	<0,001
Hb per enhet (g)	0,44	0,52	<0,01
Trombocytall (*10 ⁹ /L)	<0,001	<0,001	<0,001
Fibrinogen (g/L)	<0,001	0,12	<0,001
pH	<0,001	<0,001	<0,001
Glukose (mmol/L)	<0,01	<0,001	<0,001
Laktat (mmol/L)	<0,001	<0,001	<0,001
Kalium (mmol/L)	<0,001*	- **	- **

* For beregning av p-verdi for kalium er det benyttet T-test med gjennomsnitt for to parvise utvalg, vist i vedlegg 5.

** Det er ikke beregnet p-verdi for dag 9 og 15 da instrumentet ikke måler verdier over 12 mmol/L.

Det ble ikke funnet noen signifikante endringer med tid for R-parameteren ($p > 0,05$), noe som tilsier at den holder seg ganske stabil gjennom lagringsperioden. Figur 3.1 viser også at R-verdiene ligger langt over oppgitt referanseområde på 2-8 minutter. For MA ble det funnet signifikante endringer for dag 9 og dag 15 ($p < 0,05$). I tillegg viser figuren at MA-verdiene ligger innenfor referanseområdet (51-69 mm) fram til dag 4, men at de synker med 27 % fram mot dag 15. De målte verdiene for α -vinkel viser signifikante endringer på alle dagene, med en gjennomsnittlig prosentvis nedgang på hele 48%. Verdiene ligger under nedre referansegrense (55-78°).

Analyseresultatene til hemoglobin viser kun signifikant endring ved dag 15 og målingene er innenfor kvalitetskravet > 43 gram per enhet blod. Antallet trombocytter ligger innenfor referanseområdet ($164-370 \cdot 10^9/L$) fram til dag 4, men synker stabilt fram mot dag 15 med en prosentvis nedgang på hele 47,0%. Det ble funnet signifikante endringer ved alle dager. Fibrinogenkonsentrasjonen ligger i nedre del av referanseområde (1,9-4,2 g/L) gjennom hele lagringsperioden. Det ble funnet signifikante endringer i konsentrasjonen ved dag 4 og dag 15.

For pH er det signifikante endringer ved alle dager sammenliknet med dag 1. Her er målingen fra pose 7 på dag 4 ikke tatt med, da den er helt avvikende fra de andre målingene. Figuren viser at alle verdiene ligger utenfor referanseområdet for pH i venøst blod (7,31-7,42). Det ble også funnet signifikante endringer i glukose- og laktatkonsentrasjonen ved alle dager.

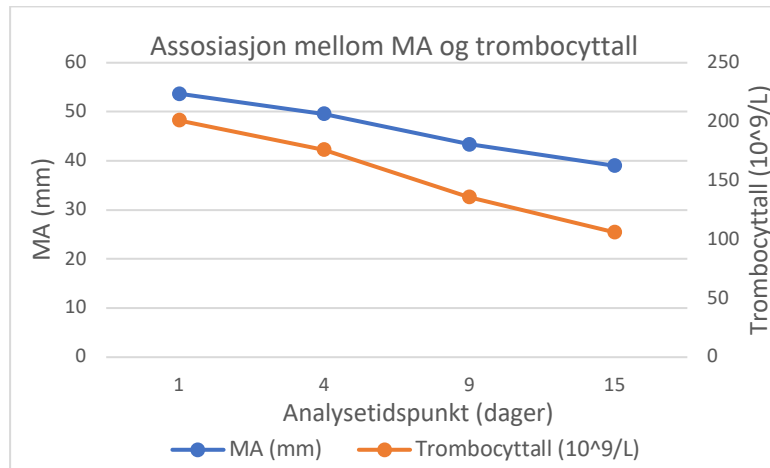
Glukosekonsentrasjonen synker gjennomsnittlig med 17,4%, mens laktatkonsentrasjonen stiger med 202,8% gjennom lagringsperioden. Når det gjelder målingene av kalium er det kun tallene fra dag 1 og 4 som blir brukt i beregningene. Etter utført T-test med gjennomsnitt for to parvise utvalg, se vedlegg 5, ble det funnet en signifikant endring i kaliumkonsentrasjonen fra dag 1 til dag 4.

Alle referanseområder er hentet fra St. Olavs laboratoriehåndbok for medisinsk biokjemi og immunologi ⁽²⁴⁾.

3.2 Assosiasjon mellom utvalgte parametere

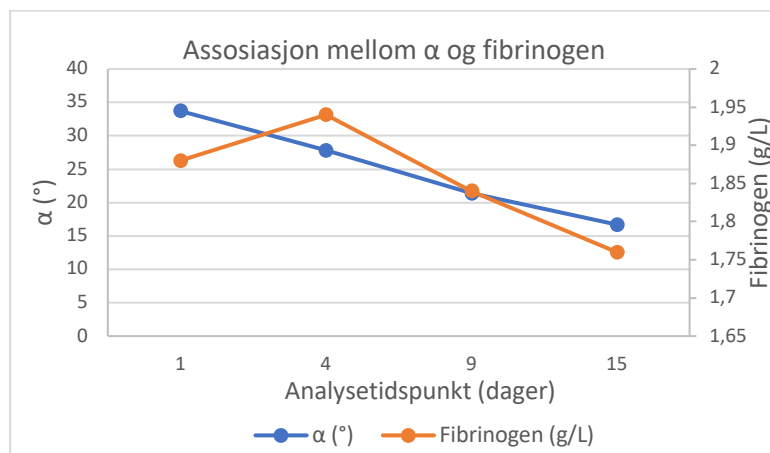
Tabell 3.3: Assosiasjon mellom bestemte parametere og beregnede p-verdier for hvert enkelt par.

Assosiasjon	p-verdi
MA - trombocytall	0,001
α -vinkel - fibrinogen	0,09
Laktat - glukose	0,001



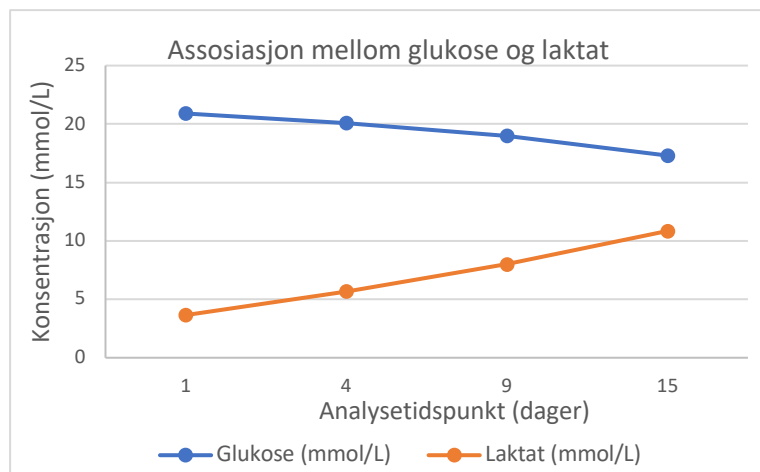
Figur 3.2: Assosiasjon mellom MA og antall trombocytter

Målingene viser en signifikant assosiasjon mellom MA og antall trombocytter, med en p-verdi på 0,001 som står oppført i tabell 3.3. Assosiasjonen er illustrert i figur 3.2.



Figur 3.3: Assosiasjon mellom α -vinkel og fibrinogenkonsentrasjon

Det finnes ingen signifikant assosiasjon mellom α -vinkel og fibrinogenkonsentrasjonen, som vist i figur 3.3. Dette stemmer overens med en beregnet p-verdi på 0,09, oppgitt i tabell 3.3.



Figur 3.4: Assosiasjon mellom glukose- og laktatkonsentrasjon

Endringene i glukose- og laktatkonsentrasjonen over tid viser en signifikant assosiasjon, med en p-verdi på 0,001, se figur 3.4 og tabell 3.3.

3.3 Tilleggsundersøkelse utført på dag 0

Tabell 3.4: Resultatene fra tilleggsundersøkelse analysert med TEG. Utført på pose nr. 6-10 med blodprøve rett fra blodgiverne, og fra blodposene før filtrering og etter filtrering. Røde tall viser verdier utenfor referanseområdet.

Pose nr.	Prøver tatt rett fra blodgiver			Før filtrering, fra blodposen			Etter filtrering, fra blodposen		
	R (min)	α (°)	MA (mm)	R (min)	α (°)	MA (mm)	R (min)	α (°)	MA (mm)
6	9	54	59	17	29	52	24	16	45
7	9	56	60	16	32	53	19	22	46
8	10	59	63	16	38	58	18	31	57
9	6	70	71	14	51	66	12	47	60
10	8	61	69	13	44	62	16	27	57

TEG-parameterne endrer seg betydelig i blodprøvene tatt fra fullblodspose med antikoagulasjonsmiddel før filtrering, sammenliknet med blodprøvene tatt rett fra blodgiverne. En ytterligere endring oppstår etter leukocytfiltrering av fullblodspose.

4.0 Diskusjon

Bruken av fullblod ved behandling av blødning har fra tidligere av basert seg på minimal lagringstid fra donering til transfusjon, derav navnet «ferskt» fullblod ⁽¹⁰⁾. Fram til i dag har det vært lite fokus på hvor lenge fullblod kan lagres med tanke på opprettholdelsen av normal koagulasjon- og trombocytffunksjon. I denne bacheloroppgaven har den hemostatiske profilen til leukocytffiltrert fullblod, gjennom analyser ved TEG, vist dårligere resultater enn forventet ut fra referanseområdene allerede fra dag 1.

De dårlige resultatene blir gjenspeilet i både R, MA og α -vinkel. R-verdiene til samtlige fullblodsposer ligger langt over referanseområdet, mens for MA og α -vinkel synker alle verdiene fra dag 1 til dag 15 og ligger dermed under sine referanseområder.

En mulig årsak til de forlengede reaksjonstidene, R, kan være fortynningseffekten til antikoagulasjonsmiddelet, CPD (63 mL), som er tilsatt fullblodsposene. Dette utgjør en fortynning på ca. 1:8, men i hvor stor grad det oppstår en betydningsfull fortynningseffekt, er uvisst. R-verdiene viser store variasjoner innenfor måleseriene, men ingen konsekvent stigning eller nedgang. Årsaken til denne variasjonen er ikke helt forstått.

Styrken på koagelet, MA, er avhengig av trombocytterne. Nedgangen i MA-verdiene kan dermed ha en sammenheng med at antall trombocytter også faller. Ser man på de statistiske dataene over trombocytterne, er det signifikante endringer for alle dagene sammenliknet med dag 1. Dette stemmer overens med at det er god assosiasjon mellom disse parameterne, som vist i figur 3.2. Altså vil en nedgang i antall trombocytter føre til en lavere maksimal styrke på koagelet.

Årsaken til endringene i α -vinkel er noe mer uklar, da den er avhengig av flere faktorer. Det er ingen assosiasjon mellom α -vinkel og fibrinogen, noe som er uventet, siden flere studier har vist god assosiasjon mellom disse parameterne ⁽²⁵⁾. α -vinkel viser til styrken på koagelet over tid og er avhengig av blant annet fibrinogen. En forklaring på fraværet av assosiasjon mellom de to parameterne, kan være at α -vinkel også er avhengig av funksjonelle trombocytter og koagulasjonsfaktorer. Ser man på fibrinogenkonsentrasjonene alene, har disse en økning i verdiene på dag 4, mens de synker på de andre dagene. Årsaken til denne økningen er ikke forstått og kan være en mulig årsak til at assosiasjonen mellom α -vinkel og fibrinogen er fraværende.

Antallet trombocytter i alle 15 fullblodsposeene lå i nedre referanseområde allerede på dag 1. Dette kommer mest sannsynlig av den harde behandlingen ved filtrering av blodet, men en viss nedgang i antallet er forventet, da trombocytterne har begrenset levetid. Nedgangen var totalt på rundt 50 % fra dag 1 til dag 15, altså halveres antallet trombocytter i løpet av lagringsperioden. På en annen side kan de lave oppbevaringstemperaturene, sammen med citrat i CPD, føre til økt aggregering av trombocytterne ⁽²⁶⁾. Instrumentet som ble brukt til å analysere denne parameteren, baserer seg på impedansprinsippet. Derfor er det mulig at celledelingen kan bidra til å gi falskt for lavt antall, da aggregeringen kan telles som andre blodceller. Dette forklarer allikevel ikke den markante nedgangen på 50 %. Halveringen gjenspeiles i de dårlige verdiene til TEG-parameterne MA og α -vinkel, som beskrevet over. TEG-parameterne viser samlet sett at en bør revurdere holdbarhetsgrensen på 15 dager, som St. Olavs hospital har satt for fullblod.

Målingene av hemoglobin viste at fullblodsposeene var innenfor holdbarhetskravet, på >43 gram per enhet blod, gjennom hele lagringsperioden.

Analyseresultatene for de metabolske parameterne viste, som forventet, en nedsatt og jevn metabolisme hos blodcellene i samtlige fullblodsposer lagret ved 4°C. Dette vises ved at talldataene holder seg nokså stabile gjennom lagringsperioden, sammenliknet med en tidligere studie om trombocyttkonsentrater lagret ved 22 °C⁽²⁷⁾. Den nedsatte metabolismen gjenspeiles både i pH-verdiene, og glukose- og laktatkonsentrasjonene.

Den observerte nedgangen i pH er signifikant for alle dagene, og kommer blant annet av omdanningen av glukose til laktat. Assosiasjon mellom glukoseforbruket og laktatproduksjonen er god, men omdanningen er ikke stor og gjør at den svake nedgangen i pH holder seg stabil. IMUFLEX-WB-SP-posene er ikke permeable for gasser, slik at blant annet CO₂ ikke slipper ut og dermed bidrar til dannelse av H⁺. Etersom metabolismen er nedsatt og cellene befinner seg i en slags dvale, vil produksjonen av CO₂ derimot være minimal. På grunn av dette påvirkes ikke pH i særlig stor grad av denne faktoren.

Det ble funnet signifikante endringer i kaliumkonsentrasjonen mellom dag 1 og dag 4, som vist i t-testen i vedlegg 5, noe som tilsier at den gjennomsnittlige konsentrasjonen øker gjennom lagringsperioden. Det ble målt kaliumverdier >12 mmol/L på dag 9 og dag 15. Man vet dermed ikke hvor stor denne økningen er, og verdiene kan derfor ikke vurderes. Dersom senere studier benytter seg av et instrument som kvantifiserer høyere verdier av kalium, og i

tillegg finner ut at økningen er stor gjennom lagringsperioden, bør en revurdere holdbarheten. Dette er fordi det ikke er gunstig å transfundere blodprodukter med høye verdier av kalium.

I denne bacheloroppgaven ble det benyttet 15 fullblodsposer. Antallet ble bestemt i henhold til kapasitet og tidsforbruk. Tidligere studier gjort på samme tema har benyttet mellom 20-30 fullblodsposer ^(10,28). Det kan derfor diskuteres om det burde vært analysert flere blodposer for å oppnå et mer pålitelig resultat.

TEG-resultatene i denne bacheloroppgaven ble ikke helt som forventet i forhold til tilsvarende studier gjort ved AIT på trombocyttkonsentrater oppbevart ved 4°C ⁽²⁷⁾. Basert på dette ble det utført en tilleggsundersøkelse for å vurdere hvordan de ulike TEG-parameterne i fullblod påvirkes av behandlingen etter tapping. I tabell 3.4 ser en at verdiene etter filtrering er tilsvarende like dårlig som resultatene fra blodpose nr. 1-5. Det vil si at de ligger langt utenfor sine referanseområder. Dermed kunne tekniske feil ved behandling og analysing av prøvematerialet avkrefte.

I tilleggsundersøkelsen ble det analysert kun 5 blodposer, men resultatet viste allikevel samme trend for alle posene. Tabell 3.4 viser at noen resultater faller utenfor referanseområde allerede før filtrering. Det henvises til en tidligere holdbarhetsstudie fra USA i 2011, som omhandler lagring av ufiltrert fullblod ved 4°C. I denne studien viser talldataene at alle TEG-parameterne hadde normale verdier helt opp til dag 11 ⁽¹⁰⁾. Ut fra dette kan det tenkes at dersom det hadde blitt analysert flere blodposer før filtrering, ville et større antall verdier havnet innenfor referanseområdet.

På bakgrunn av de uventede TEG-resultatene, har spørsmålet om leukocytterne spiller en større rolle enn først antatt, kommet opp. Fram til i dag er det utført veldig få studier på dette temaet, men man har alltid visst at leukocytter spiller en rolle i hemostasen. En studie fra USA utført i 2019 henviser til at leukocytterne er kjent for både å aktivere og inhibere trombocytffunksjonen, noe som gjør at de vil være viktig for optimal trombocyttaggregering. I tillegg viser deres hemostatiske resultater at aggregeringen var den parameteren som ble mest påvirket av leukocyttreduksjon. De konkluderer med at leukocytfiltrering reduserer den hemostatiske funksjonen sammenliknet med ufiltrert fullblod ⁽²⁸⁾. Denne studien, sammen med studien fra 2011 ⁽¹⁰⁾ og våre resultater, viser at leukocyttreredusering ikke er optimalt for maksimal trombocytterespons ved transfusjon av fullblod til pasienter med massive blødninger.

Fordelene ved leukocytteredusering bør altså veies opp mot den potensielt nedsatte hemostatiske funksjonen. I tillegg er det interessant å se på om hemostatisk funksjonelle trombocytter i ufiltrerte fullblodposer er å foretrekke, selv om risikoen for immunmedierte transfusjonsreaksjoner kan oppstå ⁽²⁹⁾. Det vil kreve flere studier som omgår in vivo undersøkelser, da konsekvensene for mottakeren etter transfusjon av ufiltrert fullblod ikke er kjent.

På bakgrunn av våre funn i denne bacheloroppgaven, anbefales det å gjøre nye studier som tester filtrert mot ufiltrert fullblod, da leukocytterne kanskje spiller en viktigere rolle enn det man først har trodd. Forsøkene bør bygge på å dele opp en blodpose fra samme blodgiver, hvor en del filtreres og den andre ikke, for å unngå biologisk variasjon. I tillegg bør trombocytterne vurderes ved andre metoder, som for eksempel «platelet mapping», som gir en mer detaljert vurdering av trombocytffunksjonen. Det anbefales også å ha flere analysedager i løpet av lagringsperioden for å finne ut mer nøyaktig ved hvilke tidspunkt endringene skjer.

5.0 Konklusjon

Dette in vitro holdbarhetsstudiet av leukocytffiltrert fullblod til bruk ved transfusjon, demonstrerer en dårligere holdbarhet for de hemostatiske parameterne i fullblod enn forventet ved standardiserte lagringsforhold ved 4 °C. På bakgrunn av dette stilles det spørsmål rundt effekten leukocytffiltrering har på blodets hemostatiske profil og dermed nødvendigheten av filtreringen. I tillegg viste studien at antallet trombocytter i løpet av lagringsperioden på 15 dager ble halvert. Det anbefales å utføre nye studier for å bekrefte våre funn. Dersom resultatene blir bekreftet bør holdbarheten til fullblod revurderes.

6.0 Referanser

Litteratur:

1. Helsedirektoratet. Blodgiver - helsenorge.no [Internett]. [sitert 9. april 2019].
Tilgjengelig på: <https://helsenorge.no/bli-blodgiver>
2. Godkjente blodbanker i Norge [Internett]. Helsedirektoratet.no. [sitert 9. april 2019].
Tilgjengelig på: <https://helsedirektoratet.no/transfusjonsmedisin/godkjente-blodbanker-i-norge>
3. Helsedirektoratet. Transfusjonstjenesten i Norge [Internett]. Veileder for transfusjonstjenesten i Norge. 2017 [sitert 9. april 2019]. Tilgjengelig på:
<https://helsedirektoratet.no/retningslinjer/veileder-for-transfusjonstjenesten-i-norge>
4. Røde Kors. Om blod [Internett]. [sitert 21. mars 2019]. Tilgjengelig på:
<https://www.rodekors.no/gi-blod/info/om-blod/>
5. Heier HE, Olaussen RichardW, Svenningsen VM. Går det mot blodforsyningskrise i Norge? | Tidsskrift for Den norske legeforening. [sitert 24. april 2019]; Tilgjengelig på:
<https://tidsskriftet.no/2012/11/kronikk/gar-det-mot-blodforsyningskrise-i-norge>
6. Milford EM, Reade MC. Comprehensive review of platelet storage methods for use in the treatment of active hemorrhage. Transfusion (Paris) [Internett]. 2016 [sitert 24. april 2019]; Tilgjengelig på: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/trf.13504>
7. Reddoch KM, Pidcoke HF, Montgomery RK, Fedyk CG, Aden JK, Ramasubramanian AK, mfl. Hemostatic function of apheresis platelets stored at 4°C and 22°C. Shock Augusta Ga. mai 2014;
8. Spinella PC, Perkins JG, Gratwohl KW, Repine T, Beekley AC. Fresh Whole Blood Transfusions in Coalition Military, Foreign National, and Enemy Combatant Patients during Operation Iraqi Freedom at a U.S. Combat Support Hospital | SpringerLink. [sitert 24. april 2019]; Tilgjengelig på: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00268-007-9201-5>
9. Sivertsen J, Braathen H, Lunde THF, Spinella PC, Dorlac WC, Strandenes G, mfl. Preparation of leukoreduced whole blood for transfusion in austere environments; effects of forced filtration, storage agitation, and high temperatures on hemostatic function. J Trauma Acute Care Surg. 2018;

10. Jobes D, Wolfe Y, O'Neill D, Calder J, Jones L, Sesok-Pizzini D, mfl. Toward a definition of "fresh" whole blood: an in vitro characterization of coagulation properties in refrigerated whole blood for transfusion - Jobes - 2011 - Transfusion - Wiley Online Library. 1. oktober 2011 [sitert 24. april 2019]; Tilgjengelig på:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1537-2995.2010.02772.x>
11. Frank Brosstad, Bernt Ly, Per Morten Sandset. HEMOSTASE Blødning/Trombose/Embolisme. Nationalbiblioteket: NYCOMED PHARMA; 1995.
12. Mittal K, Kaur R. Platelet storage lesion: An update. Asian J Transfus Sci [Internett]. 2015 [sitert 9. april 2019]; Tilgjengelig på:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4339916/>
13. Tynngård N. Preparation, storage and quality control of platelet concentrates - ScienceDirect. 20. august 2009 [sitert 25. april 2019]; Tilgjengelig på:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473050209001244?via%3Dihub>
14. Vraets A, Lin Y, Callum JL. Transfusion-Associated Hyperkalemia - ScienceDirect. 17. april 2011 [sitert 26. april 2019]; Tilgjengelig på:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887796311000071?via%3Dihub>
15. Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Bruns, Barbara G. Sawyer. Tietz. Fundamentals of clinical chemistry. 6. utg. Saunders Elsevier inc.; 2007. 976 s.
16. Ki-Shapiro DB, Lee J, Gladwin MT. Storage Lesion. Role of Red Cell Breakdown. 4. januar 2012 [sitert 26. april 2019]; Tilgjengelig på:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3080238/>
17. LeBrasseur N. Platelets' preset lifespan. 23. april 2007 [sitert 27. april 2019]; Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2064146/>
18. Levy JH, Welsby I, Goodnough LT. Fibrinogen as a therapeutic target for bleeding: a review of critical levels and replacement therapy - Levy - 2014 - Transfusion - Wiley Online Library. 10. september 2013 [sitert 26. april 2019]; Tilgjengelig på:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/trf.12431>
19. Espinosa A, Ekeland MS. Tromboelastografi – nyttig når det blør? Tidsskr Den Nor Legeforening [Internett]. 3. juli 2017 [sitert 21. mars 2019]; Tilgjengelig på:
<https://tidsskriftet.no/2017/03/klinisk-oversikt/tromboelastografi-nyttig-nar-det-blor>

20. Skordal L, Bjørsvik S, Hervig T, Størkson R, Liseth K. Praktisk bruk av tromboelastografi. Bioingeniøren [Internett]. 12. juli 2010 [sitert 21. mars 2019]; Tilgjengelig på: <http://www.bioingenioren.no/fag/fag-oversiktsartikkel/praktisk-bruk-av-tromboelastografi/>
21. epoc System Manual English 2051004969-01.pdf [Internett]. [sitert 3. april 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.woodleyequipment.com/images/Image/File/epoc%20System%20Manual%20English%202051004969-01.pdf>
22. Nygård LN. Celleteller, kjekt å ha? [sitert 29. april 2019]; Tilgjengelig på: https://www.noklus.no/Portals/2/Nyheter/Helsesekretaren%20nr_%205-2016_lab.pdf
23. Miesbach W, Schenk J, Alecsi S, Lindhoff-Last E. Comparison of the fibrinogen Clauss assay and the fibrinogen PT derived method in patients with dysfibrinogenemia - Thrombosis Research. desember 2010 [sitert 26. april 2019]; Tilgjengelig på: [https://www.thrombosisresearch.com/article/S0049-3848\(10\)00476-7/fulltext](https://www.thrombosisresearch.com/article/S0049-3848(10)00476-7/fulltext)
24. St. Olavs hospital. Brukerhåndbok i Medisinsk biokjemi og immunologi [Internett]. Tilgjengelig på: https://data.stolav.no/labhandboker/Medisinsk_biokjemi/ask/TestFinder.html
25. Harr JN, Moore EE, Ghasabyan A, Chin TL, Sauaia A, Banerjee A, mfl. Functional Fibrinogen Assay Indicates That Fibrinogen is Critical in Correcting Abnormal Clot Strength Following Trauma. Shock Augusta Ga [Internett]. januar 2013 [sitert 14. mai 2019]; Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3529156/>
26. Kattlove HE, Alexander B. The Effect of Cold on Platelets. I. Cold-induced Platelet Aggregation. Blood [Internett]. 1. juli 1971 [sitert 6. mai 2019]; Tilgjengelig på: <http://www.bloodjournal.org/content/38/1/39>
27. Tran XH, Velpen L van der. Effekten av lagringstemperatur på trombocyttkonsentrater (4 grader vs. 22 grader C) målt ved hemostatiske-, metabolske- og hematologiske parametere. 2015.
28. Thomas KA, Shea SM, Yazer MH, Spinella PC. Effect of leukoreduction and pathogen reduction on the hemostatic function of whole blood. Transfusion (Paris) [Internett]. 4. januar 2019 [sitert 8. mai 2019]; Tilgjengelig på: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/trf.15175>

29. Remy KE, Yazer MH, Saini A, Mehanovic-Varmaz A, Rogers SR, Cap AP, mfl. Effects of platelet-sparing leukocyte reduction and agitation methods on in vitro measures of hemostatic function in cold-stored whole blood. J Trauma Acute Care Surg. juni 2018;

Bilder og figurer

30. Illustrasjonsbilde av fordelingen av komponenter i blodet etter sentrifugering

Hentet fra:

<http://www.studydroid.com/imagecards/0f/jc/card-16363810-front.jpg> (01.04.2019)

31. Illustrasjonsbilde over trombocyttenes respirasjon

Hentet fra:

<http://www.bloodadvances.org/content/3/4/599?sso-checked=true> (08.04.2019)

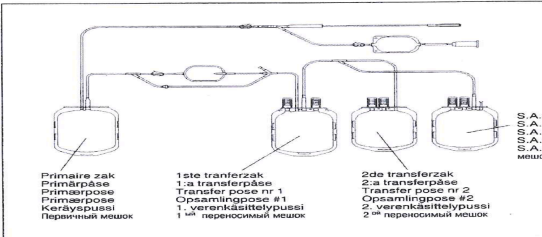
7.0 Vedlegg

- Vedlegg 1: Pakningsvedlegg for IMUFLEX-WB-SP blodposesett til tapping av fullblod
(Side 32)
- Vedlegg 2: Prosedyre for utførelse av tromboelastografi (TEG) ved Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin ved St. Olavs hospital
(Side 33)
- Vedlegg 3: Prosedyre for blodgassmåling på blodgassinstrument Epoc ved Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin ved St. Olavs hospital, 2019
(Side 37)
- Vedlegg 4: Valideringsplan for filtrert fullblod ved Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin ved St. Olavs hospital, 2019
(Side 40)
- Vedlegg 5: T-test med gjennomsnitt for to parvise utvalg, kalium
(Side 42)
- Vedlegg 6: Rådata til beregning av signifikante endringer med tid
(Side 43)
- Vedlegg 7: Rådata til beregning av assosiasjoner
(Side 44)

Vedlegg 1: Pakningsvedlegg for IMUFLEX-WB-SP blodposesett til tapping av fullblod

IMUFLEX[®] - WB-SP

IMUFLEX[®]-WB-SP Bloedzak CPD/S.A.G.M., met volbloedfilter (bloedplaatjesdoorlaatbaar) en met afnameslang voor bloedstalen™
 IMUFLEX[®]-WB-SP Blodpase med integrert helblodsfilter, som tillater trombocytter att passera igenom, och sidoslant för blodprovtagning™ CPD/S.A.G.M.
 IMUFLEX[®]-WB-SP Blodpose med integrert fullblodfilter for filtrering av hvite blodlegemer, men beholder trombocytterne med prøvetakningsarm™ CPD/S.A.G.M.
 IMUFLEX[®]-WB-SP Blodpose CPD/S.A.G.M. med prøvedtagningslange™ og in-line fuldblodsfilter til bevaring af trombocytter.
 IMUFLEX[®]-WB-SP Veripussi (CPD/S.A.G.M.) jossa kokoverisuodatin trombosyyttien poistoon sekä näytteenottotie™
 IMUFLEX[®]-WB-SP мешок с фильтром для цельной крови, сохраняющим тромбоциты, и магистралью для образцов крови™ ЦФД /С.А.Г.М



**Fig. 1
Figur 1
Kuva 1
Рис. 1**

Houder / Luer Adapter
Rohaltare / Luer Adapter
Holder / Luer Adapter
Holder / Luer adapter
Puhkpidike / Sovituskappale
Держатель / Лuer адаптер

Inkeping
Markering
Hakk
Markering
Lovi
Борозда
профрез-метка

Pre-donatiezakke
Provtagningspase
Overføringspase
Provtagningspase
Näytteenottopussi
Pre-donationsmешок для первичной дозы крови

Blauwe klem
Blå klemmen
Blå klemmen

Bla klemme
Sininen kiristin
Голубой зажим

CLIKTIP™

Witte klem
Vita klemman
Hvite klemmen

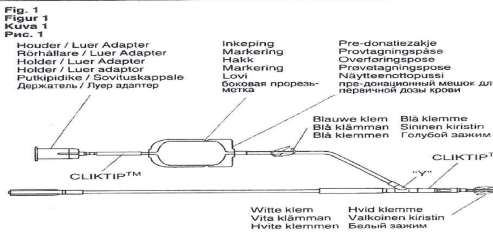
Hvite klemme
Valkoinen kiristin
Белый зажим

S.A.G.M. zak
S.A.G.M. paise
S.A.G.M. pose
S.A.G.M.-pose
S.A.G.M. pussi
мешок с С.А.Г.М.

Primære zak
Primærpase
Primærpose
Primærpose
Keräyspussi
Первичный мешок

1ste transferzak
1:a transferpase
Transfer pose nr 1
Opmålingspase #1
1. verenkäsittelypussi
1^o переносный мешок

2de transferzak
2:a transferpase
Transfer pose nr 2
Opmålingspase #2
2. verenkäsittelypussi
2^o переносный мешок



**Fig. 2a
Figur 2a
Kuva 2a
Рис. 2a**

Inkeping
Markering
Hakk
Markering
Lovi
Борозда
профрез-метка

**Fig. 2b
Figur 2b
Kuva 2b
Рис. 2b**

Permanent las
Permanent förslutning
Permanent forsegling
Lopullinen sauma
Герметичная запайка

Vakuumin
Evakuerte blodsamlingsrör
Vakuumer
Vakuuminverenkeräysletku
Вакуумная пробирка для крови

**Fig. 3
Figur 3
Kuva 3
Рис. 3**

Naaldbeschermtuis
Nålstickskydd
Kanylibeskytteren
Kanylibeskytteri
Pistonsuojaintesta
Протектор от Укола Игла

Trek
DRAG
DRA
TIAEK
VEDA
Тянуть

**Fig. 4
Figur 4
Kuva 4
Рис. 4**

Zwaartekracht
Omg. 75 cm
Gravitation ca
75 cm
Tyngdekraft ca.
75 cm
Maanvetovoima
75 cm
Высота
около 75 см

**Fig. 5
Figur 5
Kuva 5
Рис. 5**

Oefen druk uit om de lucht uit de gevulde zak te verwijderen
Tryck för att pressa ut luften ur den fyllda säcken
Påtar tryck för å tömme luft fra den fylte posen
Använd tryk för att pressa luften ut af den fylte pose
Paina täytettyä pussi saadakseen ilman ulto
Сдавливай мешок удаляя воздух из заполненного мешка

INSTRUKSJON FOR FILTRERING

FORSIKTIG Pass på at du ikke banker på eller dunker borti filteret under filtreringen.

1. Snu primærposen flere ganger for å blande blodet godt.
2. Heng primærposen i full lengde, slik at filteret kommer i vertikal stilling (Fig. 4).
FORSIKTIG Sørg for at alle rør henger fritt, uten å klemmes eller bøyes, og plasser overføringsposene flatt på benken. Tillat ca. 75 cm tyngdekraft.
3. Bryt SPERRETUPPEN på primærposen og begynn filtreringen.
FORSIKTIG Hvis alt blodet av en eller annen grunn passerer gjennom erveisventilen, stanser du filtreringen straks og klassifiserer produktet som ikke-leukocyttdpletet.
4. Lukk den HVITE klemmen når primærposen er tom.
5. Når du skal tømme luften via overgangsslangen (Fig. 5) og tilbake til den tomme primærposen, klemmer du forsiktige på den første overføringsposen med det leukodepleterte hele blodet til det filtrerte blodet når "Y"-merket under filteret.
6. Åpne den HVITE klemmen for å tømme inntakssiden av filteret.
7. Filtreringen avsluttes når inntakssiden av filteret blir hvit. Da lukkes den HVITE klemmen. Forsegl og skjær av slangen inntil "Y"-en.
8. Destruer den tomme posen og det brukte filteret forsvarlig for å unngå infeksjoner.

Vedlegg 2: Prosedyre for utførelse av tromboelastografi (TEG) ved Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin ved St. Olavs hospital

TEG, utførelse av tromboelastografi

Forfatter: Fernandez Maria Aurora Espinosa, Bente Vik Sletta
Godkjent av: Turid Fredriksen

Gyldig fra: 15.01.2019
Revisjonsfrist: 14.01.2021

Revisjon: 1.5
ID: 21680

Hensikt og omfang

Sikre riktig utførelse av analysen tromboelastografi (TEG).

Prosedyren omfatter bruk av tromboelastograf på pasientprøver. TEG kan brukes hos pasienter med pågående blødning og stort forventet blodtap, og kan gi en mer målrettet bruk av blodprodukter.

Prosedyren inngår i akkrediteringsomfanget for TEST295.

Grunnlagsinformasjon

Perioperativ monitorering av koagulasjonen er viktig for å diagnostisere årsaken til blødningen, og for å veilede evt. transfusjonsterapi.

TEG er en dynamisk måling av viskoelastiske forandringer i den hemostatiske prosessen og gir en total evaluering av hele koagulasjonssystemet, trombocytffunksjonen og det fibrinolytiske system. TEG kan være til hjelp når det gjelder å skille pasienter med kirurgisk blødning fra de som har en mikrovaskulær blødning. Dette vil være til fordel for begge pasientgrupper ved at begge grupper vil kunne få behandling i form av henholdsvis reoperasjon ved kirurgisk blødning og ulike blodprodukter ved mikrovaskulær blødning. Det å gi riktig behandling med blodprodukter til en pasient med mikrovaskulær blødning vil kunne resultere i at blødningen stopper og at man derfor unngår den økte risikoen som er forbundet med en reoperasjon.

Målrettet transfusjonsterapi er viktig for å begrense blodtapet ved store blødninger, og flere studier har vist at TEG kan bidra til å redusere bruken av blodprodukter.

Det er 3 analysemetoder:

- KaolinTEG, utføres med blank cup.
- KaolinTEG med heparinase, utføres med blå cup. Benyttes når pasienten er heparinisert.
- RapidTEG.

RapidTEG-testen er en kvantitativ in vitro diagnostisk test som er beregnet til monitorering av heparin antikoagulasjon hos voksne pasienter. I tillegg kan det brukes når det haster å få svar på en TEG analyse ved akutte situasjoner, da man kan få svar på kortere tid enn KaolinTEG (dersom prøven er varslet).

I en kritisk situasjon ved store blødninger vil det være travelt for vakthavende bioingeniør. Utlevering av blod til slike pasienter skal prioriteres foran analysering av TEG.

Variasjoner over tid og graden av koagulasjon gir ulike TEG-parametre:

TEG parameter	Definisjon	Normale verdier KaolinTEG	Normale verdier RapidTEG
R	Reaksjonstid: Starten av trombindannelse. Relatert til koagulasjonsfaktorfunksjon.	3-8 min.	0-1 min.
K	Hastighet for å oppnå et vis grad av styrke av trombinplugg.	1-3 min.	1-2 min.
MA	Maksimal amplitude, måling av trombocytffunksjonen.	51-69 mm.	52-71 mm
α	Måler hastigheten for fibrinogen kryss-binding for å stabilisere pluggen.	55-78 grader	64-80 grader

Blank cup	Romtemperatur i lukket originalbeholder	Til utløpsdato
Heparinase cup	2-8 °C i lukket originalbeholder, inkludert den forseglede posen	Til utløpsdato
Kaolinrør	2-8 °C i lukket originalbeholder	Til utløpsdato på rør
0,2M CaCl ₂	5 mL glass ved 2-8 °C 1 mL glass i romtemp	Til utløpsdato på glass
RapidTEG	2-8 °C	Til utløpsdato på hetteglass

Kontrollmateriale

Kvalitetskontroller utføres 1 gang pr. uke

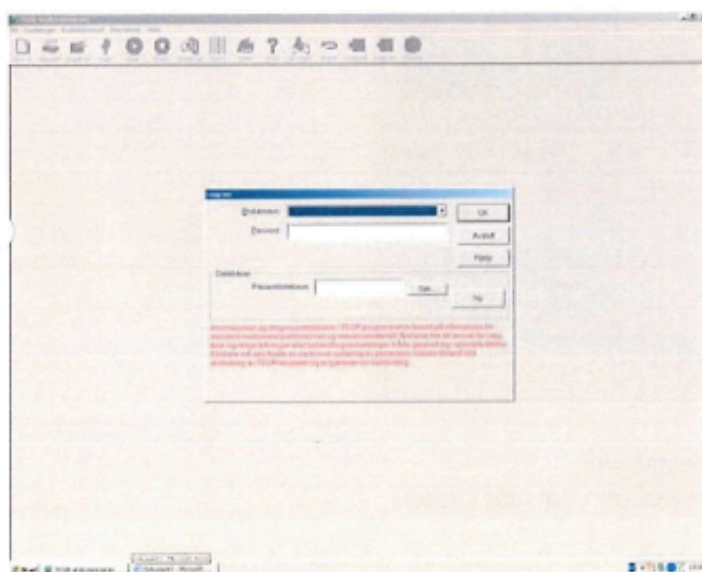
Kontroll	Oppbevaring	Holdbarhet
Level 1 Control Tørrestoff + dest.vann	Rekonstituerte hetteglass: romtemperatur.	Hver rekonstituerte kontroll er holdbar i 2 timer ved romtemperatur.
Level 2 Control Tørrestoff + dest.vann	Uåpnede hetteglass: 2-8 °C	Uåpnede hetteglass er stabile til utløpsdato.

Oppstart av maskinen

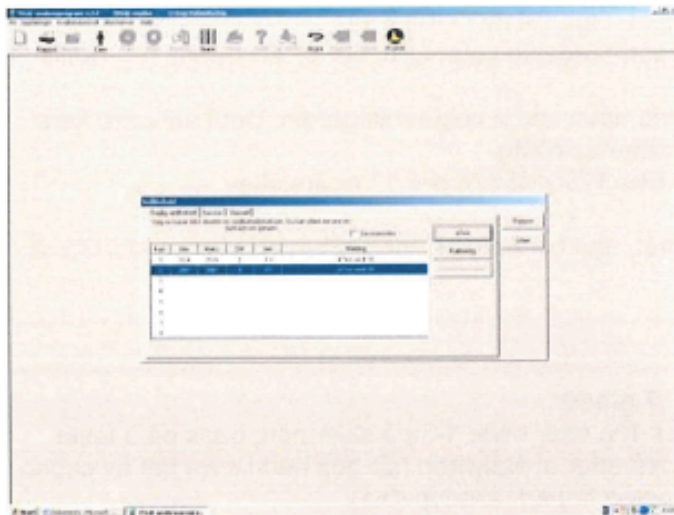
Instrumentet står normalt på, men hvis det er slått av, startes det ved å trykke på de 2 startknappene som er merket «power» og «motor».

Velg program TEG Enabled på pc koblet til instrumentet.

Dette bildet kommer opp på skjermen:

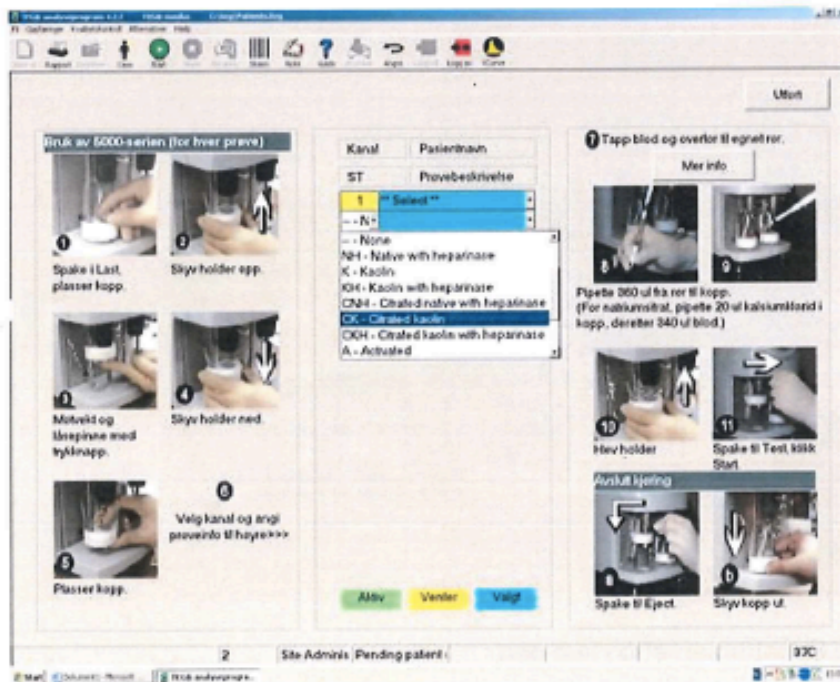


Velg "Site Administrator" og skriv passord «teg» med små bokstaver. Klikk OK.



Sett alle spaker (på begge apparat) i **test posisjon** (mot høyre). Klikk deretter på kanal 1 på skjerm og velg "eTest", gjør det for alle kanaler. Dersom eTesten er vellykket, vil det komme beskjed om "eTest verdi OK". eTesten tar noen sekunder. Trykk "Utført". I noen tilfeller må eTesten utføres 2 eller 3 ganger før den blir godkjent. Dersom en kanal gir feil eTest kan analysen ikke utføres på denne kanalen. Ta kontakt med leverandør, da det kan være behov for justering.

KaolinTEG og RapidTEG, forberedelse på skjerm



Kanal skal stå fast, kanal 1, 2, 3 eller 4.

ST: Her velges rett type analyse: Dette er viktig å huske på siden referanseområdene er ulike.

- CK for Citrated kaolin
- CKH for Citrated kaolin with heparinase
- CRT for Citrated Rapid TEG

Pasientnavn: Skriv inn etternavnet til pasienten (fjern select) og trykk enter.

- Pipetter 20 µl CaCl₂ i cupen.
- Pipetter 340 µl citratblod i cupen. Pipetter forsiktig opp og ned 3 ganger for å blande godt.
- Skyv holderen opp, sett spaken i "test" posisjon og klikk på "start" knappen på pc-skjermen.
- Analyseringen kan avsluttes når "stjernene er borte" på MA.
- Aktiver kanalen som skal avsluttes og trykk "stopp" på pc.
- Sett spaken i load posisjon på TEG-apparatet, ejekt (løsne) cup'en ved å trykke spaken ned, se bilde a og b.

Svarrapportering

Rekvirenten vil kunne se utviklingen av kurven via Remote TEG på operasjonsstuer og intensivavdelinger. Legene der er ansvarlig for vurdering og tolkning av TEG-parameterne og kurven. Avdelingene skal ikke ha utskrift av kurven.

Det er heller ikke nødvendig å ta utskrift til vår perm.

Analysen besvares "Utført" i NSL.

Avslutning

Logg ut etter endt analysering. "Logg ut-knappen" finnes øverst på skjerm markert i rødt.

Analyserte prøver settes i rad 12 sammen med T&S prøvene på riktig dag og kastes etter en uke.

Kvalitetskontroll

Utføres 1 gang pr. uke.

Ved nytt lot nr på kvalitetskontrollene:

- Velg Kvalitetskontroll (øverst på pc-skjerm).
- Klikk på «Lot», «legg til» og skriv inn lotnr.
- Velg «Alternativer» øverst på pc-skjerm.
- Klikk på «Brukerprofiloppsett» og «Normalverdier».
- Velg prøvetype L1 eller L2. Legg inn normalverdiene fra pakningsvedlegget, begge må legges inn.

Utførelse

- Ta ut Level I og Level II fra kjøleskap. Det settes opp en kontroll (Level I eller Level II) i gangen i alle kanaler, og det trengs 2 hetteglass pr level.
 - La hetteglasset med kontroll og dest. vann stå i romtemperatur i 10 min.
 - Forsikre deg om at det frysetørrede kontrollmaterialet er i bunnen av hetteglasset. Bank eventuelt på hetteglasset et par ganger.
 - Fjern forseglingen og korken på hetteglasset forsiktig, så ikke tørrstoffet forsvinner ut av glasset.
 - Tilsett 1 mL dest.vann som følger med i pakken til Level I/II-glasset og sett på korken.
 - Hold korken på plass, rist hetteglasset kraftig og la det stå i 5 minutter i romtemperatur.
 - Rist hetteglasset kraftig enda en gang og la det stå i ytterlige 5 minutter. Oppløsningen må være helt klar og bør stå opp mot totalt 30 minutter før det analyseres.
- Kontrollene er holdbar i 2 timer ved romtemperatur.
- Sjekk at temperaturen på kanalen er 37 grader.
 - Sett en cup i kanalen og installer den etter bilde 1-5 på skjermen.
 - I TEG-bildet:
 - ST:** Velg Level I eller Level II.
 - Pasientnavn:** Velg lot.nr
 - Prøvebeskrivelse:** Legg inn dagens dato.
 - Pipetter 20 µl CaCl₂ i cup'en.
 - Pipetter 340 µl fra Level I eller Level II-glasset i cup'en og trykk start.

Vedlegg 3: Prosedyre for blodgassmåling på blodgassinstrument Epoc ved Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin ved St. Olavs hospital, 2019

Epoc blodanalyseinstrument, AIT

Forfatter: Ingvild Ahne Teigum
Godkjent av: Ellen Berg

Gyldig fra: 08.11.2018
Revisjonsfrist: 07.11.2021

Revisjon: 1.0
ID: 37322

Hensikt og omfang

Prosedyren skal sikre korrekt bruk av epoc blodanalyseinstrument ved analyse av pH, pCO₂, pO₂, glukose og laktat i trombocyttkonsentrat. Slike analyser utføres i forbindelse med utprøving/optimalisering/validering av produksjon av trombocyttkonsentrat og i forskningsøyemed. Prosedyren omfatter bruk av instrumentet, kvalitetskontroller og softwareoppgradering.

Grunnlagsinformasjon

I forbindelse med utprøving/optimalisering/validering av produksjon av trombocyttkonsentrat og i forskningsøyemed måles pH, pCO₂, pO₂, glukose og laktat i trombocyttkonsentrat på forskjellige stadier i lagringstida. Til dette benyttes epoc blodanalyseinstrument.

Epoc blodanalyseinstrument er et bærbart instrument som består av tre komponenter:

1. Epoc Reader er en batteridrevet (oppladbar) kortleser for testkortene.
2. Epoc Host er en mobil datamaskin som kommuniserer trådløst (bluetooth) med Epoc reader, beregner og viser testresultater
3. Epoc testkort engangskort som inneholder en rekke sensorer, kalibreringsvæske og det sender elektriske signaler til epoc reader som er proporsjonale med konsentrasjonen av analytter i prøven. Testkortet har prøveport for tilsetning av prøvemateriale.

Systemet leveres med en software som oppgraderes hver 6. måned. SD-kort for oppgradering blir tilsendt fra leverandør.

Epoc reader er utstyrt med et temperaturkontrollsystem. Verifisering av temperaturkontrollsystemet (Termisk QA) utføres to ganger pr år (ved oppgradering av software).

Epoc reader er utstyrt med elektroniske kvalitetskontroller som kjøres automatisk ved oppstart og før analyse.

Det benyttes væskebaserte kvalitetskontroller i to nivåer, Eurotrol GAS-ISE Metabolites level 1 og 3.

Instrumentet har egen skriver med bluetoothtilkobling som kan benyttes om ønskelig.

Ansvar

Bioingeniør med kompetanse på kvalitetskontroller ved Enhet for komponentproduksjon.

Oppstartdato

Epoc låneinstrument i bruk 26.01.17- 31.08.17

Epoc blodanalyseinstrument MTA 67531 (host) og MTA 67526 (reader) tatt i bruk 01.09.17

Arbeidsbeskrivelse

Utstyr

Epoc Reader med Epoc Host

BGEM testkort for epoc, holdbar til utløpsdato ved 15-30°C

Eurotrol GAS-ISE Metabolites level 1 og 3, holdbar til utløpsdato ved 2-8°C

Sprøyter (1-2 mL) og kanyler

Prøvemateriale

Trombocyttkonsentrat

Framgangsmåte

- Slå på Reader og Host
- Logg på med brukernavn og passord *komp*
- Velg reader (Rdr 18468) ved å trykke på ikonet (hold inne til menyen kommer)
- Velg «kjør blodprøve»
- Readeren konfigureres (ca 15 sek)
- Sett inn testkortet i Reader i en jevn bevegelse slik at strekkoden blir avlest riktig. Den blå pilen skal vende opp og mot reader.
- Instrumentet bekrefter at kortet er satt inn, og kalibrering starter (165 sek)
- Legg inn prøveidentifikasjon
- Trekk opp prøvemateriale (kvalitetskontroll, prøve) med sprøyte. Sørg for at det ikke er luft i sprøyta og press ut 2-3 dråper som kastes umiddelbart før injisering av prøven.
- Når du får beskjed om å injisere prøve (innen 450 sek), hold sprøyta vertikalt og vinkelrett på testkortet, sett tuppen av sprøyta (uten kanyle) ned i prøvebrønnen på kortet, vri den en kvart omdreining, og trykk deretter sprøytetempelet ned i en jevn bevegelse. Instrumentet varsler med en pipetone og et grønt blinkende lys når nok prøvemateriale er injisert.
- Testen fullføres, og resultatene beregnes.
- Testresultatene vises ca 35 sek etter at prøven ble tilsatt.
- Aktuelle resultater ligger under fanene «Gasser» og «Meta+»
- Registrer resultatene, evt kan de skrives ut på medfølgende skriver.

Nedre målegrense for glukose på instrumentet er 1,1mmol/L. Dersom det er ønskelig å måle nøyaktig innhold, kan slike prøver kjøres på ABL90 på Laboratoriet på Kvinne-Barn-senteret, AMB. Avtales på tlf 74742. (NB! Kjør da 2x rens og kvalitetskontroll i nivå 2 (B) etterpå).

- For å hente opp tidligere kjørte prøver: Trykk verktøysymbolet nederst på skjermen og velg «vis test».

Kvalitetskontroller

Analyseres ved

- bytte av lotnummer på testkort
- oppgradering av software.

Framgangsmåte:

- Ampullene skal nå romtemperatur, ca 22°C før kjøring (tar ca 1 time).
- Umiddelbart før bruk ristes ampullen ristes kraftig i minst 15 sek.
- Rull ampulle forsiktig slik at all væske, uten luftbobler, er i bunnen på ampullen.
- Hold ampullen med den fargede prikken opp, bruk papirhåndkle el.l som beskyttelse og knekk av halsen i motsatt retning av prikken.
- Trekk opp materialet med sprøyte og injiser prøven innen 30 sek.
- Resultatene legges inn i excelarket *I:\STOLAV - Laboratoriemedisinsk klinikk Fellesområde\AIT\S-Blodbank\Komponentproduksjon\Kvalitetskontroller\QC Epoc blodgass.xls*

Softwareoppgradering



- SD-kort for oppgradering sammen med framgangsmåte blir tilsendt fra leverandør. Instrumentet vil ikke kunne brukes med utdatert software.
- Følg instruksjoner i forsendelsen.
- Last ned ny fasit (VAD) for kvalitetskontrollene: www.siemens.com/epoc, velg «Access Customer Resource Center» og deretter «Value Assignment Datasheets» (VAD). Velg aktuell epoc Sensor Configuration (oppgitt i instruksjonen) og hent ut fasitark i begge nivåer.

- Utfør Termisk QA-test:
 - o Velg reader (Rdr 18468) ved å trykke på ikonet (hold inne til menyen kommer)
 - o Velg «kjør termisk QA»
 - o Testen kjøres automatisk, og det kommer beskjed om den er godkjent. Se avsnittet «feilsøking» i manualen dersom termisk QA ikke godkjennes.
- Kjør kvalitetskontroll i begge nivåer.

Dokumentasjon

- Medusa utstyrsdatabase
 - o MTA 67531 (host)
 - o MTA 67526 (reader)
- Software endringslogg
 - o *I:\STOLAV - Laboratoriemedisinsk klinikk Fellesområde\AIT\Software-endringslogg\Komponentproduksjon\Software-_logg_over_endringer komponentproduksjon.xlsx* arkfane epoc
- Kvalitetskontroller
 - o *I:\STOLAV - Laboratoriemedisinsk klinikk Fellesområde\AIT\S-Blodbank\Komponentproduksjon\Kvalitetskontroller\QC Epoc blodgass.xls*

Referanser

1. Systemhåndbok, epoc blodanalyzesystem
2.  [Komp - Validering - Måling av pH, blodgass, glucose og laktat i trombocyttkonsentrat](#)
3.  [KOMP-validering-Epoc blodanalyzesystem](#)

Vedlegg 4: Valideringsplan for filtrert fullblod ved Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin ved St. Olavs hospital, 201

KOMP - Validering - Filtrert fullblod

Forfatter: Fernandez Maria Aurora Espinosa, Kjell Rune Logan-Halvorsrud,
Ingvild Ahne Teigum
Godkjent av: Turid Fredriksen

Gyldig fra:
30.08.2018
Ble utfaset:
31.01.2019

Revisjon:
1.0
ID: 38791

Validering

I henhold til EQS 7887 Validering LMK

Tittel	Validering av filtrert fullblod til bruk ved Luftambulansen
Valideringstidspunkt/periode	september-oktober 2018

Oppdragsgiver	Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin v/Ellen Berg
Hva skal valideres (objekt) (utstyr, prosesser, metode, m.m)	Filtrert fullblod produsert med IMUFLEX-WB-SP med platebesparende fullblodfilter.
Inngår valideringsobjektet i akkrediteringsomfanget?	Nei
Produsent/leverandør/firma	Terumo BCT
Kontaktperson	Henrik Løwenstein
Avdelingens kontaktperson	Kjell Rune Logan-Halvorsrud
Endringskontroll, ansvarlig	Kjell Rune Logan-Halvorsrud
Valideringen er utført av	Enhet for komponentproduksjon v/Ingvild Teigum

Plan utarbeidet av

Navn	Tittel
Ingvild Teigum	Fagansvarlig bioingeniør

Plan godkjent i EQS av

Navn	Tittel / funksjon i EQS
Kjell Rune Logan-Halvorsrud	Seksjonsleder v/høringskommentar
Aurora Espinosa	Seksjonsleder medisin v/høringskommentar
Turid Fredriksen	Kvalitetskoordinator v/godkjenning

Rapport utarbeidet av

Navn	Tittel

Rapport godkjent i EQS av

Navn	Tittel / funksjon i EQS
	v/høringskommentar
	Seksjonsleder v/høringskommentar
Turid Fredriksen	Kvalitetskoordinator v/godkjenning

1 Valideringsplan

1.1 Innledning

Ledelsen ved Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin besluttet i 2017 at det skal etableres et prosjekt for validering av filtrert fullblod ved blodbanken. Luftambulansen har også kontaktet avdelingen med forespørsel om filtrert fullblod om bord i helikopter og ved akuttmottaket. Hovedfokuset i første omgang er innføring av produktet til bruk i Luftambulansen.

Filtrert fullblod kan eventuelt etter retur/lagring innen 35 dagers holdbarhet, separeres til erytrocyttkonsentrat og plasma (teknisk).

1.2 Omfang

Valideringen skal etablere produktets karakteristika med tanke på innhold av Hb, fritt Hb (hemolyse) leukocytter og trombocytter, ved dag 0 (tappe- og produksjonsdag), dag 7 og 14.

Fastsatt holdbarhet er 14 dager med tanke på at det skal være intakt trombocytffunksjon.

Antall tappinger 15.

Det skal også etableres rutiner for gjennomføring av kvalitetskontroller vha statistisk prosesskontroll i rutinedrift. Antall tappinger pr år estimeres til ca 25, kvalitetskontroller må derfor tas av alle enheter inntil vi har stort nok beregningsgrunnlag (minst 50 enheter).

1.3 Praktisk gjennomføring

Produksjon: (se pakningsvedlegg, vedlegg 1)

Fullblod tappes på IMUFLEX-WB-SP (TERUMO BCT) med platebesparende filter.

Produktkode i ProSang E4902

Fullblodet legges på kjøleplate i minimum 2 timer (intern rutine 1,2)

Fullblodet filtreres deretter i henhold til pakningsvedlegg, innen 48 timer etter tapping³

Filtrert fullblod lagres ved 2-6°C³ i 14 dager.

Kvalitetskontroller:

Tidspunkt	Måles	Beregnes
Før filtrering (etter kjøleplate)	Vekt Trombocytter	Tappet volum Trombocytter/enhet
Etter filtrering	Vekt Hb EVF Lav Hb Leucocytter Trombocytter	Hb/enhet Hemolyse Leucocytter/enhet Trombocytter/enhet
Dag 7 og 14	Vekt Hb EVF Lav Hb Trombocytter	Hemolyse Trombocytter/enhet

Kontrollene analyseres ved AMB, seksjon hematologi (Hb, EVF, lav Hb, trombocytter) og AIT, Enhet for cytometri (leucocytter).

1.4 Kriterier og krav³

Tappet volum (uten antikoagulans)	450±50mL
Hb/enhet	>43g
Leucocytter/enhet	<1*10 ⁶
Hemolyse	<0,8%
Trombocytter/enhet	Etableres

90% av de testede enheter skal være innenfor krav

Resultatene registreres og beregnes i excelarket I:\STOLAV - Laboratoriemedisinsk klinikk Fellesområde\AIT\S-Blodbank\Komponentproduksjon\Validering\Filtrert fullblod\Validering filtrert fullblod CPD Imuflex.xlsx

Vedlegg 5: T-test med gjennomsnitt for to parvise utvalg, kalium

	<i>Variabel 1</i>	<i>Variabel 2</i>
Gjennomsnitt	3,62	7,94667
Varians	0,1317143	2,15552
Observasjoner	15	15
Pearson-korrelasjon	0,8976242	
Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
fg	14	
t-Stat	-14,52662	
P(T<=t) ensidig	3,887E-10	
T-kritisk, ensidig	1,7613101	
P(T<=t) tosidig	p<0,001	
T-kritisk, tosidig	2,1447867	

H0: dag1 - dag4 = 0

H1: dag1 - dag4 ≠ 0

Tobs = -14,527

tkrit = 2,144

Tobs > tkrit ⇒ H0 forkastes, det er en signifikant forskjell fra dag 1 til dag 4. p<0,001 som vil si at det er lite sannsynlig for at en får feil ved forkastning

Vedlegg 6: Rådata til beregning av signifikante endringer med tid

Parametere	Dag	Koef	P> z 	[95% Konf. Intervall]	
R	4	-0,49	0,233	-1,30	0,32
	9	-0,30	0,233	-1,41	0,81
	15	0,46	0,413	-0,64	1,56
MA	4	-4,07	0,081	-8,65	0,50
	9	-10,24	<0,001	-14,75	-5,73
	15	-14,61	<0,001	-18,32	-10,89
Alfa	4	-5,82	<0,001	-10,18	-1,46
	9	-12,31	<0,01	-17,67	-6,96
	15	-16,94	<0,001	-21,56	-12,32
Hb	4	0,27	<0,001	-0,43	0,97
	9	0,23	0,521	-0,48	0,95
	15	0,83	<0,01	0,22	1,43
PLT	4	-24,47	<0,001	-37,14	-11,79
	9	-59,27	<0,001	-77,04	-41,50
	15	-95,07	<0,001	-113,34	-76,80
Fibrinogen	4	0,06	0,001	0,03	0,10
	9	-0,03	0,122	-0,07	0,01
	15	-0,11	<0,001	-0,15	-0,07
pH	4	-0,06	<0,001	-0,08	-0,05
	9	-0,14	<0,001	-0,16	-0,12
	15	-0,26	<0,001	-0,29	-0,24
Glukose	4	-0,87	<0,01	-1,42	-0,31
	9	-1,93	<0,001	-2,34	-1,52
	15	-3,65	<0,001	-4,08	-3,21
Laktat	4	2,03	<0,001	1,88	2,18
	9	4,38	<0,001	4,07	4,68
	15	7,20	<0,001	6,59	7,82

Vedlegg 7: Rådata til beregning av assosiasjoner

Laktat	Koef.	P> z 	95% [Konf. Intervall]	
Glukose	0,2825348	0,001	0,1229334	0,4421362

MA	Koef.	P> z 	95% [Konf. Intervall]	
pH	-0,5137391	0,207	-1,31255	0,2848773

MA	Koef.	P> z 	95% [Konf. Intervall]	
Trombocytter	0,0681524	0,001	0,0277863	0,1085184

