



Høgskulen
på Vestlandet

BACHELOROPPGAVE

Hemolytisk titrering av serum fra blodgivere
Hemolytic titration of serum from blood
donors

Elise Nedberg, Kaia Devik, Marte Sivertsen

Bachelor i Bioingeniørfag
Institutt for sikkerheit, kjemi- og bioingeniørfag
Avdeling for ingeniør- og naturvitenskap

29.05.2020

Jeg bekrefter at arbeidet er selvstendig utarbeidet, og at referanser/kildehenvisninger til alle

kilder som er brukt i arbeidet er oppgitt, jf. Forskrift om studium og eksamen ved Høgskulen på Vestlandet, § 12-1.

SAMMENDRAG

Massive blødninger kan være både akutte og uventede, og det er sjelden tid til å matche blodtyper eller screene pasienter for antistoffer før blodoverføring. Erytrocytter av type O-blod brukes derfor som kriseblod. Også type O fullblod, med lave nivåer av anti-A og anti-B, blir evaluert for å bli brukt som kriseblod, fordi lave nivåer av antistoffer antas å forårsake mindre uønskede transfusjonskonsekvenser hos mottakerne. Antistoffene kan imidlertid forårsake hemolyse av mottakerens erytrocytter, som er den desidert farligste bivirkningen av blodtransfusjon med plasmaholdige blodprodukter.

Ved Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin (AIT) ved Haukeland universitetssjukehus (HUS) blir O-blodgivere screenet i henhold til deres titer-nivåer av anti-A og anti-B, og deres tilsvarende agglutinerende og hemolytiske evne. O fullblod med lav hemolytisk aktivitet, uavhengig av den agglutinerende aktiviteten, kan derfor brukes kriseblod.

Resultatene tyder på at det ikke er noen direkte sammenheng mellom antistofftiter og deres agglutinerende og hemolytiske aktivitet. Eksempelvis høye antistofftitere og agglutinerende aktivitet resulterer ikke nødvendigvis i høy hemolytisk aktivitet. Resultatene våre antyder derfor at mengden av O-fullblodgivere kan økes når de rangeres i henhold til lav hemolytisk kapasitet.

Nøkkelord: fullblod, hemolytisk transfusjonsreaksjon, sammenligning, blodbank, titer

ABSTRACT

Massive bleedings can be acute and unexpected, with shortage of time to match blood types or screen patients for antibodies before blood transfusion. Erythrocytes of type O blood is therefore used as emergency blood. Also type O whole blood, with low levels of anti-A and anti-B, is evaluated to be used as emergency blood because low levels of antibodies are thought to cause less unwanted transfusion effects in the recipients. However, the antibodies can cause hemolysis of the recipient's erythrocytes, which is by far the most dangerous transfusion reaction of plasma containing blood products.

At the Department of Immunology and Transfusion Medicine at Haukeland University Hospital, O blood donors are screened according to their titer levels of anti-A and anti-B, and their corresponding agglutinating and hemolytic ability. O whole blood with low hemolytic activity, independent of the agglutinating activity, could therefore be used emergency whole blood.

We show that there is no direct correlation between antibody titers and their agglutinating and hemolytic activity, eg. high antibody titers and agglutinating activity does not necessarily result in high hemolytic activity. Our results suggest therefore that the amount of O whole blood donors might be increased when ranged according to low hemolytic capacity.

Keywords: whole blood, hemolytic transfusion reaction, comparison, blood bank, titer

FORORD

På tredje og siste semester av Bioingeniørutdanningen ved Institutt for kjemi- og bioingeniørfag ved Høgskulen på Vestlandet (HVL), campus Kronstad inngår bacheloroppgaven. Oppgaven ble skrevet og arbeidet utført i samarbeid med Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin (AIT), Haukeland universitetssjukehus (HUS), Bergen.

Vi ønsker å takke Einar Kristoffersen, avdelingssjef/professor og Turid Helen Felli Lunde, Msc., våre eksterne veiledere ved AIT. Det har vært en glede og en ære å arbeide med dere. Tusen takk for konstruktive tilbakemeldinger og meget god hjelp underveis i arbeidet. Spesielt takk til Felli Lunde som veiledet oss stødig gjennom hele prosessen og stadig kom med nyttige tilbakemeldinger.

I tillegg vil vi takke Anita Ryningen, førsteamanuensis ved HVL, som fungerte som vår interne veileder. Takk for verdifulle tilbakemeldinger, for at du alltid har vært tilgjengelig og kommet med gode råd i tillegg til innspill gjennom hele prosessen.

En stor takk rettes også til alle ansatte ved AIT. Takk for bruk av arbeidsplass, god hjelp til orientering og bruk av laboratoriet, innsamling av prøvematerialet og lån av analysematerialet samt buffere og utstyr. Det har alltid vært en glede å komme på laboratoriet og deres hjelp har effektivisert vårt arbeid og gjort prosjektet mulig å gjennomføre.

Bergen, Mai 2020

Kaia Devik Johnsen (sign)

Marte Sivertsen (sign)

Elise Martinsen Nedberg (sign)

1. Innledning	6
1.1 Bakgrunn og problemstilling	6
1.2 ABO-systemet	7
1.2.1 Dannelse av ABO-antigenene.....	10
1.3 Universaldonor	11
1.4 Hemolytisk transfusjonsreaksjon	11
1.5 Aktivering av komplementsystemet	12
1.6 Titrering av serum	14
1.6.1 Sekretorer	16
1.7 Kriseblod	16
1.8 Lover og retningslinjer for transfusjonstjenesten	17
1.9 Etske betraktninger under prosjektperioden	18
2. Materiale og metode	19
2.1 Prøvematerialet	19
2.1.1 Innhenting av tidligere titeringsresultater.....	19
2.2 Fremgangsmåte for hemolytisk titrering	19
2.2.1 Utstyr	19
2.2.2 Reagenser	20
2.2.3 Innhold i buffer og bruken av komplementfaktorkilde	20
2.2.4 Utføring av hemolytisk titrering på mikrotiterplate	21
2.3 Instrumenter	22
2.3.1 Spektrofotometri.....	23
3. Resultater	24
3.1 Agglutinerende titeringsresultater sammenlignet med hemolyserende titeringsresultater	24
3.2 Vurdering av hemolytisk titeringsresultat	27
3.2.1 Prøver med høyt hemolytisk titeringsresultat	28
3.2.2 Prøver med lavt hemolytisk titeringsresultat	29
3.2.3 Sammenligning av agglutinerende titeringsresultat og hemolyserende titeringsresultat.....	31
3.3 Korrigering av slengere	32
3.4 Lavt titer med agglutinerende metode	33
3.5 Holdbarhet	35

3.6 Forkastede prøver.....	37
4. Diskusjon	40
4.1 Vurdering av hemolyserende titeringsresultat.....	40
4.1.1 Høye hemolyserende titeringsresultater.....	41
4.1.2 Lave hemolyserende titeringsresultater	41
4.1.3 Sammenligning av resultater for agglutinerende titer med hemolyserende titer	42
4.2 Vurdering av slengere.....	42
4.3 Interindividuell variasjon	43
4.4 Prøver som er vurdert lav med agglutinerende metode	43
4.5 Holdbarhet.....	44
4.6 Forkastede prøver.....	45
4.7 Metodeevaluering	46
4.8 Kontroller	47
5. Konklusjon	48
6. Litteratur	49
7. Definisjoner/forklaringer/forkortelser.....	52
8. Vedlegg.....	54
8.1 Vedlegg 1 – komplett oversikt over sammenligning av agglutinerende gradering og hemolyserende titering	54
8.2 vedlegg 2 – Rådata	54
8.2.1 Vedlegg 2-1 – Rådata	54
8.2.2 Vedlegg 2-2 – grafer A-celler	54
8.2.3 Vedlegg 2-3 – Grafer b-celler	54
8.2.4 Vedlegg 2-4 – Korrigering av slengere.....	54
8.2.5 vedlegg 2-5 – grafer a-celler korrigert for slengere	54
8.2.6 vedlegg 2-6 – Grafer b-celler korrigert for slengere	54
8.2.7 vedlegg 2-7 – Sortert informasjon angående kvinner og menn over og under 50 år	54
8.2.8 vedlegg 2-8 – Holdbarhetsforsøk for a-celler	54
8.2.9 vedlegg 2-9 – holdbarhetsforsøk for b-celler	54
8.3 Vedlegg 3 – Mikrotiterplater	54

1. INNLEDNING

1.1 BAKGRUNN OG PROBLEMSTILLING

Rundt 1900-tallet oppdaget Karl Landsteiner bestanddelene i ABO-systemet, hvor han påviste tilstedeværelsen av agglutinerende antistoffer i serumet til individer som manglet det tilsvarende ABO-antigenet på erytrocyttene (1). Ifølge Landsteiners lov dannes det naturlig forekommende antistoffer mot det ABO-antigenet som individet mangler. Blodgivere med blodtype O (O-givere) har ingen antigener på sine røde blodceller og kalles derfor for universaldonorer (2). Ifølge Landsteiners lov har blodtype O da antistoffer mot antigen-A og antigen-B, som forkortes anti-A (antistoff-A) og anti-B (antistoff-B). Nivåene av anti-A og anti-B i serum varierer fra person til person. Nivåene graderes i titer. I dag brukes O-givere blant annet til å fremstille fullblod for fullblodtransfusjoner, men også til blodplatekonsentrat, som kan gis til personer med blodtype A, B og AB.

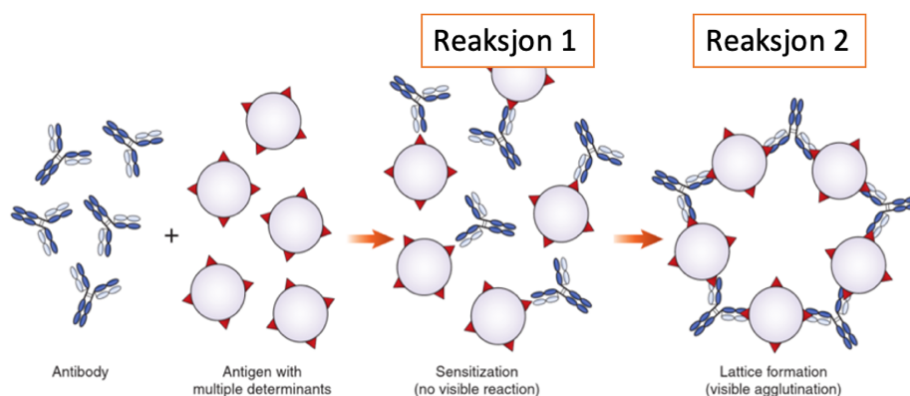
Blodgivere vurderes som høy- eller lavtiteret med tanke på anti-A og anti-B. Dette gjøres for å unngå at anti-A og/eller anti-B i plasma-delen av blodproduktet skal hemolysere pasientens egne røde blodceller. Teknikken som vanligvis blir brukt baserer seg på antistoffenes evne til å agglutinere A- og B- erytrocytter. Antistoffenes hemolyserende evne vil her være farligere enn selve agglutineringsprosessen de skaper.

Den hemolyserende evnen kan undersøkes når vi blander henholdsvis A- eller B-celler, komplementfaktorer og pasientserum. Ved å studere supernatanten etter sentrifugering, vil fargen si noe om hvor sterk hemolysen er. For å få et mer konkret resultat blir mikrotiterplaten med prøvene målt ved hjelp av en plateleser, som måler absorbansen. I tillegg til dette ønskes det å undersøkes holdbarheten til prøvematerialet gjennom ved å utføre et holdbarhetsforsøk.

Problemstillingen for oppgaven er følgende: «Til tross for høy agglutinerende titer; kan det hemolyserende titeret likevel være lavt?» Dersom dette er tilfellet, kan også disse blodgivere donere fullblod til lageret for kriseblod.

1.2 ABO-SYSTEMET

K. Landsteiner fant at de røde blodcellene (erytrocyttene) til enkelte individer ble agglutinert av serum fra andre individer. Dette ved å ta blodprøver fra friske medarbeidere, friske fødende og navlestrengsblod fra friske morkaker, for å så skille erytrocytter og plasma og la celler og plasma fra blodgivere reagere med hverandre på et objektglass eller i et reagensrør (1). De viktigste blodtypeserologiske metodene baserer seg på at antistoffene kan binde sammen erytrocytter til synlige klumper (agglutinere) *in vitro*. Reaksjonen deles inn i henholdsvis to trinn (figur 1):



Figur 1: Sensibilisering (sensitization) blir til når antistoffene binder seg til antigenene uten en synlig agglutinerings. Brodannelse (lattice formation) oppstår når antistoffene reagerer med antigenene som fins på forskjellige erytrocytter og det oppstår en synlig agglutinerings (3).

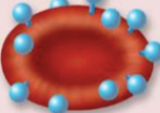
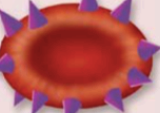
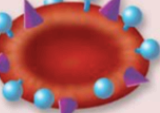
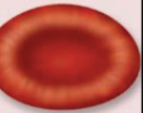
1. Den første reaksjonen er den spesifikke reaksjonen mellom antistoff i plasma og det tilhørende antigenet på erytrocyttens overflate. Dette er en reversibel likevektreaksjon avhengig av mengden antistoff og mengden antigen. Reaksjonen er i tillegg avhengig av temperatur, da de ulike antistoffene reagerer best ved ulik temperatur (4). Av figur 1 kan en se at antistoffene i reaksjon 1 har bundet seg til antigenene, men at det ikke ennå har oppstått en agglutinerings.
2. Selve agglutinerings skyldes at antistoffmolekylene har to (immunglobulin G (IgG)) eller ti (immunglobulin M (IgM)) reaktive grupper som kan binde seg til antigenet. Reagerer antistoffmolekylet med antigenene som befinner seg på forskjellige erytrocytter vil en "broforbindelse" oppstå. Bindes tilstrekkelig mange erytrocytter sammen ved slike "broer" resulterer det i en synlig agglutinerings (reaksjon 2, figur 1). I saltvann, serum og plasma vil erytrocytter frastøte hverandre fordi de har samme elektriske ladning på overflaten

(zetapotensialet). Da IgM-molekylene både er større og har flere bindingsgrupper enn IgG-molekylene vil de lettere overvinne zetapotensialet og er derfor mer effektivt agglutinerende enn IgG. Vanligvis vil derfor bare IgM-antistoffer kunne agglutinere erythrocytter in vitro i saltvannsmedium (4).

Agglutinerings av erythrocyttene ble av Landsteiner tolket som en positiv reaksjon. Han merket seg mønsteret til agglutinerings og beviste at blodet kunne deles inn i grupper. Med dette ble det første blodtypesystemet oppdaget, og Landsteiner mottok Nobelprisen i fysiologi og medisin i 1930 fordi han også postulerte at funnet kunne ha betydning for blodtransfusjon.

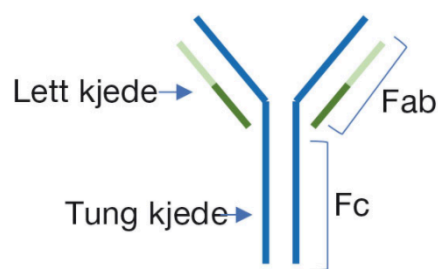
Landsteiner forstod at han kunne skille mellom 3 typer blod ut fra evnen til å agglutinere erythrocytter fra andre mennesker (5), A, B og C (senere beskrevet som O). Alfred von Decastello og Adriano Stürli påviste den fjerde og mer uvanlige blodtypen i ABO-systemet, nemlig AB (6).

Blodtypene O, A, B og AB danner blodtypesystemet ABO. Landsteiners observasjoner ble formulert til «Landsteiners lov», som sier at det dannes naturlige forekommende antistoffer mot det ABO-antigenet som individet mangler (7), se figur 2. Individuer med blodtype A har ifølge Landsteiners lov A-antigenet på sine røde blodceller og har dermed antistoff mot antigen B, anti-B (antistoff B) i sitt serum.

	Antigen A	Antigen B	Antigens A and B	Neither antigen A nor B
Erythrocytes Fenotype				
Plasma Fenotype	Anti-B antibodies	Anti-A antibodies	Neither anti-A nor anti-B antibodies	Both anti-A and anti-B antibodies
Blodtype (Fenotype)	Blodtype A	Blodtype B	Blodtype AB	Blodtype O
Genotype	AA, AO	BB, BO	AB	OO

Figur 2: De ulike blodtypene og forskjellene mellom dem. Blodgivere med blodtype O har ikke antigen-A eller antigen-B på overflaten av erythrocyttene. Ifølge Landsteiners lov har de antistoffer mot antigen-A og antigen-B i plasma (2).

Antistoffer (immunglobuliner, Ig) er store karbohydratholdige proteiner (8). De er bygd opp av en felles grunnstruktur som utgjør to korte og to lange polypeptider som er parvis identiske og antistoffene blir ofte beskrevet som en «Y» (9). Den nederste delen av «Y'en» kalles Fc-delen (figur 3). Fc-delen er viktig for antistoffenes evne til å aktivere komplementsystemet. I tillegg til antistoffenes mulighet til å binde seg til Fc-reseptorer som finnes på overflaten til enkelte celletyper (monocytter, makrofager, granulocytter og NK-celler). De to korte armene av «Y'en» benevnes som Fab-delene. Ytterst på disse korte delene finnes antigenbindende seter som utgjør molekylets to antigenbindende områder. Antistoffene er altså bifunksjonelle molekyler (9). Antistoffer dannes i plasmaceller som er differensiert fra antigenstimulerte B-lymfocytter. Antistoffer deles inn i fem hovedklasser immunglobuliner som hos mennesket benevnes med bokstavene A, D, E, G og M (henholdsvis, IgA, IgD, IgE, IgD og IgM). De gjenkjenner antigener som immunforsvaret ikke oppfatter som kroppseget. Hvis ikke det finnes et molekyl med samme struktur i kroppen fra før, kan antigenet utløse en spesifikk immunreaksjon (8). Begrepet *antigen* benyttes om alle forbindelser eller strukturer som er i stand til å bli gjenkjent av et antistoff (9). Oftest er antigener en del av en celle. Det er spesielt proteiner og polysakkarider som virker som antigener. Et molekyl må ha en viss minimumsstørrelse for å utløse en immunreaksjon. En lymfocytt i immunforsvaret vil gjenkjenne en liten del av et stort antigenmolekyl, en epitop, og er vanligvis et peptid. De fleste naturlige antigener har flere epitoper (8).



Figur 3: Illustrasjon av et antistoff som er formet som en "Y", med tilhørende Fab- og Fc-del (10).

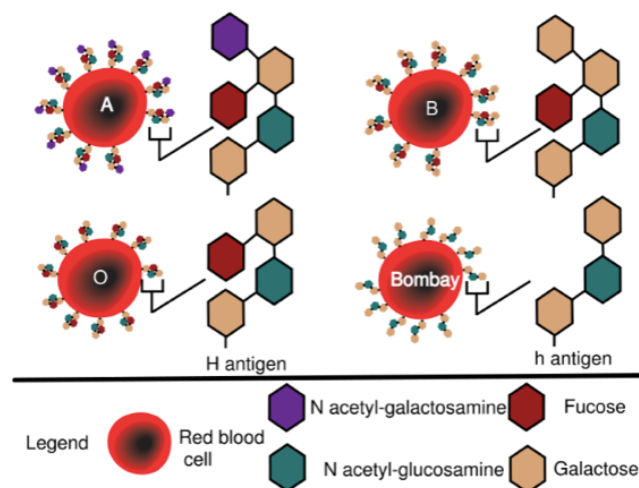
Blod fra giver med irregulære antistoff (alloantistoff) kan ikke brukes til fullblodtransfusjon. Dersom en blodgiver har erytrocyttantistoff kan det aksepteres at giver gir til erytrocyttkonsentrat. Dette må imidlertid vurderes av spesialist i immunologi og transfusjonsmedisin. Det er med det et krav om negativ screening av alloantistoff for fullblodgivere (11).

1.2.1 DANNELSE AV ABO-ANTIGENENE

ABO-antigenene avhenger av *H*-genet. *H*-allelene arves uavhengig av *ABO*-allelene. *H* (kromosom 19) kontrollerer produksjonen av *H*-antigenet, mens *ABO* (kromosom 9) kontrollerer A- og B-antigenene. *H*-antigenet er det eneste funksjonelle antigenet i H-blodtypesystemet. *H*-loket har to alleler: *H* og *h*. Formasjonen av H-antigenet er sluttproduktet i en enzymatisk reaksjon og er avgjørende for uttrykkelsen av A- og B-antigenene (2).

Uttrykket av sekretoriske ABO-antigener påvirkes også av sekretor-genet (*Se*), som påvirker tilstedeværelsen av ABO-antigener i kroppsvæsker, så som f.eks. spytt og tårer. Oppsummert, påvirkes ABO-antigener av tre genetiske, uavhengige gen-loki: *ABO*, *H*, og *Se*.

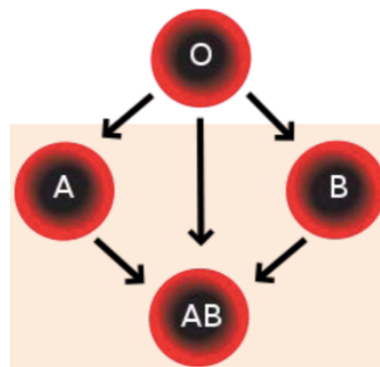
Det finnes tre hovedalleler i *ABO*-loket: A, B og O (2). A- og B-allelene er glykosyltransferaser. Det vil si at de har evne til å overføre en karbohydratgruppe til et protein (12). Glykosyltransferaser er nødvendige for riktig post-translasjonell modifikasjon av blant annet proteiner for å oppnå molekylets riktige funksjoner. I motsetning blir O-allelet regnet som ikke-funksjonelt ettersom det resulterende genproduktet er et inaktivt enzym (2). Dette resulterer i at røde blodceller fra gruppe O ikke bærer A- eller B-antigener, men er rike på ikke-konverterte H-antigener (se figur 4).



Figur 4: Illustrasjonen viser oppbygningen av de ulike blodtypene og hvilke biokjemiske strukturer de består av (2).

1.3 UNIVERSALDONOR

Reuben Ottenberg (1911) foreslo at personer med blodtype O kan bli benyttet som «universaldonor», se figur 5. Teoretisk sett kan blodtransfusjon med anti-A og anti-B skade pasientens erythrocytter dersom pasienten har blodtype A, B, eller AB. Argumentet Ottenberg benyttet var at anti-A og anti-B agglutinerer i donorens plasma ville være fortynnet i mottakerens plasma og dermed gjøre anti-A og anti-B harmløst (13). Argumentene hans førte til at det under andre verdenskrig ble benyttet enorme mengder O-blod til transfusjon for alle blodtyper. Transfusjonene ble utført uten noe innledende matchende test mellom donor og mottaker før transfusjon. Risikoen for prosedyren ble beregnet som liten på grunn av forholdene under krigen. Det ble vurdert større risiko ved å gruppere mottaker og forlike blod under slike omstendigheter som var i krigssonene (13).



Figur 5: Viser hvilke blodtyper som kan transfunderes til andre. Blodgivere med blodtype O kan donere blod til mottakere med blodtype A, B og AB (2).

1.4 HEMOLYTISK TRANSFUSJONSREAKSJON

Pasienter som mottar humant blod har risiko for hemolytisk transfusjonsreaksjon (HTR) *in vivo*. Dette skjer oftest fordi mottaker har antistoffer som reagerer mot blodgiverens erythrocytter (2). En hemolytisk transfusjonsreaksjon medfører ødeleggelse av erythrocytter som resulterer i intravaskulær eller ekstravaskulær hemolyse. Eventuelt en kombinasjon av disse. Ifølge Mollison er en hemolytisk titer ≤ 16 definert som lav og vil kunne gi mindre hemolyse som ikke vil utløse komplementsystemet ved fullblodtransfusjon (14).

En hemolytisk transfusjonsreaksjon er klassifisert som akutt eller forsinket. Begge typer kan komme av immun- eller ikke-immunmedierte årsaker. Risikoen som kan oppstå er at antistoffer fra blodgiveren (oftest anti-A i trombocyttkonsentrater av blodtypen O) kan destruere mottakers erythrocytter (av type A) (4). Antistoff av typen IgM er sterkt komplementaktiverende og kan sette i gang en akutt, intravaskulær hemolyse. IgG er derimot mindre komplementaktiverende, men bidrar til å destruere erythrocyttene med antistoff bundet til seg ved fagocytose (4).

Komplement er betegnelsen på en samling proteinmolekyler som blant annet finnes som pre-enzymmer og utgjør et av kroppens kaskadesystemer (9). Ved immunmediert akutt hemolytisk transfusjonsreaksjon (AHTR) skjer det en interaksjon mellom antistoff og respektive antigen. Dette komplekset starter reaksjoner som er assosiert med hemolyse. Alvorlighetsgraden til en slik transfusjonsreaksjon påvirkes av titer til erythrocytt-alloantistoff, men også tettheten (mengde antigen per celle) og distribusjon av erythrocyttantigen. Når overflateantigenene er spredt utover erythrocyttens overflate vil de binde færre antistoffmolekyler per erythrocytt. Det betyr at det er mindre sannsynlig at det vil initiere en alvorlig hemolytisk transfusjonsreaksjon. Det motsatte skjer når antigenene er plassert tett sammen på overflaten av erythrocyttene. Den store tettheten av antigenene vil lettere initiere aktiveringen av den klassiske komplementaktiveringsveien (2).

1.5 AKTIVERING AV KOMPLEMENTSYSTEMET

Den klassiske aktiveringsveien blir initiert av IgG- og IgM-antistoffer i kompleks med sine spesifikke antigener (15). Faktoren komplement 1 (C1) må feste seg på Fc-delen til antistoffmolekylene (9). Et IgM-molekyl kan binde seg til C1 direkte grunnet antistoffets pentamere form. Ved å ha 10 bindingssteder, vil det være nok at ett IgM-molekyl binder seg til C1 for å aktivere komplementsystemet. For at den klassiske veien skal aktiveres via IgG må Fc-delen på minst to antistoffmolekyler befinne seg i en viss avstand i forhold til hverandre grunnet den lave aviditeten.

C1 består av tre subenheter, *C1q*, *C1r* og *C1s*, som gjør dette til et stort proteinkompleks. Immunglobulinene interagerer med *C1q* som fører til en konformasjonsendring i komplekset og som resulterer i at *C1r* og *C1s* får proteaseaktivitet. Det aktiverte *C1s* spalter C4 til to subenheter, C4a og C4b. C4a er et lite løselig peptid. C4b kan reagere med

overflatestrukturer på celler og mikroorganismer og bindes kovalent der. Det neste komplementet i reaksjonskjeden er C2 som binder seg stabilt til C4b på celleoverflater hvor C1s kan spalte C2 til C2a og C2b. I likhet med C4a er C2b løselig, mens C2a inngår i kompleks med C4b. Det er C4bC2a som sammen utgjør den klassiske C3-konvertasen. Konvertaser er enzymer som er ansvarlig for å spalte enten C3 eller C5 (9). C3-konvertasen vil spalte C3 i C3a og C3b. Videre vil C3a diffundere ut i væskefasen og C3b binder seg kovalent til celleoverflater. Om lag 10 % av C3b-molekylene binder seg til overflatestrukturer i nærheten av aktiveringsstedet. C3b vil etter hvert binde seg til C4bC2b-komplekset som da får økt affinitet til C5 som fører til at aktiviteten til C3-konvertasen blir en C5-konvertase som resulterer i at flere C5-molekyler blir spaltet i to deler, C5a og C5b.

C3b fungerer som et opsonin. Opsoniner er substanser som binder en fagocytterende celle til bakteriene, og som dermed blir med på å øke omfanget av fagocytosen (8). C3a og C5a er anafylatoksiner og virker kjemotaktisk for andre (immun)celler og rekrutterer leukocytter til inflammasjonsstedet (16). C5b, C6, C7, C8 og C9 utgjør det terminale komplementkomplekset (TCC eller «membrane attack complex» (MAC)) (9). TCC gir komplementet evne til å lysere celler og enkelte mikroorganismer. MAC integrerer seg i cellemembranen og danner en pore som fører til ionelekkasje som til slutt ender i en osmotisk lysering som skyldes de høye forskjellene i det osmotiske trykket (17).

Hvis aktivering av komplementsystemet fører til intravaskulær hemolyse vil hemoglobin og erytrocyttmembranen bli frigitt i plasma. ABO-antistoff av typen IgG aktiverer sjeldnere komplementsystemet, men kan interagere med Fc-reseptorer til mononukleære fagocytter, som påvirker fagocytosen og cellulær aktivitet. Ved akutt hemolytisk transfusjonsreaksjon fungerer komplement på tre ulike måter: erytrocyttlysering, opsonisering og anafylatoksin.

- **Erytrocyttlysering** kan skje etter komplementaktivering med betydelig dannelse av MAC. Fritt hemoglobin blir bundet av haptoglobin, og når kapasiteten til haptoglobin er brukt opp vil hemoglobinemi og hemoglobinuri oppstå. Fritt hemoglobin i blodstrømmen har en cytotoxisk og proinflammatorisk effekt (2).
- **Opsonisering** oppstår på grunn av at mikrober dekket av komplementprodukter blir fjernet av mononukleære fagocytter.
- **Anafylatoksin** kan indusere til inflammasjon og blir frigjort i plasma. Slike produkter påvirker mastcellene, glatt muskulatur og nøytrofile granulocytter.

Resultatet av hemolyse er hemoglobinemi, bilirubinemi og eventuelt hemoglobinuri med sekundære komplikasjoner på grunn av disse produktene. Tromboplastiske substanser som særlig frigjøres ved intravaskulær hemolyse, kan sammen med immunreaksjonene indusere til disseminert intravaskulær koagulasjon (DIC) med sekundærblødninger (4).

Når ABO-uforlikelighet (som skyldes IgM) er underliggende årsak vil oftest symptomer opptre kun få minutter etter at transfusjonen er startet. Derimot vil det gå lengre tid ved Rh-uforlikelighet (som skyldes IgG) før symptomer oppstår hos transfundert pasient. Om antistoffene er svake på tidspunktet for transfusjonen, men transfusjonen resulterer i et sekundært antistoffsvar kan en se en forsinket hemolytisk transfusjonsreaksjon preget av fallende blodprosent, men ofte også temperaturstigning dager etter transfusjonen (4).

1.6 TITRERING AV SERUM

Levine og Mabee (1923) benyttet begrepet “farlig universaldonor” for å beskrive blodtype O med høyt agglutinerende titer i plasma (13). En av de viktigste faktorene som bestemmer utfallet av uforenelig transfusjon er styrken til mottakers anti-A eller anti-B i plasma. O-giveres blod titreres for å måle styrken på ABO-antistoff. Ved agglutinerende titrering kvantifiseres antistoff i serum fra blodtype O mot en fast konsentrasjon erythrocytter av blodtype A og B. Et titer kan defineres som den resiproke verdien av den høyeste fortynningen av serum som vil gi en påvisbar reaksjon med utvalgte erythrocytter (14). Det er andelen av antistoffer med høyest affinitet som har mest innvirkning på titeret. Jo høyere bindingskonstant antistoffene har, jo høyere titer vil forekomme (13). Allerede i en detaljert studie utført i 1946 ble det arbeidet frem til at en standardisert bestemmelse av agglutinerende titer burde bli vedtatt. Dette fordi enkle elementer som forskjellige rutiner på sentrifugering kan gi vesentlig forskjellige resultat av titer (19). AIT ved Haukeland universitetssjukehus graderer agglutinerende titer ut ifra to forskjellige fortynninger for IgM og IgG. Den agglutinerende evnen til antistoffene fra blodgivers plasma graderes visuelt etter tilsetning av erythrocytter. Graderingen er angitt med “0” for ingen agglutinerings av erythrocyttene tilsatt, og ved agglutinerings graderes det fra “1+” til “4+” avhengig av i hvilken grad det agglutineres (figur 6). Fortyningene som benyttes er 1:250 og 1:500 (20). Avdelingen definerer et titer som høyt dersom det for IgM-type er høyere enn 1:250, og/eller om det for IgG-type er høyere enn 1:500. Det titreres mot både blodtype A- og B-celler. Dersom blodgiveren får et

positivt agglutineringsutslag med ett eller flere av de fire antistoffene (IgM anti-A, IgM anti-B, IgG anti-A eller IgG anti-B) som testes mot antigenene på erythrocyttene tilsatt, vil blodgiveren defineres som høytiter. Dersom det er gradering "0" på alle fire antistoffene vil blodgiveren defineres som lavtiter.



Figur 6: Figuren fremstiller hvordan agglutineringsgraden på gelkort. Ingen reaksjon graderes til 0, +1, +2, +3 og +4 tilsier graden av agglutineringsgrad (21). "Mf" er en forkortelse for "mixed field reactions" som oftest skyldes tilstedeværelsen av to distinkte cellepopulasjoner. «H» står for hemolyse og indikerer hemolyse dersom det er svært få eller ingen røde blodlegemer i gelsøylen. "w+" tilsier så vidt synlige, små størrelser av agglutinerte celler i den nedre delen av gelsøylen og en pellet med ikke-agglutinerte celler i bunnen.

Under andre verdenskrig ble det utført en titer- og transfusjonsreaksjonsstudie ved U.S Army General Hospital and Evacuation Hospital i løpet av The European campaign. 85 soldater mottok da uforenelige antistoffer fra fullblod og plasma i forskjellige mengder. Studiet baserte seg på erfaringer underveis i krigen, ettersom fullblodet som var lagret og brukt ved behandling av krigsskader, omtrent utelukkende var av blodtype O. Konsekvensen ved bruk av dette, var at pasientene med blodtype A, B og AB mottok uforenelige antistoffer under transfusjon. Det tørkede plasmaet som hæren utleverte, var blandet plasma fra forskjellige givere, uavhengig av blodtype. Plasmaet inneholdt derfor tilfeldige mengder antistoff mot blodtype A (anti-A) og antistoff mot blodtype B (anti-B). Dermed fikk pasienter med annen blodtype enn O også uforlidelige antistoffer ved plasmatransfusjon (22).

Studien viste at transfusjon av fullblod type O til pasienter med annen blodtype i de færreste tilfellene førte til alvorlige reaksjoner. Tilfeldig valgte blodgivere med blodtype O ble under studiet titrert for å estimere den relative frekvensen av personer med høye titer av antistoffer. Blodgiverne med høyt titer ble brukt. Studien viste at hvert tilfelle

av transfusjonsreaksjoner hos mottakeren, var forbundet med et agglutinerende antistofftiter på over 500. Også asymptomatisk hemolyse av egne blodceller ved uforlikelig blod- og plasmatransfusjon viste seg å være relativt hyppig, men ikke alltid reelle tilfeller (22). Dette gir grunnlag for teoretisk interesse av hemolytisk titrering av høytitrede blodgivere (studere antistoffenes hemolyserende evne av erytrocytter).

1.6.1 SEKRETORER

Et annet viktig interesseområde for beskyttelse av hemolyse er sekretorstatus til mottaker. Omtrent 80 % av alle individer er sekretorer. Det betyr at antigener fra blodtype A og B som finnes i blodet til personene, også finnes i andre kroppsvæsker, eksempelvis spytt (23). I følge Tisdall m.fl., ble det tidligere sagt at individer som er sekretorer har mer beskyttelse mot uforenelige antistoff. I studien av proporsjonalitetsbestemmelse mellom hemolytisk og agglutinerende titer, ble det også inkludert testing av sekretorer (19). Spytt fra mottakerne ble testet for nærvær av typespesifikt antigen for å kunne klassifiseres som sekretor eller ikke-sekretor. De 9 av 39 som ikke var sekretorer, opplevde alvorlige hemolytiske reaksjoner ved transfusjon av uforenelige antistoff, og dermed høye hemolytiske titer.

Mekanismen går ut på at løselig blodtype B-antigen i blodtype B-plasma, binder seg til blodtype B-antistoffer i blodtype A-plasma (24). En slik nøytralisering kan gi beskyttelse mot hemolytiske transfusjonsreaksjoner (målt ved manglende intravaskulær hemolyse). En pasient med blodtype B med sekretorstatus, kan derfor få blodtype A-plasma, i stedet for blodtype AB-plasma i traumesituasjoner (24).

1.7 KRISEBLOD

Blodtype O Rh (D) negativt, Kell negativt erytrocyttkonsentrat kan gis når det ikke er tid til pretransfusjonsundersøkelser (11). En slik situasjon kan oppstå ved akutte traumer og under alvorlige ulykker, etter fødsler og etter kirurgi, eller i militære situasjoner. Felles for situasjonene er at det er viktig at pasienten får blod raskest mulig. Slike transfusjoner uten pretransfusjonsundersøkelser medfører en risiko for komplikasjoner dersom pasienten har blodtypeantistoff (4). Ved bruk av kriseblod, i form av erytrocyttkonsentrat, blir det ikke tatt hensyn til andre antistoff, siden det i en generell befolkning er færre enn 5 % som har dannet

alloantistoff mot andre blodtypeantigener enn ABO (7). Kriseblod kan være av typen SAGM O RhD negativ eller fullblod. I oppgaven blir fullblod omtalt som kriseblod.

Erytrocytter, plasma og trombocytter oppbevares på ulike måter og krever ulik behandling, i tillegg til at de har ulik holdbarhet. Et eksempel på dette er at trombocytter oppbevares på vippe, mens erytrocytter ikke gjør det. I et ambulanshelikopter har en for eksempel ikke mulighet til å oppbevare de ulike komponentene i henhold til prosedyre. I tillegg har de som blir utsatt for alvorlige ulykker ofte behov for tilførsel av alle komponentene. Dette er fordi at samtlige komponenter vil gå tapt under kraftige blødninger. Ambulanshelikopteret har dermed med seg fullblod. Luftambulansen i Bergen benytter O RhD- og Kell-negativt fullblod. I løpet av de tre siste årene er det tappet ca. 700 enheter fullblod på AIT ved Haukeland universitetssjukehus, og om lag 40 pasienter har hatt behov for fullblodtransfusjon. Det oppbevares i tre uker før det kastes, kassasjonsraten er omtrent 20 %.

Fullblod er ikke inndelt i komponenter, det er slik en finner det i sirkulasjonen hos mennesker, minus en liten mengde antikoagulans, buffer og sukker. En fordel med fullblod er at det ikke vil følge med ekstra væske, som det gjør om en gir pasienten enkelte komponenter. Selv om en gir erytrocytter, trombocytter og plasma i et 1:1:1 forhold (samme som i fullblod), vil det likevel ikke være likt (25). Ved en voldsom blødning er det ikke ønskelig at blodet fortynnes ytterligere noe som fører til at koagulasjonen blir dårligere. Pasienter med store blødninger er relativt sjeldne. Det fører til at noe av fullblodet som er lagret ikke vil bli brukt før det går ut på dato. Komponentene vil ha lengre holdbarhet om de oppbevares enkeltvis. Likevel går det an å lage erytrocyttkonsentrat av utløpt fullblod (26), men er ikke praksis på AIT.

1.8 LOVER OG RETNINGSLINJER FOR TRANSFUSJONSTJENESTEN

Blodforskriftens formål er å sikre et høyt beskyttelsesnivå for både blodgiver og mottaker av blodprodukter. Det betyr å hindre overføring av smitte og å trygge sikkerheten og kvaliteten på humant blod og blodkomponenter uansett anvendelsesformål. Forskriften er gjeldende for tapping og testing av humant blod og blodkomponenter uansett anvendelsesformål, i tillegg til å være gjeldende for prosessering, oppbevaring, distribusjon og utlevering av humant blod og blodkomponenter. Forskriften sikrer at blodbankene i Norge arbeider under de samme reglene og slik gir en ønsket kvalitet på humane blodprodukter (27).

Helsedirektoratet er ansvarlig fagorgan for transfusjonstjenesten i Norge og utgir Veileder for transfusjonstjenesten. Veilederen gir direktoratet uttrykk for hva som må anses å være god praksis med hensyn til transfusjonsmedisin. Utover de krav som følges av blodforskriften baserer veilederens anbefalinger seg i stor grad på Europarådets ”*Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components*” og WHO’s publikasjon ”International Travel and Health” (11). Transfusjonstjenesten har samme funksjon som Blodforskriften.

1.9 ETISKE BETRAKTNINGER UNDER PROSJEKTPERIODEN

Dette prosjektet kategoriseres til kvalitetsforbedring. Noe som betyr at det ikke var nødvendig med godkjenning av Regional Etisk Komité (REK). Ark og notater som inneholdt tappenummer ble låst inn i et skap da vi gikk fra AIT. Dette for å ivareta personsikkerheten og anonymiteten til blodgivere. De to siste sifrene i blodgiverens tappenummer ble brukt som prøve-ID. Dette ble brukt for å vite hvilke resultater som tilhører de ulike blodgiverne. Blodgiverne ble holdt så anonyme som mulig, men samtidig måtte det være mulig å spore opp blodgiveren. Siden prøvene ble merket på denne måten var det flere prøver som endte opp med samme prøve-ID på mikrotiterplaten. Vi opparbeidet et system slik at prøver med de samme to siste sifre i tappenummer ikke ble forvekslet med hverandre.

2. MATERIALE OG METODE

2.1 PRØVEMATERIALET

For å titrere tilstrekkelig antall O-givere som allerede er undersøkt og har høyt agglutinerende titer ble det opprettet en avtale med Seksjon for blodgivning for innhenting av prøvematerialet. Fra blodgivere med blodtype O og med tidligere angitt høyt titer ble det tatt et ekstra serum-rør med gel i tillegg til rutinerørene. Rørene ble sentrifugert i 10 min ved 3100 rpm (revolutions per minute/omdreininger per minutt) etter 30-120 minutter. Deretter ble det oppbevart i kjøleskap inntil prøven ble kjørt.

2.1.1 INNHENTING AV TIDLIGERE TITRERINGSRESULTATER

For å innhente de gamle titreringsresultatene ble tappenummeret fra prøven benyttet. Med de individuelle tappenummerne kan en i ProSang (databasen til Seksjon for blodgivning hvor informasjon om registrerte blodgivere kan innhentes. Produsert av Csam Health AS i Norge (28)) undersøke hvilken dato blodgiveren ble titrert med agglutinerende metode og dermed finne tappenummeret til denne datoen. De agglutinerende titreringsresultatene ble arkivert i permer merket med årstall. Dato og tappenummer ble notert og derifra måtte en finne tilsvarende informasjon i permene hvor resultatene var lagret. Resultatene ble notert og ført inn i databasen for å sammenligne metodene.

2.2 FREMGANGSMÅTE FOR HEMOLYTISK TITRERING

2.2.1 UTSTYR

- 96-brønners mikrotiterplate (NUNC/Thermo Fisher) med V-bunn
- Flergangstrau 60 mL (Thermo scientific, Finland)
- Engangs transferpipetter 3,5 mL i plast (SARSTEDT AG & Co, Tyskland)
- Stativ til glassrør
- 75 mm x 12 mm x 0,8-1,0 mm glassrør til A- og B-celler (VWR International, Tyskland)
- Multikanalspipette 50-100 µL (Thermo scientific, Finland)
- Pipette 0,5 – 5 mL (Thermo scientific, Finland)
- Pipette 10 – 100 µL (Thermo scientific, Finland)

- Pipette 100 – 1000 μL (Thermo scientific, Finland)
- Pipette 20 – 200 μL (Thermo scientific, Finland)
- Pipettespisser 50-100 μL (VWR International, Tyskland)
- Pipettespisser 100 – 1250 μL (VWR International, Tyskland, katalog nr.: 613-0273)
- Pipettespisser 1 – 200 μL (VWR International, Tyskland, katalog nr.: 613-0300)
- Tecan Sunrise™ plateleser (Tecan, Sveits)

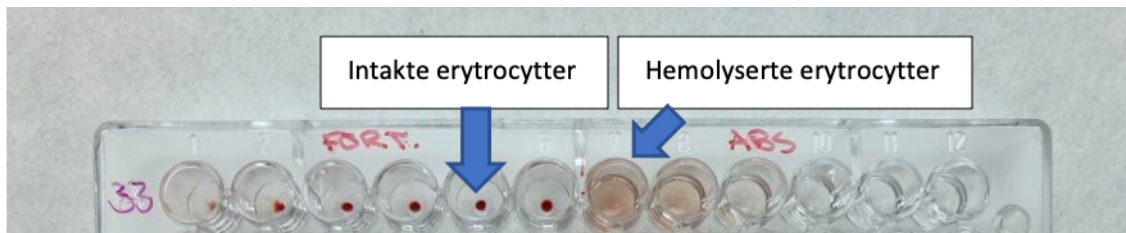
2.2.2 REAGENSER

- Phosphate buffered saline (PBS) med MgCl_2 og CaCl_2
- 3 % løsnning av A-celler
- 3 % løsnning av B-celler
- Komplementkilde (Virion/serion Diagnostics prod. nr. 9001, frysetørket, fra marsvin) rekonstituert og alikvotert i 200 μL -aliquoter.

2.2.3 INNHOLD I BUFFER OG BRUKEN AV KOMPLEMENTFAKTORKILDE

Laboratorieklinikken på HUS leverte sterilt fosfatbufret saltvann, PBS løsnning pH 7,2 og utførte steril kontroll på denne. PBS-løsningen som ble benyttet inneholdt 0,168 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ og 0,037 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ per liter. Innhold av magnesium- og kalsiumioner gjorde det mulig å starte en komplementmediert hemolyse, men ville ikke i seg selv gitt hemolyse.

Komplementfaktorer fra marsvin ble benyttet for å undersøke om IgG eller IgM i plasma til blodgiver kunne aktivere komplementkaskaden og for å sikre at det var en konstant konsentrasjon tilgjengelig av komplement - i alle fortyninger. Hvis komplementet ikke ble aktivert ville erytrocyttene ha vært intakte, men hvis komplement derimot ble aktivert ville erytrocyttene blitt lysert. Etter sentrifugering ville erytrocytter som var intakte forme seg som en “knapp” i bunnen av mikrotiterplaten, se figur 7.



Figur 7: Intakte erythrocytter former seg som en knapp i bunnen av mikrotiterplaten. Hvis komplementsystemet ble aktivert ville erythrocyttene blitt hemolysert og farge supernatanten rødlig. Jo rødere farge, desto mer hemolyse.

2.2.4 UTFØRING AV HEMOLYTISK TITRERING PÅ MIKROTITERPLATE

3 % A- og B-celler ble oppbevart i kjøleskap, blandet med varsomhet og fortynnet til 1 % løsning. Det ble overført 2 mL A- og B-celler til hver sitt glassrør som ble sentrifugert ved 1000 g i 1 minutt. Supernatanten ble avpipettert og det ble tilsatt 3 mL buffer, dette ble blandet godt med pipetten. Det ble sentrifugert på nytt og supernatanten ble avpipettert. Videre ble det tilsatt 3 x opprinnelig volum med buffer til A- og B-cellene, for å oppnå en 1 %-løsning. Buffer med marsvinkomplement ble fortynnet 1:12,5, med totalt volum på 2,5 mL (200 µL komplement i 2300 µL buffer).

Før tilsetning til mikrotiterplate ble platen merket ved hjelp av et ark med inntegnet mal for mikrotiterplaten, se figur 8. A-celler ble tilsatt i rad A-D og B-celler i rad E-H. Hver rad ble merket med prøve-ID. Fortynningsrekken var tofold: 1:4 – 1:8 – 1:16 – 1:32 – 1:64 – 1:128. Brønnene 1 - 6 ble tilsatt 50 µL buffer med komplement. Komplementfortynningen var tofold: 1:24 – 1:48 – 1:96 – 1:192 – 1:384 – 1:768. 50 µL prøve ble tilsatt i kolonne 1, eksempelvis ble prøve-ID_A tilsatt i brønn A1 og E1, prøve-ID_B i B1 og F1 også videre. Det ble blandet godt med pipetten. Neste trinn var fortynning. 50 µL av prøve/komplement-blandingen ble pipettert ut fra kolonne 1 og overført til kolonne 2. Fortynningen ble blandet godt og ble gjentatt til siste kolonne. Til slutt ble 50 µL A-celler tilsatt i hver brønn i kolonne A-D og 50 µL B-celler tilsatt i hver brønn i kolonne E-H. Det ble satt lokk på platen før den inkuberte i 37 °C i 60 minutter.

Komplementfortynning 1:24 1:48 1:96 1:192 1:384 1:768							1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128					Fortynning		
Prøvefortynning 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128							4 8 16 32 64 128					Titer		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Prøve-ID _A	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	A-celler
Prøve-ID _B	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Prøve-ID _C	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Prøve-ID _D	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Prøve-ID _A	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	B-celler
Prøve-ID _B	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Prøve-ID _C	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Prøve-ID _D	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
							Fortynning						Absorbans	

Figur 8: Mal for merking av mikrotiterplate og en oversikt over hvor prøve (serum fra blodgiver), komplement og A- og B-celler tilsettes og hvilke brønner titerne tilhører (egen illustrasjon).

Når platen hadde inkubert i 60 minutter ble den sentrifugert ved 1500 g i 2 minutter. Med en multikanalspipette ble det pipettert 80 µL supernatant fra hver brønn over til en tom brønn for spektrofotometrisk avlesning. Startet med den største fortynningen. Den spektrofotometriske avlesningen ble gjort med Tecan Sunrise™. Absorbansen ble målt ved bølgelengde 405 nm. Referansebølgelengden var ved 492 nm.

2.3 INSTRUMENTER

Tecan Sunrise™ er en plateleser som har en skuff hvor mikrotiterplaten med 96 brønner settes inn for avlesning. De optiske egenskapene til prøvene er et resultat av en biologisk, kjemisk, biokjemisk eller en fysisk reaksjon.

Supernatanten i brønnene vil absorbere lys i bestemte bølgelengder. Absorbansen i hver brønn blir målt og resultatet blir lagret digitalt, men også skrevet ut. Dette ble gjort for å ha kopier hvis noe eventuelt skulle oppstå med datamaskinen som resultatene ble lagret på.

I plateleseren leses hver prøve av vertikalt. Dette gjør at det ikke er en fysisk stopper for detektoren som måler prøven. En konsekvens av dette er at plateleseren gir en mindre nøyaktig avlesning når det gjelder absorbanse.

2.3.1 SPEKTROFOTOMETRI

Tecan Sunrise™ benytter seg av spektrofotometri for å måle absorbanse i brønnene på mikrotiterplaten. Spektrofotometri er en teknikk som bruker lys til å måle kjemiske substanser (29).

Spektrofotometri kan direkte oversettes til lys-spekter-målinger. Ved bruk av spektrofotometri kan lysintensiteten måles ved absorpsjon hvor en måler grad av lysabsorpsjon (29). Da er det absorbanse som måles. I tillegg kan en også måle emisjon som er grad av lys som blir strålt ut av prøven. Ved måling av emisjon måler lysintensiteten for det emitterte lyset.

3. RESULTATER

For hver enkel prøve er det utformet et diagram som viser grad av hemolyse. Her er absorbans lagt inn i y-aksen og fortykning langs x-aksen. Knekkpunktet til grafen viser når den hemolyserende evnen til antistoffene i serumet avtar og blir mindre betydelig.

Resultatene presenteres også som sammenligninger av agglutinerende (tidligere forsøk av blodgiverne) og hemolytiske titeringsresultater i Vedlegg 1. Rådata presenteres i Vedlegg 2 (2-1 – 2-9), og bilder av alle platene som er analysert presenteres i Vedlegg 3. Det er tatt bilde av platene for også visuelt å kunne observere grad av hemolyse, samt å kunne benytte bildene ved eventuelle uklare resultater.

3.1 AGGLUTINERENDE TITRERINGSRESULTATER SAMMENLIGNET MED HEMOLYSERENDE TITRERINGSRESULTATER

For å sammenligne hemolyserende titer med tidligere resultater fra agglutinerende titrering, ble ProSang-databasen benyttet. I tillegg ble det benyttet lagrede dokumenter i permer for å hente frem resultater fra den agglutinerende titreringen. Grunnet systemskift på avdelingen for noen år tilbake var noe informasjon lagret digitalt og noe fysisk i permer. Positivt agglutinerende titeringsresultat ble vurdert fra «½ +» til «++++» for IgM mot A- og B-celler i tillegg til IgG mot A- og B-celler. Prøver som har ½ positiv reaksjon med agglutinerende metode har blitt rundet opp til nærmeste hele positive for å fremstille resultatene på en enklere måte. Dette er gjeldende for tabell 1. Fullstendig gradering finner en i Vedlegg 1.

Tabell 1: Viser sammenligning mellom gradering for hemolyserende titer og agglutinerende gradering. Tabellen viser resultatene for IgM og IgG mot A- og B-celler.

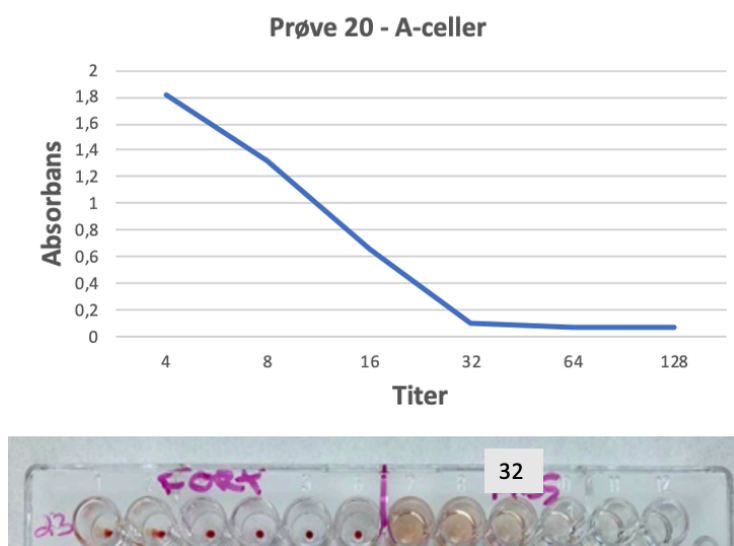
Hemolyserende titer	Agglutinerende gradering								
	Anti-A				Anti-B				
	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++	
4									IgM
8	6	3		1	7	3			
16	16	9	2		8	2	3	1	
32	5	8	5	2	1			1	
64						1			
4									IgG
8	14	6		1	8	4	1		
16	14	13	3	1	5	6	3		
32	9	8	7	1	1	1			
64									

Til høyre i tabellen ser en hvilken antistoffer blodgiverne er testet for, henholdsvis IgM og IgG. I kolonnen helt til venstre er de ulike titerne som blodgiverne gir utslag på listet opp. Her er det ønskelig at de fleste blodgiverne har lavest mulig titer, helst ≤ 16 da dette er terskeltiteren hvor det er så lav hemolyse at komplementsystemet ikke vil aktiveres, henviser til kapittel 1.4. I kolonnen til høyre for hemolyserende titer blir de ulike graderingene av de agglutinerende resultatene presentert. De er delt opp i de antistoffene det testes med, mot antigenene på erytrocyttene som tilsettes. Ved å se på en valgt hemolyserende titer, for eksempel hemolyserende titer 8, kan en se hvor mange prøver som ble vurdert til titer 8 med en spesifikk gradering på gelkort med anti-A eller anti-B. Ved den hemolyserende titeren på 8 kan en se at det er 6 prøver med titer 8 som fikk en «+»-gradering på gelkort med anti-A, at det var 3 prøver med «++»-gradering, ingen prøver med «+++»-gradering og at det var 1 prøve som hadde gradering «++++». Slik kan en få oversikt over sammenligningen mellom resultatene for den hemolyserende titeren og den agglutinerende titeren.

Tabellen viser samlet resultater for hemolyserende titreringsresultater og agglutinerende titreringsresultater. Alle blodgiverne har blitt testet for samtlige alternativer som gitt i tabellen. Det er 119 blodgivere som har blitt benyttet for å sammenligne metodene, men 13 resultater av dem ble forkastet. Hemolyserende titer ≤ 16 vurderes som lavt hemolyserende titer. Mens alt fra « $\frac{1}{2}$ +» til «++++» vurderes høyt med agglutinerende metode. Likheten mellom metodene er at en graderer for både A- og B-celler. Dette betyr at en blodgiver kan ha lavt titer for A-celler, mens høyt titer for B-cellene. Det er den samlede vurderingen som bestemmer om blodgiveren har høyt eller lavt titer. Er blodgiveren gradert « $\frac{1}{2}$ +» for agglutinerende metode eller har titer > 16 for hemolyserende metode vurderes blodgiveren til å ha høyt titer uavhengig av type antistoff og celletype. I teorien er det kliniske forskjeller mellom IgG og IgM med tanke på alvorlighets grad, som nevnt i kapittel 1.4. Dette tas likevel ikke hensyn til og antistoffene blir vurdert like alvorlig uavhengig av om det er type IgG eller IgM.

3.2 VURDERING AV HEMOLYTISK TITRERINGSRESULTAT

Som følge av stor variasjon mellom hver prøve innenfor hvert individ, vurderes titeringsresultatene visuelt ved observasjon av tydelig knekkpunkt i grafen. Der grafen flater ut vil det ikke lenger foregå hemolyse som kan indusere en HTR. Diagrammene for prøvene er markert med prøvenummer.



Figur 9: Prøve nr. 20 – A-celler med tydelig knekkpunkt ved titer 32 med tilhørende resultat i mikrotiterplaten representert under. På mikrotiterplaten er titer 32 skrevet inn over brønnen som tilsvarer knekkpunktet til grafen.

Figur 9 viser prøve nr. 20-A-celler som et eksempel på en ideell graf. Grafen beskrives som ideell da den synker helt til det oppstår ett knekkpunkt. Etter knekkpunktet stabiliserer grafen seg horisontalt på en lav y-verdi. At den legger seg horisontalt indikerer at det ikke oppstår hemolyse i de gjenstående fortyningene. Den viser at det er kontinuerlig synkende hemolyse jo høyere titer. Dette kan en også se visuelt på mikrotiterplaten i figur 9, ved at supernatanten mister den rødlige fargen etter hvert som fortyningen blir høyere. Grafen flater ut etter det tydelige knekkpunktet på titer 32. Det er altså høy grad av hemolyse frem til titer 32.

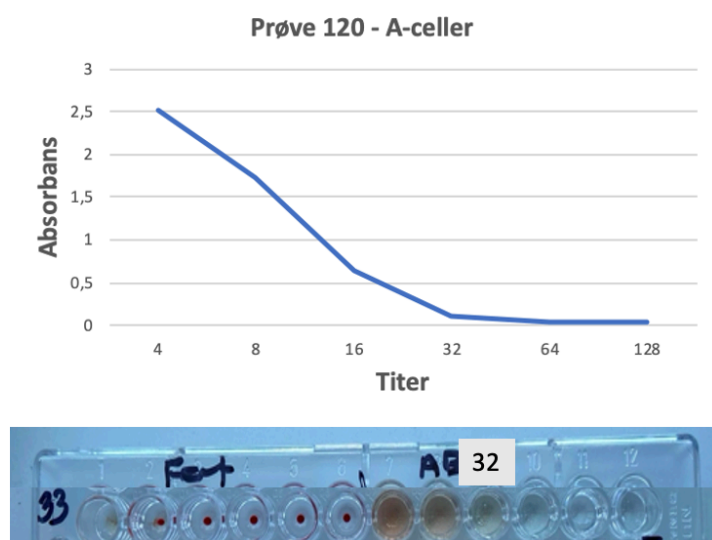
Tabell 2: Oversikt over agglutinerende titeringsresultat for prøver nr. 20.

	IgM anti-A	IgM anti-B	IgG anti-A	IgG anti-B
Prøve 20 A-celler	-	-	+	-

Fra tabell 2 ser en at det er positivt agglutineringsutslag på prøve nr. 20-A-celler. Det er antistoff IgG mot A-celler som er agglutinert med en gradering på “+”.

3.2.1 PRØVER MED HØYT HEMOLYTISK TITRERINGSRESULTAT

For å vurdere om prøver som tidligere ble vurdert høytitrede med agglutinerende metode, også kunne ha høy hemolyserende evne, ble 119 slike prøver hemolytisk titrert. Prøver med knekkpunktresultater > titer 16 blir vurdert til å ha antistoffer med høy hemolyserende evne. Under presenteres eksempel på hemolyserende titeringsresultat for slikt tilfelle (figur 10), utover dette henvises det til Vedlegg 1, 2-2 og 2-3 for resultater. Agglutinerende titeringsresultat for tilsvarende prøve viste graderingen som er presentert i tabell 4, her henvises det også videre til Vedlegg 1 for øvrige resultater.



Figur 10: Prøve nr. 120 – A-celler med høyt hemolyserende titeringsresultat for A-celler med tilhørende resultat i mikrotiterplaten representert under. På mikrotiterplaten er titer 32 skrevet inn over brønnen som tilsvarende knekkpunktet til grafen.

Figur 10 viser at prøve nr. 120 – A-celler har tydelig knekkpunkt på titer 32. Prøven ble vurdert med høy hemolyserende titer da grafen flater ut etter knekkpunktet ved titer 32.

Tabell 3: Oversikt over agglutinerende titeringsresultat for prøve nr. 120.

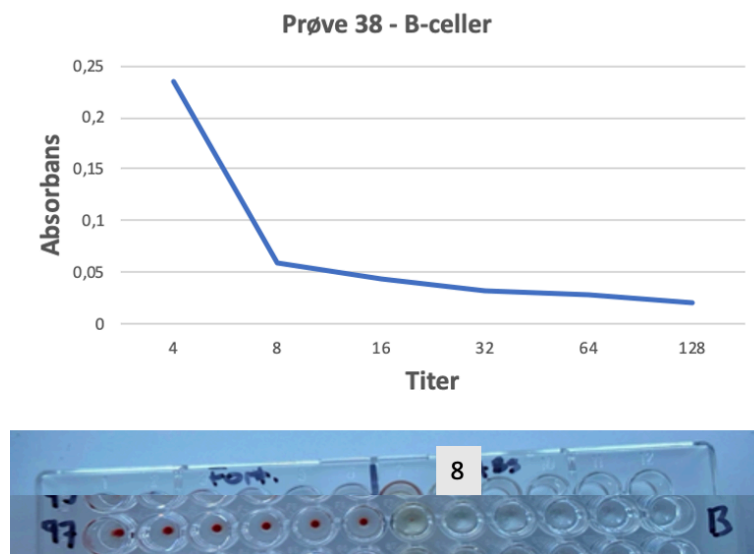
	IgM anti-A	IgM anti-B	IgG anti-A	IgG anti-B
Prøve 120 A -celler	-	-	+++	-

Tabell 3 viser at prøve nr. 120 – A-celler har sterk agglutinerende evne med sine antistoffer type IgG mot A-celler.

En ser av figur 10 at supernatanten i titer 4-16 inneholder hemolyserte celler. Graden av hemolyse synker med fortyningene, og fra og med titer 32 er det ikke mulig å observere hemolyse. Dette samsvarer med grafen. Det er tydelig rødfarge på supernatanten i titer 4 og 8, som også samsvarer med de høye absorbansverdiene på y-aksen.

3.2.2 PRØVER MED LAVT HEMOLYTISK TITRERINGSRESULTAT

Prøver med resultater med titer ≤ 16 blir vurdert til å ha antistoffer med lav hemolyserende evne, til tross for høyt agglutinerende titeringsresultat. Under presenteres eksempel på hemolyserende titeringsresultat for et slikt tilfelle (figur 11), utover dette henvises det til Vedlegg 1, 2-2 og 2-3 for resultater. Agglutinerende titeringsresultat for tilsvarende prøve viste graderingen som er presentert i tabell 4 her henvises det også videre til Vedlegg 1 for øvrige resultater.



Figur 11: Graf for prøve nr. 38 med lav hemolyserende titeringsresultat for B-celler med tilhørende resultat i mikrotiterplaten presentert under. På mikrotiterplaten er titer 8 skrevet inn over brønnen som tilsvarende knekkpunktet til grafen.

Figur 11 viser at prøve nr. 38 – B-celler har tydelig knekkpunkt på titer 8. Prøven ble vurdert med lav hemolyserende titer da grafen flater ut etter knekkpunktet på titer 8. En ser av figur 11 at supernatanten i titer 4 inneholder kun en antydning til hemolyserte celler. Videre i fortynningsrekken av supernatant er det ingen hemolyserte celler å observere. Dette samsvarer med grafen. De svake fargene i kolonne 7-12 i rekken som følger av lav hemolyse, samsvarer

med de lave absorbansverdiene på y-aksen. Sammenlignet med figur 10 (fra 3.1.1) er det lave absorbansverdier.

Tabell 4: Oversikt over agglutinerende titeringsresultat for prøve nr. 38 – B-celler.

	IgM anti-A	IgM anti-B	IgG anti-A	IgG anti-B
Prøve 38 B-celler	++	-	++	-

Tabell 4 viser at prøve nr. 38-B-celler har sterk agglutinerende evne med sine antistoffer typer IgM og IgG mot A-celler.

3.2.3 SAMMENLIGNING AV AGGLUTINERENDE TITRERINGSRESULTAT OG HEMOLYSERENDE TITRERINGSRESULTAT

For å vise et utklipp av resultater lages tabell 5. Her er det lagt inn fullstendig dokumentering av resultatene for å vise sammenligning mellom de to metodene. Tabellen viser prøveresultater for den hemolyserende metoden og den agglutinerende metoden. Med hemolyserende metoden er det testet mot A- og B-celler. Den agglutinerende metoden tester IgM mot A- og B-celler i tillegg til IgG mot A- og B-celler. Den hemolyserende metoden skiller ikke mellom antistofftypene i motsetning til den agglutinerende metoden.

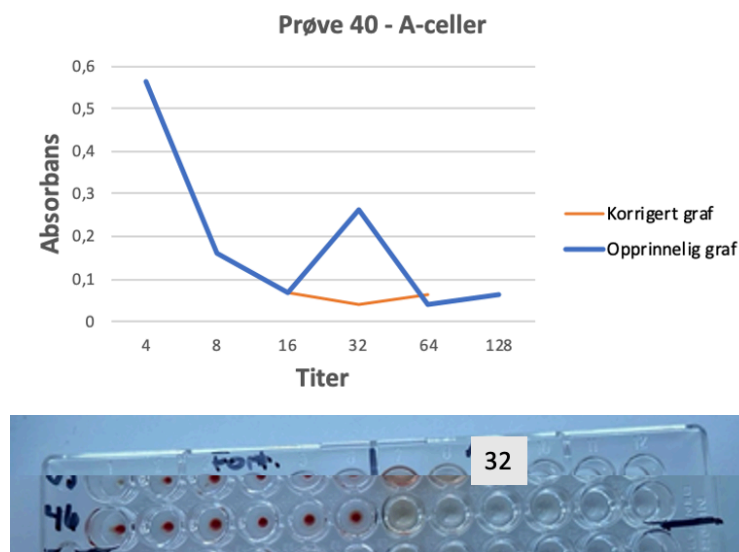
Tabell 5: viser hemolyserende titeringsresultat og agglutinerende titeringsresultat for respektive prøvenummer.

Prøve nr.	Hemolyserende titer		Agglutinerende gradering			
	A-celler	B-celler	IgM		IgG	
			A-celler	B-celler	A-celler	B-celler
2	16	16	-	-	+	-
6	32	32	-	+	-	-
18	16	16	-	+++	-	+
32	16	64	-	-	+	-
39	32	8	++++	+	+++	-
44	32	16	+++	-	++++	++
49	16	8	+++	+++	++	++
78	16	16	+	++	+	+
87	32	16	+	+	+	+
95	8	16	+	-	++	-
126	16	16	++	+++	-	+
167	32	64	+++	++	+++	-

Tabell 5 viser et utvalg av resultater for sammenligningen mellom agglutinerende titeringsresultat og hemolyserende titeringsresultat. Hemolyserende titeringsresultat kan være ulikt fordelt mellom A- og B-celler. I tillegg observeres det også at hemolyserende titer kan være lik mellom enkelte prøver, mens agglutinerende titer er ulik. Eksempelvis for prøve 18 og 78. For at en prøve skal vurderes til lav hemolyserende titer må titer være ≤ 16 for både A- og B-celler. Eksempelvis prøvenummer 44, her har A-cellene titer lik 32, mens B-cellene titer lik 16, den samlede vurderingen gjør at prøven vurderes til titer høyt.

3.3 KORRIGERING AV SLENGERE

Enkelte diagrammer med slengere på grafen etter knekkpunktet, har blitt korrigert ved å forkaste x- og y-verdien (titer og absorbansepunktet) hvor det oppstod. Derfor vil enkelte grafer mangle en titerfortynning på x-aksen.



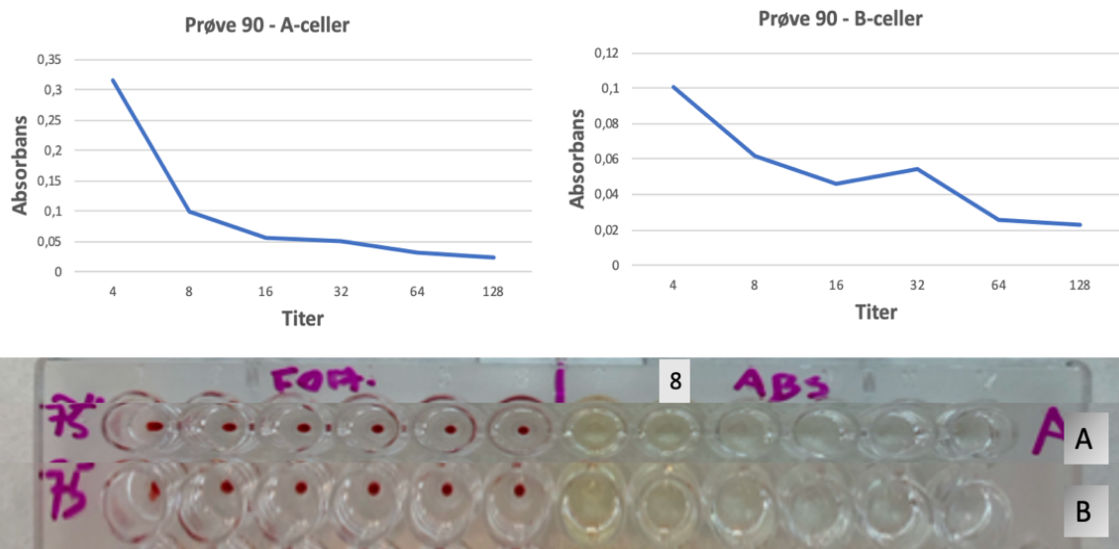
Figur 12: Den blå grafen i diagrammet viser hvordan den opprinnelige grafen så ut med slengeren. Den oransje grafen er korrigert for x- og y-verdien hvor slengeren oppstod.

I forhold til det ideelle eksempelet på diagram, figur 9 i kapittel 3.2, ser en at den blå grafen på figur 12 inneholder et avvikende punkt på titer 32. Denne slengeren er lokalisert etter knekkpunktet som ble brukt til titervurdering. Derfor ble det laget en ny graf for prøven som er korrigert for det avvikende punktet. En ser i figur 12 at ved korrigering flater grafen jevnt ut etter tydelig knekkpunkt til vurdering på titer 8. 27 prøver ble korrigert for slike slengere, henviser til Vedlegg 2-4 for komplett oversikt.

En kan se på mikrotiterplaten at prøvenummer 40 generelt har lite hemolyse i supernatanten i kolonne 7-12. Der observeres det ingen hemolyse, noe som forsterker mistanken om at det kun er en slenger og ikke reell hemolyse.

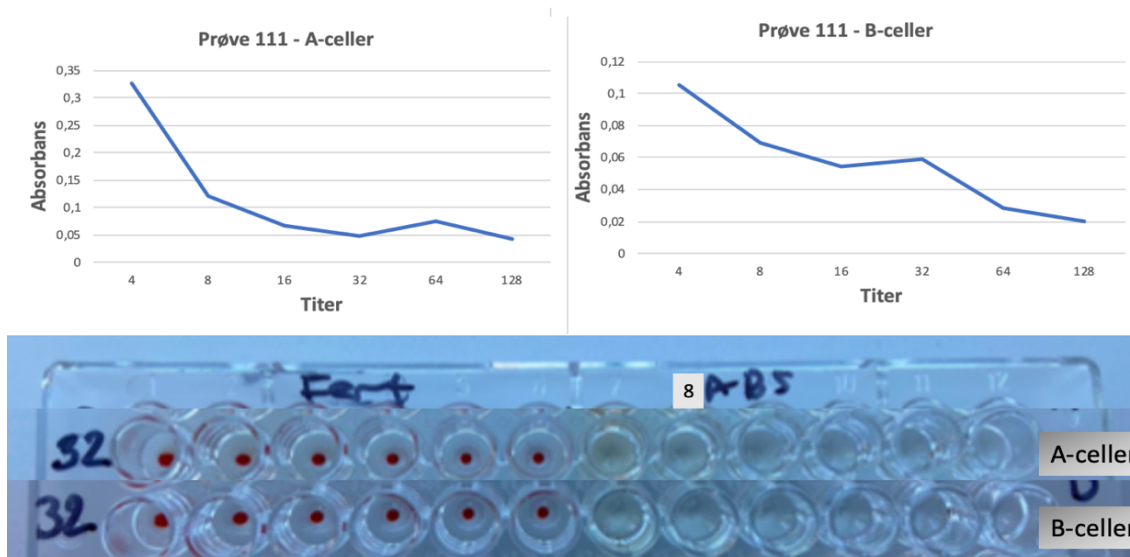
3.4 LAVT TITER MED AGGLUTINERENDE METODE

Det ble analysert 49 tilfeldige prøver som var bestemt lavtiter etter utført agglutinerende titrering. Dette for å undersøke om de som allerede var titret lavt agglutinerende, i tillegg hadde lavt hemolyserende titer. Under presenteres to eksempler på hemolytisk titeringsresultater av agglutinerende lavtiter-prøver (figur 13 og 14).



Figur 13: Diagrammet til venstre viser grafen for prøve nr. 90 med hemolyserende titeringsresultat lik 8 tilsatt A-celler. Diagrammet til høyre viser graf for samme prøve tilsatt B-celler, med hemolyserende titeringsresultat lik 8. Mikrotiterplaten med resultat for prøve nr. 90 tilsatt A- og B-celler er presentert under diagrammene.

Figur 13 viser knekkpunkt \leq titer 16 for både hemolysering av A- og B-celler, altså titer 8. For prøven tilsatt B-cellene er det lavere absorbansverdier enn for A-celler, det er altså mer hemolyse av A-cellene enn B-cellene.



Figur 14: Diagrammet til venstre viser prøve nr. 111 med hemolyserende titeringsresultat på 8 for A-celler. Diagrammet til høyre viser samme prøve, også med hemolyserende titeringsresultat på 8 for B-celler. Mikrotiterplaten med resultat for prøve nr. 111 tilsatt A- og B-celler er presentert under diagrammene.

Figur 14 viser at prøve nr. 111-A- og B-celler har like tendenser som prøve nr. 90-A- og B-celler. Det er her også lavere hemolyse av B-cellene enn A-cellene, og de hemolyserende titeringsresultatene er henholdsvis på titer 8.

En kan se av mikrotiterplaten i figur 14 at prøvene gir svak hemolyse av A- og B-celler i fortykning 1:4 og 1:8. Videre i fortykningsrekken er supernatanten blank og tilnærmet null hemolyse kan observeres. Det korrelerer med den hemolyserende titerbestemmelsen med plateleseren, og vurdering av diagrammet.

Hadde diagrammet for prøve 90 tilsatt B-celler og 111 tilsatt B-celler hatt samme verdier på y-aksen som for prøvene tilsatt A-celler, ville grafen vært en rett strek uten knekkpunkt til vurdering. På tross av to knekkpunkt for prøve 90 og 111 tilsatt B-celler, vurderes absorbansforskjellen mellom titer 8 og 64 for lav til betydelig hemolyse. Denne vurderingen baseres på at absorbansverdien er lav i tillegg til det tydelige knekkpunktet og at grafen synker videre og jevner seg ut. Første knekkpunkt vurderes altså som hemolytisk titeringsresultat for prøve 90 og 111 tilsatt B-celler.

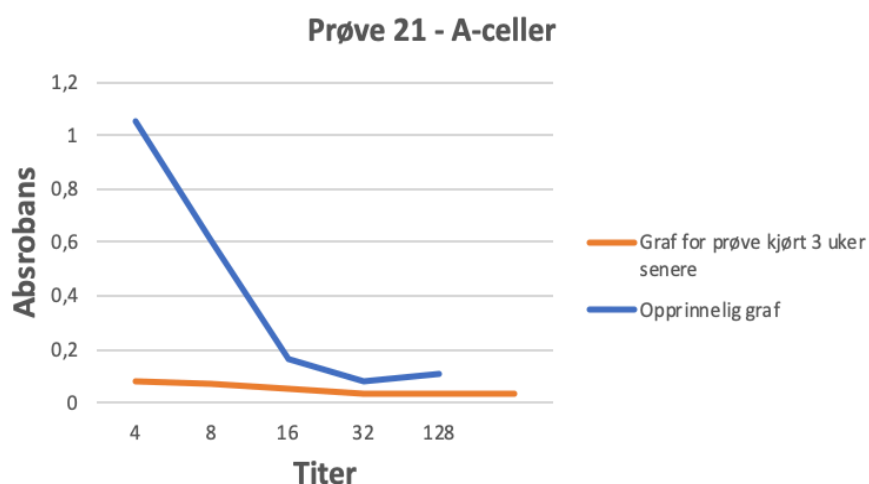
Tabell 6: Oversikt over agglutinerende titeringsresultat for prøve nr. 90 og 111.

Prøvenummer	IgM anti-A, gradering	IgM anti-B, gradering	IgG anti-A, gradering	IgG anti-B, gradering
90	-	-	-	-
111	-	-	-	-

Tabell 6 viser tidligere vurdering av prøvenes agglutinerende egenskaper. Både prøve 90 og 111 er tidligere besluttet til å være lavtiteret da de ikke har positivt utslag på verken IgM eller IgG mot både antigen A og B.

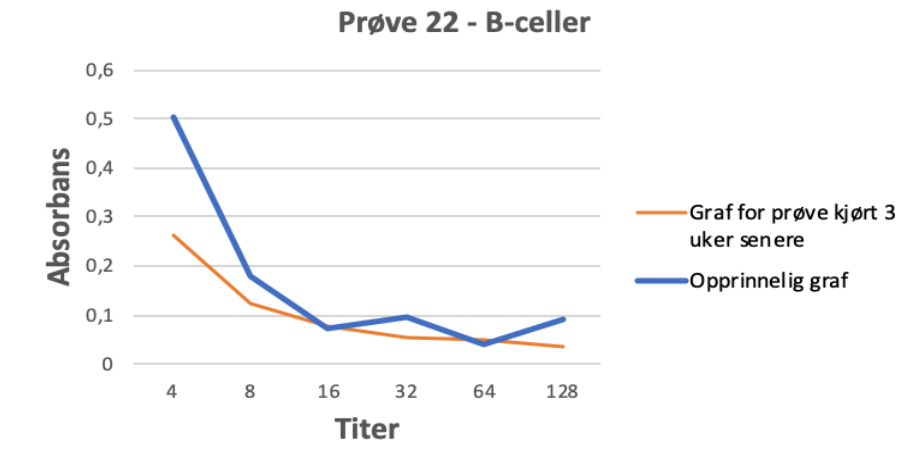
3.5 HOLDBARHET

For å undersøke om prøvene kunne oppbevares over en lengre tidsperiode ble det utført et holdbarhetsforsøk. Prøver som tidligere var hemolytisk titeret ble re-analysert for å undersøke hvordan resultatet ble etter 3 uker oppbevart i kjøleskap ved 4 °C.



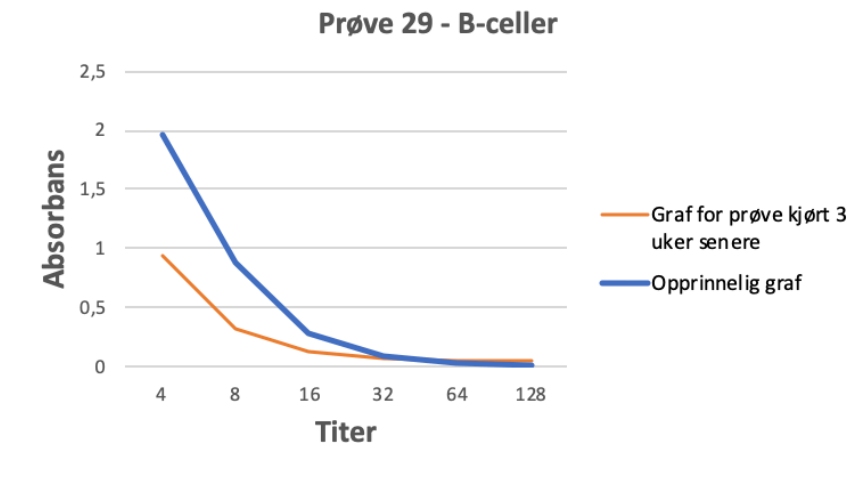
Figur 15: Diagram med hemolytisk titeringsresultat for prøve nr. 21 tilsatt A-celler. Den blå grafen representerer hemolytisk titeringsresultat for prøven kjørt første gang. Den oransje grafen representerer hemolytisk titeringsresultat for samme prøve kjørt 3 uker senere.

Figur 15 viser at absorbansverdiene på prøve nr. 21 tilsatt A-celler kjørt 3 uker senere, hadde sunket vesentlig siden første kjøring av prøven. Prøven vurderes til hemolytisk titeringsresultat 16 for prøven kjørt første gang ettersom knekkpunktet på den blå grafen er tydelig ved denne titeren. Ettersom hemolysen av cellene tilsatt er betydelig redusert ved hemolytisk titrering etter 3 ukers lagringstid, vil det ikke kunne vurderes hemolytisk titeringsresultat.



Figur 16: Diagram med hemolytisk titeringsresultat for prøve nr. 22 tilsatt B-celler. Den blå grafen representerer hemolytisk titeringsresultat for prøven kjørt første gang. Den oransje grafen er hemolytisk titeringsresultat for samme prøve kjørt 3 uker senere.

Figur 16 viser at prøve nr. 22 – B-celler kjørt første gang er et eksempel på ustabil pipettering, men den blå grafen viser likevel et tydelig nok knekkpunkt til titervurdering 8. Som på grafen til prøve 21 med A-celler, er det her også lavere absorbansverdier på prøven kjørt om igjen tre uker senere. Nok et eksempel på svekkende hemolyserende evne av antistoffene i serum.



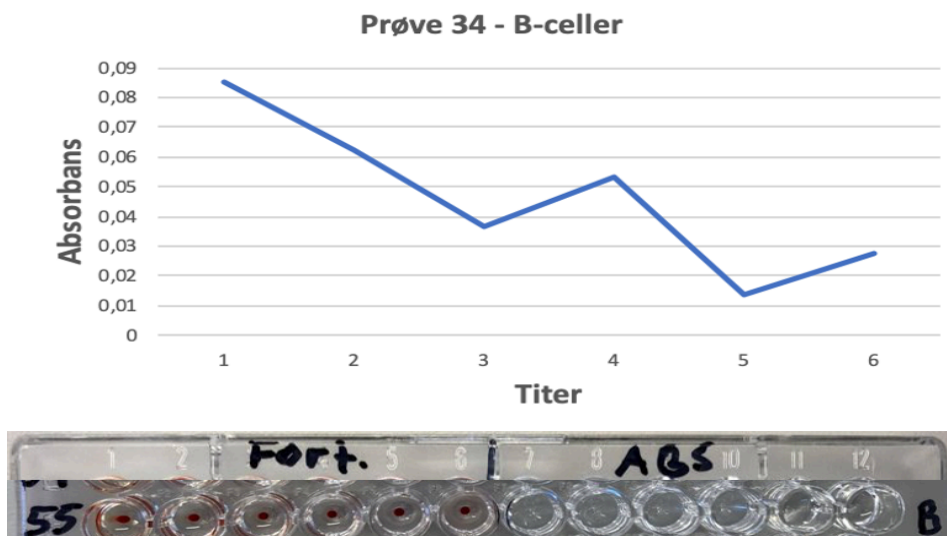
Figur 17: Diagram med hemolytisk titeringsresultat for prøve nr. 29 tilsatt B-celler. Den blå grafen representerer hemolytisk titeringsresultat for prøven kjørt første gang. Den oransje grafen representerer hemolytisk titeringsresultat for samme prøve kjørt 3 uker senere.

Figur 17 viser på den oransje grafen til prøven kjørt om igjen 3 uker senere, at nokså tydelig knekkpunkt forekommer i dette tilfelle. Absorbansverdien i knekkpunktet er likevel betydelig lavere enn for den blå grafen til prøven kjørt første gang. Lavere absorbansverdier på y-aksen er tilfelle for alle prøver kjørt om igjen etter tre ukers lagringstid i kjøleskap.

Henviser til Vedlegg 2-8 og 2-9 for øvrige holdbarhets-resultater.

3.6 FORKASTEDE PRØVER

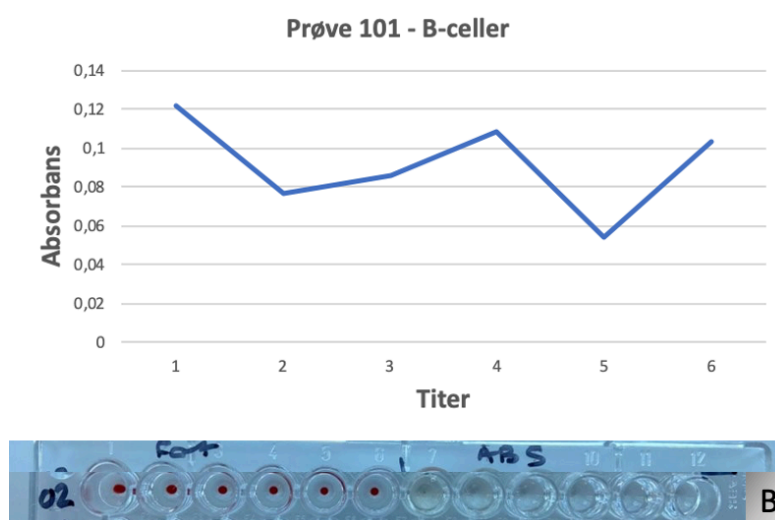
Diagrammer med grafer som ikke lot seg vurdere måtte forkastes. Dersom en slenger oppsto uten et tydelig knekkpunkt til vurdering måtte også prøveresultatet forkastes. Under presenteres to eksempler på forkastede prøveresultater, for oversikt over resterende forkastede prøveresultater henvises det til Vedlegg 2-1. Det ble totalt forkastet 23 prøveresultater.



Figur 18: Grafen til prøve nr. 34 tilsatt B-celler viser at det oppstår en slenger i diagrammet, uten at det er et tydelig knekkpunkt til vurdering. Under grafen ligger mikrotiterplaten med resultat i kolonne 1-6 da supernatanten ikke ble avpipettert.

Figur 18 viser at prøve nr. 34 – B-celler består av en slenger. Grafen har ikke tydelig knekkpunkt til vurdering, derfor kunne ikke slengeren fjernes.

Av figuren ser en også at bildet av mikrotiterplaten ble tatt før avpipettering av supernatanten. Fortynning 1:32 der slengeren oppstår har likevel en tydelig pellet uten hemolyse i supernatanten. Slengeren kan ha oppstått dersom celler fra pelleten har blitt pipettert med supernatanten over i brønn nr. 10. Må likevel forkastes på grunn av utydelig graf.



Figur 19: Diagram for prøve nr. 101 tilsatt B-celler med en utydelig graf. Mikrotiterplaten med resultat for prøve nr. 111 tilsatt B-celler er representert under diagrammet.

Figur 19 viser diagrammet til prøve nr. 101 – B-celler med utydelig graf. Prøven ble titrert med celler utgått på dato. Figuren viser også at hemolyse i supernatanten for prøve nr. 101 gradvis blir mindre med økt fortynning.

4. DISKUSJON

4.1 VURDERING AV HEMOLYSERENDE TITRERINGSRESULTAT

For innhenting av prøvematerialet ble det ikke gjort noe spesifikt ønske om kjønn eller alder. Det ble derfor analysert vilkårlig antall prøver fra menn og kvinner i alder fra 18 år og oppover. Resultatene ble delt inn i kjønn og alder for å undersøke om en kunne se noe forskjell mellom dem.

Tabell 8: Samlet oversikt over hemolytiske titeringsresultater for kvinner og menn, over og under 50 år. Totalt 157 prøver av blodtype O.

	Kvinner over 50		Kvinner under 50		Menn over 50		Menn under 50	
	RhD +	RhD -	RhD +	RhD -	RhD +	RhD -	RhD +	RhD -
Antall \leq titer 16	13	4	40	8	10	4	12	6
Antall $>$ titer 16	1	1	16	7	2	1	4	1
Antall forkastede prøver	1	0	2	2	3	2	1	2
Totalt antall prøver	15	5	58	17	15	7	17	9

Fra tabell 8 ser en at det er analysert flest O RhD + prøver. Det er totalt 13 prøver som ble forkastet grunnet graf som ikke kunne vurderes for enten A- eller B-celler, for samme prøve. Det er analysert færre prøver fra kvinner over 50 år sammenlignet med under 50 år. Når det gjelder menn er det analysert flere prøver fra menn under 50 år sammenlignet med over 50 år. Dette skyldes at det ikke ble gitt noe spesifikt ønske om alder eller kjønn. Fordelingen er tilfeldig. Tabellen viser at det er flertall av prøvene som har titer \leq 16.

Resultatene viser at flertallet av blodgiverne som er vurdert til høyt agglutinerende titer har lavt hemolyserende titer. Dette betyr at antistoffene til blodgiverne ikke har sterk nok evne til å sette i gang en hemolytisk transfusjonsreaksjon. Dette styrker teorien om at antistoff som har høy agglutinerende evne kan ha lav hemolyserende evne.

Det er kjent at ABO-antistoffenes titer synker med alderen (30). For å kunne diskutere om alder hadde påvirkning på titeringsresultatene burde det vært analysert flere blodgivere, både over

og under 50 år hos begge kjønn. Det er dog ganske likt antall menn under og over 50 år som er analysert. Resultatene viser likevel ikke noe forskjell på titer for menn over og under 50 år. Det er til sammen, uavhengig av Rh-type, 5 prøver med titer > 16 for menn under 50 år. Hos menn over 50 år er det kun 3 prøver som har titer > 16 . Dette er ikke noe betydelig differanse.

For kvinner er resultatet litt annerledes. Her ser en at det er flere kvinner under 50 år som er vurdert til høyt hemolytisk titer sammenlignet med kvinner over 50 år. Det er dog analysert flere prøver av kvinner under 50 år enn kvinner over 50 år. For å undersøke likt antall blodgivere under og over 50 år burde innsamlingsperioden av prøver vart over en lengre tidsperiode. I tillegg var innsamlingsperioden midt i utbruddet av Covid-19 som preget aktiviteten på seksjon for blodgivning og påvirket dermed innsamlingen i negativ grad.

4.1.1 HØYE HEMOLYSERENDE TITRERINGSRESULTATER

Det er totalt 31 prøver som har blitt vurdert til å ha høy hemolyserende titer, > 16 . Dette resultatet er uavhengig av kjønn og alder. Fordi det ikke er analysert tilstrekkelig antall prøver for de ulike variablene (kjønn og alder), er det ikke mulig å diskutere om det er noe mønster for dette. På den andre siden kan en diskutere at det ikke er et mønster eller en sammenheng mellom de ulike metodene. Figur 8 viser en prøve med høy hemolyserende evne. Prøven har titer vurdert til 32 for A-celler ved bruk av den hemolyserende titreringsmetoden. Ved agglutinerende titermetode ser en at prøven har «+++» for IgG mot anti-A. Når en benytter den hemolyserende metoden kan en ikke undersøke om det er IgG- eller IgM-antistoffer som aktiverer komplementsystemet og utløser hemolyse, kun om de påvirker A- eller B-celler. Dette kan bidra til å svekke metoden da det kan være klinisk relevant om det er IgG eller IgM-antistoffer som aktiverer komplementsystemet. Likevel har det per dags dato ikke en betydning om det er IgM eller IgG, de blir vurdert like alvorlig.

4.1.2 LAVE HEMOLYSERENDE TITRERINGSRESULTATER

Det er 75 prøver som har blitt vurdert til å ha lav hemolyserende titer, ≤ 16 . I likhet med prøvene som har blitt vurdert til å ha høy hemolyserende titer, er dette resultatet også uavhengig av kjønn og alder basert på samme grunn. Figur 10 viser prøve 38-B-celler med lav hemolyserende evne med et knekkpunkt ved titer 8. Ved bruk av den agglutinerende metoden har samme prøve «+++» gradering for både IgM anti-A og IgG anti-A. Etersom blodgiveren ble vurdert til høyt agglutinerende titer, men lav hemolyserende titer, kan en dermed se at det nødvendigvis ikke er en sammenheng mellom de to metodene. Dette resultatet styrker hypotesen om at blodgivere

som har blitt vurdert til høyt agglutinerende titer kan ha en lav hemolyserende titer og dermed donere fullblod til bruk i krisesituasjoner.

4.1.3 SAMMENLIGNING AV RESULTATER FOR AGGLUTINERENDE TITER MED HEMOLYSERENDE TITER

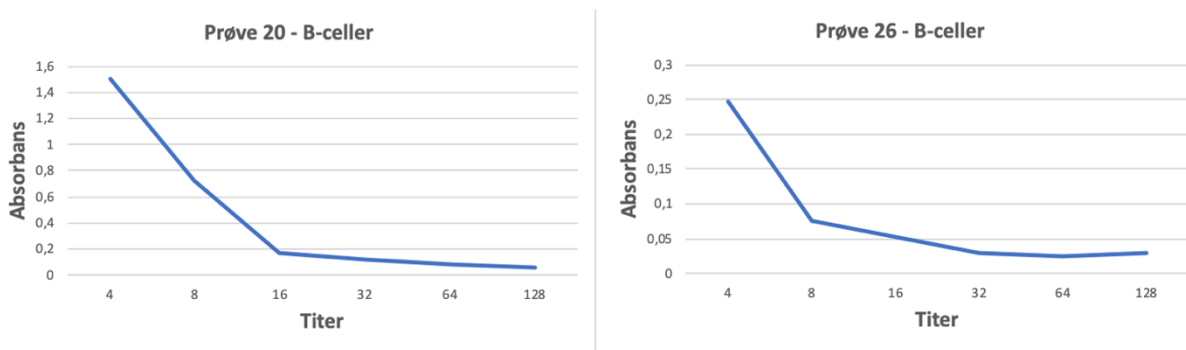
Tabell 5 viser først og fremst at alle resultater er uavhengige av hverandre. Det vil si at selv om to prøver har samme hemolyserende titeringsresultat, vil det agglutinerende titeringsresultatet være ulikt og ikke sammenlignbart. Eksempel på dette er prøve nr. 2 og prøve nr. 78 fra tabell 5. Hvor prøve nr. 2 kun har en positiv reaksjon og dette ved IgG A-celler, mens prøve nr. 78 har flere positive reaksjoner ved agglutinerende teknikk. Til tross for ulike graderinger ved agglutinerende metode har de likt hemolyserende resultat. Dette betyr at en sterk agglutinerende prøve kan være svak hemolyserende. Videre på prøve nr. 6 observeres det at antistoffene er sterkt hemolyserende på begge celler. Derimot så har antistoffene svak agglutinerende evne. Prøve nr. 32 er en av de få som har titer 64 på B-cellene. Her er det stor differanse mellom A- og B-celler, da A-celler er vurdert til titer 16. Sammenlignet med agglutinerings resultatene har denne blodgiveren kun en positiv reaksjon, og dette med IgG A-celler som er gradert «+». I og med at blodgiveren har hemolyserende titer 64 på B-cellene er det underlig at det ikke er en positiv reaksjon ved agglutinerende teknikk. Dette er med å undertrykke hypotese om at det er en sammenheng mellom hemolyserende og agglutinerende evne. På prøve nr. 44 ser en at hemolyserende titer er lik 32 på A-celler og 16 på B-celler. Noe som tyder på at antistoffene i serumet er sterkere mot A-celler enn B-celler. I tillegg ser en fra agglutinerende resultat at antistoffene agglutinerer sterkest A-cellene. Videre ser en at prøve nr. 167 har høy hemolyserende titer på begge cellene, dog høyest på B-celler. Denne blodgiverens antistoffer har i tillegg sterk agglutinerende evne, da den har flere positive reaksjoner.

4.2 VURDERING AV SLENGERE

Slengere, også kalt uteliggere, er verdier som avviker sterkt fra de øvrige verdiene slik at en mistenker at det har skjedd en feil (31). En verdi i et datasett kalles vanligvis en slenger eller uteligger dersom det avviker fra en normal eller kjent oppførsel til dataene og om det forutsetter verdier som er langt fra kjente verdier eller gjennomsnittsverdier (32). Slike feil kan for eksempel skyldes at pipettespissen ikke har vært festet ordentlig på pipetten, at en har tilsatt prøve, buffer eller celler to ganger i samme brønn eller en fortynningsfeil. Av figur 12 observeres en uteligger ved fortykning 1:32. Absorbansen i dette punktet er høyere enn

forventet. Ideelt sett skulle absorbansen hatt en verdi mellom 0,03 og 0,025. På grunn av slengerne er det vanskelig å sette riktig titer på blodgiveren. Ettersom det ble tatt bilde av mikrotiterplatene, kunne kan en undersøke om det sees reel hemolyse i fortyning hvor slengerpunktet oppstod. For å kunne sette en titer må det utføres en re-analysering av prøven. Dersom prøven er mindre enn 6 dager gammel kan prøven kjøres på nytt igjen. Ellers må det tas en ny blodprøve av blodgiveren.

4.3 INTERINDIVIDUELL VARIASJON



Figur 20: Ved å se på prøve 20-B-celler sammenlignet med prøve 26-B-celler, legger en merke til at y-aksen har ulike verdier. Dette indikerer at det er interindividuell variasjon og er grunnen til at en må vurdere den individuelle titeren basert på knekkpunktet til grafen.

Interindividuell variasjon defineres som den forskjellen i konsentrasjonen av en komponent som en finner hos flere personer (33). Det gir altså uttrykk for en biologisk variasjon mellom individene i et utvalg av den friske befolkningen. Dersom den interindividuelle variasjonen hadde vært lav, ville det vært mulig å benytte en bestemt terskelverdi. På grunn av den store interindividuelle variasjonen kan ikke en konstant terskelverdi benyttes i vurdering av hemolyse på samtlige blodgivere. Dermed bestemmes den individuelle titeren til blodgiveren ved knekkpunktet til grafen.

Prøve 20 – B-celler og prøve 26 – B-celler representerer to ulike blodgivere. Som figur 20 viser har de to prøvene ulike verdier på y-aksen. Dette tyder på at den interindividuelle variasjonen setter en stopper for å bruke en konstant terskelverdi. Dersom det hadde blitt benyttet en terskelverdi på 0,05 på alle prøvene ville knekkpunktet til prøve 26 – B vært på titer 16 istedenfor 8.

4.4 PRØVER SOM ER VURDERT LAV MED AGGLUTINERENDE METODE

For å undersøke om allerede lavtitrede prøver med agglutinerende metode også har lav hemolyserende evne ble det analysert 49 slike prøver, 39 av disse kunne vurderes med tydelig graf. Det ble vurdert om slike prøver kunne bli benyttet som «intern kontroll». Da det ikke er dokumentert sammenheng mellom agglutinerende evne og hemolyserende evne til antistoffene kan en ikke benytte slike prøver til kontroll. Det betyr dermed at en prøve med lav agglutinerende evne, kan ha høy hemolyserende evne. Likevel ser en av resultatene i Vedlegg 2-1 at alle de 39 prøvene som ble analysert har lav hemolyserende evne i tillegg til lav agglutinerende evne. Noe som er svært ønskelig da disse antistoffene vil være meget «ufarlig» ved eventuell transfusjon til pasient. Det er dermed ikke analysert tilstrekkelig mengde prøver med lav agglutinerende evne til å diskutere/trekke konklusjoner om at lave agglutinerende prøver i tillegg er lave hemolyserende. Det ville vært ønskelig å analysere flere slike prøver for å undersøke om disse evnene har en større sammenheng. Det betyr at om en skulle endret metoden på AIT, måtte alle de lavtitrede prøvene blitt re-analysert med hemolyserende metode. Dette for å forsikre seg om at en falsk lav-titret prøve ikke blir gitt som kriseblod. Eventuelt kunne det blitt gjort en større studie på lavtitrede prøver og sammenlignet agglutinerende evne med hemolyserende evne i større grad.

4. 5 HOLDBARHET

For å undersøke hvor lenge prøvematerialet kan oppbevares ble det utført et holdbarhetsforsøk. Her ble 12 prøver re-analysert tre uker etter første analysering. Dette forsøket ble utført for å undersøke hvordan resultatet blir når prøvematerialet oppbevares over lengre tid. Bare små endringer på antistoffene kan føre til svakere potens og dermed falske resultat.

Absorbansverdiene på prøve nr. 21 som fremstilles i figur 15 viser reduserte verdier i forhold til prøven kjørt tre uker tidligere. Dette gjør at en kan mistenke at antistoffenes hemolyserende evne blir svekket gjennom oppbevaringsperioden. Resultatene fra prøve nr. 21 med A-celler analysert innen gitt tidsperiode viser at absorbansen starter på omtrent 1,2. Når prøven re-analyseres tre uker etter tappetidspunkt starter absorbansen på omtrent 0,08. Dette tyder dermed på at det er betydelig forskjell mellom nytt og gammelt prøvemateriale. Ut fra diagrammet observeres det at prøven som er re-analysert har en ujevn graf med flere knekkpunkt. Dette er ikke ønskelig da det gjør grafen vanskeligere å tolke i forhold til prøven som er analysert kort tid etter tappetidspunkt som har en fin jevn graf med ett tydelig knekkpunkt.

Videre vises prøve nr. 22 med B-celler i figur 16. Grafen er ujevn med flere knekkpunkter noe som skaper vanskeligheter når en skal tolke resultatet. Til tross for at grafen har flere knekkpunkter er knekkpunktene svært tydelige noe som gjør at den vurderes til titer 16. Slike ujevne grafer kan blant annet oppstå av pipetteringsfeil. Til tross for dette blir grafen og resultatet benyttet da knekkpunktene er tydelig og synkende, slik som ønsket. Sammenlignet med første analyseringen viser resultatene fra analyseringen tre uker senere at absorpsjonen er lavere. Dette viser også figur 17 med prøve nr. 29.

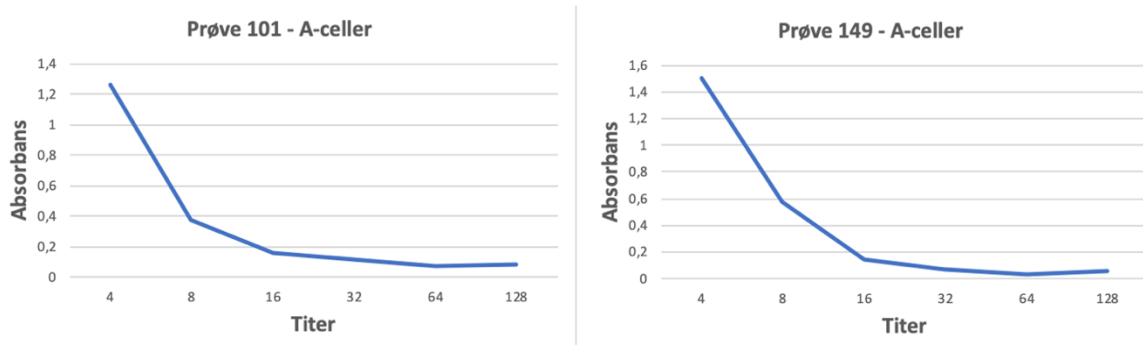
4.6 FORKASTEDE PRØVER

Hvis en ser på figur 18 som viser prøver 34-B-celler ser en at kurven ikke er synkende. Ideelt sett skulle kurven ha flatet ut etter et tydelig knekkpunkt. Dette fordi styrken på hemolysen skal synke jo mer en prøve er fortynnet. Dette er ikke tilfelle med prøve 34-B-celler. Her synker først kurven til fortynning 1:16 før den stiger til et toppunkt ved fortynning 1:32. Videre synker kurven ned til fortynning 1:64 før den igjen stiger. Dette gjør at resultatet er ustabil og dermed ikke til å stole på. Ved billedtaking av mikrotiterplaten tilhørende prøve 34-B-celler ble det gjort en feil ved at bilde ble tatt før supernatanten ble pipettert av. Likevel klarer en å se en tydelig pellet uten tegn til hemolyse i supernatanten ved fortynning 1:32 i figur 18. Dermed er det ikke samsvar mellom resultatene fra graf og mikrotiterplaten. Dersom celler fra pelleten har blitt pipettert med supernatanten over i brønn 10 kan dette være årsaken til slengeren. Det ville vært ønskelig og analysert prøven igjen for å undersøke om grafen blir godkjent ved re-analysering. Dette ble dog ikke gjort grunnet at grafene ble utformet på et senere tidspunkt, som gjorde at prøven var for gammel da dette ble oppdaget.

Prøve 101-B-celler (figur 19) viste også en graf med utydelig kurve under kapittel 3.6. Figuren tilhørende prøven viste en graf med store svingninger som gjorde resultatet umulig å tolke. Årsaken til dette kan ha vært at det ble benyttet celler som var gått ut på dato, både A- og B-celler. Dette skal ikke ha stor betydning for resultatet dersom det ikke er stor forandring på cellekvaliteten kun et par dager etter utløpsdato. Resultatene ble likevel tatt med til vurdering for å undersøke om det var mulig å kommentere disse. I disse tilfellene er det heller ikke samsvar mellom graf og mikrotiterplate. Mikrotiterplaten viser tydelige fortynninger hvor hemolysen gradvis forsvinner. Her er bildet (figur 19) tatt etter avpipettering av supernatanten som utelukker kontaminering av høy konsentrasjon til lav konsentrasjon. Det er dermed vanskelig å spekulere i hva årsaken kan ha vært.

4.7 METODEEVALUERING

I følge Mollison vil hemolytisk titer ≤ 16 ikke gi hemolyse i den grad at hemolysen kan starte en HTR, henviser til kapittel 1.4. Det benyttes derav > 16 som signifikant høyt titer for vurderingene gjort i denne oppgaven. Høy hemolytisk titer defineres da som > 16 . Ved vurdering av titeringsresultat ble knekkpunkt-metoden brukt. Utfordringene knyttet til denne metoden var i tilfeller der grafen hadde to knekkpunkt. Uten funn av referanser for hemolytisk titering utført med absorbansmåling på plateleser, var det tilnærmet umulig å basere disse vurderingene på tidligere forskning. Det første knekkpunktet i tilfeller der grafen hadde to knekkpunkt ble i størst grad benyttet. Det var da avhengig av at grafen viste tydelig tegn til å flate ut, altså måtte grafen etter første knekkpunkt ikke være bratt. I tillegg til denne vurderingen ble det også observert på grafen at det ikke var høye absorbansverdier sammenlignet med andre grafer. Figur 14 viser eksempelvis at høyeste absorbansverdi for prøve nr. 111 – B-celler var $< 0,2$. Dette er svært lav hemolyse sammenlignet med øvrige prøver kjørt. En ser eksempelvis på figur 21 at høyeste absorbansverdi for prøve nr. 101 – A-celler og 149 – A-celler er langt høyere enn for prøve nr. 111 – B-celler. Figur 21 viser også eksempler på to knekkpunkt for hver graf, med ulik vurdering av titeringsresultatet. En ser antydning til knekkpunkt på titer 8 prøve nr. 149 – A-celler, men grafen er fremdeles bratt frem til titer 16 der den flater betydelig ut. Derfor ble denne vurdert til titer 16. Prøve nr. 101 – A-celler har et tydelig knekkpunkt på titer 8, men også antydning til knekkpunkt på titer 16. Etter knekkpunkt på titer 8 er grafen derimot betydelig mindre bratt og den starter der å flate helt ut, prøven ble vurdert til titer 8 grunnet dette. Begge prøvene ble med dette vurdert hemolytisk lavtitret, derfor er ikke forskjellen av betydning.



Figur 21: Ved å se på prøve 101 – A- celler sammenlignet med prøve 149 – A-celler, legger en merke til at begge grafene har to antydninger til knekkpunkt. Prøve nr. 101 – A-celler har tydelig knekkpunkt på titer 8 og et mindre tydelig knekkpunkt på titer 16. Prøve nr. 149 har tydelig knekkpunkt på titer 16 og et mindre tydelig knekkpunkt på titer 8.

Hadde en vurdert titer basert på absorbansverdier, eller en gitt terskelverdi verdi som 0,05, ville det vært mindre sjanse for vurderingsfeil da verdien er fastsatt. Grunnet den store interindividuelle forskjellen mellom prøvene innenfor hvert individ, lot ikke dette seg gjøre da det var så stor variasjon i absorbansverdiene. Dette skyldes at det er stor variasjon i antistoffenes titer i populasjonen. Dersom absorbansverdiene på y-aksen er svært lave sammenlignet med de fleste prøvene vil det kunne være tilfelle at den hemolytiske titeren er < 4 . Dersom det likevel er et knekkpunkt i grafen på titer ≤ 16 vil blodgiveren uansett bli vurdert som lav-titret.

Grunnet lite litteratur rundt hvilket titer som defineres som “lavt”, ble det bestemt at et titer ≤ 16 ble terskeltiteren for denne oppgaven basert på teori fra Mollison. For å forsikre seg om at titer ≤ 16 ikke induserer hemolytisk transfusjonsreaksjon hos mottaker ved transfusjon må det utføres en større studie rundt dette.

4.8 KONTROLLER

For å forbedre metoden har det blitt diskutert om det ville vært hensiktsmessig å legge til en kontroll, eventuelt flere. For å undersøke at spektrofotometeret måler nøyaktig kunne det vært nyttig med en blank-kontroll. Denne kunne da blitt brukt for å korrigere ved eventuelle feilmålinger. Blank-kontrollen ville da blitt analysert først, deretter resterende oppsett av prøver. Positiv og negativ kontroll ville vært ideelt for å kontrollere arbeidet, og dermed gjøre resultatene mer pålitelig. Slike kontroller ville vist avvik i arbeidet og eventuelle feil. I tillegg til eventuelle feil som kan oppstå med materialet som benyttes.

Det er meget viktig å ha intakte og brukbare A-celler og B-celler. Testcellene kommer fra AIT som er sertifisert for å lage CE-merkede testceller. Og i tillegg har holdbarhetsdato kan det tenkes at informasjonen og kvaliteten er til å stole på. Eventuelt kjøre en kontroll på disse når

resultater begynner å tilsa at det trengs, ved for eksempel utydelige grafer. I tillegg kunne det vært ideelt å undersøke om mengden komplementfaktorer er tilstrekkelig. Dette ved å analysere kjente prøver med ulik komplementfaktor-konsentrasjon for å undersøke om det er nødvendig med høyere konsentrasjon for å indusere hemolyse.

5. KONKLUSJON

191 blodgivere med blodtype O er titrert, både kvinner og menn for å undersøke ABO-antistoffenes hemolytiske evne. Resultatene viser at de fleste har en lav hemolyserende evne, til tross for at de er vurdert til en høy agglutinerende evne. Hvis en kun skal ta hensyn til den hemolyserende evnen til antistoffene, tyder dette på at flere blodgivere kan donere fullblod til kriseblodlageret. Det er likevel nødvendig å utføre en større studie med et større antall prøver for å konkludere presist, i tillegg til å ha flere resultater for å vurdere knekkpunkt-metoden med. Resultatet kan føre til at blodbanken får et høyere antall blodgivere som kan benyttes til fullblodtapping ved eventuelle krisesituasjoner, og i rutine når det trengs.

Med tanke på holdbarheten til prøvematerialet var resultatene fra forsøket meget tydelig. Ved lagring over lengre tid synker antistoffenes hemolyserende evne og resultatene blir dermed falsk lave. Prøvematerialet som skal benyttes til hemolytisk titrering kan lagres i opptil 7 døgn ved 4°C etter sentrifugering.

Videre ville det vært ønskelig å titrere flere blodgivere, for å undersøke om det er forskjell i resultatene basert på alder. Dette for å undersøke teorien om at hemolytisk titer synker ved alderen. I tillegg ville det vært ønskelig og analysert et større volum av blodgivere som har lav agglutinerende evne. Dette for å undersøke om blodgivere med lav agglutinerende evne i tillegg har lav hemolyserende evne. Resultatene fra dette kunne blitt benyttet i diskusjon for eller mot at blodgivere som allerede er universaldonorer kan fortsette og være dette eller må vurderes med ny metode.

6. LITTERATUR

1. Landsteiner, K. (1901). *Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes* (14 ed.). Wien: Wien klin Woch.
2. Howard, P. R. (2017). *Basic & applied concepts of blood banking and transfusion practices* (4 ed.). St. Louis: Elsevier.
3. Stevens, C. D., & Miller, L. E. (2017). *Clinical Immunology and Serology - a Laboratory Perspective* (4 ed.). Philadelphia: F.A Davids Company.
4. Solheim, B. G., Hervig, T., Flesland, Ø., & Naper, C. (2012). *Klinisk blodtransfusjon* (14 ed.). Oslo/Bergen: Rikshospitalet.
5. Heier, H. E. (2019). *Blod! Mellom magi, myter og medisin gjennom 2500 år*. Oslo: Kolofon Forlag AS.
6. Erhabor, & Adias. (2013). *Essentials of Blood Transfusion Science* (1 ed.). United Kingdom: AuthorHouse.
7. Akkök, C. A. (2017). Nye blodtypeantigener, nye systemer og ny nomenklatur. Retrieved from <https://www.bioingenioren.no/fag/fag-i-praksis/2014/nye-blodtypeantigener-nye-systemer-og-ny-nomenklatur/>
8. Sand, O., Sjaastad, Ø. V., Haug, E., & Bjålie, J. G. (2014). *Menneskekroppen - fysiologi og anatomi* (2 ed. Vol. 6). Oslo: Gyldendal Akademisk.
9. Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker* (3 ed.). Bergen: Fakkbokforlaget.
10. Thommesen, L. (2019). En kort innføring i immunologi. *Bioingeniøren*, (9).
11. Helsedirektoratet. (2017). Veilederen for transfusjonstjenesten i Norge Oslo. 7.3. Retrieved from https://www.helsedirektoratet.no/veiledere/transfusjonstjenesten-i-norge-utgave-73/Transfusjonstjenesten%20i%20Norge%20utgave%207.3%20%E2%80%93%20Veileder.pdf/_attachment/inline/6222d24e-ebdc-4588-a51f-735cc17f58c6:ddb6d627e05b9f68918723bf59407db19602a601/Transfusjonstjenesten%20i%20Norge%20utgave%207.3%20%E2%80%93%20Veileder.pdf

12. Nguyen Thi, L. H. (2009). *Identifisering av en gruppe glykosyltransferaser som mulige målgener for transkripsjonsfaktoren Pax6*. (Master). Universitetet i Tromsø, Universitetet i Tromsø.
13. Klein, H. G., & Anstee, D. J. (2014a). *Mollison's blood transfusion* (12 ed.). West Sussex, UK: John Wiley & sons.
14. Mollison, P. L. (1983). *Mollison - Blood transfusion in clinical medicine* (7 ed.).
15. Volanakis, J. E., & Frank, M. M. (1998). *The human complement system in health and disease* (1 ed.). New York: Marcel Dekker Inc.
16. Lerfald, S., & Thorstensen, R. (2016). Betydningen for komplementsystemet for aktivering av koagulasjon i en ny fullblodmodell for sepsis. 1. Retrieved from <https://forskningsprosjekter.ihelse.net/prosjekt/STR1322-16>
17. Kondos, S. C., Hatfaludi, T., Voskoboinik, I., Trapani, J. A., Law, R. H., Whisstock, J. C., & Dunstone, M. A. (2010). The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins. *Tissue Antigens*, 76(5), 341-351. doi:10.1111/j.1399-0039.2010.01566.x
18. Mollison, P. L. (1983). *Mollison - Blood transfusion in clinical medicine* (7 ed.).
19. H. Tisdall, M. L., Garland M, C. D., Szanto B, s. L. P., Hand M, s. L. A., & Bonnett C, C. J. (1946). *The effects of the transfusion of group O blood of high iso-agglutinin titer into recipients of other blood groups*. Army Whole Blood Procurement Service, New York, USA: Medical Corps, Army of the United States.
20. Kleppe, S. U. (2019). *Titring av anti-A og anti-B hos blodgivere*. Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin. Haukeland universitetssjukehus. Helse Bergen.
21. FDA. (2013). *Blood Grouping Reagent DG Gel 8 AB (x4) REF 210386 3034952, Instructions for Use*. Emeryville, Ca, USA: Novartis Vaccines and diagnostics Retrieved from <https://www.fda.gov/media/86217/download>
22. Ebert, R. V., & Emersjon Jr, C. P. (1946). *A clinical study of transfusion reactions: the hemolytic effect of group-O blood and pooled plasma containing incompatible isoagglutinins*: European Theatre of Operations, U.S Army.

23. Metgud, R., Khajuria, N., Mamta, & Ramesh, G. (2016). *Evaluation of the Secretor Status of ABO Blood Group Antigens in Saliva among Southern Rajasthan Population Using Absorption Inhibition Method* (2 ed.). JCDR: Journal of clinical and diagnostic research.
24. Sikora, J., Gregory, J., George, A., Clayton, S., Zou, B., Robinson, M., . . . Pelletier, J. P. (2018). Soluble antigens in plasma allow mismatched transfusion without hemolysis. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/trf.14510>
25. Zielinski, M. D., Jenkins, D. H., Hughes, J. D., Badjie, K. S. W., & Stubbs, J. R. (2014). Back to the future: the renaissance of whole blood transfusions for massively hemorrhaging patients. *Surgery*, 155(5), 883-886.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.surg.2014.01.017>
26. Liljebakk, S. A. (2019). Fra fullblod til komponenter - og tilbake igjen? *Bioingeniøren*. Retrieved from <https://www.bioingenioren.no/aktuelt/2019/fra-fullblod-til-komponenter---og-tilbake-igjen/>
27. Forskrift om tapping, testing, prosessering, oppbevaring, distribusjon og utlevering av humant blod og blodkomponenter og behandling av helseopplysninger i blodgiverregistre (blodforskriften), (2005).
28. Csam. (2018). CSAM ProSang. Retrieved from <https://www.csamhealth.com/solutions/lims/csam-prosang/>
29. Harris, D. C. (2007). *Quantitative Chemical Analysis* (7 ed.). New York: Freeman.
30. Saphire, D. G., Rudolph, N. S., Hackleman, S. M., & Stone, W. H. (1993). The effect of age on the level of human ABO blood group antibodies. *Aging Clinical and Experimental Research*. doi:<https://doi.org/10.1007/BF03324152>
31. Bolann, B. J. (2009). *Riktig svar på biokjemiske analyser* (1 ed.). Bergen: Fagbokforlaget.
32. Ranga Suri, N. N. R., Murty M, N., & Athithan, G. (2019). *Outlier Detection: Techniques and Application: A Data Mining Perspective* (1 ed. Vol. 155). Switzerland: Springer.
33. Husøy, A.-M. (2014). *Blodprøvetaking i praksis* (2 ed.). Oslo: Cappelen Damm.

7. DEFINISJONER/FORKLARINGER/FORKORTELSER

Agglutineringsmetode: metode som baserer seg på antistoffenes egenskap til å binde sammen erythrocytter til klumper in vitro.

Allel: ett av to eller flere alternative gener som kan være på samme sted, lokus, på et kromosom.

Antigen: forbindelser eller strukturer som er i stand til å bli gjenkjent av et antistoff (15).

Antistoffer: immunglobuliner, Ig, er store karbohydratholdige proteiner (20).

Bilirubin: gult avfallsprodukt som dannes under nedbrytningen av hemoglobin i erythrocyttene.

Epitop: antigen determinant, den delen av antigenets molekylstruktur som inneholder den antigene effekten (15).

Erythrocytter: røde blodceller.

Fagocytose: En spesiell form for endocytose, der materialet som cellen tar opp utgjøres av større partikler.

Fagocytter: Tar fatt i det som skal fagocytteres ved hjelp av ulike typer reseptorer i cellemembranen.

Fullblod: blod som inneholder alle komponentene.

Helsedirektoratet: ansvarlige fagorgan for transfusjonstjenesten i Norge og har blant annet ansvaret for å gi ut veileder for transfusjonstjenesten (10).

Hemoglobinuri: hemoglobin i urinen

Hemolytisk transfusjonsreaksjon: Hemolyse av erythrocytter in vitro hos en pasient som har fått blodtransfusjon med blod fra en annen blodgruppe enn sin egen.

Hemolyse: nedbrytning eller oppløsning av erythrocyttene.

In vitro: i kroppen

Komplementsystem: en gruppe sammenvirkende plasmaproteiner som deltar i det lokale forsvaret mot betennelse i kroppen (16).

Opsonin: en substans som binder den fagocytterende cellen til bakteriene og som dermed blir med på å øke omfang av fagocytosen (20)

Plasma: flytende delen av blodet, blodvæske med innhold av fibrinogen.

Pretransfusjonsprøve: betegnelsen på en prøve som benyttes til blodtyping og antistoffscreening, også til antistoffutredning og forlikelighetstesting (10).

SAGM: Står for Saltvann-Adenin-Glukose-Mannitol og er den løsningen som brukes for oppbevaring av erythrocyttkonsentrat.

Titer: styrken på antistoffer.

Transfusjon: blodtransfusjon, overføring av blod fra en giver til en mottaker, oftest via en blodbank (10).

Opsonin: en substans som binder den fagocytterende cellen til bakteriene og som dermed blir med på å øke omfang av fagocytosen (20).

Zetapotensialet: elektrisk ladning på overflaten av erythrocyttene.

8. VEDLEGG

8.1 VEDLEGG 1 – KOMPLETT OVERSIKT OVER SAMMENLIGNING AV
AGGLUTINERENDE GRADERING OG HEMOLYSERENDE TITRERING

8.2 VEDLEGG 2 – RÅDATA

8.2.1 VEDLEGG 2-1 – RÅDATA

8.2.2 VEDLEGG 2-2 – GRAFER A-CELLER

8.2.3 VEDLEGG 2-3 – GRAFER B-CELLER

8.2.4 VEDLEGG 2-4 – KORRIGERING AV SLENGERE

8.2.5 VEDLEGG 2-5 – GRAFER A-CELLER KORRIGERT FOR SLENGERE

8.2.6 VEDLEGG 2-6 – GRAFER B-CELLER KORRIGERT FOR SLENGERE

8.2.7 VEDLEGG 2-7 – SORTERT INFORMASJON ANGÅENDE KVINNER OG MENN
OVER OG UNDER 50 ÅR

8.2.8 VEDLEGG 2-8 – HOLDBARHETSFORSØK FOR A-CELLER

8.2.9 VEDLEGG 2-9 – HOLDBARHETSFORSØK FOR B-CELLER

8.3 VEDLEGG 3 – MIKROTITERPLATER