

ABSTRACT

- Titel:** Invloed van de intercept-pathogeeninactivatie op de concentratie aan stollingsfactoren van afereseplasma
- Auteur:** Hoekman Boukje
- Opleiding:** Medische Laboratoriumtechnologie
- Promotor:** Apr. D. Dehenau Kwaliteitsverantwoordelijke Bloedtransfusiedienst, A.Z. Sint-Jan
- Interne begeleider:** Mevrouw P. Vandewiele
- Stageplaats:** A.Z. Sint-Jan
Ruddershove 10
8000 Brugge
- Samenvatting:** Een van de grootste risico's bij bloedtransfusie is de overdracht van pathogenen. Om dit risico te minimaliseren kan een pathogeeninactivatie worden uitgevoerd met een fotoactief psoraleen waarbij mogelijks aanwezige pathogenen worden geïnactiveerd. De bloedtransfusiedienst van het AZ Sint-Jan AV wil het INTERCEPT systeem als pathogeeninactivatietechniek voor afereseplasma introduceren. Alvorens deze techniek in routine uit te voeren, dient de invloed van deze techniek op de kwaliteit van het plasma geëvalueerd te worden, met name de invloed op de inhoud aan stollingsfactoren van het plasma dat wordt behandeld. In deze studie wordt afereseplasma onderworpen aan een INTERCEPT-behandeling en stollingstesten worden uitgevoerd vóór en na de behandeling.
- Trefwoorden:** Interceptbehandeling
Plasma
MDA
Stollingsfactoren

WOORD VOORAF

Graag wil ik mijn dank betuigen aan iedereen die me geholpen heeft bij het realiseren van mijn eindwerk. Dit eindwerk betekent voor mij een afsluiting van een aangename en leerrijke studie- en stageperiode.

Allereerst bedank ik mijn promotor apr. D. Dehenau, kwaliteitsverantwoordelijke van de Bloedtransfusiedienst, die mij de kans gaf om mijn stage te volbrengen in het laboratorium van het A.Z. Sint-Jan Brugge en voor het professionele advies en begeleiding bij het maken van dit eindwerk.

Dank aan dr. klinisch bioloog A. Criel, diensthoofd hematologie en laboratoriumdirecteur en R. Ghevaert, hoofdtechnologe hematologie voor het openstellen van de dienst in functie van mijn eindwerk.

Ook oprechte dank aan medisch laboratoriumtechnoloog E. Steur voor de goede begeleiding tijdens de praktische uitvoering van dit eindwerk.

Dank aan alle medisch laboratoriumtechnologen van de dienst hematologie voor de aangename werksfeer.

Verder dank ik ook de stage – en eindwerkcoördinator Mevrouw P. Vandewiele voor haar inzet en raad gedurende mijn volledige stage.

Ook bedank ik de heer J. Deklerck, docent aan de KHBO voor het advies betreffende de statistische verwerking van de resultaten.

Een woord van dank aan alle docenten en medewerkers van de opleiding medische laboratoriumtechnologie aan de KHBO te Brugge.

Tot slot dank ik mijn ouders voor de financiële en morele steun tijdens mijn opleiding en voor alle kansen die ze me tot hiertoe gegeven hebben.

Hoekman Boukje
Juni 2008

INHOUDSOPGAVE

| | |
|--|-----------|
| INLEIDING | 1 |
| 1 TRANSFUSIE: ALGEMEEN⁽⁵⁾⁽⁶⁾ | 2 |
| 1.1 COLLECTIE, VERWERKING EN BEWARING VAN BLOED: ALGEMEEN | 2 |
| 1.1.1 Volbloed | 2 |
| 1.1.2 Aferese | 3 |
| 1.2 BELANGRIJKSTE PROBLEMEN EN BIJWERKINGEN | 3 |
| 1.2.1 Bij collectie, verwerking en bewaring | 3 |
| 1.2.2 Bij toediening | 4 |
| 1.3 DE VEILIGHEID VAN BLOED EN HET BELANG | 5 |
| 2 INTERCEPT BLOOD SYSTEM⁽⁷⁾ | 7 |
| 2.1 DOELSTELLING | 7 |
| 2.1.1 Virussen | 8 |
| 2.1.2 Bacteriën | 10 |
| 2.1.3 Parasieten | 10 |
| 2.1.4 Leukocyten | 11 |
| 2.2 PRINCIPE VAN DE WERKING | 11 |
| 3 METHYLEENBLAUWBEHANDELING | 12 |
| 3.1 DOELSTELLING | 12 |
| 3.2 METHYLEENBLAUW: ALGEMEEN PRINCIPE | 13 |
| 4 KLINISCHE TOEPASSINGEN VAN PLASMA⁽³⁾ | 14 |
| 4.1 AANGEBOREN COAGULATIE FACTORDEFICIENTIE | 14 |
| 4.1.1 Hemofilie A | 14 |
| 4.1.2 Hemofilie B | 15 |
| 4.1.3 De ziekte van von Willebrand | 15 |
| 4.2 VERWORVEN COAGULATIE FACTORDEFICIENTIE | 16 |
| 4.2.1 Vitamine k deficiëntie | 16 |
| 4.2.2 leverstoornissen | 16 |

| | | |
|-------|---|-----------|
| 4.3 | DIFFUSE INTRAVASALE COAGULATIE (DIC) | 17 |
| 4.4 | COAGULATIE DEFICIENTIE VEROORZAAKT DOOR ANTILICHAMEN | 17 |
| 5 | PLASMAKWALITEIT | 18 |
| 6 | INTERCEPTBEHANDELING⁽⁷⁾ | 19 |
| 6.1 | ALGEMEEN WERKINGSPRINCIPE | 19 |
| 6.1.1 | Stap 1: additie van amotosalen | 19 |
| 6.1.2 | Stap 2: UVA belichting | 19 |
| 6.1.3 | Stap 3: reductie van amotosalen | 20 |
| 6.2 | REAGENTIA EN TOESTELLEN | 21 |
| 6.3 | WERKWIJZE | 21 |
| 7 | MULTI-CHANNEL DISCRETE ANALYZER II (MDA) BIOMERIEUX⁽⁹⁾ | 24 |
| 7.1 | ALGEMEEN | 24 |
| 7.2 | MDA II: WERKWIJZE | 26 |
| 8 | STOLLINGSTESTEN | 29 |
| 8.1 | PRE-ANALYTISCHE FASE | 29 |
| 8.2 | BEPALING VAN PROTROMBINETIJD (PT) OP DE MDA II ⁽¹⁰⁾ | 30 |
| 8.2.1 | Doelstelling en principe | 30 |
| 8.2.2 | Reagens | 31 |
| 8.2.3 | Werkwijze | 31 |
| 8.2.4 | Referentiewaarden | 31 |
| 8.3 | BEPALING VAN GEACTIVEERDE PARTIELE TROMBOPLASTINE TIJD (APTT) OP DE MDA II ⁽¹¹⁾ | 32 |
| 8.3.1 | Doelstelling en principe | 32 |
| 8.3.2 | Reagens | 32 |
| 8.3.3 | Werkwijze | 33 |
| 8.3.4 | Referentiewaarden | 33 |
| 8.4 | BEPALING VAN FIBRINOGEEN OP DE MDA II ⁽¹²⁾ | 33 |

| | | |
|--------|---|-----------|
| 8.4.1 | Doelstelling en principe | 33 |
| 8.4.2 | Reagens | 34 |
| 8.4.3 | Werkwijze | 34 |
| 8.4.4 | Referentiewaarden | 34 |
| 8.5 | BEPALING VAN ANTITROMBINE (AT) OP DE MDA II ⁽¹³⁾ | 35 |
| 8.5.1 | Doelstelling en principe | 35 |
| 8.5.2 | Reagens | 35 |
| 8.5.3 | Werkwijze | 36 |
| 8.5.4 | Referentiewaarden | 36 |
| 8.6 | BEPALING VAN FACTOR VIII OP DE MDA II ⁽¹⁴⁾ | 36 |
| 8.6.1 | Doelstelling en principe | 36 |
| 8.6.2 | Reagens | 37 |
| 8.6.3 | Werkwijze | 37 |
| 8.6.4 | Referentiewaarden | 38 |
| 8.7 | BEPALING VAN PROTEINE C OP DE MDA II ⁽¹⁵⁾ | 38 |
| 8.7.1 | Doelstelling en principe | 38 |
| 8.7.2 | Reagens | 38 |
| 8.7.3 | Werkwijze | 39 |
| 8.7.4 | Referentiewaarden | 39 |
| 8.8 | BEPALING VAN TOTAAL PROTEINE S IN PLASMA ⁽¹⁶⁾ | 39 |
| 8.8.1 | Doelstelling en principe | 39 |
| 8.8.2 | Reagens | 40 |
| 8.8.3 | Werkwijze | 40 |
| 8.8.4 | Referentiewaarden | 40 |
| 9 | INVLOED VAN DE INTERCEPT-BEHANDELING OP HET PLASMAVOLUME | 42 |
| 9.1 | WERKWIJZE | 42 |
| 9.2 | INTERPRETATIE | 42 |
| 10 | VERWERKING VAN DE STOLLINGSTESTEN | 43 |
| 10.1 | PT | 43 |
| 10.1.1 | Interpretatie | 43 |

| | | |
|--------|--------------------------|-----------|
| 10.2 | APTT | 44 |
| 10.2.1 | Interpretatie | 44 |
| 10.3 | FIBRINOGEEN | 44 |
| 10.3.1 | Interpretatie | 45 |
| 10.4 | FVIII | 45 |
| 10.4.1 | Interpretatie | 45 |
| 10.5 | AT | 45 |
| 10.5.1 | Interpretatie | 46 |
| 10.6 | PC | 46 |
| 10.6.1 | interpretatie | 46 |
| 10.7 | PS | 47 |
| 10.7.1 | interpretatie | 47 |
| 11 | PRAKTISCHE PUNTEN | 47 |
| 12 | ALGEMEEN BESLUIT | 50 |
| | LIJST FIGUREN | 51 |
| | LIJST TABELLEN | 51 |
| | LITERATUURLIJST | 52 |
| | BIJLAGEN | 1 |

INLEIDING

Het A.Z. Sint-Jan AV beschikt over een eigen bloedinstelling die instaat voor de collectie, bewerking, testen, bewaren en distribueren van bloedcomponenten. Dit houdt o.a. in dat plasma wordt gecollecteerd bij vrijwillige donoren. Tot nog toe worden alle gecollecteerde plasmaeenheden geleverd aan de Centrale Afdeling voor Fraktionering van het Rode Kruis, dat deze eenheden verder verwerkt tot stabiele bloedcomponenten (bv stabiele oplossing plasmaproteïne). De bloedtransfusiedienst wil in de toekomst echter ook plasma kunnen afleveren aan de ziekenhuisbloedbank van het AZ Sint-Jan AV, maar wil daartoe eerst het INTERCEPT systeem als pathogeeninactivatietechniek voor plasma implementeren.

Deze inactivatietechniek zorgt voor een inactivatie van een breed spectrum aan bacteriën, virussen, schimmels en witte bloedcellen die mogelijks aanwezig kunnen zijn in de plasmaeenheid.

Alvorens deze techniek in routine gebruikt kan worden, dient deze eerst gevalideerd te worden. Een onderdeel van deze validatie houdt een evaluatie in van de invloed van de inactivatietechniek op de kwaliteit van het behandelde plasma, meer bepaald op de inhoud aan stollingsfactoren.

In de studie worden interceptbehandelingen uitgevoerd op verschillende plasmaeenheden, gecollecteerd d.m.v. een aferesetechniek bij willekeurig gekozen donoren.

Stollingstesten worden uitgevoerd vóór en na de behandeling. Deze testen zijn de protrombinetijd (PT), geactiveerde partiële tromboplastine tijd (APTT), fibrinogeen, factor VIII bepaling, antitrombine (AT), proteïne C (PC) en proteïne S (PS) bepalingen. Deze bepalingen gebeuren op de Multi-Channel Discrete Analyser (MDA) van Biomérieux.

De test op Factor VIII wordt gekozen omdat dit een wettelijk criterium is. Het behandelde plasma dient een stollingsactiviteit Factor VIII te hebben die minimaal 50% van de oorspronkelijke stollingsactiviteit bedraagt⁽¹⁾. De overige stollingstesten worden toegevoegd omdat zo een algemeen beeld van de kwaliteit van het plasma wordt bekomen.

In het theoretisch deel wordt het INTERCEPT systeem besproken alsook de klinische toepassingen van plasma, de beschrijving van het MDA-toestel en de reagentia. In het experimenteel deel worden de bekomen resultaten voor en na de interceptbehandeling besproken.

Tenslotte wordt een besluit gevormd.

THEORETISCH GEDEELTE

1 **TRANSFUSIE: ALGEMEEN⁽⁵⁾⁽⁶⁾**

1.1 COLLECTIE, VERWERKING EN BEWARING VAN BLOED: ALGEMEEN

1.1.1 **Volbloed**

De eerste handeling bij het collecteren van volbloed is een ontsmetting van de huid om het belangrijkste deel van de huidflora te verwijderen. Na ontsmetting van de huid kan de donor aangeprikt worden en worden onmiddellijk de nodige staalnametubes afgenomen om de wettelijk verplichte laboratoriumtesten op uit te voeren. Dit heeft het voordeel dat mogelijk nog aanwezige huidflora niet in de collectie terechtkomt, maar in de staalnametubes, wat de microbiële veiligheid van de bloedcomponenten verhoogd. De wettelijk verplichte laboratoriumtesten die worden uitgevoerd zijn onderzoeken naar

- Hepatitis C virus (HCV): anti-HCV en nucleïnezuurtesten - HCV (NAT-HCV)
- Hepatitis B virus (HBV): HBsurface antigen en anti-HBcore (enkel bij eerste donatie)
- Humaan immunodeficiëntie virus (HIV): anti-HIV1 en anti-HIV2 en NAT-HIV
- Syfilis: flocculatie-test

Na de afname van de bloedstalen wordt gestart met de collectie van volbloed. Na collectie wordt de bloedgift verder verwerkt (door centrifugatie) tot plasma, gedeleukocyteerd erythrocytenconcentraat (EC) en een buffy-coat. De buffy-coat van de donatie wordt nadien gepoold met andere buffy-coats uit verschillende donaties van gelijke bloedgroep. Het plasma wordt ingevroren en het EC wordt in quarantaine bewaard bij 4°C. Een gedeleukocyteerd EC van goede kwaliteit moet minstens 40 gram hemoglobine bevatten en mag maximum 1×10^6 witte bloedcellen (WBC) bevatten.

Pas nadat de resultaten van de wettelijk verplichte laboratoriumtesten gekend zijn, kunnen de bloedcomponenten worden vrijgegeven.

Rode bloedcellen kunnen maximaal gedurende 42 dagen in koelkasten tussen 2 en 6 °C bewaard worden. Plasma wordt ingevroren bij een temperatuur van -40 °C en blijft langer dan een jaar bruikbaar. Bloedplaatjes zijn slechts 5 dagen houdbaar en worden bewaard op 22°C.

1.1.2 **Aferese**

Bloedcomponenten kunnen tevens gecollecteerd worden door middel van een aferesetechniek. Het voordeel van deze techniek is dat men heel specifiek bepaalde bloedcomponenten kan gaan collecteren. Het is mogelijk om enkel rode bloedcellen of enkel bloedplaatjes of enkel plasma of een combinatie van beide te collecteren. Hierbij wordt de donor gekoppeld aan een aferesetoestel waarbij het gecollecteerde bloed onmiddellijk naar de centrifuge van het toestel wordt geleid waar het wordt gescheiden in rode bloedcellen (RBC), plaatjes en plasma. Wanneer men enkel plaatjes collecteert, dan zullen de RBC terug naar de donor worden geleid.

Het plasma wordt gedeeltelijk terug gegeven en gedeeltelijk gebruikt om de trombocyten in op te slaan samen met een bewaarvloeistof. De trombocyten worden bewaard op een schudtoestel bij 22°C gedurende maximum 5 dagen.

1.2 BELANGRIJKSTE PROBLEMEN EN BIJWERKINGEN

1.2.1 **Bij collectie, verwerking en bewaring**

De meest voorkomende bijwerkingen bij donoren tijdens of na collectie zijn syncopes, gevolgd door perforatie van de vene. Bij collectie van bloedcomponenten via aferesetechniek wordt altijd een vervangvloeistof (fysiologische oplossing met een lage hoeveelheid ACD-A) mee teruggegeven aan de donor. De beperkte hoeveelheid ACD-A zorgt echter voor een reductie van de hoeveelheid intracellulair calcium bij de donor wat aanleiding kan geven tot tetanieverschijnselen. Dit komt vooral voor bij lang durende procedures waarbij grote hoeveelheden volbloed worden bewerkt zoals bij

stamcelafname. Gezien de geringe hoeveelheid bewerkt volbloed bij een plaatjescollectie, treedt dit verschijnsel slechts gering op. De lichte tetanierschijnselen worden teniet gedaan door de donor tijdens de collectie oraal calcium toe te dienen. De belangrijkste ongewenste voorvallen bij collectie en verwerking zijn bacteriële contaminatie en administratieve fouten. De bacteriële contaminatie treedt voornamelijk op bij bloedplaatjesconcentraten omdat deze bewaard worden op kamertemperatuur. Er worden dan ook steriliteitcontroles uitgevoerd op de plaatjesconcentraten. Het nadeel hierbij is echter dat het resultaat pas na 7 dagen gekend is en dat het bloedplaatjesconcentraat dus meestal al is toegediend. Het toepassen van pathogeeninactivatie zal hierbij dus een grote invloed hebben op het terugdringen van bacteriële contaminatie van de bloedplaatjesconcentraten.

Negatieve invloeden op de bewaring van andere bloedcomponenten komen voor wanneer de toestellen waarin de componenten bewaard worden niet optimaal werken. Dit kan door onder andere een te lage of te hoge bewaartemperatuur. Alle bewaartestellen zijn echter aangesloten op een temperatuurbevakingsysteem om correcte bewaring te garanderen.

1.2.2 **Bij toediening**

De belangrijkste ongewenste voorvallen bij de uitgifte van bloedcomponenten in de ziekenhuisbloedbank en bij de toediening ervan, zijn incorrecte bloedcomponententransfusies (IBCT). De grootste oorzaak hiervan zijn administratieve fouten gemaakt zowel bij aanvraag als bij de uitgifte van de bloedcomponenten. Het afnemen van een bloedstaal voor kruisproefbepaling bij een verkeerde patiënt, het foutief invullen van een aanvraagformulier, het omwisselen van bloedcomponenten voor 2 patiënten op dezelfde verpleegeenheid zijn de belangrijkste fouten, die gelukkig niet altijd aanleiding geven tot een IBCT (de fout wordt dikwijls vastgesteld vóór toediening) of tot nadelige gevolgen voor de patiënt.

Ook een gebrek aan hygiëne kan grote gevolgen hebben bij de toediening van bloedcomponenten. In het ziekenhuis zijn daarom procedures opgesteld door het transfusiecomité voor een gestandaardiseerde toediening van bloedcomponenten.

Het ontstaan van bijwerkingen na transfusie wordt meestal veroorzaakt door de aanwezigheid van donorantilichamen of door de aanwezigheid van residuele witte bloedcellen (WBC) (zeldzaam aangezien alle bloedcomponenten gedeleukocyteerd zijn). De meest voorkomende transfusiereacties zijn niet-hemolytische transfusiereacties en allergische reacties. Zeldzaam zijn Transfusion Related Acute Lunginjury (TRALI), niet-immunologische hemolyse, post-transfusionele purpura, sepsis, immunologische hemolyse door allogene antistoffen,...

1.3 DE VEILIGHEID VAN BLOED EN HET BELANG

Verbeterde donorselectieprocedures en screenen van donorbloedproducten op pathogene verwekkers dragen bij tot een verhoogde veiligheid van de bloedproducten.

Wegens deze reden kunnen bloeddonoren uitgesloten worden om de veiligheid van het bloed te kunnen garanderen. Donoren die in aanmerking komen om geweigerd te worden zijn:

- personen die in een gebied geweest zijn dat een risico vormt voor malaria
- mensen met tatoeages of piercings
- personen met wisselende seksuele partners, zowel heteroseksueel als homoseksueel
- donors die tussen 1980 en 1996 in totaal zes maanden of langer in het Verenigd Koninkrijk zijn geweest, met een menselijk groeihormoon zijn behandeld of een hersenvliestransplantatie hebben ondergaan, mogen niet langer meer doneren met name in verband met de ziekte van Creutzfeldt Jakob (CJD).

Het actief onderzoek naar pathogeeninactivatie speelt ook een grote rol bij de veiligheid.

Er bestaan verscheidene manieren om de virale en bacteriële inactivatie van bloedcomponenten te bewerkstelligen. De nieuwe generatie van inactivatiemethoden onderscheidt zich van de vorige methoden door hun verschillende 'targetsites'. De vroegere methoden richtten zich op de enveloppe van het virus terwijl de nieuwe methoden zich richten op de virale en bacteriële nucleïne zuren om zo de virale of bacteriële proliferatie te inhiberen.

De nieuwe pathogeeninactivatietechnieken verhogen de veiligheid van bloedcomponenten aanzienlijk door:

- de impact van een vals negatief screeningresultaat voor HIV, HCV en/of HBC te minimaliseren, omdat het virus onschadelijk wordt gemaakt;
- een inactivatie van residuele WBC;
- een inactivatie van mogelijks aanwezige microbiële contaminanten;
- een inactivatie van snel opkomende virussen waarvoor geen screeningtesten bestaan (bv: griep,...).

Een (zeer beperkt) nadeel van deze technieken is dat ze een bijkomende bewerkingstap inhouden. Voor bloedplaatjesconcentraten houdt deze bewerkingstap een verlies in van minder dan 10% aan bloedplaatjes. Dit verlies moet gecompenseerd worden door een extra eenheid bloedplaatjes te collecteren bij de donor.

Alle technieken die momenteel op de markt beschikbaar zijn, kunnen enkel toegepast worden op bloedplaatjesconcentraten en/of plasma. Zowel GAMBRO als CERUS werken momenteel aan een inactivatietechniek voor erythrocytenconcentraten. Er wordt verwacht dat deze tegen 2010 beschikbaar zullen zijn.

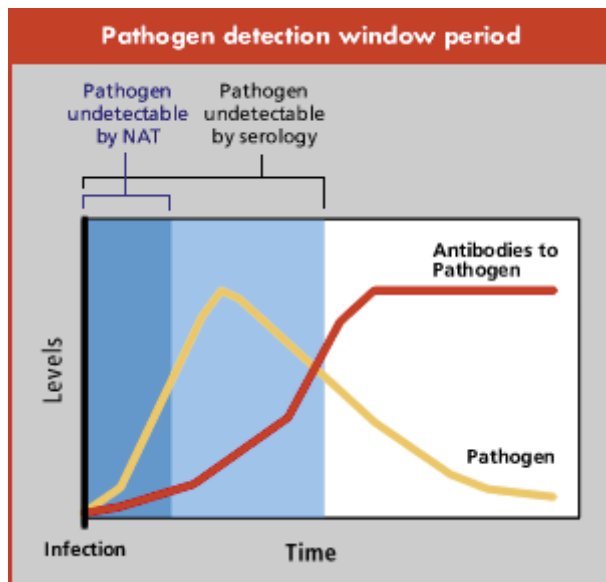
2 INTERCEPT BLOOD SYSTEM⁽⁷⁾

2.1 DOELSTELLING

Het INTERCEPT blood system bestaat uit een belichtingstoestel en een verwerkingsset met een foto-actief psoraleen, dat gebruikt wordt voor de behandeling van bloedcomponenten verkregen door centrifugatie van volbloed of d.m.v. aferesetechniek. Het systeem wordt gebruikt om een breed spectrum van virussen, bacteriën en parasieten te inactiveren evenals donorleukocyten in de bloedplaatjesconcentraten en plasma. Dit proces is bedoeld om het risico van transfusiegeassocieerde transmissie van virussen, bacteriën en parasieten te verminderen alsook het risico op de ongunstige gevolgen van residuele donorleukocyten in het bloedcomponent. Dankzij het INTERCEPT-systeem worden een aantal problemen geëlimineerd:

- bacteriële contaminatie: bacteriële contaminatie is de meest frequente transfusietransmissie infectie. De bacteriën zijn een specifiek probleem in plaatjesconcentraten wegens hun opslag bij kamertemperatuur, die de snelle bacteriële groei kan bevorderen;
- nog niet geïdentificeerde pathogenen: er bestaat een risico dat de huidige veiligheidsmaatregelen bepaalde pathogenen niet kunnen elimineren. Zelfs als nieuwe testen worden toegevoegd om de transfusie te beschermen, blijven de extra microbiële bedreigingen erkend te worden;
- de routineopsporingstesten omvatten een beperkt aantal agenten. Hoewel meerdere ziekteverwekkers in bloed kunnen aanwezig zijn, worden slechts enkelen vereist om na inzameling te worden onderzocht;

- de vensterperiode: gedefinieerd als tijd tussen de infectie en detectie van antistoffen of het antigen. Deze periode wordt geëlimineerd dankzij het INTERCEPT-systeem. In figuur 1 wordt de vensterperiode geïllustreerd;



Figuur 1: vensterperiode

- donorleukocyten kunnen potentiële dragers zijn van latente virussen zoals CytoMegalovirus (CMV) en Humaan immunodeficiëntievirus (HIV). Producten van witte bloedcellen met name cytokinen die transfusiële reacties kunnen veroorzaken door de donor T-cellen.

2.1.1 Virussen

De inactivatie van de virussen door het INTERCEPT-systeem worden weergegeven in tabel 1. De reductie is uitgedrukt in \log_{10} wat wil zeggen dat $1\log_{10}$ een reductie geeft van factor 10. Om een effectieve processtap te krijgen moet de reductie minstens $4\log_{10}$ zijn voor niet-lipidenmembraan virussen⁽⁷⁾.

Tabel 1: reductie bij geteste virussen

| Getest virus | Omvang van inactivatie (log₁₀reductie) |
|---|--|
| Lipidenmembraan virus- sen | |
| HIV-1 (cel geassocieerd) | >6,7 |
| HIV-1 (cel vrij) | >6,8 |
| HBV (strain MS-2) | >4,5 |
| HCV (strain Hutchison) | >4,5 |
| Human T-cell Lymphotropic Virus (HTLV-I) | ≥4,5 |
| West Nile Virus (WNV) | ≥6,8 |
| SARS-CoV (human Corona virus) | ≥5,5 |
| Bovine Viral Diarrhea virus, model virus for human HCV (BVDV) | ≥6,0 |
| Duck Hepatitis B Virus (DHBV), model virus voor menselijk HCV | 4,4-4,5 |
| Human T-cell Lymphotropic Virus (HTLV-II) | >5,7 |
| Niet-lipidenmembraan vi- russen | |
| Bleutonque Virus (BTV) | 5,1 |
| Human Adenovirus-5 | ≥6,9 |
| Parvo (Parvovirus B19) | 1,8 |

2.1.2 Bacteriën

De inactivatie van de verschillende bacteriën wordt weergegeven in tabel 2.

Tabel 2: reductie bij geteste bacteriën

| Geteste bacterie | Omvang van inactivatie (log₁₀reductie) |
|-------------------------------|--|
| Gramnegatieve bacterie | |
| Klebsiella pneumoniae | ≥7,4 |
| Yersinia enterocolitica | >7,3 |
| Grampositieve bacterie | |
| Staphylococcus epidermidis | >7,3 |
| Spirochetes | |
| Treponema pallidum | >5,9 |
| Borrelia burgdorferi | >10,6 |

2.1.3 Parasieten

De inactivatie van de verschillende parasieten wordt weergegeven in tabel 3.

Tabel 3: reductie bij geteste parasieten

| Geteste parasiet | Omvang van inactivatie (log₁₀reductie) |
|-------------------------|--|
| Plasmodium falciparum | ≥6,9 |
| Trypanosoma cruzi | >5,0 |
| Babesia microti | >5,3 |

2.1.4 **Leukocyten**

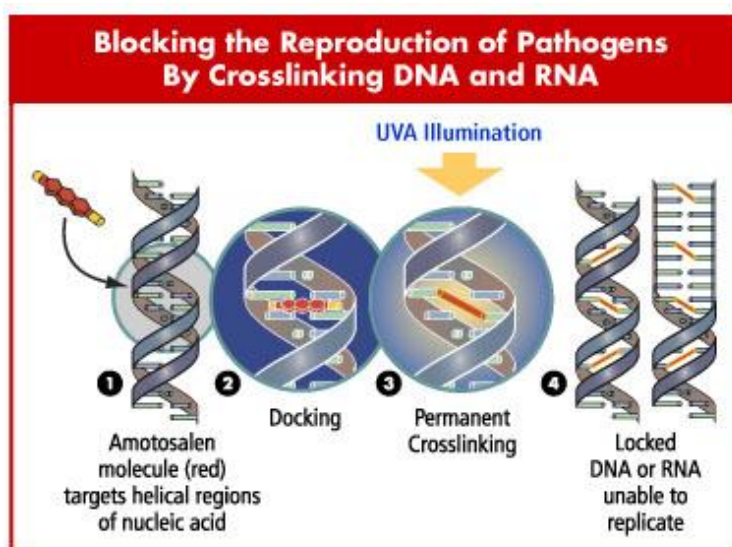
Omdat het plasma dat met INTERCEPT wordt behandeld bevroren is onder voorwaarden die het behoud van intacte cellen niet bevorderen, zijn leukocyten van beduidend minder belang in bevroren plasma dan in andere bloedcomponenten.

2.2 PRINCIPE VAN DE WERKING

Het principe is gebaseerd op de unieke eigenschappen van een speciaal ontwikkelde molecule: amotosalen HCl. Amotosalen is een synthetisch psoralen (versterkt UltraViolet (UV) A licht) met een 3-ring die in de spiraalvormige gebieden van desoxyribonucleïne zuur (DNA) en ribonucleïne zuur (RNA) wordt ingelast waardoor de replicatie van DNA en RNA irreversibel geblokkeerd wordt. De interactie van amotosalen met DNA en RNA is zeer specifiek.

Eenmaal binnen in een ziekteverwekker, zet het amotosalen zich tussen de pyrimidinebasen in de nucleïnezuren.

Door verlichting met Ultraviolet A licht bij 320-400nm, vormt het amotosalen covalente bindingen met de pyrimidinebasen in nucleïnezuren. Hierdoor kan het DNA en RNA zich niet meer vermenigvuldigen. De reactie vereist UVA en zal in afwezigheid van dit licht niet verdergaan. In figuur 2 wordt dit principe weer gegeven.



Figuur 2: crosslinking van DNA en RNA door amotosalen.

Het brede inactivatiespectrum van amotosalen heeft geen significante specificiteit van nucleïnezuuropeenvolging en is niet selectief. De trombocyten en de stollingsfactoren in het plasma zelf worden niet geïnactiveerd door het crosslinking proces omdat zij geen nucleïnezuren bevatten.

3 METHYLEENBLAUWBEHANDELING

3.1 DOELSTELLING

In 2005 werd door de bloedtransfusiedienst ook de geschiktheid van het methyleenblauw (MB) virusinactivatiemethode voor plasma onderzocht. Wegens een beperkt toepassingsgebied (enkel plasma), een beperkt inactivatiespectrum (hoofdzakelijk virussen met een lipidenmembraan) en een aanzienlijk hoger verlies aan stollingsfactoren in het plasma na behandeling (zeker t.o.v. INTERCEPTplasma) werd geopteerd om deze techniek niet te implementeren.

In tabel 4 wordt een overzicht gegeven van de virussen met een lipidenmembraan die geëlimineerd worden door MB en ter vergelijking (tabel 5) de virussen zonder lipidenmembraan⁽²⁾.

Tabel 4: lipidenmembraan virus

| Virus | Log₁₀ reductie factor |
|------------------------|---|
| HIV | >5,5 |
| Bovine virale diarrree | >6,2 |
| Eend HBV | 3,9 |
| Influenza | 5,1 |
| Pseudo rabies | 5,4 |
| Herpes simplex | >6,5 |
| Vesicular stomatitis | >4,9 |
| West Nile virus | >6,5 |

Tabel 5: niet-lipidenmembraan virus

| Virus | Log₁₀ reductie factor |
|-----------------------|---|
| HAV | 0,0 |
| Encephalomyocarditis | 0,0 |
| Porcine parvovirus | 0,0 |
| Polio | 0,0 |
| SV40 | 4,3 |
| Adenovirus | 4,0 |
| Humaan parvovirus B19 | ≥4,0 |
| Calicivirus (HEV) | >3,9 |

3.2 METHYLEENBLAUW: ALGEMEEN PRINCIPE

Het werkingsmechanisme van MB is op het zelfde principe gebaseerd als het INTERCEPT-systeem. Er wordt MB toegevoegd aan het plasma dat vervolgens belicht wordt met zichtbaar licht (590nm, 180J/cm²). Het effect van de virusinactivatiemethode is afhankelijk van de concentratie aan MB in het plasma en de belichtingstijd. Bij de fotodynamische behandeling met MB wordt het zodanig gebruikt dat een 1μM concentratie wordt bereikt in de plasma-eenheid. Na behandeling wordt het residuele MB weg gefilterd zodat een finale concentratie van 0,1-0,3μM wordt bereikt. MB kent een halfwaardetijd van circa 60 minuten en wordt hoofdzakelijk verwijderd via de urinaire route.

Bloed wordt afgenomen en gecentrifugeerd waardoor plasma en erythrocyten gescheiden worden. De plasmazak wordt via een steriele connectie aan een theraflexset gelast. Vervolgens wordt de plasmazak opgehangen waardoor het plasma door de leukocytenfilter en vervolgens over de MB-pil tot in de belichtingszak loopt. Zo wordt de MB-pil opgelost in het plasma. De belichtingszakken worden op een toestel gelegd en dubbelzijdig belicht met

zichtbaar licht tot $180\text{J}/\text{cm}^2$ gedurende ongeveer 20 minuten. Na de belichting wordt de plasmazak opgehangen waardoor het MB-plasma door de MB-filter loopt. Hierdoor wordt het residueel MB verwijderd. Het finaal product is virusgeïnactiveerd en MB-arm.

Er wordt enkel plasma afkomstig van mannelijke, niet getransfuseerde donoren gebruikt omdat dit rijker is aan factor VIII en omdat de kans op TRALI bij de patiënt wordt geminimaliseerd. TRALI is een syndroom dat zich meestal binnen de 6 uur na transfusie voordoet en dat waarschijnlijk wordt veroorzaakt door specifieke HLA- of HPA-antilichamen van de donor. Deze antilichamen komen veel vaker voor bij vrouwelijke donoren die één of meerdere zwangerschappen hebben doorgemaakt en bij getransfuseerde donoren. Deze antilichamen kunnen bij de patiënt aanleiding geven tot leukocytenactivatie met cytokineproductie, endotheelbeschadiging en pulmonair oedeem als gevolg.

4 **KLINISCHE TOEPASSINGEN VAN PLASMA**⁽³⁾

Hieronder volgt een korte algemene bespreking over de aangeboren en verworven stollingsdeficiënties. Het is niet de bedoeling deze in detail te bespreken.

4.1 AANGEBOREN COAGULATIE FACTORDEFICIENTIE

4.1.1 **Hemofilie A**

Hemofilie A of factor VIII deficiëntie is de meest voorkomende recessieve erfelijke aandoening bij factordeficiënties. De erfelijke informatie van factor VIII bevindt zich op het X chromosoom. Er ontstaat een afwezigheid of een verlaagd niveau aan factor VIII in plasma.

Karakteristieke symptomen zijn:

- ogenschijnlijk spontane bloedingen bij een minimaal trauma
- haemarthros (bloeding in het gewricht)
- spierbloedingen

- hematurie en neus – en mondslijmvliesbloedingen

In de laboratoriumonderzoeken wordt o.a. een verlengde geactiveerde partiële tromboplastine tijd (APTT) en een lage FVIII concentratie aangetroffen.

4.1.2 **Hemofilie B**

Hemofilie B of factor IX deficiëntie is een recessieve erfelijke aandoening waarbij de erfelijke informatie voor FIX zich op het X chromosoom bevindt. De klinische gevolgen zijn dezelfde als bij hemofilie A. In het laboratoriumonderzoek wordt o.a. een verlengde APTT en een lage FIX concentratie aangetroffen.

4.1.3 **De ziekte van von Willebrand**

De ziekte van von Willebrand is een autosomale dominante overervingziekte waarbij er ofwel een gereduceerd niveau van von Willebrandfactor (vWF) ofwel een abnormale functie van vWF is, veroorzaakt door een puntmutatie of een grote deletie in het gen.

De 2 functies van vWF zijn het dragen van FVIII en helpen het bij de aggregatie van trombocyten. Om deze functies te kunnen vervullen moet vWF in een voldoende hoeveelheid aanwezig zijn en een normale structuur hebben om zich te kunnen binden aan FVIII, de endotheelcellen en de trombocyten. De ziekte komt klinisch tot uiting in abnormale bloedingen, gewoonlijk van de huid en de slijmvliezen.

Er bestaan 3 verschillende types in de ziekte van von Willebrand.

- type 1 (kwantitatieve afwijking): een te lage hoeveelheid van vWF in het bloed
- type 2 (kwalitatieve afwijking): abnormale structuur van vWF
- type 3: geen vWF in het bloed

De testen in het laboratorium onderzoeken de hoeveelheid en de functies van vWF. Bij de ziekte zijn de concentraties vWF en FVIII verlaagd.

4.2 VERWORVEN COAGULATIE FACTORDEFICIENTIE

4.2.1 **Vitamine k deficiëntie**

Het lichaam heeft de beschikking over twee typen vitamine K: vitamine K1 (aanwezig in planten en groenten, dus via het voedsel beschikbaar) en vitamine K2 (geproduceerd door in de darm aanwezige bacteriën, zoals *E. coli*). Deficiëntie van vitamine K wordt veroorzaakt door te weinig inname via de voeding, malabsorptie of inhibitoren van vitamine K. Vitamine K is nodig voor de vorming van belangrijke stollingsfactoren o.a. protrombine, proteïne C, FV, FVII, FIX en FX. Deze stollingsfactoren hebben voor hun werking nood aan een gamma-carboxyglutaminezuurdomein wat nodig is om de factor via Ca^{2+} bruggen te binden aan fosfolipiden. Vitamine K is noodzakelijk voor het carboxyleren van glutaminezuurresten tot een gamma-carboxyglutaminezuurdomein. In de laboratoriumonderzoeken wordt o.a. een verlengde APTT en protrombinetijd (PT) geconstateerd.

4.2.2 **leverstoornissen**

Galobstructies resulteren in een malabsorptie van vitamine K en hierdoor ontstaat er een verminderde synthese van de factoren II, VII, IX en X bij levercellen.

Bij een ernstige hepatocellulaire aandoening en factordeficiëntie, komen verlaagde concentraties van factor V en fibrinogeen voor, gepaard met verhoogde concentraties van plasminogeenactivator. Bij veel patiënten vindt een abnormale fibrinolyse plaats.

Verminderde trombopoiëtineproductie van de lever draagt bij tot trombocytopenia.

Een miltvergroting geassocieerd met portale hypertensie resulteert in trombocytopenia.

4.3 DIFFUSE INTRAVASALE COAGULATIE (DIC)

DIC is een verworven aandoening waarbij er een chaotische activatie van coagulatie en fibrinerijke trombi intravasculair wijdverspreid voorkomen. Hierbij ontstaat orgaandysfunctie, purpura fulminans en bloedingen en trombose die tegelijkertijd kunnen plaats vinden. Bij DIC wordt trombine gevormd wat trombocyten en fibrinevorming activeert in de microvasculatuur. Hierdoor ontstaat er consumptie van trombocyten en coagulatiefactoren. Er vindt inhibitie van fibrinolyse, excessieve activatie van coagulatie en neerwaartse regulatie van fysiologische anticoagulatia plaats. Oorzaken van DIC kunnen zijn: infecties, maligniteit, obstructies, overgevoelige reacties, weefselschade, vasculaire abnormaliteiten en diversen.

In het laboratoriumonderzoek wordt o.a. een verlengde PT, APTT, verhoogde D-dimeren, fragmentocytose en trombocytopenie gedetecteerd.

4.4 COAGULATIE DEFICIENTIE VEROORZAAKT DOOR ANTILICHAMEN

De antilichamen kunnen ontstaan door een auto-immuunziekte of na het toedienen van factorconcentraten. De antilichamen kunnen ook transiënt in matig tot hoge titers voorkomen bij (virale) infecties. De antigene doelen zijn de proteïnen die binden aan fosfolipiden, protrombine, proteïne S en C.

Een frequent voorkomend antilichaam is het lupus anticoagulans. In het laboratoriumonderzoek wordt er o.a. een verlengde PT en APTT gevonden doordat de fibrinevorming vertraagd wordt.

De behandeling bestaat gebruikelijk uit immunosuppressie en toediening van stollingsfactoren.

5 PLASMAKWALITEIT

Alle pathogeenreductietechnieken die tot op heden gebruikt of onderzocht worden, hebben een invloed op de kwaliteit (hoofdzakelijk stollingsactiviteit) van het behandelde plasma (namelijk de plasma-eiwitten).

Er werden voldoende studies⁽²⁾ uitgevoerd waarin er werd gepeild naar de invloed van de MB-behandeling op de plasmakwaliteit:

- de meest gevoelige plasma-eiwitten zijn fibrinogeen, factor V, VIII en XI wat resulteert in een verlaagde concentratie;
- factor VII, vWF:antigen, anti-trombine en plasminogeen zijn nauwelijks gevoelig aan de methode;
- factor VIII en fibrinogeen worden het sterkst beïnvloed met een reductie van 20-35%. De MB-behandeling beïnvloedt de biologische activiteit van fibrinogeen en dit werd afgeleid uit het feit dat het gehalte aan fibrinogeen, niet verandert, maar dat een sterke daling wordt gemeten met de Clauss methode;
- een verandering in het niveau aan stollingsfactoren wordt geassocieerd met een verlengde PT en APTT;
- stollingsinhibitoren worden niet beïnvloed door de behandeling met MB.

Studies waarin de invloed van het INTERCEPT-systeem werd gepeild werden op⁽⁴⁾:

- het behoud van FV, FVII, FVIII, FX, of von Willebrand factor:ristocetin cofactor in PCT-FFP was gelijkwaardig aan of hoger dan methode met MB;
- niveaus van factor (F)II, FXII, FXIII, von Willebrand antigeen, D-Dimeer, en proteïne C was gelijkwaardig tussen de interceptmethode en de MB-methode;
- kortere gemiddelde prothrombin tijd, geactiveerde gedeeltelijke thromboplastin tijd en hogere gemiddelde niveaus van fibrinogeen, FXI, en proteïne S bij de interceptmethode i.v.m. de MB-methode;

- de algemene niveaus van de coagulatiefactor en de stabiliteit van de interceptmethode werden beter bewaard dan bij de MB-methode.

6 INTERCEPTBEHANDELING⁽⁷⁾

6.1 ALGEMEEN WERKINGSPRINCIPE

6.1.1 **Stap 1: additie van amotosalen**

De chemische naam van amotosalen is 3-[(2aminoethoxy)methyl]-2,5,9-trimethyl-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one waterstofchloride. De container met plasma wordt met een lastoestel op aseptische wijze gekoppeld aan de INTERCEPT-verwerkingsset, meer specifiek aan de lichtdichte container die de amosotalenoplossing bevat. Bij het overhevelen van het plasma naar de verwerkingsset stroomt het plasma via de amotosalencontainer naar de belichtingscontainer. Op deze manier wordt een homogene menging bekomen van het plasma met de amotosalenoplossing.

6.1.2 **Stap 2: UVA belichting**

De container met amotosalen en plasma wordt opgenomen in de illuminator, die de eenheid ongeveer 6 tot 9 minuten aan UVA licht blootstelt. De verlichtingsstap activeert het amotosalen dat een crosslink aangaat met de nucleïnezuren van de aanwezige ziekteverwekkers waardoor hun replicatie verhinderd wordt.

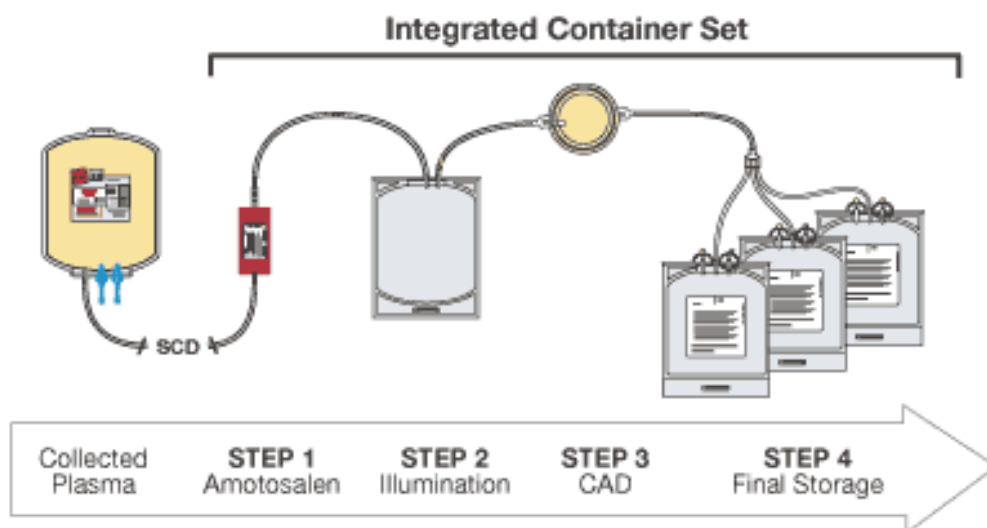
Plasma wordt nu belicht met UVA licht. De illuminator kan 1 of 2 eenheden tegelijk belichten.

De containers worden tijdens de belichting geschud zodat een goede en uniforme belichting wordt bekomen. Een inactivatie is pas effectief wanneer een minimale lichtdosis wordt afgegeven van 3J/cm².

Een LCDscherf en makkelijk te gebruiken software zorgen voor feedback bij elke stap van het belichtingsproces en een streepjescodescanner vergemakkelijkt het invoeren van de gegevens.

6.1.3 Stap 3: reductie van amotosalen

Wanneer de belichting volledig is, wordt het behandelde plasma gefiltreerd door het Compound Adsorption Device (CAD). Het CAD is een filter, samengesteld uit parels die ontworpen zijn om zowel residueel amotosalen als afbraakproducten van amotosalen na belichting uit het plasma te absorberen. In fig 3 wordt het algemeen werkingsprincipe weergegeven.



Figuur 3: algemeen werkingsprincipe

6.2 REAGENTIA EN TOESTELLEN

- INTERCEPT processingkit for apheresisplasma (Amotosalen•HCl)
- Terumo Sterile Tubing Welder
- Composeal
- Toestel: Nova Biomedical for Baxter Healthcare

In dit toestel kunnen maximum 2 plasmazakken tegelijkertijd behandeld worden.



Figuur 4: UVA illumination device

6.3 WERKWIJZE

Nota: na collectie werd het plasma ingevroren tot -80°C in afwachting van verdere verwerking.

- Ontdooi de plasmazak in het warmwaterbad
- Weeg de plasmazak af en noteer het gewicht en het nummer van de plasmazak
- Vul 3 citraat buizen (3ml plasma), 1 EDTA-buis (2,7ml plasma) en 1 buis serum gel (2,6ml plasma) en etiketeer ze met het nummer van de plasmazak + A. Dit geldt enkel voor deze studie;
- Smelt de plasmazak en de INTERCEPTkit aan elkaar met de Terumo Sterile Tubing Welder

- Hang de plasmazak omhoog en laat het plasma mengen met de amotosalen (15ml 6mM) in de belichtingszak (1,3l)
- Duw de lucht uit de belichtingszak en las deze af met de composeal
- Weeg de lege plasmazak af en noteer het gewicht
- Druk op AANMELDEN in het menu van de illuminator en vul initialen in. Kies daarna hoeveel plasmazakken er voor behandeling worden aangeboden;
- Open de lade van de illuminator
- Scan de barcodes van originele plasmazak en de barcodes van de te bekomen plasmazak in
- Leg de belichtingszak met het mengsel in de illuminator en laat de zak +/-7 minuten belichten met UVA licht (3,0J/cm²)
- Haal de belichtingszak uit de illuminator (nooit langer dan 30 minuten in toestel laten zitten). De illuminator print automatisch een rapportje uit. In figuur 5 is een dergelijk rapport te zien;

Behandelingsrapport

```

Serienummer van instrument      :V02104090
Softwareversie                  :4.2
Starttijd behandeling           :09:36
Startdatum behandeling          :16/11/2007
Operator-ID                     :BH
Donatienummer                  :F17824
Bloedcomponent                  :Plasma
Product-ID                      :F17824
Set-ID                          :INT3104B
Lot-ID                          :07B12L31
Kamernummer                     :2
Verwijderingstijd instellen    :09:44
Streefdosis                     :6.40 J/cm^2
Feitelijke dosis                :6.41 J/cm^2
Behandelingstijd               :07:07
Wachttijd                      :00:00:03
Zakstatus                       :Voltooid
Oorzaak van de status Onvoltooid :Geen
Extra informatie                :

```

Figuur 5: behandelingsrapport

- Hang de belichtingszak omhoog en laat de vloeistof door de filter stromen naar de definitieve plasmazakken. De klem aan de CAD uitzetlijn is open en de klem van de omleiding is gesloten;

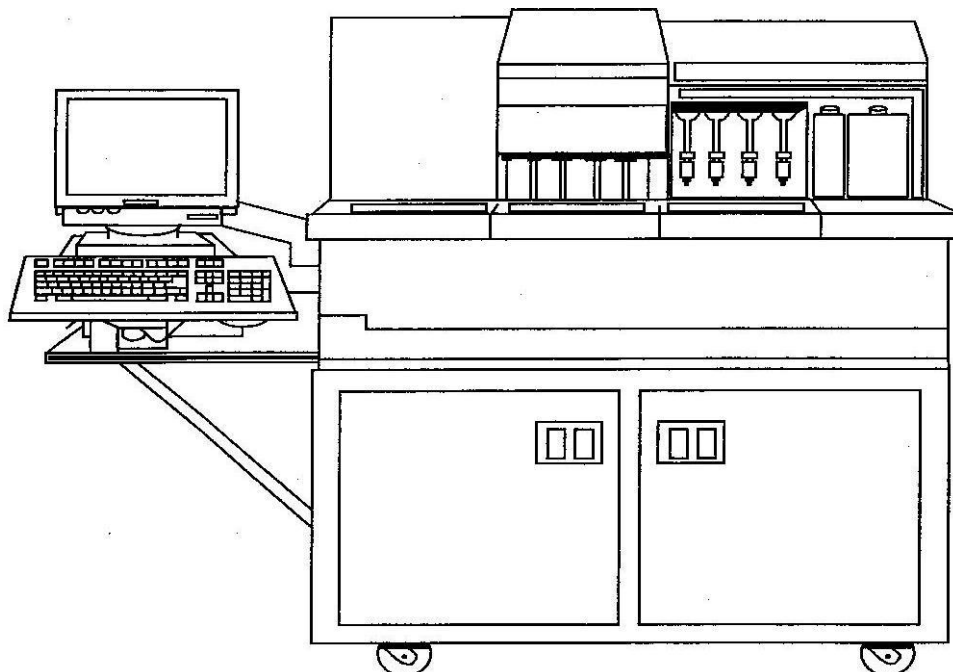


Figuur 6: CAD

- Klem de definitieve plasmazaken af en zorg ervoor dat er geen lucht in de zakken zit door de klem van de uitzetlijn te sluiten en de klem van de omleiding te openen;
- Weeg de definitieve plasmazakken samen en noteer het gewicht. Noteer ook het nummer op de definitieve plasmazakken voorafgaand door FP;
- Vul 3 citraat buizen (3ml) en 1 buis serum gel (2,6ml) en etiketeer ze met het nummer van de plasmazak + B. Dit geldt enkel voor deze studie;
- Vries de stalen van A en B in op hetzelfde ogenblik ($\leq -80^{\circ}\text{C}$)

7 MULTI-CHANNEL DISCRETE ANALYZER II (MDA) BIOMERIEUX⁽⁹⁾

Alle stollingstesten (behalve proteïne S) in deze studie gebeuren met de MDA. Dit toestel wordt hieronder besproken en wordt afgebeeld in figuur 7.



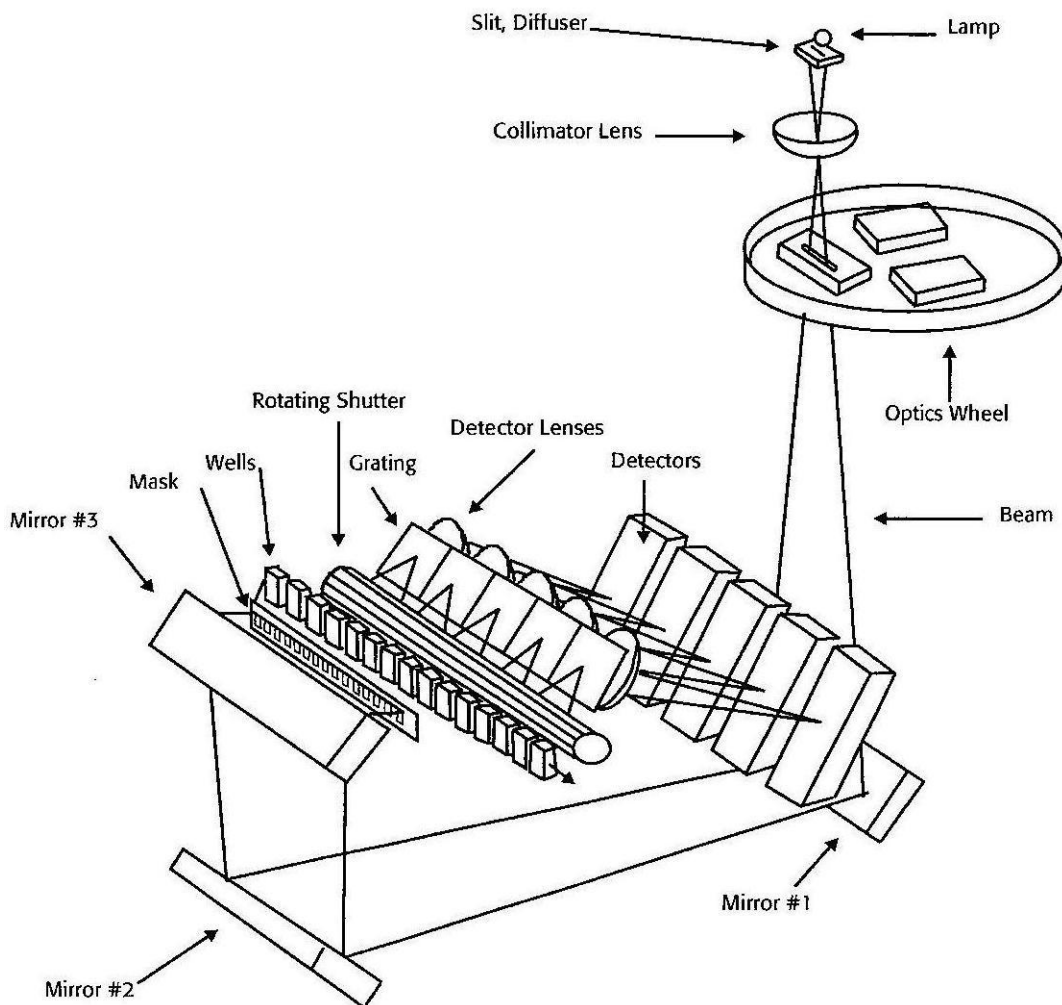
Figuur 7: MDA II

7.1 ALGEMEEN

De MDA is een volledig automatische analyzer voor stollingsonderzoek gebaseerd op klontervorming, chromogene assays of immunoassays. De testen kunnen Ad Random uitgevoerd worden.

De MDA kan worden aangesloten op het laboratorium informatica systeem (LIS) en wordt door de technoloog bediend aan de hand van een touchscreen.

Een lichtbron (een tungstenlamp) wordt geprojecteerd door een spleet en wordt verstrooid om een lichtstraal te vormen die wordt geprojecteerd op een lens (collimator). Het optisch wiel plaatst zich automatisch in de juiste positie. De lichtstraal wordt nu zodanig gedivergeerd dat het 12 reactiecuvetten kan bereiken. Daarvoor wordt ze optisch afgebogen door 3 verschillende spiegels, waarna ze wordt opgevangen door een masker die de lichtstraal verdeelt in 12 afzonderlijke lichtstralen. Elke afzonderlijke lichtstraal kan door juist 1 reactiecuvet passeren. Daarna wordt de lichtstraal door de sluiters eerst geprojecteerd op een rooster die ze differentieert in hun kleurenspectrum, vergelijkbaar met de lichtinval door een prisma. De gedifferentieerde stralen passeren door een detectorlens waarna de stralen worden gecapteerd door een fotodiode welke de lichtsterkte omzet in een analoog signaal en vervolgens in een digitaal signaal. De digitale signalen worden dan door een computer geconverteerd naar een resultaat voor de gemeten parameter. Dit optisch systeem wordt systematisch voorgesteld in figuur 8.



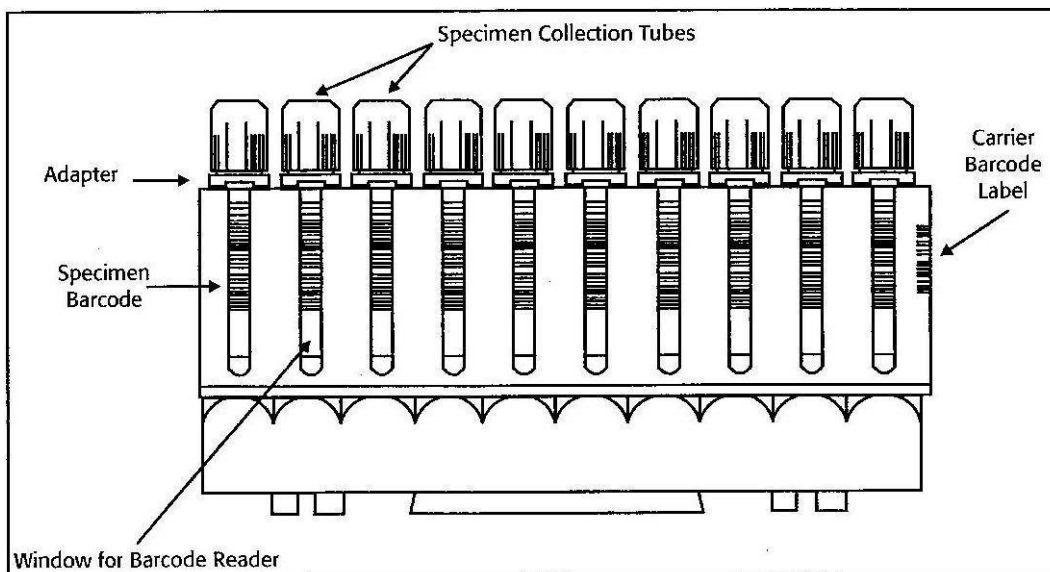
Figuur 8: optisch systeem

7.2 MDA II: WERKWIJZE

Iedere morgen worden de reagentia opnieuw op het toestel gezet en worden de naalden gespoeld met probe cleaner en javel.

De MDA II kan op 2 wijzen bediend worden: automatisch via het LIS of manueel. Manueel worden de opdrachten via het touch-screen ingegeven.

De citraattuben met dop worden in een stalenrek geplaatst met de barcode vooraan zodat het rack en de stalen gescand kunnen worden. Aan de hand van de barcode worden de aangevraagde testen doorgegeven aan de MDA II en uitgevoerd. Een voorstelling van een stalenrek wordt weergegeven in figuur 6.

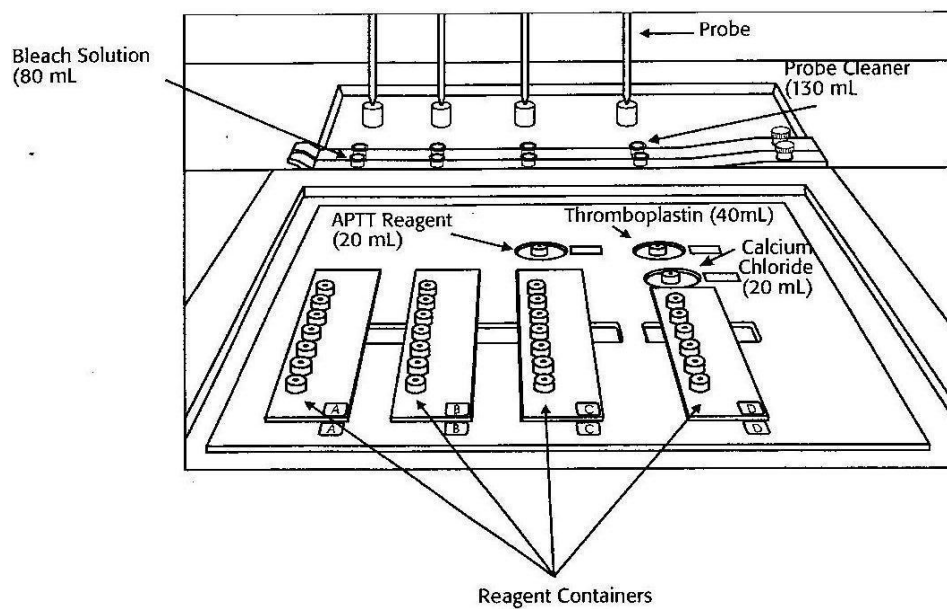
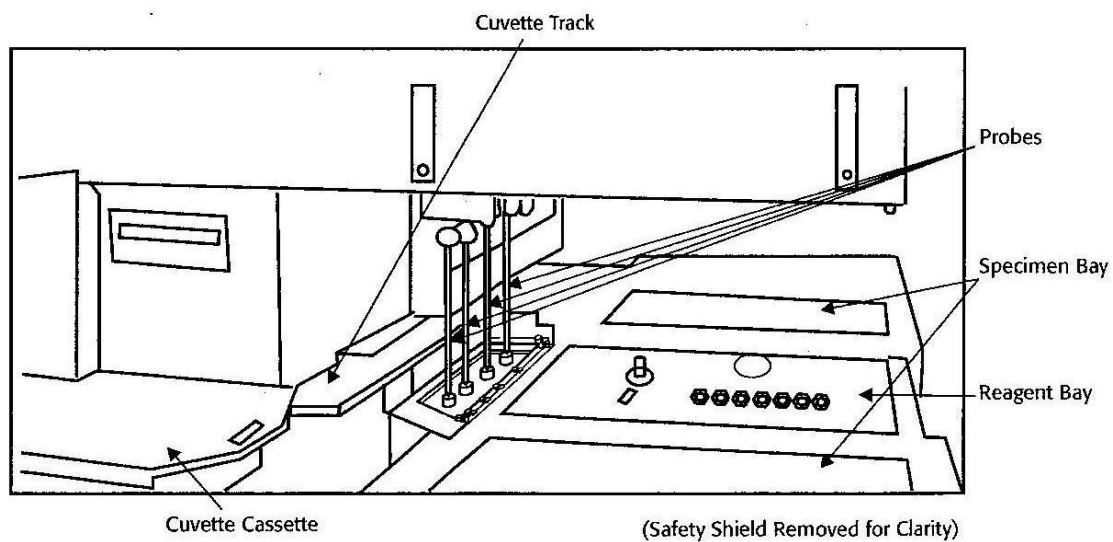


Figuur 9: stalenrek

Het stalenrek wordt in de linker “specimen bay” geplaatst om gescand te worden en het staal wordt gepipeteerd in de reactiecupjes.

De MDA II heeft 4 verschillende naalden (probes A, B, C en D) om staal en reagens in een vaste volgorde te pipetteren in de reactiecupjes. De reagentia worden geladen wanneer er niet meer genoeg in de flesjes zit of wanneer de reagentia vervallen zijn. Het toestel geeft automatisch een waarschuwing en de testen waarvoor er geen reagens meer is, zullen niet meer worden uitgevoerd. De reagentia wordt tussen de 9 en 15°C bewaard in de “reagent bay”. Ieder reagens wordt ingescand en krijgt een plaats toegewezen.

De stalen waarvan de testen reeds uitgevoerd zijn, komen uit het toestel in de rechter “specimen bay” en de resultaten worden doorgegeven aan het LIS. Een schematisch overzicht van de verschillende onderdelen wordt weergegeven in figuur 7.



Figuur 10: overzicht MDA

8 STOLLINGSTESTEN

8.1 PRE-ANALYTISCHE FASE

De plasmazakken worden bewaard op circa -80°C en worden ontdooid vlak voor de INTERCEPTbehandeling in een warmwaterbad op 37°C om denaturatie van fibrinogeen te voorkomen. Normaliter wordt voor stollings-testen volbloed afgenomen in citraatbuizen ($\text{Na}_3\text{citraat}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0,106\text{mol/l}$ in verhouding 1/10) maar aangezien het hier plasma betreft dat reeds een anticoagulans bevat, worden de stalen afgenomen in eppendorfcupjes.

Wanneer er zichtbare hemolyse plaatsvindt mogen de stalen niet gebruikt worden. Bilirubine of lipemia kunnen interferentie geven in de test. Gebruik nooit gedemineraliseerd water maar altijd gedestilleerd water (AD) want bepaalde bacteriën deactiveren factor V en VII.

In de kwaliteitscontroles wordt gebruikt gemaakt van MDA Verify 1, 2 en 3 die bewaard worden op 2 tot 8°C .

MDA Verify 1 (REF 252562) is gelyofiliseerd menselijk plasma met de karakteristieken gelijk aan vers ingevroren plasma waarbij 1,2ml AD wordt toegevoegd vóór gebruik.

MDA Verify 2 (REF 252563) en 3 (REF 252564) zijn gelyofiliseerd menselijk plasma waarbij factor II, VII, IX en X selectief en gedeeltelijk verwijderd zijn en waarbij er 1,2ml AD wordt toegevoegd vóór gebruik.

Verify 1 wordt gebruikt bij de controles van PT, APTT, fibrinogeenbepaling en factor assay's

Verify 2 en 3 worden ook gebruikt bij de controles van PT, APTT en fibrinogeenbepaling.

Alle onopgeloste en reserve reagentia wordt bewaard op een temperatuur van 2 tot 8°C .

8.2 BEPALING VAN PROTROMBINETIJD (PT) OP DE MDA II⁽¹⁰⁾

8.2.1 **Doelstelling en principe**

Bepalen van de PT met behulp van weefseltromboplastine en CaCl_2 . PT wordt in de routine als preoperatief screenringonderzoek gebruikt, als leverfunctietest en voor het opsporen van factor deficiënties van factor II, V, VII en X. Factor II, VII en X zijn vitamine K afhankelijk waardoor de PT gebruikt wordt om orale anticoagulantia therapie op te volgen. De PT is een indicatie voor de extrinsieke stollingsweg.

PT meet factor VII, X, V, protrombine en fibrinogeen. Aan citraatplasma wordt eerst weefseltromboplastine toegevoegd en daarna CaCl_2 . De tijd tussen het toevoegen en verschijnen van de fibrinedraden wordt optisch gemeten. De tijd is verlengd als het gehalte van 1 of meerdere stollingsfactoren die in deze reactie betrokken zijn beduidend verlaagd is; deze stollingsfactoren zijn factor II, V, VII, X en fibrinogeen.

De PT wordt uitgedrukt in INR en PT

- INR waarde

$$\text{INR} = [\text{PT (sec) patiënt} / \text{PT normale poolplasma (sec)}]^{\text{ISI}}$$

ISI is de gevoeligheidsindex. Deze is afhankelijk van het toestel en wordt door de fabrikant voor elk lotreagens bepaald en vermeld op de bijsluiter;

- PT

De gemeten waarde in seconden wordt omgezet in % volgens de opgeslagen calibratiecurve.

8.2.2 Reagens

De gebruikte reagenskit is Simplastin Excel S van Biomérieux (REF252182). Deze kit bevat

- Tromboplastin Reagent: 10 flesjes van 6ml weefseltromboplastine van konijnenhersenen, calciumionen en buffer;
- Diluent: 10 flesjes van 6ml.

Diluent en Tromboplastin worden samen gevoegd om het reagens te activeren. Het geactiveerde reagens is 4 dagen stabiel op een temperatuur van 2 tot 8°C in een goed afgesloten flesje met een voorkeur voor het originele flesje.

8.2.3 Werkwijze

Vraag de test manueel aan via ORDER ASSAY MENU. De barcodes worden automatisch uitgeprint.

Kleef de barcode op het eppendorfcupje en knip er het dekseltje van gezien deze niet doorprikt kunnen worden met de naald om staal op te zuigen.

Plaats de eppendorfcupjes in een stalenhouder van de MDA en plaats deze op het toestel.

Het toestel pipetteert 50µl staal in de cuvet met probe A. Het plasma wordt opgewarmd tot 37° C +/- 1°C terwijl de cuvet langs de transportband schuift (9min). Probe D voegt 100µl verwarmd Simplastine toe, onmiddellijk begint de tijd te lopen tot stolselvorming.

8.2.4 Referentiewaarden

Referentiewaarden: 60-100% activiteit

8.3 BEPALING VAN GEACTIVEERDE PARTIELE TROMBOPLASTINE TIJD (APTT) OP DE MDA II ⁽¹¹⁾

8.3.1 **Doelstelling en principe**

APTT wordt in de routine gebruikt om afwijkingen in het intrinsieke stollingssysteem op te sporen en om een tekort van factor II, V, VIII, IX, X, XI en XII te detecteren en het opvolgen van een heparinetherapie. Deze test is niet gevoelig bij plaatjesdysfuncties.

APTT is verlengt bij

- uitgesproken deficiëntie van de factoren VIII, IX, XI, XII. Factordeficiënties hebben maar een klinisch invloed als ze minder dan 20% van de normale waarde bedragen;
- aanwezigheid van lupus anticoagulans
- toedienen van heparine: voor patiënten onder heparinetherapie wordt gestreefd naar een waarde van 70 tot 110 seconden of een ratio 2-3 tegenover de startwaarde.

APTT is verkort bij toestanden die gepaard gaan met een in vivo stollingsactivatie zoals een recente trombose.

8.3.2 **Reagens**

Het gebruikte reagens is MDA Platelin LS test kit (REF252558) waarmee 2000 testen kunnen uitgevoerd worden. In de kit bevinden zich

- 5 flesjes MDA Platelin LS reagent bevat gezuiverde fosfolipiden van kip en varkens, silica (activator), buffer, stabilisator en 0,02% natriumazide als bewaarmiddel;
- 5 flesjes MDA Platelin LS Calcium Chloride (0,025M) bevat kleurstof en 0,05% natriumazide als bewaarmiddel.

Ieder flesje bevat genoeg reagentia om 400 testen uit te voeren.

Wanneer de reagentia geactiveerd zijn, blijven ze 3 dagen stabiel op kamertemperatuur en 8u op 37°C.

8.3.3 **Werkwijze**

Vraag de test manueel aan via ORDER ASSAY MENU. De barcodes worden automatisch uitgeprint.

Kleef de barcode op het eppendorfcupje en knip er het dekseltje van.

Plaats de eppendorfcupjes in een stalenhouder van de MDA en plaats deze op het toestel.

Het toestel pipetteert 50µl staal in de cuvet met probe A. Het plasma wordt opgewarmd tot 37°C +/-1°C terwijl de cuvet langs de transportband schuift. Probe C voegt 50µl verwarmde platelin toe. Het mengsel wordt geïncubeerd voor 3' en 40". Probe D voegt 50µl CaCl₂ toe aan de cuvet. De tijd tot stolselvorming wordt gemeten.

8.3.4 **Referentiewaarden**

Het resultaat van de meting wordt onmiddellijk in seconden uitgedrukt.

Referentiewaarden: 22-38 sec

8.4 BEPALING VAN FIBRINOGEEN OP DE MDA II⁽¹²⁾

8.4.1 **Doelstelling en principe**

Fibrinogeen is een acuut fase eiwit: binnen 24u na een ontsteking of weefselnecrose is een verhoging van de concentratie aantoonbaar. Het is het belangrijkste plasma-eiwit dat de sedimentatiesnelheid beïnvloedt. Verhoogde concentraties treden ook op na toevoeging van oestrogenen en zwangerschap. Hoge fibrinogeenconcentraties zijn een belangrijke risicofactor voor zowel coronair-arteriële als cerebrovasculaire ziekten. Verlaagde concentraties komen voor bij abnormale synthese, DIC, anabole steroïden, androgenen, asparaginase, plasmogeen activators en valproïnezuur.

Trombine wordt in overmaat toegevoegd aan plasma: fibrinogeen wordt omgezet in fibrine. Fibrine ondergaat polymerisatie waardoor er een fibrinenetwerk ontstaat. Factor VIII katalyseert de vorming van stabiliserende verbindingen waardoor de klont wordt gevormd. De tijd tussen toevoe-

gen van trombine en klontervorming is omgekeerd evenredig met de fibrinogeenconcentratie.

8.4.2 **Reagens**

Bepaling van fibrinogeen op de MDA II gebeurt met de kit MDA Fibriquick (REF 252560). Deze kit bevat 10 flesjes met 2,5ml gelyofiliseerd bovine trombine met stabilisator en buffer. Ieder flesje bevat genoeg reagens om 45 testen uit te voeren.

Door toevoegen van 2,5ml AD wordt het reagens geactiveerd. Bewaar geactiveerde fibriquick maximum 3 dagen op 2-15°C.

8.4.3 **Werkwijze**

Vraag de test manueel aan via ORDER ASSAY MENU. De barcodes worden automatisch uitgeprint.

Kleef de barcode op het eppendorfcupje en knip er het dekseltje van.

Plaats de eppendorfcupjes in een stalenhouder van de MDA en plaats deze op het toestel.

Het toestel pipetteert 20µl staal met probe A. Plasma wordt 1/10 verdund met imidazolebuffer. De cuvet wordt opgewarmd tot 37°+/-1°C gedurende 3'40". Probe D voegt 50µl verwarmde fibriquick toe, onmiddellijk begint de tijd te lopen tot klontervorming.

8.4.4 **Referentiewaarden**

Het resultaat wordt met behulp van een referentiecurve (kwantitatieve Biuret methode) omgezet naar concentratie (mg/dl). De fibrinogeenlevels kunnen beïnvloed worden door de aanwezigheid van heparine, hemolyse en fibrinogeendegraderende producten. Wanneer de heparineconcentratie groter is dan 0,6U/ml en/of de fibrinogeendegraderende producten groter zijn dan 100µg/ml dan zal er een lager resultaat gevonden worden dan het effectieve resultaat.

Referentiewaarden: 160-415mg/dl

8.5 BEPALING VAN ANTITROMBINE (AT) OP DE MDA II⁽¹³⁾

8.5.1 Doelstelling en principe

De doelstelling is het meten van AT. Patiënten met een aangeboren AT-tekort hebben een plasma activiteit tussen de 30 en 60%. Verworven AT-tekort komt voor bij leveraandoeningen, longembolie, DIC,... Ook het gebruik van orale contraceptiva kan leiden tot verminderde AT-gehalte.

Plasma wordt in aanwezigheid van heparine geïncubeerd met een overmaat trombine. Een complex [AT-Heparine] wordt gevormd. De resthoeveelheid trombine hydrolyseert het chromogeen substraat EtM-Spro-Arg-p-nitroaniline. Het vrijgekomen p-nitroaniline (gele kleur) wordt gemeten bij 405nm en is omgekeerd evenredig met de hoeveelheid antitrombine aanwezig in het plasma.

8.5.2 Reagens

De reagentiakit die gebruikt wordt is Biomerieux antitrombine III (REF 279030) en deze bevat:

- AT-III trombine in 4 flesjes van 3ml gelyofiliseerd bovine trombine met een concentratie van 12NIH units per ml na reconstructie. De reconstructie gebeurt met 1 flesje solvent;
- AT-III substraat in 4 flesjes van 3ml gelyofiliseerd chromogeen substraat, EtM-SPro-Arg-pNA, AcOH in 1,4µm per ml na reconstructie met 3ml AD.

In de kit bevindt zich AT-III diluent en dit is hetzelfde als de MDA imidazole buffer.

Het geactiveerde trombine en substraat zijn 14 dagen stabiel op 20 +/- 5°C in het originele flesje.

8.5.3 **Werkwijze**

Vraag de test manueel aan via ORDER ASSAY MENU. De barcodes worden automatisch uitgeprint.

Kleef de barcode op het eppendorfcupje en knip er het dekseltje van.

Plaats de eppendorfcupjes in een stalenhouder van de MDA en plaats deze op het toestel.

Probe A pipetteert staal (5µl) in de cuvet. Dit wordt verdund met diluent (40µl) en water tot een totaal volume van 200µl. Er wordt 150µl van dit mengsel verwijderd en er wordt verder gewerkt met 50µl verdund plasma. Het plasma wordt opgewarmd tot 37° +/- 1°C terwijl de cuvet langs de transportband schuift. Probe C voegt dan 50µl verwarmde trombine toe. Dit wordt dan samen geïncubeerd gedurende 3minuten en 40seconden. Daarna zal probe D 50µl substraat aan de cuvet toevoegen. Onmiddellijk meet het toestel het verschil in absorptie (405nm).

8.5.4 **Referentiewaarden**

De verandering in absorptie wordt automatisch uitgezet op een curve en omgerekend naar percentage activiteit.

Referentiewaarden: 75-125% activiteit

8.6 BEPALING VAN FACTOR VIII OP DE MDA II⁽¹⁴⁾

8.6.1 **Doelstelling en principe**

Het doel is het meten van factor VIII. Het ontbreken van factor VIII gaat gepaard met een duidelijke bloedingneiging en gestoorde wondgenezing. Een verlaagd gehalte aan factor VIII komt voor als een recessief geslachtsgebonden, erfelijke aandoening. Het gebrek wordt gedragen door het X chromosoom. Een verworven factor VIII tekort treedt op bij een gedissemineerde intravasale stolling en bij ernstige leverinsufficiëntie.

De bepaling van factor VIII is gebaseerd op de partiële tromboplastinetijd van een plasma dat alle stollingsfactoren bevat met uitzondering van de te doseren factor; deze is normaal aanwezig in het te onderzoeken verdunde

plasmastaal. De stollingstijd is afhankelijk van de concentratie van factor VIII in het staal.

8.6.2 Reagens

De kit die gebruikt wordt is de Factor VIII deficiënt plasma van Biopool (REF 40708). In de kit zitten 10 flesjes van 1ml gevriesdroogd menselijk plasma zonder factor VIII. Bij reconstructie wordt 1ml AD toegevoegd.

De test wordt gekalibreerd met Biopool Hemostasis Reference Plasma (REF 50720). De kwaliteitscontroles worden uitgevoerd met Biopool Hemostasis Reference Plasma (REF 50720) en Hemostasis Reference Plasma Abnormal (REF 50721).

8.6.3 Werkwijze

De MDA detecteert en corrigeert automatisch turbiditeit geassocieerd met lipemia, door het verlies aan licht te compenseren met een versterkt lichtsignaal. Lipemische, hemolytische en icterische stalen zullen waarschijnlijk geen interferentie geven bij een factorbepaling daar het plasma eerst verdund wordt.

Vraag de test manueel aan via ORDER ASSAY MENU. De barcodes worden automatisch uitgeprint.

Kleef de barcode op het eppendorfcupje en knip er het dekseltje van.

Plaats de eppendorfcupjes in een stalenhouder van de MDA en plaats deze op het toestel.

Het toestel pipetteert 10µl staal in de cuvet met probe A en maakt de juiste verdunning door MDA imidazole buffer toe te voegen tot 50µl. Probe B voegt er dan 50µl factor VIII deficiënt plasma aan toe. Het plasma wordt opgewarmd tot 37°+/-1°C. Daarna wordt er 50µl MDA platelin toegevoegd met probe C. Dit mengsel wordt 3minuten en 40seconden geïncubeerd op 37°+/-1°C waarna probe D 50µl verwarmde CaCl₂ toevoegt. Onmiddellijk begint de tijd te lopen tot stolselvorming.

8.6.4 **Referentiewaarden**

Resultaten van de meting in seconden van stalen en controles worden omgezet in percentage aan de hand van de referentiecurve.

Referentiewaarden: 80 tot 160% activiteit

8.7 BEPALING VAN PROTEINE C OP DE MDA II⁽¹⁵⁾

8.7.1 **Doelstelling en principe**

Het doel is het bepalen van proteïne C (PC). Een verlaagd proteïne C gehalte betekent een verhoogd risico voor trombose en embolen. Voor de aanmaak van proteïne C is vitamine K noodzakelijk. Behandeling met antivitamine K preparaten vermindert de synthese van actief proteïne C.

Proteïne C in plasma, wordt geactiveerd door een specifiek enzym, afkomstig van slangengif. Het geactiveerde proteïne C (APC) hydrolyseert het substraat S-2366, met vrijzetting van p-nitroaniline (gele kleur). Dit wordt gemeten bij 405nm en is recht evenredig met de hoeveelheid proteïne C in het plasma.

8.7.2 **Reagens**

De gebruikte kit is de bioMérieux Protein C (REF 279027) en bevat

- PC-Activator 6 flesjes van 3ml gelyofiliseerd extract van Agkistrodon c. controtrix venom;
- Substraat 6 flesjes van 6ml gelyofiliseerd chromogeen substraat TCH-Pro-Arg-pNA, AcOH 15µmol per flesje.

Eénmaal geactiveerd kunnen de activator en substraat 7 dagen op kamertemperatuur bewaard worden.

Bij de activator wordt er 3ml AD toegevoegd en bij het substraat wordt er 6ml AD toegevoegd om de reagentia te reconstrueren. Gestegen concentraties van hemoglobine, bilirubine of lipiden kunnen interfereren met het resultaat.

8.7.3 **Werkwijze**

Vraag de test manueel aan via ORDER ASSAY MENU. De barcodes worden automatisch uitgeprint.

Kleef de barcode op het eppendorfcupje en knip er het dekseltje van.

Plaats de eppendorfcupjes in een stalenhouder van de MDA en plaats deze op het toestel.

Probe A pipetteert staal (10µl + 2µl diluent) in de cuvet. Het plasma wordt opgewarmd tot 37° +/-1°C terwijl de cuvet langs de transportband schuift. Probe D voegt dan 50µl verwarmd proteïne C activator toe, dit wordt dan samen geïncubeerd gedurende 3 minuten en 40 seconden. Daarna zal probe D 10µl proteïne C substraat aan de cuvet toevoegen. Het toestel meet het verschil in absorptie bij 405nm.

8.7.4 **Referentiewaarden**

Het resultaat van de meting wordt m.b.v. de referentiecure omgezet naar percentage activiteit.

Referentiewaarden: 70-149% activiteit

8.8 BEPALING VAN TOTAAL PROTEINE S IN PLASMA⁽¹⁶⁾

8.8.1 **Doelstelling en principe**

Deze test wordt niet uitgevoerd op de MDA maar met LabSystems Multiscans Multisoft. Het doel is het bepalen van proteïne S in plasma. De cupjes van de microtiterstrips zijn gecoat met een eerste monoklonaal antilichaam tegen totaal proteïne S (reagens 1). Het tweede anti-totaal proteïne S monoklonaal antilichaam, gebonden met peroxidase (reagens 2) wordt aan de cupjes toegevoegd samen met het te testen plasmastaal. Het totaal proteïne S, aanwezig in het plasma, wordt gelijktijdig gecapteerd door het eerste monoklonaal antilichaam gecoat op de wand van de cupjes en door het tweede monoklonaal antilichaam-peroxidase conjugaat. De “sandwich” wordt dus in 1 stap gevormd. Vervolgens wordt het substraat tetramethylbenzidine (reagens3) toegevoegd. De reactie wordt gestopt door

toevoegen van een sterk zuur. De ontstane kleur is recht evenredig met de concentratie totale proteïne S in het plasma.

8.8.2 **Reagens**

De reagentia die gebruikt worden zijn: Asserachrom total protein S en H_2SO_4 1M.

Het gebruikte toestel is de Labsystems Multiscan Multisoft.

8.8.3 **Werkwijze**

Pipetteer 50 μl reagens 2 in elk cupje. Pipetteer, in duplo 200 μl plasma. Dek de strips af en laat juist 1 uur incuberen bij kamertemperatuur (18°-25°C). Was 5 maal met reagens 5. Pipetteer 50 μl 1M H_2SO_4 om de reactie te stoppen. Schud voorzichtig de plaat om de reagentia goed met het zuur te mengen. Wacht 15 minuten en lees daarna de absorpties af bij 450nm t.o.v. de blanco. De blanco is reagens 4 i.p.v. plasmaverdunning.

8.8.4 **Referentiewaarden**

Teken de standaardcurve (met op de X as de %waarden van de standaard en op de y as de afgelezen absorpties) en lees hierop de waarde af voor de plasmastalen.

Referentiewaarden: 70-140%

PRAKTISCH GEDEELTE

9 INVLOED VAN DE INTERCEPT-BEHANDELING OP HET PLASMAVOLUME

9.1 WERKWIJZE

Het afgenomen plasma wordt na collectie ingevroren tot -80°C in afwachting van de INTERCEPT-behandeling. De zakken worden ontdooid in een warmwaterbad van 37°C en onmiddellijk wordt er staal afgenomen om er de stollingstesten vóór de behandeling op uit te voeren. De plasmazakken worden gewogen om het procentueel verlies te kunnen berekenen en daarna wordt de behandelingskit aan de plasmazak gesmolten. Amotosalen wordt toegevoegd aan het plasma waarna de zak in de illuminator geplaatst wordt en gedurende 7 minuten belicht wordt. De plasmazak wordt opgehangen zodat het plasma door de filter kan lopen die amotosalen uit het plasma filtert. De lucht wordt uit de zakken geduwd en de hele kit wordt los gemaakt van de behandelde plasmazak. De zakken worden opnieuw gewogen (in g).

De resultaten van deze wegingen worden weergegeven in bijlage 1. Het gemiddelde volumeverlies wordt berekend (%) en er wordt een standaarddeviatie van het volumeverlies berekend. De statistische verwerking wordt weergegeven in tabel 6.

Tabel 6: volumeverlies

| | |
|-------------------|------|
| Gemiddelde | 8,5% |
| Standaarddeviatie | 1,9% |

9.2 INTERPRETATIE

Tijdens een behandeling mag er maximum 10% van het plasmavolume verloren gaan om een voldoende grote opbrengst te verkrijgen.

Uit de statistische verwerking kan worden afgeleid dat het gemiddelde van het volumeverlies beneden de 10% ligt en dus de behandelingen goed zijn

uitgevoerd. Ook de standaarddeviatie ligt laag wat wijst op een goede en reproduceerbare werkwijze.

10 VERWERKING VAN DE STOLLINGSTESTEN

De stalen vóór en na behandeling worden opnieuw ingevroren op -80°C en pas ontdooid wanneer de stollingstesten worden uitgevoerd.

De PT, APTT, fibrinogeen, AT, PC en factor VIII worden bepaald op de MDA waarvan de resultaten te vinden zijn in bijlage 2. PS wordt bepaald aan de hand van een ELISA-test waarvan de resultaten te vinden zijn in bijlage 2.

10.1 PT

Er worden 29 plasmazakken behandeld met de INTERCEPT-behandeling. Telkens wordt de PT bepaald vóór en na de behandeling. De statistische verwerking van de resultaten wordt weergegeven in tabel 7. Er wordt een gepaarde t-test uitgevoerd om na te gaan of er statistisch een significant verschil is.

Tabel 7: statistische verwerking PT

| PT (%) | Gemiddelde (%) | n | Standaarddeviatie (%) | P(T≤t) |
|---------------|-----------------------|----------|------------------------------|---------------|
| Vóór | 80,2 | 29 | 13,4 | 8,22E-08 |
| Na | 65,3 | 29 | 16,9 | |

10.1.1 Interpretatie

Er is een duidelijke vermindering van de PT activiteit. Deze daalt van 80,2% naar 65,3% in deze studie.

Statistisch wordt aangetoond dat er een sterk significant verschil is want $P < 0,001$.

De PT is gerelateerd aan de extrinsieke stollingsweg. De PT in deze studie wijst erop dat er een daling is in de factoren van de extrinsieke stollingsweg.

10.2 APTT

29 plasmazakken worden behandeld met de INTERCEPT-behandeling. Telkens wordt de APTT bepaald vóór en na de behandeling. De statistische verwerking van de resultaten wordt weergegeven in tabel 8. Er wordt een gepaarde t-test uitgevoerd om na te gaan of er statistisch een significant verschil is.

Tabel 8: statistische verwerking APTT

| APTT (s) | Gemiddelde (s) | n | Standaarddeviatie (s) | P(T≤t) |
|-----------------|-----------------------|----------|------------------------------|---------------|
| Vóór | 32,4 | 29 | 2,95 | 2,35E-16 |
| Na | 39,9 | 29 | 4,50 | |

10.2.1 Interpretatie

Er is een duidelijke stijging zichtbaar in de APTT van 32,4s naar 39,9s wat wijst op een daling van de concentratie van de stollingsfactoren in de intrinsieke stollingsweg. Statistisch wordt aangetoond dat er een sterk significant verschil is want $P < 0,001$.

10.3 FIBRINOGEEN

29 plasmazakken worden behandeld met de INTERCEPT-behandeling. Telkens wordt de fibrinogeen bepaald vóór en na de behandeling. De statistische verwerking van de resultaten wordt weergegeven in tabel 9. Er wordt een gepaarde t-test uitgevoerd om na te gaan of er statistisch een significant verschil is.

Tabel 9: statistische verwerking fibrinogeen

| Fibrinogeen (mg%) | Gemiddelde (mg%) | n | Standaarddeviatie (mg%) | P(T≤t) |
|--------------------------|-------------------------|----------|--------------------------------|---------------|
| Vóór | 245,59 | 29 | 91,577 | 9,94E-12 |
| Na | 192,49 | 29 | 73,505 | |

10.3.1 Interpretatie

De concentratie van fibrinogeen is gedaald van 245,59mg% naar 192,49mg%. Hieruit concluderen we dat fibrinogeen gevoelig is aan de INTERCEPT-behandeling.

Statistisch wordt aangetoond dat er een sterk significant verschil is want $P < 0,001$.

10.4 FVIII

29 plasmazakken worden behandeld met de INTERCEPT-behandeling. Telkens wordt de FVIII bepaald vóór en na de behandeling. De statistische verwerking van de resultaten wordt weergegeven in tabel 10. Er wordt een gepaarde t-test uitgevoerd om na te gaan of er statistisch een significant verschil is.

Tabel 10: statistische verwerking FVIII

| FVIII (%) | Gemiddelde (%) | n | Standaarddeviatie (%) | P(T≤t) |
|------------------|-----------------------|----------|------------------------------|---------------|
| Vóór | 101,87 | 29 | 26,02 | 4,59E-17 |
| Na | 67,70 | 29 | 23,69 | |

10.4.1 Interpretatie

De activiteit van FVIII is gemiddeld met 34,17% gedaald na de behandeling. Dit verlies van 34,17% (SD=10%) activiteit ligt nog steeds onder de norm van 50% wat dus aangeeft dat er nog genoeg activiteit aanwezig is. Statistisch wordt aangetoond dat er een sterk significant verschil is want $P < 0,001$.

10.5 AT

29 plasmazakken worden behandeld met de INTERCEPT-behandeling. Telkens wordt de AT bepaald vóór en na de behandeling. De statistische verwerking van de resultaten wordt weergegeven in tabel 11. Er wordt een gepaarde t-test uitgevoerd om na te gaan of er statistisch een significant verschil is.

Tabel 11: statistische verwerking AT

| AT (%) | Gemiddelde (%) | n | Standaarddeviatie (%) | P(T≤t) |
|---------------|-----------------------|----------|------------------------------|---------------|
| Vóór | 99,12 | 29 | 14,04 | 9,79E-10 |
| Na | 91,02 | 29 | 12,06 | |

10.5.1 Interpretatie

De activiteit van AT is gedaald van 99,12% naar 91,02%. AT is een stollingsremmer dus ook stollingsremmers worden beïnvloed door de INTERCEPT-behandeling.

Statistisch wordt aangetoond dat er een sterk significant verschil is want $P < 0,001$.

10.6 PC

29 plasmazakken worden behandeld met de INTERCEPT-behandeling. Telkens wordt de PC bepaald vóór en na de behandeling. De statistische verwerking van de resultaten wordt weergegeven in tabel 12. Er wordt een gepaarde t-test uitgevoerd om na te gaan of er statistisch een significant verschil is.

Tabel 12: statistische verwerking PC

| PC (%) | Gemiddelde (%) | n | Standaarddeviatie (%) | P(T≤t) |
|---------------|-----------------------|----------|------------------------------|---------------|
| Vóór | 105,09 | 29 | 15,51 | 2,92E-23 |
| Na | 88,75 | 29 | 15,01 | |

10.6.1 interpretatie

De activiteit van PC is 16,34% gedaald. Hieruit kunnen we afleiden dat PC, een stollingsremmer, gereduceerd wordt door de INTERCEPT-behandeling.

Statistisch wordt aangetoond dat er een sterk significant verschil is want $P < 0,001$.

10.7 PS

29 plasmazakken worden behandeld met de INTERCEPT-behandeling. Telkens wordt de PS bepaald vóór en na de behandeling. De statistische verwerking van de resultaten wordt weergegeven in tabel 13. Er wordt een gepaarde t-test uitgevoerd om na te gaan of er statistisch een significant verschil is.

Tabel 13: statistische verwerking PS

| PS (%) | Gemiddelde (%) | n | Standaarddeviatie (%) | P(T≤t) |
|---------------|-----------------------|----------|------------------------------|---------------|
| Vóór | 80 | 29 | 11 | 9,94E-12 |
| Na | 77 | 29 | 14 | |

10.7.1 interpretatie

De activiteit van PS is gedaald van 80% naar 77%. Statistisch wordt aangetoond dat er een sterk significant verschil is want $P < 0,001$.

11 PRAKTISCHE PUNTEN

Uit de gemiddelden wordt afgeleid dat FVIII nog in voldoende hoge concentratie aanwezig is om te kunnen geven aan de patiënt.

De grote standaarddeviaties zijn afkomstig doordat de eerste 11 monsters afgenomen werden in een citraatbuis waardoor er een verdunning ontstaat. Deze verdunning werd niet verrekend omdat de verhouding van belang is. De waarden worden getoond in tabel 14.

Tabel 14: resultaten stollingstesten met citraatverduunning

| Vóór | PT (%) | APTT (s) | AT (%) | FVIII (%) | PC (%) | PS (%) | fibrinogeen (mg%) |
|---------|--------|----------|--------|-----------|--------|--------|-------------------|
| F00000A | 65,9 | 33,2 | 84,32 | 102,41 | 100,09 | 69 | 153,39 |
| F00001A | 63,9 | 34,5 | 86,31 | 73,94 | 90,72 | 70 | 133,75 |
| F17179A | 74,1 | 29,9 | 85,55 | 96,75 | 88,78 | 72 | 225,35 |
| F17193A | 64,6 | 34,4 | 81,06 | 92,78 | 96,66 | 74 | 175,13 |
| F17231A | 66,1 | 34,6 | 91,16 | 60,11 | 86,08 | 65 | 160,50 |
| F17242A | 79,1 | 33,0 | 90,76 | 99,73 | 113,73 | 89 | 230,60 |
| F17244A | 72,4 | 36,4 | 76,40 | 63,21 | 92,63 | 79 | 193,09 |
| F17250A | 63,2 | 32,8 | 84,07 | 96,60 | 77,93 | 69 | 154,73 |
| F17267A | 66,4 | 32,7 | 91,50 | 85,87 | 101,95 | 89 | 142,32 |
| F17722A | 73,5 | 36,3 | 94,33 | 69,03 | 105,38 | 82 | 222,68 |
| F17736A | 63,6 | 38,7 | 93,30 | 48,71 | 109,96 | 71 | 208,86 |

| Na | PT (%) | APTT (s) | AT (%) | FVIII (%) | PC (%) | PS (%) | fibrinogeen (mg%) |
|---------|--------|----------|--------|-----------|--------|--------|-------------------|
| F00000B | 53,3 | 41,1 | 80,26 | 53,67 | 79,90 | 78 | 119,95 |
| F00001B | 53,9 | 43,2 | 77,32 | 39,26 | 74,34 | 69 | 113,84 |
| F17179B | 59,2 | 39,2 | 78,85 | 61,37 | 73,54 | 63 | 171,36 |
| F17193B | 51,5 | 41,9 | 76,59 | 57,60 | 77,93 | 65 | 138,82 |
| F17231B | 55,4 | 43,3 | 79,70 | 33,07 | 68,26 | 65 | 119,61 |
| F17242B | 66,2 | 39,1 | 81,65 | 60,04 | 95,97 | 75 | 199,71 |
| F17244B | 57,3 | 46,4 | 72,17 | 35,30 | 82,67 | 64 | 160,20 |
| F17250B | 46,1 | 44,2 | 82,06 | 47,93 | 63,23 | 64 | 105,07 |
| F17267B | 55,6 | 39,9 | 86,92 | 51,83 | 83,47 | 69 | 114,11 |
| F17722B | 58,9 | 45,9 | 84,94 | 35,55 | 85,69 | 65 | 156,33 |
| F17736B | 43,3 | 53,3 | 87,84 | 21,62 | 90,18 | 55 | 138,96 |

Negen plasmazakken zijn te lang op kamertemperatuur bewaard gebleven waardoor de stollingsfactoractiviteit gedaald is wat resulteert in een verhoogde standaarddeviatie. De resultaten zijn terug te vinden in tabel 15 en 16. Ook de tijd tussen collectie en invriezen van de plasma-eenheid heeft een invloed op de inhoud aan factor VIII. Hoe langer de plasma-eenheid bewaard wordt op kamertemperatuur, hoe groter het verlies aan factor VIII (en waarschijnlijk ook aan andere stollingsfactoren) zal zijn. Aangezien de tijd tussen collectie en invriezen niet werd gedocumenteerd, is het moeilijk om deze invloed volledig in kaart te brengen.

Tabel 15: testresultaten vóór behandeling

| Vóór | PT (%) | APTT (s) | AT (%) | FVIII (%) | PC (%) | PS (%) | fibrinogeen (mg%) |
|---------|--------|----------|--------|-----------|--------|--------|-------------------|
| F00000A | 65,9 | 33,2 | 84,32 | 102,41 | 100,09 | 69 | 153,39 |
| F00001A | 63,9 | 34,5 | 86,31 | 73,94 | 90,72 | 70 | 133,75 |
| F17179A | 74,1 | 29,9 | 85,55 | 96,75 | 88,78 | 72 | 225,35 |
| F17193A | 64,6 | 34,4 | 81,06 | 92,78 | 96,66 | 74 | 175,13 |
| F17231A | 66,1 | 34,6 | 91,16 | 60,11 | 86,08 | 65 | 160,50 |
| F17242A | 79,1 | 33,0 | 90,76 | 99,73 | 113,73 | 89 | 230,60 |
| F17244A | 72,4 | 36,4 | 76,40 | 63,21 | 92,63 | 79 | 193,09 |
| F17250A | 63,2 | 32,8 | 84,07 | 96,60 | 77,93 | 69 | 154,73 |
| F17267A | 66,4 | 32,7 | 91,50 | 85,87 | 101,95 | 89 | 142,32 |

Tabel 16: testresultaten na behandeling

| Na | PT (%) | APTT (s) | AT (%) | FVIII (%) | PC (%) | PS (%) | fibrinogeen (mg%) |
|---------|--------|----------|--------|-----------|--------|--------|-------------------|
| F00000B | 53,3 | 41,1 | 80,26 | 53,67 | 79,90 | 78 | 119,95 |
| F00001B | 53,9 | 43,2 | 77,32 | 39,26 | 74,34 | 69 | 113,84 |
| F17179B | 59,2 | 39,2 | 78,85 | 61,37 | 73,54 | 63 | 171,36 |
| F17193B | 51,5 | 41,9 | 76,59 | 57,60 | 77,93 | 65 | 138,82 |
| F17231B | 55,4 | 43,3 | 79,70 | 33,07 | 68,26 | 65 | 119,61 |
| F17242B | 66,2 | 39,1 | 81,65 | 60,04 | 95,97 | 75 | 199,71 |
| F17244B | 57,3 | 46,4 | 72,17 | 35,30 | 82,67 | 64 | 160,20 |
| F17250B | 46,1 | 44,2 | 82,06 | 47,93 | 63,23 | 64 | 105,07 |
| F17267B | 55,6 | 39,9 | 86,92 | 51,83 | 83,47 | 69 | 114,11 |

12 **ALGEMEEN BESLUIT**

Wettelijk gezien moet van de stollingsfactoren enkel factor VIII getest worden maar om een algemener beeld te krijgen van de kwaliteit van het behandelde plasma worden nog 6 andere parameters getest. Alle stollingstesten vóór en na behandeling zijn sterk significant wat wijst op een duidelijke invloed van de INTERCEPT-behandeling.

Het verlies aan stollingsfactoren is hoofdzakelijk te wijten aan de manipulatiestappen tijdens de behandeling en aan de bewaring op kamertemperatuur zowel na de collectie als tijdens de bewerking.

De gemiddelde residuele activiteit van FVIII voldoet aan het wettelijk criterium maar een aantal plasma-eenheden valt hier duidelijk buiten.

De relatief grote standaarddeviatie wijst op een te grote variatie in het proces. Om een volledig gecontroleerd proces te verkrijgen zou het gemiddelde procentueel verlies aan FVIII +3SD niet groter dan 50% mogen zijn.

Het proces is dus nog niet volledig onder controle. Om tot een gecontroleerd proces te komen, moet het plasma van collectie onmiddellijk worden ingevroren en moet ook de bewerkingstijd zo kort als mogelijk worden gehouden.

De resultaten van de andere wettelijk verplichte laboratoriumtesten voldeden aan de criteria (deze behoren niet tot het bestek van dit eindwerk).

Als besluit kan gesteld worden dat de INTERCEPTtechniek in routine kan gebruikt worden.

LIJST FIGUREN

- Figuur 1: vensterperiode
- Figuur 2: crosslinking van DNA en RNA door amotosalen
- Figuur 3: algemeen werkingsprincipe
- Figuur 4: UVA illumination device
- Figuur 11: behandelingsrapport
- Figuur 12: CAD
- Figuur 13: MDA II
- Figuur 14: optisch systeem
- Figuur 15: stalenrek
- Figuur 16: overzicht MDA

LIJST TABELLEN

- Tabel 1: reductie bij geteste virussen
- Tabel 2: reductie bij geteste bacteriën
- Tabel 3: reductie bij geteste parasieten
- Tabel 4: lipidenmembraan virus
- Tabel 5: niet-lipidenmembraan virus
- Tabel 6: volumeverlies
- Tabel 7: statistische verwerking PT
- Tabel 8: statistische verwerking APTT
- Tabel 9: statistische verwerking fibrinogeen
- Tabel 10: statistische verwerking FVIII
- Tabel 11: statistische verwerking AT
- Tabel 12: statistische verwerking PC
- Tabel 13: statistische verwerking PS
- Tabel 14: resultaten stollingstesten met citraatverduunning
- Tabel 15: testresultaten vóór behandeling
- Tabel 16: testresultaten na behandeling

LITERATUURLIJST

Wetenschappelijke bronnen

1. Koninklijk besluit van 4 april 1996 betreffende de afneming, de bereiding, de bewaring en de terhandstelling van bloed en bloedderivaten van menselijke oorsprong. Publicatie: 08-02-2005; nummer: 2005022092; bladzijde: 03949; Dossiernummer: 2005-02-01/31; Inwerkingtreding: 08-02-2005.
2. Williamson L.M., Cardigan R., Prowse C.V. Methylene blue-treated fresh-frozen plasma : what is its contribution to blood safety ? Transfusion 2003 ; 43 :1322-1329.
3. A.V. Hoffbrand, J.E. Pettit and P.A.H. Moss. Essential Haematology: Blackwell Science; 2004; p.349-261.
4. Osselaer JC, Debry C, Goffaux M, Pineau J, Calomme G, Dubuc E, Chatelain B, Vandendaele MC, Hsu J, Rheinschmidt M, Lin L. Coagulation function in fresh-frozen plasma prepared with two photochemical treatment methods: methylene blue and amotosalen; 2008 Jan;48(1):108-17. Epub 2007 Sep 27.

Elektronische publicaties

5. Stichting Sanquin Bloedvoorziening. (2008 maart 21) ; Beschikbaar : URL : <http://www.sanquin.nl>
6. Rode Kruis Vlaanderen, (2008 april 5) ; Beschikbaar : URL : <http://www.rodekruis.be>
7. INTERCEPT blood system by Cerus Corporation, A single pathogen inactivation system for both plasma and platelets, (2008 april 5) ; Beschikbaar : URL : <http://www.interceptbloodsystem.com/>
8. Bloedwijzer, (2007 december 15) URL : http://www.atriummc.nl/fileadmin/uploads_chemie/Sanquin_bloedwijzer_2.txt

Andere bronnen

9. Multi-Channel Discrete Analyzer Operator Manual van A.Z. Sint-Jan ; 2008 april 5.
10. Bepaling van PT, SOP A.Z. Sint-Jan door E. Steur, versie 3 ; 2005 maart 7.

11. Bepaling van APTT, SOP A.Z. Sint-Jan door E. Steur, versie 3 ; 2005 maart 7.
12. Bepaling van fibrinogeen, SOP A.Z. Sint-Jan door E. Steur, versie 2 ; 2004 februari 1.
13. Bepaling van AT, SOP A.Z. Sint-Jan door E. Steur, versie 2 ; 2005 maart 7.
14. Bepaling van FVIII, SOP A.Z. Sint-Jan door E. Steur, versie 1 ; 2002 februari 20.
15. Bepaling van PC, SOP A.Z. Sint-Jan door E. Steur, versie 2 ; 2006 oktober 2.
16. Bepaling van PS, SOP A.Z. Sint-Jan door E. Steur, versie 2 ; 2006 maart 1.

BIJLAGEN

Bijlage 1: volumeverlies

Bijlage 2: resultaten stollingstesten en statistische verwerking

Bijlage 1.1

| Gewicht collectiezak (g) | Gecollecteerd volume na staalname (ml) | Staalname-volume (ml) | Brutogewicht na intercept (g) | Netto-gewicht na intercept (g) | Volumeverlies |
|--------------------------|--|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------|
| 494,3 | 454,6 | 14,3 | 464,1 | 408,1 | 10,2% |
| 494,2 | 454,8 | 14,3 | 475,1 | 419,1 | 7,8% |
| 498,3 | 457,6 | 14,3 | 463,4 | 407,4 | 11,0% |
| 496,1 | 456,6 | 14,3 | 487,7 | 431,7 | 5,5% |
| 518,4 | 443,8 | 12 | 476,6 | 420,6 | 5,2% |
| 503,5 | 461,6 | 14,3 | 473,6 | 417,6 | 9,5% |
| 501,8 | 461,9 | 14,3 | 467,6 | 411,6 | 10,9% |
| 497,2 | 457,9 | 14,3 | 470,1 | 414,1 | 9,6% |
| 502,2 | 461,3 | 14,3 | 468,7 | 412,7 | 10,5% |
| 500,7 | 459,6 | 14,3 | 481 | 425 | 7,5% |
| 504,1 | 463 | 13 | 490,5 | 434,5 | 6,2% |
| 500,6 | 460,9 | 11,3 | 474,8 | 418,8 | 9,1% |
| 498,1 | 458,2 | 11,3 | 495,4 | 439,4 | 4,1% |
| 501,0 | 460,3 | 13 | 472,9 | 416,9 | 9,4% |
| 503,8 | 462,9 | 19,2 | 482,4 | 426,4 | 7,9% |
| 446,2 | 403,02 | 14,3 | 420,9 | 364,9 | 9,5% |
| 459,6 | 416,7 | 12 | 430,1 | 374,1 | 10,2% |
| 505,3 | 460,9 | 12 | 467,0 | 410,2 | 11,0% |
| 501,1 | 458,1 | 12 | 462,4 | 405,6 | 11,5% |
| 484,2 | 441,9 | 12 | 461,7 | 404,9 | 8,4% |
| 502,8 | 458,9 | 12 | 482,1 | 425,3 | 7,3% |
| 497,7 | 455,8 | 11,3 | 479,5 | 423,5 | 7,1% |
| 500,4 | 456,8 | 12 | 476,6 | 420,6 | 7,9% |
| 492,3 | 448,7 | 13 | Lek | | |
| 501,5 | 458,3 | 12 | 478,9 | 422,1 | 7,9% |
| 511,1 | 467,5 | 12 | 483,7 | 426,9 | 8,7% |
| 500,7 | 457,8 | 12 | 475,4 | 418,6 | 8,6% |

Bijlage 1.2

| Gewicht collectiezak (g) | Gecollecteerd volume na staalname (ml) | Staalname-volume (ml) | Brutogewicht na intercept (g) | Netto-gewicht na intercept (g) | Volumeverlies |
|--------------------------------|---|--------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------|
| 498 | 452,7 | 10,5 | 472,7 | 415,9 | 8,1% |
| 502,1 | 457,8 | 12 | 480,3 | 423,5 | 7,5% |

Bijlage 2.1

| Vóór | PT (%) | APTT (s) | AT (%) | FVIII (%) | PC (%) | PS (%) | fibrinogeen (mg%) |
|-------------|-------------------|---------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|
| F00000 | 65,9 | 33,2 | 84,32 | 102,41 | 100,09 | 69 | 153,39 |
| F00001 | 63,9 | 34,5 | 86,31 | 73,94 | 90,72 | 70 | 133,75 |
| F17179 | 74,1 | 29,9 | 85,55 | 96,75 | 88,78 | 72 | 225,35 |
| F17193 | 64,6 | 34,4 | 81,06 | 92,78 | 96,66 | 74 | 175,13 |
| F17199 | 83,2 | 29,2 | 91,80 | 104,71 | 125,09 | 80 | 214,08 |
| F17231 | 66,1 | 34,6 | 91,16 | 60,11 | 86,08 | 65 | 160,50 |
| F17242 | 79,1 | 33,0 | 90,76 | 99,73 | 113,73 | 89 | 230,60 |
| F17244 | 72,4 | 36,4 | 76,40 | 63,21 | 92,63 | 79 | 193,09 |
| F17250 | 63,2 | 32,8 | 84,07 | 96,60 | 77,93 | 69 | 154,73 |
| F17267 | 66,4 | 32,7 | 91,50 | 85,87 | 101,95 | 89 | 142,32 |
| F17290 | 92,1 | 33,0 | 107,44 | 125,62 | 113,68 | 70 | 310,07 |
| F17291 | 82,6 | 32,1 | 106,28 | 122,20 | 101,78 | 95 | 201,58 |
| F17297 | 66,5 | 33,6 | 96,78 | 93,46 | 80,58 | 82 | 147,44 |
| F17301 | 79,9 | 36,2 | 109,21 | 81,08 | 102,29 | 74 | 169,08 |
| F17722 | 73,5 | 36,3 | 94,33 | 69,03 | 105,38 | 82 | 222,68 |
| F17736 | 63,6 | 38,7 | 93,30 | 48,71 | 109,96 | 71 | 208,86 |
| F17754 | 89,3 | 32,8 | 112,75 | 93,20 | 120,29 | 102 | 263,45 |
| F17755 | 72,2 | 33,3 | 103,29 | 98,96 | 90,66 | 75 | 204,49 |
| F17762 | 77,3 | 28,1 | 119,65 | 105,56 | 103,39 | 71 | 226,94 |
| F17765 | 87,2 | 34,1 | 119,53 | 121,66 | 109,16 | 102 | 336,27 |
| F17769 | 76,4 | 32,9 | 92,50 | 124,70 | 102,05 | 83 | 254,31 |
| F17774 | 77,0 | 30,4 | 98,70 | 91,11 | 99,40 | 61 | 283,00 |
| F17780 | 90,6 | 29,1 | 106,99 | 130,99 | 107,18 | 88 | 440,00 |
| F17795 | 98,2 | 35,2 | 142,31 | 89,30 | 112,72 | 77 | 351,93 |
| F17796 | 108,4 | 26,9 | 115,31 | 161,50 | 150,00 | 92 | 414,36 |
| F17805 | 95,4 | 27,7 | 96,79 | 137,69 | 118,49 | 93 | 327,87 |
| F17819 | 98,2 | 30,7 | 105,61 | 124,35 | 120,59 | 92 | 485,36 |
| F17824 | 91,9 | 31,3 | 94,08 | 138,12 | 130,19 | 74 | 267,47 |
| F17828 | 106,4 | 27,6 | 96,63 | 120,83 | 96,12 | 79 | 224,00 |

Bijlage 2.2

| Na | PT (%) | APTT (s) | AT (%) | FVIII (%) | PC (%) | PS (%) | fibrinogeen (mg%) |
|-----------|---------------|-----------------|---------------|------------------|---------------|---------------|--------------------------|
| F00000 | 53,3 | 41,1 | 80,26 | 53,67 | 79,90 | 78 | 119,95 |
| F00001 | 53,9 | 43,2 | 77,32 | 39,26 | 74,34 | 69 | 113,84 |
| F17179 | 59,2 | 39,2 | 78,85 | 61,37 | 73,54 | 63 | 171,36 |
| F17193 | 51,5 | 41,9 | 76,59 | 57,60 | 77,93 | 65 | 138,82 |
| F17199 | 70,1 | 39,0 | 79,34 | 63,79 | 104,24 | 71 | 150,31 |
| F17231 | 55,4 | 43,3 | 79,70 | 33,07 | 68,26 | 65 | 119,61 |
| F17242 | 66,2 | 39,1 | 81,65 | 60,04 | 95,97 | 75 | 199,71 |
| F17244 | 57,3 | 46,4 | 72,17 | 35,30 | 82,67 | 64 | 160,20 |
| F17250 | 46,1 | 44,2 | 82,06 | 47,93 | 63,23 | 64 | 105,07 |
| F17267 | 55,6 | 39,9 | 86,92 | 51,83 | 83,47 | 69 | 114,11 |
| F17290 | 81,5 | 39,8 | 96,92 | 78,35 | 100,69 | 80 | 252,43 |
| F17291 | 71,5 | 39,7 | 97,68 | 90,09 | 85,61 | 118 | 148,27 |
| F17297 | 61,4 | 36,3 | 93,12 | 80,00 | 65,84 | 81 | 129,17 |
| F17301 | 68,9 | 42,4 | 99,13 | 54,81 | 88,92 | 93 | 165,23 |
| F17722 | 58,9 | 45,9 | 84,94 | 35,55 | 85,69 | 65 | 156,33 |
| F17736 | 43,3 | 53,3 | 87,84 | 21,62 | 90,18 | 55 | 138,96 |
| F17754 | 81,6 | 38,1 | 107,25 | 65,96 | 103,94 | 93 | 212,50 |
| F17755 | 63,1 | 41,3 | 95,04 | 65,25 | 79,97 | 69 | 164,68 |
| F17762 | 8,3 | 35,4 | 111,13 | 73,74 | 88,55 | 79 | 157,41 |
| F17765 | 73,8 | 42,5 | 110,52 | 100,02 | 92,01 | 87 | 263,37 |
| F17769 | 68,9 | 39,7 | 91,83 | 104,32 | 88,84 | 64 | 245,51 |
| F17774 | 67,2 | 35,6 | 83,42 | 68,64 | 83,86 | 73 | 204,81 |
| F17780 | 80,2 | 35,0 | 105,12 | 96,52 | 89,26 | 80 | 324,03 |
| F17795 | 84,2 | 40,0 | 116,28 | 60,41 | 95,80 | 76 | 265,44 |
| F17796 | 95,7 | 31,6 | 109,89 | 111,72 | 137,04 | 88 | 337,95 |
| F17805 | 82,1 | 33,1 | 86,13 | 106,46 | 101,11 | 105 | 267,16 |
| F17819 | 75,1 | 38,3 | 96,1 | 91,36 | 102,59 | 88 | 391,17 |
| F17824 | 74,2 | 37,8 | 85,66 | 79,65 | 109,46 | 82 | 200,29 |
| F17828 | 86,3 | 33,2 | 86,69 | 75,01 | 80,92 | 66 | 164,56 |

Bijlage 2.3: gepaarde t-toets

| | <i>PT vóór (%)</i> | <i>PT na(%)</i> |
|---|--------------------|-----------------|
| Gemiddelde | 80,1931 | 65,33793 |
| Variantie | 178,2257 | 286,2282 |
| Waarnemingen | 29 | 29 |
| Pearson-correlatie | 0,753176 | |
| Schatting van verschil tussen gemiddelden | 0 | |
| Vrijheidsgraden | 28 | |
| T- statistische gegevens | 7,177409 | |
| P(T<=t) eenzijdig | 4,11E-08 | |
| Kritiek gebied van T-toets: eenzijdig | 1,70113 | |
| P(T<=t) tweezijdig | 8,22E-08 | |
| Kritiek gebied van T-toets: tweezijdig | 2,048409 | |
| Standaarddeviatie | 13,35012 | 16,91828 |

| | <i>APTT vóór (s)</i> | <i>APTT na (s)</i> |
|---|----------------------|--------------------|
| Gemiddelde | 32,43793 | 39,87241 |
| Variantie | 8,678153 | 20,25421 |
| Waarnemingen | 29 | 29 |
| Pearson-correlatie | 0,884467 | |
| Schatting van verschil tussen gemiddelden | 0 | |
| Vrijheidsgraden | 28 | |
| T- statistische gegevens | -17,1022 | |
| P(T<=t) eenzijdig | 1,18E-16 | |
| Kritiek gebied van T-toets: eenzijdig | 1,70113 | |
| P(T<=t) tweezijdig | 2,35E-16 | |
| Kritiek gebied van T-toets: tweezijdig | 2,048409 | |
| standaarddeviatie | 2,95 | 4,5 |

Bijlage 2.4: gepaarde t-toest

| | <i>FVIII vóór (%)</i> | <i>FVIII na (%)</i> |
|---|-----------------------|---------------------|
| Gemiddelde | 101,8683 | 67,70138 |
| Variantie | 677,0883 | 561,2307 |
| Waarnemingen | 29 | 29 |
| Pearson-correlatie | 0,921707 | |
| Schatting van verschil tussen gemiddelden | 0 | |
| Vrijheidsgraden | 28 | |
| T- statistische gegevens | 18,2219 | |
| P(T<=t) eenzijdig | 2,3E-17 | |
| Kritiek gebied van T-toets: eenzijdig | 1,70113 | |
| P(T<=t) tweezijdig | 4,59E-17 | |
| Kritiek gebied van T-toets: tweezijdig | 2,048409 | |
| Standaarddeviatie | 26,02 | 23,69 |

| | <i>AT vóór (%)</i> | <i>AT na (%)</i> |
|---|--------------------|------------------|
| Gemiddelde | 99,11759 | 91,01897 |
| Variantie | 197,1224 | 145,4931 |
| Waarnemingen | 29 | 29 |
| Pearson-correlatie | 0,94191 | |
| Schatting van verschil tussen gemiddelden | 0 | |
| Vrijheidsgraden | 28 | |
| T- statistische gegevens | 8,979826 | |
| P(T<=t) eenzijdig | 4,9E-10 | |
| Kritiek gebied van T-toets: eenzijdig | 1,70113 | |
| P(T<=t) tweezijdig | 9,79E-10 | |
| Kritiek gebied van T-toets: tweezijdig | 2,048409 | |
| standaarddeviatie | 14,04 | 12,06 |

Bijlage 2.5: gepaarde t-test

| | <i>PC vóór (%)</i> | <i>PC na (%)</i> |
|---|--------------------|------------------|
| Gemiddelde | 105,0886 | 88,75276 |
| Variantie | 240,5222 | 225,3559 |
| Waarnemingen | 29 | 29 |
| Pearson-correlatie | 0,983358 | |
| Schatting van verschil tussen gemiddelden | 0 | |
| Vrijheidsgraden | 28 | |
| T- statistische gegevens | 31,11045 | |
| P(T<=t) eenzijdig | 1,46E-23 | |
| Kritiek gebied van T-toets: eenzijdig | 5000000 | |
| P(T<=t) tweezijdig | 2,92E-23 | |
| Kritiek gebied van T-toets: tweezijdig | 5000000 | |
| Standaarddeviatie | 15,51 | 15,01 |

| | <i>Fib vóór (mg%)</i> | <i>Fib na (mg%)</i> |
|---|-----------------------|---------------------|
| Gemiddelde | 245,5897 | 192,4914 |
| Variantie | 8386,395 | 5403,011 |
| Waarnemingen | 29 | 29 |
| Pearson-correlatie | 0,974613 | |
| Schatting van verschil tussen gemiddelden | 0 | |
| Vrijheidsgraden | 28 | |
| T- statistische gegevens | 11,06027 | |
| P(T<=t) eenzijdig | 4,97E-12 | |
| Kritiek gebied van T-toets: eenzijdig | 5000000 | |
| P(T<=t) tweezijdig | 9,94E-12 | |
| Kritiek gebied van T-toets: tweezijdig | 5000000 | |
| Standaarddeviatie | 91,6 | 73,5 |

Bijlage 2.6: gepaarde t-test

| | <i>PS vóór (%)</i> | <i>PS na (%)</i> |
|---|--------------------|------------------|
| Gemiddelde | 79,96552 | 76,72414 |
| Variantie | 117,5345 | 191,7783 |
| Waarnemingen | 29 | 29 |
| Pearson-correlatie | 0,57965 | |
| Schatting van verschil tussen gemiddelden | 0 | |
| Vrijheidsgraden | 28 | |
| T- statistische gegevens | 1,500868 | |
| P(T<=t) eenzijdig | 0,072292 | |
| Kritiek gebied van T-toets: eenzijdig | 5000000 | |
| P(T<=t) tweezijdig | 0,144583 | |
| Kritiek gebied van T-toets: tweezijdig | 5000000 | |
| Standaarddeviatie | 10,8 | 13,8 |