

«Vekst av *Escherichia coli* i fullblod med og utan leukocytter ved ulike lagringsvilkår»

Hanne Braathen

Masteroppgåve

Masterprogram i helsevitskap, studieretning radiograf/bioingeniør

Institutt for global helse og samfunnsmedisin

Universitetet i Bergen



Haust 2020

Forord

Ved avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin, der eg til dagleg jobbar som forskar, har me eit forskingssamarbeid med det norske og amerikanske forsvaret der målet er å skaffa blod trygt til pasientar utanfor sjukehus. Blant anna har me diskutert kva som skjer med fullblod som blir oppbevart utanfor godkjende lagringsvilkår, og mi oppgåve blei å sjå korleis bakteriar veks i fullblod med og utan leukocytter ved ulike temperaturar. For å sikra optimale testforhold, blei mikrobiolog Christopher Lindemann kontakta. Han kom med uvurderleg hjelp, både til val av bakteriestamme, utføring av pilot og gjennomføring av sjøve studien. Til å gjennomføra studien trong eg tilgang til eit bakterielaboratorium, noko Kjerstin Jakobsen og Helene Heitman Sandnes ved klinisk institutt 2 hos Universitetet i Bergen la til rette for. Seksjon for blodgiving ved AIT kalla inn og tappa blodgivarar i studien. Dei sørnga for at blodgivarane var på plass og at fullblodsposane var ferdig tappa i tide til inokulasjon av bakteriar på dei oppsette dagane i studien. Stor takk!

Ein ekstra stor takk til dei engasjerte veiledarane mine, Torunn Oveland Apelseth og Tor Hervig. Det er alltid trygt å ha dykk i ryggen!

Denne studien hadde ikkje vore mogleg å utføra utan midlar til laboratorieutstyr frå AIT og NITO/BFI sitt studiefond.

Innholdsliste

Forkortingar.....	
Forklaring av omgrep	
Oversikt tabellar, figurar, formlar og bilete	
Oversikt vedlegg.....	
Samandrag.....	
Abstract	
Innleiing.....	1
Historisk utvikling av blodbankar og blodkomponentar	1
Leukocyttreduksjon av fullblod og blodkomponentar.....	2
Forsking på og bruk av fullblod ved Haukeland universitetssjukehus.....	2
Vandrande blodbankar.....	3
Risiko ved blodtapping i vandrande blodbankar.....	4
Tapping av fullblod i vandrande blodbank.....	4
Risiko ved transfusjonar i vandrande blodbankar	5
Lagring av fullblod tappa i vandrande blodbank.....	5
Transfusjonsoverført sepsis	6
Bakterievekst i fullblod.....	6
Tidlegare forsking på området	7
Litteratursøk.....	7
Studiar av bakteriell kontaminasjon av fullblod	8
Studiar av kvalitet av fullblod under lagring	15
Hensikt med studien	17
Problemstillingar	17
Resultat.....	19
Pilot for å finna bakteriekonsentrasjon før inokulasjon	19
Positive kontrollar	20
Resultat av kvalitet- og funksjonsanalysar ikkje inkludert i artikkelen	21
Effekt av filtrering.....	22
Effekt av lagring.....	23
Diskusjon	27
Effekt av filtrering.....	27
Effekt av lagring.....	27

Metodekritisk del	29
Avvikslogg	32
Vidare studiar	34
Konklusjon	34
Praktisk bruk av funn i studien	34
Litteraturliste	35
Artikkel	

Forkortingar

ACD	Syre-citrat-dekstrose (Acid-Citrate-Dextrose)
AIT	Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin, HUS
ATCC	American Type Culture Collection
Base excess	Blodgassanalyse: Skilnad mellom bufferbase målt og normalverdi
CPD	Citrat-fosfat-dekstrose (Citrate-Phosphate-Dextrose)
CPDA-1	Citrat-fosfat-dekstrose-adenin (Citrate-Phosphate-Dextrose-Adenine)
CFU/ml	Koloniformande einingar per milliliter
CMV	Cytomegalovirus
DPIA	Vurdering av personvernkonsekvensar (Data Protection Impact Assessment)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EVF	Hematologianalyse: Erytrocytt volum fraksjon
g	Relativ sentrifugeringskraft
GMP	God produksjonspraksis (Good Manufacturing Practice)
H ₀	Nullhypotese
H _a	Alternativ hypotese
Hb	Hematologianalyse: Hemoglobin
HTLV	Humant T-cellelymfotroft virus
HUS	Haukeland universitetssjukehus
IA	Ikkje angitt
ISBT	International Society of Blood Transfusion
K	Tromboelastografianalyse: Tida frå R til mål på koagelstyrken passerer 20 mm
kPa	Kilo Pascal
LPK	Hematologianalyse: Leukocytt partikkel konsentrasjon
LB	Luria Bertoni
MA	Tromboelastografianalyse: Maksimal koagelstyrke (Maximal Amplitude)
MBF	Avdeling for medisinsk biokjemi og farmakologi, HUS
MIA	Mikrobiologisk avdeling, HUS

mmol/l	millimol per liter
OD	Optisk tettleik (Optical Density)
pCO ₂	Blodgassanalyse: Gasstrykk av karbondioksid
pO ₂	Blodgassanalyse: Gasstrykk av oksygen
PRC	Pakka raude celler (Packed Red Cells)
PubMed	Medisinsk litteratur-database
R	Tromboelastografianalyse: Tid til koagel fører til splitting av kurva
RT	Romtemperatur
TA-GvHD	Transfusjonsassosiert transplantat-mot-vert-sjukdom (Graft-versus-Host-Disease)
TLR4	Toll-liknande reseptor 4
TPK	Hematologianalyse: Trombocytt partikkel konsentrasjon
Vinkel α	Tromboelastografianalyse: Hastigheita til koagelformasjonen
WHO	Verdens helseorganisasjon (World Health Organization)
UM	Utanfor måleområdet

Forklaring av omgrep

Aferese	Blodkomponent tappa frå blodgivar via eit instrument som sentrifugerer fullblod og separerer til ulike komponentar som plasma, platekonsentrat og PRC. Delane av fullblodet som ikkje brukast blir pumpa tilbake til blodgivaren.
Avvik	Tilfelle der prosedyrar ikkje har blitt fulgt, anten fordi det ikkje er utført, er utført feil eller andre, uforutsette hendingar har oppstått. Avvik kan føra til feil resultat, og må vurderast i kvart enkelt tilfelle.
Blodagar-skål	Agar-basert vekstmedium for bakteriar med 5 % saueblod. Brukt som vekstmedium for <i>E. coli</i> på MIA.
Blodgassanalyse	Analyse som gir blodgass-(pH, pCO ₂ og pO ₂), syre/base- (Base Excess), elektrolytt- (kalium) og metabolittstatus (glukose og laktat). Analysar oppgitt i parentes blei brukt i studien.
Blodkomponent	Fullblod sentrifugert og produsert til nye komponentar som i Noreg består av erytrocyttar (PRC), blodplater (platekonsentrat) eller plasma.
Blodtyping	Analyse for å bestemma ABO- og Rh(D)-type.
Fagocytose	Når ein leukocyt fangar opp ein bakterie og transporterer han til celleinnsida.
Fullblod	Blod tappa og lagra i tilsetjingsløysing utan vidare behandling.
Hematologianalyse	Analyse som består i å telja celler i fullblod ved hjelp av eit flowcytometer, og måla andelen celler per liter fullblod.
Inokulum	Eit materiale som blir tilsett eit anna i det omsyn å få det til å vekse. I vårt tilfelle var inokulatet 1 ml prøvemateriale med 15.000 einingar <i>E. coli</i> .
Inokulasjon	Innføring av mikrobar til eit medium for å studera vekst og utvikling av mikroben.
Koloni	På blodagar-skål vil kvar enkelt bakterie veksa og dela seg. I løpet av 18-24 timar vil dette bli synleg oppå agaren som gulkvite klumpar

(koloniar) med ulik storleik alt etter kor mykje næring kvar bakterie har hatt tilgang på. Få bakteriar per skål gir store koloniar medan fleire bakteriar per skål gir koloniar med mindre storleik.

Kvantifisering	Å telja <i>E. coli</i> -vekst frå eit fastsett prøvevolum og derifrå rekna ut konsentrasjonen av <i>E. coli</i> per milliliter fullblod.
Leukocyttreduksjon	Fjerning av leukocytter frå blod via filtrering gjennom filter.
Platekonsentrat	Blodkomponent som inneheld konsentrerte blodplater frå ein til åtte blodgivarar i plasma og tilsetjingsvæske. I USA er det vanleg at eit platekonsentrat består av blodplater i plasma, medan AIT brukar 37-43 % plasma i ulike typar platekonsentrat og T-PAS+ som tilsetjingsvæske.
PRC	Konsentrat av erythrocyttar i tilsetjingsvæske. Frå 450 ml fullblod blir erythrocyttane fortynna i 100 ml tilsetjingsvæske som gir næring til cella, slik at komponenten kan kjølelagrast i 35 eller 42 dagar.
Sepsis	Bakteriell infeksjon i blodbanen som har ført til alvorleg betenning i blodet og fleire organ.
Studiearm	Studien var delt i to armar, der testarmen blei utsett for intervensjon; leukocyttreduksjon gjennom eit platesparande filter og kontrollarmen ikkje blei utsett for intervensjon og lagra som rutinen er for dette blodproduktet; leukocytthaldig.
Studiegruppe	Studien var delt inn i tre lagringsgrupper og begge studiearmane var med i dei tre gruppene; lagring ved 4, 22 og 35 °C.
TLR4	Sensor på cellemembranen til leukocytter og blodplater som kjenner igjen gram negative bakteriar.
Transfusjon	Infusjon av fullblod eller blodkomponent til ein pasient gjennom eit infusjonssett.
Transfusjonsreaksjon	Ei uønskt hending assosiert med transfusjon av fullblod eller blodkomponentar, anten under eller etter transfusjonen, som kan vera immunologisk eller ikkje-immunologisk.

Traume	Skade på kroppen frå ytre påverknadar.
Tromboelastografi	Ein analyse som detekterer viskoelastisitet i fullblod ved koagulering og gir eit bilete på koagulasjonsprosessen og innverknaden frå plasmaprotein, fibrin og blodplater.
Vandrande blodbank	Ein operasjon der ein kan tappa fersk, varmt fullblod for å transfundera til ein skadd pasient.
Viruscreening	Analysering av ulike virusantistoff og -antigen for å vurdera om transfusjon av blod frå blodgivar er trygt å gi til pasientar.

Oversikt tabellar, figurar, formlar og bilete

Tabell I	Konsentrasjon av <i>E. coli</i> -inokulat i tidlegare studiar	Side 12
Tabell II	Framstilling av inokulat i tidlegare studiar	Side 13
Tabell III	Framgangsmåte bakterietelling tidlegare studiar	Side 14
Tabell IV	Konsentrasjon av bakterievekst tidlegare studiar	Side 14
Tabell V	Resultat pilot	Side 19
Tabell VI	Resultat positive kontrollar og estimert konsentrasjon <i>E. coli</i>	Side 21
Tabell VII	Hematologiresultat dag 0	Side 22
Tabell VIII	Blodgassresultat dag 0	Side 23
Tabell IX	Hematologiresultat i løpet av lagring	Side 24
Tabell X	Blodgassresultat i løpet av lagring	Side 25
Tabell XI	Tromboelastografiresultat	Side 26
Figur 1	Skjematisk oversikt over studien	Side 18
Figur 2	TEG-kurver i løpet av lagringstida i to posar	Side 23
Formel 1	Utrekning av prosent hemolyse	Side 20
Formel 2	Utrekning av bakteriekonsentrasjon	Side 23
Bilete 1	Blodagar-skåler med for mange koloniar til teljing	Side 19
Bilete 2	Blodagar-skåler med passeleg mengd koloniar til teljing	Side 20
Bilete 3	Fortynningsrekker ved utsæd av prøvemateriale	Side 21
Bilete 4	Pose med synlege bakteriekoloniar og koagel	Side 31
Bilete 5	Ureining av ukjent koloni på to blodagar-skåler	Side 32

Oversikt vedlegg

- Vedlegg 1 Personvernkonsekvensvurdering
- Vedlegg 2 Signert prosjektavtale MBF, AIT og MIA
- Vedlegg 3 Informasjonsskriv med samtykkeerklæring
- Vedlegg 4 Studieprosedyre tapping
- Vedlegg 5 Studieprosedyre laboratoriearbeid
- Vedlegg 6 Arbeidsark tapping og laboratoriearbeid
- Vedlegg 7 Arbeidsark bakterievekst
- Vedlegg 8 Avviksskjema
- Vedlegg 9 Utfylt avvikslogg
- Vedlegg 10 Lotnummer
- Vedlegg 11 Rådata hematologi, blodgass og tromboelastografi
- Vedlegg 12 Rådata bakterieteljing
- Vedlegg 13 Retningslinjer for forfattarar «Transfusion»

Samandrag

BAKGRUNN

Tapping av leukocytthaldig citrat-fosfat-dekstrose-adenin (CPDA-1) fullblod blir utført i sivile og militære blodbankar, i tappesalar og i felt. Blod tappa i felt kan ha auka risiko for bakteriell kontaminasjon fordi vanlege hygieniske tiltak ikkje kan gjennomførast fullt ut.

HENSIKT OG PROBLEMSTILLINGAR

Målet med studien var å undersøkje om leukocyttreduksjon og lagringstemperatur påverkar vekst av *Escherichia coli* (*E.coli*, ATCC® 25922™) i CPDA-1-fullblod.

MATERIALE OG METODE

450 ml CPDA-1-fullblod frå ti blodgivarar med blodtype 0 blei inokulert med *E. coli*. Testposar (n=5) blei leukocytteredusert med eit platesparande filter to timar etter inokulasjon.

Kontrollposar (n=5) blei ikkje filtrert. Tre timar etter tapping blei fullblod fordelt i tre posar lagra ved 2-6 °C, 20-24 °C eller 33-37 °C. Vekst av *E. coli* blei kvantifisert umiddelbart, to og tre timar etter inokulasjon, dag 1, 3, 7 og 14 for alle lagringstemperaturane og dag 21 og 35 for posar lagra ved 2-6 °C. Resultat er oppgitt som gjennomsnitt (min- og maks-verdi).

RESULTAT

Fullblod blei inokulert med 20,26 (12,0-32,0) koloniformande einingar per ml (CFU/ml) *E. coli*. Etter leukocyttreduksjon gjennom filteret var konsentrasjonen av *E. coli* 9,32 CFU/ml (0,0-33,3) i testarmen. I kontrollarmen fagocytterte leukocytane *E. coli* innan 24 timar i ni av ti posar lagra ved 20-24 °C og 33-37 °C. Det føregjekk ei sakte autosterilisering i posane lagra ved 2-6 °C i begge armene. Vekst av *E. coli* førte til koagulering av fullblod i begge studiearmene.

KONKLUSJON

Resultata våre indikerer at leukocytar ikkje klarer å fagocytera *E. coli* innan to timar etter tapping, men at leukocyttreduksjon etter 24 timars kvile ved 20-24 °C før kaldlagring meir effektivt hindrar oppvekst av *E. coli*. Synlege koagel i fullblod kan skuldast kontaminering av *E. coli*.

NØKKEWORD

E. coli, kontaminering, CPDA-1-fullblod, lagring, leukocyttreduksjon, filtrering, fagocytose, vandrane blodbank

Abstract

BACKGROUND

Collection of non-leukoreduced citrate-phosphate-dextrose-adenine (CPDA-1) whole blood is performed in civilian and military blood banks, both in donation facilities and far forward.

Due to environmental conditions, blood collected under field conditions may have increased risk of bacterial contamination.

AIMS AND OBJECTIVES

The aim of this study was to examine the effects of leukocyte reduction and storage temperature on growth of *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) in CPDA-1 whole blood.

METHODS AND MATERIAL

450 mL CPDA-1 whole blood from ten group O donors was inoculated with *E. coli*. Test units (n=5) were leukoreduced with a platelet-sparing filter two hours after inoculation. Control units (n=5) remained unfiltered. Three hours after donation, the units were split into three bags and stored at 2-6°C, 20-24°C or 33-37°C. Bacterial growth was quantified immediately, two and three hours after inoculation, on days 1, 3, 7 and 14 for all storage temperatures, and additionally on days 21 and 35 for storage at 2-6°C. Results are given as mean values (range).

RESULTS

Whole blood was inoculated with mean 20.26 (range 12.0-32.0) colony-forming units per mL (CFU/mL) *E. coli*. After leukoreduction mean 9.32 CFU/mL (range 0.0-33.3) *E. coli* remained in the test arm. Leukocytes in the control arm did phagocyte *E. coli* within 24 hours at 20-24°C and 33-37°C in nine of ten bags. A slow self-sterilization occurred during storage in both arms at 2-6°C. Growth of *E. coli* led to clot formation in both study arms.

CONCLUSIONS

Our findings indicate that leukocytes are not able to phagocyte *E. coli* within two hours after donation. However, the rest at 20-24°C for 24 hours before cold storage more efficiently prevents growth of *E. coli*. Visible clots in whole blood may indicate contamination by *E. coli*.

KEY WORDS

E. coli, contamination, CPDA-1 whole blood, storage, leukoreduction, filtration, phagocytosis, walking blood bank

Innleiing

Historisk utvikling av blodbankar og blodkomponentar

Bløding er den viktigaste årsaka til død i traumesituasjonar. Dette gjeld både sivilt og militært.^{1,2} Tidlig balansert transfusjon blir anbefalt i nasjonale og internasjonale retningslinjer for behandling av pasientar med livstruande bløding.³⁻⁵ Dersom blod er tilgjengeleg, eller mogleg å tappa nær skadestad, vil færre skadde soldatar eller sivile vil døy av bløding.⁶

Allereie under første verdskrig (1916) blei den første blodbanken oppretta ved fronten av britiske styrkar, medan den første sivile blodbanken blei etablert i London i 1921. Fullblod blei tappa i glasflasker med citrat og glukose som tilsetjingsvæske, noko som førte til at fullblodet kunne lagrast i fleire dagar før det blei transfundert til skadde soldatar. Fleire sivile blodbankar blei oppretta utover 1930-talet. I Noreg kom den første blodgivarsentralen i 1933.⁷ I ein radioreportasje frå NRK i april 1940 blir det opplyst at blod tappa på flasker kan lagrast inntil 14 dagar.⁸ Først på 1960-talet kom tappeposar i plast på marknaden, noko som gjorde det mogleg å dela blodet opp i ulike komponentar som erytrocyttkonsentrat, trombocyttkonsentrat, kryopresipitat og plasma. Posar av plast til komponentframstilling blei tatt i bruk i Noreg i 1969.⁹ Etter kvart tok transfusjon av blodkomponentane over for fullblod, sidan blod frå same blodgivar då kunne brukast til å behandla fleire pasientar. Fullblod, no lagra i plastposar, blei likevel brukt til pasientar som blødde så lenge som til slutten av 1980-talet i Bergen. I tillegg blir fullblod brukt til barn under to år ved hjarteoperasjonar. Fram til 2003 gjaldt dette på Haukeland og Rikshospitalet, men sidan 2003 har desse operasjonane berre blitt utført på Rikshospitalet.

Blodbasert skadebehandling har vore viktig i krigar og krigsoperasjonar, særleg andre verdskrig, Koreakrigen og Vietnamkrigen.¹⁰ Etter Vietnamkrigen blei militær transfusjonsteneste nedprioritert og fullblod erstatta med klare væsker.¹¹ I Noreg fantes det tidlegare militært personell som var utdanna innan transfusjon, men denne utdanninga forsvann gradvis. Rundt 2010 sette Forsvaret igjen fokus på blodtransfusjon til skadde soldatar.¹²

Leukocyttreduksjon av fullblod og blodkomponentar

Det kom ei oppmoding om 100 % leukocyttreduksjon ved filtrering av cellulære blodkomponentar frå Statens helsetilsyn i 2000.¹³ Årsakene til at leukocyttreduksjon blei innført som rutine på alle cellulære blodkomponentar var å redusera risiko for transfusjonsreaksjonar, immunisering mot vevstypenantigen, postoperative bakterielle infeksjonar og for å hindra overføring av CMV og HTLV. Leukocyttreduksjon blir utført på fullblod og blodkomponentar ved bruk av eit filter som fangar opp leukocyttane. Det er eit krav at leukocyttr reduserte produkt inneheld $<1 \times 10^6$ leukocyttrar per blodpose. Det er og mogleg å produsera leukocyttr reduserte platekonsentrat frå aferese der leukocyttane er sentrifugert vekk under afereseprosedyren. Med leukocyttreduksjon blir mengda framandt genmateriale minimalisert og pasientar får preparat som dekker medisinsk behov utan ureining av ikkje-ønskelege leukocyttrar.^{13,14} Av transfusjonsreaksjonar er det særleg ikkje-hemolytiske febrile reaksjonar og dei sjeldne immunmodulerande transfusjonsreaksjonane som TA-GVHD me tenker på. Ikkje-hemolytiske febrile reaksjonar er blant dei vanlegaste og samstundes minst farlege transfusjonsreaksjonane, og ein ser desse sjølv med leukocyttr reduserte blodkomponentar.¹⁵ Overføring av CMV kan også hindrast ved å analysera blodprøvar og velja vekk blodgivarar positive for CMV, sjølv om dette kan vera ein usikker strategi, då det vil gå ut over mengd blodgivarar tilgjengeleg.¹⁶ HTLV kan i tillegg hindrast ved å ekskludera blodgivarar som har vakse opp i risikoområde.

Forsking på og bruk av fullblod ved Haukeland universitetssjukehus

I samarbeid med Forsvaret har AIT ved Haukeland universitetssjukehus sidan 2012 forska på funksjonen til fullblod tappa i blodposar med CPD som tilsetjingsvæske og integrert leukocyttr reduserande og platesparande filter (Imuflex WB-SP, Terumo BCT) med haldbarheit på 21 dagar og CPDA-1 som tilsetjingsvæske utan filter (PB-1CD456M5S, Terumo BCT) med haldbarheit på 35 dagar.¹⁷⁻¹⁹ Av kommersielle tappesett for fullblod er det berre Imuflex WB-SP med CPD som tilsetjingsvæske som har integrert platesparande filter. Me har tidlegare gjort ein studie ved AIT der ein sterilkopla Imuflex WB-SP-filter til CPDA-1-posar.¹⁹ Resultata av funksjons- og kvalitetsparameter er samanliknbare med resultata for CPD-fullblod,¹⁷ og viser at kvaliteten av CPDA-1-fullblod ikkje blir påverka negativt når det blir. Me meiner at det er trong for kommersielt tilgjengelege blodposesett som inkluderer platesparande filter på CPDA-1-posesett, for å ha moglegheita for leukocyttreduksjon tilgjengeleg for CPDA-1-

fullblod med lang haldbarheit. I 2015 godkjende Helsedirektoratet prehospital bruk av leukocyttr redusert fullblod til blødande pasientar i Helse Bergen. Sidan det har AIT kvar veke levert to posar leukocyttr redusert fullblod til luftambulansbasen i Bergen.¹⁸ I 2017 blei det i tillegg godkjend og tatt i bruk til blødande pasientar ved Haukeland universitetssjukehus. Leukocyttr redusert fullblod har jamleg blitt sendt til norske militære styrkar på oppdrag i utlandet og til militære legehelikopter i Nord-Noreg. Universell leukocyttr reduksjon av cellulære blodkomponentar er pålagt av myndigheitene ved bruk i Noreg, men i 2017 valde Forsvaret å bruka leukocytthaldig CPDA-1-fullblod frå norske blodbankar på oppdrag utanfor Noreg i dei situasjonane kor ein av logistikkomsyn ønska lengst mogeleg haldbarheit på blodet. Vidare kan CPDA-1-fullblod bli nytta i naudsituasjonar der tida er særskild knapp når blod blir tappa utanfor sjukehus. Dette fordi det ikkje er mogleg å filtrera blod i ein situasjon der arbeidsforholda er utrygge og vanskelege, samstundes som tidleg transfusjon skal prioriterast. Forsvaret arrangerer kurs i etablering av vandrane blodbank før oppdrag i utlandet, og der blir det nytta CPDA-1-blod. I ein vandrane blodbank blir CPDA-1-fullblod tappa til bruk i naudsituasjon, gjerne på staden for hendinga.²⁰

Vandrane blodbankar

AIT har etablert fleire militære og sivile vandrane blodbankar. Ein vandrane blodbank blir oppretta i ein avgrensa periode med på førehand godkjende blodgivarar. Personell har blitt kursa i intervju, tapping, blodtying og transfusjon av leukocytthaldig fullblod. Dei vandrane blodbankane kan bli oppretta når Forsvaret har oppdrag i utlandet, med avgrensa tilgang på eller moglegheit for å oppbevare godkjende blodkomponentar. Eit anna døme er boreriggjar som har oppdrag i Barentshavet med minimum fem timar evakueringstid til næraste sjukehus. Då er det aktuelt å klargjera personell som blodgivarar før avreise, der vanlege rutinar for utveljing, blodtying og viruscreening blir utført. Ei liste med godkjende blodgivarar blir levert den vandrane blodbanken frå AIT. Desse vandrane blodbankane har CPDA-1-tappeposar i beredskap dersom nokon av dei førehandsgodkjende blodgivarane må bli tappa. Fullblodet er då tenkt transfundert dersom det ikkje er tilgjengeleg lagra fullblod eller blodkomponentar frå ein godkjend blodbank. Transfusjonen føregår umiddelbart etter tapping til ein blødande pasient, for å best mogleg oppretthalda oksygenleveranse og blodvolum medan pasienten blir evakuert til sjukehus.²¹

Risiko ved blodtapping i vandrane blodbankar

Blod blir vanlegvis tappa på blodbankar eller tappestasjonar med strenge krav til hygiene, gode lokale, godt opplærde personell og GMP-godkjende tappeprosedyrar. Blodprøvar blir tatt i ein eigen liten prøvepose på starten av tappinga, noko som set ned risikoen for bakteriekontaminasjon frå hudbakteriar i blodposen.²² Når tappinga må skje i lokale som ikkje er klargjort, eller eigna, for tapping vil det vera auka risiko for bakteriekontaminasjon i blodposen fordi dei tiltak som normalt skal beskytta mot bakteriell kontaminasjon ikkje kan gjennomførast fullt ut. Det kan skuldast manglande tilgjengeleg handsprit, dårlege hygieneforhold, ein kaotisk situasjon med manglande straum og krigshandlingar i nærleiken. I tillegg vil det vera mindre tid til intervju av blodgivaren før tapping. Når ein vandrane blodbank blir aktivert har allereie minst ein pasient blitt såra. I tillegg til å forsvare seg, må soldatane då både velje blodgivar, tappa blod, samt behandla og transfundera den skadde soldaten. Dette er særskilt krevjande, og tilgang på medbrakt blod vil lette mykje. Vanlegvis er det medisinsk personell som har opplæring i tapping av blod, og dei kan ha hendene fulle med behandling av pasienten. Ved aktivering av ein vandrane blodbank skal og personell som ikkje direkte behandlar dei skadde ha opplæring i å skaffa til veie blod.

Tapping av fullblod i vandrane blodbank

Det er sjeldan tid eller utstyr til å utføra blodtyping eller viruscreeninga av blodgivaren ved aktivering av ein vandrane blodbank. Difor er det viktig at dette er gjort på førehand, og at ein er sikker på at ein brukar korrekt givar i ein kvar situasjon. Identifisering kan skje ved at blodgivarar identifiserer seg med fotoidentifikasjon. Namn og fødselsnummer kan då kontrollerast mot det førehandsgodkjente blodgivarregisteret

Under tapping skal ein sørge for at:

- ✓ Blodgivaren set eller legg seg ned på ein slik måte at posen kan plasserast cirka 60 cm under armen
- ✓ Posen ligg på eit så reint område som mogleg (ein kan bruka innsida av emballasjen som ei rein overflate)
- ✓ Armen til blodgivaren blir reingjort så godt som mogleg i stikkområdet
- ✓ Blodposen blir merka forsvarleg med namn, fødselsnummer og blodtype til blodgivaren og dagens dato
- ✓ Det er slått to lause knutar på tappeslangen før stikk

- ✓ Ein punkterer åra godt for å sikra god flyt til tappeposen
- ✓ Fullblodet blir blanda med tilsetjingsvæska undervegs for å hindra koagel i posen
- ✓ Ein fyller posen til korrekt nivå utan hjelpemiddel, som vekt
- ✓ Knutane blir stramma før nåla går ut av armen for å hindra ureining i posen

Når tappinga er fullført kan blodet umiddelbart bli transfundert pasienten.

Risiko ved transfusjonar i vandrane blodbankar

Når ein vandrane blodbank blir aktivert, vil skadde pasientar bli transfundert med fersktappa, leukocytthaldig fullblod. Septiske transfusjonsreaksjonar er assosiert med lagra blod, fordi berre små mengder bakteriar er til stades i fersktappa blod.²³ Det er ikkje vanleg å sjå transfusjonsreaksjonar hos traumepasientar, både fordi dei milde (feber, blodtrykksfall, smerter i flanken) og alvorlege (større blodtrykksfall, pustevanskar) reaksjonane lett kan oversjåast eller tolkast som ein del av traumet, men også fordi traume er assosiert med immunsuppresjon i timar eller dagar etter skaden.²⁴ Dei farlegare immunmodulerande reaksjonane som TA-GvDH og sekundær hemolyse er sjeldne, og oppstår vanlegvis fleire dagar etter transfusjon. Det finnast eitt dokumentert tilfelle av TA-GvHD hos ein soldat,²⁵ og eitt tilfelle som oppstod postoperativt hos ei elles frisk kvinne.²⁶

Lagring av fullblod tappa i vandrane blodbank

Forsvaret sine vandrane blodbankar har eigne prosedyrar for oppbevaring av fullblod. Per i dag kan fullblodet, dersom det ikkje umiddelbart blir transfundert, bli oppbevart i romtemperatur i åtte timar før det må leggast kaldt i 1-10 °C. Posen kan oppbevarast i inntil 24 timar frå tapping før transfusjon eller kassasjon. Det er ønskjeleg for Forsvaret å veta kor lenge fullblod tappa utanfor blodbankar kan lagrast i romtemperatur, og kor lenge det er forsvarleg å lagra desse posane kjøleg etter tapping. Forsvaret sine operasjonar utanlands har oftast vore i varme strøk. Difor er det ønskjeleg å sjå korleis lagring utanom blodbankskap påverkar fullblodet. Sidan Forsvaret vekslar på å bruka fullblod med og utan leukocytter, er det viktig å undersøkje om bakterievekst blir påverka av innhald av leukocytter, og om kvaliteten til fullblod blir påverka av filtrering.

Transfusjonsoverført sepsis

Dersom fullblod tappa i ein vandrande blodbank ikkje blir brukt, men lagra til ein eventuell ny pasient, kan risikoen for septisk transfusjonsreaksjon auka fordi bakteriar får moglegheit til å veksa.²⁷ Bakteriooverført infeksjon er den vanlegaste transfusjons-assosierte infeksjonen.²⁸ Truleg er det ein underrapportering av bakterielle transfusjonsreaksjonar fordi ein finn fleire blodkomponentar med bakterieoppvekst enn rapporterte septiske transfusjonsreaksjonar,²⁹ men dette kan og skuldast auto-sterilisering i løpet av lagringstida.³⁰ Gram negative bakteriar gir meir alvorlege transfusjonsreaksjonar enn gram positive bakteriar.³⁰ Det blei ikkje meldt nokon bakterielle transfusjonsreaksjonar i Noreg i 2019.¹⁵ Den franske B_{ACTHEM}-studien²⁷ og den amerikanske BaCon-studien²⁸ rapporterte bakterielle transfusjonsreaksjonar over ein to-årsperiode. Begge studiane fann at risikoen for transfusjonsoverført bakterieinfeksjon var høvesvis tre og 20 gongar høgare i platekonsentrat enn PRC. BaCon-studien fann flest infeksjonar frå *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* og *Serratia marcescens* medan B_{ACTHEM}-studien fann flest infeksjonar frå *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*, *E. coli*, *Bacillus cereus* og *Acinetobacter lwoffii*. B_{ACTHEM}-studien rapporterte ein daudelegheit på 1 per million transfunderte PRC, det same for fersk frose plasma, men 7 per million transfunderte platekonsentrat frå aferese. BaCon-studien viste ein daudelegheit på 0,13 per million transfunderte PRC og høvesvis 1,94 og 2,22 per million transfunderte platekonsentrat frå aferese og fleire givarar.

Bakterievekst i fullblod

Som nemnd over er det kjend at mange bakteriar har gitt septiske transfusjonsreaksjonar hos pasientar, både etter transfusjon av platekonsentrat lagra ved 20-24 °C og blodkomponentar lagra ved kjøletemperaturar.^{27,28} Me valde å bruka éi bakteriestamme for å illustrera kva som skjer dersom ein fullblodspose blir kontaminert med bakteriar. Sidan filtreringa kan fjerna bakteriar som er fagocyttert av leukocyttar³¹ og bakteriar som har blitt aktivert av komplementfaktorar i plasma og dermed heng seg fast i filteret³² er det hensiktsmessig å undersøkje kva som skjer med bakteriar som passerer filteret. Me skulle sjå på vekst ved høge temperaturar og ønska ikkje å bruka *Yersinia enterocolitica*, som er kjend for å voksa i kjølelagra blodkomponentar. For å sikra at me gjorde eit godt val, tok me

kontakt med overlege på bakteriologisk laboratorium ved HUS, som gav oss god hjelp. Valet sto mellom dei gram positive *Staphylococcus epidermidis* og *Staphylococcus aureus* og den gram negative *E. coli*. Hudbakterien *S. epidermidis* vil vera den mest openberre kontaminatoren, men begge dei gram positive mikrobaner er lågvirulente mikrobar som har oftast ikkje gir alvorleg sjukdom hos immunfriske personar. *E. coli* er den hyppigast detekterte mikrobena i blodkultur. *E. coli* kan og overleva i vatn og gi blodbåren infeksjon ved inntak med bakteriemi før sjukdomsutbrot. Seinast i 2019 blei det innført kokepåbud av drikkevatt på Askøy etter funn av bakterien i drikkevatt.³³ Det er kjend at *E. coli* har gitt fatale transfusjonsreaksjonar.^{28,34} Valet falt på *E. coli* ATCC 25922 som er ei velkarakterisert bakteriestamme som er godt eigna til laboratorieforsøk, fordi ein kan forventa vekst etter to timar inkubering. Ved lagring på blodagar-skål held *E. coli* ATCC 25922 seg stabil over tid når han blir overført til ny skål kvar veke.³⁵ Før studien tok til utførte eg ein pilot for å bekrefte bakteriemengd i fortynningar.

Tidlegare forskning på området

Det er gjort mange studiar på inokulering av *E. coli* i fullblod som anten har blitt lagra leukocytthaldig eller har blitt nytta til produksjon av blodkomponentar som platekonsentrat, erytrocyttkonsentrat og plasma,³⁶⁻⁴⁶ men få studiar på lagra, leukocyttr redusert og leukocytthaldig fullblod.⁴⁶⁻⁴⁹ Dette skuldast truleg at fullblod har vore lite brukt i dei åra filter for leukocyttr reduksjon har vore tilgjengeleg. Difor er det lite kjennskap til bakterieoverlevinga i leukocyttr redusert fullblod under lagring.

Litteratursøk

Fleire PubMed-søk blei utført for å finna aktuell litteratur der bakteriar var inokulert i fullblod og blodkomponentar i tillegg til artiklar som skildra kvalitetskontrollar at CPDA-1-fullblod. Det siste søket blei gjort 7. oktober 2020.

Følgande søkeord blei brukt for å finna aktuell litteratur i PubMed:

“Bacterial and inoculation and whole and blood and transfusion”

“Bacterial and growth and whole and blood and transfusion”

“Bacterial and inoculation and blood and components and transfusion”

“Bacterial and growth and blood and components and transfusion”

“Quality and control and whole and blood and transfusion and CPDA-1”

Frå søkerresultata fann eg aktuelle artiklar som eg las. Det resulterte i at eg fann fleire aktuelle artiklar i referanselistene. Eg systematiserte artiklane og vurderte kva relevans dei hadde til mi oppgåve. Som bakgrunnsinformasjon har eg valt å presentera tidlegare forskning der ulike stammer *E. coli* har blitt inokulert i fullblod og blodkomponentar, sidan det er *E. coli* som blei brukt i denne studien.

Studiar av bakteriell kontaminasjon av fullblod

E. coli inokulert i fersktappa fullblod før lagring

Det har blitt utført nokre studiar med *E. coli* og fullblod, som skildra i dette avsnittet. Eg fann ingen studiar der *E. coli* har blitt inokulert i fullblod før filtrering og lagring, slik at effekten av filtrering blir vurdert, eller studiar der *E. coli* har blitt inokulert i CPDA-1-fullblod.

I 1955 gjorde Braude et al ein studie der dei såg på eigenskapane til bakteriar som vaks i blod.⁴⁷ Dei brukte bakteriar isolert frå pasientar, sjukehus- og blodbankmiljø; blant dei *E. coli*. Dei fann at *E. coli* som blei dyrka fram ved 37 °C ikkje alltid overlevde i fullblod lagra ved 4 og 27 °C over tid, medan alle stammene overlevde i fullblod lagra ved 37 °C.

James et al (1957) testa først ut seks *E. coli*-stammer der berre ei vaks i små inokulat i blod fortynna med citrat og glukose.⁴⁸ Denne stamma blei brukt i dei vidare studiane. I to forsøk med små inokulat fekk dei berre oppvekst i 2/100 kjølelagra flasker. I eit tredje forsøk inokulerte dei eit stort inokulat *E. coli* til fullblod, som blei overført til to glas. Det eine glaset blei lagra ved 37 °C i to timar før kjølelagring som eit forsøk på å sterilisera blodet for kjøleveksande bakteriar medan det andre glaset blei kjølelagra umiddelbart. Prøvar til bakterievekst blei tatt umiddelbart etter inokulasjon, etter to timar og 24 timar. Forfattarane fann ikkje bevis for at *E. coli* vaks meir i gruppa som blei oppbevart to timar ved 37 °C, noko dei tolka som at det var ufarleg å oppbevara blod ved 37 °C rett etter tapping.

Högman et al (1991) inokulerte *E. coli* i CPD-fullblod som anten var leukocytthaldig eller leukocyttr redusert.⁴⁹ Forfattarane fann at leukocytthaldig fullblod lagra i romtemperatur blei sterilisert innan 18-24 timar. Forfattarane inokulerte bakteriane til fullblodet etter filtrering, og fekk dermed ikkje studert effekten til filteret i denne studien. Dei fekk kritikk for dette og

gjennomførte året etter ein ny studie med *Yersinia enterocolitica*.⁵⁰ Dei konkluderte med at leukocytter fagocyterte bakteriar som då blei fanga opp av filteret. I det leukocytthaldige blodet ville derimot dei fagocyterte bakteriane sleppe ut igjen i blodposen når leukocyttane etter kvart gjekk i oppløysing, som førte til at dei fekk ei forsinka vekst.

Nyleg har Taha et al (2019) brukt same bakteriestamma som eg. Dei inokulerte *E. coli* ATCC 25922 i 7-ml CPD-fullblodsalikvotar som blei lagra aerobt i romtemperatur i 24 timar.⁴⁶ Dei ønska sjå på leukocytthaldig fullblod si evne til å fagocytera store mengder bakteriar i romtemperatur over natt. Dette er fordi det er vanleg i blodbankar å lagra fersktappa fullblod over natt før komponentproduksjon. I denne studien auka *E. coli*-konsentrasjonen i løpet av 24 timar, som viste at fullblod ikkje hadde evna til å fagocytera så stort inokulat.

E. coli inokulert i fullblod produsert til blodkomponentar, eller blodkomponentar

Kahn et al (1975) gjorde ein laboratoriestudie der dei inokulerte *E. coli* i CPD-fullblod som blei produsert til platekonsentrat og lagra ved anten 4 eller 22 °C i tre dagar.³⁶ Studien blei gjort få år etter at det blei vanleg å lagra platekonsentrat i romtemperatur, og fleire septiske transfusjonsreaksjonar hadde blitt rapportert. Dei fann vekst av *E. coli* i posane lagra ved romtemperatur frå dag 1, medan dei ikkje fann vekst i posane lagra i kjøleskap på dag 3. Forfattarane konkluderte med at det er mindre oppvekst av *E. coli* i platekonsentrat lagra ved kjøleskapstemperaturar.

Buchholz et al (1994) gjorde eit forsøk som blei gjennomført på to laboratorium (lab A og lab B), der dei leukocyttereduserte bakteriekontaminerte blodkomponentar.³⁷ To posar fullblod var blanda i ein stor pose, som blei inokulert med 1,1 CFU/ml *E. coli*, og deretter fordelt i to posar som blei lagra sju timar i romtemperatur før dei blei produsert til PRC og platekonsentrat. Ein komponent i kvart par blei leukocytteredusert. PRC blei lagra i kjøleskap i 42 dagar medan platekonsentrat blei lagra fem dagar på vippe i inkubatorskap fylgt av fem dagar i ro på benk. Lab A kunne ikkje påvisa *E. coli* i platekonsentrat, medan lab B fann oppvekst frå dag 1. Lab B fann ein skilnad i vekst i platekonsentrat dag 1. Dei fann at den leukocyttereduserte posen hadde minst oppvekst dag 1. Denne veksten utjamna seg til dag 3 då det var eksponentiell vekst i begge posane. Begge laboratoria kunne påvisa *E. coli* i PRC, men fann ingen vekst under lagring. Skilnaden i funn hos dei to laboratoria kan skuldast den

låge konsentrasjonen av *E. coli* i posen, men og at dei har brukt to ulike bakteriestammer med ulike eigenskapar.

I 1995 forska Wagner et al vidare på effekt av kvile i romtemperatur før produksjon av blodkomponentar.³⁸ Dei inokulerte eit lite inokulat *E. coli* i fullblod som blei produsert til PRC, platekonsentrat og plasma etter 8 eller 24 timars kvile i romtemperatur. PRC produsert etter 24 timar kvile blei i tillegg leukocyttr redusert. Dag 1 fann forfattarane fleire bakteriar i PRC som hadde kvilt 24 timar før filtrering, men bakteriekonsentrasjonen sank til tilsvarande som PRC produsert etter 8 timar kvile etter filtrering. Dei fann færre bakteriar i platekonsentrat der fullblodet hadde kvilt 24 timar før produksjon, men veksten utjamna seg i begge gruppene frå dag 2. Dei fann ingen oppvekst i plasma. Forfattarane konkluderte med at leukocyttr reduksjon av PRC førte til at *E. coli* blei fjerna og tilsvara bakteriekonsentrasjonen til ufiltrerte PRC produsert etter 8 timar kvile.

Sanz et al (1997) utførte ulike forsøk på effekt av kviletid i romtemperatur før produksjon.³⁹ Dei inokulerte eit større inokulat av *E. coli* til fullblod umiddelbart etter tapping og let det kvila 6 eller 16 timar før produksjon til blodkomponentar. Alle platekonsentrat som hadde kvilt 6 timar før produksjon hadde eksponentiell oppvekst dag 2, medan berre ein pose i 16-timarsgruppa hadde oppvekst frå dag 2 og to andre hadde målbar oppvekst først på dag 5. Dei fann ingen oppvekst i PRC eller plasma høvesvis dag 35 og 60. I dette forsøket var alle produkta leukocytthaldige. For å sjå på den baktericide effekten til leukocyttrar utførte forfattarane enno eit forsøk, der dei let fullblod kvila 16 timar i romtemperatur før produksjon. Dei leukocyttr reduserte halve posen og let halve posen vera leukocytthaldig. *E. coli* blei inokulert og platekonsentrat blei produsert av dei halve posane. Det var målt lik vekst i dei to gruppene dag 5, men forfattarane meinte at synlege bakteriekoloniar i dei leukocyttr reduserte posane viste at *E. coli* vaks betre i leukocyttr reduserte platekonsentrat. Det er verdt å merka seg at i det andre forsøket mangla effekten av filtreringa, sidan bakteriane blei inokulert etter filtrering.

Chen et al (2008) inokulerte PRC med bakteriar kjende for å vera relatert til transfusjonsrelatert sepsis og dødsfall grunna kontaminerte PRC, deriblant *E. coli* (ATCC 25922).⁴¹ Dagen etter tapping blei 1-15 eller 100 CFU/ml inokulert i PRC som blei lagra ved 4 °C i 42 dagar. Bakterievekst blei målt umedelbart, dag 1, 7 og kvar veke fram til dag 42. Forfattarane fann at *E. coli* blei auto-sterilisert i løpet av lagring i 42 dagar.

Störmer et al publiserte i 2012 resultat frå forsøk planlagt av ei arbeidsgruppe i ISBT med referansestammer anbefala av WHO.⁴² Dei 14 involverte laboratoria inokulerte platekonsentrat med 0,03 og 0,3 CFU/ml *E. coli* for å illustrera kontaminasjon frå blodgivinga. *E. coli* PEI-B-19 blei brukt fordi det er kjend at denne stamma har evna til å proliferera i platekonsentrat oppbevart i romtemperatur. Vekst dag 4 blei presentert. Eitt laboratorium fekk ingen vekst av det lågaste inokulatet, medan det var eksponentiell vekst i det høgaste inokulatet. Alle dei andre laboratoria fann eksponentiell vekst i begge inokulata dag 4.

Ramirez-Arcos et al (2013) inokulerte 1 CFU/ml *E. coli* ATCC 25922 i PRC.⁴³ Dei valde bakteriestamma fordi *E. coli* har vore påvist i transfusjonsreaksjonar. Blodposane blei oppbevart ved 4 °C i 42 dagar forutan 3 timar i romtemperatur fordelt over 6x30 minutt jamleg frå dag 14 til 35 eller 3x1 time jamleg frå dag 14 til 28. Det var ikkje oppvekst av *E. coli* i løpet av lagringstida.

I 2016 inokulerte Taha et al to ulike stammer *E. coli* til fullblod som kvilte i romtemperatur over natt før produksjon til platekonsentrat.⁴⁴ Ei stamme forsvann over natt (ATCC 10798) medan den andre (CBS11001) vaks til 10⁷ CFU/ml. Bakteriestamma som vaks var dyrka fram frå eit tidlegare kontaminert platekonsentrat og vekst viste seg som synlege klumpar i supernatanten i platekonsentrata. Denne studien viste at ulike stammer av *E. coli* oppfører seg ulikt i fullblod.

Ketter et al (2019) inokulerte 1.000 CFU/ml *E. coli* ATCC 25922 til platekonsentrat og plasma frå aferese.⁴⁵ Dei inokulerte den høge konsentrasjonen for å sikra nøyaktige og reproduserbare resultat. Platekonsentrat blei lagra i fem dagar ved 4 eller 21 °C. Plasma blei oppbevart i romtemperatur. Forfattarane fann oppvekst til 10⁹ CFU/ml innan dag 2 i platekonsentrat og plasma lagra ved 21 °C og ingen endring i vekst i platekonsentrat lagra ved 4 °C.

Ulike arbeidsmetodar og resultat i tidlegare studiar

I dette kapittelet er framgangsmåtar frå dei tidlegare skildra artiklane presentert, der dei har brukt metodar og utstyr som var tilgjengelege for min studie. Det har vore brukt ulike konsentrasjonar av *E. coli* i tidlegare forsøk, frå 0,03 til 1.000 CFU/ml, som vist i Tabell 1 på neste side.

Tabell 1. Konsentrasjon av *E. coli*-inokulat i tidlegare studiar, der bakterien har blitt inokulert i fullblod og blodkomponentar.

Publikasjon	Planlagt inokulat (CFU/ml)	Faktisk inokulat (CFU/ml)	Årsak til val av bakteriestamme	Årsak til val av konsentrasjon
James et al (1957) ⁴⁸	0,03-0,4 0,2-0,4	IA	<i>E. coli</i> -stamma viste oppvekst i blod frå små inokulat.	Usannsynleg at store mengder bakteriar kan kontaminera blod under tapping.
Kahn et al (1975) ³⁶	125	78-161	Fordi dei hadde vakse i fullblod eller platekonsentrat.	For å klara å isolera bakteriar i platekonsentrat etter produksjon.
Högman et al (1991) ⁴⁹	1, 10 eller 100	IA	Isolert frå diagnostikk av rutineprøvar på sjukehuset.	IA
Buchholz et al (1994) ³⁷	1	IA	Frå kliniske isolat eller ATCC	Data antyder at små mengder bakteriar finnast i fullblod rett etter tapping.
Wagner et al (1995) ³⁸	1	2,7±3,4	Klinisk isolat resistent mot den bakteriedrepende evna til plasma.	Illustrasjon av bakteriekontaminasjon frå hudreining.
Sanz et al (1997) ³⁹	50	IA	Frå kliniske isolat i rutinediagnostikken.	Konsentrasjonen gav konsekvent bakterievekst, og ein kunne måla effekt av intervensjonar.
Wagner et al (1998) ⁴⁰	10 1 0,1	8,2±1,2 0,91±0,13 0,14±0,07	Illustrasjon av ein hurtigvoksende bakterie.	IA
Chen et al (2008) ⁴¹	1-15 100	<5 og 6-15 16-50 og >51	Relatert til transfusjonsrelatert sepsis.	IA
Störmer et al (2012) ⁴²	0,03 0,3	0,04 0,5	Evne til å veksa i platekonsentrat oppbevart ved romtemperatur.	Illustrasjon av kontaminasjon frå blodgiving.
Ramirez-Arcos et al (2013) ⁴³	1	~1	Fordi <i>E. coli</i> har vore implisert i transfusjonsreaksjonar.	«relevant concentrations»
Taha et al (2016) ⁴⁴	100	IA	Bakteriestamma blei kjøpt inn frå ATCC.	Kunne spora bakteriane i platekonsentrata som blei produsert.
Ketter et al (2019) ⁴⁵	1.000	IA	Assosiert med septisk transfusjonsreaksjon.	Sikra nøyaktige og reproduerbare resultat
Taha et al (2019) ⁴⁶	500	IA	ATCC 25922 (klinisk isolat).	Utfordra bakteriekapasiteten til fullblodet og leggja til rette for vekst.

I vår studie hadde me som mål å inokulera fullblod med 30 CFU/ml, som er eit middels stort inokulat. Me valde å bruka eit så stort inokulat for å sikra at *E. coli* var påvisbare i 100 µl prøvemateriale rett etter inokulering. Det er eit teikn på at forsøket var vellukka, og at levande bakteriar som let seg påvisa har blitt inokulert. I tilfelle der bakteriar blir fjerna av blodet er det og viktig å påvisa at ein har klart å inokulera bakteriar før fagocyttering. Som Tabell I visar, har berre om lag halvparten av forfattarane oppgitt faktisk inokulat i forsøka.

Framstilling av inokulat frå dei artiklane der eg fann metodar aktuelle for min studie er skissert i Tabell II. Andre artiklar skildra metodar med utstyr eg ikkje hadde tilgang på, eller inokulerte ikkje bakteriar som var i eksponentiell vekst.

Tabell II. Skjematisk oversikt av korleis inokulat tidlegare har blitt framstilt og som var aktuelle for min studie.

Publikasjon	Inkubasjon	Fortynning	Kontrollar	Eksponentiell vekst?
Kahn et al (1975) ³⁶	32 °C i 24 timar på trypticase soy agar skåler	Fortynna koloniar i sterilt saltvatn før bruk.	Ja	Ja
Högman et al (1991) ⁴⁹	<i>E. coli</i> inkubert over natt på blodagar-skåler.	Fortynna i fosfat-bufra saltvatn til ein optisk tettleik på 4×10^7 CFU/ml. Fortynna vidare til 2.500, 250 og 25 CFU/ml.	Det blei tatt kontrollar av alle tre inokulata ved kvart forsøk.	Ja
Wagner et al (1995) ³⁸	Ein koloni <i>E. coli</i> inkubert i trypticase soy-buljong ved 30 °C under aerobe forhold.	Fortynna til 1000 CFU/ml i saltvatn umedelbart før inokulering.	Ja	Ja
Sanz et al (1997) ³⁹	IA	Fortynna i fosfat-bufra saltvatn til 1 McFarland standard, som tilsvara 3×10^8 CFU/ml. Denne prøven blei fortynna til endeleg konsentrasjon.	Ja	IA
Wagner et al (1998) ⁴⁰	Ein koloni inkubert aerobt i trypticase soy-buljong ved 30 °C.	Passelege fortynningar blei laga i ubufra, sterilt saltvatn rett før inokulasjon.	Ja	Ja

Etter ei samla vurdering valde eg å inkubera *E. coli* i LB-medium under aerobe forhold over natt ved 37 °C, sentrifugera LB-mediet før fortynning i sterilt saltvatn til 0,5 McFarland standard. Denne OD hadde piloten vist at tilsvara $\sim 0,75 \times 10^8$ CFU/ml. Eg føretok vidare fortynningar til 15.000 CFU/ml som var inokulasjonsfortynninga og to vidare fortynningar som var positive kontrollar.

Det har blitt brukt mange ulike metodar for å kvantifisera bakteriekonsentrasjonen av *E. coli* i blod. I Tabell III har eg lista opp framgangsmåtar som var aktuelle for min studie.

Tabell III. Framgangsmåte bakterieteljing i tidlegare artiklar som var aktuelle for min studie.

Publikasjon	Volum	Medium/skåler	Inkubasjon	Fortynningar	Teljing
Högman et al (1991) ⁴⁹	0,5 ml	Blodagar-skåler	37 °C i 48 timar	Fem: 1:10-1:100.000	Snitt av to skåler
Sanz et al (1997) ³⁹	100 µl (900 µl)	Blodagar-skåler (thioglycolate buljong)	37 °C i 24 timar (+ 24 timar ekstra i negative prøvar)	IA	IA
Chen et al (2008) ⁴¹	0,5-1 ml	Blodagar-skåler	35 °C i 24-48 timar	1:10-seriefortynna	<200 koloniar
Taha et al (2019) ⁴⁶	100 µl	Blodagar-skåler	37 °C i 24 timar	1:10-seriefortynna	IA

Eg valde å spreie 100 µl fullblod på tre blodagar-skåler, inkubere dei ved 37 °C i 18-24 timar og telje skåler med <200 koloniar. Der det var aktuelt seriefortynna eg fullblod 1:10 med sterilt saltvatn og inkuberte minimum tre fortynningssteg (Vedlegg 15). Resultat blei oppgitt som gjennomsnitt av tre skåler. Eg brukte skålene med flest talte koloniar til å berekna konsentrasjonen av *E. coli* i fullblod.

Det var ønskeleg å ha eit bilete av kor stor oppvekst eg kunne forventa av *E. coli* i fullblod lagra ved ulike temperaturar. I Tabell IV er resultatata i dei aktuelle artiklane, der konsentrasjon er skildra, lista.

Tabell IV. Oppvekst av *E. coli* i ulike forsøk der bakterien har blitt inokulert i fullblod og blodkomponentar. TNTC=Too numerous to count

Publikasjon	Blodkomponent	Temperatur (Vekst (CFU/ml)
Kahn et al (1975) ³⁶	Platekonsentrat	22 °C 4 °C	>300 frå dag 1 1-11 dag 3
Högman et al (1991) ⁴⁹	Platekonsentrat Leukocytteredusert fullblod Leukocytthaldig fullblod	22 °C	10 ⁸ CFU/ml dag 2 10 ⁶⁻⁹ dag 2 0 dag 2
Buchholz et al (1994) ³⁷	Platekonsentrat PRC	22 °C 4 °C	0-TNTC dag 2 0-0,1 dag 42
Wagner et al (1995) ³⁸	Platekonsentrat PRC	22 °C 4 °C	10 ⁸⁻⁹ dag 2 10 ² dag 42
Sanz et al (1997) ³⁹	Platekonsentrat	22 °C	>10 ⁵ dag 2
Taha et al (2016) ⁴⁴	Platekonsentrat	22 °C	10 ⁸ dag 3
Taha et al (2019) ⁴⁶	Fullblod	22 °C	10 ⁵ etter 24 timar

Desse studiane gav viktig informasjon om vekst av *E. coli*, særleg i leukocyttr redusert fullblod lagra ved romtemperatur. *E. coli* verkar ikkje å veksa godt i kjøletemperaturar, og det synast ikkje å vera nødvendig å fortynna prøvar frå kjøletemperaturar mykje. Me kunne forventa at *E. coli* kunne veksa til ein konsentrasjon av 10^8 CFU/ml i varme temperaturar og at prøvar frå blod lagra varmt bør fortynnast.

Studiar av kvalitet av fullblod under lagring

Kvalitet i fullblod lagra ved og utanfor optimale forhold

Shields et al (1970) gjorde ein kvalitetsstudie med ACD-fullblod.⁵¹ Forfattarane fann ikkje meir celledestruksjon i fullblod lagra ved 10 °C enn ved 4 °C, eller i fullblod oppvarma til 22 °C i 16 timar. Forfattarane fann at fleire oppvarmingar til 10 og 22 °C i fire eller 24 timar førte til auka plasma-Hb. Når oppvarming var kombinert med agitasjon, auka plasma-Hb ytterlegare. Lagring ved 22 °C i 24 timar før transfusjon førte til auka plasma-Hb og kalium, mest tydeleg i fullblod lagra i 28 dagar. Det var kortare *in vivo* overleving av fullblod som hadde blitt lagra ved 22 °C i 24 timar før transfusjon samanlikna med fullblod som ikkje hadde blitt oppvarma, men skilnaden var først statistisk signifikant i fullblod lagra 28 dagar før transfusjon.

Hughes et al (2007) delte CPD-fullblod i to og lagra posane ved 19 eller 25 °C i tre dagar. Dei målte dei same parametrane som eg gjorde, i tillegg til fleire andre. Forfattarane konkluderte med at *in vitro* tap av platefunksjon og konsentrasjon av plasmafaktorar var overraskande låg.⁵² Forfattarane meiner at resultatata støttar lagring av fullblod i 24 timar før komponentproduksjon.

Moroff et al publiserte i 2011 ein artikkel som viste at *in vivo* overleving av erytrocyttar etter 35 dagar i 4 °C og blodplater etter fem dagar i 22 °C ikkje blei nedsett om fullblod kvilte 24 timar i staden for åtte timar i romtemperatur før komponentproduksjon til leukocytthaldige PRC og platekonsentrat.⁵³ Dette kan tyda på at fullblod som skal bli lagra kaldt kan kvila 24 timar i romtemperatur før kjølelagring utan at det påverkar *in vivo* overleving av erytrocyttar. Det ultimate beviset brukt i kliniske studiar for kvalitet av blodkomponentar er viabilitet, altså *in vivo* overleving etter transfusjon, der målet er >75 % gjenfunne erytrocyttar.

Pidcock et al publiserte i 2013 ein artikkel der dei hadde lagra CPD-fullblod anten ved 4 eller 22 °C i 21 dagar. Halvparten av posane blei i tillegg patogenreduert. Forfattarane fann at fullblod lagra kaldt betre oppretthaldt hemostatisk funksjon en fullblod lagra ved 22 °C.

Meledeo et al publiserte i 2019 ein artikkel der dei samanlikna lagring av fullblod i tre ulike tilsetjingsløysingar.⁵⁴ Dei lagra ufiltrert fullblod ved 4 °C i 35 dagar. Den hemostatiske funksjonen blei redusert i løpet av lagringstida, men forfattarane fann liten skilnad imellom dei tre ulike tilsetjingsløysingane.

Forskningsgruppa mi publiserte i 2018 ein artikkel der me lagra leukocytteredusert CPD-fullblod ved 22 °C i 3 dagar og 32 °C i to timar.¹⁷ Me konkluderte med at lagring i romtemperatur førte til nedsett aggregeringsevne i blodplater målt med Multiplate Analyser, men at kort lagring ved 32 °C ikkje førte til nedsett kvalitet. Erfaringar frå denne studien gjorde at me i 2020 publiserte ein ny artikkel, der me sterilkopla platesparande filter til CPDA-1-posar.¹⁹ Dermed kunne me samanlikna kvalitet og hemostatisk funksjon under lagring i leukocytthaldig og leukocytteredusert CPDA-1-fullblod. Me konkluderte med at leukocyttreduksjon ikkje sette ned kvaliteten eller den hemostatiske funksjonen til fullblod lagra inntil 35 dagar ved 4 °C.

Kaldlagra blodplater

Kaldlagra fullblod inneber kaldlagra blodplater. Getz sin oversiktsartikkel frå 2019 konkluderer med at kaldlagra blodplater kan vera meir eigna til å forbetra hemostasen til traumepasientar enn varmlagra blodplater, sjølv om *in vivo* overleving blir nedsett av kjølelagring.⁵⁵ I 2019 publiserte forskningsgruppa vår ein artikkel der me viste at kaldlagring fører til forbetra platefunksjon samanlikna med romtemperert lagring.⁵⁷ I 2020 publiserte me ein annan artikkel der pasientar hadde blitt transfundert etter hjarte- og karoperasjonar med platekonsentrat, som anten var varmlagra, kaldlagra inntil 7 dagar eller kaldlagra inntil 14 dagar. Me konkluderte med at platekonsentrat lagra kaldt inntil 14 dagar er funksjonelt aktive.⁵⁶

Hensikt med studien

Denne studien blei utført for å undersøka om leukocyttreduksjon og lagringstemperatur påverkar vekst av *E. coli* (ATCC 25922) i CPDA-1-fullblod, og om vekst av *E. coli* påverkar kvalitet- og funksjonsparameter.

Problemstillingar

Primærutfallet i studien var om leukocyttreduksjon beskyttar fullblod mot oppvekst av *E. coli* under lagring. For å undersøka dette blei det første forskingsspørsmålet:

1. Kan leukocyttrifilering føra til mindre oppvekst av bakteriar i CPDA-1-fullblod?

H₀: Leukocyttrifilering og ikkje-leukocyttrifilering gir same oppvekstforhold for bakteriar i blodposar ved same lagringstemperatur.

H_a: Leukocyttrifilering av CPDA-1-fullblod fører til dårlegare oppvekstforhold for bakteriar ved same lagringstemperatur.

Sekundærutfalla var om lagring ved høge temperaturar fører til oppvekst av *E. coli* og om *E. coli* påverkar kvalitet- og funksjonsparameter i CPDA-1-fullblod. For å undersøka dette blei dei andre og tredje forskingsspørsmåla som følgjer:

2. Har lagringstemperatur innverknad på bakterievekst?

H₀: Det er same bakterievekst ved alle tre temperaturar.

H_a: Det er ulik bakterievekst ved dei tre temperaturane.

3. Kan laboriemarkørar for kvalitet og funksjon bli påverka av bakterievekst i CPDA-1-fullblod lagra ved ulike temperaturar?

H₀: Kvalitets- og funksjonsmarkørar blir ikkje påverka av bakterievekst ved ulike temperaturar.

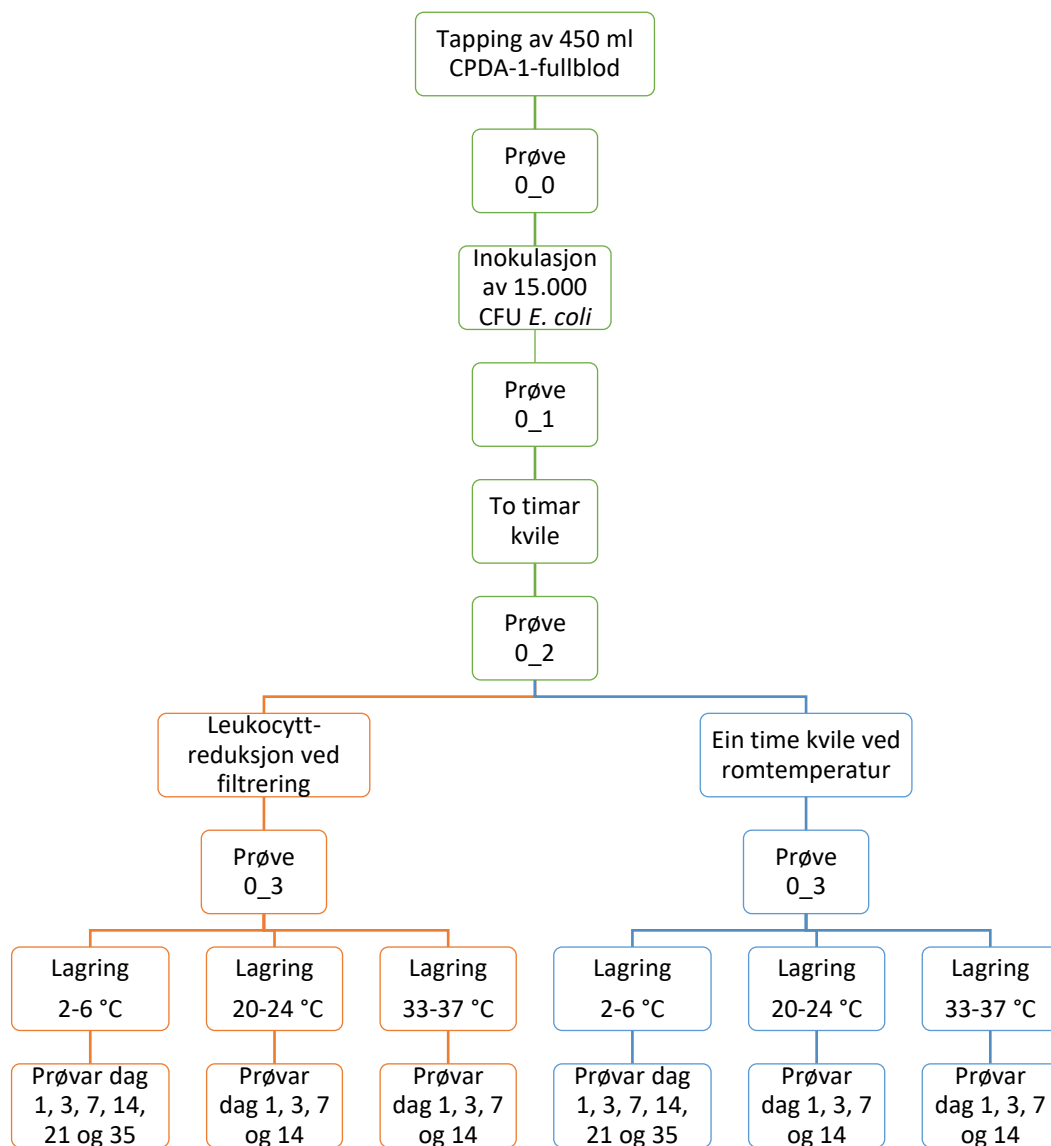
H_a: Kvalitets- og funksjonsmarkørar blir forverra av bakterievekst ved ulike temperaturar.

Studien blei gjennomført som ein laboriestudie, slik artikkelen skildrar. Figur 1 viser ei skjematisk oversikt over studien.

Posane i testarmen blei utsett for intervensjonen i forsøket vårt, som var leukocyttreduksjon gjennom eit platesparande filter. Posane i kontrollarmen blei lagra som er rutine for CPDA-1-fullblod; utan leukocyttreduksjon. Posane i test- og kontrollarmen blei igjen delt i tre grupper med ulik lagringstemperatur; 4, 22 eller 35 °C.

Studien har etisk godkjenning frå Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk, REK nord, med referansen 2017/157. Under planlegging av studien gjennomførte me ein personvernkonsekvensvurdering (Vedlegg 1) der prosjektleiar, Torunn Apelseth, konkluderte med at me ikkje hadde behov for DPIA i denne studien.

Før oppstart blei det inngått ein avtale mellom MBF, AIT og MIA om analysering av prøvemateriale og produksjon av medium og blodagar-skåler (Vedlegg 2). Diversje studiedokument ligg vedlagt, deriblant informasjonsskriv med samtykke, diverse studieprosedyrar og –arbeidsark (Vedlegg 3-8).



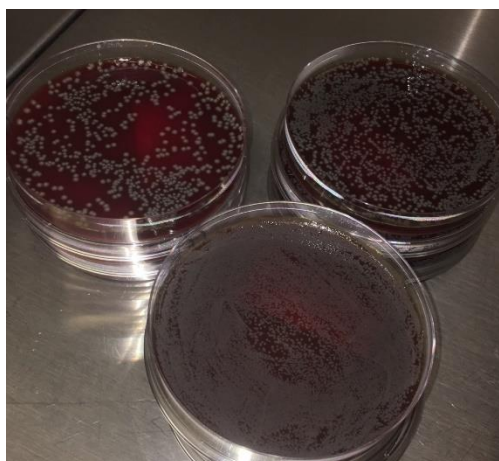
Figur 1. Skjematisk oversikt over studien med tapping, inokulasjon, behandling og prøvetaking i studien.

Resultat

I dette kapitlet har eg skildra resultat som ikkje er tatt med i artikkelen. Rådata ligg som Vedlegg 11 og 12, medan resultat presentert i tabellane er gjennomsnitt av kvar studiearm i kvar gruppe. Artikkelen vil bli sendt til tidsskriftet «Transfusion» for fagfelle vurdering. Vedlegg 13 skildrar retningslinjer for forfattarar som tidsskriftet har utarbeida. Merk at artikkelen blir innsendt som «original research».

Pilot for å finna bakteriekonsentrasjon før inokulasjon

Før eg kunne gjennomføra studien måtte eg finna ut kva konsentrasjon *E. coli* faktisk hadde ved 0,5 McFarland standard. Dette var og ein fin måte å tørrtrena før den første blodgivaren blei tappa. Eg fekk overført ein koloni *E. coli* ATCC 25922 til ei blodagar-skål på bakteriologisk seksjon ved mikrobiologisk avdeling. Denne stamma lagra eg på blodagar-skål i kjøleskap og overførte til ny skål kvar veke i løpet av studien. Ein koloni blei overført til 25 ml LB-medium og inkubert ved 37 °C og 200 rpm (311DS, Shaking Incubator, Labnet International Inc.) i 50 ml-sentrifugerøyr med korken på gløtt for å sikra aerobe forhold. Neste dag var løysinga blakka grunna *E. coli*-vekst. Korken blei lukka og røyret sentrifugert ved 1900 g i 10 minutt. Ein liten del av pelleten blei fortynna i sterilt saltvatn til OD 0,5 McFarland standard (DEN-1B McFarland Densitometer, BioSan). 1:10-fortynningsrekke frå 1:10⁻¹ til 1:10⁻⁷ blei laga ved å overføra 0,5 ml til 4,5 ml sterilt saltvatn. 100 µl av dei tre lågaste fortynningane blei spreidd på blodagar-skåler i triplikat. Resultat av piloten er vist i Tabell V.



Bilete 1. Blodagar-skåler med tre ulike fortynningar som alle har for mange koloniar til teljing (>200 koloniar).

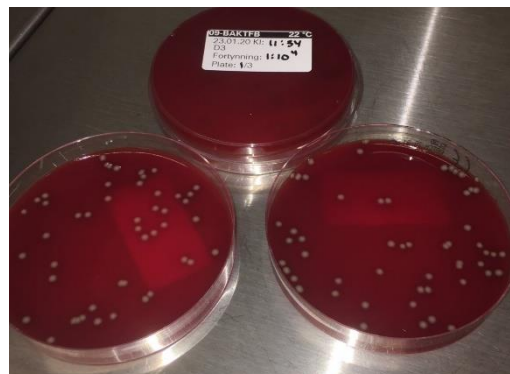
Tabell V. Resultat av pilot med 0,5 McFarland *E. coli* fortynna i sterilt saltvatn.

Fortynning	Koloniar talt	Fortynning	Koloniar talt	Fortynning	Koloniar talt
1:10 ⁻⁵	75	1:10 ⁻⁶	4	1:10 ⁻⁷	2
	88		9		3
	73		9		1
Gjennomsnitt	78,67	Gjennomsnitt	7,33	Gjennomsnitt	2

Sidan 1:10⁻⁵-fortynninga tilsvare 787 CFU/ml, runda av til 750 CFU/ml kan me rekna tilbake til at 0,5 McFarland tilsvare 0,75x10⁸ CFU/ml, som er lågare enn den oppgitte konsentrasjonen på 1,6x10⁸ CFU/ml. For å sikra at 15.000 CFU blei inokulert i fullblod frå 1:10⁻⁴-fortynninga gjorde eg det første fortynningssteget til 1:5 ved å tilsetje 1 ml bakterievæske i 4,5 ml sterilt saltvatn i første steg, elles 1:10 ved å tilsetje 0,5 ml i 4,5 ml i dei vidare stega.

Positive kontrollar

Sidan inokulasjonsprøven hadde ein konsentrasjon på 15.000 CFU/ml, kunne eg ikkje spreie 100 µl av denne prøven på blodagar-skål og forvente å telje koloniar. Ved kvart forsøk laga eg to vidare fortynningar som blei brukt som positive kontrollar (Tabell VI), både for å kontrollera at inokulasjonskonsentrasjonen var korrekt, men og for å sjå at konsentrasjonen sank med ~1:10 i dei to kontrollane og at det faktisk var *E. coli* til stades i prøven. Dei positive kontrollane hadde eg med for kvar pose som blei inokulert, og resultatet frå 1.500-prøven blei brukt til å estimera den inokulerte konsentrasjonen av *E. coli* (Tabell VI). Sidan inokulasjonsprøven var cirka ti gonger sterkare brukte eg ti som fortynningsfaktor i Formel 1 for å rekna ut konsentrasjon inokulert i fullblod.



Bilete 2. Blodagar-skåler med passeleg mengd koloniar til teljing (<200).

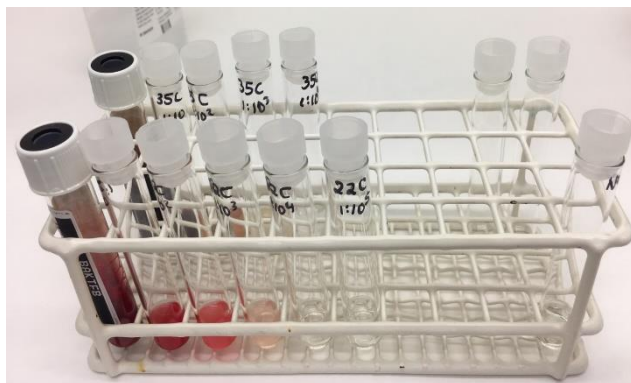
Formel 1. Estimering av konsentrasjon av *E. coli* i fullblod.

$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{Mengd koloniar talt (CFU)} \times \text{Fortynningsfaktor}}{\text{Prøvevolum (ml)}}$$

Tabell VI. Koloniar talt i positive kontrollar og estimert inokulert konsentrasjon av *E. coli* i fullblod. Estimert inokulert *E. coli* blei utrekna frå 1.500 CFU/ml-prøven og fortynningsfaktor 10. Resultat er gjennomsnitt av tre talte skåler.

Talte koloniar: 1.500 CFU/ml	Konsentrasjon: 1.500 CFU/ml	Talte koloniar: 150 CFU/ml	Konsentrasjon: 150 CFU/ml	Volum fullblod	Estimert inokulert <i>E. coli</i> CFU/ml
94	940	6,7	67	450	20,9
111	1110	9,7	97	477	23,3
89	890	10	100	479	18,6
76	760	6,3	63	483	15,7
58	580	8	80	483	12,0
86,3	863	6,3	63	480	18,0
112	1120	7	70	482	23,2
96	960	13	130	482	19,9
155	1550	17,3	173	484	32,0
92,7	927	6,7	67	488	19,0
Gjennomsnitt: 97,00	Gjennomsnitt: 970,0	Gjennomsnitt: 9,10	Gjennomsnitt: 91,0	Gjennomsnitt: 478,8	Gjennomsnitt: 20,26

Resultatet av kontrollane viste at eg inokulerte ein lågare konsentrasjon av *E. coli* enn ønska i ni av ti posar i løpet av studien. Gjennomsnittleg konsentrasjon av *E. coli* inokulert i fullblod



Bilete 3. Døme på fortynningsrekker ved utsæd av prøvemateriale frå lagra fullblodsposar.

var 20,26 CFU/ml. Skilnaden mellom dei to fortynningane varierte, men gjennomsnittleg var reduksjonen 1:10,7 frå 1.500- til 150-fortynningsprøven. Resultata frå dei positive kontrollane stemmer med at denne litt for store fortynninga har skjedd i kvart steg.

Resultat av kvalitet- og funksjonsanalysar ikkje inkludert i artikkelen

Resultat av hematologi-, blodgass- og tromboelastografi-analysar blei ikkje skildra i detalj i artikkelen fordi koagulering av blod med bakterievekst førte til manglande resultat. I

artikkelen blei difor berre resultat frå posane lagra ved 4 °C presentert. Kvalitetsanalysar er vist i Tabell VII og IX der gjennomsnittleg resultat i kvar arm av hematologimålingar er lista, medan Tabell VIII og X viser gjennomsnittleg resultat for kvar arm av blodgassanalysar.

Funksjonsanalysar er vist i Tabell XI som gjennomsnittleg resultat i kvar arm av tromboelastografianalysar. Vedlegg 13 inneheld rådata for hematologi, blodgass og funksjonsanalysane.

Effekt av filtrering

LPK blei ikkje målt i prøvar frå testarmen etter leukocyttrreduksjon, men det blei tatt prøve for å måla restinnhald av leukocyttrar i prøve 0_3 for å sikra at filtreringa var vellukka.

Resultatet av dette er presentert i artikkelen. At LPK sank frå $4,14 \times 10^9/l$ til $0,09 \times 10^6/eining$ viser at filteret fjerna fleire leukocyttrar enn kravet på restinnhald av leukocyttrar $<1 \times 10^6/eining$. Platetalet sank mellom alle prøvetidspunkta i testarmen (Tabell VII). Det er eit krav at $>80\%$ av platene er med fullblodet gjennom filteret. Tabell VI viser at platetalet etter leukocyttrreduksjon er $90,1\%$ av platetalet i prøve 0_2. Ingen andre hematologianalysar blei påverka av filtreringa (Tabell VII).

Tabell VII. Hematologiresultat tappedig. Prosent hemolyse i fullblod er ein utrekna parameter frå Hb, EVF og plasma-Hb. n=5, forutan der anna er oppgitt. Resultat er gjennomsnitt av målingane i kvar arm.

Analyse (eining)	Arm	Dag 0_0	Dag 0_1	Dag 0_3	Dag 0_4
Hb (g/dl)	Kontroll	12,12	12,12	12,26	12,12
	Test	12,40	12,38	12,40	12,18
EVF (1)	Kontroll	0,382	0,376	0,386	0,384
	Test	0,380	0,384	0,382	0,380
Plasma-Hb (g/l)	Kontroll	0,24	0,26	0,22	0,22
	Test	0,22	0,22	0,24	0,22
Hemolyse (%)	Kontroll	0,14	0,14	0,10	0,10
	Test	0,12	0,12	0,14	0,14
TPK ($\times 10^9/l$)	Kontroll	182,0	173,4	177,8	179,4
	Test	167,6	161,6	160,4	144,6
LPK ($\times 10^9/l$)	Kontroll	4,44	4,32	4,56	4,42
	Test	4,10	4,24	4,14	IA

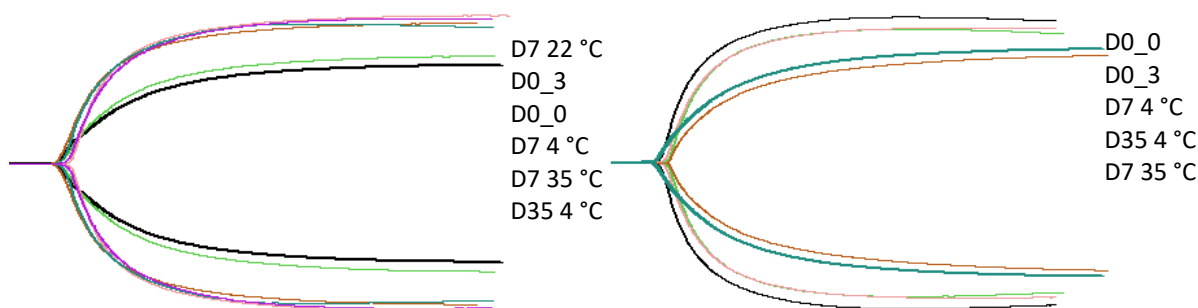
Som vist i Tabell VIII blei ingen blodgassanalysar umiddelbart påverka av leukocyttrreduksjon.

Tabell VIII. Blodgassanalyser utført tappedagen. Resultat er gjennomsnitt av målingane i kvar arm. Analysen blei utført ved 37 °C. n=5.

Analyse (eining)	Arm	Dag 0_0	Dag 0_1	Dag 0_2	Dag 0_3
pH ()	Kontroll	7,196	7,196	7,182	7,172
	Test	7,196	7,184	7,176	7,178
pCO ₂ (kPa)	Kontroll	10,04	10,02	10,38	10,78
	Test	10,28	10,54	10,58	10,38
pO ₂ (kPa)	Kontroll	6,76	6,52	6,58	6,12
	Test	5,54	5,30	5,38	5,12
Base (mmol/l)	Kontroll	-11,12	-11,12	-11,34	-11,34
	Test	-10,88	-11,02	-11,34	-11,56
Kalium (mmol/l)	Kontroll	2,98	3,00	3,04	3,06
	Test	2,96	2,98	3,02	3,08
Glukose (mmol/l)	Kontroll	25,42	25,76	25,52	25,28
	Test	25,66	25,40	24,94	24,60
Laktat (mmol/l)	Kontroll	1,12	1,22	1,78	2,08
	Test	1,58	1,80	2,40	2,64

TEG 5000 viste endring etter filtrering i testgruppa. R-tida var lengre, K steig, vinkelen og MA sank, men alle resultat var i normalområda. Resultata er vist frå dag 0 til dag 35 i Tabell XI.

Figur 2 visar kurver frå to posar gjennom studien. Det er mogleg å sjå effekt av filtrering som nedsett MA på kurvene i testarmen.



Figur 2. Alle TEG 5000-resultat i ein pose i kontrollarmen (venstre) og en pose i testarmen (høgre). Dei to kurvene som skil seg ut er dei smale kurvene frå dag 35. Ein kan sjå at det er skilnad før og etter filtrering (kurvene blir smalare) i testarmen, men dette er utan klinisk verdi.

Effekt av lagring

Den einaste målbare kvalitetsparameteren som er eit krav for fullblod ved utdateringsdato er prosent hemolyse, som skal vera <0,8 % i minimum 90 % av dei kontrollerte posane.

Prosent hemolyse blir rekna ut ved Formel 2, der hematokrit tilsvarer til EVFx100.

Formel 2. Utrekning av prosent hemolyse i fullblod.

$$Hemolyse \% = \frac{(Plasma-Hb \text{ g/dl}) \times (100 - \text{hematokrit \%})}{Hb \text{ g/dl}}$$

Som vist i Tabell IX var hemoglobin stabil medan EVF steig svakt i heile lagringsperioden i 4 °C-gruppene. Begge gruppene hadde godkjend hemolyse ved slutten av lagringstida på 35 dagar. Leukocyttallet sank til dag 7 i 35 °C-gruppa i testarmen. Dette var ikkje synleg i 4 og 22 °C-gruppene dag 7, men blei tydeleg i den vidare lagringa i 4 °C-gruppa.

Tabell IX. Hematologiresultat i løpet av lagring ved 4, 22 eller 35 °C. Prosent hemolyse i fullblod er ein utrekna parameter frå Hb, EVF og plasma-Hb. Resultat er gjennomsnitt av målingane i kvar arm. n=5, forutan der anna er oppgitt.

Analyse (eining)	Arm (temperatur)	Dag 1	Dag 3	Dag 7	Dag 14	Dag 21	Dag 35
Hb (g/dl)	Kontroll (4 °C)	12,16	12,20	12,12	12,18	12,26	12,16
	Test (4 °C)	12,20	12,28	12,30	12,40	12,32	12,34
	Kontroll (22 °C)	12,10	12,14	12,40 (n=4)			
	Test (22 °C)	12,26	IA	IA			
	Kontroll (35 °C)	12,16	12,16	12,44			
	Test (35 °C)	12,30	12,25 (n=2)	12,55 (n=2)			
EVF (l)	Kontroll (4 °C)	0,382	0,384	0,388	0,395	0,394	0,396
	Test (4 °C)	0,382	0,380	0,390	0,386	0,392	0,400
	Kontroll (22 °C)	0,390	0,408	0,435 (n=4)			
	Test (22 °C)	0,396	IA	IA			
	Kontroll (35 °C)	0,406	0,434	0,390			
	Test (35 °C)	0,410	0,420 (n=2)	0,400 (n=2)			
Plasma-Hb (g/l)	Kontroll (4 °C)	0,32	0,34	0,36	0,54	0,60	0,70
	Test (4 °C)	0,30	0,30	0,40	0,42	0,48	0,66
	Kontroll (22 °C)	0,32	0,30	0,54			
	Test (22 °C)	0,34	1,10	3,86			
	Kontroll (35 °C)	0,30	0,48	1,92			
	Test (35 °C)	0,38	5,64	12,77 (n=3)			
Hemolyse (%)	Kontroll (4 °C)	0,16	0,18	0,20	0,28	0,28	0,34
	Test (4 °C)	0,14	0,16	0,22	0,22	0,24	0,32
	Kontroll (22 °C)	0,18	0,16	0,20 (n=4)			
	Test (22 °C)	0,16	IA	IA			
	Kontroll (35 °C)	0,14	0,20	1,02			
	Test (35 °C)	0,20	0,25 (n=2)	2,15 (n=2)			
TPK (x10 ⁹ /l)	Kontroll (4 °C)	156,8	158,8	155,4	123,2	121,8	114,6
	Test (4 °C)	142,8	138,2	132,0	116,8	92,6	71,6
	Kontroll (22 °C)	174,6	196	203,8 (n=4)			
	Test (22 °C)	147,2	IA	IA			
	Kontroll (35 °C)	181,0	183,2	118,4			
	Test (35 °C)	149,4	107,5 (n=2)	44,5 (n=2)			
LPK (x10 ⁹ /l)	Kontroll (4 °C)	4,38	4,36	4,30	3,94	3,42	2,88
	Kontroll (22 °C)	4,34	4,32	4,33 (n=4)			
	Kontroll (35 °C)	4,26	3,60	3,06			

Det var ikkje mogleg å måla hemolyse ved alle prøvetidspunkta grunna koagel, men me kan seia at plasma-Hb >1,6 g/l svarar til hemolyse > 0,8 %. Plasma-Hb var over ønska nivå allereie dag 3 i den leukocyttr reduserte testarmen lagra ved 35 °C (Tabell IX). Plasma-Hb > 1,6 g/l i begge armene ved 35 °C, men berre i testarmen ved 22 °C. I den leukocytthaldige

kontrollarmen var plasma-Hb >1,6 g/l i alle prøvane ved 22 °C, også posen med bakterievekst (Tabell IX og Vedlegg 13). Det var meir hemolyse i testarmen enn i kontrollarmen i dei varmlagra gruppene. Posar med koagel hadde meir hemolyse enn posar utan koagel.

Tabell X. Blodgassanalysar utført på fullblod i løpet av lagring ved 4, 22 eller 35 °C. n=5, forutan der anna er oppgitt. Resultat er gjennomsnitt av målingane i kvar arm. IA=ikkje analysert. Analysen blei utført ved 37 °C.

Analyse (eining)	Arm (temperatur)	Dag 1	Dag 3	Dag 7	Dag 14	Dag 21	Dag 35
pH ()	Kontroll (4 °C)	7,162	7,110	7,020	6,920	6,838	6,698
	Test (4 °C)	7,164	7,116	7,050	6,948	6,876	6,743
	Kontroll (22 °C)	7,054	6,834	6,648 (n=4)			
	Test (22 °C)	7,066	IA	IA			
	Kontroll (35 °C)	6,868	6,672	6,694			
	Test (35 °C)	6,884	6,740 (n=2)	6,810 (n=2)			
pCO ₂ (kPa)	Kontroll (4 °C)	10,16	10,80	11,96	11,92	10,76	7,72
	Test (4 °C)	10,18	10,82	11,30	11,50	10,52	7,94
	Kontroll (22 °C)	11,72	14,00	10,13 (n=4)			
	Test (22 °C)	11,66	IA	IA			
	Kontroll (35 °C)	13,92	9,38	2,92			
	Test (35 °C)	13,34	8,30 (n=2)	2,15 (n=2)			
pO ₂ (kPa)	Kontroll (4 °C)	8,06	10,52	15,74	29,04	32,56	34,12
	Test (4 °C)	6,60	7,46	10,48	27,34	32,22	34,06
	Kontroll (22 °C)	6,84	7,42	8,58 (n=4)			
	Test (22 °C)	5,84	IA	IA			
	Kontroll (35 °C)	6,08	5,38	4,88			
	Test (35 °C)	5,70	5,55 (n=2)	8,90 (n=2)			
Base (mmol/l)	Kontroll (4 °C)	-12,74	-14,24	-16,68	-20,58	-23,82	-28,38
	Test (4 °C)	-12,60	-13,88	-16,16	-19,94	-22,92	-27,52
	Kontroll (22 °C)	-15,10	-21,84	-28,18 (n=4)			
	Test (22 °C)	-15,46	IA	IA			
	Kontroll (35 °C)	-20,78	-28,3	-31,47 (n=3)			
	Test (35 °C)	-20,62	-27,50 (n=2)	-30,30 (n=2)			
Kalium (mmol/l)	Kontroll (4 °C)	4,28	6,42	9,64	14,08	17,56	22,60 (n=4)
	Test (4 °C)	4,16	6,46	9,88	14,24	17,70	22,45 (n=4)
	Kontroll (22 °C)	3,74	5,92	10,25 (n=4)			
	Test (22 °C)	3,76	IA	IA			
	Kontroll (35 °C)	5,60	13,76	IA			
	Test (35 °C)	5,72	14,40 (n=2)	IA			
Glukose (mmol/l)	Kontroll (4 °C)	24,48	23,86	22,12	19,18	16,72	11,94
	Test (4 °C)	24,84	23,48	22,16	19,28	16,94	12,42
	Kontroll (22 °C)	22,24	16,92	10,63 (n=4)			
	Test (22 °C)	22,26	IA	IA			
	Kontroll (35 °C)	17,98	10,24	6,70			
	Test (35 °C)	17,86	11,5 (n=2)	8,85 (n=2)			
Laktat (mmol/l)	Kontroll (4 °C)	3,24	5,14	8,42	13,64	18,20	25,60
	Test (4 °C)	4,08	5,44	8,44	13,06	17,60	24,40
	Kontroll (22 °C)	6,98	13,84	27,97 (n=3)			
	Test (22 °C)	7,78	IA	IA			
	Kontroll (35 °C)	15,20	26,5 (n=2)	IA			
	Test (35 °C)	15,62	28 (n=1)	IA			

Som vist i Tabell X sank pH, base, pCO₂ og glukose mykje raskare under lagring i alle 22 og 35 °C-gruppene enn i 4 °C-gruppene samstundes som laktat og kalium steig raskare.

Skilnadane i funksjonsanalysane i test- og kontrollarmen etter filtrering utjamna seg dag 7 og 35 i begge posane lagra ved 4 °C (Tabell XI). Forutan R-verdien hadde posar i kontrollarmen lagra ved 22 °C best funksjon dag 7 og posar i begge armene lagra ved 35 °C dårlegast funksjon. Figur 2 viser korleis utviklinga i to posar, ein frå kvar studiearm, ser ut på TEG-kurver.

Tabell XI. Tromboelastografianalysar. n=5, forutan der anna er oppgitt. Resultat oppgitt er gjennomsnitt av målingane i kvar arm. IA=ikkje analysert.

Analyse (eining)	Arm (temperatur)	Dag 0_0	Dag 0_3	Dag 7	Dag 35
TEG R (minutt)	Kontroll (RT)	6,66	7,82		
	Test (RT)	6,64	8,84		
	Kontroll (4 °C)			7,58	7,00
	Test (4 °C)			7,20	6,56
	Kontroll (22 °C)			8,38 (n=4)	
	Test (22 °C)			IA	
	Kontroll (35 °C)			6,86	
	Test (35 °C)			8,25 (n=2)	
TEG K (minutt)	Kontroll (RT)	1,64	2,00		
	Test (RT)	1,68	2,52		
	Kontroll (4 °C)			2,10	4,58
	Test (4 °C)			2,32	5,66
	Kontroll (22 °C)			1,53 (n=4)	
	Test (22 °C)			IA	
	Kontroll (35 °C)			3,18	
	Test (35 °C)			5,80 (n=2)	
TEG vinkel (α)	Kontroll (RT)	66,68	61,98		
	Test (RT)	65,42	55,48		
	Kontroll (4 °C)			61,20	49,66
	Test (4 °C)			58,28	47,72
	Kontroll (22 °C)			67,03 (n=4)	
	Test (22 °C)			IA	
	Kontroll (35 °C)			50,96	
	Test (35 °C)			54,30 (n=2)	
TEG MA (mm)	Kontroll (RT)	63,40	61,92		
	Test (RT)	64,78	57,24		
	Kontroll (4 °C)			61,18	42,52
	Test (4 °C)			58,30	42,54
	Kontroll (22 °C)			65,23 (n=4)	
	Test (22 °C)			IA	
	Kontroll (35 °C)			50,40	
	Test (35 °C)			40,15 (n=2)	

Diskusjon

Effekt av filtrering

Som vist i Tabell VII, har ikkje inokulasjon av *E. coli* i fullblod rett etter tapping ført til nedsett funksjon av filteret, korkje evna til å sleppe erythrocyttar og blodplater gjennom eller til å halde leukocyttar tilbake i filteret. Hemolyse ved slutten av lagringstida i 4 °C var heller ikkje auka i testgruppa (Tabell IX), som indikerer at det ikkje er auka skade av på erythrocyttmembranane frå filtreringa.

Den umiddelbare funksjonseffekten på fullblodet målt med TEG 5000 (Tabell XI) indikerer treigare aktivering av koagulasjonen (auka R-tid), lågare fibrinogenfunksjon (nedsett alfa-vinkel), færre plater og ein totalt svakare koagelstyrke (nedsett MA). Funksjonsendringa i filtrert blod var ikkje synleg på same måte dag 7, noko som kan tyda på stress frå filtreringa kan påverke den første målinga. Endringane var små, som Figur 2 illustrerer. Det var først dag 7 for posar lagra ved 35 °C og dag 35 for posar lagra ved 4 °C at koagelstyrken var under normalområdet. Dette viser kor mykje lagringstemperatur har å seia for kvalitet.

Effekt av lagring

Stabil Hb samsvarer med hemolyse i fullblodet, altså at få erythrocyttar har blitt nedbrote under lagring, som vist i Tabell IX. EVF steig svakt, noko som kan skuldast at erythrocyttane endrar form under lagring til å bli meir sfæriske. At leukocyttalet sank raskast i 35 °C-gruppene tydar på auka celledaud ved denne temperaturen, medan fall i LPK frå dag 14 i 4 °C tyder på ein forseinka celledaud i denne gruppa. Til samanlikning fann ikkje Pidcock et al (2013) nedgang i LPK i løpet av lagring i leukocytthaldig fullblod lagra ved 4 og 22 °C i 21 dagar.⁵⁸ Dei fann stabile platetal ved 22 °C, men reduksjon ved 4 °C. Eg fann auke i TPK ved 22 °C dag 7 og mindre fall i TPK ved 4 °C enn det dei rapporterte. Meledeo et al (2019) samanlikna kvalitet i leukocytthaldig fullblod i tre ulike tilsetjingsløyser lagra ved 4 °C i 35 dagar. Dei fann same trend i LPK som eg, men ikkje like stor nedgang i TPK. Vår eigen studie frå 2020 var utført på CPDA-1-fullblod lagra kaldt. Me fann den gongen litt auka platetal i løpet av lagring i 35 dagar. Årsaka til at det er ulike resultat i ulike studiar kan skuldast andre årsaker enn endringar i fullblodet. Målevariasjon i ulike hematologi-instrument, ulikt prøvemateriale før analyse, ulik blanding av posane før prøvetaking kan vera medverkande

årsaker. På AIT fyller me prøvemateriale frå blodposar på EDTA-glas før hematologianalysar for å løysa moglege samanklistra celler før analyse.

Fullblod lagra ved 35 °C hadde hemolyse over 0,8 % dag 7 i begge armene, noko me ikkje fann i kontrollarmen lagra ved 22 °C. Den leukocyttereduserte testarmen, som hadde bakterievekst i alle posane hadde gjennomsnittleg plasma-Hb på 3,86 dag 7, som svarar til hemolyse over 0,8 %. Dette indikerer at bakterievekst har ført til auka hemolyse i posar lagra ved 22 °C.

Endring i blodgassanalysane under lagring, vist i Tabell X, tyder på mykje høgare metabolisme i dei varme gruppene, som raskare førte til dårlegare kvalitet i fullblodet. Pidcoke et al fann same nedgangen i pH og glukose og auke i laktat som eg ved 22 °C, men eg hadde ikkje same negative utviklinga som dei rapporterte ved 4 °C.⁵⁸ Hughes et al (2007) lagra fullblod ved 19 eller 25 °C i 72 timar.⁵² Både Hughes, Meledeo og Sivertsen fann den same utviklinga som eg i pH, glukose og laktat.

Det var framleis funksjonsskilnadar i dei to studiearmene dag 7, men ikkje på same måte som rett etter filtrering (Tabell XI og Figur 2). Medan posane lagra ved 4 °C i 35 dagar og 35 °C i 7 dagar viste teikn på å ha mista funksjon i form av saktare dannande koagel og færre plater, viste ikkje posane lagra ved 22 °C same trend. Det er mogleg at prøvane mine tatt frå 4 °C-gruppa ikkje var tilstrekkeleg oppvarma før analysering, som har ført til falske låge verdiar. Dei fire posane lagra ved 22 °C i sju dagar hadde sterkast koagel. Dette indikerer at platefunksjonen ikkje er utslått i fullblod lagra i sju dagar ved 22 °C. Pidcoke et al (2013) fann ein reduksjon i koagelstyrke i fullblod lagra ved 22 °C i 7 dagar, medan Hughes et al (2007) som fann vedvarande lik koagelstyrke i 72 timar. Meledeo et al og Sivertsen et al fann, som eg, redusert koagelstyrke i løpet av.¹⁹

Bakterievekst i kontrollgruppa frå dag 7 i to posar i 35 °C-gruppa og i tre posar frå dag 14 i 22 °C-gruppa viser og at leukocytane har løyst seg opp og slept ut bakteriar tidlegare i den varmaste gruppa. Dette tyder på at leukocytane hadde evna til å fagocytera bakteriar innan prøvetaking dag 1. Når eg igjen kunne påvisa bakteriar dag 7 eller dag 14 skuldast dette mest truleg nedbryting av leukocytane. Högman et al skildra same fenomenet i 1991.⁴⁹

Forfatarane skreiv at det er ein fordel å leukocytfiltrera blod før lagring for å hindra

forseinka oppvekst, då det er velkjent at leukocytter går i oppløysing under lagring i blodkomponentar og slepp ut celleinnhaldet.

Tidlegare studiar har funne ulike resultat av fagocyttering under kvile i romtemperatur. Det har blitt sett på kvile ved seks, åtte, 16 og 24 timar, medan me berre let fullblodet kvila to timar. Det har vore ulike funn, men i dei fleste tilfella har det vore ein fordel å la blodet kvila lengst mogleg før komponentproduksjon.^{38,39,49} Eg fann berre ein pose med oppvekst etter 24 timars kvile i romtemperatur. Våre resultat indikerer difor det andre har funne; lengre kvile er ein fordel for fagocyttering. Årsaka til at AIT let blodet kvila minimum to timar er for å la temperaturen i fullblodsposen seinka til romtemperatur og la leukocytter fagocyttera eventuelle bakteriar. Fordi leverandøren har anbefala filtrering innan åtte timar med platesparande filter har det blitt sett som maksimumsgrense.

Me fann ikkje vekst i fullblod lagra ved 4 °C, men rask vekst ved 22 °C i leukocyttr redusert fullblod. Dei aller fleste *E. coli*-stammene veks dårleg ved 4 °C i fullblod, PRC og platekonsentrat og godt i platekonsentrat ved 22 °C.^{36,41,42,45,48} Våre resultat stemmer overeins med dette. Me fann varierende grad av oppvekst ved 35 °C, som kan indikera at andre kjelder enn fagocytose hindrar oppvekst. To tidlegare studiar har lagra inokulert blod ved 37 °C, der ein fann oppvekst ved lagring ved 37 °C og ein ikkje fann auka vekst etter to timar i 37 °C før kjølelagring.^{47,48}

I studiar der dei har brukt ulike stammer har dei sett ulike evner til å overleva i blodkomponentar.^{37,44} Me brukte berre ei stamme. Dette kan forklara resultat me har fått som har vore ulike andre sine resultat. Grunnen til at Taha et al (2019)⁴⁶ fekk eit anna resultat enn oss ved kvile i romtemperatur var nok fordi dei hadde inokulert ein så stor konsentrasjon av *E. coli* at det ikkje var mogleg for leukocytane å fagocyttera og bakteriane dermed fekk veksa.

Metodekritisk del

I denne pilotstudien blei det ikkje tatt med ei bakteriefri kontrollgruppe. Hadde me hatt ei kontrollgruppe utan inokulerte bakteriar kunne me ha samanlikna resultat i posar med og utan bakteriar for å vurdere om bakteriar har ført til nedsett kvalitet i fullblodet. Sidan bakteriar blei inokulert i fullblod som skulle bli filtrert og funksjonen til filteret ikkje tillèt

filtrasjon av små mengder blod, kunne me ikkje fjerna halvparten av blodet før inokulasjon. Difor ville ei bakteriefri kontrollgruppe ha betydd dobbelt så mange blodgivarar i studien. Dette hadde me ikkje tid eller testkapasitet til innan rammene for ei masteroppgåve. Sidan me ønskte å veta kva leukocyttreduksjon gjorde med eventuelle bakteriar i fullblod, kom me fram til at det ikkje var naudsynt å dobla arbeidsmengd og tappingar. Me kan samanlikna kvalitets- og funksjonsresultat frå denne studien med andre studiar som har blitt gjennomført.

Dersom det hadde latt seg gjera, burde me tatt med fleire posar i studien. Då kunne me analysert resultatata statistisk for å sjå etter statistisk signifikante skilnadar.

MBF analyserte hematologi- og blodgassanalysar i studien. Avtalen me oppretta på førehand, var at analysar kjørt hos dei måtte koma i løpet av normal arbeidstid. Difor valde eg å la blodet kvila berre to timar før filtrering. Dette er vanleg prosedyre på komponentseksjonen ved AIT, der prosedyren krev filtrering av fullblod mellom to og åtte timar etter tapping. Resultata frå studien viser at dette var for kort tid til effektiv fagocyttering av dei inokulerte bakteriane.

Bakteriestamma me valde var god å jobba med på laboratoriet. Det var uproblematisk å laga bakteriefortynningar i eksponentiell vekst som blei inokulert i fullblod. Eg synast det var fint å jobba med ein bakterie eg ikkje trong vera redd for å bli smitta av. Men, om eg skulle gjort forsøket på nytt med kjennskapen eg har no ville eg valt ei anna bakteriestamme som ikkje koagulerer i fullblod, og valet ville nok falt tilbake på den gram positive *Staphylococcus aureus*.

Inokulatet hadde lågare konsentrasjon av *E. coli* enn ønska. Gjennomsnittleg estimert inokulasjon var 20,26 CFU/ml. Sjølv med lågare konsentrasjon enn ønska klarte eg å påvisa *E. coli* i alle posane. Ein lærdom frå dette forsøket var at konsentrasjonen var lågare enn forventa, og ved eit eventuelt nytt forsøk bør eg ta det med i berekninga, slik at resultatet blir nærare ønska konsentrasjon. Årsaka til at konsentrasjonen blei lågare enn ønska kan vera at piloten ikkje var godt gjennomført, slik at eg ikkje hadde funne korrekt konsentrasjon av *E. coli* ved 0,5 McFarland, og dermed konsekvent underestimerte konsentrasjonen av inokulatet. Det er like truleg at årsaka skuldast at konsentrasjonen av *E. coli* blei meir fortynna i kvart steg enn planlagt, slik som vist for dei positive kontrollane i Tabell VI. Dette

kan skuldast at pipetter med stort volum har større variasjon enn pipetter med lite volum. Ei anna årsak kan vera at bakteriar har festa seg til kvarandre, pipettespissar eller overflater i glasa undervegs, og dermed ikkje blitt fortynna korrekt.

Før studien var me ikkje oppmerksame på at oppvekst av *E. coli* (ATCC 25922) kunne føra til koagulasjon av fullblod. Ingen av bakgrunnsartiklane eg brukte har nemnt koagulasjon. Sjølv om det er kjend at sepsis med *E. coli* gir DIC,⁵⁹ hadde me ikkje forventa at dette kunne skje i fullblodsposane under lagring. Det er skildra at bakteriekontaminasjon av blodkomponentar kan gi koagel og ein brukar alltid visuell



Bilete 4. Leukocytteredusert pose lagra i 3 dagar ved 22 °C, der ein kan sjå lyse bakteriekoloniar som veks oppå celledaget og små, mørke koagel på botn av posen.

kontroll av blodkomponentar ved utlevering for å sjå etter moglege koagel.⁶⁰ I ein vidare litteraturgjennomgang etter at me oppdaga koagel i posar med oppvekst fann eg at Landsem et al (2015) publiserte ein artikkel der dei viser at *E. coli* (ATCC 33572) gir koagulasjon av fullblod grunna komplementaktivering som gir produksjon av vevsfaktor i monocytter.⁶¹ Eg kontakta Anne Landsem ved Forskningslaboratoriet hos Nordlandssykehuset per e-post. Ho meinte at denne mekanismen også moglegvis kan forklara koagulasjon etter inkubering med *E. coli*-stamma me har brukt. Likevel forklarar ikkje dette kvifor eg fekk oppvekst i posar i den leukocyttereduserte testarmen, sidan dei manglar monocytter som kan produsera vevsfaktor. Derimot har eg funne to andre artiklar som skriv at *E. coli* påverkar TLR4, som ein finn både på leukocytter og blodplater. Matus et al (2017) skriv at *E. coli* O111 induserer syntetisering av vevsfaktor frå blodplater via TRF4-aktivering, som fører til koagulering.⁶² Wang et al (2019) skriv at membranvesiklar utskild frå *E. coli* fører til disseminert intravaskulær koagulasjon ved sepsis.⁶³

Det er svært usikkert kor korrekt kvantifiseringa av *E. coli* i posar med koagel var. Eg vil anta at mengda bakteriar var ulik i koagel og flytande blod. Sidan *E. coli* har sett i gong koageldanninga er det sannsynleg at *E. coli* finnast innfiltra i koagela, men at mengda ikkje var lik som i det flytande blodet. Eg vil difor tru at prøvemengda flytande blod som blei

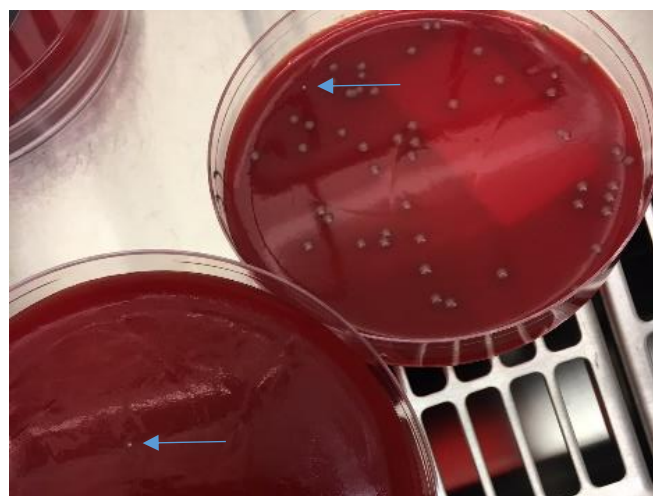
spreidd på blodagar-skåler frå posar med koagel ikkje innehalddt ei representativ mengd bakteriar for heile blodposen. Ved blanding av posane var det umogleg å løysa opp koagela. Eg blanda likevel posane på lik måte som posane utan koagel, for å sikra at celler og eventuelle bakteriar som var klistra saman eller til poseveggen var så godt løysa som mogleg. Ved overføring til prøvetakingsposen blei ulike mengder koagel med. Før pipettering av 100 µl fullbod til blodagar-skålene blei prøveglaset blanda i 5-10 sekund på prøveristar. Likevel var det i mange tilfelle vanskeleg å pipettera blod utan koagel i pipettespissen, noko som gjorde prøvetaking av fullblod med mange små koagel til ein tidkrevjande prosess.

Avvikslogg

Den utfylte avviksloggen til studien, Vedlegg 8, skildrar alle avvik som oppstod. Det som eg synast er dei viktigaste avvik, er der eg fortynna prøvematerialet for mykje før utsæd på blodagar-skåler. I dei tilfella eg fekk negative resultat i fortynna prøvar kan eg ikkje med sikkerheit seia at det ikkje var bakteriar i fullblodet. Dei tilfella der eg ikkje hadde fortynna prøven godt nok, slik at eg ikkje fekk rekna ut korrekt konsentrasjon var kjedelege, men eg fekk i det minste påvisa bakterien i fullblodet.

Ved fleire anledningar sank temperaturen under 33 °C. To posar var under 33 °C 1 time og 15 minutt, ein pose hadde eitt målepunkt under 33 °C medan to posar var under 33 °C i eit par timar. I løpet av 14 dagar er dette likevel lite. Ved ein anledning var temperaturen over 24 °C i to timar for ein pose. Også dette ser eg som kort tid i løpet av lagringstida på 14 dagar.

Det var to tilfelle av ureiningar på blodagar-skålene ved avlesing. Ein gong kom ureininga frå annan bakterie. Eg fann tre koloniar fordelt på tre skåler med ulik fortynning av prøvemateriale. Den dagen har eg notert at eg brukte hanskar under arbeid i sikkerheitsbenken, utan at eg hugsar kvifor. Vanlegvis brukte eg berre desinfiserte hanskar på tappedagen, ved behandling av bakteriefortynninga



Bilete 5. Ureining av ein ukjent koloni på to ulike blodagar-skåler. Ureininga er små, kvite koloniar medan *E. coli*-koloniar er større og gule.

til og med inokulering. I dette tilfellet har truleg hanskebruk ført til at noko, for eksempel glaset med sterilt saltvatn, eller opninga til t-ausene brukt til å spreie prøvemateriale, har blitt ureina. Ved eit anna tilfelle fekk eg ein kraftig ureining på ei av tre skåler. Den dagen var det koagel i den ufortynna prøven, som i mange tilfelle førte til vakuum i pipettespissen og plutselig sprut av prøvemateriale opp i pipettespissen. Denne dagen vil eg tru at spruten nådde sjølve pipetta, og har ført til ureining inni ein pipettespiss. Pipetta blei reingjort, desinfisert og kontrollert før ny bruk.

Ved to anledningar har sentrifugeringa av prøvar tatt frå posane blitt utført utanom prosedyren. Ein gong blei sentrifugeringa utført forseinka og ein gong blei prøvane sentrifugert ved 10.000 g i 10 minutt i staden for 2.500 g i 15 minutt. Plasma-Hb var ikkje påverka i nokon av tilfella.

TEG-analyse blei sett opp forseinka ein gong. I studien prøvde eg å analysere TEG umiddelbart etter prøvetaking for å hindra endringar i prøveglaset, særleg dag 0, . Eg trur ikkje at ein time i prøveglas har ein effekt på analysen som ikkje allereie har kome etter ei veke lagra i blodpose. Ein gong blei feil kanal starta på data, slik at analysen gjekk i koppen utan at det blei registrert på data. Starta rett kanal på data og stoppa den feile etter 1,3 minutt. Sidan kurva ikkje hadde endra seg på denne tida, la eg til tida som blei køyrd på feil kanal til R-tida til denne prøven i databasen. Dette førte truleg til $\pm 0,2$ minutt feil i databasen, som ikkje har innverknad på resultatet av studien

Det hyppigaste avviket er i dei tilfella koagel i blodposane gjorde at hematologi- og blodgassanalyser ikkje blei utført. Dette gjaldt åtte posar i testarmen dag 3 og 7 der ein pose i tillegg var så koagulert dag 7 at eg ikkje kunne pipettere blod i det heile, og ein pose i kontrollarmen dag 7. I staden for å laga eitt avvik per prøvetidspunkt, samla eg desse i tre avvik. På eitt tidspunkt var ein pose så koagulert at eg ikkje klarte å pipettere prøvemateriale frå posen, slik at eg heller ikkje kunne ta prøve til bakterievekst.

I løpet av studien førte eg opp lotnummer brukt på eit eige skjema (Vedlegg 10). Dersom det oppstod endringar i resultat som kunne skuldast utstyr eller reagens som eg brukte var det viktig å ha ei fullstendig oversikt over kor tid utstyr var tatt i bruk, og kor tid det ikkje lengre var i bruk. Heldigvis blei det ikkje nødvendig å vurdere om endringar skuldast utstyr eller reagens brukt.

Vidare studiar

Vidare studiar bør undersøkje kor lenge det er optimalt at fullblod kviler ved romtemperatur før kjølelagring, i forhold til bakterievekst. Våre resultat indikerer at fullblod bør kvila lengre enn to timar. Av praktiske omsyn ein bør tenka på er at komponentproduksjonslaboratorium sjeldan har døgn drift, slik at det er naturleg å vurdere åtte og 24 timars kvile, slik det har blitt gjort i tidlegare kvalitetsstudiar.

Sidan *E. coli* (ATCC 25922) koagulerer ved vekst i fullblod er det naturleg å velja andre bakteriestammer som ikkje fører til koagulering, slik at prøvematerialet held seg meir homogent.

For alle prøvetidspunkt fram til dag 7 i tillegg til dag 14, 21 og 35 for posar lagra ved 4 °C, sentrifugerte og frøys eg ned plasma til cytokin-analysar som ligg lagra ved -70 °C i biobanken «In vitro kvalitet av fullblod og blodkomponenter». Dette materialet kan gi verdifull informasjon. Det kan vera interessant å måla IL-1 β og TNF- α fordi dei kan seia noko om aktivering av leukocytter og blodplater, og dermed produksjon av vevsfaktor som kan ha aktivert *E. coli*.^{61,63}

Konklusjon

Resultata våre indikerer at leukocytter ikkje klarer å fagocyttera *E. coli* frå fullblod oppbevart i romtemperatur innan to timar etter tapping, men at leukocyttreduksjon etter 24 timars kvile ved 20-24 °C før kaldlagring meir effektivt hindrar oppvekst av *E. coli*.

Synlege koagel i fullblod kan skuldast kontaminering av *E. coli*. Dette visar at optisk kontroll av blodposar før utlevering eller transfusjon er viktig.

Praktisk bruk av funn i studien

Eg fann at det var ein fordel å ha leukocytter i fullblod som blei lagra varmt for å hindra oppvekst av *E. coli*. Ved kjølelagring var det ingen skilnad i bakterievekst i dei to studiearmane, som indikerer at leukocytter ikkje påverkar bakterievekst ved 4 °C. Det kan difor vera ein fordel at blod som blir tappa i vandrane blodbankar ikkje blir leukocyttreredusert.

AIT bør vurdere å la CPDA-1-fullblod kvila over natt før kjølelagring. Eg vil og anbefala at kviletida til CPD-fullblod før leukocyttrereduksjon via filtrering blir vurdert.

Litteraturliste

1. EASTRIDGE BJ, MABRY RL, SEGUIN P, CANTRELL J, TOPS T, URIBE P, MALLET O, ZUBKO T, OETJEN-GERDES L, RASMUSSEN TE, BUTLER FK, KOTWAL RS, HOLCOMB JB, WADE C, CHAMPION H, LAWNICK M, MOORES L, BLACKBOURNE LH. Death on the battlefield (2001-2011): implications for the future of combat casualty care. *J Trauma Acute Care Surg* 2012;**73**: S431-7.
2. DRAKE SA, HOLCOMB JB, YANG Y, THETFORD C, MYERS L, BROCK M, WOLF DA, CRON S, PERSSE D, MCCARTHY J, KAO L, TODD SR, NAIK-MATHURIA BJ, COX C, KITAGAWA R, SANDBERG G, WADE CE. Establishing a Regional Trauma Preventable/Potentially Preventable Death Rate. *Ann Surg* 2020;**271**: 375-82.
3. BUTLER FK, HOLCOMB JB, SCHREIBER MA, KOTWAL RS, JENKINS DA, CHAMPION HR, BOWLING F, CAP AP, DUBOSE JJ, DORLAC WC, DORLAC GR, MCSWAIN NE, TIMBY JW, BLACKBOURNE LH, STOCKINGER ZT, STRANENES G, WEISKOPF RB, GROSS KR, BAILEY JA. Fluid Resuscitation for Hemorrhagic Shock in Tactical Combat Casualty Care: TCCC Guidelines Change 14-01--2 June 2014. *J Spec Oper Med* 2014;**14**: 13-38.
4. HERVIG TK, J.; ESPINOSA, A.; HETLAND, G.; LLOHN, A.; KRISTOFFERSEN, G.; SUNDIC, T.; ARSENOVIC, M. Klinisk transfusjonshåndbok. In: transfusjonsmedisin Dnl-Nffio, ed.: Norsk forening for immunologi og transfusjonsmedisin, 2017.
5. traumatologi Nkf. *Behandling av kritiske blødninger og bruk av massiv transfusjon [monograph on the internet]*. traumeplan.no: Traumeplan NKT; 2020. Available from: <https://traumeplan.no/index.php?action=showtopic&topic=CwG6QrNZ&highlight=true>
6. HOWARD JT, KOTWAL RS, SANTOS-LAZADA AR, MARTIN MJ, STOCKINGER ZT. Reexamination of a Battlefield Trauma Golden Hour Policy 2018;**84**: 11-8.
7. KORS R. *Transfusjonens historie [monograph on the internet]*. rodekors.no: Røde Kors; 2020. Available from: <https://www.rodekors.no/gi-blod/informasjon/transfusjonens-historie/>
8. Fra Blodgiversentralen. Reportasje: NRK (the Norwegian Broadcasting Corporation), 1940:00:12:05.
9. HEIER H. BLOD! Mellom magi, myter og medisin gjennom 2500 år: Kolofon forlag, 2019.
10. THOMPSON P, STRANENES G. The History of Fluid Resuscitation for Bleeding. *Damage Control Resuscitation: Identification and Treatment of Life-Threatening Hemorrhage* 2019: 3-29.
11. FALK JL, RACKOW EC, WEIL MH. Colloid and crystalloid fluid resuscitation. *Acute Care* 1983;**10**: 59-94.
12. CAP AP, PIDCOKE HF, SPINELLA P, STRANENES G, BORGMAN MA, SCHREIBER M, HOLCOMB J, TIEN HC-N, BECKETT AN, DOUGHTY H, WOOLLEY T, RAPPOLD J, WARD K, READE M, PRAT N, AUSSET S,

- Kheirabadi B, Benov A, Griffin EP, Corley JB, Simon CD, Fahie R, Jenkins D, Eastridge BJ, Stockinger Z. Damage Control Resuscitation. *Military Medicine* 2018;**183**: 36-43.
13. Hansen LE, Haugsbø A. Leukocytffiltrering av cellulære blodprodukter. In: Helsetilsynet, ed. Rundskriv IK-13/2000: Sosial- og helsedirektoratet, 2000.
 14. Bassuni WY, Blajchman MA, Al-Moshary MA. Why implement universal leukoreduction? *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2008;**1**: 106-23.
 15. Flesland ØS, T. T.; Espinosa, A. Overvåking av blod i Norge 2019 - transfusjonskomplikasjoner. In: pasientsikkerhet Ako, ed. www.helsedirektoratet.no: Helsedirektoratet, 2019:38.
 16. Ljungman P. Risk of cytomegalovirus transmission by blood products to immunocompromised patients and means for reduction. *Br J Haematol* 2004;**125**: 107-16.
 17. Sivertsen J, Braathen H, Lunde THF, Spinella PC, Dorlac W, Strandenes G, Apelseh TO, Hervig TA, Kristoffersen EK. Preparation of leukoreduced whole blood for transfusion in austere environments; effects of forced filtration, storage agitation, and high temperatures on hemostatic function. *J Trauma Acute Care Surg* 2018;**84**: S93-s103.
 18. Bjerkvig C, Sivertsen J, Braathen H, Lunde THF, Strandenes G, Assmus J, Hervig T, Cap A, Kristoffersen EK, Fosse T, Apelseh TO. Cold-stored whole blood in a Norwegian emergency helicopter service: an observational study on storage conditions and product quality. *Transfusion* 2020;**60**: 1544-51.
 19. Sivertsen J, Braathen H, Lunde THF, Kristoffersen EK, Hervig T, Strandenes G, Apelseh TO. Cold-stored leukoreduced CPDA-1 whole blood: in vitro quality and hemostatic properties. *Transfusion* 2020;**60**: 1042-9.
 20. Apelseh TO, Strandenes G, Kristoffersen EK, Hagen KG, Braathen H, Hervig T. How do I implement a whole blood-based blood preparedness program in a small rural hospital? *Transfusion* 2020.
 21. Bjerkvig CK, Strandenes G, Eliassen HS, Spinella PC, Fosse TK, Cap AP, Ward KR. "Blood failure" time to view blood as an organ: how oxygen debt contributes to blood failure and its implications for remote damage control resuscitation. *Transfusion* 2016;**56 Suppl 2**: S182-9.
 22. de Korte D, Marcelis JH, Verhoeven AJ, Soeterboek AM. Diversion of first blood volume results in a reduction of bacterial contamination for whole-blood collections. *Vox Sang* 2002;**83**: 13-6.
 23. Jacobs MR, Good CE, Lazarus HM, Yomtovian RA. Relationship between bacterial load, species virulence, and transfusion reaction with transfusion of bacterially contaminated platelets. *Clin Infect Dis* 2008;**46**: 1214-20.
 24. Jackman RP. Immunomodulation in transfused trauma patients. *Curr Opin Anaesthesiol* 2013;**26**: 196-203.

25. Gilstad C, Roschewski M, Wells J, Delmas A, Lackey J, Uribe P, Popa C, Jardeleza T, Roop S. Fatal transfusion-associated graft-versus-host disease with concomitant immune hemolysis in a group A combat trauma patient resuscitated with group O fresh whole blood. *Transfusion* 2012;**52**: 930-5.
26. Patel KK, Patel AK, Ranjan RR, Shah AP. Transfusion associated graft versus host disease following whole blood transfusion from an unrelated donor in an immunocompetent patient. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2010;**26**: 92-5.
27. Perez P, Salmi LR, Folléa G, Schmit JL, de Barbeyrac B, Sudre P, Salamon R. Determinants of transfusion-associated bacterial contamination: results of the French BACTHEM Case-Control Study. *Transfusion* 2001;**41**: 862-72.
28. Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR, Gregory KR, Elder KV, Schreiber GB, Arduino MJ, Holt SC, Carson LA, Banerjee SN, Jarvis WR. Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion* 2001;**41**: 1493-9.
29. Illert WE, Sanger W, Weise W. Bacterial contamination of single-donor blood components. *Transfus Med* 1995;**5**: 57-61.
30. Hamill TR. The 30-minute rule for reissuing blood: are we needlessly discarding units? *Transfusion* 1990;**30**: 58-62.
31. Siblino L, Lafeuillade B, Ros A, Le Petit JC, Pozzetto B. Reduction of *Yersinia enterocolitica* load in deliberately inoculated blood: the effects of blood prestorage temperature and WBC filtration. *Transfusion* 2002;**42**: 422-7.
32. Seghatchian J. Universal leucodepletion: an overview of some unresolved issues and the highlights of lessons learned. *Transfus Apher Sci* 2003;**29**: 105-17.
33. Paruch L, Paruch AM, Sørheim R. DNA-based faecal source tracking of contaminated drinking water causing a large *Campylobacter* outbreak in Norway 2019. *Int J Hyg Environ Health* 2020;**224**: 113420.
34. Benjamin RJ, Kline L, Dy BA, Kennedy J, Pisciotto P, Sapatnekar S, Mercado R, Eder AF. Bacterial contamination of whole-blood-derived platelets: the introduction of sample diversion and prestorage pooling with culture testing in the American Red Cross. *Transfusion* 2008;**48**: 2348-55.
35. ATCC. *Escherichia coli* (ATCC 25922). In: Collection TATC, ed. www.atcc.org, 2019.
36. Kahn RA, Syring RL. The fate of bacteria introduced into whole blood from which platelet concentrates were prepared and stored at 22 or 4C. *Transfusion* 1975;**15**: 363-7.
37. Buchholz DH, AuBuchon JP, Snyder EL, Kandler R, Piscitelli V, Pickard C, Napychank P, Edberg S. Effects of white cell reduction on the resistance of blood components to bacterial multiplication. *Transfusion* 1994;**34**: 852-7.

38. Wagner SJ, Robinette D, Nazario M, Moroff G. Bacteria levels in components prepared from deliberately inoculated whole blood held for 8 or 24 hours at 20 to 24 degrees C. *Transfusion* 1995;**35**: 911-6.
39. Sanz C, Pereira A, Vila J, Faundez AI, Gomez J, Ordinas A. Growth of bacteria in platelet concentrates obtained from whole blood stored for 16 hours at 22 degrees C before component preparation. *Transfusion* 1997;**37**: 251-4.
40. Wagner SJ, Robinette D. Evaluation of an automated microbiologic blood culture device for detection of bacteria in platelet components. *Transfusion* 1998;**38**: 674-9.
41. Chen CL, Yu JC, Holme S, Jacobs MR, Yomtovian R, McDonald CP. Detection of bacteria in stored red cell products using a culture-based bacterial detection system. *Transfusion* 2008;**48**: 1550-7.
42. Stormer M, Arroyo A, Brachert J, Carrero H, Devine D, Epstein JS, Gabriel C, Gelber C, Goodrich R, Hanschmann KM, Heath DG, Jacobs MR, Keil S, de Korte D, Lambrecht B, Lee CK, Marcelis J, Marschner S, McDonald C, McGuane S, McKee M, Muller TH, Muthivhi T, Pettersson A, Radziwon P, Ramirez-Arcos S, Reesink HW, Rojo J, Rood I, Schmidt M, Schneider CK, Seifried E, Sicker U, Wendel S, Wood EM, Yomtovian RA, Montag T. Establishment of the first international repository for transfusion-relevant bacteria reference strains: ISBT working party transfusion-transmitted infectious diseases (WP-TTID), subgroup on bacteria. *Vox Sang* 2012;**102**: 22-31.
43. Ramirez-Arcos S, Perkins H, Kou Y, Mastronardi C, Kumaran D, Taha M, Yi QL, McLaughlin N, Kahwash E, Lin Y, Acker J. Bacterial growth in red blood cell units exposed to uncontrolled temperatures: challenging the 30-minute rule. *Vox Sang* 2013;**105**: 100-7.
44. Taha M, Kalab M, Yi QL, Maurer E, Jenkins C, Schubert P, Ramirez-Arcos S. Bacterial survival and distribution during buffy coat platelet production. *Vox Sang* 2016;**111**: 333-40.
45. Ketter PM, Kamucheka R, Arulanandam B, Akers K, Cap AP. Platelet enhancement of bacterial growth during room temperature storage: mitigation through refrigeration. *Transfusion* 2019;**59**: 1479-89.
46. Taha M, Kyluik-Price D, Kumaran D, Scott MD, Toyofuku W, Ramirez-Arcos S. Bacterial survival in whole blood depends on plasma sensitivity and resistance to neutrophil killing. *Transfusion* 2019;**59**: 3674-82.
47. Braude AI, Carey FJ, Siemienski J. Studies of bacterial transfusion reactions from refrigerated blood: the properties of cold-growing bacteria. *J Clin Invest* 1955;**34**: 311-25.
48. James JD, Stokes EJ. Effect of temperature on survival of bacteria in blood for transfusion; with a note on contamination by cold-growing organisms. *Br Med J* 1957;**2**: 1389-95.
49. Hogman CF, Gong J, Eriksson L, Hambræus A, Johansson CS. White cells protect donor blood against bacterial contamination. *Transfusion* 1991;**31**: 620-6.

50. Hogman CF, Gong J, Hambraeus A, Johansson CS, Eriksson L. The role of white cells in the transmission of *Yersinia enterocolitica* in blood components. *Transfusion* 1992;**32**: 654-7.
51. Shields CE. Studies on stored whole blood. IV. Effects of temperature and mechanical agitation on blood with and without plasma. *Transfusion* 1970;**10**: 155-62.
52. Hughes JD, Macdonald VW, Hess JR. Warm storage of whole blood for 72 hours. *Transfusion* 2007;**47**: 2050-6.
53. Moroff G, AuBuchon JP, Pickard C, Whitley PH, Heaton WA, Holme S. Evaluation of the properties of components prepared and stored after holding of whole blood units for 8 and 24 hours at ambient temperature. *Transfusion* 2011;**51 Suppl 1**: 7s-14s.
54. Meledeo MA, Peltier GC, McIntosh CS, Bynum JA, Cap AP. Optimizing whole blood storage: hemostatic function of 35-day stored product in CPD, CP2D, and CPDA-1 anticoagulants. *Transfusion* 2019;**59**: 1549-59.
55. Getz TM. Physiology of cold-stored platelets. *Transfus Apher Sci* 2019;**58**: 12-5.
56. Strandenes G, Sivertsen J, Bjerkvig CK, Fosse TK, Cap AP, Del Junco DJ, Kristoffersen EK, Haaverstad R, Kvalheim V, Braathen H, Lunde THF, Hervig T, Hufthammer KO, Spinella PC, Apelseth TO. A Pilot Trial of Platelets Stored Cold versus at Room Temperature for Complex Cardiothoracic Surgery. *Anesthesiology* 2020.
57. Braathen H, Sivertsen J, Lunde THF, Kristoffersen EK, Assmus J, Hervig TA, Strandenes G, Apelseth TO. In vitro quality and platelet function of cold and delayed cold storage of apheresis platelet concentrates in platelet additive solution for 21 days. *Transfusion* 2019.
58. Pidcoke HF, McFaul SJ, Ramasubramanian AK, Parida BK, Mora AG, Fedyk CG, Valdez-Delgado KK, Montgomery RK, Reddoch KM, Rodriguez AC, Aden JK, Jones JA, Bryant RS, Scherer MR, Reddy HL, Goodrich RP, Cap AP. Primary hemostatic capacity of whole blood: a comprehensive analysis of pathogen reduction and refrigeration effects over time. *Transfusion* 2013;**53 Suppl 1**: 137s-49s.
59. Lupu F, Keshari RS, Lambris JD, Coggeshall KM. Crosstalk between the coagulation and complement systems in sepsis. *Thromb Res* 2014;**133 Suppl 1**: S28-31.
60. Walther-Wenke G. Incidence of bacterial transmission and transfusion reactions by blood components. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 2008;**46**: 919.
61. Landsem A, Fure H, Christiansen D, Nielsen EW, Osterud B, Mollnes TE, Brekke OL. The key roles of complement and tissue factor in *Escherichia coli*-induced coagulation in human whole blood. *Clin Exp Immunol* 2015;**182**: 81-9.
62. Matus V, Valenzuela JG, Hidalgo P, Pozo LM, Panes O, Wozniak A, Mezzano D, Pereira J, Sáez CG. Human platelet interaction with *E. coli* O111 promotes tissue-factor-dependent procoagulant activity, involving Toll like receptor 4. *PLoS One* 2017;**12**: e0185431.

63. Wang E, Liu Y, Qiu X, Tang Y, Wang H, Xiao X, Chen F, Lu B. Bacteria-released outer membrane vesicles promote disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res* 2019;**178**: 26-33.

Artikkel

Title

Effect of Leukoreduction and Temperature on Risk of Bacterial Growth in CPDA-1 Whole Blood; a Study of *Escherichia Coli*

Author

Hanne Braathen^{1,2}

Attributors

¹Department of Immunology and Transfusion Medicine, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway

²Department of Global Public Health and Primary Care, University of Bergen, Bergen, Norway

Disclaimers

The author declare that she has no conflicts of interest relevant to the manuscript submitted to TRANSFUSION.

Corresponding author

Hanne Braathen, Jonas Lies vei 91B, N-5021 Bergen, Norway

Telephone: +47 559 72 461

Fax: +47 559 72 484

hanne.braathen@helse-bergen.no

Sources of support

I completed this trial with grants from the Institute of Biomedical Science at Norwegian Society of Engineers and Technologists and the Department of Immunology and Transfusion Medicine at Haukeland University Hospital.

Running head

E. coli in CPDA-1 whole blood

Abstract

BACKGROUND

Collection of non-leukoreduced citrate-phosphate-dextrose-adenine (CPDA-1) whole blood is performed in civilian and military walking blood banks. Due to environmental conditions, blood collected outside a blood bank may have increased risk of bacterial contamination. This study was conducted to examine the effects of leukocyte reduction and storage temperature on growth of *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) in CPDA-1 whole blood.

METHODS AND MATERIAL

450 mL CPDA-1 whole blood from ten group O donors was inoculated with *E. coli*. Test units were leukoreduced with a platelet-sparing filter two hours after inoculation. Control units remained unfiltered. Three hours after donation, whole blood was split into three bags and stored at 2-6°C, 20-24°C or 33-37°C. Bacterial growth was quantified immediately, two and three hours after inoculation, on days 1, 3, 7 and 14 for all storage temperatures, and additionally on days 21 and 35 for storage at 2-6°C.

RESULTS

Whole blood was inoculated with mean 20.26 (range 12.0-32.0) colony-forming units per mL (CFU/mL) *E. coli*. After leukoreduction through the platelet-sparing filter mean 9.32 CFU/mL (range 0.0-33.3) *E. coli* remained in the whole blood. Leukocytes in the control arm were able to phagocytose *E. coli* within 24 hours at 20-24°C and 33-37°C in nine of ten bags. However, a slow self-sterilization occurred during storage in both arms at 2-6°C.

CONCLUSIONS

Our findings indicate that leukocytes are not able to phagocytose *E. coli* within two hours after donation, while storage at 20-24°C for 24 hours leads to fewer bags with *E. coli*-contamination. Subsequent storage at 2-6°C will reduce growth of *E. coli*.

Key Words

E. coli, contamination, CPDA-1 whole blood, storage, leukoreduction, phagocytosis, walking blood bank

INTRODUCTION

All blood cellular components, including whole blood, used in Norway are leukoreduced (LR) according to regulatory requirements. Whole blood is LR with platelet sparing filters. Local standard operating procedures allow for leukoreduction by filtration between two and eight hours after donation and before refrigeration. The rationale for the holding time is that during the rest period, the leukocytes in whole blood is expected to phagocytose contaminating bacteria before removal from the blood by filtration. After filtration, whole blood is stored at 2-6°C until transfusion. Based on quality data regarding red cell storage, citrate-phosphate-dextrose-adenine (CPDA-1) could be a better storage solution because it allows for longer storage,^{1,2} but this additive solution is yet not present in a commercially available bag connected to a platelet-sparing filter.

Norwegian blood banks are hospital based. Blood is collected in GMP-approved blood donation facilities. In addition to serving the civilian hospitals, some blood banks are appointed to support the Norwegian military forces. As the supply chain may be challenging, it is necessary to establish safe systems for obtaining blood at site of injury. Under such circumstances, safe procedures covering the whole process from donor selection to transfusion have been implemented. Whole blood donated in a walking blood bank is intended for immediate use to maintain blood pressure and tissue oxygenation in the bleeding patient until surgical intervention is available.

However, in addition to immediate use, whole blood collected in a walking blood bank may also be stored refrigerated or if this possibility is not available, at room temperature. Thus, the issue of bacterial contamination is of great importance for patient safety.

The by far most applied method for leukoreduction in blood banks is removal by filtration. Based on hemovigilance data from many countries over decades, this is a safe procedure not increasing the risk of bacterial infections in the recipients. Blood collected in a walking blood bank is not LR. When personnel, often with limited training, collect blood in a walking blood bank where normal hygiene procedures cannot be accomplished, there is a higher risk of bacterial contamination in the donated blood.

In this study, I aimed to explore the effects of leukoreduction and storage temperature on bacterial growth in CPDA-1 whole blood. As a primary outcome, I investigated whether leukoreduction of whole blood protects against growth of *E. coli* during storage. As a secondary outcome, I examined whether storage at high temperatures lead to increased growth of *E. coli* and if *E. coli* affects function and quality of CPDA-1 whole blood.

MATERIALS AND METHODS

Study design and ethics

This laboratory study was performed at the Department of Immunology and Transfusion Medicine at Haukeland University Hospital between September 2019 and March 2020. The regional committees for medical and health research ethics approved the study (REC id: 2017/157). All donors gave written informed consent to participate in the study before donation.

Preparation of CPDA-1 whole blood

We collected 450 mL O RhD positive whole blood into bags with 63 mL CPDA-1 (PB-1CD456M5S, *Terumo BCT*) from ten blood donors (four female and six male). Immediately after collection and baseline sampling, the whole blood was inoculated with 1 mL 15,000 colony-forming units (CFU) *Escherichia coli* (ATCC® 25922™).

Preparation of inoculum

Before each whole blood donation, I incubated one colony of *E. coli* in 25 mL Luria-Bertoni medium at 200 rpm (311DS, Shaking Incubator, *Labnet International Inc.*) for 12-18 hours at 37°C and aerobic conditions. To make a pellet of *E. coli* in exponential growth, the tube was centrifuged at 1900 g (Kubota 8700, *Kubota Corporation*) in room temperature for 10 minutes. The pellet was resuspended in sterile saline (9 mg/mL NaCl, *B. Braun*) until OD₆₀₀ (DEN-1B McFarland Densitometer, *BioSan*) and further diluted to 15,000 CFU/mL. A 1 mL-sample of the diluted *E. coli* was kept on ice until inoculation. To calculate the inoculation concentration and confirm the presence of *E. coli* in the inoculate, a 10-fold dilution of the inoculation sample was quantified as described below.

Storage and sampling of CPDA-1- whole blood

After two hours rest at room temperature, the units in the test arm (n=5) were LR with a platelet-sparing filter (Imuflex WB-SP, BB*LGQ456E6, *Terumo BCT*), whereas units in the control arm (n=5) remained unfiltered. After three hours, the units were gently mixed and transferred to three final storage bags (Teruflex, BB*T015CM, *Terumo BCT*) which were kept at 2-6°C (4°C) for 35 days and at 20-24°C (22°C) or 33-37°C (35°C) for 14 days. The units were sampled by sterile welding of a Teruflex bag to the storage bags. The bags were gently mixed before an appropriate volume was removed. The sampling time points were as follows: Days

1, 3, 7 and 14 for all storage temperatures and additionally on days 21 and 35 for bags stored at 4°C.

Laboratory investigations

To ensure that there were no complications from other bacteria already present in the whole blood, I performed bacterial controls immediately after donation and before inoculation with *E. coli*. A 3-way stopcock (Discofix® C, *B. Braun Melsungen AG*) was sterile-welded to the whole blood bag and 10 mL whole blood was transferred aseptically to aerobic (BacT/ALERT FA Plus, *bioMérieux SA*) and anaerobic (BacT/ALERT FN Plus, *bioMérieux SA*) culture bottles, which were incubated at 36°C for 7 days (BacT/ALERT® 3D 60, *bioMérieux SA*).

Quantification of *E. coli* was performed by pipetting and dispersing 100 µL whole blood onto blood agar plates in triplicate. Where appropriate based on odour, clots and previous results, I diluted the samples in 10-fold increments with sterile saline and dispersed at least three dilution steps. The blood agar plates were incubated at 37°C for 18 to 24 hours. Plates with <200 colonies were counted. Mean of three plates was used to calculate CFU/mL *E. coli* in whole blood.

Residual WBC (rWBC) was counted by flow cytometry (BD Leucocount Kit/BD FACSCanto II, *BD Biosciences*) after leukoreduction of the test units. Hematology and blood gas parameters were measured at all sample points, except day 14 for bags stored at 22 and 35°C. If visible clots were detected, these tests were not analyzed because the clots would block capillaries in the instruments. Hemoglobin (HBG), haematocrit (HCT), platelet count (PLT) and leukocyte count (WBC) were analyzed in K2EDTA on a hematology analyzer (Cell-Dyn Sapphire, *Abbott Diagnostics*). Plasma-hemoglobin (plasma-HGB) was measured using a

photometer (HemoCue Plasma/Low Hb, *HemoCue AB*). pH, pO₂, pCO₂, potassium, glucose and lactate were measured on a blood gas analyzer (ABL825 FLEX, *Radiometer Medical ApS*). Viscoelastic hemostatic properties were measured by thromboelastography (TEG 5000, *Haemonetics Corporation*) immediately after donation, at three hours and on day 7. Bags stored at 4°C were additionally measured on day 35. Briefly, 1 mL of whole blood was activated with 40 µL of kaolin of which 340 µL was transferred to a plain cup containing 20 µL of 0.2 M CaCl₂ to overturn the effect of citrate. The analysis ran until 30 minutes after reaching MA. The parameters recorded from TEG analysis were time to first clot formation (R), time from R until the clot reached 20 mm (K), rate of clot formation (α), and maximum clot strength (MA).

Visual inspection

From day 1, I performed a visual inspection of the blood bags to investigate if there were any changes occurring. Clotting and the color of whole blood were evaluated. After the initial observations, I gently mixed the bags to get a second judgement of the blood qualities.

Statistical analysis

SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0. Armonk, NY: IBM Corp.) was used to store the database and perform statistical analyses. Due to the low number of whole blood bags in this study, I only performed descriptive analyses, which are presented as mean (range).

RESULTS

450 mL CPDA-1 whole blood from ten group O blood donors was inoculated with 20.26 (12.0-32.0) *E. coli* calculated from the positive controls of the inoculation samples. Samples

taken immediately after inoculation of *E. coli* confirmed recovery of the inoculated *E. coli* in all bags with a recovered *E. coli* concentration of 11.67 CFU/mL (3.3-26.7).

Effect of leukoreduction on growth of *E. coli*

After two hour rest at room temperature, *E. coli* was still detectable in nine of ten units with 13.00 CFU/mL (0.0-23.3, n=10). Five units in the test arm were then LR through a platelet-sparing filter, which did not remove *E. coli* from the whole blood. When measured three hours after inoculation, the LR and the non-leukoreduced (nLR) arm had a concentration of 9.32 CFU/mL (0.0-33.3, n=5) and 13.34 CFU/mL (3.3-26.7, n=5) respectively (Table 1).

Further, a rWBC concentration of 0.09×10^6 /unit (0.0-0.3) was detected in four units in the test arm after leukoreduction. The fifth unit had bacterial growth due to a delay in analysis, which led to a measuring error.

Effect of storage temperature on growth of *E. coli*

Refrigerated storage at 4°C inhibited growth of *E. coli* in both arms. All bags stored at 4°C had detectable growth at least one of the first seven days, while none of the bags had detectable growth on days 14, 21 and 35 (Table 2).

The bags in the LR arm stored at 22°C had 2.10×10^5 CFU/mL (2.0×10^3 - 8.0×10^5) *E. coli* from day 1, reaching 6.20×10^8 CFU/mL (4.0×10^8 - 7.0×10^8) on day 14 (Table 2). In the nLR arm, only one bag had detectable growth on day 1, later reaching 2×10^8 CFU/mL on day 14. Four of the five bags in the control arm had detectable growth on day 14 (Table 2). One bag had visible clots on day 14 but no detectable growth in a 1:10⁶ dilution.

Three of five bags in the LR arm stored at 35°C had bacterial growth from day 1, while two bags had no detectable growth throughout storage for up to 14 days (Table 2). No nLR bags stored at 35°C had detectable growth on days 1 and 3. There was, however, detectable

growth from day 7 in two of five bags. One of the bags with detectable growth on day 7 was completely coagulated on day 14, which made sampling impossible. One bag had visible clots on day 14, but no detectable growth with a dilution of $1:10^3$.

Visual inspection

All bags with exponential growth of *E. coli* provided visible clots from day 3 onwards, contrasting no visible clots on day 1 (Illustration 1). One bag in the control arm had no visible clots despite an *E.coli* concentration of 7.0×10^5 CFU/mL on day 14. This bag had no detectable growth on day 7.

The storage bags used in this study were gas permeable and I found that erythrocytes in bags stored at 4°C became more and more vibrantly red, which coincided with an increase in pO₂ levels from mean 7.3 kPa on day 1 to 34.1 kPa on day 35 (n=10). Whole blood stored at 22°C and 35°C became darker in color, which coincided with stable pO₂ but not with detectable bacterial growth. Visual inspection of the bags before mixing did not always show hemolysis that had occurred since the last sampling. In seven bags with mean plasma-HGB of 0.47 g/L (range 0.4-0.6) at the previous sample-point and no visible hemolysis before mixing, I found plasma-HGB levels above accepted limits with mean 5.71 g/L (range 2.2-15.1).

Five bags stored at 35°C, three in the LR arm and two in the nLR arm, had visible air bubbles in the bag on day 3. The three bags in the test arm had extensive growth, while the two bags in the control arm had no detectable bacterial growth.

There was a distinct smell from bags with bacterial growth, which corresponded to the extent of bacterial growth.

The effects of *E.coli* on functional and quality control markers

Samples for functional test and quality control analysis were taken on day one from all bags, but from day three, all bags with exponential growth of *E. coli* had clots of differing sizes, which made analysis in automated analyzers impossible. Only bacterial quantification and plasma-HGB was performed on the clotted samples. Table 3 shows hematology and blood gas results from the bags stored at 4°C. The results are presented as mean of each arm.

DISCUSSION

Escherichia coli (ATCC® 25922™) is a strain of bacteria used in many laboratory experiments.³⁻⁷ It has a rapid growth rate, is activated, but not killed by complement, does not produce verotoxin and is coagulase negative.⁸ The bacterium enabled us to examine bacterial growth in whole blood bags with and without leukoreduction, since *E. coli*, as observed in our data, do not absorb to the filter during leukoreduction.

Effect of leukoreduction on growth of *E. coli*

Our results indicate that a rest period of two hours before leukoreduction is insufficient for phagocytosis of inoculated *E. coli* by leukocytes in whole blood. A longer resting period at 22°C would probably facilitate phagocytosis⁹ and thereby product sterility as the phagocytosed bacteria are removed during filtration.¹⁰ Sanz et al (1995) showed that prolonged storage of whole blood at room temperature for 16 hours yielded fewer *E. coli* than whole blood held for six hours.¹¹ This is indicated in our results, where 80% of the non-filtered bags had undetectable growth after 24 hours at 22°C while 10% had undetectable growth after two hours. A slight decline in detectable bacteria was observed in the LR arm immediately after filtration, probably due to some removal by the filter. Moroff et al (2011) showed that in vivo survival in platelets stored for five days and red cells stored for 35 days

was similar when whole blood was held at room temperature for 8 or 24 hours before component preparation.¹²

For the nLR bags stored at 4°C, I observed a peak in growth on day 1, which may be a result of continued growth before the temperature dropped after room temperature storage.^{13,14}

Effect of storage temperature on growth of *E. coli*

During storage at 4°C, there was no difference in bacterial growth in the two study arms except for the transitory incline on day 1 in the nLR arm. After day 7, *E. coli* was undetectable in all bags stored at 4°C. This phenomenon with auto-sterilization has been described previously for packed red cells contaminated with *E. coli*^{5,15} as well as a bacteriostatic effect in platelet concentrates stored at 4°C for three and five days.^{7,16} Braude et al (1955) found that only some strains of *E. coli* survived in citrated blood stored at 4-8°C for 20 days.¹⁷ As long as whole blood is stored at 4°C there is no difference in bacterial growth by *E. coli* in LR and nLR bags.

There was a delay in bacterial growth in nLR whole blood stored at 22 or 35°C. This is in accordance with previous literature reporting that leukocytes can phagocytose *E. coli* in whole blood at 22 and 35°C.¹⁸ However, the phagocytosis is temperature-dependent,¹⁹ and our results suggest that the phagocytosis is better preserved at 35°C as compared to 22°C and 4°C. At 35°C, two of five bags in both arms did not have detectable growth during storage. However, storage at 35°C is not advisable due to the reduced quality of whole blood.

The LR whole blood stored at 22°C had seemingly no protection against bacterial proliferation since all five bags showed exponential growth from day 1. However, nLR whole blood was able to phagocytose *E. coli* in four of five bags and keep the bacteria undetectable for a period. However, when the leukocytes disintegrated and bacteria again were released

into the whole blood, *E. coli* proliferated and detectable growth were observed on day 14. For the fifth nLR bag stored at 22°C, in which bacterial growth was demonstrated already on storage day 1, the WBC count was $3.2 \times 10^9/L$, lower than in the other four bags (range $3.7-6.3 \times 10^9/L$). As I do not have data on the concentration of different leukocyte subsets, I can only speculate that the whole blood of some donors may be incapable of executing phagocytosis at a sufficient level.²⁰

Visual inspection

Visual inspection of all blood components before release is an important part of a quality control system.²¹ Bacterial contamination may lead to discoloration and hemolysis, which may be detectable by visual inspection.²² Sealed segments of tubing attached to the bag may be used to assess the bag for changes in colour.²³ When whole blood bags are stored upright, red cells sediment, and the supernatant should, under ideal conditions be a clear yellow. Visual inspection of our bags before sampling did not always show discoloration in the supernatant. However, the change in color was visible in centrifuged tube samples and in the supernatant after the bags had been mixed and the cells had sedimented anew. A possible way of visually detecting hemolysis of whole blood could be to turn the bags over once daily and then keep them upright to make sedimentation reveal the true color of plasma before issuing.^{23,24}

Red cells in bags stored at 35°C became darker in color than bags stored at 22°C regardless of detectable bacterial growth, indicating that bacterial growth was not the leading cause of discoloration of the cells in this study, rather an increasing plasma-HGB and stable pO₂. Red cells in bags stored at 4°C became vibrantly red during storage with simultaneous increasing pO₂ levels.

Clot formation is known to accompany bacterial contamination of red cell concentrates.²⁵ A result of bacterial growth at 22°C and 35°C was extensive coagulation of the whole blood.^{26,27} There was, however, a window period where bacterial growth was detected by testing without any visual signs of infection. No bags had visible clots before day 3, while nine bags stored at 22 and 35°C had detectable growth of *E. coli* on day 1. One of these bags had 2.4×10^7 CFU/mL, which is associated with serious transfusion reactions and possible fatality.^{28,29} On day 3, nine of ten bags had clinically significant concentrations of *E. coli*.

The effects of *E. coli* on functional and quality control markers

The low number of bags in our study prevents statistical comparative analyses. However, as seen in Table 3, whole blood stored at 4°C did not have hemolysis >0.8% at end of storage in either arm. As expected with the short lifespan of leukocytes, there was a declining number in the nLR arm. The LR arm had fewer platelets at the end of storage, which may have started at filtration, where I found a 10% (4, 21) loss. Sivertsen et al (2020) found similar results in cold-stored leukoreduced CPDA-1 whole blood.²

Limitations of our study

The sampling volume of 100 µL whole blood in triplicate for bacterial quantification has its limits. However, it is common practice.^{30,31} In bags with low concentration of bacteria, there is a possibility of false negative results. In our study, two bags with detectable bacteria immediately after inoculation but no detectable bacteria three hours after inoculation had detectable *E. coli* at a later time-point, which confirm false negative results in bags with few colony-forming units.

I could only collect samples for laboratory investigation from whole blood without clots. Since five LR bags stored at 22 and three LR bags stored at 35°C developed clots, I missed almost all samples after day 1 in the test arm.

Conclusions

LR by filtration two hours after donation did not protect whole blood from growth of *E. coli*, as the bacteria passed the filter simultaneously as bactericidal protection from leukocytes was removed. There was less growth of *E. coli* in nLR whole blood at 22°C and 35°C. However, during storage at 4°C a slow self-sterilization occurred. Our findings indicate that postponed filtration will better protect against bacterial contamination. I found more platelets and no reduced quality in nLR whole blood stored at 4°C compared to LR. Further studies should be performed to find the ideal time to transfer whole blood into cold storage.

Acknowledgements

I thank the staff at the Microbiology Department for the strain of *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) and guidance in performing our bacterial research. I also thank the staff at the Department of Immunology and Transfusion Medicine and the Department of Clinical Chemistry and Pharmacology for their invaluable help.

References

1. Sivertsen J, Braathen H, Lunde THF, Spinella PC, Dorlac W, Strandenes G, Apelseth TO, Hervig TA, Kristoffersen EK. Preparation of leukoreduced whole blood for transfusion in austere environments; effects of forced filtration, storage agitation, and high temperatures on hemostatic function. *J Trauma Acute Care Surg* 2018;**84**: S93-s103.
2. Sivertsen J, Braathen H, Lunde THF, Kristoffersen EK, Hervig T, Strandenes G, Apelseth TO. Cold-stored leukoreduced CPDA-1 whole blood: in vitro quality and hemostatic properties. *Transfusion* 2020;**60**: 1042-9.
3. Widmer AF, Wiestner A, Frei R, Zimmerli W. Killing of nongrowing and adherent *Escherichia coli* determines drug efficacy in device-related infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;**35**: 741-6.
4. Hakanen A, Huovinen P, Kotilainen P, Siitonen A, Jousimies-Somer H. Quality control strains used in susceptibility testing of *Campylobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2002;**40**: 2705-6.
5. Chen CL, Yu JC, Holme S, Jacobs MR, Yomtovian R, McDonald CP. Detection of bacteria in stored red cell products using a culture-based bacterial detection system. *Transfusion* 2008;**48**: 1550-7.
6. Ramirez-Arcos S, Perkins H, Kou Y, Mastronardi C, Kumaran D, Taha M, Yi QL, McLaughlin N, Kahwash E, Lin Y, Acker J. Bacterial growth in red blood cell units exposed to uncontrolled temperatures: challenging the 30-minute rule. *Vox Sang* 2013;**105**: 100-7.
7. Ketter PM, Kamucheka R, Arulanandam B, Akers K, Cap AP. Platelet enhancement of bacterial growth during room temperature storage: mitigation through refrigeration. *Transfusion* 2019;**59**: 1479-89.
8. ATCC. *Escherichia coli* (ATCC 25922). In: Collection TATC, ed. www.atcc.org, 2019.

9. Hogman CF, Gong J, Eriksson L, Hambræus A, Johansson CS. White cells protect donor blood against bacterial contamination. *Transfusion* 1991;**31**: 620-6.
10. Buchholz DH, AuBuchon JP, Snyder EL, Kandler R, Piscitelli V, Pickard C, Napychank P, Edberg S. Effects of white cell reduction on the resistance of blood components to bacterial multiplication. *Transfusion* 1994;**34**: 852-7.
11. Sanz C, Pereira A, Vila J, Faundez AI, Gomez J, Ordinas A. Growth of bacteria in platelet concentrates obtained from whole blood stored for 16 hours at 22 degrees C before component preparation. *Transfusion* 1997;**37**: 251-4.
12. Moroff G, AuBuchon JP, Pickard C, Whitley PH, Heaton WA, Holme S. Evaluation of the properties of components prepared and stored after holding of whole blood units for 8 and 24 hours at ambient temperature. *Transfusion* 2011;**51 Suppl 1**: 7s-14s.
13. Pietersz RN, Reesink HW, Pauw W, Dekker WJ, Buisman L. Prevention of *Yersinia enterocolitica* growth in red-blood-cell concentrates. *Lancet* 1992;**340**: 755-6.
14. Wenz B, Burns ER, Freundlich LF. Prevention of growth of *Yersinia enterocolitica* in blood by polyester fiber filtration. *Transfusion* 1992;**32**: 663-6.
15. Ramirez-Arcos S, Mastronardi C, Perkins H, Kou Y, Turner T, Mastronardi E, Hansen A, Yi QL, McLaughlin N, Kahwash E, Lin Y, Acker J. Evaluating the 4-hour and 30-minute rules: effects of room temperature exposure on red blood cell quality and bacterial growth. *Transfusion* 2013;**53**: 851-9.
16. Kahn RA, Syring RL. The fate of bacteria introduced into whole blood from which platelet concentrates were prepared and stored at 22 or 4C. *Transfusion* 1975;**15**: 363-7.
17. Braude AI, Carey FJ, Siemienski J. Studies of bacterial transfusion reactions from refrigerated blood: the properties of cold-growing bacteria. *J Clin Invest* 1955;**34**: 311-25.

18. Huang L. Growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 in mechanically-tenderized beef. *Int J Food Microbiol* 2010;**140**: 40-8.
19. Leijh PC, van den Barselaar MT, van Zwet TL, Dubbeldeman-Rempt I, van Furth R. Kinetics of phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by human granulocytes. *Immunology* 1979;**37**: 453-65.
20. Süss J, Bakács T, Balázs C. The phagocytosis capacity assay: a new radiometric phagocytosis test for clinical use. *J Immunol Methods* 1982;**53**: 69-75.
21. Walther-Wenke G. Incidence of bacterial transmission and transfusion reactions by blood components. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 2008;**46**: 919.
22. Sowemimo-Coker SO. Red blood cell hemolysis during processing. *Transfus Med Rev* 2002;**16**: 46-60.
23. Kim DM, Brecher ME, Bland LA, Estes TJ, Carmen RA, Nelson EJ. Visual identification of bacterially contaminated red cells. *Transfusion* 1992;**32**: 221-5.
24. Netz UJ, Hirst, L., & Friebel, M. . Non-invasive detection of free hemoglobin in red blood cell concentrates for quality assurance. *Photonics & Lasers in Medicine* 2015;**4(2)**: 193-5.
25. Walther-Wenke G. Bacterial contamination of blood components—incidence and significance for homologous and autologous transfusion. *Journal of Laboratory Medicine* 2006;**30**: 66-73.
26. Landsem A, Fure H, Christiansen D, Nielsen EW, Osterud B, Mollnes TE, Brekke OL. The key roles of complement and tissue factor in *Escherichia coli*-induced coagulation in human whole blood. *Clin Exp Immunol* 2015;**182**: 81-9.
27. Lupu F, Keshari RS, Lambris JD, Coggeshall KM. Crosstalk between the coagulation and complement systems in sepsis. *Thromb Res* 2014;**133 Suppl 1**: S28-31.

28. Seghatchian J. Bacterial contamination of blood components. *Transfus Apher Sci* 2001;**25**: 147-50.
29. Yomtovian R, Brecher ME. pH and glucose testing of single-donor apheresis platelets should be discontinued in favor of a more sensitive detection method. *Transfusion* 2005;**45**: 646-8.
30. Siblino L, Lafeuillade B, Ros A, Le Petit JC, Pozzetto B. Reduction of *Yersinia enterocolitica* load in deliberately inoculated blood: the effects of blood prestorage temperature and WBC filtration. *Transfusion* 2002;**42**: 422-7.
31. Kim DM, Brecher ME, Bland LA, Estes TJ, McAllister SK, Agüero SM, Carmen RA, Nelson EJ. Prestorage removal of *Yersinia enterocolitica* from red cells with white cell-reduction filters. *Transfusion* 1992;**32**: 658-62.

Tables

Table 1. Estimated and detected growth of *E. coli* in CPDA-1 whole blood on donation day. Quantification of *E. coli* was performed by dispersing 100 µL whole blood onto blood agar plates in triplicate. The blood agar plates were incubated at 37°C for 18 to 24 hours. Plates with <200 colonies were counted. Mean of three plates was used to calculate CFU/mL *E. coli* in whole blood.

	Estimated inoculation	Immediately after inoculation	Two hour rest	Three hour rest or filtration
	20.9	26.7	23.3	10.0
Non-leukoreduced control arm	18.6	3.3	20.0	10.0
	12.0	10.0	20.0	3.3
	23.2	20.0	16.7	26.7
	32.0	10.0	6.7	16.7
Mean	21.34	14.00	17.34	13.34
	23.3	6.7	3.3	3.3
Leukoreduced test arm	15.7	6.7	10.0	10.0
	18.0	10.0	23.3	33.3
	19.9	13.3	0.0	0.0
	19.0	6.7	6.7	0.0
Mean	19.18	8.68	8.86	9.32

Table 2. Estimated and detected growth of *E. coli* in CPDA-1 whole blood during storage at 4, 22 and 35°C. Quantification of *E. coli* was performed by dispersing 100 µL whole blood onto blood agar plates in triplicate. Where appropriate, I diluted the samples in 10-fold increments with sterile saline and dispersed at least three dilution steps. The blood agar plates were incubated at 37°C for 18 to 24 hours. Plates with <200 colonies were counted. Mean of three plates was used to calculate CFU/mL *E. coli* in whole blood.

* Three bags had no detectable growth in the dilutions used at that sample point.

† Four bags had >200 colonies on the blood-agar plates with the dilutions used. I was unable to estimate the correct concentration of bacteria in these samples.

‡ Two bags had no detectable growth in the dilutions used. However, due to clots in the bags I suspect false negative results.

Storage at 4°C	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	Day 21	Day 35
	66.7	30.0	6.7	0.0	0.0	0.0
Non-leukoreduced control arm	0.0	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0
	50.0	16.7	3.3	0.0	0.0	0.0
	43.3	6.7	6.7	0.0	0.0	0.0
	26.7	20.0	20.0	0.0	0.0	0.0
Mean	37.54	15.34	7.34	0.00	0.00	0.00
	0.0	16.7	6.7	0.0	0.0	0.0
Leukoreduced test arm	3.3	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0
	23.3	20.0	3.3	0.0	0.0	0.0
	0.0	13.3	0.0	0.0	0.0	0.0
	16.7	0.0	3.3	0.0	0.0	0.0
Mean	9.06	10.66	2.66	0.00	0.00	0.00

Storage at	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14
22°C				
	0.0*	0.0	0.0	3.6x10 ⁷
Non-leukoreduced control arm	0.0	0.0	0.0	2.0x10 ⁵ †
	0.0	0.0	0.0	0.0‡
	0.0	0.0	0.0	7.0x10 ⁵
	1.4x10 ³	5.0x10 ⁵	4.4x10 ⁷	2.5x10 ⁸
Mean	3.58x10²	1.01x10⁵	8.73x10⁶	6.85x10⁷
	2.0x10 ³ †	1.4x10 ⁸	2.3x10 ⁸	6.4x10 ⁸
Leukoreduced test arm	3.3x10 ⁴	3.9x10 ⁷	1.9x10 ⁸	6.8x10 ⁸
	8.0x10 ⁵	3.6x10 ⁶	1.1x10 ⁸	4.0x10 ⁸
	1.9x10 ⁴	3.3x10 ⁶	1.8x10 ⁸	6.7x10 ⁸
	2.0x10 ⁵	2.7x10 ⁷	1.9x10 ⁸	7.0x10 ⁸
Mean	2.10x10⁵	4.25x10⁷	1.82x10⁸	6.20x10⁸
35°C				
	0.0*	0.0	0.0	0.0‡
Non-leukoreduced control arm	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	2.0x10 ³ †	NA
	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	1.8x10 ⁴	1.2x10 ⁹
Mean	0.00	0.00	4.42x10³	3.91x10⁸

	2.0×10^3 †	4.5×10^8	8.7×10^8	6.3×10^8
Leukoreduced	1.0×10^4	9.7×10^7	6.2×10^8	3.5×10^8
test arm	0.0*	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0	0.0
	2.4×10^7	4.3×10^8	7.8×10^8	6.2×10^8
Mean	7.94×10^6	1.94×10^8	4.54×10^8	3.20×10^8

Table 3. Results of blood gas analysis and hematology analyses on whole blood stored at 4°C from day 1 to end of storage day 35. pH, pCO₂, pO₂, potassium, glucose and lactate were measured on a blood gas analyzer (ABL825 FLEX, *Radiometer Medical ApS*). Hemoglobin (HGB), haematocrit (HCT), platelet count (PLT) and leukocyte count (WBC) were analyzed in K2EDTA on a hematology analyzer (Cell-Dyn Sapphire, *Abbott Diagnostics*). Plasma-hemoglobin (plasma-HGB) was measured using a photometer (HemoCue Plasma/Low Hb, *HemoCue AB*). Hemolysis was calculated from HGB, HCT and plasma-HGB.

Analysis	Arm	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	Day 21	Day 35
pH	Control	7.162	7.110	7.020	6.920	6.838	6.698
	Test	7.164	7.116	7.050	6.948	6.876	6.743
pCO ₂ (kPa)	Control	10.16	10.80	11.96	11.92	10.76	7.72
	Test	10.18	10.82	11.30	11.50	10.52	7.94
pO ₂ (kPa)	Control	8.06	10.52	15.74	29.04	32.56	34.12
	Test	6.60	7.46	10.48	27.34	32.22	34.06
Potassium (mmol/L)	Control	4.28	6.42	9.64	14.08	17.56	22.60 (n=4)
	Test	4.16	6.46	9.88	14.24	17.70	22.45 (n=4)
Glucose (mmol/L)	Control	24.48	23.86	22.12	19.18	16.72	11.94
	Test	24.84	23.48	22.16	19.28	16.94	12.42
Lactate (mmol/L)	Control	3.24	5.14	8.42	13.64	18.2	25.6
	Test	4.08	5.44	8.44	13.06	17.6	24.4
HGB (g/dL)	Control	12.16	12.20	12.12	12.18	12.26	12.16
	Test	12.20	12.28	12.30	12.40	12.32	12.34
HCT	Control	0.382	0.384	0.388	0.395	0.394	0.396

(1)	Test	0.382	0.380	0.390	0.386	0.392	0.400
Plasma-	Control	0.32	0.34	0.36	0.54	0.60	0.70
HGB	Test	0.30	0.30	0.40	0.42	0.48	0.66
(g/L)							
Hemolysis	Control	0.16	0.18	0.20	0.28	0.28	0.34
(%)	Test	0.14	0.16	0.22	0.22	0.24	0.32
PLT	Control	156.8	158.8	155.4	123.2	121.8	114.6
($\times 10^9/L$)	Test	142.8	138.2	132.0	116.8	92.6	71.6
WBC	Control	4.38	4.36	4.30	3.94	3.42	2.88
($\times 10^9/L$)							

Table 4. Viscoelastic hemostatic properties measured by thromboelastography (TEG 5000, *Haemonetics Corporation*) immediately after donation (0_0), after three hours hold (0_3) and on day 7 and day 35 in bags stored at 4°C. Bags in the test arm were leukoreduced by filtration between day 0_0 and 0_3. The parameters recorded were time to first clot formation (R), time from R until the clot reached 20 mm (K), rate of clot formation (α), and maximum clot strength (MA).

Analysis	Sample point	Day 0_0	Day 0_3	Day 7	Day 35
	Temperature	RT	RT	4°C	4°C
TEG R	Control	6,66	7,82	7.58	7.00
	Test	6,64	8,84	7.20	6.56
TEG K	RT control	1.64	2.00	2.10	4.58
	RT test	1.68	2.52	2.32	5.66
TEG α	RT control	66.68	61.98	61.20	49.66
	RT test	65.42	55.48	58.28	47.72
TEG MA	RT control	63.40	61.92	61.18	42.52
	RT test	64.78	57.24	58.30	42.54

Illustrations

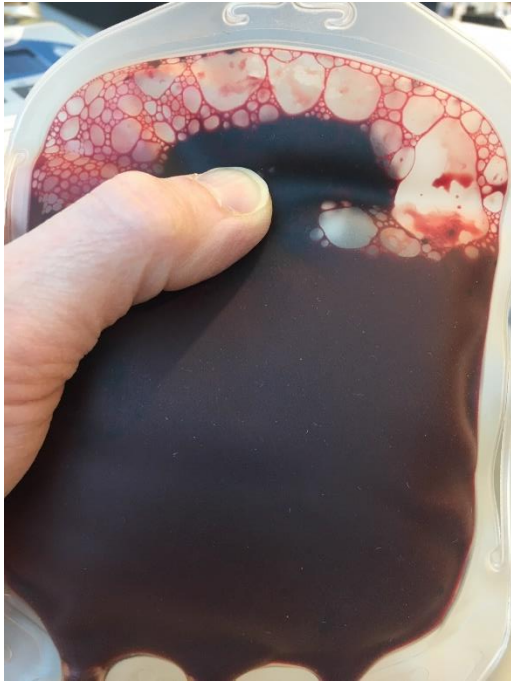


Illustration 1. Visible clot in whole blood stored at 22°C for three days.