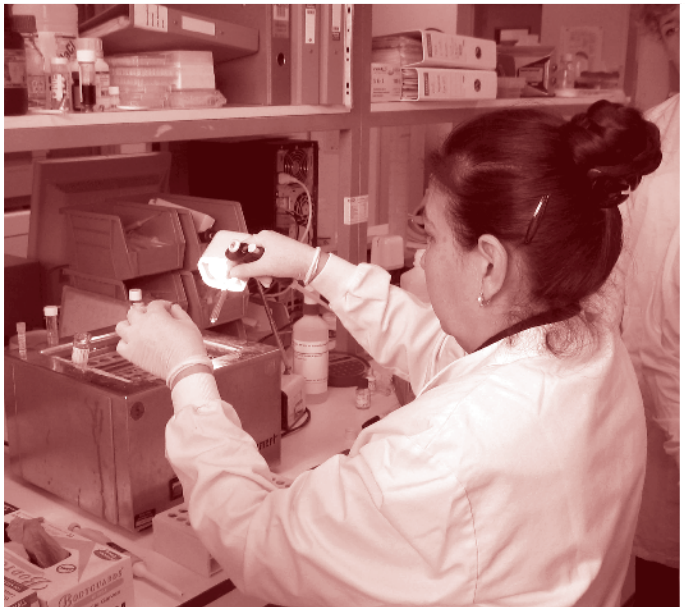
تشخيص مرض الهيموفيليا واضطرابات النزف الأخرى

دليل المختبر

الطبعة الثانية



Steve Kitchen

Angus McCraw

Marión Echenagucia

WORLD FEDERATION OF
HEMOPHILIA
FÉDÉRATION MONDIALE DE L'HÉMOPHILIE
FEDERACIÓN MUNDIAL DE HEMOFILIA
Treatment for All

صدَر عن الاتحاد العالمي للهيموفيليا (World Federation of Hemophilia (WFH

© World Federation of Hemophilia, 2012

يشجع الاتحاد العالمي للهيموفيليا على إعادة توزيع مطبوعاته لأغراض تعليمية من قبل المنظمات غير الربحية للهيموفيليا/ واضطرابات النزف. لغرض الحصول على ترخيص بإعادة طبع أو إعادة توزيع أو ترجمة هذه المطبوعة، يرجى الاتصال بقسم التواصل على العنوان التالي.

تتوفر هذه المطبوعة على شكل ملف PDF باللغات الإنجليزية والفرنسية والأسبانية والعربية والروسية والصينية على موقع الاتحاد العالمي للهيموفيليا www.wfh.org. يمكن طلب مطبوعات إضافية من:

World Federation of Hemophilia
1425 René Lévesque Boulevard West, Suite 1010
Montréal, Québec H3G 1T7
CANADA
Tel.: (514) 875-7944
Fax: (514) 875-8916

E-mail: wfh@wfh.org
Internet: www.wfh.org

تشخيص مرض الهيموفيليا واضطرابات النزف الأخرى

دليل المختبر

الطبعة الثانية

Steve Kitchen
أخصائي تدريب المختبرات في الاتحاد العالمي للهيموفيليا (WFH)
Sheffield Haemophilia and Thrombosis Centre
Royal Hallamshire Hospital
Sheffield, U.K.

Angus McCraw
أخصائي تدريب المختبرات في الاتحاد العالمي للهيموفيليا (WFH)
Katharine Dormandy Haemophilia Centre and Thrombosis Unit
The Royal Free Hospital
London, U.K.

Marión Echenagucia
(مشارك في تأليف كتاب الأتمتة)
Banco Municipal de Sangre del D.C.
Universidad Central de Venezuela
Caracas, Venezuela

نيابة عن
لجنة علوم المختبرات في الاتحاد العالمي
للهيموفيليا (WFH)
الرئيس (2010): Steve Kitchen, Sheffield, U.K.
نائب الرئيس: Sukesh Nair, Vellore, India

تمت مراجعة هذه الطبعة من قبل الذوات التالية أسماؤهم، الذين كانوا وقت الكتابة أعضاء لجنة المختبرات في الاتحاد العالمي للهيموفيليا (WFH):

Mansoor Ahmed
Norma de Bosch
Ampaiwan Chuansumrit
Marión Echenagucia
Andreas Hillarp
Clarence Lam
Sukesh Nair
Alison Street
Alok Srivastava

كما تمت مراجعة بعض الأقسام من قبل أعضاء الاتحاد العالمي لمرض هيموفيليا (فون ويلبراند) ولجنة اضطرابات النزف النادرة.

شكر وتقدير: يعتمد عدد من الأساليب المذكورة على الإجراءات المعيارية لتشغيل المختبرات، التي قامت بصياغتها أنيت بوير من مركز شيفيلد لأمراض الهيموفيليا، ونود التعبير هنا عن تقديرنا وعرفاننا لمساهمتها في ذلك. كما يعبّر الاتحاد العالمي للهموفيليا WFH عن امتنانه لسهير عيد، رئيسة قسم التخثر وأمراض الدم الجزيئية والوراثة الخلوية في مركز الأميرة إيمان للبحوث وعلوم المختبرات، ومركز الملك حسين الطبي، عمان، الأردن، لمراجعة هذه الترجمة.

ملاحظة تحذيرية: حيثما يرد مصدر تجاري في هذا الدليل، فهو على سبيل المثال المناسب في وقت الكتابة، وليس القصد منه توصية من قبل الاتحاد العالمي للهيموفيليا (WFH) أو من المؤلف، أو من لجنة علوم المختبرات في (WFH). كما أنه لا يعني أن المصادر الأخرى غير موثوقة أو غير مناسبة بأي شكل من الأشكال. قد تقوم الشركات المصنعة للمواد المستخدمة في فحوصات المختبرات بتغيير تركيبة المواد، لذا فإن الاعتمادية المستقبلية لهذه المصادر غير معروفة في وقت الكتابة.

معلومات الاتصال بالمؤلفين:
steve.kitchen@sth.nhs.uk
amccraw@nhs.net

المحتويات

1. معدات المختبرات 1
2. التحقق من الماصة ومعايرة توازن قياس الوزن 3
3. سلامة المختبر 5
4. جمع العينات والمتغيرات ما قبل التحليلية 11
5. مراقبة الجودة الداخلية وتقييم الجودة الخارجي 14
6. تقنية الأنبوب المائل يدوياً 20
7. إعداد ومعايرة البلازما الطبيعية المجمعة 22
8. تأسيس نطاق مرجعي اعتيادي 24
9. الكواشف 27
10. تعداد الصفائح 29
11. زمن النزف 34
12. زمن البروثرومبين (PT) 36
13. زمن الثرومبوبلاستين المنشّط جزئياً (APTT) 39
14. مزج الاختبارات لمزيد من التحقيق عن (PT) و(APTT) غير الطبيعي 44
15. زمن تخثّر الثرومبين 48
16. زمن الثرومبين في وجود كبريتات البروتامين لكشف وجود الهيبارين 50
17. زمن الريبتيلايز 51
18. الفيبرينوجين (مقايسة كلاوس المعدلة) 54
19. إزالة الهيبارين من البلازما 57
20. مقايسة مضاد الفيبرينوجين بواسطة الفحص الشعاعي المناعي (RID) 59
21. مراقبة العامل (XIII) 61
22. المقايسات المعتمدة على أساس زمن البروثرومبين (العوامل II، V، VII، X) 63

23. مقايسات العوامل المعتمدة على أساس (APTT) (مقايسة مرحلة واحدة من [FXII أو ،FXI ،FIX ،C:FVIII] 66
24. مقايسات العامل (VIII:C) في الراسب القري (كريوبريسيبيتات) 69
25. مقايسات التخثر على مرحلتين للعامل (VIII:C) 70
25.1 إنتاج الكاشف المجتمع لمقايسة العامل (VIII:C) ذات المرحلتين 72
26. مقايسة كروموجينيك للعلمل (VIII:C) 75
27. المقايسة الداخلية ذات المرحلة الواحدة للبريكاليكرين (PKK) ولمولد الكينينوجين ذي الوزن الجزيئي العالي (HMWK) 78
28. مراقبة مثبط معامل التخثر المعتمد على (APTT) 80
29. فعالية العامل المساعد ريستوسيتين/ فعالية العامل فون ويلبراند (فعالية (VWF: RCo) أو (VWF)) 82
29.1 إعداد الصفائح المستقرة 84
30. مولد مضاد العامل فون ويليبراند بواسطة تقنية (VWF:AG) (ELISA) 86
31. مقايسة ربط الكولاجين لعامل فون ويلبراند (VWF:CB) 89
32. مقايسة ربط العامل (VIII) لتشخيص مرض فون ويلبراند نورماندي 92
33. تحليل (VWF) مولتيمر (Multimer) 98
34. القياس الكمي لمثبطات العامل (VIII) 107
35. مقايسة مثبط العامل (IX) 112
36. مقايسة فعالية العامل (XIII) 113
37. مضاد تخثر الذئبة والأجسام المضادة للفسفوليبيد 116
38. تخفيف راسيل لوقت سم الأفعى (DRVVT) 118
38.1 إعداد الصفائح المغسولة لـ (DRVVT) 121
39. اختبار وظائف الصفائح 122
39.1 انكماش الجلطة 123
39.2 قياس تراكم الصفائح 124
40. تجفيف البلازما بتجميدها (ليوفيلايزيشن) 133
41. تقييم واستخدام مقاييس التخثر 135
42. التحليل الجزيئي الوراثي 142

1 معدات المختبرات

سيتطلب أي مختبر يشترك في تشخيص وعلاج اضطرابات النزيف باستخدام بعض من أو جميع التقنيات الوارد وصفها في هذا الدليل، الحد الأدنى من المعدات الأساسية. علماً بأنه سيتم تناول التقييم واستخدام مقاييس التخثر شبه الآلية والآلية بالكامل في القسم 41.

والمعدات الأساسية المطلوبة هي:

- ثلاجة بدرجة حرارة 4 مئوية لحفظ الكاشف
  يجب المحافضة على الكاشف بصورة اعتيادية ما بين درجة حرارة 2 – 8 مئوية، ما لم يتم تحديدغير ذلك من قبل الشركة المصنعة. ويمكن أن تكون وحدة ذات درجة داخلية جيدة النوعية كافية.

- تجميد عميق قادر على المحافظة على درجة ما دون 35– مئوية
  تفيد درجة الحرارة المنخفضة، مثل 70– درجة مئوية، التخزين لفترة طويلة أكثر. وتكون عوامل التخثر مستقرة عند هذه الدرجة لمدة ستة أشهر على الأقل (وودهامز وآخرون، 2001). وعادة ما تكون وحدات التجميد لغاية 20– درجة غير كافية لتخزين البلازما والكواشف للعديد من اختبارات التخثر والتميع (الإرقاء). والمجمدات (الفريزرات) ذات دورة الإذابة التلقائية غير مناسبة تماماً.

- تكون الحمامات المائية المنتظمة قادرة على المحافظة على درجة حرارة تتراوح بين (37 ± 0,5 مئوية). كما تكون الحمامات الجافة مناسبة او غير مناسبة اعتماداً على نوعية الحمام الجاف. عادة ما تتم المحافظة على درجة حرارة أفضل باستخدام الحمام المائي.

- جهاز لمقياس درجة الحموضة

- مصدر الضوء (على سبيل المثال، مصباح منضدة من نوع أنجلبويس)

- ساعة (ساعات) توقيت

- ماصات آلية معيّرة قادرة على إعطاء عينة وكميات كواشف دقيقة ومُحكمة، في نطاق ما بين صفر – 200 ميكرولتر وحتى 1000 ميكرولتر. من المهم التحقق من دقة هذه الماصات (انظر القسم 2).

- ماصة معيّرة لإعطاء كميات من السائل تصل إلى 5 مل

- جهاز طرد مركزي قادر على توليد ما لا يقل عن 1700 غ (جاذبية)
  يمكن قبول الطرد المركزي لمعظم تحليلات التخثر في درجة حرارة الغرفة (20 – 25 درجة مئوية).
  (يُنصح في بعض التقنيات بطرد مركزي 2500 غ وبدرجة 4 مئوية.)

- ميزان معايرة تحليلية قادر على إعطاء قياس دقيق للغرامات في ثلاث خانات عشرية.
  أنظر القسم 2 للاطلاع على إجراءات التحقق من الدقة.

وتشمل المعدات الإضافية المطلوبة لبعض الإجراءات:

- قارئ لوحة مايكروتيتر للتقنيات المناعية المرتبطة بالإنزيمات (ELISA Reader)
- جهاز تراكم الصفائح (Platelet aggregometer)
- المعدات المحددة المذكورة في دليل المرافق الذي يشرح طرق عمل الفحص.

ويُعتبر تكييف الهواء في كل غرفة ميزة كبيرة في البلدان التي تكون درجات الحرارة فيها مرتفعة.

يجب أن يتم تجهز مواد استهلاكية كافية، كما ينبغي تجنب إعادة استخدام أنابيب الاختبار ورؤوس الماصات pipette tips المختبرية بعد غسلها، لأن المواد المتبقية يمكن أن تؤثر على النتائج سلباً، مما يسبب هدراً للوقت والكواشف.

المراجع

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, and Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12:229–36.

2 التحقق من الماصة ومعايرة توازن قياس الوزن

للمساعدة في إدارة الجودة، يجب أن يتم فحص معايرة التوازن ومعايرة حجم الماصة كل ثلاثة إلى ستة أشهر. وينبغي إخراج الأجهزة غير القابلة للمعايرة بشكل ملحوظ فوراً من الاستخدام حتى تتم إعادة معايرتها. ينبغي أن تحمل جميع الماصات رقم تعريف فريد.

طريقة فحص معايرة الماصة

1 قد تكون الماصات لكمية واحد أو لكميتين أو ثلاث، أو أن تكون لمجموعة متواصلة من الكميات.

- يتم فحص الماصات ذوات الإعداد الثابت الواحد أو الإعدادين كل على حده.
- يتم فحص الماصات ذوات الثلاثة إعدادات وهي ثابتة عند أدنى وأعلى إعداد.
- الماصات ذوات إعداد مجموعة الكميات المتواصلة: يتم فحص إعداد الحد الأقصى، وكذلك عند حوالي 25 % من إعداد الحد الأقصى. وكما يلي:
  - ماصة 10 مل، عند 10 مل و 2.5 مل
  - ماصة 5 مل، عند 5 مل و 1.25 مل
  - ماصة 1 مل، عند 1 مل (1000 ميكرولتر) و0.25 مل (250 ميكرولتر)
  - ماصة 0.2 مل، عند 0.2 مل (200 ميكرولتر) و0.05 مل (50 ميكرولتر)
  - ماصة 0.1 مل، عند 0.1 مل (100 ميكرولتر) و0.025 مل (25 ميكرولتر)
  - ماصة 50 ميكرولتر، عند 50 ميكروليتر و15 ميكرولتر

2 التحقق من المعايرة من خلال وزن خمس كميات مكررة من الماء المقطر (في درجة حرارة الغرفة) على الميزان. يتم تسجيل كل وزن بالغرام (حتى ثلاث خانات عشرية). لأغراض عملية، يساوي كل 1000 مل وزن 1000 غرام.

النتائج

ينبغي تسجيل النتائج وأي إجراء يتم اتخاذه.

عندما تظهر الماصة على أنها غير دقيقة بسبب اختلاف الكمية المسحوبة بأكثر من 10 % من الكمية المذكورة،

فيجب إخراجها من الاستخدام فوراً وعدم استخدامها حتى تتم إعادة معايرتها باتّباع تعليمات الشركة المصنعة. يجب أن تكون الماصات دقيقة على الوجه الأفضل بمقدار يقل عن 10 % بشكل كبير.

ملاحظة: إذا كانت الماصة غير دقيقة خارج الحدود التالية (متوسط الوزن)، يجب وقف استخدامها على الفور.

- **ماصة 10 مل**
  10 مل: 9.000 غ(غرام) – 11.000 غ
  2.5 مل: 2.250 غ – 2.750 غ
- **ماصة 5 مل**
  5 مل: 4.500 غ – 5.500 غ
  1.25 مل: 1.125 غ– 1.375 غ
- **ماصة 1 مل**
  1 مل: 0.900 غ – 1.100 غ
  0.25 مل: 0.225 غ – 0.275 غ
- **ماصة 0،2 مل**
  0.2 مل: 0.180 غ – 0.220 غ
  0.05 مل: 0.045 غ – 0.055 غ
- **ماصة 0،1 مل**
  0.1 مل: 0.090 غ – 0.110 غ
  025 مل: 0،225 غ – 0.0275 غ
- **ماصة 50 ميكرولتر**
  50 ميكرولتر: 0.045 غ – 0.055 غ
  15 ميكرولتر: 0.013 غ – 0.165 غ

طريقة فحص الموازين

يتم قياس الأوزان المعيّرة بعد كل 6 أشهر، وتسجيل القيَم للتأكد من دقتها.

1 تصفير الميزان.

2 قياس وزن الأوزان المعيّرة الثلاثة، واحداً في كل مرة. قم بتسجيل الأوزان إلى ثلاثة مراتب عشرية (على سبيل المثال 1.003 غ).

3 إذا كان هناك أي وزن خارج الحدود المنصوص عليها (بأقل من 2 %)، يتم أخرجها من الاستخدام حتى يتم تصحيح هذه المشكلة.

3 السلامة في المختبر

المختبرات التي تتعامل مع المواد الكيميائية والعينات البيولوجية هي أماكن خطرة.

في السنوات الأخيرة، كان هناك اهتمام متزايد بأهمية سلامة ممارسات العمل في الصناعة، لأسباب صحية وبيئية معاً. وقد أدى هذا الوعي إلى مزيد من التشديد على أمور مثل التوثيق الآمن وتدريب الموظفين وتقييم المخاطر.

وتقع على عاتق أرباب العمل مسؤولية توفير ملابس ومعدات الحماية، وهم مطالبون بتوفير التدريب على ممارسات العمل الآمنة.

إذا وجدت ممارسات العمل الآمنة في مكان ما، فسيتم تقليص احتمال تعرضك أو تعرض زملائك أو العامة لإصابة خطيرة إلى حد كبير.

مسؤولو السلامة

من المهم أن يتم تعين مسؤول أو مسؤولي سلامة لكل قسم. ويأخذ هؤلاء الأشخاص على عاتقهم ومسؤوليات إدخال إجراءات السلامة والمحافظة عليها. ومع ذلك، فالسلامة هي مسؤولية جميع موظفي المختبر.

دليل السلامة

يجب أن يكون هناك دليل شامل للسلامة يغطي جميع جوانب ممارسات العمل الآمنة للقسم بأكمله.

يجب على جميع الموظفين قراءة الدليل والتوقيع على بيان يثبت أنهم قد فهموا ما ورد فيه.

يجب الاحتفاظ بنسخ من هذا الدليل لدى مسؤول السلامة ووضعها أيضاً في أماكن يمكن الوصول إليها بسهولة من قبل جميع أعضاء فريق العمل.

تدابير السلامة: الاحتياطات العالمية

يتطلب نظام الاحتياطات العالمية أن يتم تجنب وتقليل أية مخاطر للعدوى من أي مصدر وذلك باتّباع ممارسات العمل الجيدة.

ويجب اعتبار جميع عينات الدم ومنتجات الدم (بما في ذلك الكواشف المنتجة من البلازما وأدواتها)، وغيرها من مواد الجسم البشري على أنها تمثل خطراً محتملاً للعدوى.

وينبغي دائماً اتخاذ التدابير الوقائية إلى أقصى حد ممكن عند التعامل مع أية مادة.

يجب ألّا يتم اتخاذ أي تصنيف آخر للمخاطر. ينبغي التعامل مع جميع سوائل الجسم وغيرها من المواد، غير الدم، سواء تم جمعها أو جلبها إلى الوحدة لغرض الفحص أو لأي غرض آخر، بنفس العناية التي تعطى للدم.

المختبر

ينبغي أن يكون المختبر نظيفاً ومرتباً على الدوام، كما ينبغي فصل أماكن الأعمال المكتبية عن مناطق الفحوصات المختبرية. حاولوا عدم استخدام المختبر لتخزين المواد الفائضة. وحاولوا ضمان مشاركة الجميع في المحافظة على المختبر منظماً.

الملابس الواقية

يجب على كل شخص يدخل المختبر، بما في ذلك الزوار، ارتداء معطف المختبر. يجب استبدال المعطف فوراً إذا أصبح ملوثاً.

قفازات الاستعمال لمرة واحدة

لا يحب كثير من الناس ارتداء القفازات، ولكن تحتوي كل عيّنة يتم التعامل معها في المختبر على خطورة ما. ينبغي دائماً ارتداء القفازات عند التعامل مع المواد السامة.

لن تحمي القفازات والمعاطف بشكل واضح ضد حوادث الوخز بالإبر، ولكنها ستمنع، على سبيل المثال، مصل فيروس نقص المناعة الموجب أو السموم التي يمكن أن تلامس أية جروح أو خدوش على بشرتك.

دائماً استبدل القفازات إذا كانت مقطوعة أو مثقوبة على الفور.

غسل العين

يمكن أن تحصل العديد من حالات العدوى بسهولة عن طريق الاتصال بالأغشية المخاطية للعينين.

اغسل عينيك مباشرة بالكثير من الماء البارد الجاري إذا حدث اتصال مع مادة محتملة العدوى.

الأدوات الحادة

تمثل الأدوات الحادة مثل الإبر والزجاج المكسور خطراً كبيراً: استخدم صندوقاً للأدوات الحادة قابلاً لاحتوائها دون أن يتعرض لأي ثقب.

كانت هناك عدة حالات أصيب فيها العمال بالعدوى نتيجة للوخز بالإبر.

الهباء الجوي

تجنب جميع الممارسات التي قد تسبب رذاذاً أو قطرات متطايرة أو غباراً في المختبر المفتوح.

يجب أن تتم العمليات التي تولد الهباء دائماً داخل خزانة مناسبة للحماية من الادخنة، ويجب ارتداء نظارات السلامة.

يجب تنظيف جميع البقع فوراً، وذلك باستخدام مواد التبيض المعقمة أو العوامل المحايدة عند الضرورة.

المواد السامة والقابلة للاشتعال

يجب حفظ المواد السامة أو القابلة للاشتعال دائماً داخل خزانة الحماية من الادخنة أو داخل صندوق آمن مناسب.

المعدات الكهربائية

يجب اتخاذ تدابير عناية خاصة عند التعامل مع أية معدات تستخدم السوائل، مثل خزانات المياه الكهربائية وحمامات الماء.

يترك أمر التركيب والصيانة والإصلاح دائماً للموظفين المؤهلين.

الممتلكات والسلوك الشخصي

عدم إحضار الحاجيات الشخصية مثل الأقلام والحقائب والأمشاط إلى المختبر.

تجنب وضع يديك على وجهك أو على الأغشية المخاطية (العيون، الأنف، الفم) أثناء وجوك في المختبر، أما إذا كان عليك القيام بذلك، فاغسل يديك أولاً دائماً.

يجب ألا يتم إحضار الطعام والسجائر ومستحضرات التجميل إلى المختبر.

عدم وضع الماصة في الفم أبداً.

دائماً اغسل يديك جيداً قبل مغادرة المختبر.

الحوادث

يجب الإبلاغ فوراً عن جميع الحوادث، كما يجب تسجيلها في سجل الحوادث الذي يحتفظ به مسؤول السلامة في القسم. وهذا الأمر مهم، لا سيما فيما يتعلق بإصابات الوخز بالإبر. وفي هذه الأحوال، اتّبع نظم المستشفى المحلي للتسجيل والإبلاغ، إضافة إلى أية إجراءات أو تكليفات موصى بها محلياً.

التحكم في المواد الخطرة على الصحة (COSHH)

يتم اتّباع هذا التشريع في مختبرات المملكة المتحدة، هو دليل مفيد لتحديد الأخطار والمخاطر.

الأخطار والمخاطر

الأخطار التي تحملها المواد هي أمكانيتها على إحداث الضرر. المخاطر الناتجة عن هذه المادة هي احتمال إضرارها بشخص تحت ظروف استخدامها الفعلية.

تحديد المخاطر

يُعتبر تحديد المخاطر شرطاً أساسياً لتقييم الخطر. ويختلف الوقت الذي يتطلبه تحديد المخاطر وفقاً للمادة نفسها.

تقييم الأخطار

أخذ الحقائق التالية بعين الاعتبار:

- المخاطر
- شروط الاستخدام
- الكميات التي سيتم استخدامها
- الطرق أو المواقع المحتمل تعرضها (الاستنشاق، الابتلاع، والجلد، أو العينين)

وستحدد نتيجة تقييم المخاطر:

- ظروف التخزين
- إجراءات معالجة طريقة الاستعمال
- إجراءات التخلص من الفضلات
- شرط المراقبة والرصد الصحي
- إجراءات الطوارئ

يجب مراجعة تقييم المخاطر وتحديثها سنوياً إذا لزم الأمر.

انظر الشكلين 1.3 و2.3 أدناه للحصول على أمثلة حول كيفية تسجيل المعلومات لتقييم المخاطر، في هذه الحالات باستخدام إجراء COSHH.

الغرض من هذا النموذج هو تحديد المخاطر وتدابير الرقابة المرتبطة بالمعدات المستخدمة في إجراء معين ما. يجوز للموظفين المختصين والمدرجين فقط تنفيذ أي إجراء، وينبغي عليهم القيام بذلك فقط بعد مراجعة وثائق الصحة والسلامة المتعلقة بذلك الفحص المعين.

الشكل 1.3: التحكم في المواد الخطرة على الصحة (COSHH) لوقت البروثرومبين ومقايسات عامل التخثر المستند إلى (APTT)

رقم مرجع (COSHH) المقايسات 1

مرجع المختبر مرحلة واحدة (مقايسات II، V، VII، VIII، IX، X، XI، XII).

عنوان الإجراء/ التجربة:

المادة	الكمية التقريبية	المخاطر المُعرّفة
عازل جليوكسالين (إيميدازول)، ويحتوي على (انظر**)	<5 مل	ضار في حال بلعه.
** إيميدازول	3.4 غ/ لتر	مادة تسبب التآكل: مسببة للحروق. ضارة إذا تم استنشاقها أو بلعها أو امتصاصها من خلال الجلد. مهيّجة للعينين.
** كلوريد الصوديوم	5.85 غ/ ل	مهيج للعينين والرئتين. تجنب ملامسته للجلد.
البلازما قليلة العامل Factor-deficient plasma	1 مل	خطر العدوى.
ثرومبوبلاستين	2 مل	قليل الخطر.
كاشف APTT	2 مل	قليل الخطر.
كلوريد الكالسيوم 0.025م	5 مل	قليل الخطر.
العازل أورين (Owren's buffer)	<500 مل	يحتوي على باربيتون. ضار عند بلعه. قد يسبب حساسية عند ملامسته للجلد أو استنشاقه.
محلول تنظيف جهاز التخثر	<50 مل	يسبب الحروق: مضر للعيون والجلد وغيرها. لا تخلطه مع غيره من المطهرات. يسبب التآكل. قد يسبب اتصاله بالمواد القابلة للاشتعال حريقاً. يحرر اتصاله بالحوامض غازات سامة. يتفاعل بشدة مع أملاح الأمونيوم؛ المذيبات العضوية – يشكل خطر انفجار.
محلول تنظيف جهاز التخثر	<50 مل	يحتوي على 0.16 % من حامض الهيدروكلوريك والمنظفات. مهيج: قد يؤذي العينين والجلد.
البلازما المعيارية/المراقبة/ المريضة	<1000 ميكرولتر	خطر العدوى.

الشكل 2.3: التحكم في المواد الخطرة على الصحة (COSHH) لمقايسة العامل (XIII)

عنوان الإجراء/ التجربة:

المادة	الكمية التقريبية	المخاطر المُعرّفة
كاشف منشط: ثرومبين بقري؛ مثبط تجلط (0.01 G GLY-PRO-ARG-ALA-AMIDE)؛ كلوريد الكالسيوم؛ هيكساديميثرين؛ بروميد (40 مايكروغرام)؛ ألبومين بقري؛ عازل بيسين (100م م/ ل)؛ و2.5ملغ من أزيد الصوديوم	زجاجة 5 مل	يحتوي على أزيد الصوديوم: شديد السمية إذا تم امتصاصه عن طريق الجلد أو ابتلاعه. قد يسبب ضرراً جينياً متوارثاً. يتفاعل مولداً انفجاراً مع معادن معينة.
كاشف (NADH): 2 ملغ NADH؛ ألبومين بقري و2.5ملغ من أزيد الصوديوم	زجاجة 5 مل	يحتوي على أزيد الصوديوم: شديد السمية إذا تم امتصاصه عن طريق الجلد أو ابتلاعه. قد يسبب ضرراً جينياً متوارثاً. يتفاعل مولداً انفجاراً مع معادن معينة.
كاشف تحديد: ببتيد مُصطنع؛ جليسين إيثييستر (7 ملغ)؛ ألفا كيتوجلوتارات (13.5 ملغ)؛ ألبومين بقري؛ عازل (HEPES)، و5 ملغ من أزيد الصوديوم	زجاجة 5 مل	يحتوي على أزيد الصوديوم: شديد السمية إذا تم امتصاصه عن طريق الجلد أو ابتلاعه. قد يسبب ضرراً جينياً متوارثاً. يتفاعل مولداً انفجاراً مع معادن معينة.
البلازما المعيارية/ المراقبة/ المريضة	<1000 ميكرولتر	خطر العدوى.

4 جمع العينات ومتغيرات ما قبل التحليل

يصف عدد من الأدلة التوجيهية المفصلة إجراءات جمع ومعالجة عينات الدم لاختبارات التجلط (CLSI 2007, 2008a, 2008b).

يجب أخذ الدم الوريدي من عروق ثنية المرفق عندما يكون الأمر ممكناً، وذلك باستخدام رباط ضاغط لتسهيل عملية الجمع. ويجب وضع الرباط الضاغط مباشرة قبل جمع العينة، وألا يزيد قياس إبرة السحب (النيدل) عن قياس 21 للبالغين، كما ينبغي جمع العينة باستخدام الحُقن و/ أو انابيب نظام الجمع بالتفريغ لتسمح بالجمع السريع لعينة الدم. يجب أن يتم سحب الدم بلطف إلى الحقنة، وربما يكون استخدام إبرة بقياس 22 أو 23 للأطفال الرضع أمراً ضرورياً.

يجب التخلص من أية عينة لم يتم جمعها فوراً من الوريد بنجاح وذلك لاحتمال تنشيط نظام التخثر، ولا يجب عودة الدم مرة ثانية في الإبرة بعد جمعه في الحقنة. يجب إزالة الإبرة قبل ضخ الدم من الحقنة إلى انبوب مع مضاد للتخثر، كما لا يجب أن يحدث أي تأخير بين جمع العينة ومزجها بمضاد التخثر.

بمجرد امتزاج مضاد التخثر بالدم، يجب إغلاق الانابيب بإحكام وخلطها بالتقليب بلطف لخمس مرات، مع تجنب الهز بقوة. يوصي بعض الكتاب بعدم استعمال أول 5 ملليترات مسحوبة لاختبارات التجلط.

وإذا تم استخدام نظام الجمع بانبوب نظام الجمع بالتفريغ، فينبغي ملاحظة أن مزج العينة بتقليبها لخمس مرات بلطف مطلوب أيضاً بعد أن تم سحب العينة في مضاد تخثر الدم.

ينبغي أن يمزج الدم مع مضاد التخثر من سترات الصوديوم نسبة 9 أجزاء من الدم: جزء 1 من مضاد التخثر. ويجب أن يكون هذا 0,109 م (3,2 % من ثلاثي ديهايدريت سترات الصوديوم) أو ما يشابهه (مثلاً؛ 0,105 م السترات المضادة للتخثر المستعملة بنجاح في بعض الأنظمة المفرغة). ويمكن تخزين محلول مضاد التخثر في درجة 4 مئوية لمدة تصل حتى ثلاثة أشهر، ولكن يجب فحصها قبل الاستخدام أو التخلص منها إذا وجدت فيها جسيمات مادية – مثلاً، عند حدوث تلوث. ويجب ألا يحدث أي اتصال منشط انبوب العينة (مثلاً؛ استخدام البلاستيك أو زجاج السيليكون). يمكن أن تتأثر النتائج إذا كان المريض يعاني من انخفاض في مكداس الدم، أو إذا ارتفعت نسبة الكريات بشكل خاص. ويجب تعديل كمية مضاد التخثر للأخذ بعين الاعتبار كمية البلازما المخفضة. يبين الشكل 1.4 دليلاً لكمية مضاد التخثر اللازمة لعينة 5 ملليلتر.

الشكل 1.4: كميات الدم ومضاد التخثر اللازمة للعينات التي لها مكداس دم غير طبيعي (هيماتوكريت).

كمية الدم	كمية مضاد التخثر	مكداس الدم
4.5 مل	0.5 مل	%55 - %25
4.3 مل	0.7 مل	%20
4.6 مل	0.4 مل	%60
4.75 مل	0.25 مل	%70
4.8 مل	0.2 مل	%80

وبدلاً من ذلك، يمكن إبقاء حجم مضاد التخثر 0.5 مل ثابتاً وإضافة كميات متباينة من الدم وفقاً لمكداس الدم. يمكن احتساب كمية الدم التي تجب إضافتها (لكل 0.5 مل من السترات 0،109) وحسب المعادلة:

$$4.5 \times \frac{60}{100 - \text{كريات حمراء}}$$

الطرد المركزي

يتم تحضير البلازما الغنية بالصفائح (PRP) لاختبار وظائف الصفائح الدموية بواسطة جهاز الطرد المركزي للدم بمضاد التخثر في درجة حرارة الغرفة عند 150جاذبية – 200 جاذبية لمدة 10دقائق. تتم إزالة خلاصة السائل والاحتفاظ بها في درجة حرارة الغرفة في زجاجة مقفولة أثناء الاستخدام لمدة لا تزيد عن الساعتين.

يتم استخدام البلازما قليلة الصفائح (PPP) لمعظم اختبارات التخثر. وينبغي أن تتم عملية الطرد المركزي للعينة على الأقل لـ 1700 جاذبية لمدة 10 دقائق على الأقل. يمكن أن تتم هذه العملية في درجة حرارة الغرفة بشرط عدم تجاوز درجة الحرارة 25 درجة مئوية، وفي هذه الحالة يجب استخدام العينة الناتجة من الطرد المركزي والمبردة إلى 4 درجات مئوية.

تتطلب إجراءات بعض الاختبارات أن يتم فصل البلازما بالطرد المركزي مرتين. وللقيام بذلك، يتم تحويل البلازما قليلة الصفائح من عملية الطرد المركزي الأولى إلى أنبوب بلاستيكي مقفول وتعاد عملية الطرد المركزي مرة ثانية. يجب الحرص على عدم استخدام الجزء الأسفل من البلازما بعد عملية الطرد المركزي الثانية، لأنه قد يحتوي على أية صفائح دم متبقية بعد عملية الطرد الأولى.

عينات الاختبار الفوري

يجب فحص العينات خلال أربع ساعات من أخذها قدر المستطاع. كما ينبغي تجنب تخزينها لفترات طويلة لاختبارات الفحص ولقياس عامل تخثر الدم، وعلى الرغم من ذلك يبدو أن عينات الدم الكاملة المخزنة في درجة حرارة الغرفة قد تكون مستقرة لقياسات وقت البروثرومبين (باجلين ولودينجتون 1997). يجب المحافظة على العينات المعدّة لاجراء اختبارات المراقبة ولفحص عامل (VII) في درجة حرارة الغرفة لتجنب إمكانية تحفيز البرودة للفحص.

العينات عالية الخطورة

يجب توخي الحذر عند التعامل مع جميع عينات البلازما وذلك بسبب خطورة انتقال التهاب الكبد، وفيروس نقص المناعة البشرية، وغيرها من الفيروسات.

أنظر القسم 3، سلامة المختبرات.

طريقة تجميد البلازما

يمكن تخزين العينات المجمدة لغرض اختبارها لاحقاً. ويفضل التخزين في درجة –70 مئوية أو أقل من ذلك. إذ تكون عوامل التخثر في حالة مستقرة عند هذه الدرجة لستة أشهر على الأقل (وودهامز أيتال، 2001). أما تخزين العينات للمدى القصير في درجة –35 مئوية، فكاف لمعظم الاختبارات، بينما التخزين في درجة –20 مئوية فهو غير كاف في العادة. ويجب أن تتم عملية الطرد المركزي المزدوجة (انظر قسم الطرد المركزي أعلاه) في حال تم تجميد العينات تجميداً شديداً قبل تحليل التخثر لداء الذئبة.

بما أن النتائج المستخلصة من بعض التقنيات يمكن أن تتأثر، لذا من الأفضل تجنب التجميد والإذابة قبل تحديدات (APTT). يجب نقل أية عينات بلازما مجمدة فوراً إلى حمام مائي بدرجة 37 مئوية، وإذابتها بين 4 إلى 5 دقائق وخلطها بتقليب لطيف قبل التحليل. ينبغي تجنب الإذابة البطيئة في درجات حرارة منخفضة لمنع تشكل الراسب القري، الأمر الذي يقلل من (FVIII:C, VWF) ومحتوى الفيبرينوجين للبلازما الطافية.

المراجع

Baglin T, Luddington R. Reliability of delayed INR determination: implications for decentralised anticoagulant care with off-site blood sampling. *Br J Haem* 1997; 96:431-4.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipunture: Approved standard*, 6th ed. 2007; Clinical and Laboratory Standards Institute Document H3-A6: 27(26).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Procedures and devices for the collection of diagnostic capillary blood specimens: Approved standard*, 6th ed. 2008 (a); Clinical and Laboratory Standards Institute Document H4-A6: 28(25).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays: Approved guideline*, 5th ed. 2008 (b); Clinical and Laboratory Standards Institute Document H21-A5: 28(5).

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12:229-36.

5 مراقبة الجودة الداخلية وتقييم الجودة الخارجي

ضمان الجودة (QA) هو مصطلح شامل يمكن استخدامه لوصف جميع التدابير المتخذة لضمان موثوقية الفحوصات والتقارير المختبرية. ويشمل هذا اختيار الفحص، جمع عينة صالحة من المريض تحليل العينة وتسجيل النتائج بطريقة دقيقة وفي الوقت المناسب، من خلال تفسير النتائج، وفق الاقتضاء، وإبلاغ هذه النتائج إلى طبيب التحويل.

مراقبة الجودة الداخلية (IQC) وتقييم الجودة الخارجي (EQA) (ويشار اليها احياناً باسم اختبار الكفاءة) هما مكونان مختلفان ومتكاملان في الوقت ذاته لبرنامج ضمان جودة المختبر. يتم استخدام مراقبة الجودة الداخلية (IQC) لتحديد ما إذا كانت سلسلة من التقنيات والإجراءات تؤدى باستمرار على مدى فترة من الزمن. وبالتالي يتم تطبيقها لضمان اتساق عمل المختبر يوماً بعد يوم. ويستخدم تقييم الجودة الخارجي (EQA) لتحديد درجة التوافق بين نتائج مختبر واحد ما، مع تلك المتحصلة من مراكز أخرى.

ومن خلال مشروع تقييم الجودة الخارجي (EQA) الأكبر، يتيح التحليل بأثر رجعي للنتائج المتحصلة من مختبرات مشاركة التحديد، ليس فقط لضعف أداء المختبر الفردي فحسب، بل للكواشف والطرق التي تؤدي إلى ظهور نتائج غير موثوق بها أو مضللة أيضاً.

والغرض الأساسي لتقييم الجودة الخارجي (EQA) هو اختبار الكفاءة لفحوصات المختبر كل على حدة. يتضمن برنامج (EQA) الدولي الذي يقدمه الاتحاد العالمي الهيموفيليا التحليلات ذات الأهمية الخاصة لتشخيص وعلاج اضطرابات النزيف (لمزيد من المعلومات، يرجى الاتصال بالاتحاد الدولي للهيموفيليا (WFH). لقد تم نشر بيانات عن هذا المشروع في المراجع التالية :

Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Development of a World Federation of Hemophilia External Quality Assessment Scheme: results of a pilot study. *Haemophilia* 1996; 2: 4-46

Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Laboratory performance of haemophilia centres in developing countries: 3 years' experience of the World Federation of Hemophilia External Quality Assessment Scheme. *Haemophilia* 1998; 4: 739-746.

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID, Preston FE. Laboratory performance in the WFH EQA programme 2003-2008. *Haemophilia*. 2009; 15:571-7.

معلومات الاتصال ببرنامج تقييم الجودة الخارجي (EQA) للاتحاد الدولي للهيموفيليا (WFH) (2010)

المدير: بروفسور اف. اريك بريستون
المدير العلمي: الدكتور ستيف كيتشين

Rutledge Mews
3 Southbourne Road
Sheffield
S10 2QN
المملكة المتحدة
هاتف: 3300 267 114 44+
فاكس: 3309 267 114 44+
الموقع الإلكتروني: www.ukneqasbc.org

يمكن أن تُقدم مشاريع تقييم الجودة الخارجي (EQA) الأكبر معلومات عن الأداء النسبي للإجراءات التحليلية، بما فيها مبدأ الطريقة والكواشف والأدوات. لقد تم ربط المشاركة المستمرة في مشاريع EQA لتحسين أداء المختبرات. وقد بدأ هذا جلياً ليس على الأداء العام والظاهر من خلال الحد من اختلافات النتائج بين المختبرات فحسب، ولكن لدى المختبرات الفردية أيضاً.

إن تقييم أداء المختبر الفردي هو عنصر أساسي في مشاريع (EQA).ويقارن مشروع تقييم الجودة الخارجي (EQA) الذي يقدمه الاتحاد الدولي للهيموفيليا (WFH) نتائج المشاركين مع نتائج العينات نفسها عندما يتم تحليلها في ما يصل إلى 700 مركز منتشر في مختلف أنحاء العالم والتي تشارك في المشروع الوطني لتقييم الجودة الخارجي لتخثر الدم في المملكة المتحدة (UK NEQAS).

هناك العديد من الأسباب حول عدم إمكانية تقديم مختبر ما نتائج يمكن اعتبارها غير مرضية. في حين أن سبب ذلك قد يكون واضحاً على الفور، إلا أن تحديد المشكلة الأساسية ليس سهلاً دائماً. وتتمكن المشاريع الأكبر من تحديد مشاكل الأداء التي تتعلق تحديداً باختلافات الكاشف أو اختلافات المنهج.

وتعد السرية التامة إحدى المزايا الهامة لجميع مشاريع تقييم الجودة الخارجي (EQA). وفي مشروع تقييم الجودة الخارجي (EQA) الدولي المشار إليها أعلاه، فإن معلومات أداء المختبرات الفردية ليست متاحة لأي شخص غير رئيس القسم المعيّن إلا من خلال تصريح مكتوب فقط.

مراقبة الجودة الداخلية

يتم استخدام مراقبة الجودة الداخلية لتحديد ما إذا كانت سلسلة من التقنيات والإجراءات تؤدى باتساق على مدى فترة من الزمن. يشيع استخدام مصطلح "مراقبة الجودة" لوصف مجموعة من الإجراءات المستخدمة للتحقق من أن نتائج الفحوص المختبرية موثوقة بما يكفي لتقديمها لمساعدة الأطباء في اتخاذ القرار ومراقبة المعالجة وتشخيص حالات اضطراب وقف النزف. ويجب تطبيق إجراءات مراقبة الجودة بطريقة تضمن السيطرة الفورية والمستمرة لاستخراج النتائج.

وتتأثر جودة النتائج المتحصلة في إطار المختبر بعوامل كثيرة، منها:

- جمع ومعالجة العينات بطريقة مناسبة
- اختيار التقنيات المناسبة والمحافظة على دليل محدّث لإجراءات العمل القياسية
- استخدام كواشف ومواد مرجعية موثوقة
- اختيار الآلات المناسبة والصيانة الكافية
- سجلات كافية
- نظام الإبلاغ عن النتائج

وإضافة إلى ذلك، تعتمد جودة النتائج التي يتم الحصول عليها من خلال الممارسات الدورية بدرجة كبيرة على التدريب والاختيار، والحافز، كتكملة مناسبة للموظفين الملائمين.

وتفيد مراقبة الجودة الداخلية بشكل خاص في التعرف على درجة الدقة لتقنية معينة – وتعني الدقة درجة التوافق بين القياسات المتكررة لعينة واحدة. من المهم الإدراك أن الأسلوب الدقيق لا يعني بالضرورة نتائج دقيقة، والدقة تعني قياس قرب القيمة المقدرة للقيمة الحقيقية.

مواد مراقبة الجودة

لتقييم دقة أسلوب معين، فمن الضروري إجراء تحليلات متكررة لمقادير متساوية من العينة نفسها. من المهم أن تشمل مراقبة الجودة (QC) عينات ذات قيَم طبيعية وقيَم غير طبيعية لضمان أن الطريقة مُسيطرٌ عليها في مستويات مختلفة من تحليل محدد، إذ قد تكون تغييرات طفيفة نسبياً في عملية تحليلية ما أكثر وضوحاً عند اختبار مراقبة غير طبيعي.

يجب أن تكون المواد المراقبة مشابهة في الخصائص لعينات الاختبار وأن يتم تحليلها بتزامن. مواد مراقبة الجودة ذات الأصل البشري أكثر تشابهاً لعينات الاختبار البشرية. يجب أن تكون كل قنينة أو مقدار من مواد مراقبة الجودة متطابقة عملياً، بحيث أن أي تغير في نتائج الاختبار ليس ناتجاً عن استبدال قارورة محل أخرى.

ينبغي أيضاً أن تكون مراقبة الجودة مستقرة للفترة المقصود استخدامها فيها. أما بخصوص فحوصات ومقايسات عمليات وقف النزف، فيجب حفظ عينات البلازما مجمدة بشدة (يفضل بدرجة 35- مئوية أو أقل) أو مجففة بالتجميد لضمان قدر كاف من الاستقرار لاستخدامها كمادة لمراقبة الجودة. لاستعادة العينات المجففة بالتجميد الى محلول، فمن المهم استخدام الماء المقطر بدرجة حموضة مابين 6,8 – 7,2 وإعطاء مهلة لخمس دقائق على الأقل لإعادتها.

إذا تم استخدام مواد تجارية لمراقبة الجودة، فيجب أن تتم إعادتها وفق تعليمات الشركة المصنّعة باستخدام نظام مص دقيق. وإذا تم استخدام مواد مراقبة شديدة التجميد، فيجب إذابتها بسرعة في درجة 37 مئوية لمدة خمس دقائق. يجب أخذ خطر انتقال الفيروسات المنتقلة عبر الدم بعين الاعتبار في اختيار مواد المراقبة. لا يجب استخدام المواد ذات المخاطر العالية.

وينبغي أن تدرج مادة واحدة لمراقبة الجودة على الأقل مع كل مجموعة من فحوصات أو مقايسات المشاهدة. قد يكون من الأنسب لفحوصات المشاهدة أن تشمل مراقبة الجودة العادية في هذه الطريقة ولاختبار المواد غير العادية مرة واحدة في اليوم أو في المناوبة أو عند وجود شك بخصوص ما إذا كانت الطريقة تحت السيطرة. وللحصول على دليل لاستكشاف المشاكل المتعلقة بـ (PT /APTT) ومشاكل مراقبة الجودة الداخلية (IQC) عند تحليل مستويين مختلفين، انظر الشكل 1.5 أدناه.

الشكل 1.5: اكتشاف مشاكل مراقبة الجودة الداخلية (IQC)

المستوى 1 من مراقبة الجودة الداخلية PT	المستوى 2 من مراقبة الجودة الداخلية PT	المستوى 1 من مراقبة الجودة الداخلية APTT	المستوى 2 من مراقبة الجودة الداخلية APTT	الخلاصة/ التحقق
خارج	داخل	داخل	داخل	مادة المستوى 1 من مراقبة الجودة الداخلية PT
خارج	خارج	داخل	داخل	كاشف PT
داخل	داخل	خارج	داخل	مادة المستوى 1 من مراقبة الجودة الداخلية APTT
داخل	داخل	خارج	خارج	كاشف APTT
خارج	خارج	خارج	خارج	الأداة

ينبغي إدراج مواد مراقبة الجودة ذات المستوى المخفّض مع الاختبارات المستخدمة لتشخيص ورصد النقص المتوارث لحالات نزف الدم.

يجب التعامل مع مواد التحكم في جميع الحالات تماماً مثل عينات الاختبار، إذا أمكن ذلك. وبما أنه سيحدث بعض التباين بالضرورة نتيجة لاختلافات بيولوجية وتقنية وتحليلية، فيجب تسجيل كل نتيجة من نتائج مراقبة الجودة وتقييمها بالمقارنة مع الفئة التي تعتبر مقبولة وكما مُبيّن في أدناه.

حدود التباين المقبولة

بالنسبة لمواد مراقبة الجودة الداخلية التجارية، غالباً ما تُقدم الشركات المصنّعة للعينات النطاق المستهدف من القيَم المقبولة. ستعتمد النتائج التي يتم الحصول عليها في حالة اختبارات المشاهدة والفحوصات التي تعمل في بعض الاحيان على الكواشف ونظام الكشف النهائي المستخدم لإجراء الاختبارات. ويجب أن يأخذ قيمة النطاق المستهدف Target Range هذا التأثير بعين الاعتبار. واذا كان النطاق المستهدف غير متاح لتقنية معينة، فيمكن القيام بذلك محلياً.

يتم اختبار مواد مراقبة الجودة بشكل متكرر (10 مرات بحد أدنى) وفي أيام مختلفة عندما يتم التأكد من أن طريقة العمل مسيطرٌ عليها (وكما مبين ضمن النتائج المستهدفة على مواد بديلة لمراقبة الجودة، على سبيل المثال).

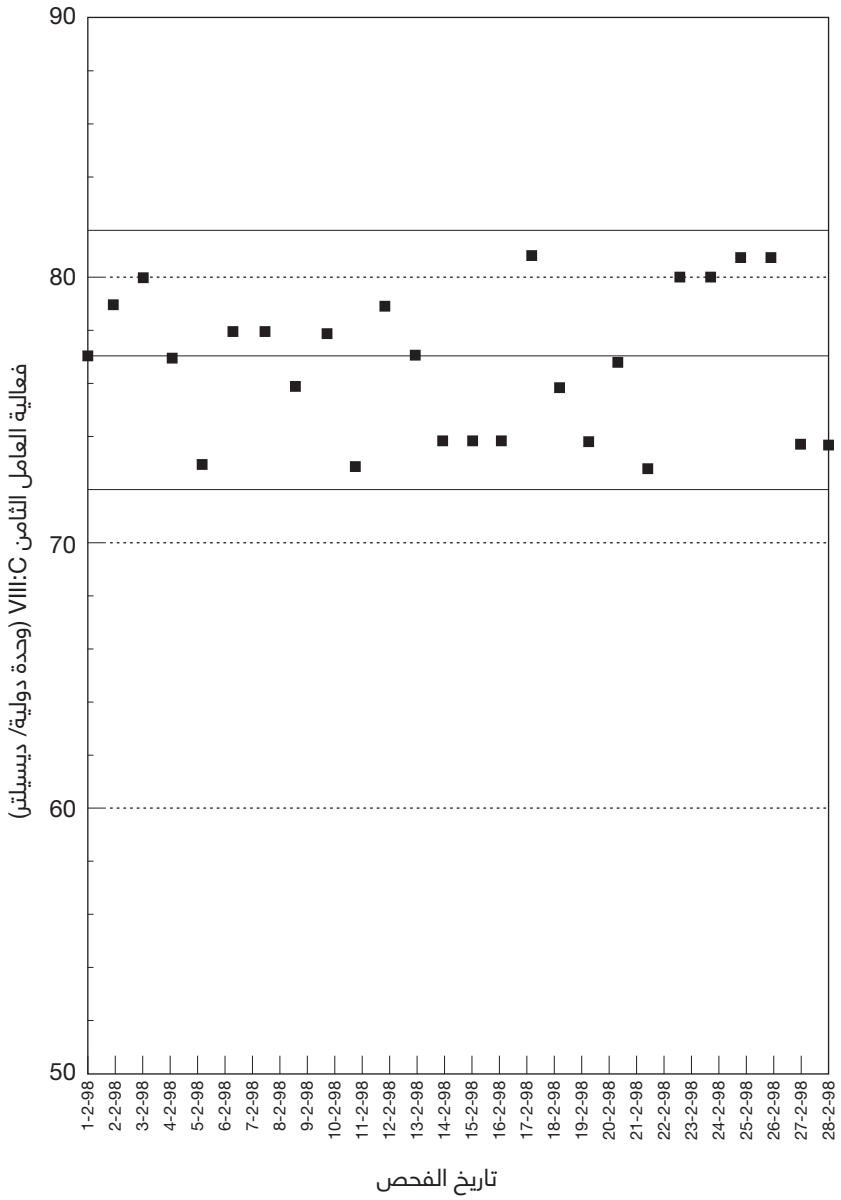
ومن ثم يتم حساب المتوسط والانحراف المعياري (SD) لهذه النتائج. والانحراف المعياري (SD) هو الجذر التربيعي لمجموع (D^2) مقسوماً على (N−1)، حيث أن (D) هو فرق النتائج الفردية من المتوسط و(N) هو عدد التحديدات. و(SD) هو مقياس انتشار النتائج: وكلما كبرت قيمة (SD)، ازداد انتشار النتائج. وهناك مقياس مهم آخر وهو معامل التباين (CV)، وهو (SD) معبر عنه كنسبة مئوية من المتوسط (SD = CV مقسوماً على المتوسط ومضروباً في 100 %). يجب أن يكون معامل التباين (CV) للنتائج في أيام مختلفة لوقت البروثرومبين ووقت الثرومبوبلاستين المنشط جزئياً لعينة مراقبة الجودة دائما أقل من 8 % ومن الأفضل أن يكون أقل من ذلك. ولمقاييسات مثل العوامل (FVIII:C و FIX) فينبغى أن يكون معامل التباين لأقل من 10 % قابلاً للتحقيق لغرض الاختبارات التي أجريت على مدى عدة أيام.

في أغلب الحالات، ستظهر النتائج التي تم الحصول عليها لعينة مراقبة الجودة الداخلية (IQC) توزيعاً عادياً (جاوسين). ومن الممارسات الشائعة لإعداد نطاق الهدف لنتائج مراقبة الجودة الداخلية (IQC) حيث يكون الوسط ± 2SD ، فينبغي أن يشمل هذا 95 % من القيم.

يجب أن يتم تسجيل النتائج الفردية على مخطط يحدد قيمة نطاق الهدف. المثال المبيّن في الشكل 2.5 أدناه. وتعتبر أية قيَم مستقبلية تقع ضمن هذه الحدود مقبولة.

وتشير النتائج الخارجة عن هذا النطاق إلى أن مواد مراقبة الجودة قد أتلفت أو تم التعامل معها بطريقة غير صحيحة، أو أن طريقة العمل لم يتم التحكم بها بشكل صحيح. ستمنح إعادة اختبار مواد مراقبة الجودة مزيداً من التفريق بين هذين الاحتمالين، ويؤكد تجاوز النتائج للحدود أن نظام الاختبار خارج عن نطاق التحكم. ويعني الانحراف المتوسط أو طويل الأجل في نتائج اختبار مراقبة الجودة – على سبيل المثال، والناتج عن الأداة أو الخلل في الكاشف أو التغيير – والذي سيظهر جلياً عبر التدقيق في جداول السجل التراكمي.

الشكل 2.5: نتائج مقايسات (FVIII:C) على عينات مراقبة الجودة الداخلية التي تمت مقايستها في أيام مختلفة



كل نقطة هي مقايسة مختلفة على المواد نفسها. الخطوط المتصلة تمثل المتوسط وانحرافين معياريين من 20 مقايسة إجريت على هذه المادة، والتي تعتبر أنها تمثل حدود النتائج المقبولة.

6 تقنية الأنبوب المائل يدوياً

على الرغم من توفر العديد من الأدوات المختلفة لاختبارات التخثر (انظر القسم 41 حول التحليل الالي) واستخدامها في جميع أنحاء العالم، ما تزال تقنية إمالة الأنبوب يدوياً مستخدمة بنجاح من قبل العديد من المراكز. فقد يكون من الضروري القيام ببعض الاختبارات يدوياً، حتى عندما تكون الآلات قيد الاستخدام، نظراً لعدم توافق العينات العرضية والأداة المستخدمة. قد يكون هذا هو السبب في وجود تركيزات دهون مرتفعة بشكل كبير في البلازما، أو في تحليل عينات اليرقان، أو حيث يختلف نمط تشكّل الجلطة في العينة بشكل ملحوظ عن العينات الطبيعية، وخاصة عندما يتم خفض تركيز الفيبرينوجين بشكل ملحوظ.

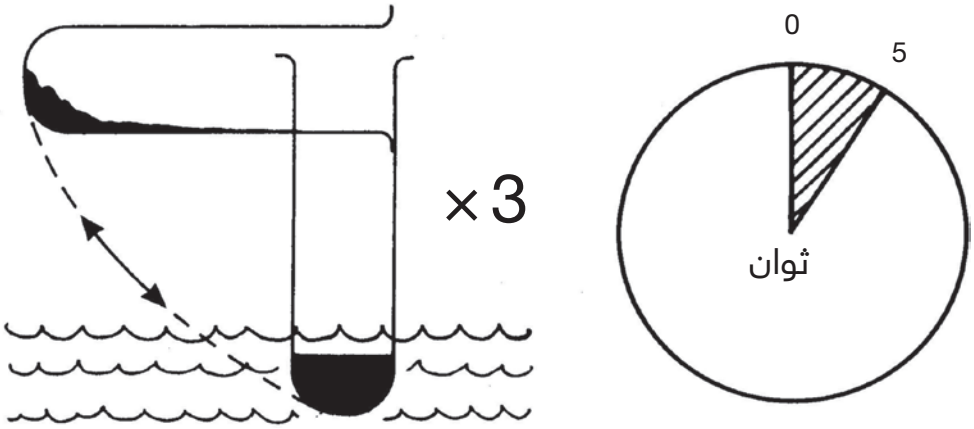
أفضل طريقة لإجراء اختبارات التخثر اليدوي هي استخدام الأنابيب الزجاجية، والحجم المناسب هو 10×75 ملم. ويمكن استخدام أنواع مختلفة من الأنابيب الزجاجية بنجاح، إلا أنها قد تؤثر على أوقات التخثر المتحصلة، وخصوصاً في اختبارات المشاهدة مثل وقت الثرومبوبلاستين (APTT) المنشّط جزئياً. إذا تم تغيير مصدر أنابيب الاختبار (المُصنّع أو التركيب)، فينبغي الأخذ بعين الاعتبار احتمالية تأثر النتائج. ويمكن القيام بذلك من خلال مقارنة عدد قليل من الاختبارات، مثل (APTT)، مع نوعي الأنابيب كليهما. إذا ظهرت اختلافات منهجية، فيجب إنشاء نطاق عادي جديد. وينبغي تجنب غسل أنابيب الاختبار وإعادة استخدامها قدر الإمكان.

وبسبب العديد من المتغيرات ومصادر التلوث المحتملة المرتبطة بالتقنيات اليدوية، يجب أن تشمل هذه العملية تكرار الاختبارات. وعلى أية حال، إذا اختلف وقت التخثر للاختبارات المكررة بأكثر من 10 %، فتجب إعادة الاختبار.

عند استخدام تقنينة إمالة الأنبوب، فمن المهم معرفة المزايا التالية:

- يجب أن تتم تدفئة الكواشف مسبقاً حتى درجة 37 مئوية لمدة خمس دقائق على الأقل قبل استخدامها في اختبارات التخثر.
- يجب أن يتم خلط مزيج بلازما الاختبار والكاشف مباشرة بعد إضافة آخر عنصر من المزيج عن طريق الرج السريع المسيطر عليه لأنبوب الاختبار لمدة ثانية أو ثانيتين، وأن تبدأ ساعة التوقيت في الوقت ذاته.
- وعندها يجب إمالة الخليط بزاوية قدرها 90 درجة ثلاث مرات كل خمس ثوان تحت المراقبة في حين يتم تسجيل وقت التخثر. ويظهر هذا الإجراء في الشكل 1.6 أدناه.
- يجب أن يُغمر أنبوب الاختبار في حوض ماء بدرجة حرارة 37 مئوية (± 0,5 درجة مئوية) بين عمليات الإمالة بحيث تغطس قاعدة أنبوب الاختبار المائل حوالي 4–3 سم تحت سطح الماء، لتساعد في المحافظة على درجة حرارة المزيج قريبة من 37 درجة مئوية قدر الإمكان.
- يجب أن يتم تدقيق مزيج التخثر بصريا تحت مصدر ضوئي لمصباح أنجلوبوز أو ما شابه ذلك وتسجيل وقت التخثر.

الشكل 1.6: تقنية إمالة الأنبوب اليدوية لاختبارات التخثر



إمالة الأنبوب ثلاث مرات كل خمس ثوان

7 إعداد ومعايرة البلازما الطبيعية المجمعة

الجدول 1.7: جمع البلازما الطبيعية المجمّعة

المتبرعون	20 فرداً أصحاء طبيعيون لا يتناولون أدوية تتداخل مع عوامل التخثر وتفاعلات التجلط. من المقبول شمول النساء اللاتي يتناولن حبوب منع الحمل، ويفضّل أن يكون العدد متساوياً تقريباً بين الذكور والإناث، وينبغي أن تتراوح أعمارهم بين 20 الى 50 عاماً.
مضاد التخثر	0.109م (3.2 %) من ديهايدرات سترات ثلاثي الصوديوم المخزنة مع (N-2-hydroxyethylpiperazine) حامض (HEPES) (N-2-ethanesulphonic) في 5 غرام لكل 100 مل من سترات ثلاثي الصوديوم.
الجمع	يتم سحب الدم من المتبرعين مابين 9 و11 صباحاً باستخدام محاقن بلاستيكية ذات استخدام لمرة واحدة بحجم 60 مل وإبر فراشة قياس 21 غ.

طريقة تحضير البلازما الطبيعية المجمّعة (PNP)

1 يجمع 54 مل من الدم ويمزج مع 6 مل من مضاد التخثر في حاويات بلاستيكية.

2 تخزين العينة على ثلج مذاب أثناء الإعداد للتجميع.

3 إجراء عملية الطرد المركزي بدرجة 4 مؤية لمدة 15 دقيقة عند 2500 غرام.

4 تجميع البلازما في وعاء بلاستيكي مانع للاتصال.

5 يتم تقسيمها في قنان زجاجية سعة 1.5 مل وفي كميات متساوية بمقدار 0.5 مل.

6 يتم تجميدها بسرعة فوق ثلج جاف/ ثنائي أوكسيد الكربون الصلب (CO_2) إذا توفر. وبدلا من ذلك، يوضع فوراً على رف مفتوح بدرجة 70– مئوية.

7 يتم إكمال الإجراءات الواردة أعلاه خلال أربع ساعات.

8 تبقى مستقرة عند درجة 70– مئوية لأكثر من ستة أشهر.

ستحتوي البلازما الطبيعية المجمّعة (PNP) التي أعدت بهذه الطريقة مستويات من العوامل (II، V، VII، IX، X، XI، XII، HMWK) وعلى البريكاليكرين بحوالي وحدة واحدة لكل مل أو 100 وحدة لكل دل، وعلى الرغم من أن اختلاف مستويات العامل (FVIII) وعامل فون ويلبراند (VWF) بشكل واسع في تجمعات مختلفة من البلازما الطبيعية المجمّعة (PNP). يجب معايرة هذه البلازما الطبيعية المجمّعة محلياً على أساس الوحدة الدولية (IU)، وبما أن المعايير الدولية متاحة الآن لجميع عوامل تخثر الدم المذكورة أعلاه، باستثناء العامل (FXII). ويمكن استخدام الكمية المجمّعة دون معايرة مع كمية افتراضية من 100 وحدة/ دل U/dl أو وحدة واحدة/ مل U/ml

لعامل (FXII). ولغرض المعايرة وفق الوحدة الدولية (IU)، فمن الضروري إما الحصول على إعدادات مرجعية معايرة لمنظمة الصحة العالمية (التي عقدت في المعهد الوطني للمعايير والرقابة البيولوجية، جنوب ميمس، بوتيرز بار، هيرتز، المملكة المتحدة) أو شراء بلازما تجارية مرجعية مناسبة تمت معايرتها وفق الوحدة الدولية من قبل الشركة المصنعة. يجب الأخذ بعين الاعتبار استبدال هذه البلازما المجمعة كل 12 إلى 18 شهراً، ما لم يكن هناك دليل من نتائج رقابة الجودة الداخلية تشير إلى أنه تمت المحافظة على الاستقرار.

طريقة معايرة البلازما الطبيعية المجمّعة (PNP) المحلية:

1 الحصول على المعايرة القياسية، مثلاً: المعايير الدولية لمنظمة الصحة العالمية (IS) (زجاجتين بحد أدنى).

2 تستخدم زجاجة واحدة من المعايير الدولية (IS) مع 4 مقادير متساوية من (PNP) المحلية في يومين مختلفين.

3 في اليوم الأول اختبر (دولي، محلي، محلي، محلي، محلي، دولي) وكرر هذه العملية باستخدام كميات مخففة جديدة من كل بلازما.

4 في اليوم الثاني اختبر (محلي، محلي، دولي، دولي، محلي، محلي) وكرر هذه العملية باستخدام كميات مخففة جديدة من كل بلازما.

5 احسب قوة كل قدر من المعايير المحلية مقابل معدل النتائج مع اثنين من المعايير المحلية.

ويتم تعيين متوسط الناتج للكميات المتساوية الأربع × تخفيفين × يومين (ن = 16) على أنها قوة المعايير المحلية.

8 تأسيس نطاق مرجعي اعتيادي

ولإعطاء التفسير الصحيح لنتيجة أي فحص مختبري، فمن المهم الحصول على البيانات ذات الصلة بنتائج الاختبار لأشخاص أصحاء طبيعيين. الصحة ليست شرطاً جيد التعريف، وغالباً ما تكون مصطلحاً نسبياً. ويمكن أن تكون المجموعة المثالية في بعض الحالات متطابقة بشكل وثيق بين الأشخاص الخاضعين للدراسة في ما يخص العمر والجنس، في حالات العوامل (FVIII/VWF) وفصائل الدم (ABO).

ومع ذلك، فإن اختياراً دقيقاً كهذا ليس ضرورياً للعديد من اختبارات التخثر. وعملياً، سيتأثر اختيار أشخاص بصحة اعتيادية لإنشاء نطاق طبيعي باعتبارات عملية. يمكن استخدام موظفي المستشفى الأصحاء الذين لا يتناولون أية أدوية ، المتبرعين بالدم الأصحاء أو المرافقين للمرضى البالغين. جميعهم يمكن استخدامهم لعمل عينات مرجعية وهناك عدد من الاعتبارات المهمة في ما يتعلق بالمجموعات العادية Normal rang، وكما يرد أدناه.

يمكن لحالة الأشخاص الطبيعيين أن تؤثر على النتائج التي يتم الحصول عليها عند جمع الدم. وتمت مؤخراً مراجعة بعض هذه المتغيرات ما قبل التحليلية وفق دليل (ISTH) المتعلق بأمور الصحة النسائية (Blomback et al. 2007). ويشمل هذا إعادة النظر في تأثيرات الإجهاد البدني (على سبيل المثال، استمرارية لغاية 10 ساعات من الزيادة بقدر ضعفين ونصف (2.5) في العوامل (FVIII/VWF)، الإجهاد الذهني (زيادة في (FVIII/VWF) بعد الإجهاد الذهني الحاد)، آثار الهرمونات، التباينات الإيقاعية (الساعة البايولوجية)، والآثار الناجمة عن وضعية الجسد والنظام الغذائي. لقد تم إعطاء بعض التوصيات العامة وهي ليست قاصرة على فحوصات المرضى من الإناث. وعلى النحو التالي:

- الامتناع عن ممارسة الرياضة البدنية المكثفة لمدة 24 ساعة قبل سحب الدم من الوريد.
- استخدام بيئة يتم تخفيف الإجهاد البدني والذهني فيها.
- الامتناع عن تناول الاطعمة الدسمة والتدخين صباح يوم سحب الدم من الوريد.
- الحصول على العينات في الصباح الباكر (7 حتى 9 صباحاً)، بعد أن يتم إجلاس الشخص في وضع مريح لمدة 20 إلى 30 دقيقة.

يجب دائماً إنشاء نطاق طبيعي محلياً، وينبغي استخدام معلومات المصنع والتعليمات فقط كدليل.

ويجب جمع العينات الطبيعية، ومعالجتها وتحليلها باستخدام تقنيات أقرب ما تكون إلى التطابق مع التقنيات المستخدمة لعينات المريض.

ولاختبارات الكشف (APTT، PT) تحديداً، ينبغي النظر في احتمالية ان دفعة/ كمية جديدة من الكاشف من الشركة المصنعة نفسها تحتوي على مجموعة طبيعية مختلفة عن المواد السابقة المماثلة. ينبغي تدقيق بيانات مراقبة الجودة الداخلية المتداخلة مع أي تغيّر. وتشير أية تغييرات إلى الحاجة لمجموعة طبيعية مختلفة.

ولغرض إجراء المقايسات، ينبغي استخدام معلومات المصنع والتعليمات فقط كدليل. وأكثر تقنيات المقايسات ملاءمة هي تلك التي لأجلها تم إنشاء المجموعة الطبيعية المحلية مشابهة إلى حد كبير لتلك الموجودة في التعليمات.

وتختلف النطاقات العادية لبعض اختبارات التخثر لدى الأطفال حديثي الولادة (المولودون قبل الموعد أو بمدة الحمل الكاملة) والأطفال منها عند البالغين (Andrew et al. 1987, 1990, 1992).

يجب استخدام النطاقات العادية، وخصوصاً لاختبارات الكشف فقط كعامل مساعد للمعلومات السريرية. يتطلب بعض المرضى الذين لديهم تاريخ مرضي شخصي وعائلي مطابق المزيد من الفحوصات في حال وجود نتائج فحص طبيعية. أما المرضى الآخرون ذوو نتائج الفحوصات غير الطبيعية فقد لا يتطلبون المزيد من الفحوصات حين يكون أمر النتائج غير الطبيعية جلياً. لذا قد لا تكون الحدود الطبيعية متساوية لحدود القرار والتدخل.

هناك أسباب إحصائية وراء الحاجة لـ 120 شخصاً على الأقل لبناء مجموعة مرجعية صالحة تماماً، ولكن لأغراض عملية، يمكن الحصول على نتيجة مقاربة من خلال اختبار عدد أصغر بكثير، ويمكن اعتبارها مقبولة لأغراض سريرية من قبل عدد من الخبراء الميدانيين (CLSI 2008). يجب أن لا يقل عدد الأشخاص الطبيعيين الذين تم اختيارهم للتحليل عن 30 شخصاً لاختبارات فحوصات الإرقاء المتعلقة باضطرابات النزف.

يجب عند إنشاء نطاقات طبيعية، جمع عينات من أشخاص طبيعيين، ومعالجتها وتحليلها محلياً باستخدام تقنيات مطابقة لتلك المستخدمة في تحليل عينات المرضى. إذا كانت الممارسة العادية هي لعينات يتم تخزينها مجمدة لتحليل الدفعة، فيجب أن يتم ذلك أيضاً للعينات الطبيعية. إذا تمت معالجة عينات المريض بعد تأخير تم خلاله نقل العينات إلى المختبر في غضون عدة ساعات، فيجب أن يستخدم تأخير مماثل بين جمع العينات وفحصها بالنسبة لعينات الأشخاص الطبيعيين المستخدمة لاستخلاص القيم المرجعية. ينبغي استخدام معلومات مصنّع الكاشف والتعليمات كدليل فقط.

يتم استخدام النتائج التي تم الحصول عليها من عينات أشخاص طبيعيين وأصحاء في كل اختبار لبناء مجموعة مرجعية عادية. ويُظهر توزيع نتائج الاختبار المتعلقة بأغلب فحوصات اضطرابات النزيف توزيعاً عادياً أو مموهاً. ومن المفيد أن يتم تأكيد ذلك من خلال المراقبة البصرية للبيانات في شكل رسم بياني، كما هو مبيّن في الشكل 1.8. قد تكون القيم المتطرفة الواضحة الموجودة بشكل غير متوقع بعيداً عن معظم القيم المرجعية الأخرى نتائج شاذة على الأرجح. من المقبول استبعادها من الحسابات الأخرى.

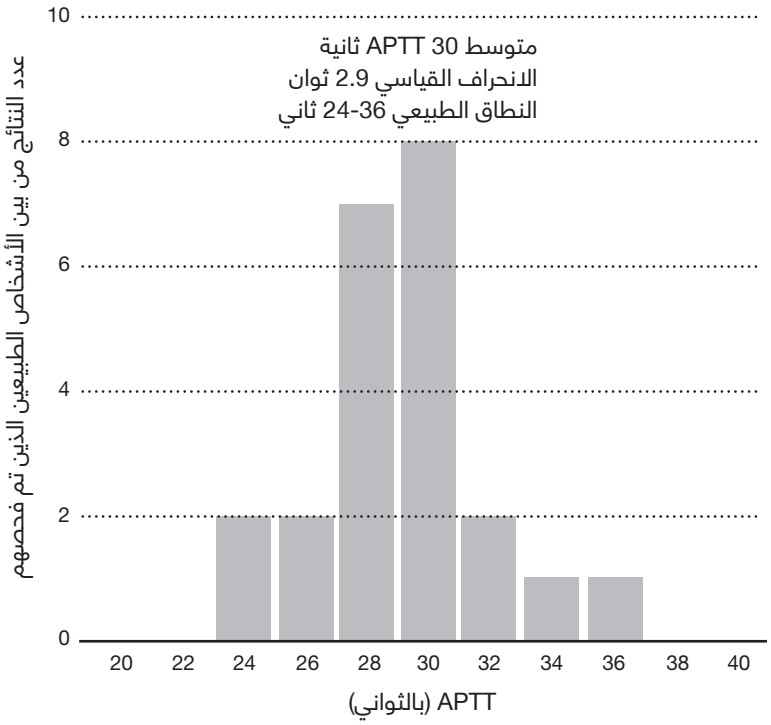
والعرف المستخدم كثيراً هو أن يشمل النطاق المرجعي أو العادي الـ 95 % المركزية من القيم. إذا اختلف التوزيع بشكل ملحوظ عن ما موضح في الشكل 1.8 – أن يميل في اتجاه واحد على سبيل المثال – فقد تكون هناك حاجة لعينات طبيعية إضافية. من الملائم استبعاد 2.5 % من القيم من الطرفين، وترك الـ 95 % المركزية.

إذا كان التوزيع اعتيادياً، فمن المناسب حساب المتوسط والانحراف المعياري للقيم العادية (كما هو موضح في القسم 5)، واستخدام المتوسط زائداً ضعفي الانحراف المعياري (2SD) والمتوسط ناقصاً ضعفي الانحراف المعياري (2SD) على أنها الحدود العليا والسفلى على التوالي.

وعلى أي حال، يجب فقط استخدام المعدل الاعتيادي كدليل للمساعدة في التفسيرات السريرية.

للحصول على المناقشة الكاملة حول إنشاء النطاقات المرجعية، راجع ((CLSI (2000).

الشكل 1.8: توزيع نتائج (APTT) في مواضيع صحية واعتيادية



ملاحظة: تُظهر البيانات توزيعاً عادياً، موزعاً بالتساوي على جانبي قيمة المتوسط.

المراجع

Andrew M, Paes B, Johnston M. Development of the hemostatic system in the neonate and young infant. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990; 12:95–104.

Andrew M, Paes B, Milner R, et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood 1987;* 70:165–72.

Andrew M, Vegh P, Johnston, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostastic system during childhood. *Blood* 1992; 80:1998–2005.

Blomback M, Konkle BA, Manco-Johnson MJ, Bremme K, Hellgren M, Kaaja R on behalf of the ISTH SSC on Women's Health Issues. Preanalytical conditions that affect coagulation testing, including hormonal status and therapy. *Thromb Haemost* 2007; 5:855–858.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: Approved guideline*, 2nd ed. 2000; Clinical and Laboratory Standards Institute Document C28-A2.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *One-stage prothrombin time (PT) test and activate partial thromboplastin time (APTT) test: Approved guideline,* 2nd ed. 2008; Clinical and Laboratory Standards Institute Document H47-A2.

9 الكواشف

كلوريد الكالسيوم

على سبيل المثال، مواد (BDH) الكيمياوية. المحلول المولي.

25mM: يخفف 25 مل من المحلول (1M) إلى 1 لتر في دورق حجمي من الماء المقطر.

حامض باربيتورات اورين المعزول ذي درجة الحموضة 7.35

5.875 غ من ثنائي إثيل باربيتورات الصوديوم (الصوديوم باربيتون)

7.335 غ من كلوريد الصوديوم

1 ضع المواد في الدورق الحجمي ثم أذب فيه ما مقداره 780 مل من الماء المقطر.

2 أضف 215 مل من حامض الهيدروكلوريك (0.1M).

3 اضبط الحجم إلى لتر واحد بالماء المقطر.

4 إذا لزم الأمر افحص درجة الحموضة واضبطها إلى 7.35 درجة.

محلول اورين الملحي المعزول

200 مل من عازل باربيتورات اورين
800 مل محلول ملحي عادي (0.9 % غم كلوريد الصوديوم)

عازل جليوكسالين

2.72 غ من جليوكسالين (إيميدازول)
4.68 غ من كلوريد الصوديوم

1 ضع المواد في الدورق الحجمي ثم أذب فيه ما مقداره 650 مل من الماء المقطر.

2 أضف 148.8 مل من حامض الهيدروكلوريك (0.1M)، واضبط درجة الحموضة إلى 7.3.

3 اضبط الحجم إلى لتر واحد بالماء المقطر، إذا لزم الأمر.

الكواشف المستخدمة لاختبارات المشاهدة

في المراحل الأولى من فحوصات وتشخيص اضطرابات النزف، فإن من الأهمية البالغة اختيار وتطبيق فحص الكواشف المناسبة، ولا سيما بالنسبة لاختبارات وقت البروثرومبين (PT) ووقت الثرومبوبلاستين المنشط جزئياً (APTT). وتتوفر العديد من الكواشف المختلفة في جميع أنحاء العالم. وحيث تتوفر التشكيلة الواسعة، ينبغي عند الاختيار الأخذ بنظر الاعتبار تباين الحساسية. وفي فحص اضطراب النزف بواسطة (PT) و(APTT)، يتعيّن أخذ مصادر المعلومات التالية المتعلقة بالأداء المحتمل لكاشف معيّن بنظر الاعتبار:

- البيانات المقارنة في ما يتعلق بالكواشف الأخرى من مشاريع ضمان الجودة الخارجية (EQA)، مثل مشروع ضمان الجودة الخارجية الدولي (انظر القسم 5)
- البيانات المنشورة
- اختبار محلي لبلازما مأخوذة من مريض معروف العلة
- وثائق بيانات المصنّعين

قد يكون الإنتاج المحلي لكواشف (PT) و(APTT) مغرٍ من الناحية المالية، إلا أنه قد يسبب صعوبات في توحيد المقاييس، وبالتالي من الأفضل تجنبه.

وتجدُر الملاحظة أيضاً أن بعض الشركات المصنعة تقدم كواشف مختلفة. وبالإضافة إلى ذلك، قد تتغير تركيبة كواشف تحمل الاسم نفسه من وقت لآخر. ويعني هذا أنه لا يمكن أعطاء توصيات باستخدام مصدر معين من المواد.

10 تعداد الصفائح

المبدأ

يتم مزج الدم مع سائل التخفيف الذي يؤدي إلى انحلال خلايا الدم الحمراء. يتم تعبئة عداد كريات الدم بسائل التخفيف، وتُحسب الصفائح الدموية تحت المجهر، ويفضل باستخدام مجهر مرحلة التباين (phase contrast)، إذا توفر.

المواد/ المعدات

- حجرة عد رقيقة مسطحة القاع، (جهاز عد الخلايا نوعية نيوباور) لعد الصفائح بواسطة مجهر تمايز طوري (phase contrast)
- مجهر تمايز طوري (phase contrast) مجهز بمكثف طويل المدى، إذا توفر، وإلا فيمكن استخدام مجهر ضوئي عادي
- ماصة 20 مايكرولتر
- ماصة مدرجة 2 مل
- أنبوب بحجم 12×75 ملم
- خلاط ميكانيكي

الكاشف

سائل تخفيف: 1 % من أكسلات الأمونيوم في الماء المقطر.
يُخزن في الثلاجة، وتتم تصفيته دائماً قبل استعماله.

العينة

إذا كانت عينة الدم مأخوذة من وخز الإصبع، فيجب أن يكون الثقب نظيفاً والدم يتدفق بسلاسة. تُمسح أول قطرة من الدم. إذا كانت عينة الدم مأخوذة من الدم الوريدي، فلا بد من جمعها في حقنة بلاستيكية جافة (أو زجاجة بغطاء من السيليكون) ذات إبرة قصيرة لا تقل عن مقياس 21. يجب إزالة الإبرة قبل أن يُسلم الدم في الوعاء البلاستيكي مع (EDTA). يجب أن يتم مزج الدم ومضاد التخثر بلطف، لتجنب تزبده، ودون أي تأخير.

الطريقة

1 يتم مص 0.38 مل من سائل التخفيف إلى أنبوب اختبار.

2 تعبئة الماصة بـ 20 مايكرولتر حتى العلامة ثم مسح الماصة من الخارج.

3 تفريغ محتوى الماصة في سائل التخفيف، ويتم غسل الماصة بسحب الدم وتفريغه في الأنبوب عدة مرات. يُمزج لمدة لا تقل عن 10 دقائق يدوياً أو يُفضل بواسطة خلاط ميكانيكي.

4 تعبئة عداد الكريات، وكما موضح أدناه.

5 تغطى الحجرة بطبق بتري petri dish لمدة 10 إلى 20 دقيقة لإتاحة استقرار الصفائح الدموية. تترك قطعة قطن مبللة أو ورق الترشيح داخل الطبق لمنع التبخر.

6 تُحسب الصفائح باستخدام المجهر في مربعات كبرى بمساحة 1 ملم (= 0.1 مايكرولتر). يتم عد الصفائح الدموية في عدة مربعات حسب الضرورة للحصول على عدد لا يقل عن 100. تظهر الصفائح مستديرة أو بيضوية، وتتيح بنيتها الحبيبية الداخلية ولمعانها الأرجواني تمييزها من دون بقية المكونات. وتبدو أشباح خلايا الدم الحمراء التي تم عزلها بواسطة أكسلات الأمونيوم في الخلفية. إذا لم يتوفر مجهر التمايز الطوري، فيمكن استخدام مجهر ضوئي عادي، مع تخفيض المكثف باستمرار لتوفير كثافة ضوئية منخفضة.

7 حساب عدد الصفائح الدموية للتر الواحد من الدم وفقا للمعادلة الواردة أدناه.

عَداد الكريات

يتم إنشاء حجرة عداد الكريات، مع نيوباور أو النيوباور القوي المحسن، بحيث تكون المسافة بين الجانب السفلي من زجاج الغطاء وسطح الحجرة 0.1 ملم. يحتوي سطح الحجرة على مجالين محكومين خصيصاً بأبعاد كالمبينة في الشكل 10.1. يحتوي الملمتر المربع المركزي على خطوط حدود ثنائية أو ثلاثية. في المناطق الوسطى هناك 25 مربعاً في النيوباور المحسنة و16 مربعاً في النيوباور المتحكمة. تبلغ مساحة كل مربع 0.04 ملم^2 (0.2×0.2 ملم). وهذه المربعات بدورها مقسمة الى مربعات أصغر، بمساحة 0.0025 ملم2 لكل منها (0.05×0.05 ملم). والأربا ع الخارجي للمنطقة الحاكمة التي مساحة كل منها 1 ملم2 وهي مقسمة إلى 16 مربعاً.

الحسابات

معادلة حساب عدد الخلايا هي:

العدد (خلايا/لتر) = $(N \times D/A \times 10 \times 10^6)$

حيث (N) = العدد الكلي للخلايا المحسوبة

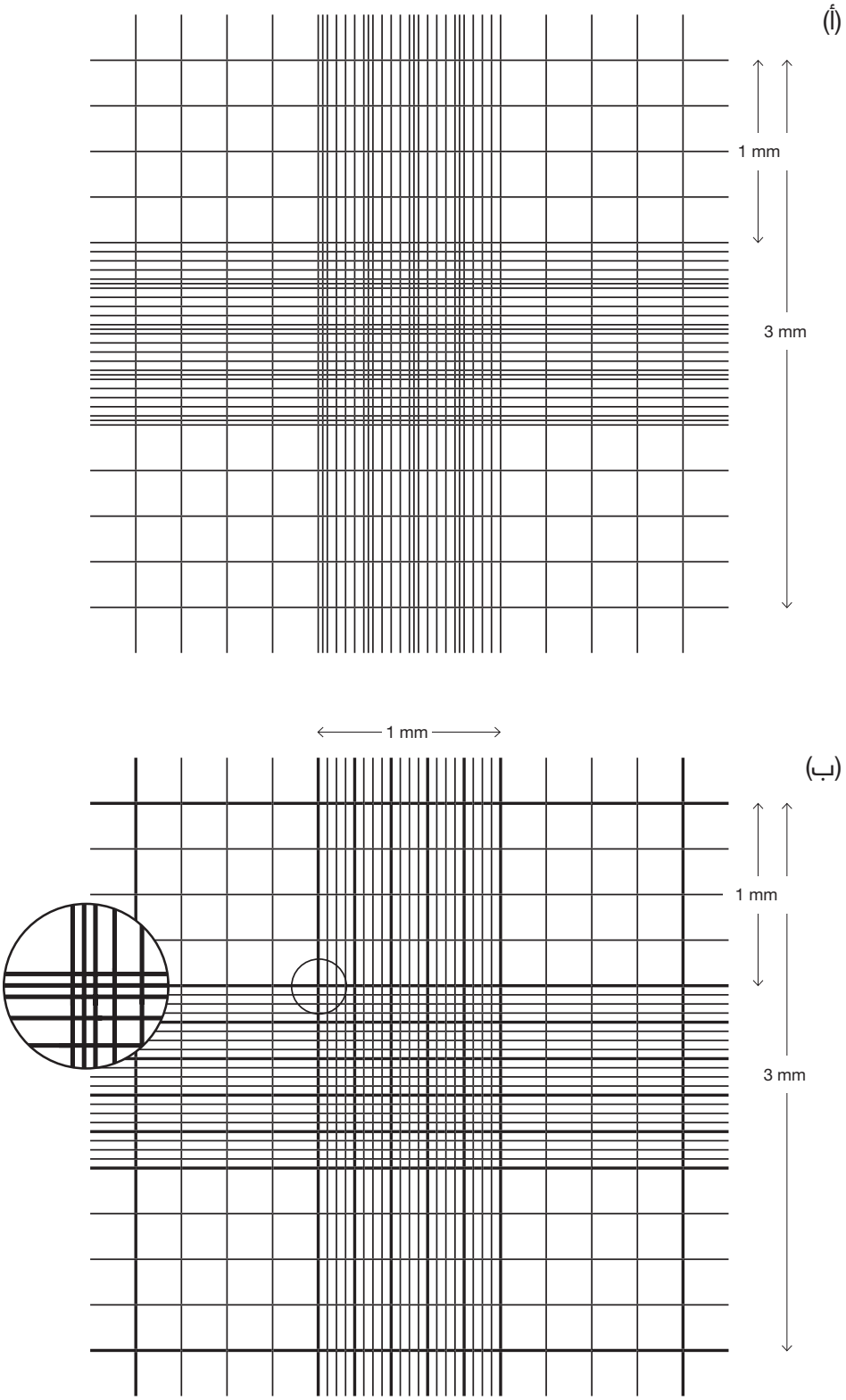
(D) = التخفيف

(A) = المساحة الكلية المحسوبة (بالملمتر المربع)

(10) = العامل لحساب الحجم بالمايكرولتر من المساحة (بالملمتر المربع) وعمق الحجرة (0.1 ملم)

(10^6) = العامل لتحويل العدد من (/ مايكرولتر إلى / لتر)

الشكل 10.1: حجرة الفرز لعداد الكريات (أ) نيوباور و (ب) نيوباور المحسنة



مصادر الخطأ في عد الخلايا

حين يتم استخدام الدم من الأوعية الشعيرية يجب الحصول على قطرات حرة التدفق.

عندما يتم استخدام الدم بمضاد التخثر، يجب أن تكون العينة ممزوجة بعناية من خلال قلب أنبوب الدم بما لا يقل عن 20 مرة قبل أخذ العينة. لا تقم برج الأنبوب، لأن رجه يولد رغوة، مما يجعل المص الدقيق مستحيلاً. قم بإمالة الأنبوب الممزوج جيداً بزاوية 45° أو أكثر قليلاً، وقم بالمص من حافة الأنبوب، باتباع الإجراءات نفسها للدم الشعيري.

يجب أن تكون ماصات أخذ عينات الدم نظيفة وجافة.

يجب ملء الماصة بسرعة، ويجب أن يتم سحب الدم بدقة باستخدام جهاز شفط الماصة المرفق بها، والتعبئة إلى الخط المطلوب. إذا تم تجاوز الخط قليلاً، فيمكن طرد الدم الزائد عن طريق مس حافة الماصة بقطعة من ورق الترشيح أو بقماش ناعم. إذا تم تجاوز الخط، فيجب استخدام ماصة جديدة.

لا ينبغي وجود فقاعات هواء في عمود الدم.

يجب أن تُمسح الماصة من الخارج من الدم (والحرص على عدم سحب الدم من الطرف) قبل أن يتم إدخالها في سائل التخفيف.

بعد أن تم تفريغ محتويات الماصة في المخفف، يجب سحب سائل التخفيف إلى الماصة من خلال عدة مرات من الشفط المطرد، لضمان أن يتم تفريغ جميع الدم في السائل.

يجب رج الأنبوب الذي يحتوي على الدم المخفف بلطف يدوياً لدقيقتين على الأقل، أو يفضل استخدام هزاز ميكانيكي. وبعد رج الأنبوب، تتم تعبئة الحجرة فوراً بواسطة ماصة باستور أو الأنبوب الشعيري.

تُملأ الحجرة بواسطة الخاصة الشعرية، من خلال تدفق السائل من الماصة أو من الشعيرات المنتظمة بحيث تمتلئ بسرعة وبسلاسة. يجب أن يتم ملؤها تماماً، ولكن لا يجب أن ينتشر السائل إلى الأخاديد. دع الخلايا تستقر في منطقة العد لمدة بين 10 إلى 20 دقيقة، ثم استمر في عملية العد.

يجب أن تكون حجرة عد الكريات والغطاء الزجاجي نظيفة وجافة قبل استخدامها. ويمكن أن تحدث أخطاء كبيرة نتيجة بصمات الأصابع أو الشرائح الفلمية الدهنية.

ولا بد من حساب عدد كاف من الخلايا لتقليل الخطأ الناجم عن التوزيع الاعتباطي للخلايا. وعملياً، يجب أن يتم حساب ما لا يقل عن 100 خلية. وكمزيد من التدقيق للتوزيع الصحيح في الحجرة، يجب أن لا يختلف عدد الخلايا المحسوبة في كل منطقة (أي في المربعات الكبيرة) بأكثر من 10 %.

الضوابط

يجب القيام بعمليتي تخفيف، وأخذ متوسط الحسابين، ويجب أن يتفق الحسابان ضمن نطاق 10 %.

مصادر الخطأ في عد الصفائح

إن الدم المأخوذ عن طريق وخز الوريد هو أفضل من الدم الشعيري، لأن الصفائح تتمسك بالجرح والتخفيفات المتلاحقة من وخز الاصبع ليست قابلة للتكرار دائماً.

تم وصف الأخطاء العامة لعملية السحب بالماصة وعد الكريات أعلاه. وإضافة إلى ذلك، يجب إيلاء اهتمام خاص لضمان أن تكون حجرة العد نظيفة بدقة، إذ يمكن أن يتم عد الأوساخ والغبار على أنها صفائح دموية. اغسل الحجرة بالماء والصابون، ثم اشطفها بالماء المقطر، واتركها لتجف بانسياب الماء منها، ثم امسحها بنسيج قماشي خال من الوبر. تأكد من أن قطعة الغطاء نظيفة قبل استخدامها.

يحول وجود كتل من الصفائح الدموية دون اعتمادية العد. إذا كانت العينة تحتوي على كتل، فيجب أخذ عينة جديدة.

يجب أن يبقى مخفف أكسلات الأمونيوم مبرداً، ويجب التخلص منه إذا كان هناك دليل على تلوث بكتيري.

يجب القيام بحساب العينة خلال ثلاث ساعات من جمعها.

11 زمن النزف

المبدأ

وقت النزف هو الوقت الذي يستغرقه الجلد المقطوع قياسياً لعمق وطول ثابتين لإيقاف النزيف.

تحدث إطالة وقت النزف للمرضى الذين يعانون من نقص الصفائح (thrombocytopenia)، وأمراض فون ويلبراند، وهن صفيحات جلانزمان (Glanzmann's thrombasthenia)، ومتلازمة برنار سولييه (Bernard–Soulier)، مرض عوز تخزين الصفائح، واضطرابات الصفاح الأخرى. الفيبرينوجين مطلوب، وقد تم اقتراح دوراً لـ (FV)، لذا قد يمكن إطالة وقت النزيف للمرضى الذين يعانون من نقص في الفيبرينوجين أو (FV). وتحدث الإطالة أيضاً لدى المرضى الذين يعانون من أمراض الكلى، وأمراض نقص بروتين الدم، واضطرابات الأوعية الدموية.

المواد/ المعدات

- جهاز قياس ضغط الدم
- مسحات تطهير
- جهاز قالب وقت النزيف
- ورق ترشيح بسمك 1 ملم
- ساعة توقيت

الطريقة

1 يوضع حزام جهاز قياس ضغط الدم حول أعلى الذراع ويُنفخ حتى درجة 40 ملم من الزئبق. ويستمر هذا الضغط طوال الاختبار.

2 يتم تنظيف السطح الظهري من الساعد، ويوضع جهاز وقت النزيف بثبات على الجلد بدون ضغط. يُضغط الزناد، وتبدأ ساعة التوقيت.

3 ينبغي تجنب الأوردة السطحية والندبات والكدمات.

4 عند الثانية 30 من الوقت، نشّف تدفق الدم بواسطة ورق الترشيح. أحضر ورق الترشيح قريباً من الشقوق دون المساس بحافة الجرح.

5 سجل الوقت من الوخز وحتى وقف النزيف.

التفسير

يصل المعدل الطبيعي لدى البالغين الى ثماني دقائق لكنه قد يختلف وفقا للطريقة المستخدمة.

الملاحظات

- هناك نوعان من الأجهزة المتوفرة تجارياً والقادرة على تنفيذ وقت النزيف عند كتابة هذا التقرير. ينبغي إنشاء معدل طبيعي محلياً، وبغض النظر عن الجهاز المستخدم.
- ينبغي أن يكون الشق باتجاه مواز لطول الذراع. تجعل الشقوق العمودية النزف يستمر لوقت أطول.
- ينبغي تكرار النتيجة غير الطبيعية.
- ليس من الضروري أن تُسجل نقطة النهاية إذا استمر النزيف أكثر من 20 دقيقة.
- ينبغي الأخذ بنظر الاعتبار تأثير الأدوية المتداخل مع وظيفة الصفائح. على سبيل المثال، يمكن للأدوية التي تحتوي على الأسبرين أن تسبب إطالة النزف. لذا، يجب عدم تناول هذه الأدوية قدر المستطاع لمدة سبعة أيام قبل الاختبار.
- هناك احتمال حدوث ندبات في موقع شقوق وقت النزف. ويجب إعلام المرضى بهذا قبل تنفيذ الشق.

المرجع

Mielke CH. Measurement of the bleeding time. *Thromb Haemost* 1984; 52:210–211.

12 زمن البروثرومبين (PT)

المبدأ

يعكس هذا الاختبار الكفاءة العامة للنظام الخارجي، فهو حساس لتغييرات العوامل (V، VII، X)، وأقل حساسية للعامل (II) (البروثرومبين) كما أنه غير مناسب للكشف عن التغييرات الطفيفة في مستوى الفيبرينوجين، إلا أنه قد يكون غير طبيعي إذا كان مستوى الفيبرينوجين منخفضاً جداً أو إذا كان هناك مانع ما. وتتأثر حساسية الاختبار بالكاشف وبالتقنية المستخدمة، فمن المهم إنشاء مجموعة مرجعية محلياً.

يظهر الشكل 1.12 أدناه المسار الذي تم قياسه في وقت البروثرومبين. ويحتوي الكاشف (PT) الذي غالباً ما يُطلق عليه الثرومبوبلاستين، على معامل أنسجة ودهون فوسفاتية.

وتتوفر الكثير من الكواشف المناسبة تجارياً. يضم القسم 9 ملاحظات حول اختيار الكواشف.

الكواشف

- الثرومبوبلاستين (قد يحتوي هذا الكاشف على كلوريد الكالسيوم)
- 25 م م من كلوريد الكالسيوم (مطلوب فقط إذا كان كاشف الثرومبوبلاستين لا يحتوي على الكالسيوم)

الطريقة: يدوية

1 أضف 0.1 مل من البلازما الاعتيادية للأنبوبين الأولين ودفئهما إلى درجة 37 مئوية لمدة دقيقتين.

2 أضف 0.2 مل من كاشف الثرومبوبلاستين (المسخّن مسبقاً حتى 37 مئوية) (إذا وُجد الكالسيوم في الكاشف).

3 شغّل ساعة التوقيت، قم بالمزج، وسجل أوقات التخثر.

4 كرر العملية لكل عينة اختبار.

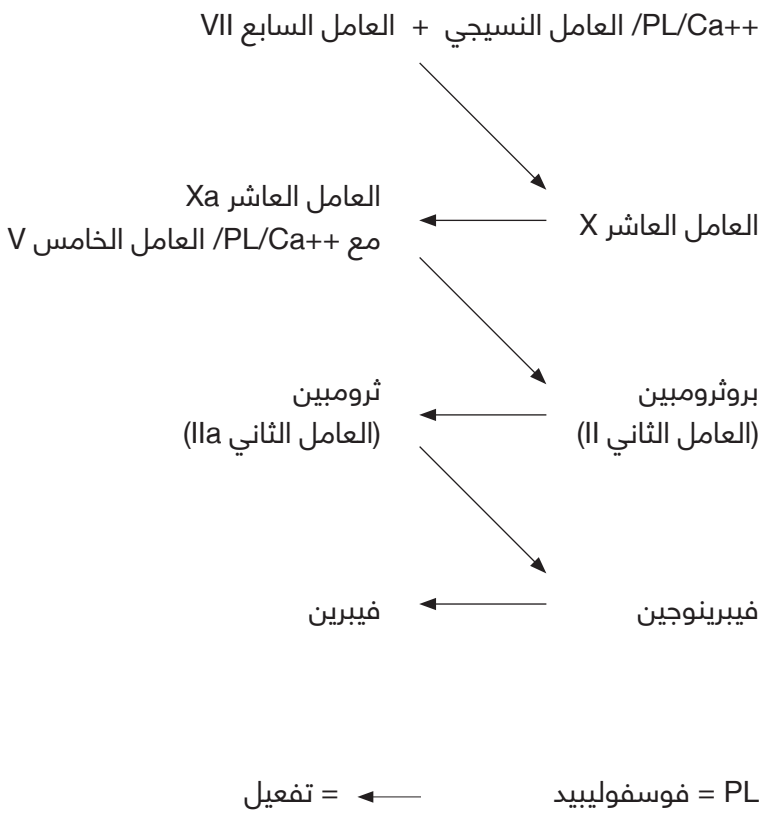
5 سجّل وقت التخثر للمريض بالثواني.

بالنسبة للتقنية اليدوية، قم بأداء جميع الاختبارات مكررة. وينبغي ألا تختلف مرات التخثر المتكررة بأكثر من 10 %. بالنسبة للاختبارات الآلية التي تتخللها مقايسة (CV) بأقل من 5 %، فسيكون اختبار واحد مقبولاً عادة، وتُفحص النتائج المطولة المقدمة.

الملاحظات

- إذا لم يكن كاشف الثرومبوبلاستين يحتوي على الكالسيوم، فإن إجراء الاختبار هو 0.1 مل بلازما، 0.1 مل ثرومبوبلاستين، ويتخثر مع 0.1 من 25 mM من كلوريد الكالسيوم مسبق التسخين.
- تنشيط العامل (FIX) بواسطة عامل النسيج (FVII) يحدث في الجسم الحي. وفي ظروف أكثر اختبارات (PT)، فإن العامل (X) مفعل بقوة بحيث أن المقايسة غير حساسة لنقص العامل (IX) أو (VIII).
- ينبغي تسخين الثرومبوبلاستين/ كلوريد الكالسيوم مسبقاً لمدة مابين 5 إلى 30 دقيقة قبل الاستخدام.
- تتأثر أوقات التخثر عادة باستخدام مقاييس تخثر مختلفة، اعتماداً على كيف ومتى يتم الكشف عن نقطة النهاية. ويؤكد هذا أكثر على أهمية إنشاء نطاقات طبيعية للطريقة المستخدمة في المختبر حالياً.
- في حال وجود عيوب طفيفة في العوامل (II، V، VII، أو X) فقد تكون درجة الإطالة في حدها الأدنى. في حالة نقصان العامل (II)، قد يكون (PT) ضمن المعدل الطبيعي.
- يمكن أن تتأثر بعض كواشف (PT) بسبب وجود مضادات تخثر داء الذئبة/ مضادات الفسفوليبيد، وبعض الأنوا ع النادرة من الأجسام المضادة والتي قد تؤدي إلى إطالة (PT) دون أي إطالة لـ (APTT). تكون الكواشف ذات تركيزات الفسفوليبيد الأقل، أكثر عرضة للتأثر، بما في ذلك بعض الكواشف التي يتم بناؤها بواسطة عوامل نسيج دهني مؤلف.
- يمكن أن يؤدي وجود العامل المنشّط (VII)، إما بعد العلاج بالعامل المؤتلف (VIIa) أو عند تنشيط العامل (VII) الأصلي، إلى تقصير (PT). يعتمد التأثير على كاشف عامل النسيج المستخدم. إن الكواشف التي تحتوي على عامل النسيج البقري معرضة لهذا التأثير بشكل خاص (كيتشين وآخرون 1992). يجب ألا تُخزن عينات الدم ما بين 2 – 8 درجات مئوية قبل تحديد (PT)، إذ قد يحدث تنشيط (FVII) البارد.
- يمكن أن تكون كمية الدم المجموعة لتحديد (PT) مستقرة لمدة لا تقل عن 24 ساعة، اعتماداً على الكاشف المستخدم. (بيجلين ولودنجتون 1997).
- قد تختلف عينات (PT) ذات الكواشف التي تحتوي على معامل النسيج البشري عن العينات المستحصلة بالكواشف التي تحتوي عوامل نسيج من فصائل الأخرى، مثل الأرانب. في حالات كهذه، فإن النتيجة التي تم الحصول عليها من كواشف عامل النسيج البشري تكون أكثر دلالة لخطر النزيف.
- للحصول على المناقشة الكاملة عن المواضيع التعلقة (PT)، انظر ((CLSI (2008).

الشكل 1.12: يتم قياس المسار من خلال اختبار وقت البروثرومبين



المراجع

Baglin T, Luddington R. Reliability of delayed INR determination: implications for decentralised anticoagulant care with off-site blood sampling. *Br J Haem* 1997; 96:431-4.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *One-Stage Prothrombin time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test: Approved guideline*, 2nd ed. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute Document H47-A2.

Kitchen S, Malia RG, Preston FE. A comparison of methods for the measurement of activated factor VII. *Thromb Haemost* 1992; 68:301-5.

13 زمن تفعيل الثرومبوبلاستين الجزئي (APTT)

المبدأ

ليس هذا الاختبار محدداً للنظام الجوهري (Intrinsic system) فحسب، بل هو أكثر اختبارات المعاينة فائدة لكشف نقص العوامل الثامن VIII والتاسع IX والحادي عشر XI والثاني عشر XII حين يقترن بوقت البروثرومبين الطبيعي.

سيتعرض APTT إلى الإطالة أيضاً عند أي نقص ينطوي على مسارات مشتركة (نقص العوامل الخامس V والعاشر X والثاني II، و الفيبرينوجين إلى حد أقل)، وفي حال وجود المثبطات. سيعمل وجود بعض المثبطات العلاجية للتخثر مثل الهيبارين أيضاً على إطالة APTT. ومن المهم أيضاً استبعاد احتمال استخدام مثل هذه المعالجات عند التحقيقات الأولية لـ APTTs المطّول.

تتم إطالة أمد الـAPTT في وجود البريكاليكرين (PKK) أو نقص مولد الكاينين ذي الوزن الجزيئي العالي (HMWK) ما لم يتم إجراء الاختبار باستخدام الكاشف الذي يحتوي على حامض إيلاجيك كمنشط. في هذه الحالة سيكون APTT طبيعياً، وحتى في غياب هذه العوامل بشكل كامل.

يُظهر الشكل 2.13 المسار الذي تم قياسه بواسطة APTT.

الكواشف

- كاشفAPTT
- 25 ملم من كلوريد الكالسيوم

الطريقة

1 ضع أنبوباً يحتوي على كلوريد الكالسيوم في درجة 37 مئوية لمدة خمس دقائق قبل الاستخدام.

2 امتص مقدار 0,1 مل من كاشف APTT في أنبوبي تخثر زجاجيين في درجة 37 مئوية.

3 امتص مقدار 0,1 مل من بلازما التحكم في الأنبوب الأول.

4 ابدأ ساعة التوقيت الرئيسية. امزج.

5 أضف مقدار 0,1 مل من بلازما التحكم إلى الأنبوب الثاني. امزج.

6 بعد وقت الحضانة* الموصى به، أضف 0,1 مل من كلوريد الكالسيوم لكل أنبوب بالتعاقب، وابدأ ساعة توقيت جديدة لكل أنبوب. امزج. سجل وقت تكوّن الخثرة.

بالنسبة للتقنية اليدوية، قم بإجراء بجميع الاختبارات بشكل مكرر. لا ينبغي أن تختلف أوقات التخثر المتكررة بأكثر من 10 %. بالنسبة للاختبارات الآلية باتباع مقايسة درجة التباين ما بينها لأقل من 5 %، سيكون التكرار المفرد مقبولاً في العادة، شريطة أن يتم التحقق من النتائج المطولة.

* ينبغي اتّباع توصية الشركات المصنعة للكاشف. ويتم هذا عادة في نطاق دقيقتين إلى خمس دقائق. ومن المهم جداً أن يتم توقيت الحضانة بالضبط، إذ سيؤثر الانحراف عن هذا عادة على النتائج، مع فترات الحضانة المطوّلة التي تعطي أوقات تخثر أقصر لأي كاشف معين.

تفسير النتائج

يجب إنشاء معدل طبيعي محلياً.

يشير APTT المطول مع PT الطبيعي إلى وجود نقص ممكن من العوامل (XII ,XI ,IX ,VIII) ومولد الكاينين ذي الوزن الجزيئي العالي والبريكاليكرين، أو وجود مثبط ما. في حالات APTT المطوّل، يجب اختبار مزيج متساو من البلازما الطبيعية وبلازما الاختبار (أي، مزيج من جزء اختبار واحد وجزء بلازما طبيعية واحد، ويسمى ذلك مزيج 50:50، كما مبين أدناه). إذا تم تصحيح الـ APTT بأكثر من 50 % من الفرق بين أوقات تخثر البلازما الطبيعية وبلازما الاختبار، فسيؤشر ذلك نقصاً في العامل. قد يدل تصحيح الضعف على وجود مثبط ما، ومن الممكن في أحد عوامل التخثر في النظام أو من نوع غير محدد، مثل تخثر داء الذئبة (انظر القسم 25).

الشكل 1.13: مثال على تفسير APTT

العينة	النتيجة
التحكم بـ APTT	35 ثانية
الاختبار	60 ثانية
إذا كان المزج 50:50	42 ثانية (هذا تصحيح جيّد، فعلى الأرجح يوجد نقص في العامل)
إذا كان المزج 50:50	52 ثانية (هذا تصحيح غير جيّد، لذا من المحتمل وجود مثبط ما)

الملاحظات

- تتوفر العديد من الكواشف المناسبة تجارياً. وتتضمن هذه الكواشف مواداً ذات حساسيات مختلفة. يضم القسم 9 ملاحظات حول اختيار الكواشف.
- أما بخصوص PT، فيمكن أن يتأثر التخثر باستخدام جهاز التخثر (coagulometer).
- ضمن البلازما الخاصة بالاختبار، يمكن للمستويات العالية من عامل تخثر واحد تعويض المستويات المنخفضة للعوامل الأخرى. على سبيل المثال، يمكن أن يؤدي الارتفاع الملحوظ بمستوى العامل الثامن (FVIII) خلال المرحلة الحرجة إلى APTT اعتيادي في وجود انخفاض مستوى (FIX) أو (FXI) والتي قد تكون لهما أهمية سريرية. إذا كان المريض يعاني من أعراض شخصية مواتية أو تاريخ عائلي مفترض لاضطراب النزف، فإن التحقق المكتمل، بما فيه من فحص لعوامل محددة، قد يكون له ما يبرره في وجود APTT الطبيعي، لا سيما إذا كانت النتيجة تكمن في الجزء العلوي من مجموعة المرجع.
- يختلف تركيز الفسفوليبيد بشكل ملحوظ بين الكواشف. وهذا هو أحد الأسباب التي تجعل درجة حساسية الكواشف مختلفة بشكل ملحوظ لمضادات التخثر عند وجود مرض الذئبة. إذا تم استخدام كاشف متحسس الذئبة للـ APTT الأولي، فمن المفيد إجراء APTT لمرة ثانية باستخدام كاشف مثل الأكتين (Actin FS) (دايد بهرنغ، ماربورغ، ألمانيا)، والتي تحتوي على تركيز عال جداً للفسفوليبيد (كيتشين وآخرون 1999). إذا تسبب تخثر داء الذئبة بالإطالة مع الكاشف الأول، فإذن سيكون APTT الثاني على الأغلب طبيعي دائماً. إذ يطيل عدد قليل جداً من مضادات تخثر الذئبة الـ APTT عند استخدام الأكتين (Actin FS).

فحصوات التحقق من الـ APTT الطويلة المعزولة

بالنسبة للمرضى الذين لديهم وقت بروثرومبين عادي و APTT مطوّل، يكون التسلسل الطبيعي للتحقيق الواجب اتباعه هو:

1 تحديد وقت الثرومبين (انظر القسم 15). إذا كان طبيعياً، أكمل إلى الخطوات 2 و3. إذا كان وقت الثرومبين أطول، كرر مع وجود سلفات البروتامين (انظر القسم 16). إذا تم تصحيح وقت الثرومبين إلى الوضع الطبيعي، سيوحي هذا بوجود الهيبارين، ولن يتطلب الأمر اجراء المزيد من الاختبارات المبينة أدناه. إذا لم يُعرف عن المريض تعاطيه لأي نوع من الهيبارين، فيجب طلب تكرار العينة.

2 حدد الـ APTT على مزيج من البلازما الطبيعية والبلازما المريضة (انظر القسم 14) باستخدام مزيج بنسبة 1:1 (50%) طبيعية:مريضة. يشير فشل تصحيح مزيج الـAPTT بنسبة 50% إلى الوضع الطبيعي وجود مثبط ما.

3 حدد الـ APTT مع الكاشف الثاني الذي يحتوي على تركيز عالي للفوسفوليبيدات، مثل الأكتين (Actin FS) (دايد بهرنغ). إذا كان APTT الأولي طويل المدة بوضوح (بما لا يقل عن ثلاث ثوان فوق الحد الأعلى الطبيعي للاستخدام) ويكون الأكتين (Actin FS) طبيعياً، فإن تخثر داء الذئبة هو السبب المحتمل. ويمكن تأكيد هذا في وقت لاحق عن طريق اختبارات معينة مثل وقت مزج رسل لسم الافعى (DRVVT، انظر القسم 38)، ورغم أن هذا ليس ضرورياً عادة في غياب أية شروط تحقيق ممكنة لتخثر الذئبة (LAC) بوصفها عامل خطر لتجلط الدم. نادراً جداً ما يكون نقص البريكاليكرين سبباً

ممكناً آخر للـAPTT الاعتيادي مع الأكتين (Actin FS) والـ APTT طويل المدى الملحوظ مع كاشف يستخدم السليكا أو الكاولين كمنشط. ومثل معظم حالات (LAC)، لا يرتبط هذا مع أي من أخطار النزف. لذلك، ومرة أخرى، قد لا يكون التأكيد مطلوباً.

4 عندما يكون الـ APTT الأولي طويل الأمد بوضوح (ثلاث ثوانٍ أو أكثر) ويكون الأكتين (Actin FS APTT) طبيعيا، ليست هناك حاجة لإجراء فحوصات العامل.

5 إذا كانت كلا فترتي APTT طويلة، نفذ فحوصات (FIX, FVIII:C و FXI) على النحو المطلوب (انظر القسم 23). يمكن إجراء فحص (FXII) إذا لزم الأمر، وبما أن النقص شائع نسبياً فيمكن أن يفسر هذا الكشف إطالة أمد الـ APTT. وليس من الضروري استبعاد وجود اضطرابات النزف، إذ لا يرتبط نقص الـ FXII بخطر زيادة النزف.

6 ترتبط الكواشف مثل الأكتين (Actine FS)، التي تستخدم حمض الإيلاجيك كمنشط اتصال مع النتائج الطبيعية في وجود نقص وحتى الشديد من البريكاليكرين.

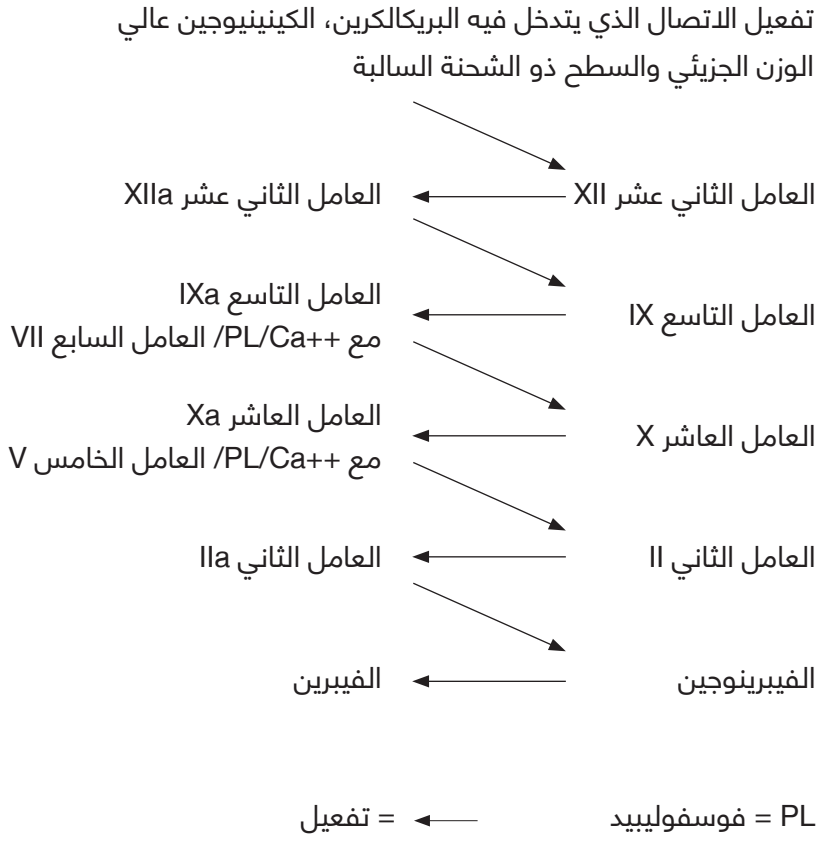
يمكن تطبيق الخطوات 1 إلى 3 في وقت واحد توفيراً للوقت، عند الاقتضاء.

الملاحظات

- يستثني الـAPTT العادي مع الأكتين (Actin FS)، المتجمع مع الـ APTT الأولي المطوّل (Synthasil/ IL) عادة وجود نقص في العوامل (FXI, FVIII أو FXI)، وفي هذه الحالة ليست هناك حاجة لفحوصات العامل.
- يمكن أن يحدث الـAPTT الطبيعي نادراً مع أي كاشف عندما تنخفض نسبة العوامل (FIX أو FXI) بشكل معتدل 30 – 50 وحدة/ ديسلتر، ويرتفع العامل الثامن FVIII بشكل ملحوظ.
- تكون قيمة الـ APTT مع الأكتين (Actin FS) طبيعية في كثير من الأحيان اذا كانت قيمة العامل (FXII) في نطاق (20 وحدة/ ديسلتر) إلى (50 وحدة/ ديسلتر)، اما في حال استعمال الكاولين أو السيليكا المنشطة تكون قيمة الـ APTT المطوّل معتدلة. وليس لهذا العيب علاقة سريرية.
- يطيل عدد قليل من موانع تخثر داء الذئبة القوية أمد الـ APTT مع الأكتين (Actin FS).
- تقوم أجسام مضادة معينة لـ (FVIII أو FIX أو FXI) بإطالة أمد الـ APTT بغض النظر عن الكاشف.

للاطلاع على مناقشة كاملة للمواضيع المتعلقة بتحديد APTT، انظر (CLSI 2008).

الشكل 2.13: المسار الذي تم قياسه بواسطة APTT



المراجع

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *One-Stage Prothrombin time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test: Approved guideline*, 2nd ed. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute Document H47-A2.

Kitchen S, Cartwright I, Woods TA, Jennings I, Preston FE. Lipid composition of 7 APTT reagents in relation to heparin sensitivity *Br J Haematol* 1999; 106:801-8.

14 مزج الاختبارات لمزيد من التحقيق عن (PT) و (APTT) غير الطبيعي

المبدأ

يمكن أن تخضع عينات البلازما ذات نتائج الاخبار غير الطبيعية (مثلاً PT/ APTT) للمزيد من الفحوصات لتحديد الخلل بواسطة اختبارات المزج. ومن المهم في بادئ الأمر التثبت أن يتم تصحيح الخلل في بلازما المريض ببلازما طبيعية لغرض إزالة وجود المثبط. يشير تصحيح الشذوذ عن طريق إضافة واحد من الكواشف الموضحة أدناه إلى أن الكاشف المضاف يجب أن يحتوي على المادة الناقصة من عينة الاختبار.

ويتم تتكرر فحوصات العينات غير الطبيعية في مخاليط ذات حجم متساوٍ (وكما يطلق عليه أدناه 50:50) من المضافات وبلازما الاختبار.

يمكن استخدام العوامل التالية لاختبارات الخلط:

- البلازما العادية
- البلازما المعمرة
- البلازما المكثفة
- البلازما ناقصة (FVIII)
- البلازما ناقصة (FIX)

البلازما المعمرة

1 يضاف الدم الوريدي الطبيعي إلى 1/9 من حجم 0.1 م من أوكسلات الصوديوم.

2 يتم طرد الدم مركزياً للحصول على البلازما ذات الصفائح الدموية القليلة، والمفصولة في ظروف معقمة ويتم حضنها بدرجة 37 مئوية لمدة يومين أو ثلاثة أيام.

3 يجب أن يتجاوز وقت البروثرومبين في نهاية هذه العملية 90 ثانية مع الثرومبوبلاستين الحساس.

4 ثم يتم توزيع البلازما بمقادير متساوية في حاويات بلاستيكية وحفظها بدرجة 35- مئوية (أو أقل).

تعاني البلازما المعمرة نقصاً في العوامل (V) و (VIII).

البلازما المكثفة

1 يتم تحضير هلام هيدروكسيد الألومنيوم (الألومينا) بمزج 1 غرام من الهلام المرطب مع 4 مل من الماء المقطر إلى للحصول على لزوجة سلسة.

2 يتم أخذ البلازما قليلة الصفائح الممزوجة بالحامض من خمسة متبرعين طبيعيين ويتم جمعها.

3 يضاف حجم عشر من هيدروكسيد الألمنيوم إلى البلازما مسبقة التسخين المخلوطة والموضوعة في الحاضنة لمدة ثلاث دقائق بدرجة 37 مئوية.

4 ثم يتم طرد الخليط فوراً (1700 غ (gravety)، ثلاث دقائق، بدرجة حرارة الغرفة) لترسّب الهلام.

5 يتم وضع البلازما الطافية في حاويات بلاستيكية ويمكن حفظها بدرجة 35- مئوية لعدة أسابيع.

وللبلازما المكثفة نقص في العوامل II، VII، IX و X (العوامل المعتمدة على فيتامين-K). ويجب أن يكون وقت البروثرومبين لهذه >60 ثانية مع كاشف حساس.

ملاحظة: يجب توخي الحذر عند وقت التكثيف، إذ قد يؤدي التكثيف المفرط إلى فقدان عوامل تخثر الدم الأخرى.

البلازما ذات النقص في العوامل (FVIII/ FIX)

تكون البلازما المأخوذة من المرضى الذين يعانون من النقص الحاد المعزول (وحدة دولية واحدة/ دل IU/dl) من العامل (FVIII) أو (FIX) مفيدة جداً لدراسات المزج. حيثما توفرت، ينبغي تفضيل استخدامها على البلازما المعمرة والبلازما المكثفة. وينبغي أن تكون البلازما التي يتم اختيارها لهذا الغرض ذات (PT) طبيعي، مما يؤكد أن عوامل التخثر التوليفية الأخرى في الكبد من المرجح أن تكون في مستويات عادية.

ويمكن لهكذا بلازما أن يتم تجميدها بالتجفيف لغرض التخزين طويل الأجل أو تخزينها كبلازما بدرجة 35- مئوية (أو أقل) لمدة لا تقل عن ثلاثة أشهر.

باستخدام مزيج من المواد المضافة وبلازما المريض بنسبة 50:50، يمكن تحديد وصف الشذوذ.

في الحالات التي توجد فيها إطالة معزولة من APTT، فتُفضل البلازما ذات النقص في FVIII على البلازما المعمرة وبالمثل، تُفضل البلازما ذات النقص في FIX على البلازما المكثفة.

ملاحظات

- يتوفر هيدروكسيد الألمنيوم من (BDH)، بوول، BH15 ITD، انكلترا.
- لا تظهر الموانع غير المحددة التي تؤثر على (APTT) في العادة (مثل مضاد تخثر الذئبة) أي التصحيح، ومع ذلك فمن المحتمل أن تكون البلازما التي تحتوي على مثبطات ضعيفة أو منخفضة العيار الأضعف ذات تصحيح جزئي للبلازما العادية.

- قد ترتبط مثبطات محددة ضد FVIII مع قلة التصحيح الفوري لـ APTT بواسطة البلازما الطبيعية المضافة. وفي حالات أخرى، هناك تصحيح فوري من قبل البلازما الطبيعية، تليها إطالة APTT في الخليط بمرور الوقت. ويمكن اختبار مزيج بلازما الاختبار والبلازما الطبيعية بعد ساعة واحدة في درجة 37 مئوية، جنباً إلى جنب مع محددات APTT على البلازما الطبيعية وبلازما الاختبار والتي تم احتضانها بشكل منفصل في الوقت ذاته.
- إن الموانع المحددة ضد عوامل التخثر الأخرى نادرة بشكل خاص إلا أنها يمكن ان تحدث. فمن غير الممكن التعميم حول سلوكها في تجارب المزج، ما عدا أن موانع FIX عادة ما تكون سريع المفعول.
- تُظهر بعض أمثلة APTTs لدي الأشخاص ذوي الهيموفيليا المكتسبة (A) عيار الأجسام المضادة لـ FVIII وتأثير إضافة 20 % و50 % من البلازما الطبيعية المجمعة وكما مُبيّن في الشكل 2.14. لدى طريقة APTT المستخدمة 37 ثانية كحد أعلى للمعدل الطبيعي. ويوضح هذا أنه في وجود هكذا أجسام مضادة لمكافحة FVIII، يمكن أن يكون هناك تصحيح كامل في مزيج 50:50 للمريض والبلازما العادية المجمعة في بعض الحالات. إذا تم حضن هذه الخلائط في درجة 37 مئوية، فإن هناك زيادة مطردة في APTT، كجسم مضاد لـ FVIII يعمل على تثبيط FVIII.

الشكل 1.14: نمط مزج نتائج الاختبار في وجود قصور لعامل فردي

الخلل في اختبار البلازما	APTT	البلازما المعمرة ذات النقص في FVIII	البلازما المكثفة ذات النقص في FIX	البلازما الطبيعية
FVIII	غير طبيعي	دون تصحيح	تصحيح	تصحيح
FIX	غير طبيعي	تصحيح	دون تصحيح	تصحيح
FXI / FXII	غير طبيعي	تصحيح	تصحيح	تصحيح
المانع	غير طبيعي	دون تصحيح	دون تصحيح	دون تصحيح

الخلل في اختبار البلازما	PT	APTT	البلازما المعمرة ذات النقص في FVIII	البلازما المكثفة ذات النقص في FIX	البلازما الطبيعية
FVIII	غير طبيعي	غير طبيعي	تصحيح	دون تصحيح	تصحيح
FIX	غير طبيعي	غير طبيعي	دون تصحيح	تصحيح	تصحيح
FXI / FXII	غير طبيعي	طبيعي	تصحيح	دون تصحيح	تصحيح
المانع	غير طبيعي	غير طبيعي	تصحيح	دون تصحيح	تصحيح

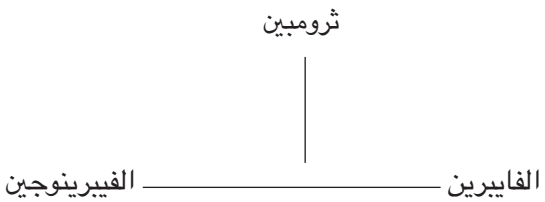
الشكل 2.14: دراسات المزج الهيموفيليا (A) المكتسبة

عيار بيثيسدا (وحدة/ مل)	APTT (بالثواني)	APTT + %20 بلازما طبيعية (بالثواني)	APTT + %50 بلازما طبيعية (بالثواني)
1.0	210	137	77
1.1	83	52	38
2.0	82	43	34
6.6	107	51	37
8.4	150	55	39
21	145	62	48
23	123	127	55
120	69	50	38

15 زمن تخثّر الثرومبين

المبدأ

يعكس وقت الثرومبين التفاعل بين ثرومبين والفيبرينوجين.



تتم الإطالة عندما يكون مستوى الفيبرينوجين منخفضاً جداً (أقل من 1.0 غرام /لتر)؛ في وجود الهيبارين ومواد مثل الهيبارين؛ وفي وجود موانع أخرى مثل منتجات تحلل الفيبرين (وجين) (FDP)، وعندما يكون الفيبرينوجين (ديسفيبرينوجينيميا) غير طبيعي من حيث الجودة، ويشمل ذلك العيوب الخلقية والمكتسبة الثانوية بالنسبة لأمراض الكبد.

الكاشف

محلول الثرومبين، الذي يشمل تخثر البلازما الطبيعية في حوالي 15 ثانية.

تعطي المحاليل الأقوى أوقات تخثر أقصر، وربما تكون طبيعية في وجود عيوب خفيفة.

الطريقة: يدوياً

1 أفرغ 0.2 مل من الماصة في أنبوب تخثر زجاجي.

2 قم بتدفئته حتى درجة 37 مئوية.

3 أضف 0.2 مل من الثرومبين.

4 شغل ساعة الإيقاف. احسب وقت التجلط.

5 ينبغي إنشاء المعدل الطبيعي محلياً.

6 كرر اختبار.

ملاحظات

- يجب أن يكون تركز الثرومبين المستخدم بحيث يعطي وقت تخثر بنحو 15 ثانية مع البلازما الطبيعية المجمعة (مع المراقبة). إذا تم استخدام الثرومبين المركز، قم بتخفيفه لحوالي 10 – 15 وحدة/ مل في المحلول الملحي، ويتطلب الأمر المزيد من التخفيف حتى يتم الحصول عليه في الوقت المراقبة المناسب.
- يمكن حفظ الثرومبين المتشكل بدرجة 35– مئوية أو أقل ويتم تخفيفه قبل الاستخدام.
- سيتعرض الثرومبين المخفف للتلف في درجة حرارة الغرفة.
- ينبغي أن تدرج مراقبة البلازما المجمعة الطبيعية مع كل مجموعة من الاختبارات.

16 زمن الثرومبين في وجود كبريتات البروتامين لكشف وجود الهيبارين

يمكن أن يسبب وجود بعض الهيبارين غير المجزأ ومنخفض الوزن الجزيئي إطالة وقت الثرومبين.

كما يمكن أن يتم تحييد أشكال الهيبارين الكبرى، والتي تطيل وقت الثرومبين، بإضافة سلفات البروتامين (PS). وتتوفر سلفات البروتامين في العديد من صيدليات المستشفيات، حيث يتم استخدامها كعامل علاجي لعكس تأثير الهيبارين.

عادة ما يكون تركيز الدواء في الإعدادات العلاجية أعلى بكثير مما هو مفيد لأغراض الفحص في المختبرات. لذا، ينبغي أن يتم تخفيف هذه الأدوية، إذا لزم الأمر، باستخدام المحلول الملحي حتى تركيز 40 ملغ % كمحلول للعمل. ويتم إعداد محلول العمل من الثرومبين مع (PS) بخلط تسعة أجزاء من كاشف الثرومبين مع جزء واحد من 40 ملغ % من (PS). ومن ثم يستخدم هذا بدلاً من محلول الثرومبين الموصوف في القسم 15. وينبغي تحليل ومراقبة العادية. إذا تمت إطالة وقت الثرومبين ولكن تم التصحيح مقابله في غضون ثوان من نتيجة المراقبة، فسيتأكد وجود الهيبارين.

17 زمن الريبتيلايز

المبدأ

الريبتيلاز هو سم أفعى يتم الحصول عليه من أفعى أتروكس الدساس (Bothrops atrox). وهو انزيم مشابه للثرومبين ويعمل مباشرة على الفيبرينوجين لتحويله إلى الليفين. لا يمكن تثبيطه باستخدام مضاد الثرومبين، لذا فهو لا يتأثر بوجود الهيبارين. ولذلك، يمكن استخدامه لتقييم معدل تحويل الفيبرينوجين إلى الليفين في وجود الهيبارين.

ومن المفيد التحقق فيما إذا كان وقت الثرومبين المطوّل ناتج عن وجود الهيبارين في العينة. إذا كان وقت الثرومبين مطولا والريبتيلاز طبيعي، فإن السبب الأكثر ترجيحاً هو وجود الهيبارين. وفي وجود الديسفيبرينوجينيميا، فإن وقت الريبتيلاز قد تكون أكثر حساسية (أي أطول) من وقت الثرومبين.

الكواشف

- ريبتيلاز (سيغما الدريتش، الرمز V5375) المذاب في تركيز 25 ملغ في 15 مل من العازل اورين. هذا السم الخام خطر، ويجب توخي الحذر لتجنب استنشاق المسحوق. يجب على العامل بالفحص ارتداء قفازات وقناع أثناء التعامل مع السم الخام. يجب أن يتم تخزين كمية المحلول مجمدة بشدة عند درجة 70– مئوية في كميات متساوية بحجم 0.5 مل. ستبقى مستقرة لمدة سنتين على الأقل تحت هذه الظروف.

  لإعداد الكاشف الجاهز للاستخدام، قم بإذابة وتخفيف الكاشف المجمد 1/10 في عازل اورين، قسمه إلى كميات متساوية وأعد تجميده إلى درجة 70– مئوية لغرض استخدامه مرات أخرى. هذا الكاشف الجاهز للاستخدام مستقر تحت هذه الظروف لمدة لا تقل عن ثلاثة أشهر.

  ينبغي إذابة الكميات المتساوية الجاهزة للاستخدام والمجمدة في حمام مائي بدرجة 37 مئوية لمدة ثلاث دقائق على الأقل. ثم يكون هذا مستقراً للاستخدام ما لا يقل عن 12 ساعة عند درجة حرارة محيطية ما بين 20 – 25 مئوية.

- البلازما الطبيعية: يتم تحضير البلازما الطبيعية المجمعة على النحو المبين في القسم 7. قم بإذابتها في حمام مائي بدرجة 37 مئوية لحوالي ثلاث دقائق.

الطريقة

قم بجميع هذه الاختبارات مكررة.

1 ضع أنابيب تختر زجاجية بحجم 75 × 10 ملم كافية في حمام مائي بدرجة 37 مئوية (اثنين لكل مريض، بالإضافة إلى اثنين لغرض المراقبة).

2 أفرغ من الماصة 0.3 مل من البلازما (المراقبة أو المريض) في أنابيب التخثر الدافئة.

3 دفئها لمدة دقيقة إلى دقيقتين.

4 أضف 0.1 مل من مزيج الريبتيلاز المخفف وشغل ساعة التوقيت.

5 قم بإمالتها ثلاث مرات لمزجها، ثم ثلاث مرات كل خمس ثوان حتى تشكيل الجلطة.

6 سجل وقت التخثر.

7 يجب أن يكون وقت المراقبة مابين 15 – 18 ثانية. (إذا كان الوقت أقصر، اضبطه بالمزيد من التخفيف لكاشف ريبتيلاز مع عازل اورين.)

8 إذا لم يحدث تخثر الدم، سجل الحالة في التقرير على أنها أقل من 90 ثانية.

المدى الطبيعي

وينبغي أن يكون وقت المريض ضمن ثلاث ثوان من وقت المراقبة. كما ينبغي الإبلاغ عن وقت المراقبة مع وقت المريض.

التفسير

الشكل 1.17: تفسير وقت الثرومبين المطوّل

وقت الثرومبين	وقت الريبتيلاز	السبب	الملاحظات
مطوّل	مطوّل بتساوٍ	هايبو- أو أفيبرينوجينيميا	قم بقياس الفيبرينوجين
مطوّل	مطوّل بشدة	ديسفيبرينوجينيميا	خلقي أو مُكتسب
مطوّل	طبيعي	الهيبارين	
مطوّل	مطوّل بشيء قليل	الهيبارين مع بعض الهايبو- أو ديسفيبرينوجينيميا	حالة نادرة من الديسفيبرينوجينيميا قد تعطي هذا النمط
مطوّل	مطوّل بتساوٍ	تجلط الدم المنتشر داخل الأوعية (DIC)	قم بقياس (D-dimers)

ملاحظة

تتوفر كواشف الريبتيلاز بتركيزات جاهزة للاستخدام من قبل عدة شركات تصنيع تجارية. وميزتها عدم وجود الحاجة للتعامل مع السم الخام وأمور الصحة والسلامة. وعند استخدام واحد من هذه الكواشف، اتبع تعليمات الاستخدام للشركة المصنعة. قد يكون المعدل الطبيعي مختلفاً لتلك المذكورة أعلاه، إلا أن تفسير النتائج يكون على النحو الوارد في الشكل 1.17. وبما أن الريبتيلاز هو كاشف مكلف، فيمكن استخدام طريقة تحييد البروتامين/ وقت الثرومبين (القسم 16) لتأكيد وجود الهيبارين في عينة الاختبار.

18 الفيبرينوجين (مقايسة كلاوس المعدلة)

المبدأ

يتم إعداد مخففات البلازما الطبيعية القياسية ذات محتوى الفيبرينوجين المعروف في عازل الجليوكسالين. يتم قياس وقت التخثر بعد إضافة الثرومبين، وإنشاء رسم بياني.

يتناسب وقت التخثر مع تركيز الفيبرينوجين، ويؤخذ تخفيف 1/10 لتمثيل القيمة في الإعدادات القياسية. تُخفف بلازما الاختبار بنسبة 1/10، وتُقرأ النتيجة من السطر القياسي.

الكواشف

- البلازما القياسية أو المرجعية ذات تركيز الفيبرينوجين المعروف
- ثرومبين 30 وحدة/ مل – 100 وحدة/ مل (قد يختلف التركيز حسب المصدر)
- عازل الإيميدازول (جليوكسالين) أو عازل اورين بدرجة حموضة 7.35

الطريقة

1 حضّر تخفيفات بنسبة 1/5، 1/10، 1/15، و 1/20 من البلازما المعيارية في عازل الإيميدازول.

2 قم بتفريغ كميات 0.2 مل مكررة من جميع الكميات المخففة في أنابيب التخثر الزجاجية.

3 سخنها إلى درجة 37 مئوية لمدة دقيقتين.

4 أضف 0.2 مل من الثرومبين (30 وحدة/ مل – 100 وحدة/ مل)، ثم احسب وقت تشكّل الجلطة.

5 بالنسبة للتقنيات اليدوية، قم باختبارات مكررة. وهذا ليس ضرورياً بالنسبة لمعظم مقاييس التجلّط عند القيام باختبارات آلية.

6 ارسم متوسط وقت التخثر مقابل تركيز الفيبرينوجين على ورق رسم بياني (log/log)، مع أخذ نسبة التخفيف 1/10 لتمثيل القيمة القياسية.

7 خفف بلازما الاختبار إلى 1/10، حدد وقت التخثر، واقرأ القيمة من الرسم البياني.

ينبغي وضع المعدل الطبيعي محلياً، إلا أنه عادة ما يكون قريباً من 1.5 غ/ ل – 3.5 غ/ ل.

ولأغلب تقنيات كلاوس، تكون العلاقة بين وقت التخثر وتركيز الفيبرينوجين خطية على نطاق محدود من أوقات التخثر، وتتراوح عادة بين 10 إلى 25 ثانية.

- للحصول على بلازما الاختبار العادي، يمكن استخدام تخفيف بنسبة 1/10.
- للحصول على تركيز أقل (مثلاً، 0.75 غ/ ل – 1.5 غم/ ل)، ينبغي تخفيف البلازما بنسبة 1/5 (وتقرأ القيمة من الرسم البياني مضروبة في 5/10).
- للحصول على مستويات أقل من 0.75 غ/ ل فيجب تخفيف بلازما الاختبار بنسبة 1/20 (وتقرأ القيمة من الرسم البياني مضروبة في 2/10).
- للحصول على مستويات أعلى من (4 غ/ ل) فيجب تخفيف بلازما الاختبار بنسبة 1/20 (وتقرأ القيمة من الرسم البياني مضروبة في 20/10).

لا يتأثر الاختبار بمستويات الهيبارين المستخدمة لعلاج الجلطات الدموية الوريدية. يمكن أن تعمل المستويات العليا المستخدمة للأوعية القلبية لإطالة وقت التخثر، مما يؤدي إلى التقليل من تقدير الفيبرينوجين، ما لم يكن الكاشف يحتوي على محيدات الهيبارين لمواجهة ذلك.

بيانات المعايرة النموذجية

ملاحظة: يجب أن يتم إنشاء منحنى معايرة باستخدام الكواشف المستخدمة محلياً.

البلازما المعيارية: 2.1 غ/ ل من الفيبرينوجين

الشكل 1.18: مثال لمعايرة الفيبرينوجين

التخفيف القياسي	تركيز الفيبرينوجين (غ/ ل)	وقت التخثر (بالثواني)
1/5	4.2	8.5
1/10	2.1	14
1/15	1.4	19.5
1/20	1.05	24.5

أمثلة:

بلازما الاختبار 1: مخففة بنسبة 1 في 10، وقت التخثر 15 ثانية.
الفيبرينوجين = 1.9 غ/ ل (من رسم المعايرة البياني)

بلازما الاختبار 2: مخففة بنسبة 1 في 5، وقت التخثر 16 ثانية.
الفيبرينوجين = 1.8 غ/ ل من رسم المعايرة البياني × 5/10
(حيث تخفيف 1/5 هو أكثر من 1/10)
= 0.9 غ/ ل

ويمكن لعدد من محللات التخثر تقدير مستوى الفيبرينوجين أثناء تحديد وقت البروثرومبين. وهذا ممكن لأن التغير في التبعثر الطفيف أو الانتقال كنتيجة لتشكّل الجلطة يتناسب مع تركيز الفيبرينوجين الأولي. وعادة ما يُشار إلى هذه الطرق على أنها الفيبرينوجين المشتق من (PT).

هناك قيود على معظم الطرق المشتقة من (PT). وعلى وجه الخصوص، فغالباً ما تكون النتائج التي يتم الحصول عليها أعلى بكثير من تلك الناتجة عن مقايسة كلاوس حين تكون هناك إما مستويات منخفضة جداً (أقل من 1.5 غ/ ل) أو مرتفعة (فوق 5 غ/ ل) من الفيبرينوجين. عادة ما تكون النتائج طبيعية في وجود الديسفيبرينوجينيميا. لمراجعة هذه الأمور، انظر ماكي وآخرين 2003.

هناك طرق فيبرينوجين كلاوس والتي تُعد مناسبة لمقايسة بلازما الاختبار غير المخففة، إلا أن النتائج قد لا تكون قابلة للتبديل مع نتائج الفحوصات التي تستخدم مقايسات كلاوس على نطاق واسع من خلال توظيف بلازما الاختبار المخففة (جينينغز وآخرون، 2009).

المراجع

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Differences between multifibrin U and conventional Clauss fibrinogen assays: data from the UK National External Quality Assessment scheme. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20:388-90.

Mackie IJ, Kitchen S, Machin SJ, Lowe GD. Guidelines on fibrinogen assays. *Br J Haematol* 2003; 121: 396-404.

19 إزالة الهيبارين من البلازما

المبدأ

الهيباريناز 1 (المكوّن الفعّال للهيبزيم (Hepzyme®)) وهو محدد بالهيبارين الذي يُشتقّ في مواقع متعددة لكل جزيء، وينتج الأوليجوساكريدز الذي فقد نشاط جرعته. الهيبزيم (Hepzyme®) هو الهيباريناز 1 المنقى من البكتيريا والذي يتم إنتاجه في (Flavobacterium heparinum). وهو قادر على إزالة ما يصل حتى وحدتين دوليتين من الهيبارين لكل مل من البلازما. ويمكن استخدام الهيبزيم (Hepzyme®) لتحييد تأثير الهيبارين في العينة، بحيث يمكن تقييم حالة التخثر الكامنة. وخاصة أنه يستخدم في حالات تلوث الهيبارين.

الكاشف

الهيبزيم (Hepzyme®)، تحتوي القارورة على كمية محضّرة ومجففة من الهيباريناز 1 مع المثبتات

المصّنع: دايد بهرنغ

التخزين: بدرجة 4 مئوية

الاستقرار: وفقاً لتاريخ انتهاء الصلاحية المحدد من قبل المصنّع. تُستخدم كل قارورة لاختبار مريض واحد فقط.

الطريقة

1 أضف 1.0 مل من البلازما الحامضية قليلة الصفائح الدموية إلى قارورة الهيبزيم (Hepzyme®).

2 أعد السدادة واقلبها بلطف 5 إلى 10 مرات.

3 اتركها في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة.

4 انقلها الى كوب عينة بلاستيكي سعة 2 مل، واسمح للفقاعات بالاختفاء لبضع لحظات.

5 نفذ الاختبار المطلوب.

يجب أن يتم إدراج وقت الثرومبين للتحقق من إزالة جميع الهيبارين بنجاح.

وينبغي إجراء الاختبارات في أقرب وقت ممكن (أي، ضمن مبادئ الاختبار لذلك الإجراء).

التفسير

لا يزيل هذا الإنزيم أية عوامل تخثر (على عكس بعض التقنيات البديلة لإزالة الهيبارين)، لذا يشير النقص الحقيقي لوقت التخثر في (APTT)، أو وقت الثرومبين، أو (PT) بعد المعالجة بالهيبزيم إلى أن الهيبارين كان موجوداً. تم تقليص جميع الهيبارين غير المجزأ والصيغ الجزيئية المنخفضة بفعل هذا الانزيم.

20 مقايسة مضاد الفيبرينوجين بواسطة الفحص الشعاعي المناعي (RID)

المقدمة

يتم الاشتباه بالديسفيبرنوجينيميا (النوع الثاني من نقص الفيبروجين) عندما تكون نتيجة مقايسة كلاوس للفيبرينوجين منخفضة بكثير عن الفيبرينوجين المشتق من وقت البروثرومبين أو من نتائج مستضد الفيبرينوجين.

تحدد مقايسة كلاوس مستوى الفيبرينوجين من خلال تحديد معدل تكوين فايبرن (الليفن) بعد إضافة تركيز عالٍ من الثرومبين، في حين تفحص المقايسة المشتقة الكثافة البصرية/ التبعثرات الضوئية ضمن جلطة فايبرن (الليفن) المتشكلة بعد اكتمال تشكيل الجلطة.

وتكشف مقايسة مستضد الفيبرينوجين الديسفيبرنوجينيميا على أنها منخفضة الفعالية من خلال مقايسة كلاوس في وجود مستوى طبيعي من المستضد.

قد يرافق فقدان الأفيبرينوجين نزيف بسبب خلل تخثر البلازما ووظيفة الصفائح الدموية. وتسبب العديد من العيوب الديسفيبرنوجينيميا، والتي قد تتسم بضعف إفراز الفيبرينوبيتيد (A/ B) وضعف في بلمرة الليفين المونومر. قد يكون النوع الثاني من العيوب ذو أعراض، إلا أن بعض المتغيّرات ارتبطت بالتهيؤ للنزيف أو الجلطة. ويمكن أن تكون قابلية المريض للنزف أو الجلطة لا علاقة له بالديسفيبرنوجينيميا، والتي قد تكون نتيجة عرضية.

المواد

وعاء نور – بارتيجين المسطح للفيبريجين NOR–Partigen Fibrinogen R·I·D· Plate,

المصّنع: دايد بهرنغ Dade Behring

يحتوي كل وعاءً على 12 حجرة.

الكواشف

- البلازما المعايرة ذات تركيز الفيبرينوجين المعروف التي يمكن عزوها إلى معايير الفيبرينوجين الدولية الخاصة بمنظمة الصحة العالمية.
- بلازما الاختبار: يتم فحص البلازما الحامضية عادة غير مخففة، أو مخففة بالمحلول الملحي لإعطاء مستوى بحوالي 2.5 غ/ ل إذا كان من المتوقع أن يكون المستوى أكبر من 5 غ/ ل. ويتم تبليغ النتائج أقل من 0.5 غ/ ل، على أنها أقل من 0.5 غ/ ل (الحد الأدنى من الحساسية).

الطريقة

1 اسمح للوعاء المسطح RID بالتدفئة حتى درجة حرارة الغرفة، ثم أزل الغطاء واتركها مفتوحة لمدة 5 دقائق حتى تتبخر الرطوبة الزائدة.

2 يتم اختبار البلازما المعيارية بشكل نقي وبنسب تخفيف 75 %، 50 % و25 % في المحلول الملحي.

3 أضف بالضبط 5 مايكرولتر من المخففات القياسية ومواد مراقبة الجودة، وبلازما المريض إلى الأوعية (يفضل تكرارها). عملية المص الدقيقة ضرورية للكميات الصغيرة المطلوبة.

4 بمجرد انتشار العينات في الهلام (ليس بأكثر من خمس دقائق بعد التطبيق)، أعد الغطاء وضع الوعاء المسطح مسطحة في صندوق رطب في درجة حرارة الغرفة لحوالي 48 ساعة.

5 ويمكن تقدير النتائج بعد 18 ساعة، ما دامت الأقطار لا تتجاوز 5.5 ملم. يجب الإبلاغ عن النتائج النهائية بعد يومين، ما لم يبلغ القطر أكبر من 8 ملم، وفي هذه الحالة تترك اللوحة يوماً آخر لإتاحة اكتمال الانتشار. يشير القطر الأكبر من 9.3 ملم إلى أن مستوى الفيبرينوجين هو أكبر من مستوى الحساسية للمقايسة، وفي هذه الحالة يجب أن يتم تخفيف العينة بالمحلول الملحي ويُعاد اختبارها.

6 قم بقياس أقطار الراسب باستخدام جهاز قراءة الوعاء المسطح بهرنغ (متوفر مع الاوعية). قم بقياسها إلى أقرب 0.5 ملم واقرأها مرتين (الأقطار بـ 90 درجة من بعضها البعض).

7 ارسم المنحنى القياسي: القطر المربع مقابل التركيز على ورقة الرسم البياني المخطط.

8 اقرأ بالمقابل مراقبة الجودة ومستويات المريض من هذا المنحنى.

9 أبلغ النتائج بالغرام/ لتر إذا كانت مراقبة الجودة ضمن النطاق المستهدف

21 مراقبة العامل (XIII)

المبدأ

الثرومبين والكالسيوم مطلوبات لتفعيل العامل (FXIII) والذي سيعمل على تشعّب فايبرن الليفين بشكل مستقر. وفي هذه الطريقة، وبالرغم من استخدام البلازما الحامضية، ما تزال أيونات كافية من الكالسيوم متاحة لتفعيل (FXIII).

وتستخدم بلازما حامض الإيثيليندايامينيتيتراسيتيك (EDTA) الطبيعية المضادة للتخثر في المراقبة. وفي هذه البلازما، تعمل نتائج (EDTA) في استخلاب كامل لأيونات الكالسيوم، مما يعني أن العامل (FXIII) ليس قادراً على تشعب الليفين. إن إضافة مقدار 2 % من حامض الخليك أو 5 م من اليوريا سينتج عنه تحلل للجلطات غير المتشعبة، بينما لدى البلازما الحامضية ذات الوحدات الأكثر من 10/ دل من العامل (FXIII) الفعّال فإن جلطة غير قابلة للتحلل. يكون الاختبار عادة أكثر حساسية إذا تم استخدام حامض الخليك (بدلاً من اليوريا)، إذ ستذوب الجلطة في مستويات أعلى من العامل (FXIII) في وجود حامض الخليك (جينينغز وآخرون، 2003).

المواد/ الكواشف

- أنابيب زجاجية بقياس 75 × 10 ملم
- 0.9 % محلول ملحي
- 30 وحدة/ مل من الثرومبين
- بلازما (EDTA) طبيعية
- 2 % حامض الخليك

الطريقة

1 أضف 0.2 مل من بلازما الاختبار الحامضية إلى 0.2 من المحلول الملحي بنسبة 0.9 % في أنبوب زجاجي. لمراقبة إيجابية، كرر العملية باستخدام 0.2 مل من بلازما (EDTA). وللمراقبة السلبية، كرر العملية باستخدام 0.2 مل من البلازما الستريتية الطبيعية. normal citrated plasma.

2 أضف 0.1 مل من الثرومبين 30 وحدة/ مل. امزج.

3 اتركه لمدة 30 دقيقة بدرجة 37 مئوية.

4 انفض الأنابيب لإبعاد الجلطة من الجانبين.

5 أضف 5 مل حامض الخليك 2 % وسد الأنبوب. اتركه في درجة حرارة الغرفة لمدة 12 ساعة.

النتائج

- لا ينبغي أن يكون لبلازما (EDTA) جلطة مرئية.
- ينبغي أن يكون للبلازما الحامضية الطبيعية جلطة سليمة ومرئية.
- إذا كانت الجلطة غير مرئية، فإن لدى الشخص نقص في العامل (FXIII).

المدى الطبيعي

لدى الأشخاص الطبيعيين جلطة مرئية بعد 12 ساعة في حامض الخليك 2 %.

ملاحظة

- يمكن استخدام اليوريا 5 م بدلاً من حامض الخليك 2 %. وعندها تكون مدة حضانة تحلل الجلطة 18 ساعة. وهذه الطريقة أقل حساسية من استخدام حامض الخليك (المذكورة أعلاه).
- ينتج التجلط بالكالسيوم والتحلل باليوريا نتائج غير طبيعية فقط عندما تكون مستويات العامل (FXIII) أقل من 5 وحدات/ دل. وبالمقارنة، تنتج الجلطة بـ 30 وحدة/ مل من الثرومبين التي يتبعها التحلل بـ 2 % من حامض الخليك نتائج غير طبيعية عند مستويات أقل من 10 وحدات/ دل (جينينغز وآخرون، 2003).
- أحياناً، قد ينزف المرضى الذين يعانون من مستويات عامل (FXIII) أعلى من 5 وحدات/ دل (انظر بولتون – ميجز، وآخرون، 2004 للمراجعة).

المراجع

Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, Collins PW, Kitchen S, Dolan G, Mumford AD. The rare coagulation disorders – review with guidelines for the management from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10(5): 593-628

Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Problems relating to the diagnosis of FXIII deficiency. *Thromb Haemost* 2003; 1: 2603-8.

22 المقايسات المعتمدة على أساس زمن البروثرومبين (العوامل II، V، VII، X) (تحليل العوامل)

المبدأ

يمكن إجراء المقايسات على العوامل (II، V، VII، X) باستخدام مقايسة ذات مرحلة واحدة استناداً إلى وقت البروثرومبين. وتتكون المقايسة أساساً من مقارنة قدرة تخفيفات البلازما المعيارية أو المرجعية وبلازما الاختبار لتصحيح وقت البروثرومبين للبلازما المعروف عنها النقص التام في عامل التخثر الذي يتم قياسه. في مقايسة العامل (V)، على سبيل المثال (موضحة أدناه)، فإن البلازما تعاني نقصاً في العامل (V) إلا أنها تحتوي على كميات طبيعية من العوامل (II، VII، X) والفيبرينوجين. قد تكون عوامل التخثر (II، VII، X) قد خضعت للمقايسة بطريقة مشابهة، باستبدال البلازما المعينة ذات النقص في العامل (V) بعينها والواردة في المثال أدناه، وباستخدام البلازما المرجعية المناسبة بتركيز معروف للعامل الخاضع للمقايسة.

الكواشف

- البلازما التي تعاني من نقص العامل (V)
  هذا قد يكون نقصاً خلقياً أو نقصاً مصطنعاً في العامل (V) (البلازما المعمرة)
- محلول اورين الملحي العازل
  عازل (OBS) أو الجليوكسالين (انظر القسم 9)
- البلازما الستريتية الطبيعية. normal citrated plasma ذات النقص في صفائح الدم:
  الاختبارية والمعيارية
  بالنسبة للمعيارية، استخدم البلازما الطبيعية المجمعة من20 متبرعاً (المحفوظة بدرجة 70– مئوية أو أقل) أو المرجعية التجارية أو البلازما المعيارية
- الثرومبوبلاستين/ الكالسيوم (كما مستخدم في اختبارات (PT)

الطريقة

1 لكل من بلازما الاختبار والبلازما المعيارية، حضّر التخفيفات في أنابيب بلاستيكية، كما موضح في الشكل 1.22 أدناه.

الشكل 1.22. تحضر تخفيفات بلازما الاختبار والبلازما المعيارية

التخفيف	البلازما (مل)	OBS (مل)
1/5	0.1	0.4
1/10	0.1	0.9

التخفيف	البلازما (مل)	OBS (مل)
1/20	0.5 (1/10)	0.5
1/40	0.5 (1/20)	0.5

ملاحظة : امزج نسبة 1/10 من التخفيف جيدا قبل استخدامه لإعداد التخفيف 1/20. امزج التخفيف 1/20 جيداً قبل استخدامه لإعداد التخفيف 1/40. يجب اختبار تخفيفات البلازما مباشرة بعد تحضيرها. إذا تجاوزت درجة حرارة الغرفة 25 مئوية، فقد يكون من الضروري وضع التخفيفات على الجليد الرطب قبل تحليلها.

2 افحص كل تخفيف من البلازما المرجعية أو البلازما المعيارية على النحو التالي:

أولاً. أفرغ 0.1 مل من كل تخفيف بالماصة إلى أنبوب زجاجي بحجم 75 × 10 ملم.

ثانياً. أضف 0.1 مل من البلازما ذات النقص في العامل الخامس.

ثالثاً. سخنه حتى درجة 37 مئوية لمدة دقيقتين.

رابعاً أضف 0.2 مل كاشف الثرومبوبلاستين/ الكالسيوم مسبق التسخين.

خامساً. ابدأ ساعة التوقيت وامزج.

ملاحظة: إذا لم يحتوي كاشف الثرومبوبلاستين على الكالسيوم، فيضاف 0.1 مل من الثرومبوبلاستين إلى خليط البلازما المخفف والناقصة. وبعد تأخير مابين 1 – 2 دقيقة عن التسخين إلى درجة 37 مئوية، فسيتخثر هذا المزيج باستخدام 0.1 مل من الكالسيوم مسبق التسخين (حتى درجة 37 مئوية).

3 سجّل وقت التخثر.

4 كرر العملية لتخفيفات بلازما الاختبار.

بالنسبة لبلازما الاختبار التي يُتوقع أن تكون طبيعية، افحص التخفيفات 1/10، 1/20 و1/40.
بالنسبة لبلازما الاختبار التي يُتوقع أن يكون لها مستويات منخفضة، افحص التخفيفات 1/5، 1/10 و1/20.

وينبغي أيضاً اختبار عينة "فارغة"Blank على النحو التالي:

- 0.1 مل من (OBS)
- 0.1 مل من البلازما ذات النقص في العامل (V)
- 0.2 مل من كاشف الثرومبوبلاستين/ الكالسيوم

يعكس وقت التخثر للعينة "الفارغة" جودة البلازما الناقصة ويجب أن يكون معادلاً لأقل من 1 %.

النتائج

ارسم أوقات تخثر بلازما المراقبة والاختبار مقابل تركيز العامل (V) على 3 دورات × دورتين على ورق لوغاريتمي. ويظهر مثال على مثل هذا الرسم البياني (لمقايسة العامل (FVIII) في القسم 23. يتم تعيين قيمة اعتباطية للتخفيف 1/10 بنسبة 100 %، وبالتالي فالتخفيف 1/5 يعادل نسبة 200 %، وهكذا. وبدلاً من ذلك، ارسم التركيز على مقياس لوغاريتمي ووقت التخثر على مقياس خطي.

ويتم استقراء الكمية ذات الصلة للعامل (V) في بلازما المريض بالمقارنة مع البلازما الطبيعية أو المواد المرجعية القياسية من الرسم البياني. ويظهر مثال على ذلك في القسم الخاص بالمقايسات المستندة إلى (APTT) (الشكل 1.23). يقرأ وقت اختبار التخثر الذي يعادل 100 % (المكان الذي يجتاز فيه خط الاختبار الفاعلية بنسبة 100 %) من الخط المعياري (وبالتالي فإن التركيز المعياري الذي يمكن أن يعطي وقت التخثر المحدد هذا). ويعطي هذا تركيز الاختبار في نسبة من المعياري. وتتضاعف هذه النسبة بتركيز عامل التخثر في المستوى القياسي (بالوحدة الدولية/ دل) لإعطاء التركيز في الاختبار (بالوحدة الدولية/ دل).

الملاحظات

- يجب تحديد المعدل الطبيعي لكل من عوامل التخثر هذه محلياً إلا أنه غالباً ما يكون لها حد أدنى ما بين 50 – 70 وحدة دولية/ دل بالنسبة للعامل (VII ،V، وX). إن الحد الأدنى من الوضع الطبيعي بالنسبة للعامل (II) هو أعلى. في إحدى الدراسات، فإن الأشخاص الطبيعيون من الأسر التي لديها تاريخ في نقص العامل (II)، إضافة إلى أشخاص طبيعين آخرين غير ذوي علاقة، لهم مستويات من العامل (II) في نطاق 84 – 130IU/dl وحدة دولية/ دل (جيرولامي وآخرون، 1998). لقد أفاد مركز مختلف نطاقاً مرجعياً ما بين 84 – 132 IU/dl وحدة دولية/ دل (بولتون ميجز وآخرون، 2004).
- ينبغي على الأشخاص الذين يعانون من انخفاض مستوى العامل (V) أيضاً إجراء فحص العامل (VIII) لاستبعاد نقص (V و VIII) مجتمعين.
- في بعض حالات نقص العامل (VII)، قد يكون هناك تفاوت بين مستويات (FVII:C) المتحصلة، اعتماداً على مصدر الثرومبوبلاستين. لذا يُنصح باستخدام الثرومبوبلاستين البشري على أساس أن النتائج أكثر عرضة لتعكس فعالية الجسم الحي. (انظر بولتو – ميجز وآخرين 2004) للمراجعة. وفي بعض الحالات النادرة، قد تكون النتيجة منخفضة جداً إذا تم استخدام ثرومبوبلاستين أرنب، إلا أنها تكون طبيعية إذا استخدم في الفحص الثرومبوبلاستين البشري. وقد يكون هذا هو السبب في أن بعض الحالات النقص الحاد والواضح للعامل (VII) ليس لديها أعراض نزيف.

المراجع

Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, Collins PW, Kitchen S, Dolan G, Mumford AD. The rare coagulation disorders — review with guidelines for the management from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10(5): 593-628.

Girolami A, Scarano L, Saggiorato G, Girolami B, Bertomoro A, Marchiori A. Congenital deficiencies and abnormalitoies of prothrombin. *Blood Coagul Fibrinol* 1998: 9: 557-569.

23 مقايسات العوامل المعتمدة على أساس (APTT) مقايسة مرحلة واحدة من (FVIII:C، FIX، FXI، أو FXII)

المبدأ

يتم في هذا القسم وصف مقايسة المرحلة الواحدة للعامل (VIII). وتستند هذه المقايسة على المقارنة بين قدرة تخفيفات البلازما المعيارية وبلازما الاختبار على تصحيح APTT من البلازما المعروفة بالنقص التام في العامل (VIII) لكنها تحتوي على جميع العوامل الأخرى المطلوبة للتخثر الطبيعي. وبالنسبة للعوامل (IX، XI، و XII)، فإن المقايسة في الأساس هي نفسها، وتتم من خلال استبدال البلازما الناقصة ذات الصلة بالبلازما ذات النقص في العامل (VIII)، وبعد اختيار البلازما المرجعية المناسبة.

الكواشف

- البلازما الستريتية الطبيعية. normal citrated plasma والبلازما المعيارية standard plasma قليلة الصفائح
ينبغي أن تكون البلازما المعيارية المستخدمة إما بلازما مجموعة ومحضرة محلياً ومحفوظة بدرجة 70– مئوية أو أقل، أو أن تكون بلازما تجارية عادية. في كلتا الحالتين، يجب معايرة هذه البلازما المرجعية وفق معيار دولي للعامل (VIII). إن من غير المقبول افتراض أن البلازما الطبيعية المجمعة لديها 100 وحدة/ دل من العامل (FVIII:C).

- البلازما التي تعاني نقص العامل (VIII)
تتوفر هذه البلازما تجارياً أو قد يتم جمعها من متبرع لديه مستوى العامل (VIII) أقل من وحدة واحدة/ دل، والذي ليس لديه أجسام مضادة لـ (VIII)، ولم يتلق أي علاج لمدة أسبوعين، ولديه اختبارات وظائف الكبد طبيعية. يمكن أن تؤدي وظيفة الكبد غير الطبيعية إلى انخفاض في عوامل تخثر الدم الأخرى، والتي تؤثر على خصوصية المقايسة.
يمكن تخزين هذه البلازما في كميات متساوية المقدار بدرجة 35– مئوية. يفضل استخدام البلازما ذات النقص في العامل (VIII) التي تنتج عن عملية فصل العامل (VIII) من البلازما الطبيعية باستخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة. يتوفر هذا النوع من المواد تجارياً وله ميزة السلامة الفيروسية مقارنة بالبلازما المأخوذة من المصابين بالهيموفيليا الذين عولجوا بمنتجات البلازما. ومع ذلك، لم يتم العثور على أن جميع البلازما المفصولة مناعيا (immunodepleted) أقل من وحدة واحدة/ دل، وينبغي الاعتناء للتأكد من هذا. يرى بعض الخبراء أن وجود تركيزات عادية من (VWF) في البلازما ذات النقص في العامل (VIII) قد يكون ميزة، وهناك دليل يدعم هذا فيما يتعلق بمقايسات العامل (VIII) المنفذة كجزء من تحديدات مثبط العامل (VIII).

- الكاشفAPTT
- محلول اورين الملحي المعزول (OBS أو عازل الجليوكسالين؛ انظر القسم 9)
- 25 م م mM من كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$)

الطريقة

1 اصنع تخفيفات 1/10 من البلازما المعيارية وبلازما الاختبار في المحلول الملحي المعزول في أنابيب بلاستيكية. (إذا كان من المتوقع لبلازما الاختبار أن تحتوي على مستوى منخفض جداً للعامل (VIII)، ابدأ التخفيف عند 1/5).

2 قم بصنع تخفيفات مزدوجة باستخدام كميات 0.2 مل في OBS من البلازما المعيارية وبلازما الاختبار من 1/10 إلى 1/40 في أنابيب بلاستيكية. (قم بمزج كل تخفيف جيداً قبل الانتقال إلى الأنبوب التالي). يجب فحص تخفيفات البلازما مباشرة بعد تحضيرها. إذا تجاوزت درجة حرارة الغرفة 25 درجة مئوية، فقد يكون ضرورياً وضع التخفيفات على جليد رطب قبل الاختبار.

3 أفرغ مقدار 0.1 من الماصة من كل تخفيف قياسي إلى أنبوب زجاجي بحجم 75 × 10 ملم.

4 أضف 0.1 مل من البلازما ذات النقص في العامل (VIII) وانقلها إلى حمام ماء بدرجة 37 مئوية.

5 أضف 0.1 مل من كاشف APTT وضعه في الحاضنة لمدة 5 دقائق

6 في الدقيقة 5 أضف 0.1 مل من كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$) وسجل وقت التخثر.

وينبغي أيضاً اختبار عينة "فارغة" على النحو التالي:

- 0.1 مل من (OBS)
- 0.1 مل من البلازما ذات النقص في العامل (VIII)
- 0.2 مل من كاشف APTT
- احتضان لمدة 5 دقائق
- 0.1 مل من كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$)

يجب أن يكون وقت التخثر للعينة "الفارغة" أطول من 1 % من وقت فعالية العامل (VIII) من الرسم البياني القياسي للمعايرة. إذا كان الوقت أقصر، فيشير هذا إلى أن البلازما الركيزة ليست ناقصة تماماً للعامل (VIII) وبالتالي فهي ليست بلازما مناسبة كركيزة.

النتائج

تم وصف تخطيط النتائج في القسم 22، مما يتطلب ورقاً بيانياً ذا مقياس لوغاريتمي أو لوغاريتمي/ خطي.

يتم تعيين قيمة اعتباطية للتخفيف 1/10 بنسبة 100 %، والتخفيف 1/20 بنسبة 50 %، والتخفيف 1/40 بنسبة 25 %.

ويجب الحصول على خطوط مستقيمة، وموازية لبعضها البعض.

اقرأ بالمقابل تركيز عينة الاختبار كما موضح في الشكل 1.22 (القسم 22). وفي هذا المثال، فإن تركيز العامل (VIII) في عينة الاختبار هو 7 % من التركيز في العينة المعيارية. إذا كانت العينة المعيارية تحتوي على تركيز بقيمة 85 وحدة دولية/ دل، فإن تركيز عينة الاختبار هو 85 وحدة دولية/ دل × 7 % = 6 وحدات دولية/ دل.

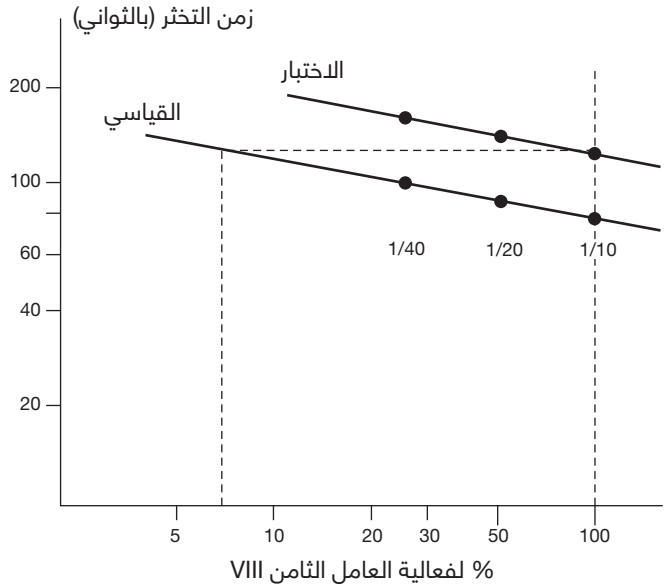
إذا لم تكن الخطوط متوازية، فينبغي إعادة المقايسة.

قد تحدث الخطوط غير المتوازية بسبب خطأ فني. إذا تم التخلص من الخطأ الفني، فربما يعود ذلك إلى وجود المانع، والذي قد يعمل كمضاد للعامل (VIII) على وجه التحديد أو قد تكون من نوع "الذئبة"، مما يبيّن وجود نمط تقارب. الخطوط متباينة نموذجية في عينة مُفعلة.

ملاحظات

- إذا كان تركيز (VIII) (أو FIX، FXI، أو FXII) في بلازما الاختبار قريباً من الصفر (أي أن أوقات التخثر لجميع التخفيفات مشابهة للعينة الفارغة) فقد تحدث خطوط غير متوازية.
- يجب أن يتم إنشاء نطاق طبيعي محلياً ولكن غالباً ما يكون الحد الأدنى 50 – 65 وحدة دولية/ دل في حالة وجود (FIX) أو (FXI).
- وفيما يتعلق بـ (FXI)، فإن الوحدة الدولية قد تم تأسيسها مؤخراً. في وقت كتابة هذا التقرير، هناك القليل من البيانات حول مستويات (FXI) الطبيعية في الوحدة دولية. وأشارت المطبوعات التي سبقت إنشاء الوحدة الدولية إلى أن الحد الأدنى للوضع الطبيعية للعامل (FXI) هو في حدود 63 – 80 وحدة دولية/ دل (انظر بولتون – ميجز وآخرون، 2004 للمراجعة).

الشكل 1.23: الرسم البياني لمقايسة العامل (FVIII)



المرجع

Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, Collins PW, Kitchen S, Dolan G, Mumford AD. The rare coagulation disorders – review with guidelines for the management from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10(5): 593-628.

24 مقايسات العامل (VIII:C) في الراسب القري (كريوبريسيبيتات)

تكون ظروف المقايسة المبينة في القسم 23 مناسبة عند احتواء عينات الاختبار على مستويات طبيعية أو شبه طبيعية من العامل (FVIII:C). إذا ارتقى المستوى فوق 150 وحدة دولية/ دل، فتحتاج الظروف عادة إلى تعديل لتصميم مقايسة كي تكون صالحة.

تتراوح مستويات العامل (FVIII:C) في الراسب القري بين المتبرعين الفرديين، ولكنها عادة ما تكون ضمن نطاق ما بين 200 – 1000 وحدة دولية/ دل. وعند هذه المستويات ، يجب أن تكون مواد الاختبار مخففة مسبقاً للحد من التركيز قبل الفحص. وبالنسبة لمعظم وحدات الراسب القري، فإن التخفيف المسبق من 1 في 5 أو 1 في 10 سيقلل التركيز على مستوىً كهذا حتى يمكن استخدام المواد المخففة تصميم المقايسة الموصوفة في القسم 23 (أي أن المواد مسبقة التخفيف يتم تخفيفها أكثر بنسب 1/5، 1/10، 1/20 في عزل المقايسة، وكما هو موضح).

إذا لم يكن الراسب القري مخففاً مسبقاً إلى التركيز المناسب، فمن غير المرجح ان تتم تلبية متطلبات الحصول على خط مستقيم خلال تخفيفات عينة الاختبار ولكي يكون هذا الخط موازياً لمنحنى المعايرة. إذن فمثل هذا المقايسة ستبطل بعد ذلك، ولن تكون النتائج دقيقة.

يجب الانتهاء من التخفيف المسبق للراسب القري فورا قبل بدء مقايسة العامل (FVIII:C). تستخدم بعض المراكز العوازل المستخدمة في مقايسة (FVIII:C) مثل (عازل اورين أو الإيميدازول/ جليوكسيد)، في حين تستخدم مراكز أخرى البلازما ذات النقص في العامل (FVIII:C) لهذا الغرض. وعموماً، فمن المحتمل أن تكون التخفيفات المسبقة كهذه أكثر استقراراً إذا تم إعدادها باستخدام البلازما ذات النقص في العامل (FVIII:C). لذلك، يُعد هذا هو المخفف المفضل.

تشابه دقة مقايسات FVIII على الراسب القري بين المراكز لدقتها عند فحص عينات البلازما (جينينغز وآخرون، 2009).

المرجع

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID, Preston FE. Laboratory performance in the World Federation of Hemophilia EQA programme 2003–2008. *Haemophilia* 2009; 15: 571–7.

25 مقايسات التخثر على مرحلتين للعامل (VIII:C)

المبدأ

وكان أول وصف لهذه المقايسة في عام 1955 كتعديل لاختبار تخفيف الثرومبوبلاستين. وتستند مقايسة العامل (FVIII:C) ذات المرحلتين على مبدأ أن كمية (FVIII) الحالية في النظام هي محدودة النسبة أثناء تخثر خليط الاختبار الذي يحتوي على العامل (FX)، والعامل المنشّط (FIX)، الفوسفوليبيد، الكالسيوم، والزيادة في (FV). ويزيل امتصاص البلازما بواسطة هيدروكسيد الألنيوم العوامل المنشطة والعوامل المعتمدة على الفيتامين ك. هذا أمر ضروري لإزالة البروثرومبين بحيث لا وجود له في خليط الحاضنة الأولي. من دون هذه الخطوة، سيحتوي الخليط على جميع العناصر المطلوبة لتشكّل الليفين، وسيتخثر الخليط.

وتُحتضن تخفيفات البلازما المعيارية وبلازما الاختبار الممتصة مع الكاشف المرافق في المرحلة الأولى. ويؤدي هذا إلى توليد العامل (FXa). ويضاف مصدر من البروثرومبين والفيبرينوجين من البلازما الطبيعية المجمعة في المرحلة الثانية، التي تتيح تشكّل الجلطة، والتي يعتمد وقت التخثر الناتج عنها على الكمية الأولية للعامل (VIII:C).

الكواشف

- كاشف مختلط (انظر "إنتاج الكاشف المختلط" أدناه)
- عازل اورين فيرونا
- البلازما الطبيعية المجمعة (بلازما الركيزة): تخزن بتجميد شديد
- البلازما المعيارية أو المرجعية
- مراقبة الجودة الداخلية (IQC)
- 0.0125 م من كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$) (مثلاً، 1 في تخفيفين من 0.025 م من ($CaCl_2$) كما مستخدم في اختبار (APTT)
- تعليق هيدروكسيد الألنيوم (مثل رمز كتالوج سيجما (A8222)): يخزن في درجة حرارة الغرفة

متطلبات العينة

بلازما حامضية، والتي يمكن تخزينها مجمدة قبل الاختبار، إذا لزم الأمر.

الطريقة

1 حضر البلازما المعيارية باستخدام الماء المقطر قبل 10 دقائق من استخدامها، والكاشف المجتمع بما لا يقل عن 15 دقيقة قبل استخدامه مع 3 مل من 0.0125 م من كلوريد الكالسيوم.

2 هيء بلازما (IQC) وبلازما الركيزة. إذا كانت أي منهما مجمدة، أذبها بدرجة 37 مئوية لمدة 5 دقائق قبل الاستخدام.

3 قم بوضع علامات على أنابيب بلاستيكية كافية ذات استخدام واحد لكل واحدة من العينات، عينات IQC، والمعيارية.

4 ضع مقدار 0.45 مل من البلازما المعيارية، بلازما المراقبة الداخلية وبلازما المريض في كل أنبوب بلاستيكي.

5 أضف 50 مايكرولتر من الألومينا جيدة الرج إلى كل أنبوب وامزجها جيداً.

6 بالنسبة للكميات الصغيرة من البلازما، استخدام 0.225 مل من البلازما و 25 مايكرولتر من الألومينا.

7 ضعها في الحاضنة بدرجة 37 مئوية لمدة 3 دقائق، ثم دوّرها لـ 5000 غ لدقيقتين في جهاز طرد مركزي مناسب.

8 انقل على الفور البلازما الطافية الى الأكواب أو الأنابيب البلاستيكية المتوافقة مع المحلل المستخدم. احرص على عدم تعكير الألومينا الراسبة.

ملاحظة: تستند الخطوات التالية على استخدام محلل من سلسلة (Sysmex CA). يمكن إجراء الاختبار على الأجهزة من مصنّعين متعددين آخرين. لقد أجرى أحد مؤلفي هذا الدليل مقايسات بنجاح على محللات من (Instrumentation Laboratory)، وعلى الأرجح كانت الطريقة متوافقة مع أنواع أخرى من المحللات. لذا، تم إدراج هذه الطريقة المحددة كمثال توضيحي.

9 حمّل الكاشف المجتمع، وعازل المقايسة، والبلازما الطبيعية المجمعة/ الركيزة في المحلل الآلي.

10 تظهر البلازما الممتصة للتحليل بالترتيب التالي: المعيارية، IQC، بلازما المريض، وأخيراً، المعيارية الثانية. وتتم مقايسة العينات ذات التركيزات الطبيعية من (FVIII) عادة باستخدام ثلاثة تخفيفات مختلفة ضمن النطاق 1/50 – 1/400.

وللمستويات المنخفضة من (FVIII) (أقل من 0.05 وحدة دولية/ دل) فقد تكون هناك حاجة للتخفيفات 1/10، 1/20، و 1/50. وللمستويات المرتفعة (أكثر من 1.5 وحدة دولية/ دل)، قد تكون هناك حاجة لتخفيفات 1/800 – 1/3200. وبخلاف ذلك، فقد تكون خطوط استجابة المريض للجرعة غير موازية للخط القياسي.

النتائج

مخطط النتائج والحسابات لفعالية العامل (FVIII) كما موصوف في مقاسية المرحلة الواحدة (القسم 23).

1.25 إنتاج الكاشف المجتمع لمقايسة العامل (VIII:C) ذات المرحلتين

احصل على كمية كافية من العامل (FV) والفسفوليبيد لإنتاج نسبة 5:1:1 مع المصل المعمر المخفف (أي 5 أجزاء من المصل إلى جزء 1 من العامل FV وجزء 1 من الفسفوليبيد). على سبيل المثال، 240 مل المصل المخفف، و48 مل من العامل FV ، و48 مل من الفسفوليبيد (أو 180 مل:36 مل:36 مل).

الكواشف

- مصل معمر
  1. 10 مل من الدم المأخوذ من 6 متبرعين طبيعيين على الأقل في أنابيب زجاجية عادية، دون إضافات.
  2. يُحتضن لمدة 4 ساعات في درجة 37 مئوية، ثم طوال الليل في 4 درجات مئوية.
  3. يتم تدويرها في 3000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقيقة.
  4. افصلها وامزج الطافي في الزجاج غير سيليكوني (يمكن تخزينه مجمداً).
- بوفين (FV) (دايجنوستيك ريايجنت لتد.، ثايم، أوكسفوردشاير، انكلترا)
  أعد كل واحدة منها مع 1 مل من عازل الجليوكسالين.
- فسفوليبيد (بيل وألتون، دايجنوستيك ريايجنت لتد.، أوكسفورد، انكلترا)
  أعد كل واحدة منها مع 1 مل من عازل الجليوكسالين (مثلاً، 5 مرات تركيز).
- عازل الجليوكسالين
- حامض (HEPES) (سيجما H3375)

الطريقة

1. خفف المصل المعمر 1/10 بعازل الجليوكسالين.
2. قم بتفعيل المصل المخفف لمدة ساعة قبل إضافة كرة زجاجية صغيرة واحدة (كرة بالوتيني) لكل مل، وضعها في خلاط دوار لمدة ساعة مع غشاء مختبر بلاستيكي (فيلم) في الأعلى). ملاحظة: تزن 100 كرة بالوتيني 3.7 غ).

ملاحظة: اعمل بأسرع ما يمكن للخطوات 3 – 8.

3 أعد بلازما (FV) في 1 مل من عازل الجليوكسالين.

4 أعد الفسفوليبيد في 1 مل من عازل الجليوكسالين.

5 امزج المصل المخفف المفعّل، العامل FV، والفسفوليبيد بنسبة 5:1:1.

6 امزجه جيداً وأضف مسحوق (HEPES)، مما يعطي تركيز 1% لاستقرار درجة الحموضة عند 7.0 درجة (مثلاً، إذا كان السائل 300 مل، أضف 3 غ من (HEPES)

7 أفرغه في كمية 0.5 مل.

8 يمكن أن يُجمد هذا جافاً (انظر القسم 40 حول التجميد الجاف).

9 افحص كاشفاً جديداً تحت الظروف المثلى، وكما مبين في أدناه.

تقييم استقرار توليد العامل (FXa)

يتطلّب التخفيف الأمثل للعينة، وفترة الحضانة، والكمية الكلية للمقايسة، وكمية 0.0125 م من كلوريد الكالسيوم لغرض إعادة التشكيل، وطول مدة الإعادة، واستقرار الكاشف المجتمع إعادة تقييم بشكل منتظم للحصول على استقرار توليد العامل (FXa).

إن الترتيب والمدى الذي يحدث فيه ما يلي ليس نهائياً. فهو عرضة للتغيير، اعتماداً على الكمية. وهناك نقطة انطلاق جيدة وهي استخدام الظروف نفسها التي تستخدمها الكمية الحالية، ثم غيّر المقياس في كل مرة.

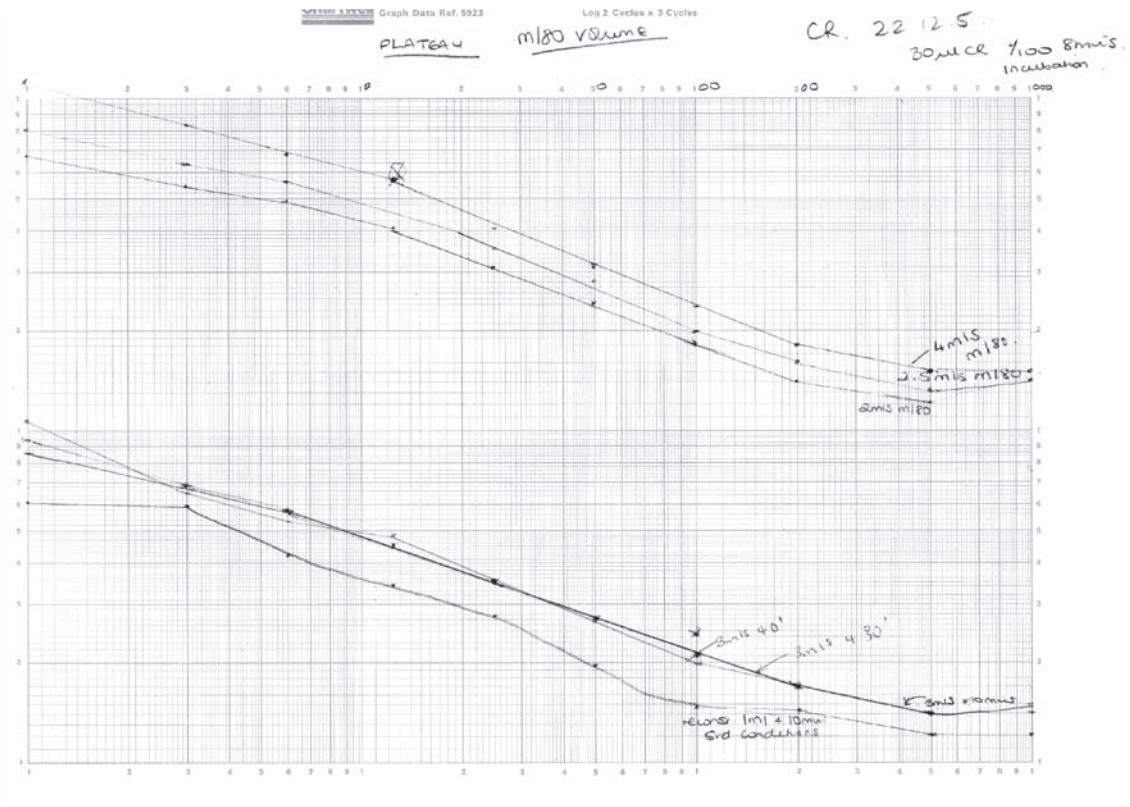
- كمية الإعادة مع 0.0125 م من كلوريد الكالسيوم: 0.5 مل، 1 مل، 1.5 مل، 2 مل، 2.5 مل، 3 مل، 3.5 مل.
- طول مدة الإعادة قبل استخدام/ الاستقرار بعد الإعادة: مباشرة قبل الاستخدام، 5 دقائق، 10 دقائق، 30 دقيقة، 60 دقيقة، 120 دقيقة.
- مدة الحضانة: 5 دقائق، 6 دقائق، 7 دقائق، 8 دقائق، 9 دقائق، 10 دقائق.
- تخفيف العينة: 1/20، 1/50، 1/80، 1/100.
- كمية الكاشف المجتمع في المقايسة: 20 مايكرولتر، 30 مايكرولتر 40 مايكرولتر 50 مايكرولتر، الخ.

لكل عملية مقايسة، سجّل جميع النتائج على ورق بياني نوع (log–log)، كما في المثال المبيّن في الشكل 25.1. اختر التخفيفات والظروف التي تحتوي على أكبر عدد من النقاط على الجزء الخطي للمنحنى. وللظروف المثالية أوقات تخثر بحوالي 20 إلى 30 ثانية لأول تخفيف.

ملاحظات

- يتم تجميع البلازما الطبيعية المجمعة/ الركيزة من البلازما الطبيعية المتبقية من عمليات مراقبة التخثر العادية أو من أشخاص أصحاء طبيعيين.
- يجب أن تحتوي البلازما الطبيعية على (PT) عادية و (APTT) عادية.
- يمكن تخزين البلازما الطبيعية المجمعة في مجاميع من قنان بلاستيكية بحجم 3 أو 5 مل بدرجة 80- مئوية لستة أشهر على الأقل.

الشكل 1.25: مثال استقرار توليد العامل (FXa)



26 مقايسة كروموجينيك للعامل (VIII:C)

المقدمة

المقايسة المفضلة الأكثر شيوعاً للعامل (VIII:C) في جميع أنحاء العالم لسنوات عديدة هي مقايسة المرحلة الواحدة، الموصوفة في القسم 23.

هناك قيود على مقايسة المرحلة الواحدة، وتشمل التدخل إذا كان مضاد تخثر الذئبة موجوداً. الأهم من ذلك، لا تُستثنى الهيموفيليا (A) الخفيفة من خلال العثور على مستوى عادي للعامل (VIII:C) في مقايسة المرحلة الواحدة. وقد أبلغت عدة مجموعات عن فئة فرعية من الهيموفيليا الخفيفة (A) أن لدى المرضى تعارضاً بين نشاط العامل (FVIII) وكما محدد باستخدام أنواع مختلفة من المقايسات (باركيه – جيرنيز وآخرون، 1988، دنكان وآخرون، 1994، كيلنغ وآخرون، 1999). ويرتبط أكثر من 20 % من مرضى الهيموفيليا الخفيفة (A) بهذا التناقض، الذي يعرف بأنه فرق ذو شقين بين النتائج التي تم الحصول عليها من خلال أنظمة مقايسات مختلفة (باركيه – جيرنيز وآخرون، 1988).

في بعض الحالات، قد تكون نتيجة المقايسة ذات المرحلة الواحدة أعلى بخمس مرات من مقايسة التخثر ذات المرحلتين أو مقايسة الكروموجينيك (باركيه – جيرنيز وآخرون، 1988). والأكثر شيوعاً، أن نتيجة المقايسة ذات المرحلة الواحدة هي أعلى مرتين من مقايسة التخثر ذات المرحلتين أو مقايسة الكروموجينيك. ولدى أكثر من ثلاثة أرباع مرضى كهؤلاء، تنخفض جميع نتائج المقايسات تحت الحد الأدنى للنطاق المرجعي بحيث يمكن أن يكون التشخيص موثوق به، بغض النظر عن الطريقة التي يتم اتّباعها للتحليل.

ومع ذلك، تكون نتائج مقايسة المرحلة الواحدة جيدة ضمن المعدل الطبيعي لنسبة صغيرة من المرضى، مع مستويات منخفضة باستخدام مقايسة التخثر ذات المرحلتين أو مقايسة الكروموجينيك (كيلينغ وآخرون، 1999، مازورير وآخرون، 1997). ولدى هؤلاء المرضى تاريخ نزف متوافق مع المستويات الدنيا التي تم الحصول عليها مقايسة التخثر ذات المرحلتين أو مقايسة الكروموجينيك.

في كثير من الحالات، يتم التعرف على الخلل الجيني، لذا ليس هناك شك في أن هؤلاء الأشخاص لديهم هيموفيليا بالفعل (رودزي وآخرون، 1996، مازورير وآخرون، 1997). استناداً إلى التوجيهات المطبوعة، فإن حوالي 5 % – 10 % من المرضى المؤكد إصابتهم بالهيموفيليا الخفيفة (A) وراثياً لديهم نتيجة مقايسة ذات مرحلة واحدة طبيعية. وبما أن فعالية العامل (FVIII) طبيعية في مقايسة المرحلة الواحدة المستندة إلى APTT، فليس من المستغرب أن يكون APTT طبيعياً أيضاً لدى مرضى كهؤلاء. وهذا يعني أن المرضى الذين لديهم تاريخ سريري متوافق مع الهيموفيليا (A) ينبغي أن يكون لديهم تخثر على مرحلتين (انظر القسم 25) أو مقايسة الكروموجينيك، حتى لو كان كل من APTT ومقايسة المرحلة الواحدة طبيعيين.

ولدى عدد من المصنعين مجموعات تجارية لمقايسة الكروموجينيك للعامل (FVIII). والعديد منها مناسبة لتشخيص الهيموفيليا (A) في وجود نشاط عادي ذي مرحلة واحدة للعامل (FVIII). وتظهر أمثلة على النتائج لهكذا مرضى في الشكل 1.26 أدناه. لقد كان طقم مقايسة الكروموجينيك المستعمل طقماً تجارياً من شركة سيمينز/ دايد بيهرنغ، إلا أن إدراجها لا يشير إلى التفوق على مقايسات مماثلة أخرى، والتي يمكن استخدامها بنجاح في هذا السياق.

الشكل 1.26: أمثلة لمرضى يعانون من الهيموفيليا الخفيفة (A) المؤكدة راثياً وتناقضات المقايسة

الحالة	مقايسة ذات مرحلة واحدة (وحدة دولية/ دل)	مقايسة ذات مرحلتين (وحدة دولية/ دل)	مقايسة كروموجينيك (وحدة دولية/ دل)
أ	101	34	13
ب	88	15	28
ج	63	30	40
د	55	24	40
ه	58	21	33
و	72	21	36
ز	84	19	45

هناك حالات من الهيموفيليا الخفيفة (A) لديها فعالية منخفضة لمقايسة المرحلة الواحد، ولكن لها نتائج طبيعية في مقاسية المرحلين أو مقايسة الكروموجينيك (مومفورد وآخرون، 2002، ليال اتش وآخرون، 2008). في كثير من الحالات (ولكن ليس جميعها) من هذا القبيل، يرتبط النمط الظاهري السريري بنتيجة مقايسة التخثر الكروموجينيك أو مقاسية المرحلتين عند عدم وجود تاريخ شخصي أو عائلي للنزف، مع عدم وجود متطلبات لمعالجة استبدال العامل (FVIII) (ليال اتش وآخرون، 2008).

وبناء على هذه النتائج، فإن من المفيد لجميع مراكز الهيموفيليا أن توفر مقايسة الكروموجينيك أو مقايسة المرحلتين للتجلط. يجب أن يتم تنفيذ هذه الاختبارات على الأشخاص ذوي الـ APTT الطبيعي وفعالية (FVIII) ذات المرحلة الواحدة مع وجود تاريخ شخصي أو عائلي يتوافق مع الهيموفيليا الخفيفة.

تم وصف مقايسة الكروموجينيك المعدلة (النسخة المعدلة من مقايسة كواماتيك، إنسترومنتيشن لابراتوري لتد). إنها مناسبة لمقايسة المستويات المنخفضة جداً من العامل (FVIII) (ياتوف وآخرون، 2006). وإبلاغ هذه الطريقة لتتيح قياسات دقيقة ومُحكمة للعامل (FVIII) في نطاق 0.1 – 2 وحدة دولية/ دل (0.1 – 2 من FVIII، أو 0.001 – 0.02 وحدة دولية/ مل).

مبدأ التحليل

في بعض تحاليل الكروموجينيك (ولكن ليس جميعها)، يتم تفعيل كافة FVIII في العينة بواسطة الثرومبين. يتم تفعيل FVIII ثم تسريع تحويل العامل (FX) إلى العامل (FXa) في وجود العامل (FIX) المفعّل، والفوسفليبيد، وأيونات الكالسيوم. يتم تقييم فعالية (FXa) من خلال تحلل ركيزة (p–nitroanaline) إلى (FXa) بالتحديد. يتناسب المعدل الأولي لإفراز (p–nitroanaline) (أصفر اللون) بقياس 405 نانومتر مع (FXa) الفعال وبالتالي إلى فعالية (FVIII) في العينة. للمراجعة، انظر لوندبلاد وآخرون، 2000).

المراجع

Duncan EM, Duncan BM, Tunbridge LJ, Lloyd JV. Familial discrepancy between the one-stage and two-stage factor VIII assay methods in a subgroup of patients with haemophilia A. *Br J Haematol* 1994; 87: 846–848.

Keeling DM, Sukhu K, Kemball-Cook G, Waseem N, Bagnall R, and Lloyd JV. Diagnostic importance of the two stage FVIII:C assay demonstrated by a case of mild hemophilia associated with His1954 → Leu substitution in the FVIII A3 domain. *Br J Haematol* 1999; 105: 1123–6.

Lundblad RL, Kingdon HS, Mann KG, White GC. Issues with the assay of FVIII activity in plasma and FVIII concentrates. *Thromb Haemost* 2000; 84:942–8.

Lyall H, Hill M, Westby J, Grimley C, Dolan G. Tyr346 → Cys mutation results in factor VII:C assay discrepancy and a normal bleeding phenotype: Is this mild haemophilia A? *Haemophilia* 2008; 14:78–80.

Mazurier C, Gaucher C, Jorieux S, Parquet-Gernez A. Mutations in the FVIII gene in seven families with mild haemophilia A. *Br J Haematol* 1997; 96:426–7.

Mumford AD, Laffan M, O'Donnell J, McVey JH, Johnson DJD, Manning RA, Kemball-Cook G. A Tyr346→Cys substitution in the interdomain acidic region a1 of FVIII in an individual with FVIII:C assay discrepancy. *Br J Haematol* 2002; 118:589-594.

Parquet-Gernez A, Mazurier C, Goudemand M. Functional and immunological assays of FVIII in 133 haemophiliacs: Characterisation of a subgroup of patients with mild haemophilia A and discrepancy in 1- and 2-stage assays. *Thromb Haemost* 1998; 59:202–206.

Rudzi Z, Duncan EM, Casey GJ, Neuman M, Favaloro RJ, Lloyd JV. Mutations in a subgroup of patients with mild haemophilia A and familial discrepancy between one-stage and two-stage factor VIII:C methods. *Br J Haematol* 1996; 94:400–406.

Yatuv R, Dayan I, Baru M. A modified chromogenic assay for the measurement of very low levels of FVIII activity (FVIII:C). *Haemophilia* 2006; 12:253–257.

27 المقايسة الداخلية ذات المرحلة الواحدة للبريكاليكرين (PKK) ولمولد الكينينوجين ذي الوزن الجزيئي العالي (HMWK)

المبدأ

إن (HMWK) ويعرف بعامل فيتزجيرالد، و(PKK) عامل فليتشر، هي عوامل تخثر موجودة في مسار الاتصال. ويسبب الانخفاض في أي منهما إطالة كبيرة لـ (APTT) مع أغلب كواشف (APTT)، اعتماداً على المنشّط المستخدم. في ظل الغياب الكامل لكل من (HMWK) أو (PKK) (< وحدة دولية واحدة/دل) فيكون (APTT) عادة أكبر من 200 ثانية وأطول من (APTT) مع نظام الاختبار نفسه، وفي وجود نقص كامل للعوامل (VIII، IX). ستعطي كواشف (APTT) التي تستخدم حامض إيلاجيك كمنشط (على سبيل المثال، الأكتين FS) نتائج طبيعية تماماً مع أي من النقص. لذا، لا يمكن استخدام كواشف كهذه في مقايسة المرحلة الواحد لهذه العوامل.

ينحدر منحنى استجابة الجرعة في مقايسة المرحلة الواحدة لهذه العوامل مع بعض الكواشف أكثر من غيرها. وتصف الطريقة المبينة أدناه استخدام كاشف معيّن واحد الذي ينحدر إلى منحنى استجابة الجرعة بشكل حاد، مما يؤدي إلى نتائج مقايسة أكثر دقة وضبطاً.

الكواشف

- كاشف دوبتون (APTT) (تيكنوكلون، فيينا، النمسا)
  يُخزن بدرجة 2 – 8 مئوية وفق تعليمات الشركة المصنّعة
- 25 م م كلوريد الكالسيوم
  يُخزن بدرجة 2 – 8 مئوية
- عازل اورين فيرونال
  يُخزن بدرجة 2 – 8 مئوية
- البلازما ذات النقص في البريكاليكرين (عامل فليتشر)
  مثال: تُجمد مجففة (تيكنوكلون، فيينا، النمسا)
  تُخزن بدرجة 2 – 8 مئوية
- البلازما ذات النقص في (HMWK) (عامل فيتزجيرالد)
  مثال: تُجمد مجففة (تيكنوكلون، فيينا، النمسا)
  تُخزن بدرجة 2 – 8 مئوية
- البلازما المرجعية (على سبيل المثال، البلازما الطبيعية المجمعة، راجع القسم 7)
- عينة مراقبة الجودة الداخلية

الطريقة

1 تم وصف تصميم المقايسة على أنها مقايسة (FVIII) ذات مرحلة واحدة في القسم 23 (أي، 3 تخفيفات معيارية، 3 تخفيفات من بلازما الاختبار).

2 تم صنع التخفيفات باستخدام عازل اورين.

3 عادة ما تكون أكثر تخفيفات المقايسة مناسبة أعلى من تلك المستخدمة في مقايسات المرحلة الواحدة لـ (FVIII) أو مقايسات (FIX) الموصوفة سابقاً.

4 تم وصف التحليل وتركيب منحنى المعايرة، وحساب نتائج الاختبار، تحت مقايسات (FVIII) ذات المرحلة الواحدة (القسم 23).

النطاقات العادية من الأدلة الإرشادية كما يلي:

(HMWK): 0.70 – 1.20 وحدة/ مل (70 – 120 وحدة/ دل)

(PKK): 0.70 – 1.20 وحدة/ مل

لا توجد معايير دولية لكل من (HMWK) أو (PKK) في وقت كتابة هذا الدليل.

28 مراقبة مثبط عامل التخثر المعتمد على (APTT)

المبدأ

قد تكون مثبطات التخثر التي تؤثر على (APTT) فورية أو ذات مفعول يعتمد على الوقت. وستُظهر بلازما الاختبار التي تحتوي على مثبط فوري المفعول، عندما تُخلط مع البلازما الطبيعية، تصحيحاً ضئيلاً أو معدوماً لوقت التخثر. ومن ناحية أخرى، تتطلب المثبطات المعتمدة على الوقت فترة حضانة مع البلازما الطبيعية قبل أن يتم اكتشافها.

يتم احتضان البلازما الطبيعية وبلازما الاختبار بدرجة 37 مئوية لمدة ساعة إلى ساعتين، بشكل منفصل وعلى شكل مزيج 50:50. وعندها يتم تحديد (APTT) على البلازما الطبيعية وبلازما الاختبار، والمزيج المحتضن، وكذلك على مزيج محضّر من كميات متساوية للبلازما الطبيعية وبلازما الاختبار بعد حضانة منفصلة (تمزج على الفور). وتتم مقارنة درجة تصحيح (APTT) لكل مزيج.

ويوحي التصحيح الرديء في المزيج المُعد بعد حضانة منفصلة أن المثبط فوري المفعول. يوحي التصحيح الرديء للمزيج المحتضن أن المثبط معتمد على الوقت.

الكواشف

- بلازما طبيعية: مجموعة من 20 متبرعاً
- بلازما الاختبار
- كواشف لـ (APTT)

الطريقة

1 قم بإعداد ثلاثة أنابيب بلاستيكية: أ، ب، و ج.

2 ضع 0.5 مل من البلازما الطبيعية في الأنبوب أ، وضع 0.5 مل من بلازما الاختبار في الأنبوب ب، وضع 0.2 مل من كل من البلازما الطبيعية وبلازما الاختبار في الأنبوب ج.

3 ضعها في الحاضنة لمدة ساعة واحدة إلى ساعتين بدرجة 37 مئوية.

4 اقسم المزيج بنسبة 50:50 من الأنابيب أ و ب. وهذا هو الأنبوب د، والذي هو بمثابة مزيج فوري

5 قم بإجراء (APTT) بتكرار على أ، ج، د، و ب (بهذا الترتيب).

النتائج والتفسير

الشكل 1.28: مثال على مراقبة مثبط عامل التخثر المستند إلى APTT

العينة	1	2	3
أ: البلازما الطبيعية	40	40	40
ب: بلازما الاختبار	90	90	90
ج: بلازما الاختبار + الطبيعية (محتضنة بعد مزجها معاً)	45	70	70
د: بلازما الاختبار + الطبيعية (محتضنة على حدة قبل المزج)	45	48	70

العينة 1: بلازما ذات خلل جوهري ولكن بدون مانع

العينة 2: بلازما تحتوي على مثبط معتمد على الوقت

العينة 3: بلازما تحتوي على مثبط فوري المفعول

29 فعالية العامل المساعد ريستوسيتين/ فعالية العامل فون ويليبراند (فعالية (VWF:RCo) أو (VWF))

المقدمة

إن قياس العامل المساعد ريستوسيتين ضروري لتشخيص مرض فون ويلبراند (VWD). بينما يمكن القيام بتراكم الصفائح الدموية الشاملة للريستوسيتين (في البلازما الغنية بالصفائح الدموية) عند إجراء الدراسات على تراكم الصفائح الدموية، والاختبار ليس حساساً بما يكفي، وربما يواجه التراكم الضعيف اضطرابات أخرى من غير (VWD). أن مقايسة (VWF:RCo) مفيدة بشكل خاص في الكشف عن نوع (2B، 2A، و2M VWF)، حيث قد يكون (VWF:Ag) طبيعياً أو شبه طبيعي في حين ينخفض (VWF:RCo) بشكل ملحوظ.

مقايسة العامل المساعد ريستوسيتين

تجمع الطريقة الموصوفة هنا طريقة المقايسة العيانية وتقنية تثبيت الصفائح من ايفانز واوستن.

الكواشف

- البلازما المرجعية
- الصفائح الدموية المثبتة والمنجرفة
  يتم تحضير الصفائح الدموية البشرية العادية المثبتة بالفورماليهايد العادي من تركيزات الصفائح الدموية مثل تلك المستخدمة لعلاج المرضى الذين يعانون من اضطرابات الصفائح، من خلال طريقة ايفانز واوستن (1977). انظر "تحضير الصفائح المثبتة"، أدناه.
- Ristocetin (Ristocetin A SO_4 Macrofarm Ltd., Third Floor, 27 Cockspur Street, Trafalgar Square, London SW1Y 5BN)
  ريستوسيتين (ريستوسيتين (A SO_4) ماكروفورم لتد. الطابق الثالث، 27 كوكسبر ستريت، ترافالجار سكوير، لندن (SW1Y 5BN))
  يتم تخفيف 100 ملغ من المسحوق في 3.3 مل من المحلول الملحي ثم تفرّغ إلى كميات من 0.1 مل في أنابيب بلاستيكية بأغطية وتخزن بدرجة 70– مئوية. ولهذا المحلول المُخزن بالتالي تركيز 30 ملغ/ مل. يتطلّب التركيز النهائي في أنبوب التحليل 1.0 ملغ/ مل. وبما أن هناك تخفيف 1 من 4 في التحليل، فيتطلب هذا محلولاً من 4.0 ملغ/ مل. للحصول على 4.0 ملغ/ مل، أضف 0.65 مل من المحلول الملحي إلى 0.1 مل من المحلول المُخزن 30 ملغ/ مل. (وينبغي أن تعطي وقتا خالياً، أي 0.2 صفيحة + 0.1 مل ريستوسيتين + 0.1 عازل لأكثر من60 ثانية.

- 6 غ % من عازل الألبومين الحامضي المالح
استخدم العازل الحامضي/ المالح (جزء واحد 0.11 م سترات ثلاثي الصوديوم: 5 أجزاء المحلول الملحي اعتيادي) مع 1.2 غ من ألبومين المصل البقري المضاف.

الطريقة

- استخدام عازل الألبومين الحامضي المالح، خفف البلازما الطبيعية وبلازما الاختبار على النحو التالي:
  - البلازما المعيارية: 1/2، 1/4، 1/8
  - بلازما الاختبار: 1/2، 1/4، 1/8
- افحص كل تخفيف في درجة حرارة الغرفة على النحو التالي:

أولاً. في أنبوب تخثر زجاجي، ضع:

- 0.2 مل من الصفائح المثبتة المغسولة (في عدد 800 × $1/10^9$ في محلول تعليق الصفائح الدموية)
- 0.1 مل من البلازما المخففة

ثانياً. امزج جيداً، مع تجنب تشكيل فقاعات قدر الإمكان. أضف 0.1 مل من الريستوسيتين (4.0 ملغ/ مل، إعطاء تركيز نهائي من 1.0 ملغ/ مل).

ثالثاً. ابدأ تشغيل ساعة التوقيت. أمِل الأنبوب بخفة وجيئة وذهاباً على خلفية داكنة مع مصباح ساطع موجه على الأنبوب.

رابعاً. سجل الوقت الذي يستغرقه تجمع كمية مرئية كبيرة.

افحص كل تخفيف مرتين، وثلاث مرات إذا كان الفرق بين المرتين أكبر من 10 %.

الحساب

سجل الوقت الذي يستغرقه تجمع تخفيفات البلازما الطبيعية مقابل التخفيف/ التركيز لدورتين على ورق (log–log). سجل الوقت الحاصل مع تخفيفات بلازما الاختبار. يجب أن يكون الرسم البياني بخطوط مستقيمة متوازية.

يُقرأ تركيز عامل الريستوسيتين المساعد في بلازما الاختبار من المستوى القياسي والمصحح للتخفيف وقيمة القياسي بطريقة مماثلة لتلك الوارد وصفها في القسم الذي يوضح مقايسة (FVIII) ذات المرحلة الواحدة (القسم 23).

وينبغي وضع النطاق الطبيعي محلياً، ولكنه عادة ما يكون قريباً من 50 – 150 وحدة دولية/ دل.

1.29 إعداد الصفائح الثابتة

الشكل 1.29: الكواشف لإعداد الصفائح الثابتة

0.2% من محلول (EDTA)	2 غ من ثنائي الصوديوم – EDTA، 8.5 غ من كلوريد الصوديوم، ماء مقطر حتى لتر 1، بدرجة حموضة 6.4
محلول التثبيت	20 مل × 40% من محلول الفورمالديهايد (أو 22.2 مل 36% فورمالدهايد). 0.2 غ ثنائي الصوديوم – EDTA، 8.5 غ من كلوريد الصوديوم، 0.4 من فوسفات الهيدروجين ثنائية الصوديوم، 1.1 غ ثنائي هيدروجين الصوديوم ثنائي هيدرات الفوسفات، ماء مقطر حتى لتر 1، درجة حموضة 6.4.
محلول الغسل	جزء واحد من محلول سترات ثلاثي الصوديوم (3.8%) 5 أجزاء من محلول الماء الملحي، درجة حموضة 6.4
محلول التعليق	مثل محلول الغسل، ولكن بدرجة حموضة 7.4
محلول الحفظ	0.2 ثنائي الصوديوم – EDTA، 8.5 غ من كلوريد الصوديوم، 0.10 غ من أزيد الصوديوم، ماء مقطر حتى لتر 1، درجة حموضة 6.4

الطريقة

1 احصل على الصفائح الدموية حديثة قدر المستطاع في ديكستروز سيترات الفوسفات (كما مستخدم في جمع منتجات الدم) أو خذ الدم في 0.109 م سيترات وقم بتحضير البلازما غنية الصفائح (PRP).

2 اترك (PRP) في حاوية بلاستيكية بغطاء في درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة، ثم بدرجة 37 مئوية لمدة ساعة. امزج تسعة أجزاء من (PRP) مع جزء واحد من محلول (EDTA). دعها تركد لمدة دقيقة واحدة في درجة حرارة الغرفة

3 أضف حجماً متساوياً من محلول التثبيت بدرجة 4 مئوية واتركه بدرجة 4 طوال الليل.

4 يطرد مركزياً في 280 غ (جاذبية) لمدة 20 دقيقة. تجاهل الطافي وأفرغ حبيبات الصفائح الدموية.

5 أضف 2% من كمية البداية من (PRP) من محلول الغسل وأعد تعليق الصفائح.

6 خففه أكثر حتى 25% من كمية البداية من (PRP) واتركه في درجة 4 مئوية لمدة ساعة.

7 يطرد مركزياً في 280 غ لمدة 20 دقيقة، يفرّغ، ويعاد تعليقه في محلول التعليق للاستخدام الفوري أو في محلول التخزين لخزنه بدرجة 4 مئوية للاستخدام في وقت .

8 أعد تعليقه إلى تركيز يقارب 800 × 10^9/ ل.

ستستقر الصفائح بالتخزين لتشكيل ترسبات طليقة. قبل البدء بالمقايسة، أزل محلول التخزين من فوق الصفائح واستبدله بكمية متساوية من محلول التعليق. وعندها تستقر الصفائح الدموية لمدة شهرين على الأقل.

المرجع

Evans RJ, Austen DE. Assay of ristocetin cofactor using fixed platelets and a platelet counting technique. *Brit J Haemato* 1997; 37: 289-94.

30 مولد مضاد العامل فون ويليبراند بواسطة تقنية (ELISA) (VWF:AG)

المبدأ

يرتبط الجسم المضاد ذو النسائل المتعددة لعامل فون ويلبراند (VWF) البشري بالسطح البلاستيكي للأوعية في صفيحة مايكروتيتر. تضاف تخفيفات البلازما المعيارية وبلازما الاختبار ويتم احتضانها، وخلال وقتها يرتبط (VWF) بالجسام المضاد. ويضاف الأنزيم الثاني المسمى بالجسم المضاد، والذي يرتبط بدوره بـ (VWF). كمية الجسم المضاد مرتبطة، وبعد ذلك يوجد (VWF) كمياً، وذلك بإضافة إنزيم الركيزة يليه اضافة المادة الملونة.

العوازل

- عازل الكربونات 0.05 م بدرجة حموضة 9.6
  لكل لتر 1: 1.59 غ كربونات الصوديوم
  0.93 غ كربونات هيدروجين الصوديوم
  0.20 غ أزيد الصوديوم

- محلول الفوسفات الملحي المعزول 0.01 م بدرجة حموضة 7.2
  لكل 1 لتر: 0.345 غ فوسفات هيدروجين الصوديوم الثنائي
  2.680 غ فوسفات الهيدروجين ثنائية الصوديوم
  8.474 غ كلوريد الصوديوم
  توين (PBS) 20، 1 مل/ ل
  توين (PBS) 20، 0.5 مل/ ل

- عازل سيترات الفوسفات 0.1 م بدرجة حموضة 0.5
  لكل 1 لتر: 7.30 غ من حامض الستريك
  23.87 غ من فوسفات الهيدروجين ثنائية الصوديوم $12H_20$

محلول الارتكاز (substrate soluation)

80 ملغ ثنائي كلوريد 1.2 كلوريد ثنائي الأورثوفينيليلينيديامين المذاب في 15 مل سترات الفوسفات العازلة و10 ميكرولتر من 20 كمية. بيروكسيد الهيدروجين المضاف.

ملاحظة: يجب أن يحضر جديداً في كل مرة.

مواد أخرى

- مضادات الأجسام المضادة (VWF)
  مثلاً: مضاد (VWF) البشري أو من الأرانب من داكو أي/ اس (إنتاج سفيج، دي كي– 2600، جلاستروب، الدنمارك).

- Anti–VWF antibody
Example: rabbit anti-human VWF from DAKO a/s
(Production Svej, DK-2600, Glastrup, Denmark).
- مضادات الأجسام المضادة (VWF) المترافقة مع انزيم البيروكسيديز (أيضاً من داكو).

ملاحظة: يمكن استخدام مصادر أخرى للأجسام المضادة وبنفس القدر من النجاح. قد تختلف تخفيفات الأجسام المضادة المقترحة أدناه وفقاً للمصدر وعدد مجموعة الأجسام المضادة المستخدمة.

- ألواح مايكروتيتر للاستخدام مرة واحدة وقارئ ألواح
- 10 % من محلول حمض الكبريتيك

الطريقة

1 أضف 100 مايكرولتر من الجسم المضاد المخفف بنسبة 1/1000 في عازل الكربونات لكل وعاء يتم استخدامه. ضع اللوحة في الحاضنة لمدة ساعة واحدة في صندوق رطب في درجة حرارة الغرفة.

2 اغسل الأوعية بملئها 0.5 مل/ ل من توينPBS ، يليها قلبها وضربها بلطف على ورق الامتصاص. كرر أربع مرات.

3 اصنع تخفيفات من البلازما المعيارية (1/20، 1/30، 1/40، 1/50، 1/80، 1/160، 1/320) وبلازما الاختبار (1/20، 1/40، 1/80، 1/60 بالنسبة للطبيعي؛ 1/5 بالنسبة للنتائج المتوقعة المنخفضة) في 1 مل/ ل من توين (PBS).

4 أضف 100 مايكرولتر من كل تخفيف إلى الأوعية، ضعها في الحاضنة لمدة ساعة واحدة كما في السابق، واغسلها كما مر آنفاً.

5. أضف 100 مايكرولتر مضاد البيروكسيداز المترافق للجسم المضاد (VWF) من داكو والمخفف بنسبة 1/1000 في 1 مل/ ل من توين (PBS) لكل وعاء وضعه في الحاضنة كما سبق..

6. قم بتكوين الركيزة الآن؛ اتركها في الظلام باستخدام رقائق الألمنيوم حولها من جميع الجهات واتركها تمتزج حتى تتحلل البلورات أو القرص. (أضف بيروكسيد الهيدروجين مباشرة قبل الاستعمال.).

7. شغل قارئ اللوحة.

8. اغسل مرتين في 0.5 مل/ ل (PBS)، ومرة واحدة في 0.1 م من سيترات الفوسفات العازلة.

9. أضف 100 مايكرولتر من محلول الركيزة الجديد لكل وعاء وضع اللوح في الحاضنة في درجة حرارة الغرفة في صندوق رطب لنحو ست دقائق (حتى يصبح اللون واضحاً في أدنى تخفيف قياسي).

10. أوقف التفاعل بإضافة 100 مايكرولتر من محلول حامض الكبريتيك بنسبة 10% إلى كل وعاء في نفس المعدل الذي تمت إضافة الركيزة إليه. إذا تم استخدام ماصة متعددة القنوات، فمن السهل إضافة الركيزة إلى كل صف من الأوعية بالتعاقب في مدة 10 ثوانٍ، ومن ثم إضافة حامض الكبريتيك في التسلسل نفسه في مدة 10 ثوان.

11. اقرأ الكثافة البصرية (OD) في 492 نانومتر.

ويتم الحصول على النتائج من خلال تخطيط الكثافة البصرية مقابل التخفيف على ورق بياني (log/log). تم وصف طريقة التخطيط والحساب عند توضيح مقايسة (FVIII) ذات المرحلة الواحدة في القسم 23.

31 مقايسة الكولاجين الملزمة لعامل فون ويليبراند (VWF:CB)

المبدأ

لدى عامل فون ويلبراند (VWF) عدة وظائف. إضافة إلى كونه البروتين الناقل لـ (FVIII) في البلازما، وتشكيل المركب الذي يحمي (FVIII) من التحلل البروتيني، فهو يعمل أيضاً كوسيط لتجميع الصفائح الدموية عن طريق ربط نفسه لمستقبلات غشاء الصفائح (GpIb وGpIIb/IIa) بعد عملية تحفيز الصفائح الدموية. من المهم أيضاً في عملية الإرقاء الأولية، العمل كوسيط بين الصفائح وما تحت البطانة.

أن (VWF:RCo) الواردة في (القسم 29) هي مقياس لخصائص التلاصق لـ VWF إلا أنها قد لا تعكس وظيفتها الفسيولوجية دائماً. إن قياس قدرة الـ VWF على ربط الكولاجين قد تعكس بعض الأحيان وظيفتها الفسيولوجية على نحو أفضل. وفي أغلب أحوال VWD (ولكن ليس كلها)، هناك توافق بين نتائج (VWF:RCo) و(VWF:CB). في حالات نادرة من VWD، تكون واحدة من هذه الانشطة قليلة الفعالية، ويكون الآخر هو ضمن المعدل الطبيعي. قد يحتاج التشخيص الكامل إجراء كلا المقايسات، رغم أن العديد من المراكز لا تستخدم سوى واحد من اثنين فقط. يختار بعض الكتّاب (VWF:CB) في غياب فحص (VWF:RCo) المناسب الدقيق.

وهناك عدد من المجموعات(مواد عمل الفحص) المتاحة تجارياً في السوق في وقت كتابة هذا الدليل. وهناك مثال أدناه، ولكن البقية قد تم استخدامها بنجاح أيضاً. إن إدراج هذه الطريقة لا يعني توصية بمنتج شركة معيّن. إذا قد يتم استخدام مصدر تجاري مختلف، فمن المهم اتباع تعليمات الشركة المصنّعة.

الكاشف

مجموعة تيكنوزيم (VWF:CB) إليسا (تكنوكلون، فيينا، النمسا)

يحفظ بدرجة حرارة 2 – 8 مئوية، وفق تعليمات الشركة المصنّعة.

العينات

يمكن تخزين بلازما الاختبار السيتراتية والمعايرة مجمدة بشدة في درجات حرارة أقل من 35– مئوية قبل التحليل.

الطريقة

1. تأكد من إحضار مواد الطقم (Kit) بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة قبل البدء. ويمكن تقسيمه إلى ثلاثة أو أربعة، وفقاً لعدد العينات المراد فحصها.

2. حضر العينات المعيارية وعينات المراقبة باستخدام 0.5 مل من الماء المقطر واتركها لمدة 15 دقيقة، أو قم بإذابتها إذا كانت مجمدة مسبقاً. امزجه جيداً بتدويره لمدة 10 ثوان.

3. خفف جميع بلازما الاختبار، والمراقبة، والبلازما المعيارية 1 + 25 (أي 20 مايكرولتر بلازما و500 مايكرولتر عازل حضانة)، ثم امزجه بتدويره.

4. قسمه بكميات متساوية وجمد بلازما المعايرة وبلازما المراقبة وخزنها بدرجة 80- مئوية.

5. أضف 100 مايكرولتر لكل عينة تخفيف في الوعاء المناسب، قم بتغطيته بفيلم، وضعه في الحاضنة لمدة 45 دقيقة في درجة حرارة الغرفة (20 – 25 مئوية). قم بعمل جميع الاختبارات مكررة.

6. هيئ عازل الغسيل. خفف جزءاً واحداً من عازل الغسل المركز بـ 9 أجزاء من الماء المقطر، اخلطه جيداً. قبل التمديد، حل أي رواسب بلورية تظهر من خلال الحاضنة بدرجة 37 مئوية لمدة 10 دقائق.

7. بعد 45 دقيقة، اغسله ثلاث مرات باستخدام 200 مايكرولتر من عازل الغسل المخفف لكل وعاء، يليه قلبها واضربها بلطف على ورق الامتصاص.

8. هيئ محلول العمل المتقارن (conjugate) بتخفيف جزء متقارن واحد مع 50 جزءاً من عازل الحاضنة (incubation buffer). شكلّها قبل الاستخدام مباشرة، إذ تكون مستقرة 60 دقيقة فقط. امزج 20 مايكرولتر متقارنة مع 1000 مايكرولتر من العازل لـ 8 أوعية.

9. أضف 100 مايكرولتر من محلول العمل المتقارن لكل وعاء، قم بتغطيته، ثم ضعه في الحاضنة في درجة حرارة الغرفة لمدة 45 دقيقة.

10. اغسله ثلاث مرات باستخدام 200 مايكرولتر من عازل الغسل كما مر سابقاً، يلي ذلك قلبها وضربها بلطف على ورق امتصاص.

11. أضف 100 مايكرولتر من محلول الركيزة لكل وعاء، غطه بفيلم، وضعه في الحاضنة لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة.

12. أضف 100 مايكرولتر من محلول الإيقاف لكل وعاء.

13. قم برجه لمدة 10 ثوان. باستخدام قارئ لوحات مايكروتيتر (microtitre plate reader,) مناسب، قم بقياس الكثافة البصرية (OD) ضمن 10 دقائق في 450 نانومتر.

14. خطط (يدوياً أو باستخدام باقة الإحصاءات) تركيز (VWF:CB) (على المحور السيني) مقابل (OD) (على المحور الصادي) باستخدام تقنية نقطة إلى نقطة خطي–خطي.

المعدل الطبيعي: 0.49 – 1.32 وحدة دولية/ مل

للمزيد من القراءة

Favaloro EJ. An update on the VWF collagen binding assay: 21 years of age and beyond adolescence but not yet a mature adult. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33:727–44.

Laffan M, Brown SA, Collins PW, Cumming AM, Hill FG, Keeling D, Peake IR, Pasi KJ. The diagnosis of VWD: A guideline from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. *Haemophilia* 2004; 10:199–217.

32 مقايسة ربط العامل (VIII) لتشخيص مرض فون ويلبراند نورماندي

المبدأ

النوع الثاني من (VWD) هو شكل كمي من (VWD) يؤثر على وظيفة البروتين في (VWF). ويتميز النوع 2 نورماندي (2N) بمستويات منخفضة بشكل غير طبيعي من (FVIII:C) بسبب انخفاض تقارب (VWF) من (FVIII). ونتيجة لذلك، فإن قلة (FVIII) لا بد منها، وبالتالي فإن هذه القلة محمية من التدهور/ الإزالة، مما أدى إلى تركيز منخفض في البلازما. تم العثور على الطفرات المسؤولة عن نوع (2N VWD) في المجال (FVIII) الملزم الخاص بـ (VWF). وفي العادة يشابه المرضى ذوي النوع (2N VWD) المرضى الذين يعانون من الهيموفيليا الخفيفة – منخفضة (FVIII:C)، مع المستويات الطبيعية من (VWF:RCo) و(VWF:Ag) – ولكن لديهم نمط مكبوت متنح بالوراثة.

إن مقايسة (FVIII) الملزمة هي طريقة قائمة على (ELISA) لتحديد ما إذا كان (VWF) يلزم (FVIII) بشكل اعتيادي. تستخدم الأجسام المضادة وحيدة النسيلة لالتقاط (VWF)، ويتم استخدام كلوريد الكالسيوم لإزالة (FVIII) الذاتي من (VWF)، وتتم إضافة كمية معروفة من المؤتلف (FVIII) لربط (VWF) ورفع الربط. ثم يقاس (FVIII) الملزم باستخدام مقايسة كروموجينيك لـ (FVIII). تم أدناه وصف طريقة ربط (FVIII) على أساس التقنية المنشورة (نسبيت وآخرون، 1996).

تم نشر البيانات المتحصلة باستخدام مقايسة تجارية وضعت مؤخراً (Asserachrom VWF:FVIIIB, Diagnostica Stago) في صيغة مختصرة (كارون وآخرون، 2009). وتشابه هذه المقايسة تلك الموصوفه أدناه في خطوات التحليل الأولية. وفيها يتم استخدام أوعية مايكروتيتر المغلفة بمضادات الأجسام المضادة لـ (VWF) من الأرانب، والتي تربط (VWF/FVIII) من بلازما المريض المخففة. بعد إزالة (FVIII) الذاتية (من المريض)، يضاف (FVIII) المؤتلف، والذي يرتبط بـ (VWF) الخاص بالمريض تبعاً لطبيعة جزيء (VWF) لدى المريض. ويختلف هذا الاختبار عن الاختبار الموضح أدناه في ما يتعلق بطريقة الكشف عن (FVIII) المرتبط: وفي هذا الاختبار التجاري، يتم استخدام مضادات الفئران المترافقة ضد أجسام (FVIII) المضادة البشرية. وقد ذكرت الدراسات أن المقايسة حساسة بنسبة 100 % وتعتمد خصوصاً على تحليل 37 حالة تم تشخيصها سابقاً من نوع (2N VWD) و13 ناقل طفرات متغايرة (كارون وآخرون، 2009)، مع معامل مقايسة داخلي للتباين بنسبة أقل من 10 % لقياسات النسبة المئوية من (FVIII) الملزم.

الكواشف

- أجسام (MAS 533p) المضادة وحيدة النسيلة لموقع (GPIb) الملزم لـ (VWF) أكسفورد بايوتكنولوجي OBT0085، أكسفورد، المملكة المتحدة).
  يحفظ بدرجة حرارة 4 مئوية، وفق تعليمات الشركة المصنّعة. ويلاحظ أنه يمكن استخدام الأجسام المضادة الأخرى من مصادر مختلفة بنجاح.

- تركيز (FVIII) 2.5 وحدة/ مل (مثل، أدفيت، باكستر فارماكيوتيكل)
يحفظ بدرجة 80- مئوية.

يتم تخفيف التركيز في عازل (HEPES) المصنوع من:
  - 2.763 غ/ ل من حامض HEPES
  - 2.188 غ/ ل من ملح HEPES
  - غ/ ل من كلوريد الصوديوم
  - أضف 1 % من BSA
  - اصنعه بكمية 100 مل، بدرجة حموضة حتى 7.35

- طقم كوتيست (FVIII) كروموجينيك (إنسترومينتال لابراتوري، ليكسينجتون، ماساتشوستس، الولايات المتحدة الأمريكية)
طقم واحد يكفي للوحتين. استعمل طقم التصنيع وجمّد الكواشف المتبقية بدرجة 80-.

- 20 % حامض الخليك

- عينات مراقبة الجودة
وتشمل المراقبة العادية، إذا توفرت،وتُعروف بمراقبة VWD نورماندي.

العوازل

يمكن ترميز هذه العوازل بألوان من أصباغ الطعام، مما يجعل رؤيتها أسهل في لوحة مايكروتيتر. كوّن عوازل جديدة لكل مقايسة.

- عازل سيترات الفوسفات 0.1 م بدرجة حموضة 0.5
لكمية 0.5 لتر:
  - 3.65 غ من حامض الستريك (BDH 10081)
  - 4.74 غ فوسفات الهيدروجين ثنائية الصوديوم اللامائية (BDH 102494C)

- 10× تريس محلول ملحي معزول (TBS): 50 م م تريس، 100 م م كلوريد الصوديوم، درجة الحموضة 8.0
لكمية 0.5 لتر:
  - 30.27 غ تريس (سيغما)
  - 29.22 غ كلوريد الصوديوم (سيغما)
  - يحتاج حوالي 60 مل 1م (HCL) لدرجة الحموضة.

- عازل غسل: (TBS)/ 0.1 % (BSA)
لكمية 1 لتر:
  - 100 مل 10× TBS
  - 900 مل H_2O
  - 1 غرام ألبومين بقري (سيغما)

- مخفف بلازما: TBS/ 3% BSA
لكمية 100 مل:
  - 10 مل 10 × TBS
  - 90 مل H_2O
  - 3 غرام ألبومين بقري (سيغما)
- محلول كلوريد الكالسيوم 0.35
لكمية 50 مل:
  - 17.5 مل 1م كلوريد الكالسيوم
  - 32.5 مل H_2O
- مخفف FVIII
لكمية 100 مل:
  - 100 مل عازل غسل
  - 0.147 غ كلوريد الكالسيوم
  - 0.002 مل توين (سيغما P5927) اغمر الطرف الأصفر في توين واترك قطرة واحدة تسقط في العازل.

الطريقة

يستغرق هذا الاختبار ثلاثة أيام متتالية. تأكد أن نتائج (VWF:Ag) لكل مريض اختبار متوفرة قبل بدء هذا الاختبار.

اليوم 1 (مساءً)

1. خفف جسماً مضاداً أحادي النسيلة (MAS 533p) من (أكسفورد بايوتيكنولوجي) في كمية 1 م من عازل السيترات بدرجة حموضة (0.5) إلى تركيز 2.5 ميكروغرام/ ل (50 مايكرولتر من الجسم المضاد بالضبط في 10 مل من العازل).
2. غلّف لوحة مايكروتيتر (NUNC) باستخدام 100 ميكروليتر من مزيج الأجسام المضادة/ العازل واتركه طوال الليل بدرجة 4 مئوية ومغطى بشريط بارافيلم (parafilm). هناك فقط ما يكفي فقط لتغطية 11 صفاً، لذا أترك الصف 12 غير مغلف.

اليوم 2 (مساءً)

3. اغسل أربع مرات باستخدام (50) (TBS م م تريس، 100 م كلوريد الصوديوم، درجة حموضة 8.0) ويحتوي على 0.1% BSA ، وجفف السائل الزائد.
4. أضف 100 مايكرولتر من تخفيفات البلازما المتسلسلة (~ وحدة واحدة/ دل من (VWF:Ag–) 0.125 وحدة/ دل من (VWF:Ag)) في (TBS)/ 3% من (BSA) وضعه في الحاضنة بدرج 4 مئوية طوال الليل في صندوق رطب. راجع "بروتوكول التخفيف" أدناه، والشكل 1.32 لمخطط اللوحة.

بروتوكول التخفيف

- يتم إنتاج أربعة تخفيفات من كل بلازما اختبار من خلال التخفيف المزدوجة. ابدأ بما لا يقل عن 0.6 مل من التخفيف الأول.
- يجب أن تخفف كل عينة لإنتاج وحدة واحدة/ دل (0.01 وحدة/ مل)، لذا يجب معرفة (VWF:Ag) قبل البدء بهذا الاختبار. على سبيل المثال، إذا كان (Ag:VWF) 0.90 وحدة دولية/ مل، اصنع تخفيف بداية بنسبة 1/90؛ وإذا كان (Ag:VWF) 0.06 وحدة دولية/ مل، اصنع تخفيف البداية 1/6، الخ.
- للحصول على عينات المرضى والمراقبة، خفف وفقاً لمستوى (VWF:Ag) إلى أقرب 0.05 وحدة/ مل (أي (Ag:VWF) = 0.13 تخفيف 1/15، إلى آخره).

.....

اليوم 3 (ابدء فى حوالى الساعة 9:30 صباحاً)

.....

5. اغسل كما مر سابقاً.

.....

6. لإزالة (FVIII) الذاتية، ضعه في الحاضنة مرتين مع 100 مايكرولتر 0.35 م من كلوريد الكالسيوم لمدة ساعة في كل مرة في درجة حرارة الغرفة. تجاهل أول كلوريد الكالسيوم قبل إضافة الكمية الثانية. لا تقم بالغسل بينهما.

.....

7. اغسل كما مر سابقاً.

.....

8. خفف 200 مايكرولتر من (FVIII) إلى 10 مل من مخفف (FVIII) لانتاج 0.05 وحدة/ مل من (FVIII). أضف 100 مايكرولتر لكل وعاء وضعه في الحاضنة لمدة ساعتين بدرجة 37 مئوية.

.....

9. غسل كما مر سابقاً.

.....

10. استخدم طقم كوتيست (SP4FVIII) كروموجينيك على النحو التالي:

أولاً. أخرجه من الغرفة الباردة قبل 30 دقيقة من استخدامه لغرض تدفئته.

ثانياً. كوّن الكواشف وفقاً لتعليمات الطقم:

- العوامل (FX) + (FIXa) في 3 مل من الماء المقطر، لتكوين قنينتي من كل واحد
- (S – 2765) في 12 مل من الماء المقطر

ثالثاً. امزج في قنينة بلاستيكية مناسبة ذات استخدام لمرة واحدة:

- 5 أجزاء من العوامل (4.12) (FX) + (FIXa مل) (طازجاً)
- جزء واحد من الفسفوليبيد (0.83 مل)
- 3 أجزاء 1/10 تخفيف من طقم العازل (250 مايكرولتر من قم العازل و 2.25 مل من الماء)

رابعاً. أضف 75 مايكرولتر من هذا الخليط إلى كل وعاء، ثم ضعه في الحاضنة لمدة خمس دقائق في درجة 37 مئوية.

11. دون تجاهل الخليط، أضف 25 مايكرولتر 0.025 م من كلوريد الكالسيوم من الطقم إلى كل وعاء. ضعه في الحاضنة لمدة خمس دقائق في درجة 37 مئوية.

12. أضف 50 مايكرولتر من ركيزة الكروموجينيك (S–2765) إلى كل وعاء.

13. اتركه بدرجة 73 مئوية حتى يتطور اللون (عادة حوالي 20 دقيقة) وراقب 1.0 وحدة/ دل لديها كثافة بصرية (OD) من 1،0–0،8. اقرأ باستخدام قارئ اللوحة بدرجة 405 نانومتر (المرشح 1).

14. أوقفه باستخدام 50 ميكرولتر من 20 % من حامض الخليك (المصنوع من 2 مل من حامض الخليك المثلج و8 مل من الماء).

15. أعد قراءة الامتصاص لكل عينة باستخدام قارئ اللوحة بدرجة 405 نانومتر (المرشح 1).

16. سجل تركيز المستضد (VWF) مقابل الامتصاص بدرجة 405 نانومتر من (FVIII) المرتبط. يجب إبلاغ النتائج في صيغة رسم بياني وتقرير (انظر "تفسير البيانات"، أدناه).

الشكل 1.32: تخطيط لوحة مايكروتيتر من 96 وعاءً

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
أ	B1	CTL 1.0	PT2 1.0	PT4 1.0	PT6 1.0	PT8 1.0	CTL 1.0	PT2 1.0	PT4 1.0	PT6 1.0	PT8 1.0	
ب	B2	CTL 0.5	PT2 0.5	PT4 0.5	PT6 0.5	PT8 0.5	CTL 0.5	PT2 0.5	PT4 0.5	PT6 0.5	PT8 0.5	
ج	B3	CTL 0.25	PT2 0.25	PT4 0.25	PT6 0.25	PT8 0.25	CTL 0.25	PT2 0.25	PT4 0.25	PT6 0.25	PT8 0.25	
د	B4	CTL 0.125	PT2 0.125	PT4 0.125	PT6 0.125	PT8 0.125	CTL 0.125	PT2 0.125	PT4 0.125	PT6 0.125	PT8 0.125	
هـ	B5	PT1 1.0	PT3 1.0	PT5 1.0	PT7 1.0	N 1.0	PT1 1.0	PT3 1.0	PT5 1.0	PT7 1.0	N 1.0	
و	B6	PT1 0.5	PT3 0.5	PT5 0.5	PT7 0.5	N 0.5	PT1 0.5	PT3 0.5	PT5 0.5	PT7 0.5	N 0.5	
ز	B7	PT1 0.25	PT3 0.25	PT5 0.25	PT7 0.25	N 0.25	PT1 0.25	PT3 0.25	PT5 0.25	PT7 0.25	N 0.25	
ح	B8	PT1 0.125	PT3 0.125	PT5 0.125	PT7 0.125	N 0.125	PT1 0.125	PT3 0.125	PT5 0.125	PT7 0.125	N 0.125	

B = فارغة
CTL = مراقبة البلازما
PT = عينات اختبار
N = معروفة على أنها VWD مراقبة نورماندي (إن وُجدت)

اختبار ثمانية مرضى في لوحة واحدة.

تفسير البيانات

1. احسب متوسط الكثافة البصرية (OD) لكل مريض، والمراقبة، والمراقبة السلبية.

2. ابدأ ورقة عمل جديدة في برنامج إيكسل Excel، وأدخل البيانات التالية:
   - العمود أ – في أ1: (VWF:Ag) وحدة/ دل؛ في أ2: 1.0؛ في أ3: 0.5؛ في أ4: 0.25؛ في أ5: 0.125
   - العمود ب – في ب1: اسم المريض؛ ب5–2: متوسط الكثافات البصرية (ODs) لتخفيفات المريض الأربع
   - العمود ج – في ج1: المراقبة العادية؛ ج5–2: متوسط الكثافات البصرية (ODs) لتخفيفات المراقبة الأربع
   - العمود د – في د1: مراقبة نورماندي؛ د5–2: متوسط الكثافات البصرية (ODs) لتخفيفات (RD) الأربع

3. اختر "Chart wizard XY scatter" مع خطوط ممهدة. اختر جميع الأعمدة الأربعة الكثافات البصرية (ODs)، وتأكد من التسلسل في الأعمدة.

4. على الرسم البياني الناتج، ينبغي تسمية المحور السيني (VWF:Ag) وحدة/ دل. وقم بتسمية المحور الصادي 405 نانومتر من (FVIII) الملزم. ادمج الرسم البياني ككائن في الصحيفة رقم 1.

5. أضف خط الاتجاه الخطي لخطوط المراقبة العادية وخطوط المريض، ثم اختر "عرض التعادل" على الرسم البياني. سيظهر هذا معادلة لكل سطر تشبه ص = 0.....س + 0.....ص. استخدم الجزء 0.... س لحساب نسبة تدرج المريض/ تدرج المراقبة.

المراجع

Caron C, Ternisien C, Wolf M, Fressinaud E, Goudemand J, Veyradier A. An accurate and routinely adapted ELISA for Type 2N von Willebrand disease diagnosis. Abstracts of Congress of International Society for Haemostasis and Thrombosis, Boston, 2009.

Nesbitt IM, Goodeve AC, Guilliatt AM, Makris M, Preston FE, Peake IR. Characterisation of type 2N von Willebrand disease using phenotypic and molecular techniques. *Thromb Haemost* 1996; 75:959–64.

33 تحليل (VWF) مولتيمر

المبدأ

مبدأ تحليل المولتيمر هو الفصل الكهربي لمولتيمرات (VWF) على هلام أجاروس (SDS) اعتماداً على وزنها الجزيئي، يليها تصوير غير شعاعي باستخدام نظام الأجسام المضادة المترافقة للفوسفاتيز القلوية. في طريقة إنايات، يتم إنتاج ثلاثة تركيزات من المواد الهلامية الفاصلة في نطاق بين 1 % و 1.8 % أجاروس (عادة 1.2 %، 1.4 %، 1.8 %) لغرض تحديد النطاق الكامل لمولتيمرات (VWF) (في 1 %)، فضلا عن البنية الثلاثية الفردية لكل مولتيمر (بنسبة 1.8 %).

اشتقت هذه الطريقة من إنايات (1983) وروجيري (1981).

الشكل 1.33: جدول أعمل تحليل مولتيمر (VWF)

اليوم/ الوقت	الإثنين/ الثلاثاء	الثلاثاء/ الأربعاء	الأربعاء/ الخميس	الخميس/ الجمعة
8 ص	هيء العوازل، باستثناء عازل الهلام السائل، قبل يوم الاختبار	راقب صبغة المؤشر. توقف عند وصول الفتيل. قد يحتاج لزيادة التيار		
9 ص		اشطف الهلام بـ H_2O	اشطف الهلام بـ H_2O اشطف الهلام بتوين/ TBS متجهاً للأعلى 8 مرات بنهاية اليوم	اشطف الهلام بـ H_2O اشطف الهلام بتوين/ TBS متجهاً للأعلى 8 مرات قبل 3 مساءً
10 ص	تحضير عازل الهلام السائل؛ أضف أجاروس	جفف الهلام باستخدام مجفف شعر بارد.*		
11 ص 11:30 ص	أنشئ اللوحات؛ ضع عازل الهلام السائل في الميكروويف اتركه يبرد حتى 60 – 65 درجة مئوية قبل الصب			

12 م	اترك الهلام ليركد في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة، ثم بدرجة 4 مئوية لمدة ساعة واحدة			
2 م	شغّل المبرد. خفف مع درجة حموضة العازل الكهربائي. اقطع الفتائل. أذب عينات المرضى والأحواض الصفراء؛ خفف حسب الاقتضاء			
3 م	قص الأوعية. أضف بلازما المريض. شغّل في 30 ميغا أمبير (230 فولت) لمدة 30 دقيقة.	ضع الهلام في 150 مل 5% من الحليب (TBS) متجهاً للأعلى في خلاط مداري		صب آخر غسلة وصب محلول AP على الهلام، متجهاً للأعلى
4 م	عندما تصبح العينة خارج الوعاء، املأ الأوعية بعازل الهلام السائل وخفض التيار الى 5 ميغا أمبير (110 فولت).			بعد تطوّراللون (45 - 60 دقيقة)، أوقف التفاعل بالشطف لعدة مرات بـ H_2O. جفف الهلام باستخدام مجفف شعر بارد.
5 م		اشطف الهلام بـ H_2O. ضع الهلام متجهاً للأسفل في 25 مل من الجسم المضاد الأولي في حوض زجاجي طوال الليل.	اشطف الهلام بـ H_2O. ضع الهلام متجهاً للأسفل في 25 مل من الجسم المضاد الثانوي في حوض زجاجي طوال الليل.	

* اختياري: لتسريع عملية التجفيف، كدس الهلام لمدة 30 إلى 60 دقيقة، ثم جففه تحت هواء ساخن (مثلاً باستخدام مجفف شعر داخلي).

الكواشف

كوّن جميع العوازل جديدة لكل مقايسة. وتُصنع جميع الكواشف من الماء المقطر ويتم تعديل درجة حموضتها.

- عازل الهلام السائل: 0.4 م تريس، 0.1 % (SDS)، درجة الحموضة 8.8
  - 4.54 غ تريس قاعدة (سيغما T1503)
  - غ (SDS) دوديسيل كبريتات الصوديوم (BDH 436696N)
  - 100 مل ماء مقطر (H_2O)

اخلط معاً في قمع مخروطي سعة 100 مل:

- 100 مل عازل الهلام السائل
- 1.6 غ سيكيم (HGT) أجاروس (Seakem 50050) (P) للحصول على الهلام العادي أو
- 1.8 غ أجاروس للتمييز الثلاثي أو
- غ أجاروس لمولتيمرات (HMW) ذات وزن جزيئي عالٍ

استخدم 1.6 % لمولتيمرات (HMW)، و1.8 % للتمييز الثلاثي.

ملاحظة: تُظهر الأجاروس المنخفضة بنسبة 1.2 % مولتيمرات (HMW) فقط؛ وتظهر الأجاروس المرتفعة بنسبة 1.8 % كلاً من الوزن الجزيئي المنخفض (LMW) والمولتيمرات (HMW).

يكفي هذا الحجم لكميتين من الهلام.

- العازل الكهربائي: درجة الحموضة 8.35

مركّز بـ 10 أضعاف

- 15.15 غ قاعدة تريس
- 72.1 غ جليسين
- 5 غ (SDS)
- 500 مل ماء مقطر (H_2O)

العمل

أضف 200 مل من العازل المركز 10 أضعاف إلى 1800 مل ماء مقطر؛ درجة حموضة 8،35

- عازلة العينة: 10 م م تريس، 1 م م (EDTA)، درجة الحموضة 8.0

محلول مخزّن مركّز بـ 10 أضعاف

- 1.21 غ تريس/ قاعدة تريسما (سيغما T1503)
- 0.07 غ (EDTA) ملح ثنائي الصوديوم (BDH 10093)

اصنع ما يصل الى 100 مل بالماء المقطر.

العمل

خفف عازل العينة المركّز بنسبة 10:1 في 100 مل من الماء المقطر للحصول على محلول العمل، ثم أضف:

- 4.8 غ يوريا (BDH 102904W)
- 0.2 غ (SDS) كبريتات دوديسيل الصوديوم (BDH 436696N) درجة الحموضة 8.0

- تريس ماء الملح المعزول المُخزن (TBS): 50 م م تريس، 150 م م كلوريد الصوديوم، درجة الحموضة 7.4
  - 12.1 غ قاعدة تريس
  - 18 غ كلوريد الصوديوم
  - 2 لتر ماء مقطر
- عازل الحجب
  - 20 غ من مسحوق الحليب منزوع الدسم بنسبة 5 %
  - 133 مل من (TBS) المُخزنة
- عازل الغسل
  - 500 مايكرولتر توين 20
  - 11 مل من (TBS) المُخزنة
- الأجسام المضادة الأولية
  الأجسام المضادة متعددة النسائل لـ (VWF) البشري ومن الأرانب (غلاف (VWF:Ag) ab؛ مثلاً داكو A0082)
- الأجسام المضادة الثانوية
  الأجسام المضادة الفوسفاتيز القلوية المترافقة من الخنازير للأرانب (مثلاً داكو D0306)
- طقم الفوسفاتيز القلوية المترافق (بايوراد 6432–170)
- رباط دعم الهلام بالهلام (تطبيقات بايوويتاكر الجزيئي 53750)

الطريقة

اليوم 1 : إعداد الهلام والحيّز الكهربائي

1. ضع الأجاروس وعازل الهلام السائل في الميكروويف حتى يصبحان واضحين، ثم اتركهما ليركدا. أعد تذويبهما عندما تكون مستعداً للصب، اتركهما ليبردا إلى درجة 65 مئوية قبل صبهما (مع وضع رقائق الألمنيوم في الأعلى لتجنب التبخر).
2. صب الهلام على شكل "ساندويتش" يتم إنشاؤها باستخدام لوحين زجاجيين (200 × 120 ملم) مع وضع فاصل على شكل حرف U (15 ملم) في الجزء العلوي من اللوحة على النحو المبين أدناه.
3. اقطع قطعة من الفلم المربوط بالهلام بحجم يستخدم فاصل الهلام كدليل. بلل أحد ألواح الزجاج وضع رباط الهلام أعلاه وجانبه إلى الورقة (الجانب المبلل) إلى الأعلى. استخدم الأسطوانة لإزالة أية فقاعات هواء. وضع الفاصل في الأعلى، ثم ضع لوح الزجاج الثاني أعلى ثم أمسكهما بمشبك (bulldog) حول الجوانب والأسفل. تأكد من أن الجهاز مستوي قبل صب الهلام.
4. بينما يبرد محلول هلام الأجاروس إلى 60–65 درجة مئوية، قم بتدفئة معدات صب الهلام بتمريرها تحت الماء الساخن باستخدام مجفف الشعر

5. صب الأجاروس في حقنة دافئة ورشه في معدات الصب باستخدام قطعة أنبوب قصيرة من إبرة الفراشة.

6. احجز كمية صغيرة من هلام الأجاروس في أنبوب اختبار لملء الأوعية في وقت لاحق.

7. دع الهلام يهدأ في درجة حرارة الغرفة لمدة لا تقل عن 30 دقيقة، ثم لمدة ساعة بدرجة 4 مئوية في صندوق رطب لساعة. احفظه في الصندوق الرطب إذا لم يكن للاستخدام الفوري، ولكن أحكم إغلاق الحواف المفتوحة بشريط بارافيلم لمنع الجفاف (يمكن حفظ الهلام طوال الليل إذا لزم الأمر).

8. قم بإعداد الخزان الكهربائي للتبريد إلى درجة 14 مئوية. وأعد لترين من العازل الكهربائي المخفف بنسبة 10 % (بعد تخفيف درجة الحموضة). ضع لتراً واحداً من العازل في كل جانب من جوانب الخزان.

9. عندما يركد الهلام، استخدم القالب لقص 11 وعاءً في الأعلى. قم بترطيب اللوح الكهربائي بالماء المقطر وضع الهلام في وسط لوح التبريد الأبيض/ والأزرق في الخزان، مع عينات الأوعية إلى الجانب البعيد الموجب (الكاثود).

10. قم بقياس قطعة من ورق الترشيح بطول 10 – 15 سم (WHATMAN 3030690)، اطوها، وكرر العملية مرتين. اثنها بحدة ومزقها (وهذا عادة ما يعطي خطاً أكثر إتقانا من القص) بحيث يكون لديك 3 – 5 طبقات في المجموع لكل جانب. قم بقياس العرض مقابل حجم الهلام واقطع العرض بالضبط. رطّب ورقة الترشيح مع العازل الكهربائي، ثم ضع فتيل كل ورقة ترشيح على كل من نهايات الهلام، اجعلها تتداخل بحوالي 5 ملم.

11. خفف عينات من المرضى والحوض الأصفر كمجموعة مراقبة. اصنع 1/10 تخفيف في عازل عينة العمل للبلازما ذات (VWF:Ag) بحوالي 1.0 وحدة دولية/ مل، ولكن استعمل 1/2 إذا كنت تتوقع نتيجة منخفضة للغاية. لا ينصح باستخدام البلازما غير المخففة. (عادة ما يتم تخفيف صفائح (VWF) إلى 1/2 (.0.

12. اغسل معدات صب الهلام جيدا بماء ساخن بعد الاستخدام.

13. أضف 20 مايكرولتر من العينة المخففة، ثم 1 مايكرولتر من 1 % البروموفينول الأزرق إلى كل وعاء. يتم تفريغ الحوض الأصفر (المراقبة العادية) في الممرات 1 و6 و11.

14. ضع غطاء الخزان الكهربائي في مكانه وشغل مجموعة الطاقة، وتحقق من توصيل السلك الأحمر بنقطة الاتصال الحمراء والسلك الأسود إلى النقطة السوداء. اسمح لهذه العينات بالخروج من الأوعية عن طريق تشغيل التيار بأقصى طاقة لمدة 30 إلى 60 دقيقة. سجل الظروف الكهربائية على ورقة التحليل.

15. أوقف التيار واملأ الأوعية بهلام الأجاروس الاحتياطي.

16. ابدأ عملية الكهربة بتيار مستمر من 5 مل أمبير لحوال 20 ساعة (ما يقارب 80 فولت). إذا كان الجهد عالياً جداً، فستحتاج مقاومة الفتائل إلى تعديل (قانون أوم)، لذا أضف فتيلاً لطرف الكاثود حتى يصبح الجهد مقبولاً.

اليوم 2 : إعداد الهلام للتصوير

17. وفي صباح اليوم التالي، ستنتقل علامة البروموفينول الزرقاء نحو الجانب السالب (الأنود) من الهلام.

18. حين يكون سمك العلامة الزرقاء حوالي 1 سم من نهاية الهلام، سجل مقاييس الحيّز الكهربائي، وأوقفه. أزل الهلام من المعدات.

19. تجاهل أي عازل سابق، واغسل الخزان جيداً بالماء، وامسح الفواصل البرتقالية على طول الاسلاك المعدنية بعناية.

20. ضع الهلام متجهاً للأعلى في حوض بلاستيكي مملوء بالماء المقطر واغسله برفق لمدة ساعة الى ساعتين في خلاط مداري أوهزاز متأرجح. غيّر الماء عدة مرات أثناء مدة الغسل.

21. أزل الهلام بعناية وجفف أية مياه زائدة إلى الأنسجة.

22. إما أن تجفف مسطحة باستخدام مجفف الشعر بحرارة متوسطة مع إبقاء الرؤوس الهلامية في كلا النهايتين، أو تُدعك لمدة ساعة الى ساعتين ما بين ورقة الترشيح والمناشف الورقية على طاولة تسوية زجاجية مع وضع عدة كتب ثقيلة فوقها، يلي ذلك تجفيف بمجفف الشعر وبحرارة متوسطة، كما مر سابقاً. قد يستغرق التجفيف اكثر من ساعة لكل هلام.

23. عندما يجف الهلام تماماً (سيظهر لامعاً وجافاً بشكل مسطح فوق أربطة الهلام)، أزل أربطة الهلام الزائدة، ولكن اترك ما لا يقل عن 5 ملم حول حافة الهلام.

24. ضع الهلام مواجهاً الأعلى في حوض بلاستيكي يحتوي (TBS) + حليب منزوع الدسم بنسبة 5 % (مارفل) وضعه في الحاضنة لما لا يقل عن 90 دقيقة (كلما كان الوقت أطول كلما كان أفضل) وبسرعة بطيئة وهزاز ستيوارت.

25. اشطف الهلام عدة مرات بالماء المقطر.

26. هيئ تخفيفاً بنسبة 1 في 2000 من (غلاف) أضداد (VWF) للأجسام المضادة في (TBS). استخدم 12.5 مايكرولتر من الأجسام المضادة في 25 مل من (TBS). ضع الأجسام المضاد المخففة في طبق من البيركس للأجسام المضادة الأولية.

27. جفف الماء الزائد من الهلام وضعه مواجهاً الأسفل في الأجسام المضادة المخففة. تأكد من عدم وجود فقاعات هواء بين الهلام الأجسام المضادة المخففة.

28. ضع الغطاء على العلبة، وضعه في الحاضنة طوال الليل على الدكة في درجة حرارة الغرفة.

اليوم 3

29. أزل الهلام من محلول الأجسام المضادة الأولي واشطفه لفترة وجيزة في عدة كميات متغيرة من الماء المقطر

30. ضع الهلام مواجهاً الأعلى في حوض بلاستيكي. اغسله على الأقل بثمانية كميات متغيرة من (TBS) 0.05 % توين (100 – 150 مل لكل غسلة) على مدار اليوم، بينما يهتز على الخلاط المداري.

31. هيئ تخفيفاً بنسبة 1 في 2000 من أضداد (VWF) المترافقة الثانوية للأجسام المضادة من الخنازير في (TBS). استخدم 12.5 مايكرولتر من الأجسام المضادة في 25 مل من (TBS). ضع الأجسام المضاد الثانوية في طبق من البيركس للأجسام المضادة الثانوية.

32. اشطف الهلام بالماء المقطر، جفف الماء الزائد من الهلام وضعه مواجهاً الأسفل في الأجسام المضادة الثانوية. تأكد من عدم وجود فقاعات هواء بين الهلام الأجسام المضادة الثانوية.

33. ضع الغطاء على العلبة، وضعه في الحاضنة طوال الليل على الدكة في درجة حرارة الغرفة.

اليوم 4: تصور المولتيمرات

34. أخرج الهلام من محلول الأجسام المضادة الثانوي واشطفها لمدة وجيزة في عدة كميات متغيرة من الماء المقطر.

35. ضع الهلام مواجهاً الأعلى في حوض بلاستيكي. اغسله على الأقل بثمانية كميات متغيرة من (TBS) 0.05 % توين (100 – 150 مل لكل غسلة) على مدار اليوم، بينما يهتز على الخلاط المداري.

36. أثناء آخر غسلة (حوالي الساعة 3 مساءً)، هيئ 20 مل من البلازما الركيزة العاملة من مجموعة عازل تطوير اللون الفوسفاتيزي القلوي 25× (H102). ولكل هلام، خفف 800 ميكروليتر 25× عازل (AP) في 20 مل من الماء. ثم أضف 200 مايكرولتر من المحلول أ و200 مايكرولتر من المحلول ب إلى العازل وامزجه جيداً.

37. أخرج الهلام من آخر غسلة وجفف أي سائل زائد.

38. ضع الهلام مواجهاً الأعلى في طبق بيركس للتطوير واسكب مزيج الركيزة المهيأ فوق كامل الهلام.

39. هزه بلطف على الهزاز حتى يكتمل التفاعل وتنكشف أربطة المولتيمر. يمكن أن يستغرق هذا مدة تصل إلى 45 دقيقة.

40. حين يكتمل التفاعل، تجاهل الركيزة، واغسل الهلام في كميتين متغيرتين من الماء المقطر على الأقل مع الهز لمدة 30 إلى 60 دقيقة لمنع التفاعل من الاستمرار.

41. نشف أي السائل فائض من الهلام وجففه بمجفف الشعر، كما مر سابقاً.

42. يمكن أن يُفحص الهلام ويُخزن إلكترونياً، وتحدد كميته باستخدام قياس الكثافة إذا لزم الأمر.

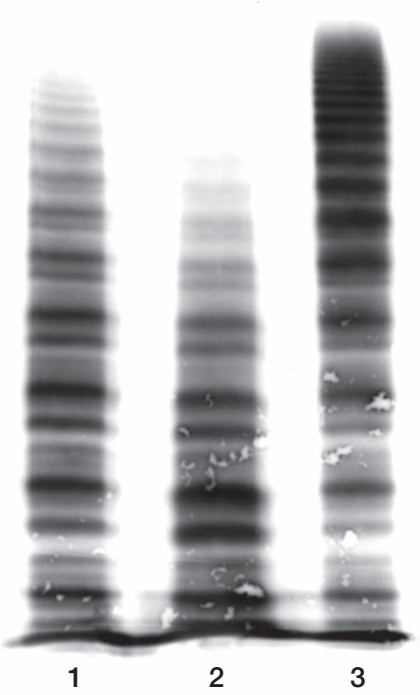
يمكن إبلاغ النتائج المتحصلة، كما في الشكل 2.33 أدناه، وفقاً لنمط المولتيمر المشاهد على الهلام.

الشكل 2.33: تفسير نمط المولتيمر

نمط المولتيمر	التفسير
جميع مولتيمرات الأوزان الجزيئية الموجودة	نمط العادي نوعياً
تشكيل ثلاثي مبالغ فيه لـ (LMW)	نقصان في (HMWM)
إجمالي الاستنزاف ل مولتيمرات (HMW)	زيادة طفيفة في (HMWM)
زيادة في أول رابط لـ (LMW)	نقصان طفيف في (HMWM)
لا توجد مولتيمرات مرئية	لم يتم الكشف عن مولتيمرات

الشكل 3.33: مثال على هلام مولتيمر

ملاحظة: أشكال (VWF) ذات الوزن الجزيئي الأعلى في قمة العمود.



العمود 1 لمريض لديه النوع (2B VWD)

العمود 2 لمريض لديه النوع (2A VWD)

العمود 3 هو لبلازما طبيعية ذات مولتيمرات سليمة جميعها

المراجع

Enayat MS, Hill FG. Analysis of the complexity of the multimeric structure of FVIII related antigen/von Willebrand protein using a modified electrophoretic technique. *J Clin Pathol* 1983; 36:915–9.

Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Classification of variant VWD subtypes by analysis of functional characteristics and multimeric composition of FVIII/ von Willebrand factor. *Ann N Y Acad Sci* 1981; 370:205–9.

34 القياس الكمي لمثبطات العامل (VIII)

المبدأ

تعتبر مثبطات (FVIII) الناتجة عن معالجة الأشخاص الذين يعانون من الهيموفيليا ذات علاج (FVIII) معتمدة على الزمن.

وإذا أضيف (FVIII) إلى بلازما تحتوي على مثبط وخليط محتضن، سيتم تحييد (FVIII) تدريجياً. إذا كانت كمية (FVIII) ومدة الحضانة موحدة، يمكن تعريف قوة المثبط بالوحدات وفقاً لكمية (FVIII) المضافة التي تم تحييدها.

ويمكن إجراء المقايسة باستخدام (FVIII) البشري أو المأخوذة من الخنازير.

قد يُشتبه بوجود المثبط من خلال نصف الحياة المخفضة والمستردة لـ (FVIII).

مقاسية بيثيسدا

إن مصدر (FVIII) هو البلازما الطبيعية المجمعة لعيارات المضاد البشري؛ والخنزيري مخففة التركيز في البلازما ذات النقص في (FVIII) للعيارات المضادة من الخنازير.

وتُعرّف وحدة بيثيسدا على أنها كمية المثبط التي سيتحيد 50 % من وحدة واحدة من (FVIII) المضافة في ساعتين بدرجة حرارة 37 مئوية.

المرضى الذين لا يُتوقع أن يكون لديهم مثبط:

1. أضف أجزاء متساوية (0.2 مل) من بلازما المريض إلى البلازما الطبيعية المجمعة.
2. وللمراقبة، أضف 0.2 مل 0 % (FVIII:C) إلى 0.2 مل من البلازما الطبيعية المجمعة.
3. ضعها في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة ساعتين. ثم قم بإجراء مقايسة FVIII:C.

المرضى الذين يُتوقع أن يكون لديهم مثبط:

1. حضر تخفيفات باستخدام عازل مقايسة (FVIII) من بلازما المريض. فمن الأفضل وضع الكثير من التخفيفات بدلاً من القليل جداً. يمكن دائماً الاحتفاظ بها في الجليد بعد الحضانة لمدة ساعتين لجولة ثانية من المقايسات. إذا كانت المعلومات السابقة في ما يتعلق بعيار المثبط المتوقع متوفرة، فيجب أن تمتد تخفيفات الاختبار على جانبي هذه
2. تضاف كمية قياسية من (FVIII) على شكل البلازما الطبيعية المجمعة لكل تخفيف كل بلازما الاختبار – وسيحتوي هذا عادة نحو 100 وحدة/ دل. وبالتالي، فإن كل مزيج حضانة يحتوي تركيز ابتداء بحوالي 50 وحدة/ دل. ليس المهم التركيز الدقيق، لأن المصدر نفسه أضيف لجميع مخاليط الحضانة.

3. في مقايسة (FVIII) المنفذة بعد حضانة لمدة ساعتين، يتم استخدام مزيج المراقبة من البلازما الطبيعية والبلازما ذات النقص في (FVIII) كمرجع معياري، ويحسب تركيز (FVIII) لمخاليط أخرى مقابل هذا. وتستخدم هذه المادة كمرجع بنسبة 100 % في مقايسة.

من المهم عزل البلازما الطبيعية، إما بإضافة 0.1 م إيميدازول بدرجة حموضة 7.4 في تعديل نيميجن الموصوف مؤخراً، أو باستخدام البلازما الطبيعية المجمعة المعزولة والموضحة في القسم 7. ويحسن هذا من حساسية وخصوصية المقايسة. وبالنسبة لعيارات مضاد–الخنزير، فإن بلازما الخنزير ليست متوفرة بسهولة. لذا، فمن المقبول استخدام تركيز خنزير مخفف إلى وحدة واحدة/ مل في البلازما ذات النقص في (FVIII).

4. وفي نهاية فترة الحضانة، يتم قياس مستوى (FVIII) المتبقي والمثبطات المحسوبة من الرسم البياني لـ (FVIII) المتبقية مقابل وحدات المثبط. (انظر الشكل 1.34 أدناه).

الكواشف / المعدات

- عازل الجليوكسالين (انظر القسم 9)
- محلول اورين الملحي المعزول (انظر القسم 9)
- البلازما الطبيعية المجمعة (انظر القسم 7)
  ملاحظة: يجب أن تكون معزولة لتحسين استقرار (FVIII) أثناء حضانة الساعتين خلال المقايسة.
- التركيز الخنزيري
- البلازما ذات النقص في (FVIII)
- كاشف (APTT)
- حمام الثلج
- أنابيب بلاستيكية بحجم (75 × 12 ملم)

الطريقة

مضاد (FVIII) البشري

1. هيئ تخفيفات مضاعفة من بلازما الاختبار في أنابيب بلاستيكية بكميات 0.2 مل، وذلك باستخدام عازل الجليوكسالين كمخفف. ستختلف التخفيفات اللازمة لكل مريض. وستكون نقطة الانطلاق المقترحة من غير المخففات، 1/2، 1/4، الخ.

   ملاحظة: إذا كان المريض قد أجرى تحليل مثبط سابقاً، فقد يوفر المستوى دليلاً تقريبياً ينبغي استخدام التخفيفات بموجبه. ومن المفيد أيضاً ملاحظة إذا كان قد تلقى أي علاج بـ (FVIII) مؤخراً، إذ قد يؤدي هذا إلى زيادة أو نقصان مستوى المثبط.

2. أفرغ 0.2 مل من البلازما ذات النقص في (FVIII) من الماصة في أنبوب بلاستيكي آخر. سيكون هذا بمثابة المعيار.

3. أضف 0.2 مل من البلازما الطبيعية المجمعة إلى كل من الأنبوب المعياري وتخفيفات بلازما الاختبار. سيكون مستوى (FVIII) في جميع الأنابيب يقارب 50 وحدة/ مل. ويعتبر هذا 100 % في تحليل (FVIII) عند نهاية الحضانة.

4. أغلق، وامزج، وضع جميع الأنابيب في الحاضنة بدرجة 37 مئوية لمدة ساعتين.

5. وعند الساعة الثانية، انقل جميع الأنابيب لحمام ثلجي ما لم يتم تنفيذ تحليل (FVIII) مباشرة.

6. قم بإجراء تحليل (FVIII) على جميع مخاليط الحاضنة باستخدام الطريقة المعتادة لتحليل (FVIII)، ولكن باستخدام إعداد الأنبوب كمعيار بنسبة 100 %. تكون التخفيفات المناسبة للاستخدام في تحاليل (FVIII) 1/5، 1/10، 1/20.

7. اقرأ المتبقي من (FVIII) لكل من مخاليط الاختبار، وذلك باستخدام نسبة المراقبة 100 %.

النتائج/ التفسير

يتم اختيار تخفيف بلازما الاختبار الذي يعطي متبقي (FVIII) أقرب إلى 50 % ولكن ضمن نطاق 30 % – 60 % لغرض حساب المثبط. وبدلا من ذلك، احسب النتيجة من كل تخفيف وخذ المتوسط. لا ينبغي استخدام أي متبقي (FVIII) أقل من 25 % أو أكثر من 75 % لحسابات مستوى المثبط.

يمكن أن يتم تسجيل النسبة المئوية لمتبقي (FVIII) مقابل وحدات المثبط على ورقة (log–log) من تعريف وحدة المثبط (انظر الشكل 34.1).

اقرأ مستوى المثبط الموافق لمتبقي (FVIII) لكل خليط اختبار وصحح التخفيف. على سبيل المثال:

1/4 تخفيف + المجمعة الطبيعية
متبقي (FVIII) = 50%
وحدة المثبط (من الرسم البياني) = 1 وحدة B
اضرب الناتج في عامل التخفيف (1/4) = 4 وحدات B

ملاحظات

- في أغلب الأحيان يتم إجراء تحاليل المثبطات الكمية على بلازما الاختبار من المرضى الذين يعانون من الهيموفيليا الشديدة، لذا فهي تحتوي على القليل أو ما لا يمكن قياسه من العامل (FVIII:C). إذا كانت بلازما الاختبار تحتوي على أكثر من 5 وحدات/ دل من (FVIII)، فيجب أن يؤخذ هذا في الاعتبار عند حساب عيار المثبط.

يمكن القيام بذلك من خلال ثلاث طرق:

- الأول بإضافة المزيد من العوامل إلى خليط المراقبة أكثر من خليط الاختبار لتعويض العامل (FVIII) في خليط الاختبار. على سبيل المثال، إذا احتوت بلازما الاختبار على 20 وحدة/ دل من (FVIII)، يتكون خليط الاختبار من 120 مايكرولتر من البلازما الطبيعية و80 مايكرولتر

0 % (FVIII). (وعندها يحتوي كل من خليط الاختبار والمراقبة على ما يقارب 60 وحدة/ دل من (FVIII) في بداية مرحلة الحضانة). يمكن لهذا النهج أن يُستخدم فقط في حال فحص بلازما المريض غير مخففة، وليس بعد التخفيف، الأمر الذي سيغيّر من تركيزات (FVIII) الأولية

- بدلاً من ذلك، يمكن أخذ مستوى (FVIII) الأولي في بلازما الاختبار بنظر الاعتبار أثناء القيام بالحساب. وفي هذه الحالة، يتم تكوين مخاليط التحليل بالطريقة العادية.
- وهناك خيار آخر هو تسخين بلازما الاختبار بدرجة 58 مئوية لمدة 90 دقيقة قبل إجراء التحليل، والتي ستدمر جميع عوامل التخثر، بما في ذلك العامل (FVIII). وبما أن الأجسام المناعية (الإميونوجوبيولينز) مقاومة للحرارة، فإن عيار المانع لن يتأثر بهذه المعالجة.

- تعتبر البلازما ذات النقص في (FVIII) المستخدمة في تكوين خليط المراقبة مهمة. ويجب أن تحتوي هذه على مستويات طبيعية من (VWF)، حيث ظهر أن عيارات المثبط أقل ما بين 30 % – 50 % إذا لم تحتوي البلازما ناقصة (FVIII) على (VWF) (فيربروجين وآخرون، 2001).

المثال 1: المريض ذو 10 وحدات/ دل (FVIII)

راقب البلازما الطبيعية المجمعة + 0 % (FVIII)

أ. البلازما الطبيعية المجمعة + بلازما الاختبار غير المخففة – (FVIII) الأولي = 120 %
ب. البلازما الطبيعية المجمعة + بلازما الاختبار المخففة 1 في 2 – (FVIII) الأولي = 110 %

بعد ساعتين من الحضانة، يتم إجراء تحاليل العامل.

أ. البلازما الطبيعية المجمعة + بلازما الاختبار غير المخففة – (FVIII) الأولي = 120 % من عامل المراقة المتبقي (FVIII): 120/120 = 100 %؛ نتيجة المثبط: سلبية
ب. البلازما الطبيعية المجمعة + بلازما الاختبار المخففة 1 في 2 – (FVIII) الأولي = 110 % من عامل المراقبة المتبقي (FVIII): 110/110 = 100 %؛ نتيجة المثبط: سلبية

المثال 2: المريض ذو 20 وحدة/ دل (FVIII) (والمثبط موجود)

تم اختبار بلازما المريض غير مخففة

البلازما الطبيعية المجمعة + بلازما الاختبار غير المخففة – (FVIII) الأولي = 120 % من عامل المراقبة

بعد ساعتين الحضانة ، يتم إجراء تحاليل (FVIII).

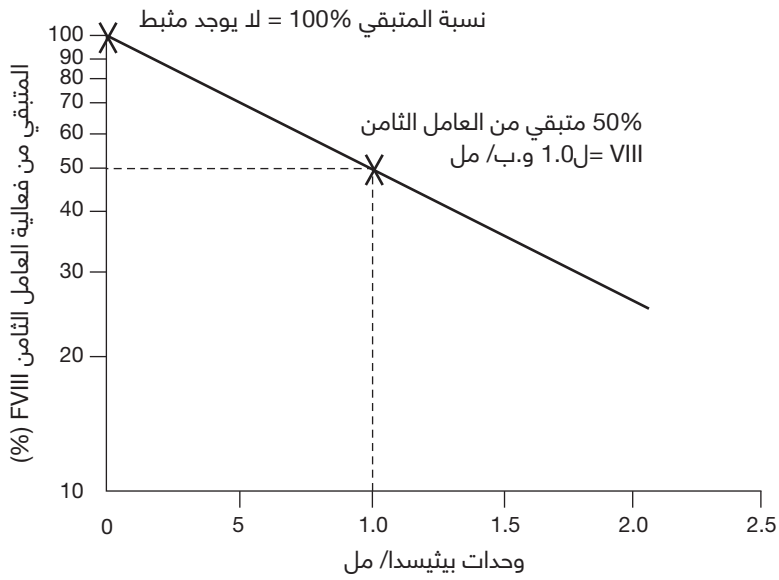
البلازما الطبيعية المجمعة + بلازما الاختبار غير المخففة – (FVIII) = 90 % من عامل المراقة المتبقي (FVIII): 90/120 = 75%

مضاد (FVIII) من الخنزير

إن طريقة مثبطات (FVIII) المأخوذة من الخنزير في جوهرها نفس المثبطات البشرية، إلا في مصدر (FVIII). فينبغي أن يكون أصل هذا مأخوذاً من الخنازير، ولكن حتى الآن لا يتوفر مصدر العامل (FVIII) من بلازما الخنزير بشكل موثوق على نطاق واسع. ولذلك، يتم استخدام التركيز الخنزيري المخفف في البلازما الهيموفيليا (البشرية) إلى تركيز وحدة واحدة/ مل.

ملاحظة: إذا كان (FVIII) المتبقي ما بين 80 % و100 % بالنسبة للعينة المُحتضنة غير مخفف مع تركيز الخنزير، فسيتم تفسيره على عدم وجود المثبط. وعلى الرغم من عدم استخدام (FVIII) في البلازما المشتقة من الخنازير حالياً، فإن تركيز (FVIII) المؤتلف من الخنازير قيد التطوير في وقت كتابة هذا الدليل.

الشكل 1.34: العلاقة بين العامل (FVIII) المتبقي وعيار المثبط



المراجع

Kasper C, Aledort L, Counts R, Edron J, Fratantoni J, Green D, Hampton J, Hilgartner M, Laserson J, Levine P, MacMillan C, Pool J, Shapiro S, Shulman N, Eys J. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 34:869–872.

Verbruggen B, Giles A, Samis J, Verbeek K, Meninsk E, Novakova I. The type of FVIII deficient plasma used influences the performance of the Nijmegen modification of the Bethesda assays for factor VIII inhibitors. *Thromb Hameost* 2001; 86:1435–1439.

Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda Assay for factor VIII:C inhibitors: Improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 1995; 73:247–251. (for the Nijmegen modification)

35 مقايسة مثبط العامل (IX)

المبدأ

تظهر مثبطات العامل (FIX) حركية مختلفة عن مثبطات العامل (FVIII:C)، في تفاعل المستضد/ الجسم المضاد ليصل إلى الاكتمال أسرع. يستند هذا التحليل إلى حضانة بلازما المريض مع أجزاء متساوية من مصدر العامل (FIX) لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 37 مئوية، يليها تحليل (FIX).

ويتم تعريف وحدة واحدة من المثبط عندما تدمر 50 % من فعالية العامل (FIX) على مدى 10 دقائق بدرجة حرارة 37 مئوية.

الكواشف

- بالنسبة لتحليل (FIX) (انظر القسم 23).
- البلازما الطبيعية المجمعة كمصدر للعامل (FIX) (نفس البلازما المجمعة لتحليل مثبط (FVIII)).

الطريقة

إذا كان هناك اشتباه في وجود المثبط، استخدم تخفيفات مناسبة من بلازما المريض. وبخلاف ذلك، ينبغي استخدام البلازما غير المخففة لمراقبة المثبط.

1. باستخدام أنابيب بلاستيكية بحجم 75 × 12 ملم:
   - الاختبار: أضف 0.2 مل من بلازما المريض (أو التخفيف) إلى 0.2 مل من البلازما الطبيعية المجمعة.
   - المراقبة: أضف 0.2 مل 0 % من العامل (F:IX) إلى 0.2 مل من البلازما الطبيعية المجمعة.
2. المراقبة: بعد 10 دقائق، قم بإجراء تحليل (F:IX) باستخدام مزيج المراقبة كمرجع (كما في تحليل مثبط (F:VIII)).

الحساب

اعمل على النتيجة كنسبة مئوية متبقية عن المراقبة. تعمل وحدات المثبط على النحو نفسه لمثبط العامل (FVIII:C) في تقنية البيثيسدا الموضحة في القسم 34.

36 مقايسة فعالية العامل (XIII)

المبدأ

يتم نشر الفيبرينوجين ليغطي سطح لوحة المايكروتيتر. يتم منع ملزمات غير محددة بواسطة عامل حجب خاص. ويُنشّط العامل (FXIII) في عينة الثرومبين وأيونات الكالسيوم. في الخطوة التأسيسية، يُدخل العامل (FXIIIa) في بلازما الاختبار الركيزة (5- بايوتينااميدوبينتيلين) (BAPA) إلى (FXIII) في ركيزة الفيبرينوجين المغلفة على اللوحة في وجود الكالسيوم. وتتناسب كمية (BAPA) المُدخلة مع فعالية (FXIII) لعينة الاختبار. وفي الخطوة التالية، يتقيّد (Strept – AP) المتقارن (streptavidine–alkaline phosphatase) بالكمية المدخلة من (BAPA). ويحول الفوسفاتاز القلوي تحويل الركيزة الاصطناعية (p–nitro phenyl phosphate) (pNPP) إلى فوسفات وبي–نيتروفينول، والتي يمكن قياسها عند 405 نانومتر.

تتوفر الكواشف للطريقة الموضحة أدناه تجارياً في شكل طقم (مقايسة إدخال العامل Pefakit FXIII، بينتافارم، سويسرا). علماً بأن مقايسات الفاعلية الأخرى متوفرة من شركات مُصنّعة أخرى، منها طقم بيريكروم (دايد بيهرينج، ماربورج، ألمانيا)، والتي توظف مبادئ تحليل مختلفة.

الكواشف

ويشمل الطقم التجاري جميع الكواشف اللازمة.

الطريقة

اليوم 1

1. اترك مكونات الطقم لتبلغ درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة.
2. استعد كاشف التغليف (R2) في الماء المقطر، وفقا للكمية الموصى بها من قبل الشركة المصنعة.
3. أضف 100 مايكرولتر من كاشف التغليف لكل وعاء من الأوعية الفارغة في أشرطة لوحة المايكروتيتر.
4. جمد أي كاشف تغليف فائض للاستخدام لاحقاً. ستبقى مستقرة لمدة ستة أشهر بدرجة 20– مئوية.
5. أحكم إغلاق الأشرطة باستخدام الشريط البلاستيكية المزوّد وضعها في الحاضنة طوال الليل (14 إلى 16 ساعة) بدرجة حرارة ما بين 20 – 25 مئوية.

اليوم 2

6. خفف 20 مقداراً من (TBS R1) المركز (تريس الملحي المعزول) 50 مل في 950 مل من الماء المقطر أو كمية أقل، إذا لزم الأمر.

7. خف 3 مل من كاشف الحجب (R3) مع 27 مل من (TBS R1) المخفف. قم بتجميد (R3) الفائض.

8. تجاهل كاشف التغطية من لوحة المايكروتيتر، اقلب الشريط، ثم انقر على الأنسجة لإزالة البقايا

9. أضف 300 مايكرولتر من كاشف الحجب المخفف لكل وعاء.

10. ضعه في الحاضنة لمدة ساعة – ساعة ونصف بدرجة 37 مئوية.

11. استعد المعيار (R10) في 0.5 مل من الماء المقطر والمراقبات الثلاث (R11، R12، و R13) في 0.2 مل ماء مقطر.

12. أذب أي بلازما اختبار مجمدة بدرجة 37 مئوية لمدة خمس دقائق قبل التحليل.

13. هيئ حاوية ببضع مئات المللترات من مزيج الجليد/ الماء في حمام جليدي.

14. اصنع تخفيفات لجميع بلازما اختبار والمراقبة، 10 مايكرولتر من البلازما، 1 مل من عازل (TBS R1) المخفف (تخفيف بنسبة 1:101). ضع المزيج في دوامة المزج.

15. اجعل تخفيفات المعيار على النحو التالي:
    - معيار 1: 30 مايكرولتر (R10) + 970 مايكرولتر (TBS R1)
    - معيار 2: 20 مايكرولتر (R10) + 980 مايكرولتر (TBS R1)
    - معيار 3: 75 مايكرولتر (R10) + 25 مايكرولتر (TBS R1)
    - معيار 4: 25 مايكرولتر (R10) + 75 مايكرولتر (TBS R1)
    - معيار 5: 10 مايكرولتر (R10) + 90 مايكرولتر (TBS R1)

    ملاحظة: التخفيفات 1 و2 جاهزة للاستخدام. خفف 10 مايكرولتر من تخفيفات المعايير 3 – 5 أكثر في 1 مل من (TBS R1).

16. اغسل اللوحة ثلاث مرات باستخدام 300 مايكرولتر/ عبوة من (TBS R1). ثم اقلبه وانقر على الأنسجة لإزالة السائل الزائد.

17. استعد الجزء A من كاشف التفعيل (R4) والجزء B (R5) في 5 مل من الماء المقطر لكل منهما. ضعهما على ثلج مذاب/ حمام ماء وثلج لمدة لا تتجاوز 30 دقيقة.

18. أضف 25 مايكرولتر من كل من بلازما المعيار، التحكم، أو اختبار إلى الأوعية المناسبة. تشمل العبوات الخالية لـ (TBS R1).

19. امزج جزء كواشف التفعيل A وB (R4 وR5) لتشكيل كاشف الدمج النهائي.

20. أضف 75 مايكرولتر من كاشف الدمج النهائي إلى كل عبوة، بما فيها العبوات الخالية.

21. ضعها في الحاضنة لمدة 30 دقيقة بدرجة 37 مئوية.

22. أضف 200 مايكرولتر/ عبوة من محلول إيقاف الدمج (R6). امزج بلطف لمدة 10 دقائق على هزاز الألواح.

23. استعد كاشف التحديد (R7) بإضافة 12 مل من الماء المقطر. قم تجميد (R7) المخفف غير المستخدم.

24. اغسل اللوحة أربع مرات باستخدام 300 مايكرولتر/ عبوة من (TBS). انقر لإزالة السائل الزائد.

25. أضف 200 مايكرولتر/ عبوة من كاشف التحديد (R7). ضعه في الحاضنة لمدة 15 دقيقة بدرجة 37 مئوية.

26. اغسل اللوحة أربع مرات باستخدام 300 مايكرولتر/ عبوة من (TBS). انقر لإزالة السائل الزائد.

27. كوّن محلول الركيزة مباشرة قبل الاستعمال:
- للحصول على 96 عبوة (لوحة كاملة)، أضف 9 أقراص (R8b) إلى 22.5 مل من عازل الديثانولامين (R8a)
- للحصول على 64 عبوة (8 أشرطة)، أضف 6 أقراص إلى 15 مل من الديثانولامين
- للحصول على 32 عبوة (4 أشرطة)، أضف 3 أقراص إلى 7.5 مل من عازل الديثانولامين
- للحصول على 24 عبوة (3 أشرطة)، أضف قرصين إلى 5 مل من عازل الديثانولامين

28. أضف 180 مايكرولتر/ عبوة من محلول الركيزة. ضعه في الحاضنة لمدة 11 دقيقة بدرجة 37 مئوية.

29. أضف 50 مايكرولتر/ عبوة من محلول الإيقاف (4 م هيدروكسيد الصوديوم – R9).

30. اقرأ الكثافة البصرية خلال 15 دقيقة عند 405 نانومتر في قارئ ألواح مايكروتيتر.

ملاحظة : يمكن تخزين عدة أطقم من الكواشف مجمدة لاستخدامها لاحقاً، كما هو موضح أعلاه. ومع ذلك، فلا ينبغي تجميد أجزاء كاشف التفعيل للركيزة A وB، المعايير والمراقبات. ويمكن شراء أطقم الكواشف الجزئية التي تحتوي على هذه المواد الأخيرة للاستخدام مع أي كواشف مستخدمة جزئياً التي تم تجميدها. يقلل هذا من تكلفة اختبار إذا يتم تحليل عينات اختبار في دفعات صغيرة.

حساب النتائج

يتم تجهيز تخفيفات المعيار وقيم المراقبة مع كل طقم.

ارسم منحنى المعايرة بتخطيط التركيز مقابل الكثافة البصرية للتخفيفات المعيارية بعد طرح الكثافة البصرية من الفراغ، باستخدام برامج تداول بيانات أو أوراق رسم بياني مناسبة. استخدام مقياس خطي–خطي. اطرح الكثافة البصرية الفارغة من الكثافات البصرية لتخفيفات عينة الاختبار/ المراقبة، وحوّل الكثافات البصرية إلى فعالية العامل (FXIII)، وذلك باستخدام منحنى المعايرة.

37 مضاد تخثر الذئبة والأجسام المضادة للفسفوليبيد

المقدمة

من المهم للمختبرات فحص المرضى للتحقق من اضطرابات النزيف المحتملة ليكونوا قادرين على تحديد وجود الاجسام المضادة التي تطيل الفحوصات المختبرية مثل (APTT).

إحدى المجموعات من الأجسام المضادة التي يمكن أن تسبب إطالة مثيرة لـ APTT هي مجموعة الهيتيروجينوس (heterogenous) غير المتجانسة وتسمى مجتمعة بالأجسام المضادة لأضداد الفسفوليبيد (APA)، التي يشار إليها أحياناً في المنشورات بمضادات تخثر الذئبة (LAC). فمن الواضح الآن أن ما يسمى بالأجسام المضادة للفسفوليبيد (APA) من عائلة الأجسام المضادة غير متجانسة (هيتيروجينوس) والتي تتفاعل مع محددات المستضدات في البروتينات التي هي في حد ذاتها مركبة بالفسفوليبيدات سالبة الشحنة. تتطلب الكثير من هذه الأجسام المضادة بيتا2--جليكوبروتين 1، وهو بروتين يرتبط بدهون الفوسفوليبيد. والأخرى قد تكون موجهة ضد البروثرومبين.

ومن المهم الملاحظة أن هذه الأجسام المضادة قد تتداخل مع تفاعلات التخثر في المختبر، وإطالة الاختبارات المعتمدة على الفسفوليبيد مثل (APTT) وأحياناً (PT)، ولكنها لا ترتبط بالنزيف إلا في حالات نادرة قليلة حيث يوجد نقص كبير في البروثرومبين المكتسب. ومن المفارقات، تربط هذه لأجسام المضادة بشكل واضح هذه الأضداد مع الخثار الوريدي والشرياني من خلال آليات غير مفهومة جيداً.

في المراكز التي تحاول تشخيص اضطرابات النزف، فمن الضروري أن يكونوا قادرين على الكشف عن هذه الأجسام المضادة باستخدام اختبارات محددة للتحقيق من المرضى الذين يعانون من (APTTs) مطولة. وقد نشرت عدة وثائق توجيهية، ومراجعات للنتائج باستخدام تقنيات مختلفة لاستعراض الكشف المختبري عن مرض مضادات تخثر الذئبة (LAC)، بما فيها تلك الواردة في المراجع في نهاية هذا القسم.

من المهم إدراك أن تقنيات (APTT) المختلفة في كثير من الأحيان ليست حساسة للكشف عن وجود مثل هذه الأجسام المضادة، والطبيعة غير المتجانسة للمجموعة التي أدت إلى التوصيات التي يمكن أن تتطلب الكثير من الاختبار لتأكيد وجود نوع من مضادات تخثر الذئبة.

معايير وجود مضادات تخثر الذئبة كما يلي:

1. اختبار الإطالة للتخثر الذي يعتمد على الفسفوليبيد.
2. أدلة على وجود المثبط تظهرها دراسات الخلط.
3. تأكيد طبيعة المثبط المعتمد على الفسفوليبيد.
4. قلة وجود الثبيط لأحد عوامل التخثر (مثل FVIII:C، FIX:C، أو FXI).

تحضير العينة

من المهم ضمان أن يتم الاحتفاظ بعدد من الصفائح المتبقية من بلازما اختبار إلى الحد الأدنى، خاصة إذا كانت البلازما مجمدة ومذابة قبل التحليل. إحدى الطرق لإزالة أقصى عدد من الصفائح الدموية هي تصفية البلازما بالطرد المركزي (كما تم إعدادها لاختبارات التجلط الأخرى) من خلال مرشح 0.22 مايكرو. وبدلاً

من ذلك، يمكن طرد البلازما مرتين، كما هو موضح في القسم 4. الهدف هو تقليل عدد صفائح إلى أقل من $10^9 \times 10$/ لترٍ في البلازما الخاضعة للتحليل. وبما أن الترشيح قد يؤثر على مقايسات التخثر الأخرى، وربما يكون مكلفاً، فإن الخيار المفضل هو إزالة البلازما قليلة الصفائح من الخلايا بعد الطرد المركزي الأول (الحد الأدنى 1700 غ لمدة 10 دقائق على أقل)، ثم تطرد مركزياً في حاوية ثانوية للبلازما للمرة الثانية تحت الظروف نفسها. وبعد الطرد الثاني، تتم إزالة البلازما بعناية، تاركة الطبقة السفلى دون إثارة، ولأن هذه ستحتوي على غالبية الصفائح الإضافية القليلة التي لم تتم إزالتها بالطرد المركزي الأول. وعادة ما تحتوي البلازما المحضرة بواسطة الطرد المركزي المزدوج بهذه الطريقة تعداد صفائح متبقية أقل بكثير من $10^9 \times 10$/ لتر، وهي مناسبة للتجميد العميق قبل التحليل لاختبار مضاد تخثر الذئبة. وتنطبق هذه التعليقات على إعداد بلازما الرقابة فضلاً عن بلازما الاختبار.

دراسات الخلط

يبين القسم 14 تفاصيل دراسات الخلط المستخدمة للإشارة إلى احتمال وجود المثبط.

اختبارات محددة لكشف (LAC) و (APA)

هناك عدد متزايد من اختبارات محددة لوجود مضادات تخثر الذئبة تشمل تخفيف راسيل لوقت سم الأفعى (DRVVT)، ووقت تخثر الكاولين (KCT)، الذي يسمى أيضاً اختبار إكسنر. وقد استخدمت اختبارات محددة أخرى مستندة إلى سم الأفعى، مثل وقت التيكستارين أو وقت سم أفعى التايبان، وكذلك وقت الثرومبوبلاستين المخفف. وترد تفاصيل هذه التجارب في المراجع المذكورة أدناه.

حتى عندما يتم استخدام اختبارات محددة نسبياً مثل (DRVVT) وغيره، فمن المهم تأكيد الطبيعة المعتمدة على الفسفوليبيد للمثبط المستخدم للإختبارات التأكيدية.

وترد أدناه طريقة لـ (DRVVT)، الذي تكون نتائجه الشاذة أكثر تحديدا من (APTT) لوجود الأجسام المضادة لمستضدات الفسفوليبيد.

وتوصي تحديثات توجيهات (ISTH) المنشورة مؤخراً (بينجو وآخرون، 2009) بأن الاختبارين المعتمدين على الفسفوليبيد والتي يجب استخدامها هي (DRVVT) و(APTT)، وهما حيث يحدث الخلل، ينبغي تكرار الاختبار في وجود فائض من الفسفوليبيد. إنها تشير إلى أن استخدام الصفائح المنجرفة كمصدر للفسفوليبيد الزائد في هذه الطريقة يمكن أن يكون مشكلة نظراً لعدم وجود التوحيد وإمكانية التباين من دفعة إلى دفعة بين الإعدادات. نحن ندرج هنا طريقة لتحضير الصفائح الدموية المنجرفة للمراكز التي يمكن أن تستمر في استخدام هذا النهج. لا تنصح وثيقة (ISTH) باستخدام (KCT) أو وقت الثرومبوبلاستين المخفف، أو عدد من المقايسات الأقل تميزاً والقائمة على سم الأفعى.

المراجع

Brandt JT, Triplett DA, Alung B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Anti-phospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 74:1184–1190.

Lupus Anticoagulant Working Party. Guidelines on testing for the lupus anticoagulant. *J Clin Pathol* 1991; 44:885–889.

Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, De Groot PG. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *Thromb Haemost* 2009; 7:1737–40.

38 تخفيف راسيل لوقت سم الأفعى (DRVVT)

المبدأ

يحتوي سم أفعى راسيل (RVV) على الانزيم الذي يُفعل العامل (FX) مباشرة، والذي يقوم عندها بتفعيل البروثرومبين في وجود الفسفوليبيد، أيونات الكالسيوم، والعامل (FV). ويجعل تخفيف السم والفسفوليبيد الاختبار حساس خاصة لوجود (APA)/(LAC). وهكذا يمكن أن يكون الـ (DRVVT) المطول ناجم عن مثبطات فوسفوليبيدية، ولكن يمكن أن يكون سببه أيضاً نقص أو خلل في العوامل (II، V، X) أو الفيبرينوجين. إذا حدثت الإطالة مقارنة بمجموعة عادية محددة محلياً، فيتم تكرار (DRVVT) باستخدام صفائح مكسرة منجرفة مجمدة/ ذائبة لاستبدال دهون الفسفوليبيد. ويشير تصحيح النتيجة غير الطبيعية، عندما تحل الصفائح محل الفسفوليبيد، إلى وجود الأجسام المضادة لمستضدات الفسفوليبيد.

الكواشف

- إيميدازول (عازل الجليوكسالين) – 0.05 م بدرجة حموضة 7.3
  - 3.4 غ إيميدازول
  - 5.85 غ كلوريد الصوديوم

1. يُذاب في 800 مل من الماء المقطر.
2. تُضبط درجة الحموضة إلى 7.3 باستخدام 1 م من (HCL)
3. يُحضّر ما يصل إلى لتر واحد من الماء المقطر.

- سم أفعى راسيل (دایاجنوسيز رييجنتس، شارع شينور رود، ثايم، المملكة المتحدة)
  Russell's viper venom (Diagnostic Reagents, Chinnor Road, Thame, U·K.)

1. أضف 2 مل من الماء المقطر إلى 0.2 ملغ من السم لاعطاء 0.1 ملغ/ مل.
2. جمده بدرجة 35– مئوية أو أقل في كميات من 20 مايكرولتر.
3. للاستخدام، أذبه وخففه في حوالي 1 في 500 في عازل إيميدازول (10 مايكرولتر في 5 مل) لإعطاء تخفيف RVV (DRVV).

- الفسفوليبيد (PL)؛ (استعاضة الصفائح لدایاجين بيل وألتون، دایاجنوسيز رييجنتس ، شارع شينور رود، ثايم، المملكة المتحدة)
  Phospholipid (PL; Diagen Bell and Alton Platelet substitute, Diagnostic Reagents, Chinnor Road, Thame, U·K.)
  اعد اذابة المادة بالماء المقطر وفقاً لتعليمات الشركة المصنّعة.

- 25 م م محلول كلوريد الكالسيوم

- الصفائح المغسولة المجمدة/ المنفصلة الذائبة

تغسل الصفائح الدموية البشرية الطبيعية وتفصل بالتجميد/ الإذابة لتعريض الفسفوليبيد المحفز للتخثر. تم إدراج الطريقة الكاملة في نهاية هذا القسم (انظر "إعداد الصفائح المغسولة لـ (DRVVT)").

- البلازما الطبيعية المجمعة

يجب أن يتم إعداد هذه بعناية لضمان وجود العدد الأدنى من الصفائح الدموية المتبقية، وكما هو موضح في تحضير العينة أعلاه. قد يكون من الملائم استخدام البلازما الطبيعية المجمعة والمذكورة في القسم 7، شريطة أن يتم طرد البلازما المجمعة مرتين قبل التجميد العميق.

الطريقة

1. أضف 0.1 مل من الفسفوليبيد و0.1 مل من البلازما الطبيعية المجمعة إلى أنبوب الاختبار الزجاجي بدرجة 37 مئوية.

2. سخنها حتى درجة 37 مئوية لمدة دقيقة – دقيقين.

3. أضف 0.1 مل من (RVV) المخفف (RVV بدرجة حرارة الغرفة). امزجه واتركه لمدة 30 ثانية بالضبط بدرجة 37 مئوية.

4. أضف 0.1 مل من 25 م م من كلوريد الكالسيوم مسبق التسخين. امزج وابدأ ساعة التوقيت.

5. سجل وقت تشكّل الجلطة. قم بجميع الاختبارات مكررة.

يجب أن تعطي البلازما الطبيعية المجمعة وقت التخثر ما بين 30 – 35 ثانية. إذا كان الوقت أقل من 30 ثانية، قم بمزيد من التخفيف لمحلول (RVV) بإضافة المزيد من عازل الإيميدازول. إذا كان أكثر من 35 ثانية أضف المزيد من محلول (RVV) المخزّن. كرر الاختبار على البلازما الطبيعية المجمعة حتى يتم الحصول على وقت 30 – 35 ثانية.

6. حضر تخفيف 1/8 من (PL) في محلول ملحي؛ على سبيل المثال، بإضافة 0.1 مل من (PL) إلى 0.7 مل من الماء الملحي.

7. كرر الخطوات من 1 إلى 5 باستعاضة الصفائح الدموية 1/8 بديلاً عن (PL) المنتظم.

إذا كان وقت التخثر (30 – 35 ثانية سابقاً) قد طال حتى 35 – 40 ثانية، فيدل هذا على أن تركيز (PL) مخفف بما فيه الكفاية ليجعل من الاختبار حساساً للأجسام المضادة للفسفوليبيد.

إذا تجاوز وقت التخثر 40 ثانية، كرر الخطوات 1 – 5 باستخدام (PL) المخفف 1 في 4. إذا بقي وقت التخثر 30 – 35 ثانية، كرر الخطوات 1 – 5 باستخدام (PL) المخفف 1 في 16. إذا كان الوقت 35 – 40 ثانية، تابع إلى الخطوة التالية.

8. باستخدام محلول (RVV) هذا (مع الأخذ بالاعتبار وقت 30 – 35 ثانية مع (PL) المنتظم والبلازما الطبيعية المجمعة) وتخفيف الفسفوليبيد المرتبط مع الوقت من 35 – 40 ثانية، كرر الخطوات 1 – 5 باستعاضة بلازما المريض بدلاً من الطبيعية المجمعة.

9. احسب نسبة وقت DRVV (DRVVT) لبلازما المريض مقابل (DRVVT) للبلازما الطبيعية المجمعة لإعطاء نسبة (DRVVT).

10. تم الآن تكرار الخطوات من 1 – 5 باستخدام البلازما الطبيعية المجمعة، ومرة أخرى باستخدام بلازما الاختبار، ولكن مع استخدام الصفائح المغسولة والمفصولة بالتجميد/ الإذابة بدلاً عن (PL). وهذا هو إجراء معادلة الصفائح (PNP). في الخطوة 2، تم وضع الخليط في الحاضنة لمدة 10 دقائق. تم احتساب نسبة بلازما الاختبار إلى نسبة البلازما الطبيعية المجمعة لـ (PNP).

التفسير

يجب وضع القيمة الطبيعية لنسبة (DRVVT) محلياً باستخدام البلازما من أشخاص طبيعيين، وكما موضح في القسم 8. والنطاق الطبيعي هو (المتوسط ± 2 SD) لـ (DRVVT) عندما تكون قيمة (PL) عادة 0.90 – 1.10. وتشير نسبة (DRVVT) المتزايدة إما لنقص في العوامل (II، V، X أو الفيبرينوجين)، أو أنها تشير إلى احتمال وجود الأجسام المضادة لمستضد الفسفوليبيد.

إن نسبة (DRVVT) المطوّلة بالفسفوليبيد والتي تقلل أو تصحح في نسبة (PNP) توحي بوجود الأجسام المضادة لمستضد الفسفوليبيد (Antiphospholipid).

لاحظ أن نقص عوامل التخثر المذكورة أعلاه يترافق مع النسب المتزايدة في كل من (DRVVT) مع الفسفوليبيد وفي (PNP).

يمكن أن يؤدي وجود الهيبارين في العينة إلى نتائج مماثلة لتلك التي تظهر عند وجود الأجسام المضادة لمستضد الفسفوليبيد.

التصويبات في (DRVVT) في اختبار (PNP)

إن التصويبات أو التقليل في نسبة (DRVVT) المتزايد الى داخل النطاق الطبيعي هي دليل قوي على وجود (LAC).

وفي كثير من الأحيان، لا يتم تصحيح نسبة (PNP) إلى داخل النطاق الطبيعي. ولا تُعرف درجة التصحيح المطلوبة للإشارة إلى احتمال وجود (LAC) على وجه اليقين. وأحد المناهج هو حساب نسبة التصحيح على النحو التالي:

$$100 \times \frac{\text{نسبة (DRVVT) مع (PL)} - \text{نسبة (PNP)}}{\text{نسبة (DRVVT) مع (PL)}}$$

وتعتبر النتيجة فوق النطاق الطبيعي التي تُصحح بأكثر من 10 % في (PNP) دالة على وجود (LAC).

1.38 إعداد الصفائح المغسولة لـ (DRVVT)

الكواشف

عازل تايرود Tyrode's buffer، درجة الحموضة 6.5

- 8.0 غ (NaCl)
- 0.2 غ (KCl)
- 0.065 غ ($NaH_2PO_4 2H_2O$)
- 0.415 غ ($MgCl_2\ 6H_2O$)
- 1.0 غ ($NaHCO_3$)

يُذاب في 900 مل من الماء المقطر وتُضبط درجة الحموضة إلى 6.5. اصنع ما يصل إلى لتر واحد باستخدام الماء المقطر.

الطريقة

1. حضّر البلازما الغنية بالصفائح (PRP) من الدم الستراتي المأخوذ حديثاً بواسطة الطرد المركزي في 170 غ (1200 دورة في الدقيقة) لمدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة.

   أو استخدم تركيزات الصفائح كما في علاج المرضى.

2. خفف (PRP) 1 في 2 باستخدام عازل تايرود.

3. ضع صفائح التخفيف في أنابيب طرد بلاستيكية مخروطية القاع، وابدأ الطرد المركزي لمدة 10 دقائق في 850 غ بدرجة حرارة الغرفة.

4. تخلص من الطبقة العليا باستخدام ماصة باستير البلاستيكية وأعد خلط طبقة الصفائح في عازل تايرود. (إضافة العازل بالكمية نفسها من الحجم الأصلي لـ (PRP).). ضعه في جهاز الطرد المركزي في 850 غرام، كما مر سابقاً. قم بتكرار هذه العملية مرتين.

5. تخلص من الطبقة العليا وأعد خلط طبقة في عازل تايرود. باستخدام كمية العازل نفسها بنسبة 25% من الحجم الأصلي لـ (PRP).

6. قبل الاستخدام، اذب الصفائح المحفوظة. نستطيع تجميدها (على درجة 20−) وتذويبها لمرتين فقط.

39 اختبار وظائف الصفائح

تساهم الصفائح الدموية في الإرقاء بطريقتين رئيسيتين:

- تلتصق بالألياف الشعيرية تحت البطانة وألياف الكولاجين في جدران الأوعية الدموية، وبعد ذلك تُغير الشكل، تخضع لتفاعلات إفراز محددة، ومن ثم تُجمع لتشكيل مكونات المرقئ الأساسية.
- وكنتيجة لهذه الأحداث، وخصوصاً أثناء فترة الإفراز والتجميع، يتم توليد أنشطة محفز التخثر، والتي توظف بشكل رئيسي فسفوليبيدات غشاء الصفائح حتى يبدأ تخثر الدم في المناطق التي يحدث فيها تكدس الصفائح.

قد تؤدي عيوب الصفائح الكمية أو النوعية إلى الاتجاه لإحداث نزيف شديد، ويرجع ذلك أساساً إلى عدم تشكيل سد من الصفائح الدموية، ولكن أيضاً إلى حد أقل في التفعيل شبه الأمثل لتخثر الدم.

إن خلل وظيفة الصفائح، أو نقصها قد يظهر سريرياً مع مجموعة متنوعة من الأعراض تشير بقوة الى فشل عملية وقف نزف الدم الأساسي (مثل الكدمات أو الرضوض، الرعاف، النزف المعوي، أو غزارة الطمث). عادة ما تعمل عيوب الصفائح الدموية على ارتفا ع اضطرابات النزف الخفيف إلى حد ما. قد يتم إحضار المرضى فقط عند النزيف بعد الجراحة أو قلع الأسنان.

وتشمل عيوب الصفائح أمراض تخزين التجمعات، وهن الصفائح جلانزمان (Glanzmann's thrombasthenia)، ومتلازمة برنار سولييه (Bernard–Soulier syndrome).

وفي التحقق عن المرضى الذين يشتبه في وجود اضطرابات النزف لديهم، فمن المهم الحصول على تاريخ سريري مفصل. ومن الاختبارات الأولية الهامة: فيلم فحص الدم، تحديد عدد صفائح الدم، وتحديد وقت نزيف الجلد (موضح في القسم 11). إذا كانت هذه الاختبارات ضمن الحدود الطبيعية، فإن خلل الصفائح الدموية المهم سريرياً كسبب للنزيف تحت الفحص غير مرجح.

وتاريخ الأدوية مهم أيضاً. إذ يمكن لعدد الأدوية أن تؤثر على نتائج اختبارات وظائف الصفائح الدموية بما فيها وقت النزف. على سبيل المثال، قد يستمر تأثير تناول الاسبرين حديثاً مدة تصل إلى 10 أيام.

للحصول على قائمة الأدوية التي يمكن أن تتداخل مع وظيفة الصفائح، راجع الدليل التوجيهي للجمعية البريطانية لأمراض الدم بشأن اختبار وظيفة الصفائح الدموية المشار إليه أدناه.

ويمكن لاختبار بسيط آخر أن يعطي مؤشراً على وجود خلل محتمل هو طريقة انكماش الجلطة المبينة أدناه.

1.39 انكماش الجلطة

يمكن أن يعطي انكماش الجلطة في كامل الدم المتخثر مؤشراً لعدد الصفائح الدموية ووظيفتها. عندما تنكمش الجلطة، ويتم إفراز المصل، ويمكن قياس درجة انكماش الجلطة.

الطريقة

1. اجمع 1 مل من الدم في أنبوب اختبار زجاجي (75 ملم × 10 ملم) وضعه بدرجة 37 مئوية.
2. افحص الأنبوب بصرياً حتى تظهر الجلطة بشكل أكيد. اتركه دون تعكير في درجة 37 مئوية لمدة ساعة أخرى.
3. قس المسافة من قاعدة الأنبوب حتى الشكل الهلالي. أزل الخثرة بعناية بعود خشبي رقيقة (مثلاً عود الكوكتيل)، اترك المصل الناتج عن التخثر في الأنبوب.
4. قِس المسافة من قاعدة الأنبوب حتى الشكل الهلالي للمصل.
5. قسّم مسافة المصل على المسافة الإجمالية واضربها في 100 للحصول على النسبة المئوية.

التفسير

في العادة، يُنتج المصل بأكثر من 40 %. ويوجد بعض الخلل في الصفائح الدموية للمصل الناتج، لا سيما في وهن الصفائح جلانزمان (Glanzmann's thrombasthenia).

الملاحظات

- يجب أن تكون الأنابيب والعيدان الخشبية نظيفة تماماً لمنع التصاق التخثر بالأنبوب.
- يجب إزالة التخثر بعناية وبلطف لتجنب الضغط، وبالتالي إخراج المزيد من المصل.

المراجع

Chanarin I (ed.). *Laboratory Haematology: An Account of Laboratory Techniques*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989.

Guidelines on platelet function testing. The British Society for Haematology BCSH Haemostasis and Thrombosis Task Force. *J Clin Pathol* 1988; 41: 1322–1330.

2.39 قياس تجمّع الصفائح

المبدأ

تقع الكثافة البصرية للبلازما الغنية بالصفائح الدموية على شكل تجمعات من الصفائح. وتعتمد كمية الوقوع، وإلى حد كبير على نسبة تفاعلية الصفائح، شريطة أن يتم التحكم في جميع المتغيرات الأخرى (على سبيل المثال تعداد الصفائح، وسرعة الخلط، ودرجة الحرارة).

وتتم مراقبة تغيرات الكثافة البصرية، حيث تعكس الكثافة البصرية للبلازما الغنية بالصفائح، درجة تراكم الصفائح الناجم عن واحد من مجموعة متنوعة من المنبهات.

ويتم رصد الكثافة البصرية باستخدام مقياس التراكم المتصلة بقارء الجداول حيث قد يتم تسجيل النتائج بيانياً. تم نشر عدد من المراجعات للممارسة الحالية في مراكز مختلفة

الاحتياطات قبل دراسة تراكم الصفائح

ينبغي استبعاد المركبات المحتوية على الأسبرين ما لا يقل عن 10 أيام قبل الاختبار، ما لم يكن قد تم فحص تأثيرها على تراكم الصفائح الدموية تحديداً، ويتداخل الأسبرين مع تفاعل الإفراز.

وينبغي أيضاً تجنب تناول الأدوية الأخرى المعروفة بالتأثير على وظيفة الصفائح على الأقل للفترة المطلوبة لإزالتها من الدورة الدموية. وتشمل هذه مضادات الأنتيهستامين ومضادات حيوية ومضادات اكتئاب معينة. ويجب التحقق من صرف أية عقاقير قبل إجراء اختبار وظائف الصفائح الدموية.

ولأن الكيلومكرونات يمكن أن يتداخل مع قياس تراكم الصفائح، فلا ينبغي إجراء الدراسات بعد وقت قصير من وجبة دسمة.

وقد تمنع العديد من المكونات الغذائية "الطبيعية" الأخرى، بما فيها الكحول والبصل والثوم والفلفل والزنجبيل أيضاً تراكم الصفائح الدموية. يجب أخذ هذا الأمر بنظر الاعتبار عند تقييم النتائج.

إعداد البلازما غنية الصفائح (PRP) والبلازما فقيرة الصفائح الدموية (PPP)

يتم جمع الدم الوريدي بأقل انسداد وريدي إلى 1/10 كمية ثلاثي سترات الصوديوم (0.109 م) في أنبوب من البوليبروبلين أو الزجاج بالسليكون. ويتطلب إجراء دراسة التراكم الكامل ما يقارب 20 مل من الدم.

ويُنشط التبريد الصفائح الدموية، لذا تتم معالجة الدم بدرجة 20 – 25 مئوية. ويتم تحضير البلازما غنية الصفائح (PRP) من خلال الطرد المركزي لمدة 10 إلى 15 دقيقة بمعدل 200 غ.

يتم نقل (PRP) بعناية، لتجنب التلوث بخلايا الدم الحمراء أو الطبقة التي تحوي تراكم الخلايا البيضاء buffy coat (سيتضاءل التراكم إذا وُجد أحدها)، إلى أنبوب البوليبروبلين ويُترك بدرجة 20 – 25 مئوية حتى يجري اختباره. إن درجة الحرارة الدقيقة للتخزين ليست حرجة، لكنها قد تؤثر على النتائج، لذا يجب أن يتم التقيد بدرجة الحرارة نفسها لجميع عينات (PRP).

ويتم طرد الدم المتبقي مركزياً في 2000 غ لمدة 20 دقيقة، وإزالة البلازما فقيرة الصفائح الدموية (PPP) وتخزينها بدرجة 4 مئوية.

يجري عد الصفائح على (PRP): سيؤثر عدد الصفائح الدموية على استجابات التراكم التي تم الحصول عليها ، ولكن ضمن النطاق الذي تقع فيه معظم (10^9/1 × 600–200) (PRP)، ومثل هذه الآثار ضئيلة. في الواقع، هناك أدلة على أن تخفيف (PRP) مع (PPP) من المريض نفسه قد يحول دون الحصول على استجابات، ربما لأن (PPP) يمكن تحتوي على مواد تنطلق من الصفائح الدموية نتيجة لصدمة إضافية بسبب الطرد المركزي عالي السرعة (كاتانيو وآخرون، 2007، لينيمان وآخرون، 2008). لهذه الأسباب، يجب تعديل (PRP) مع عد الصفائح في النطاق أعلاه.

قد تتأثر الاستجابة التراكم لعدد (PRP) المرتفع جداً (أكثر من 1000 × 10^9/1). وبالتالي قد يكون من المفيد ضبط تعداد الصفائح إلى مستوى أكثر ملاءمة. يمكن القيام بذلك عن طريق تخفيف (PRP) في (PPP) للمريض. وبالمثل، قد يُظهر تعداد الصفائح المنخفض (أقل من 200 × 10^9/1) تقلصاً في استجابة التراكم. يؤدي تركيز الصفائح الدموية دائماً، تقريباً إلى تغيير وظيفي غير مستحسن. ومع ذلك، يمكن إجراء تخفيف مراقبة عادي (في PPP) للعدد نفسه من (PRP) للمقارنة.

يعتمد تراكم الصفائح الدموية على درجة الحموضة، لذا ينبغي المحافظة على (PRP) ضمن نطاق 7.7 – 8.0. ويمكن إحراز مراقبة مرضية من خلال تخزين (PRP) بالكامل في أنابيب مُحكمة الإقفال وإكمال الفحوصات خلال ساعتين من جمع الدم.

المواد المستعملة في دراسة تراكم الصفائح

تُنشط الكواشف مثل (ADP) والكولاجين المرتبطة بمستقبلات معينة في غشاء الصفائح، الصفائح الدموية، وتثير سلسلة من التفاعلات. ويؤدي هذا إلى مرور الصفائح بمرحلة تغير الشكل والانكماش والتحرك وإطلاق مكونات حبيبية، وأخيراً تراكم الصفائح الدموية.

تحدث عدة مسارات مختلفة لكنها مترابطة لتفعيل صفائح الدم اعتماداً على نوع وتركيز المنبه المستخدم، مما يؤدي إلى تراكم الصفائح الدموية. في أنبوب التفاعل، يؤدي التغيير من تعليق الصفائح الموحد إلى التراكم إلى انخفاض في امتصاص الضوء وزيادة في انتقال الضوء من خلال تعليق الصفائح الدموية. ويتم الكشف عن هذا بواسطة جهاز تسجيل في توليفة أجهزة مع مقياس تراكم الصفائح.

يجب أن تكون عوامل التراكم الخمسة المذكورة أدناه كافية للسماح بتحديد مختلف الاضطرابات الوظيفية الصفائح.

الأدينوسين – 5 – ثنائي الفوسفات (ADP)

يتم إعداد محلول المخزون من 1 م م/ لتر من ملح الصوديوم في الماء الملحي المعزول بعازل اورين (OBS) وتخزينها بكميات صغيرة بدرجة 40– مئوية. ويبقى هذا مستقراً لثلاثة أشهر على الأقل. وبمجرد إذابته، يجب استخدام المحلول خلال ثلاث ساعات أو التخلص منه.

وللاستخدام، يتم تحضير تخفيفات إضافية في (OBS). ويعتمد نمط الاستجابة لـ (ADP) على تركيزه النهائي.

- عند 2 مايكرومول/ لتر، يمكن مشاهدة موجات أولية وثانوية واضحة المعالم: تمثل الأولى التأثير المباشر الناجم عن المنبه والأخير هو نتيجة لإطلاق (ADP) الذاتي وتوليد الثرومبوكسون A2 (TXA2)، الذي يقوم بذاته بتراكم الصفائح الدموية.
- أقل من 2 مايكرومول/ لتر، يُظهر قلة من الأشخاص العاديين تدريجياً استجابة ثانوية، وتنعكس الموجة الأولية عادة بينما يتدهور مستوى (ADP) الإنزيمي.
- أكثر من 2 مايكرومول/ لتر، تكون المرحلة الأولية عادة مكثفة للغاية بحيث أن التمييز محجوب بينها وبين المرحلة الثانوية.

يؤدي (ADP) الى تغيير شكل الصفائح من قرصي إلى كروي شائك. ويسبب هذا في البداية زيادة طفيفة في الكثافة البصرية لتعليق الصفائح الدموية، وهو ما يمكن ملاحظته إذا كان التراكم الأولي ضعيفاً.

الأدرينالاين (الإيبينيفرين)

ويتم إعداد محلول المخزون من 1 م م/ لتر من ملح البيترتريت في (OBS). يجب أن يتم تخزينها واستخدامها كما في (ADP). مع الأدرينالين، التركيزات المستخدمة وأنماط استجابة مماثلة لتلك الخاصة بـ (ADP). ومع ذلك، ففي ظل غياب الموجة الثانوية، لا تنعكس موجة الأولية، وليس لها الكثافة بحيث تحجب الموجة الثانوية.

الكولاجين

يستخدم التعليق المستقر للُبيفات الكولاجين الخيلي على نطاق واسع جداً (1 ملغ/ مل)، والذي توفره هرمون – كيمي، ميونيخ، ألمانيا. Hormon–Chemie, Munich, Germany,

وهناك عدد من المواد الأخرى المناسبة على حد سواء. يتم تخزينه في درجة 4 مئوية، ويجب مزجه جيداً مباشرة قبل تخفيفه مع طقم العازل. وينبغي استخدامه بتركيز نهائي من 0,5 – 2,0 ميكروغرام/ مل في (PRP)، و تكون التخفيفات المعلقة مستقرة لمدة أسبوع بدرجة 4 مئوية.

مع الكولاجين، لا تحدث أية موجة ابتدائية. وتُعرّف الاستجابة عادة من خلال مدة المرحلة الفاصلة lag phase قبل بدء التراكم ومن خلال كثافة الأخيرة. تسبق الزيادة الطفيفة في الكثافة البصرية الناجمة عن تغيير شكل الصفائح والتي تزيد من عملية تراكم الصفائح.

عند استخدام الكولاجين من عدة مصادر مختلفة. يمكن أن يكون لكلى نوعي الكولاجين وفصائلهما التي تُحضر منها (مثل، الخيول أو الأبقار) تأثير هام على النتائج المتحصلة. وفي الواقع، هناك حاجة لأكثر من 100 مجموعة من التركيزات، اعتماداً على مصدر المواد. ولذلك فمن المهم اختيار مصدر مناسب وإنشاء مجموعة مرجعية محلية لهذه المادة، التي ينبغي إعادة تقييمها إذا تغير المصدر.
للمراجعة، انظر جينينغز وآخرون Jennings et al، (2008).

الريستوسيتين

عند التركيز النهائي للريستوسيتين بـ 1 ملغ/ مل في (PRP)، عادة ما تكون الموجات الأولية والثانوية المميزة ملحوظة، ولكن فوق هذا يكون التأثير المباشر شديداً لدرجة دمج المرحلتين.

الموجة الأولية هي مقياس كمية عامل فون ويلبراند الموجود في البلازما، في حين أن الموجة الثانية تأتي من إطلاق من المواد الداخلية.

حامض الأراكيدونيك

يُذاب أراكيدونيك الصوديوم (درجة النقاء 99%) في (OBS) حتى تركيز 10 م م/ لتر. وتوضع مقادير متساوية صغيرة في قوارير زجاجية مظللة ممسوحة بالنتروجين لمنع الأكسدة، ثم تُغلق بإحكام وتخزن مجمدة بدرجة أقل من 20– مئوية.

عموماً التراكم مع حامض الأراكيدونيك يكون وحيد الطور، وتسبقه مرحلة فاصلة قصيرة (lag phase).

الكواشف

ملاحظة: هذه التركيزات مناسبة إذا أضيف جزء واحد إلى تسعة أجزاء من (PRP).

- ADP

اصنع تخفيفاً بنسبة 1 في 10 = 100 µM ميكرو م (أي محلول 0.1 مل 1000 ميكرو م µM + 0.9 مل OBS)

من هذا، اصنع تركيزين للعمل:

- 20 ميكرومتر µM (أي 0.2 مل 100 ميكرومتر µM + 0.8 مل OBS)
- 30 ميكرومتر µM (أي 0.3 مل 100 ميكرومتر µM + 0.7 مل OBS)

في الحالات التي يجري فيها اختبار قابلية التراكم العليا (hyperaggregability)، قد تكون هناك حاجة إلى تركيز أقل (على سبيل المثال 10 ميكرومتر µM ، و5 ميكرومتر µM).

- الأدرينالاين (الإيبينيفرين)

قم بتخفيفه كما في ADP

- الكولاجين

امزجه جيداً وخففه في (OBS):

- 1 في 500 (أي 0.1 مل المخزون + 4.9 مل OBS) = 20 مايكروغرام/ مل
- 1 في 100 (أي 0.5 مل تخفيف 1.50 + 0.5 مل OBS) = 10 ميكروغرام/ مل

- الريستوسيتين

يستخدم هذا حتى أربعة تركيزات اعتماداً على النتائج المتحصل عليها: 15 ملغ/ مل، 12.5 ملغ/ مل، 7.5 ملغ/ مل، و5 ملغ/ مل

- حامض الأراكيدونيك

10 م م/ لتر

الطريقة

بسبب مقاومة الصفائح الدموية للتراكم الناتج عن الطرد المركزي، يجب ألا تبدأ دراسات التراكم خلال 30 دقيقة من إعداد (PRP). وعلى وجه الخصوص، يتم تقليل الاستجابة لـ (ADP) خلال الـ20 إلى 30 دقيقة الأولى بعد إعداد (PRP). ومع ذلك، ينبغي استكمال الاختبار في غضون ساعتين.

1. شغّل مقياس التراكم حتى يسخن إلى درجة 37 مئوية، واضبط سرعة التحريك إلى 900 دورة في الدقيقة.

   بعض أجهزة مقاييس التراكم ذات قناتين، لذ فمن الملائم استخدام النصف من عرض ورقة الرسم البياني لكل قناة.

   تكون إعدادات (PRP) المستخدمة مع انحراف قدره 10 م فولت، هي 0.5 و5.5 م فولت للقنوات 1 و2 على التوالي (تمثل تراكماً بنسبة صفر %)، وستكون القيم الفارغة المقابلة (التي تم تعيينها باستخدام PPP) 4.5 و9.5 فولت (تمثل تراكماً بنسبة 100 %).

2. ضع 0.45 مل من (PRP) في انبوب زجاجي خاص (تخلص منه بعد استخدامه) يحتوي على "ملف" مطلي بالسليكون للمزج.

3. ضع في حامل القناة (1) واضبط الإرسال إلى صفر% (0.5 م فولت). استبدله بكفيت يحتوي على 0.5 مل من (PPP)، واضبط الإرسال إلى 100 % (4.5 م فولت). كرر هذا الإجراء حتى لا يعود تعديل آخر مطوباً.

4. كرر العملية للقناة 2، باستخدام إعدادات 5.5 و9.5 م فولت.

5. اسمح لـ (PRP) بالتسخين إلى درجة 37 مئوية لمدة دقيقتين. أضف 0.05 مل من منبه إلى قعر الانبوب الزجاجي الخاص وراقب تغير الكثافة البصرية لمدة ثلاث دقائق.

كرر هذا الإجراء لكل منبه.

الملاحظات

- بالنسبة لـ (ADP) والأدرينالين، ابدأ بالتركيز 20 ميكرومتر. سيكون هذا تركيزاً نهائياً في (PRP) من 2 ميكرومتر.
- بالنسبة للكولاجين، استخدم تركيز 10 غ/ مل. سيكون هذا تركيزاً نهائياً من 1 ميكروغرام/ مل.
- بالنسبة للريستوسيتين، استخدم تركيز 12.5 ملغ/ مل. عند الكشف عن النوع (2B VWD)، افحص أيضاً تركيزات 7.5 ملغ/ مل و5 ملغ/ مل. وسيعطي هذا التركيز النهائي في (PRP) من 1.25 ملغ/ مل، 0.75 ملغ/ مل، و0.5 ملغ/ مل على التوالي. استخدم 15 ملغ/ مل اذا لم يكن هناك استجابة لـ 12.5 ملغ/ مل.

  إذا كانت الصفائح الدموية ذات تراكم عالٍ (hyperaggregate) مع 0.5 ملغ/ مل من الريستوسيتين (يشير هذا إلى (2B VWD) محتمل أو صفائح من نوع (VWD)):

  - تحقق من وجود تراكم عفوي من خلال مراقبة (PRP) تحت ظروف التحريك نفسها على مقياس التراكم دون إضافة أي منبه لتحفيز التراكم.

- اغسل الكمية التي تم قياسها من (PRP) (مثلاً، 1 مل من كل من بلازما المريض والبلازما الطبيعية × 3) في عازل غسل سترات المحلول الملحي (EDTA). أعد التعليق بعناية لصفائح المريض الدموية في البلازما الطبيعية والصفائح الدموية الطبيعية في بلازما المريض. أعد الاختبار باستخدام 0.5 ملغ/ مل من الريستوسيتين.

وينبغي أن تندرج التفاعلات في واحد من الأنماط أدناه.

الشكل 1.39: أنماط التفاعل

PRP المريض PPP المريض	الصفائح الدموية للمريض PPP عادي	الصفائح الدموية العادية PPP المريض
التراكم	لا توجد استجابة	تراكم = النوع 2B VWD
التراكم	تراكم عفوي	لا توجد استجابة = نوع الصفائح *VWD

* للاطلاع على نوع الصفائحVWD، انظر فرانشيني وآخرين (2008) ,.Franchini et al.

تفسير أنماط التراكم

- إذا لم تعط الصفائح الدموية التي يجري اختبارها استجابة طبيعية – أي، مرحلتين من التراكمات التي تغطي أكثر من 50 % من المقياس، مع التركيزات العليا التي تغطي أكثر من 50 % من المقياس مع التركيزات العليا من الكواشف – إذن سيزداد تركيز المنبه. (في حدود المعقول) حتى يتم الحصول على استجابة مرضية.
- في الحالات التي يوجد فيها خلل إطلاق واضح، راقب الاستجابة لحامض الأراكيدونيك.
- إذا لم يتم الحصول على استجابة مع حمض الأراكيدونيك، قم بالاختبار مع الثرموبوكسان A2 و/ أو أيونوفور الكالسيوم.
- عند دراسة تراكم الصفائح الدموية كجزء من تقييم قابلية التراكم العليا (hyperaggregability)، يتم استخدام (ADP) والأدرينالين وبتركيزات أقل للحصول على منحنى الاستجابة للجرعة. التركيزات المستخدمة هي: 2 ميكرومتر، 1ميكرومتر، 0.5 ميكرومتر، و0.1 ميكرومتر كتركيز نهائي في (PRP). يتم أيضاً تنفيذ التراكم العفوية قبل اختبار بقية المنبهات:
  1. ضع 0.5 مل من (PRP) في كفيت وضعه في مقياس التراكم.
  2. راقب أي تغيير في الكثافة البصرية لمدة 15 دقيقة.

إذا لم تكن كمية (PRP) كافية، فالحد الأدنى للكمية التي يمكن استخدامها في الكفيتات القياسية هو 0.36 مل (PRP) + 40 ميكرولتر من المنبه.

- يجب أن تتم معالجة (PRP) التي أعدت بالطريقة نفسها من المتبرعين الطبيعيين الأصحاء كتحقيق على الكواشف. وهذا أمر مهم خاصة إذا تم الحصول على نتائج غير طبيعية للمريض، حيث أن بعض المنبهات غير مستقرة، ولا سيما عند تخفيفها إلى تركيزات للعمل. ويمكن استخدام نتائج الأشخاص الطبيعيين الأصحاء التي تم اختبارها بهذه الطريقة لاستخلاص نطاقات مرجعية للمساعدة في تفسير نتائج المريض.

حساب النتائج

عادة ما يتم التعبير عن النتائج بثلاث طرق:

1. تقاس النسبة الواقعة ضمن الكثافة البصرية بعد ثلاث دقائق من إضافة المنبه. هذه هي الطريقة الأكثر ملاءمة، على الرغم من أنها لا تقدم معلومات عن شكل منحنيات التراكم.
2. المنحدر الأولي لتتبع التراكم. تشير هذه إلى أن معدل التراكم، ولكنها لا تشير إلى ما إذا حدث تراكم ثانوي.
3. تحديد بداية تركيز المنبه، أي، كمية كواشف التراكم اللازمة لمجرد الحث على استجابة المرحلة الثانية. (وتميل هذه إلى أن تكون هدراً في PRP).

تفسير النتائج

يتطلب الأمر قدراً كبيراً من الحذر عند تفسير أنماط تراكم الصفائح الدموية. وقد يؤثر عدد من العوامل الفنية على النتائج. وعلينا أن نضع في الاعتبار أن هناك عدداً من الاختلافات الهامة بين التراكم المحدد بطريقة النيفيلومتري (nephelometry) وتلك التي تحدث في الجسم.

ومع ذلك، يمكن الحصول على معلومات تشخيصية مفيدة، وتظهر بعض الأمثلة على أنماط التراكم في الشكل 2.39.

الشكل 2.39: نتائج تراكم الصفائح الدموية في اضطرابات مختلفة

الاضطراب	ADP	الكولاجين	الريستوسيتين 1.25 ملغ/ مل	الريستوسيتين 0.5 ملغ/ مل	حامض الأراكيدونيك	الأدرينالين
VWD نوع 1 و 2A	N	N	A/R**	H	N	N
VWD نوع 2B	N	N	N	H	N	N
متلازمة برنار سولييه	N	N	A	A	N	N
وهن صفائح جلانزمان	A	A	N	A	A	A
داء اختزان التجميع	P/N	R/N	P/N	A	R/N	P/N
ضعف سيكلو- أوكسيجيناز*	R/N	R	N	A	R	R/N

N = عادي؛ A = غائب؛ R = مُخفّض؛ H = استجابة متزايدة؛ P = موجة ابتدائية فقط

* أو تأثير أو الأسبرين

** يمكن أن تكون طبيعياً في (VWD) الخفف النوع 1

المزيد من التحقيق في وظيفة الصفائح الدموية

إذا لوحظ حدوث نمط تراكم غير طبيعي بشكل فردي فمن المستحسن تكرار تقييم الأخير مرة أخرى للتحقق من اتساق الشذوذ.

عند وجود تراكم غير طبيعي، قد يكون من المفيد إجراء مزيد من الفحوصات. وتشمل هذه قياس محتوى نوكليوتيدات الصفائح الدموية وإطلاقها أثناء تراكم الصفائح الدموية.

يمكن تأدية حساب كميات جليكوبروتينات الغشاء للحصول على تشخيص متلازمة برنار سولييه ووهن صفائح جلانزمان بشكل قاطع.

يمكن تقييم آلية إطلاق الصفائح من خلال قياس محتوى الصفائح الإجمالي لـ (ADP) وثلاثي فوسفات الأدينوسين (ATP) وإطلاق (ATP) أو –5هيدروكسيتريبتامين (أو كليهما) من حبيبات كثيفة.

الشكل 3.39: العوامل التقنية التي تؤثر على وظيفة الصفائح

مضاد التخثر	كمية 1/10 من سترات ثلاثي الصوديوم
الوقت	ابدء الفحوصات بعد 30 دقيقة من تحضير (PRP). أكمل الدراسات في غضون ساعتين من جمع الدم.
الطرد المركزي	يجب أن يكون كافياً لإزالة خلايا الدم الحمراء وكريات الدم البيضاء، ولكن ليس الصفائح الدموية الكبيرة. ينبغي أن يتم في درجة حرارة الغرفة، وليس في 4 مئوية.
حساب عدد الصفائح	العدد المنخفض < 100 × 10^9/ لتر يسبب استجابات بطيئة وضعيفة. العدد المرتفع > 100 × 10^9/ لتر قد يُظهر استجابات مخفّضة.
درجة الحموضة	< 7.7 تثبط التراكم. > 8.0 تعزز التراكم.
سرعة الخلط	< 800 دورة بالدقيقة تظهر تراكماً منخفضاً. > 1200 دورة بالدقيقة يؤدي إلى تكسّر كتل الصفائح الدموية.
الهيماتوكريت	> 55% يُبين تراكماً أقل تدريجياً، وخصوصا تثبيط المرحلة الثانية بسبب زيادة تركيز السيترات.
درجة الحرارة	< 35 مئوية تُظهر تراكماً منخفضاً مع جرعات منتظمة من جميع المنبهات، ولكن استجابة متزايدة لجرعات منخفضة من (ADP).
فرط الشحوم في الدم	تسبب زيادة كيلومكرونات انخفاض التراكم.
الكفيت المتسخ	قد يسبب تراكماً عفوياً واضحاً.
شريط عدم وجود حركة	لا توجد استجابة عند إضافة عامل التراكم.
فقاعات الهواء	تذبذبات سريعة وواسعة للقلم قبل التراكم. وتنتج أيضاً عن انخفاض عدد الصفائح الدموية.

الاختلافات بين الظروف في الجسم الحي و في المختبر لتراكم الصفائح الدموية

مع اختبارات الدم في المختبر:

- الدم معالج لمنع التخثر
- تتم إزالة أقراص الدم الحمراء (RBC) وكريات الدم البيضاء (WBC)
- لا يتم إشراك مكونات الأوعية الدموية
- لا يتم إشراك الجلطات
- يتم اختيار عدد صفائح الدم
- يتم الاحتفاظ بمنتجات تنشيط الصفائح والإطلاق
- الكواشف المستخدمة غير فزيولوجية (وظائفية) في التكوين والجرعة
- الصفائح الدموية غير مستقرة خارج الجسم
- قد تظهر تأثيرات العقاقير أكثر أو أقل وضوحاً منها في الجسم الحي

المراجع

Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen S, Liesner RJ, Minford A, Mumford AD, Parapia LA, Perry DJ, Watson SP, Wilde JT, Williams MD; UKHCDO. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UK HCDO. *Br J Haematol* 2006; 135:603–33.

Cattaneo M, Hayward CP, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD.Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: A report from the Platelet Physiology Subcommittee of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 2009; 7:1029.

Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F. Platelet aggregation studies: Autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica* 2007; 92:694–7.

Franchini M, Montagnana M, Lippi G. Clinical, laboratory and therapeutic aspects of platelet-type von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol* 2008; 30:91–4.

Jennings I, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Platelet function testing: practice among UK National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation participants, 2006. *J Clin Pathol* 2008; 61:950–4.

Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: An adjustment for platelet count is not necessary. *Thromb Haemost* 2008; 6:677–83.

40 تجفيف البلازما بتجميدها (ليوفيلايزيشن)

المقدمة

ويمكن استخدام (الليوفيلايزيشن)، أو التجفيف بالتجميد بالتجفف، لإعداد بلازما تبقى مستقرة لفترات طويلة من الزمن. هذا مفيد، على سبيل المثال، لإعداد البلازما ذات النقص في (FVIII) المجففة بالتجميد، والتي عادة ما تكون مستقرة لعامين على الأقل وحتى خمسة أعوام عند تخزينها بدرجة 20– مئوية أو أقل، وهذا الاستقرار كاف للبقاء فترات قصيرة (حتى سبعة أيام) بدرجة حرارة 20 – 50 مئوية.

البلازما المناسبة

يُخلط الدم الوريدي مع 0.105 – 0.109 م من سترات الصوديوم لإعداد 9 أجزاء من الدم، وجزء واحد من مضاد التخثر. يُطرد مركزياً في 1700 غ لمدة 10 دقائق، ويُجمع عند الاقتضاء، ويُخزن بدرجة 55– مئوية في انتظار نتائج الفحص الفيروسي. تأكد من أن النتائج سلبية لمضاد فيروس نقص المناعة البشري (HIV) 1 و2، ومضاد التهاب الكبد الوبائي (HCV)، والتهاب الكبد (B SAg).

المواد

- عبوات زجاجية محايدة شفافة سعة 2 مل برقبة داخلية مطلية بالسليكون بطول 13 ملم
- سدادة تجميد جاف بقطر 13 ملم، رمادية
- أختام قابلة للنزع بالكامل بقطر 13 ملم

(تتوفر جميعها من دياجنوستيك ريجنتس، ثايم، أوكسفوردشاير، المملكة المتحدة)

- وحدة تجميد جاف (تتوفر وحدة رفوف سوبرموديوليو ستوبرينج من لايف ساينس إنترناشونال، وحدة 5، مركز رينجواي، شارع أديسون، باسينغستوك، هامبشاير، RG21 6YH، المملكة المتحدة)
- حامض (HEPES) (N–2–Hydroxyethylpiperazine–N'–2–ethanesulphonic) بي دي اتش لابرراتوري سبلايرز، بوول، BD15 1TD، المملكة المتحدة)

الطريقة

1. أذب البلازما بسرعة بدرجة 37 مئوية.
2. امزجها جيداً.

3. أضف 0.8 غ من (HEPES) لكل 100 مل من البلازما.

4. امزج ودع (HEPES) يتحلل (حوالي 15 إلى 20 دقيقة).

5. املأ أدراج التجميد الجاف الفولاذية المقاومة للصدأ، بقنانٍ زجاجية فارغة.

6. أفرغ كميات متساوية من 0.5 مل بالضبط في كل قنينة.

7. ضع السدادة المطاطية على القنينة إلى عمق النتوء الضيق على السدادة. تأكد من تفريغ القنينة من الهواء.

8. جمدها بدرجة 70– مئوية لمدة لا تقل عن ثلاث ساعات.

9. شغّل وحدة التجميد بالتجفيف. قم بتفعيل وحدة البراد.

10. ضع الأدراج في وحدة الرفوف (حتى ثمانية رفوف).

11. ضع وحدة الرفوف في حجرة بلاستيكية شفافة فوق منفذ خروج الهواء أعلى مجمّد التجفيف.

12. قم بتفعيل المضخة. تأكد من إكمال الخطوتين السابقتين وهذه الخطوة خلال ثلاث إلى أربع دقائق لمنع بدء ذوبان البلازما. إذا حدث ذوبان جزئي، ستتزبّد المواد وتتجمد جافة بشكل سيئ، ويجب التخلص منها.

13. تأكد من أن التفريغ جارٍ من خلال حركة مقياس الضغط (حركة مرئية خلال بضع دقائق)، ومن خلال جمود حجرة البلازما تحت ضوء الضغط اليدوي الجانبي.

14. دعه تحت السحب لمدة خمسة أيام.

15. أحكم إغلاق القناني تحت السحب بشد المقابض للأسفل على وحدة الرفوف.

16. اسمح بوصول الهواء من خلال منفذ الدخول.

17. أزل الصقيع ونشّف جهاز التجميد الجاف.

18. خزّن البلازما المجمدة بالتجفيف بدرجة 20– مئوية، وغطها بأسرع ما يمكن.

19. للتأكد من التجميد الجاف لليلازما بالتساوي، اختبر 4 – 6 قناني مختارة من مواقع مختلفة من بين الأدراج الفولاذية. حدد (PT) و (APTT)، والتي لا ينبغي أن تختلف بأكثر من 6% – 8%.

41 تقييم واستخدام مقاييس التخثر

المقدمة

ينتشر استخدام الآلات الآن في مختبرات التخثر على نطاق واسع في معظم أنحاء العالم. فقد ساهمت في تحسين توحيد وتسهيل الاختبارات التي تتطلب تدريباً خاصاً وظروف عمل خاصة، بحيث تزيد المختبرات من كفاءتها وذخيرتها.

إن استخدام الآلات في الإرقاء حديث عهد نسبياً. فقد كانت الطرق اليدوية قائمة على الكشف البصري لجلطة الليفين، وكان استخدام حاضنات بدرجة 37 مئوية ذات يوم هو التقنية الوحيدة لدراسات تخثر الدم. ثم بدأ في السبعينات من القرن العشرين منهج شبه آلي جديد يقوم على أساس مبادئ المعدات البصرية أو الميكانيكية للكشف عن الليفين. وبعد ذلك أصبحت الأدوات المؤتمتة بالكامل أكثر شيوعاً في المختبرات الحديثة. واليوم، يمكن لمعدات جديدة متصلة بنظم معالجة بيانات محددة إجراء اختبارات تخثر الدم، والمولدات اللونية، والاختبارات المناعية.

يتوفر اليوم منهجين:

1. الميكانيكي
2. البصري
   - 2-1 الصور الضوئية
   - 2-2 النيفيلوميتري
   - 2-3 الكروموجيني
   - 2-4 المناعي

المبدأ الميكانيكي

تستند الطرق الكهرومغناطيسية على الكشف عن الزيادة في لزوجة البلازما عندما يتشكل الليفين. وهناك طريقتان مطبقتان لهذا المبدأ لمعدات المختبرات اليوم.

تستخدم الطريقة الأولى المجال الكهرومغناطيسي المطبّق لاختبار الكفيتات التي تكشف الحركة لكرة من الفولاذ المقاوم للصدأ الموضوعة في عينة البلازما. تتبع كرة الفولاذ حركة البندول، حيث تتأرجح بحركة مستمرة من جانب إلى آخر في محلول كاشف البلازما. وحين يبدأ الليفين بالتشكّل، تزداد اللزوجة وتتباطأ حركة الكرة الفولاذية. عند بلوغ حركة تذبذب الكرة مستوى محدداً سلفاً، يتوقف الكرونومتر، مشيراً إلى وقت تخثر البلازما.

وتستخدم طريقة الكشف الميكانيكي الثانية أيضا كرة من الفولاذ المقاوم للصدأ، تقع هذه المرة في فتحة نقطة واحدة. ويكشف جهاز استشعار مغناطيسي موقع الكرة، وبينما هي تدور، تحافظ على ميلها في

الوقت الذي تبقى فيه عينة السائل مائعة. وعندما يتشكل الليفين، تلتقط الجلطة الكرة، وتنقلها من موقعها الأصلي. وبينما هي تتحرك خارج نطاق أجهزة الاستشعار، تنقطع الدائرة ويتوقف الكرونومتر (توماس وآخرون، 1999).

المبادئ البصرية أو قياس الطيف

مبدأ الصورة البصرية

تستند النظم البصرية على فكرة أن تشكّل الجلطة يحدث تغييراً في كثافة البلازما البصرية. وبينما تتشكل الجلطة، تحدث هناك تغيرات في الخصائص البصرية من القراءة الاولية للبلازما/ الكواشف. يتم رصد هذه التغيرات واستخدامها لاشتقاق الوقت الذي يستغرقه الحصول على درجة معينة من التغيير ليحدث.

المبدأ النيفيلومتري

يتم اعتماد المبدأ النيفيلومتري من قبل بعض الأنظمة. وفي فحوصات التخثر، يُبث ضوء ليزر أحادي اللون – على سبيل المثال، عن طريق الألياف البصرية. وأصبحت قراءات تشتت الضوء ممكنة بواسطة أجهزة استشعار يمكن تركيبها في 90 أو 180 درجة من مسار الضوء، اعتماداً على النظام المعين، والذي يقيس عندها تناثر الضوء بزاوية أو يسجل التغيير في انتقال الضوء. عند وصول الضوء إلى التراكمات غير القابلة للذوبان مثل الألياف الليفين، فإنه يتناثر بزاوية (180 درجة) للأمام ويتبعثر بزاوية (90 درجة) جانبياً. ويتوقف الكرونومتر عندما تصل كمية الضوء المبعثر أو الضوء المنتقل إلى مستوى محدد سلفاً. وعادة ما يتناسب الفرق بين الضوء المبعثر أو الضوء المنقول قبل وبعد تشكيل الجلطة مع كمية من الليفين المتشكّلة.

المبدأ الكروموجيني (التولّد اللوني)

يستند هذا المبدأ على استخدام مادة توليد لون معين والمعروفة باسم حامل اللون، الذي يُعتبر البارا–نتروأنيلين (pNA) أكثر أنواعها شيوعاً. ولديه أقصى حد امتصاص يبلغ 405 نانومتر. ويكمن مبدأ اختبار مولد اللون (الكروموجينيك) في تمسك (pNA) على مواد اصطناعية (روداك، 1995). ويرتبط (pNA) بسلسلة من الأحماض الأمينية التي تحاكي التسلسل المستهدف من عامل التخثر المفعّل الذي نريد تحديده. ويشق بروتين التخثر ركيزة المولد اللوني في موقع معين بين تسلسل الأحماض الأمينية المحددة ويطلق (pNA).

تتناسب كثافة اللون الأصفر مع كمية (pNA) التي تم إطلاقها. ويقاس ذلك من خلال الكشف الضوئي في طول موجي يبلغ 405 نانومتر. وبينما يُشق المزيد من (pNA) ويطلق، تزداد القدرة الامتصاصية للعينة، مما يؤدي إلى قدر أكبر من التغيير في كثافة المحلول البصرية (روداك، 1995).

لقد تمكنت أول أدوات التخثر توفير مقياس تعريف واحد فقط، مثل الميكانيكي أو الصورة البصرية. وصممت أدوات الصورة البصرية أولاً للقراءات في طول موجي واحد (على سبيل المثال، 500 نانومتر أو 600 نانومتر) والتي لا يمكن استخدامها إلا للكشف عن تشكّل الجلطة. وأحدث من ذلك، يمكن لبعض مقاييس التجلط قراءة اثنين أو أكثر من الأطوال الموجية في كثير من الأحيان بما فيها موجات 405 نانومتر، مما يزيد القدرة للتفاعلات الأحدث (طرق الركيزة الكروموجينية). في تسعينات القرن العشرين، أدرج عدد من الشركات عدة طرق كشف بنجاح، والتي تعطي الآن أي مختبر واحد إمكانية تطبيق منهجيات مختلفة باستخدام المعدات نفسها.

الشكل 1.41: مزايا وعيوب طرق الكشف في مقاييس التحديد

الطريقة	المزايا	العيوب
الميكانيكية	• لا تداخل بسبب الخصائص الفيزيائية مثل فرط شحميات الدم أو انحلال الدم • قد تستخدام كميات عينة صغيرة • يمكن لبعضها تحليل الدم الكامل لبعض الاختبارات، وإزالة الحاجة إلى الطرد المركزي	• استحالة مراقبة الرسومات البيانية لتشكّل الجلطة • قد تحتوي على مشاكل في الكشف عن (endopoint) في بعض العينات ذات الفيبرينوجين المنخفض
الصورة البصرية	• إمكانية الحصول على رسومات بيانية لتشكيّل الجلطة • التدقيق البصري لانحلال الدم/ فرط شحميات الدم/ اليرقان في بعض الأنظمة البصرية	• التداخل بسبب زيادة فرط شحميات الدم، انحلال الدم، فرط بيليروبين الدم، أو البروتين في بعض الأنظمة • قد تحتوي بعض النظم الحالية صعوبات في الكشف عن التجلط عند استخدام بعض الكواشف الشفافة تماماً • قد لا يتم الكشف عن فترات التخثر القصيرة جداً بسبب التأخير قبل الشروع في المراقبة
النيفيلومترية	• يمكن قياس تفاعلات الأنتيجين • الأجسام المضادة في البروتينات الموجودة في كميات صغيرة جداً	• عدد محدود من الاختبارات المتوفرة • تكلفة الكواشف
الكروموجينية (التولّد اللوني)	• قد تكون المقايسات المحددة كلياً الأسهل • قد تكون المقاييس إضافية غير مناسبة للقياس من خلال كشف التجلط ممكنة • تزيد من ذخيرة من الفحوصات الممكنة • تحسينات ممكنة في الدقة بالمقارنة مع التحليلات المستندة إلى الجلطة	• محدودة بالطول الموجي للأدوات • تتطلب كميات اختبار كبيرة لنسبة التكاليف والمنافع الإيجابية • تكلفة الأدوات والكواشف
المناعية	• يمكن أتمتة الطرق اليدوية التي تستغرق وقتا طويلا • زيادة عدد الاختبارات الممكنة	• محدودية عدد من الاختبارات المتاحة • تكلفة الأدوات • تكلفة الكواشف

المبدأ المناعي

تستخدم عادة جسيمات اللاتكس المجهرية الدقيقة (microparticles) المغلفة بالأجسام المضادة عموماً مقابل (المستضد) التحليلي الذي يتم قياسه. يخترق شعاع ضوي أحادي اللون تعليق جسيمات اللاتكس المجهرية الدقيقة (microparticles). عندما يكون الطول الموجي أكبر من قطر جسيمات التعليق، تمتص الجسيمات كمية صغيرة من الضوء. ومع ذلك، عندما تأتي جسيمات لاتكس مجهرية مغلفة بأجسام مضادة في اتصال مع الأنتيجين الموجود في المحلول، فإنها تلتصق بالأجسام المضادة، وتشكيل روابطاً بين الجسيمات، التي تنتج تراصاً. عندما يقترب قطر الجسيمات من الطول الموجي للشعاع الضوئي أحادي اللون، ويتم امتصاص أكبر كمية من الضوء. وتتناسب هذه الزيادة في امتصاصية الضوء مع التراص، والتي تتناسب بدورها مع كمية المستضد في العينة. يتوفر هذا النوع من التكنولوجيا في تحاليل تخثر أكثر تطوراً تم عرضها في السوق في التسعينات من القرن الماضي. وعادة، يمكن أداء المقايسات المناعية القياسية التي تستغرق وقتا طويلاً في غضون دقائق عند استخدام أي من هذه الأدوات المؤتمتة.

مزايا الأتمتة في مختبر التخثر

1. تحسين سعة ومرونة الوقت المهني المقضي (روداك، 1995).
2. تحسن إعادة القيام بالاختبار. في الماضي، لم تكن اختبارات التخثر اليدوية دقيقة، وبمعاملات تباين أكبر من 20 %، وتوفر المعدات شبه الآلية قدراً أكبر من الدقة في اختبار التخثر. ومع ذلك، عند إخراج العينات والكواشف يدوياً، يجب القيام بالاختبار بشكل مكرر. أما باستخدام المعدات الآلية بالكامل فقد تحسنت الدقة تماماً، مما حقق معاملات تباين أقل من 5 %، وحتى 1 % لبعض الاختبارات. وقد حدى هذا بالمؤلفين إلى تقديم فكرة التجارب الواحدة واحتمالية خفض تكاليف الكاشف والكوفيتات بمقدار النصف.
3. التقليل من تكاليف العينات والكواشف.
4. تسهيل تخزين البيانات وأنظمة الاسترجاع بواسطة برامج الكمبيوتر.
5. تسمح بالتكرار الآلي للنتائج حين تقع اخطاء في الجولة الأولى.
6. توفر إمكانية القيام بمختلف التجارب باستخدام عينة واحدة.
7. يسمح بأخذ العينات من أنبوب مغلق، مما يحسن سلامة وكفاءة اختبارات التخثر. ويقلل هذا إلى حد كبير من احتمال تعرض المشغل للرذاذ أو انسكاب العينة المريضة، أو الأخطاء في وضع الملصقات. ويقدم أحد المصنّعين نظام فرز حاصل على براءة اختراع يفصل البلازما من كريات الدم الحمراء تلقائياً قبل الاختبارات ودون عملية الطرد المركزي المسبقة.
8. يوفر إمكانية تخفيف العينات، والمعايرة، والمراقبات. يمكن برمجة المعدات اللازمة لتخفيفات إضافية إذا أفلتت النتائج الأولية من خطية طرق الفحص. ويمكن أيضاً القيام باختبارات أخرى تلقائياً دون تدخّل المشغل أو إذا أشرت سريرياً بسبب نتائج المرحلة الأولية.
9. تشمل معظم أجهزة التحليل نظم إنذار تحذر المشغل حول الزيادة في قراءات ما قبل التأسيس، والتي قد تحدد مشكلة المعدات (مثلاً كمية صغيرة من الكاشف، إخفاق درجة الحرارة، عينة صغيرة جداً، وأخطاء مراقبة الجودة).

يجب أن تكون مزايا وعيوب أنواع الطرائق المختلفة المتوفرة معروفة ومفهومة لغرض ضمان دقة وصحة نتائج الاختبار. من المهم الأخذ بنظر الاعتبار أن المختبرات مسؤولة عن نتائج جديرة بالثقة. إن أهم ما يشغل المختبر هو اختيار معدات التخثر التي ستعطي نتائجٍ مناسبة على الرغم من قيود الميزانية. وتتطلب مثل هذه الأدوات صيانة فنية دورية، ومعرفة دائمة، وتحكماً بالنظام، إذ يمكن للخطأ أو الإخفاق أن يؤثر بشكل حاسم على عدد من النتائج. لذا تُصبح نظم المراقبة التي تضمن الثقة التحليلية إجبارية.

قد تكون العديد من المختبرات محظوظة بما فيه الكفاية لتكون قادرة على تقييم المعدات قبل شرائها. إن لم يكن ذلك ممكناً، فمن المهم جداً الحصول على معلومات وافية ومشورة من أحد المختبرات المرجعية.

عند تقييم معدات جديدة قبل شرائها، قارن أولاً أجهزة التحليل وفقاً لمعايير مثل:

- تكلفة المعدات
- فترة عدم التشغيل والموثوقية
- وقت الاستجابة للإصلاح
- سهولة الاستخدام
- توافر الصيانة الكافية ضمن إطار زمني مناسب
- عملية التحقق من الصحة والإنتاجية
- تكلفة عناصر الاستعمال مرة واحدة
- المرونة في استخدام الكواشف من مصنّعين آخرين
- إمكانية إضافة بروتوكولات اختبارات جديدة
- دورات تدريبية ودعم تدريبي مستمر (روداك، 1995)

ستختلف حساسية الأنواع المختلفة من المعدات اللازمة للمقاييس المتعددة تبعاً لكيفية معايرة الأجهزة وكيفية الكشف عن نقطة النهاية. لدى المختبرات احتياجات مختلفة، ومن المستحسن ترتيب الأولويات. وعلى سبيل المثال، انظر الشكل 2.41.

التكنولوجيا في تطور، وتولّد المتطلبات اليومية المتزايدة الحاجة إلى أدوات من هذا النوع في المختبر. حيث ستشكل هذه الأدوات خطوة كبيرة إلى الأمام في مجال المختبرات، نظراً لإمكانية إجراء الاختبارات بطريقة موثوقة ودقيقة ومُحكمة، وتقديم النتائج في فترة زمنية أقصر، وتحت سيطرة أفضل.

إن مزايا الأتمتة هائلة. تتقدم التكنولوجيا بشكل مستمر لتلبية التطورات الجديدة في الميدان، وتقليل أوقات التنفيذ، مما يتيح للاختبارات أن تكون موثوقة ودقيقة ومُحكمة، مع المحافظة على الجودة.

الشكل 2.41: خصائص المعدات المتخصصة

المصدر: روداك، 1995

الخصائص	الوصف
وصول عشوائي	مع عينة المريض، يمكن إجراء اختبارات مختلفة ومتباينة في أي ترتيب، وفي الوقت نفسه.
الأنبوب الرئيسي للعينة	يتم أخذ عينة البلازما مباشرة بواسطة التقطير في أنبوب جمع مفتوح وموضوع في المحلل.
اختراق سدادة إغلاق أنبوب أخذ العينات	يفرّغ جهاز التحليل عينة البلازما داخل أنبوب الجمع والسدادة المطاطية في مكانها.
الباركود (الرمز الشريطي)	يتيح الباركود تعريف الكاشف، عينات المرضى، أو كليهما. ويقلل هذا من الإدخال اليدوي للبيانات.
ثنائية الاتجاه بين المراحل	يحتاج المحلل كمبيوتراً مركزياً لتحديد العدد المطلوب من الاختبارات. ولا يحتاج المشغل إلى برمجة المعلومات في المعدات يدوياً.
مؤشر العينة	يحذر المشغل من المشاكل حول سلامة العينة.
استشعار مستوى السائل	يحذر المشغل حول عدم كفاية كمية العينة أو الكاشف لاختبار وافي، أو إذا لم تكن المعدات تسحب العينة بما فيه الكفاية لأداء الاختبار المطلوب.
برامج مراقبة الجودة المتكاملة	يخزن برنامج كومبيوتر الآلات وينظم بيانات مراقبة الجودة. وقد تشمل التطبيق الكامل لأنظمة ويستجارد للإشارة إلى النتائج الواقعة خارج الحدود.
قدرات STAT	تسمح للمشغل بإلغاء تسلسل التحقق من الاختبار لغرض وضع عينة STAT جديدة في عازل التحقق.
سعة تبريد عينات متكاملة	تحافظ على سلامة العينات والكاشف أو كليهما أثناء عملية التحقق.
سعة تخزين عينات متكاملة	تشير إلى مقدار عينة المريض التي يمكن تحميلها في المحلل في أي وقت محدد.
القدرة على اختبار الانعكاس	يجعل من الممكن برمجة المعدات لتكرار أو إضافة اختبارات تحت مقاييس محددة من قبل المشغل.
تخزين بيانات المريض	قدرة المحلل على تخزين نتائج الاختبار التي يمكن طلبها في أية لحظة. وقد يخزن منحنيات تشكّل الجلطة.
مراقبة كمية الكاشف	يحذر المشغل حول قلة كمية الكاشف لاجراء الاختبارات المبرمجة.
المعالجة	عدد الاختبارات التي يمكن معالجتها أثناء فترة محددة (تصنف عموماً بأنها عدد الاختبارات لساعة واحدة).
منحنى تشكّل الجلطة	يتيح للمشغل تصوير تشكّل الجلطة داخل الكفيت. ويساعد على الكشف عن ظروف معينة غير منتظمة أو حالات مرضية، أو مكان ومحلول إخفاق نتيجة الاختبار المنحرفة.

المراجع

Rodak BF (ed): *Diagnostic Hematology*. Philadelphia: WB Saunders, 1995: 626–631.

Thomas LC, Sochynsky CL. Multiple measuring modes of coagulation instruments. *Clin Hemost Rev* 1999; 13:8.

المنشورات الأخرى ذات الصلة

Graves S, Holman B, Rossetti M, Estey C, Felder R. Robotic automation analysis. *Clinica Chimica Acta* 1998; 278:269–279.

Sasaki M, Kageoka T, Ogura K et al. Total laboratory automation in Japan: Past, present and the future. *Clinica Chimica Acta* 1998; 278:217–227.

42 التحليل الجزيئي الوراثي

تغطي مطبوعة حديثة منفصلة صادرة عن لجنة علوم المختبرات في الاتحاد العالمي للهيموفيليا (WFH)، من تأليف كل من البروفسور أمبايوان تشونسومريت والدكتور آن جوديف، الطرق المختبرية المتصلة بجميع جوانب الاختبارات الجينية الجزيئية في ما يتعلق بالهيموفيليا والاضطرابات المترافقة معها. يتناول دليل المختبرات هذا، التحليل المظهري، وسيكون متوفراً للتنزيل المجاني من خلال الموقع الإلكتروني للاتحاد العالمي للهيموفيليا (WFH)، www.wfh.org.

الاتحاد العالمي للهيموفيليا
1425 رينيه ليفيسك بوليفارد ويست، جناح 1010
مونتريال، كيبيك H3G 1T7
كندا

هاتف: 875-7944 (514)
فاكس: 875-8916 (514)
البريد الإلكتروني: wfh@wfh.org
الموقع الإلكتروني: www.wfh.org

WORLD FEDERATION OF
HEMOPHILIA
FÉDÉRATION MONDIALE DE L'HÉMOPHILIE
FEDERACIÓN MUNDIAL DE HEMOFILIA
Treatment for All