

موارد مصرف:

تعیین کمی زمان ترومبوپلاستین فعال شده نسبی در پلاسمای انسانی مقدمه

مقدمه:

تست زمان ترومبوپلاستین فعال شده نسبی (APTT) به عنوان یک تست غربالگری عمومی برای تشخیص اختلالات انعقادی در مسیر داخلی انعقاد استفاده می‌شود و همچنین به عنوان یک تست شایع در غربالگری درمان با ضد انعقاد داخل رگی کاربرد دارد. آزمایش زمان ترومبوپلاستین نسبی فعال شده یک تست غربالگری عمومی برای ارزیابی فاکتورهای مسیر داخلی و مشترک انعقادی شامل فاکتورهای انعقادی VIII, IX, X, XI, XII, III و فبرینوژن می‌باشد (۱)

اصول آزمایش:

در آزمایش APTT مسیر انعقادی در حضور کلسیم، سفالین و فعال کننده‌ی فاکتور XII (الایژیک اسید) فعال می‌شود و لخته‌ی قابل تشخیص تشکیل می‌شود. زمان لازم برای تشکیل لخته تحت عنوان APTT در نظر گرفته می‌شود.

محتویات کیت:

کیت شامل دو معرف است. معرف اسفالین (تهیه شده از یافت مغزی خرگوش) به علاوه‌ی الایژیک اسید حل شده در بافر ایمیدازول به علاوه‌ی سدیم آزاید به عنوان نگه دارنده و معرف ۲: کلسیم کلرید ۰/۰۲۵ مولار معرف حاوی سدیم آزاید (> گرم در لیتر) به عنوان نگهدارنده است.

آماده سازی محلول ها:

محتویات، کیت آماده‌ی مصرف می‌باشند این معرف ها توسط روش های دستی، نیمه اتوماتیک و تمام اتوماتیک قابل استفاده است.

نگهداری محلول ها:

معرف های موجود در ویال های دست نخورده تا زمان انقضاء مشخص شده روی برچسب جعبه، هنگامی که در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد ذخیره می‌شوند، پایدار هستند. معرف ها نباید فریز شود. در صورت نگهداری معرف آب شده در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد، اجازه دهید معرف قبل از استفاده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۱۸-۲۵ درجه سانتیگراد) بماند. پس از باز کردن ویال، محلول به مدت ۸ روز قابل استفاده است.

مواد و تجهیزات که مورد نیاز هستند ولی در کیت موجود نیستند:

- دستگاه کوآگولومتر (در روش اتوماتیک و یا نیمه اتوماتیک)
- بن ماری در روش دستی
- سمپلر های مختلف برای روش دستی و نیمه اتوماتیک و سر سمپلر دستی
- چراغ مطالعه در روش دستی
- کورنومتر در روش دستی
- کنترل نرمال و پاتوژن

شرایط جمع آوری و پایداری نمونه:

- خونگیری برای تست های انعقادی باید در لوله های حاوی ضد انعقاد سیتراست سدیم ۳/۲٪ انجام شود. نسبت خون به ضد انعقاد ۹ به ۱ باید باشد.
- از نمونه‌ی همراه با EDTA، هپارین، و اگزالات استفاده نشود.
- پلاسمای مورد استفاده پلاسمای فقیر از پلاکت (PPP) (سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۲۰۰۰ g) است. تعداد پلاکت ها باید کمتر از ۱۰۰۰۰ باشد. پلاسمای به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق و دو هفته در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد قابل نگه داری است.
- از نمونه های کدر و ایکتریک برای انجام تست PTT استفاده نکنید.
- نمونه‌هایی که کمتر از ۹۰ درصد حجم مورد انتظار در لوله های نمونه گیری پر شده اند قابل قبول نمی‌باشند.
- بلافاصله پس از خونگیری با سر و ته کردن لوله، خون با ماده‌ی ضد انعقاد مخلوط شود.

روش انجام آزمایش:

قبل از انجام آزمایش معرف های سفالین و کلسیم کلرید به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داری شوند و سپس به مدت پنج دقیقه در دمای ۳۷ درجه قرار داده شوند. جهت انجام تست ۱۰۰ میکرولیتر نمونه به علاوه ۱۰۰ میکرولیتر معرف سفالین به داخل لوله آزمایش ریخته شود و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شود. سپس ۱۰۰ میکرولیتر معرف کلسیم کلرید اضافه شود و همزمان کورنومتر روشن شود و زمان لازم برای تشکیل لخته به عنوان نتیجه‌ی PTT ثبت شود.

کنترل کیفی:

در هر ران کاری از نمونه‌ی کنترل نرمال و کنترل بالا استفاده کنید تا از عملکرد صحیح کیت مطمئن شوید.

در صورتی که نتایج هر یک از کنترل ها در محدوده‌ی مورد نظر نبود، تمام اجزای آزمایش از قبیل سمپلر ها، بن ماری و کورنومتر بررسی شود و مجدد تست انجام شود اگر همچنان نتایج خارج از محدوده‌ی مورد نظر بود از یک معرف دیگر استفاده کنید.

اهمیت بالینی:

نقص ارثی یک یا چند فاکتور مسیر داخلی انعقاد منجر به طولانی شدن PTT می‌شود. همچنین وضعیت‌های اکتسابی مثل بیماری‌های کبدی، DIC، ضدانعقاد لوپوسی، درمان با هپارین و آنتاگونیست‌های ویتامین K (مثل وارفارین) و درمان با مهارکنندگان ترومبین (مثل هیرویدین و آرگاتروبان) منجر به افزایش PTT می‌شود. (۲)

محدوده‌ی نرمال:

مقادیر نرمال آزمایش APTT به شرایط انجام آزمایش بستگی دارد و ممکن است در آزمایشگاه های مختلف متفاوت باشد. بنابراین ضروری است که هر آزمایشگاه محدوده

نرمال خود را با توجه به جمعیت مراجعه کننده تعیین کند و در صورت تغییر روش یا دستگاه محدوده‌ی نرمال جدید تعیین شود. نتایج حاصل از بررسی ۱۲۰ فرد نرمال با این کیت نشان دهنده‌ی محدوده نرمال ۲۷/۷ تا ۳۷/۶ ثانیه بود.

مقادیر درمانی برای غربالگری با ضدانعقاد های وریدی از آزمایشگاهی به آزمایشگاه دیگر متفاوت است این مقادیر فقط باید به عنوان راهنما استفاده شوند هر آزمایشگاه باید محدوده مرجع طبیعی (NRR) را با استفاده از ابزار دقیق روش‌های جمع آوری خون و تکنیک های آزمایش مورد استفاده در آن آزمایشگاه تعیین کند (۳).

دامنه درمانی با هپارین توسط پزشک و آزمایشگاه باید بر اساس دستورالعمل های داخلی و پزشکی تعیین شود و صحت گذاری باید توسط آزمایشگاه برای هر سری ساخت انجام شود و آزمایشگاه در برکه نتیجه آزمایش باید درج کند که پزشک صرفا به نتیجه آزمایش جهت تعیین مقدار هپارین اکتفا نکند و علائم بالینی بیمار را نیز در نظر بگیرد.

آزمایشگاه باید هر گونه عدم انطباق در نتیجه را به بخش پشتیبانی شرکت اطلاع دهد.

محدودیت ها و تداخلات:

محدودیت ها

در بیمارانی که میزان هماتوکریت بالاتر از ۵۵ درصد باشد نیاز است که در نسبت سیتراست به خون اصلاحاتی صورت گیرد در غیر اینصورت سیتراست اضافی در برابر میزان کم پلاسمای بیمار دارای هماتوکریت بالا با کلسیم پیوند برقرار می‌کند و باعث طولانی شدن کاذب زمان آزمایش می‌شود. برای محاسبه حجم مناسب در این شرایط از فرمول زیر استفاده می‌شود:

$$\text{حجم کل خون} \times \frac{\text{HCT-100}}{\text{HCT-595}} = \text{حجم سیتراست}$$

- تورنیکت را بیش از یک دقیقه نبندید چون باعث تراکم فاکتورهای VIII، فبرینوژن و وون ویلبراند می‌شود.
- افزایش بیش از حد یک فاکتور انعقادی ممکن است افزایش PTT را در حضور کمبود فاکتورهای انعقادی، نرمال کند و بر کمبود آنها پوشش گذارد حالت فوق می‌تواند در افزایش فاکتور ۸ گروه پروتئین های فاز حاد قرار می‌گیرد رخ دهد. همچنین آزمایشات انعقادی در افزایش فاکتورهای انعقادی ممکن است کمتر از زمان پلاسمای کنترل باشد.
- افزایش زمان PTT همراه با آزمایش PT نرمال و بدون سابقه‌ی خونریزی ممکن است دال بر کمبود فاکتورهای تماسی باشد.
- از نگهداری طولانی مدت بیش از ده دقیقه پلاسمای بیمار یا کنترل در دمای ۳۷ درجه قبل از آزمایش خودداری کنید.
- در نمونه گیری با لوله های خلا که دارای سوزن مشترک هستند نمونه های مربوط به آزمایش انعقادی را در ابتدا بگیرد چون آغشتگی سوزن به EDTA یا Clot Activator درون لوله ها باعث تداخل در آزمایشات فوق می‌شود (۳).
- این کیت برای کار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ± 0.5 درجه سانتی گراد طراحی شده است. مرتباً دمای تمام المنت های گرمایی را بررسی کنید.
- واکنش های التهابی فاز حاد می‌تواند به علت افزایش فبرینوژن منجر به کاهش زمان PTT شود.
- انجماد و ذوب پلاسمای حاوی سلول های باقیمانده باعث ایجاد غشای سلولی آسیب دیده می‌شود و نتایج را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

مواد دخالت کننده

اگزالات سدیم، EDTA و هپارین ضد انعقاد های مناسبی نیستند.

★ مقادیر بالای بیلی روبین، هموگلوبین آزاد پلاسمای (در نمونه های همولیز شده) کلسترول، تری گلیسرید و آسکوربیک اسید می‌تواند در نتیجه ی تست های انعقادی تداخل کند. آنالیت های فوق تا مقادیر زیر تداخلی در تست PTT انجام شده توسط این کیت ندارند:

- بیلی روبین تا سطح 22 mg/dl (376 μmol/L)
- هموگلوبین آزاد پلاسمای تا سطح 450 mg/dl
- کلسترول تا غلظت 600 mg/dl
- تری گلیسرید تا سطح 800 mg/dl
- آسکوربیک اسید تا سطح 48 mg/l

ایمنی و دفع پسماند:

این کیت صرفاً برای استفاده توسط پرسنل واجد شرایط آزمایشگاه طراحی شده است. در هنگام کار با معرفهای آزمایشگاهی رعایت کردن اقدامات احتیاطی مورد نیاز ضروری میباشد در صورت شکسته بودن ویال، کیت قابل استفاده نیست.

از آلوده کردن معرف ها خودداری کنید.

از سرسمپلر های یک بار مصرف استفاده کنید.

این معرفها غیر قابل خوردن و نوشیدن هستند در مورد چگونگی دور ریختن مواد از قوانین تدوین شده پیروی شود.

معرف های حاوی سدیم آزاید باید با احتیاط دور ریخته شوند تا از ایجاد آزاید های فلزی قابل انفجار جلوگیری شود. اگر مواد زائد در سینک ها ریخته می‌شود، از مقدار زیادی آب برای شستشو استفاده کنید (۴).

ویژگی های عملکردی:

۱- حساسیت به فاکتورها :

یک معرف APTT با حساسیت کافی باید در نمونه هایی با فعالیت فاکتور ۲۰-۳۰٪ افزایش نشان دهد (۷). معرف APTT در پلاسمای با کاهش خفیف و شدید فاکتور های ۸ و ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ انعقادی ارزیابی شد و نتایج به شرح زیر بود (جدول در پشت برگه) :

۲- همبستگی (Correlation)

در ارزیابی همبستگی نتایج بین کیت حاضر با کیت PTT شرکت ترموفیشر با استفاده از دستگاه کواکولومتر نیمه اتوماتیک استکو نتایج زیر به دست آمد. قابل ذکر است که در این ارزیابی ۱۵۰ فرد با دو کیت مورد ارزیابی قرار گرفتند که از بین بیماران، ۴۰ نفر نرمال، ۴۰ نفر دارای سطح ۱۸-۲۵ درصد فاکتور ۸ و ۴۰ نفر دارای سطح ۲-۱۸ درصد فاکتور ۸ و ۳۰ نفر دارای سطح کمتر از ۲۰٪ فاکتور ۹ انعقادی بودند.

PT Correlation	
Heamostica PTT vs Fisher PTT N= 150	$y=0.9741x+0.641$ $R^2 = 0.9955$

علایم مورد استفاده در لیبل

مورد استفاده در آزمایشگاه تشخیص پزشکی	
به دفترچه‌ی راهنما مراجعه کنید.	
در دمای دو تا ۸ درجه نگه داری شود.	
معرف حاوی سدیم آزاید است.	
آدرس تولید کننده	
تاریخ انقضا	
لات نامبر	
دور از رطوبت نگه داری شود.	
تاریخ تولید	
تعداد تست قابل انجام توسط کیت	

References

1. Errichetti, A.M., Holden, A., Ansell, J.: Management of Oral Anticoagulant Therapy: Experience with an Anticoagulation Clinic. Arch Inter Med. 144:1966-68, 1984.
2. Hirsh, J., Dalen, J.E., Deykin, D., Poller, L.: Oral Anticoagulants: Mechanisms of Action, Clinical Effectiveness and Optimal Therapeutic Range. Chest 102(Suppl): 312S-316S, .2991
3. NCCLS: Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays; Approved Guideline. NCCLS document H21-A4. NCCLS, Wayne, PA, 2003. 4. Palmer, R.N., Gralnick, H.R.: Inhibition of the Cold Activation of Factor VII and the Prothrombin Time. Am J Clin Path. 81: 618-622, 1984.
5. Young, D.S., Thomas, D.W., Friedman, R.B., et al: Effect of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Clin Chem 18:1041, 1972.
6. Dalen, J.E., Hirsh, J.: American College of Chest Physicians and the National Heart, Lung, and Blood Institute National Conference on Antithrombotic Therapy. Arch Inter Med. 149:274-264:641 .6891
7. Palaereti, G., Coccheri, S., Poggi, M., et al: Oral Anticoagulant Therapy Control: Evidence that the INR Expression Improves the Interlaboratory Comparability of Results. The Bologna Oral Anticoagulant Control Exercise. Thromb Haemostasis 58:905-910, 1987.

شرکت شفا آزما پارسیان

آدرس: تهران، خیابان وصال شیرازی، خیابان ایتالیا، پلاک ۴۱، طبقه هفتم

تلفن: ۹۱۳۰۵۹۱۹ (۰۲۱)

Factor	% Activity	PTT (seconds)
VIII	<1%	78
VIII	20%	41
IX	<1%	82
IX	20%	43
XI	<1%	95
XI	20%	48
XII	<1%	99
XII	20%	38

همچنین معرف APTT در پلاسماهای با کاهش خفیف و شدید فاکتور های ۸ و ۹ انعقادی در تعداد غلظت‌های بیشتر ارزیابی شد و نتایج به شرح زیر بود:

حساسیت به فاکتور ۹		حساسیت به فاکتور ۸	
سطح فاکتور (%)	PTT (seconds)	سطح فاکتور (%)	PTT (seconds)
100	32	100	34
50	38	50	40
25	47	25	49
12.5	70	12.5	65
6.25	95	6.25	92

۲- حساسیت به هیپارین:

میزان حساسیت معرف‌ها به درمان با هیپارین بسته به مارک تجاری هیپارین و تجهیزات و معرف‌های مورد استفاده متفاوت است و هر بیمارستان باید منحنی حساسیت به هیپارین خود را با برند هیپارینی که در آن مرکز استفاده می‌شود تعیین کند و بر آن اساس رنج درمانی تعیین شود.

حساسیت کیت حاضر به هیپارین به شرح زیر می‌باشد:

نتیجه TTP	غلظت هیپارین (unit/ml)
29	0
40	0.1
51	0.2
64	0.3
82	0.4
100	0.5

دقت: دقت تست PTT به عوامل زیادی مانند ابزار، تکنیک و معرف مورد استفاده بستگی دارد. جهت ارزیابی دقت، نمونه‌های کنترل نرمال و غیر نرمال و نمونه‌های بیماران نرمال و غیر نرمال به مدت ۲۰ روز، روزانه دو ران و در هر ران دو تکرار (مجموعاً ۸۰ تکرار) در جدول زیر خلاصه شده است.

	Control Normal	Control Abnormal	Human Normal Plasma	Human Abnormal Plasma
Mean	32.3	51.8	35.5	48.9
SD	0.38	0.52	0.437	0.51
CV%	1.18	1.01	1.23	1.05
S_R (within-run precision)	0.38	0.58	0.45	0.50
S_T (Estimate of within-device or within-laboratory precision standard deviation)	0.38	0.52	0.43	0.51
S_{rr} (Estimate of Between-Run Standard Deviation)	0.006	0.101	0.034	0.015