اساس و روش کار کوآگولومترها و آشنایی با منابع خطا

دکتر حبیبا... گل‌افشان عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

رضا رنجبران کارشناس ارشد هماتولوژی

بسیاری از تست‌های انعقادی مانند آزمایش‌های روزمره PT و PTT و اندازه‌گیری فیبرینوژن بر پایه زمان لخته شدن پلاسما صورت می‌گیرد. در این بخش با طریقه سنجش زمان لخته با سازوکارهای مختلف در انواع کوآگولومترها آشنا می‌شوید.

تاریخچه

در اوایل سال 1900 زمان لازم جهت لخته شدن خون در لوله آزمایش با خم و راست کردن لوله مورد سنجش قرار گرفت که به عنوان زمان انعقاد خون در روش Lee white tilt tube به کار گرفته شد.

در سال 1910 دستگاه سنجش ویسکوزیته خون (Coaguloviscosimeter) با ثبت تغییرات ولتاژی حین انعقاد خون قادر به ثبت پایان زمان انعقاد بود.

تست‌های انعقادی ریشه در مطالعات فردی به نام گرام دارد که زمان انعقاد را با افزودن کلرور کلسیم به پلاسما بدست آورد و این روش امروزه اساس کار دستگاه ترومبوالاستوگرافی (TEG) را شکل می‌دهد.

اصول دستگاه‌های مبتنی بر تشکیل لخته به عنوان نقطه پایان آزمایش (Clot end point)

دستگاه‌های کوآگولومتر، اتوماتیک و یا نیمه اتوماتیک هستند. در دستگاه‌های نیمه اتوماتیک نیاز به اضافه کردن پلاسما و معرف‌های آزمایش توسط اپراتور به کووت دستگاه می‌باشد و در یک زمان قادر به انجام یک تا دو تست است، در حالیکه دستگاه‌های اتوماتیک دارای سیستم پیپتینگ (Pipetting) برای انتقال پلاسما و معرف‌هاست و همزمان چندین تست را می‌تواند انجام دهد.

دستگاه‌های کوآگولومتر اتوماتیک دارای سیستم پیپتینگ (Pipetting) برای انتقال پلاسما و معرف‌هاست و همزمان چندین تست را می‌تواند انجام دهد

کوآگولومترهای اتوماتیک و نیمه اتوماتیک از صحت و دقت بهتری نسبت به روش‌های دستی برخوردارند.

تجهیزات مبتنی بر اساس تشکیل لخته در 5 گروه جای می‌گیرند:

1-الکترو مکانیکی (Electromechanical)

2-فتواپتیک (Photo-optic) یا توربیدومتریک

3-نفلومتریک (Nephlometric)

4-کروموژنیک (Chromogenic) یا آمیدولیتیک

5- ایمونولوژیک (Immunologic)

سنجش نقطه پایان بر اساس الکترومکانیکال (Electromechanical end point)

روش‌های گوناگون الکترومکانیکی برای ثبت زمان تشکیل لخته به عنوان پایان تست ابداع شده است.

در یکی از این روش‌ها یک گوی استیل (Steel ball) در کووت دستگاه که در انتهای آن یک انحنا وجود دارد، قرار داده شده است. میدان الکترومغناطیسی حرکت گوی به جلو و عقب را حس می‌کند. تشکیل لخته‌های فیبرینی گوی را از حرکت باز می‌دارد و در این لحظه زمان‌سنج دستگاه متوقف می‌گردد.

در روش دیگر گوی استیل در لوله آزمایش جایگاه ثابتی دارد که توسط میدان الکترومغناطیسی این جایگاه تحت‌نظر است. تشکیل لخته فیبرینی گوی را از محل جابجا کرده و در این لحظه زمان‌سنج، پایان زمان انعقاد را ثبت می‌کند.

در روش دیگر از دو الکترود (Probe) که یکی متحرک و دیگری ثابت است استفاده می‌شود. الکترود متحرک به‌طور مرتب به لوله تست وارد و خارج می‌شود و هر سیکل ورود و خروج موجب قطع جریان می‌گردد. با تشکیل لخته روی الکترود متحرک که هادی جریان الکتریکی است جریان منقطع به جریان پیوسته تبدیل می‌شود و این لحظه توسط دستگاه به عنوان نقطه پایان ثبت می‌گردد.

سنجش نقطه پایان براساس فتواپتیک:

کوآگولومتر در این حالت تغییرات جذب نوری (OD) یا عبور نور (Transmittance) را در طی فرآیند لخته شدن شناسایی می‌کند. در بسیاری از کوآگولومترها نور با طول موج ثابت بین 500 تا 600 نانومتر به لوله آزمایش تابانده می‌شود، ولی امروزه این دستگاه‌ها از طول موج 405 نانومتر نیز برای سنجش کروموژنیک بهره می‌برند.

میزان جذب نوری وابسته به شفافیت و رنگ پلاسماست که برای هر بیمار به عنوان پایه ثبت می‌گردد. تشکیل لخته فیبرینی موجب افزایش جذب نور گردیده که میزان جذب نوری با میزان جذب نوری پیش فرضی که از قبل به دستگاه داده شده است، مقایسه و با رسیدن به جذب نوری هدف، زمان‌سنج متوقف می‌گردد.

نکته مهم:

با توجه به اینکه میزان OD پایه از OD نهایی کسر می‌شود از این رو اثرات نمونه لیپمیک و یرقانی روی نتایج اندک است. در بسیاری از دستگاه‌های فتواپتیک همزمان از طول موج‌های گوناگون جهت افتراق و کاهش اثرات لیپیدمی و بیلی‌روبینمی از طریق فیلتر کردن جذب نوری ناخواسته، استفاده می‌شود.

سنجش نقطه پایان بر اساس کروموژنیک (آمیدولیتیک):

در این روش که برای سنجش فعالیت فاکتورهای انعقادی استفاده می‌شود از یک الیگوپپتید مصنوعی که توالی آمینو اسید آن شبیه سوبسترای واقعی فاکتور فعال موردنظر در بدن است، استفاده می‌شود. این الیگوپپتید در جایگاه شکستگی با یک کروموفور (Chromophore) مانند پارانیتروآنیلین (PNA) کانژوگه شده است و اثرگذاری فاکتور فعال بر الیگوپپتید موجب رهاسازی پارانیتروآنیلین می‌شود که به رنگ زرد است. شدت رنگ زرد با فعالیت فاکتور موردنظر در ارتباط بوده و در طول موج 405 قرائت می‌شود. در برخی از روش‌ها از کانژوگه فلورسنت استفاده شده که به آن روش فلوروژنیک گفته می‌شود.

مثال اول: برای سنجش فعالیت فاکتور ده (X) نخست با افزودن سم افعی راسل و یون کلسیم آنرا فعال کرده و سپس در مجاورت سوبسترای مخصوص کانژوگه شده با پارانیتروآنیلین قرار می‌گیرد. شدت رنگ زرد با فعالیت فاکتور 10 در ارتباط است.

مثال دوم: هپارین با وزن مولکولی کم بطور عمده فاکتور 10 فعال را خنثی می‌کند؛ از این رو برای سنجش دُز درمانی هپارین با وزن مولکولی کم از سنجش خاصیت ضد فاکتور 10 فعال در پلاسمای بیمار به روش کروموژنیک استفاده می‌شود. برای این کار به پلاسمای بیمار فاکتور 10 فعال در مقدار تعیین شده اضافه می‌گردد. برخی از کیت‌ها همراه فاکتور 10 فعال دارای آنتی‌ترومبین بوده و برخی، از پلاسمای بیمار به عنوان منبع آنتی‌ترومبین استفاده می‌کنند.

هپارین موجود در پلاسمای بیمار با اتصال به آنتی‌ترومبین، فاکتور 10 فعال افزوده شده را خنثی می‌کند و چنانچه فاکتور 10 فعالی باقی بماند موجب هیدرولیز سوبسترای اختصاصی و رهاکردن رنگ زرد PNA می‌شود و از این رو شدت رنگ زرد با میزان هپارین در پلاسمای بیمار نسبت عکس دارد.

نمونه‌ای از آنالیزورهای کروموژنیک

سنجش نقطه پایان بر اساس نفلومتریک (Nephlometric End Point)

نفلومتری شبیه فتواپتیک است با این تفاوت که به جای سنجش جذب نوری، میزان پراکنش نور تابشی در زاویه 90 درجه و زاویه روبرو سنجیده می‌شود. یک دیود (Diode) ساطع‌کننده، نور تابشی را در حدود 600 نانومتر تولید کرده و یک دستگاه نورسنج (Photodetector) پراکنش نور را در زوایای 90 درجه (Side) و نزدیک 180 درجه یا زاویه روبرو (Forward) اندازه می‌گیرد. با تشکیل لخته فیبرینی پراکنش در زوایای فوق افزایش یافته و با رسیدن به محدوده از پیش تعیین‌شده، زمان‌سنج متوقف و زمان یادداشت می‌گردد. نفلومتری قابلیت ارزیابی تشکیل لخته به صورت دینامیک را دارد.

از نفلومتری برای سنجش کمپلکس‌های ایمنی در واکنش آنتی‌ژن- آنتی‌بادی نیز استفاده می‌شود. برای سنجش فاکتورهای انعقادی به روش نفلومتری، ذرات لاتکس با آنتی‌بادی اختصاصی هر فاکتور آغشته گردیده و با پلاسمای بیمار، برای تشکیل کمپلکس‌های ایمنی مجاور می‌شود و با سنجش پراکنش نور مقدار فاکتورهای انعقادی اندازه‌گیری می‌شود.

سنجش نقطه پایان بر اساس ایمونولوژیک:

در این روش میکروپارتیکل‌های لاتکس با آنتی‌بادی مخصوص علیه ماده‌ای که قصد اندازه‌گیری آن است، آغشته می‌شود. نور تک رنگ (منوکروماتیک) از میان ذرات لاتکس عبور داده می‌شود. هنگامی که طول موج نور تابشی بزرگتر از قطر ذرات لاتکس باشد فقط مقدار کمی جذب نوری صورت می‌گیرد ولی چنانچه واکنش آنتی‌ژن- آنتی‌بادی صورت گیرد منجر به افزایش قطر ذرات و در نتیجه افزایش جذب نوری می‌گردد که شدت آن متناسب با تراکم آنالیت (ماده موردنظر) می‌باشد. اندازه‌گیری فاکتورهای انعقادی با این روش در مدت کوتاهی قابل انجام است.

قرائت نقطه پایان آزمایش‌های انعقادی بر پایه چشمی احتیاج به آزمایش دوبل دارد و گاهی مقدار CV ممکن است متجاوز از 20 درصد گردد، گرچه دستگاه‌های نیمه اتوماتیک دقت را افزایش داده است ولی به علت پیپتینگ دستی نیاز به انجام آزمایش دوبل دارد. با

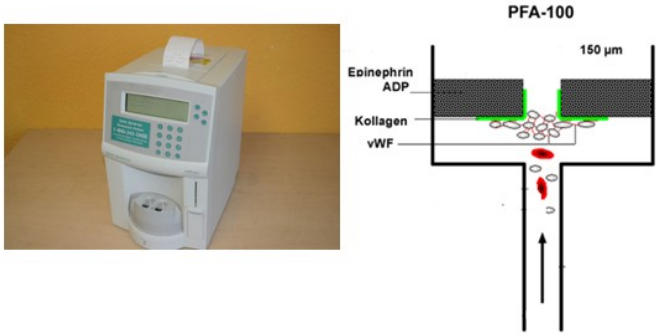
تجهیزات اتوماتیک کامل نه تنها می‌توان مقدار کمتری معرف مصرف کرد، بلکه می‌توان به ضریب تغییرات کمتر از 5٪ یا حتی یک درصد دست یافت و انجام تک تست مطمئن است.

تجهیزات سنجش عملکرد پلاکتی:

پی‌گیری درمان با داروهای ضد پلاکتی مانند آسپرین، پلاویکس و بازدارنـــــــده‌های گلیکوپروتئینی IIb/ IIIa پلاکتی، موجب نیاز روزافزون به تجهیزات سنجش کارآیی پلاکت‌ها شده است. سنجش کارآیی پلاکت‌ها نیز قبل از عمل جراحی برای بیماری که سابقه خونریزی دارد ضروری است. زمان سیلان از تست‌های قدیمی برای سنجش پلاکت‌های کارآمد بوده ولی استاندارد کردن آزمایش بسیار مشکل بوده و از طرفی این تست نمی‌تواند خونریزی در هنگام عمل جراحی را پیش‌بینی کند.

تجهیزاتی مانند دستگاه سنجش تجمع پلاکتی (Platelet Aggregometer) و تجمع‌سنج لومینسانس قادر به سنجش کارآیی پلاکت‌ها و عملکرد ترشحی پلاکت‌ها هستند، ولی در آزمایشگاه‌های روتین مورد استفاده نیستند.

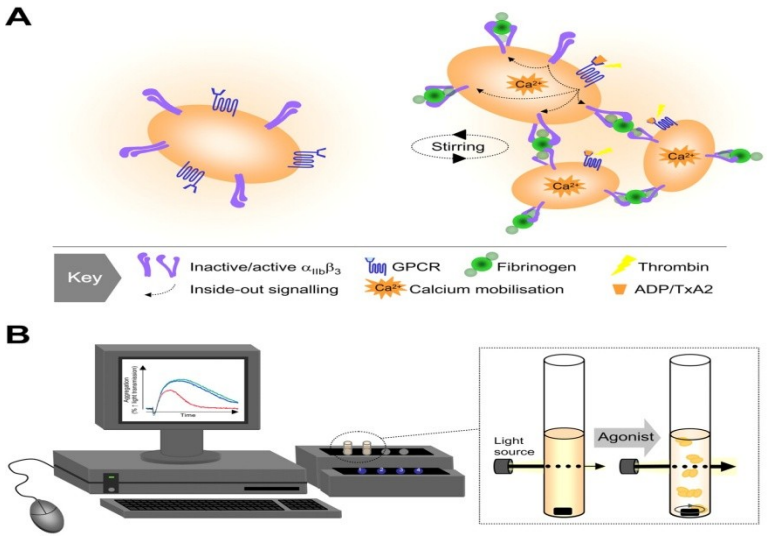
آنالیزور PFA-100 (Platelet function analyzer-100) در ارزیابی کارآیی پلاکت‌ها و شناسایی بیماران فون‌ویلبراند و مؤثر بودن درمان با آسپرین موفق بوده است. در این آنالیزور خون کامل سیتراته تحت فشار از یک سوراخ میکروسکوپی در غشایی که اطراف آن با کلاژن و اپی‌نفرین و یا کلاژن و ADP آغشته شده است، عبور داده می‌شود. زمان انسداد سوراخ معادل زمان سیلان است.



در آنالیزور PFA-100 خون کامل سیتراته از سوراخی که اطراف آن با محرک‌های پلاکتی آغشته شده است عبور داده می‌شود. پلاکت با سازوکار چسبیدن به کلاژن و تجمع به یکدیگر موجب مسدود شدن مجرا می‌گردد. زمان انسداد مجرا معادل زمان سیلان می‌باشد.

در آنالیزور Accumetric verify تجمع پلاکتی روی مهره‌های آغشته به فیبرینوژن در پاسخ به محرک‌های اختصاصی پلاکتی بر مبنای جذب نوری مورد سنجش قرار می‌گیرد. در این آنالیزور که تأیید FDA دارد برای پیگیری درمان با آسپرین از آراشیدونیک اسید و برای پیگیری درمان با بازدارنده‌های گلیکوپروتئین IIb /IIIa پلاکتی مانند داروهای Abciximab, Tirofiban, Eptifibatide از پپتید

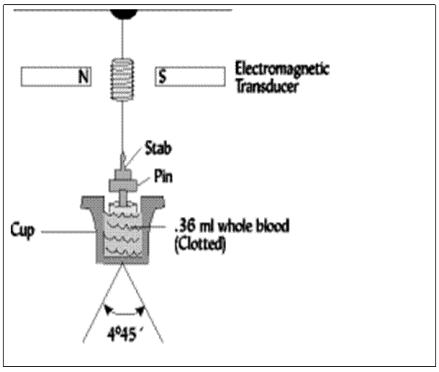
فعال‌کننده گیرنده ترومبین (TRAP) و نیز از ADP برای پیگیری داروهای بازدارنده گیرنده P2Y12 پلاکتی مانند پلاویکس و پراسوگرل (Prasugrel) به عنوان محرک استفاده می‌شود.



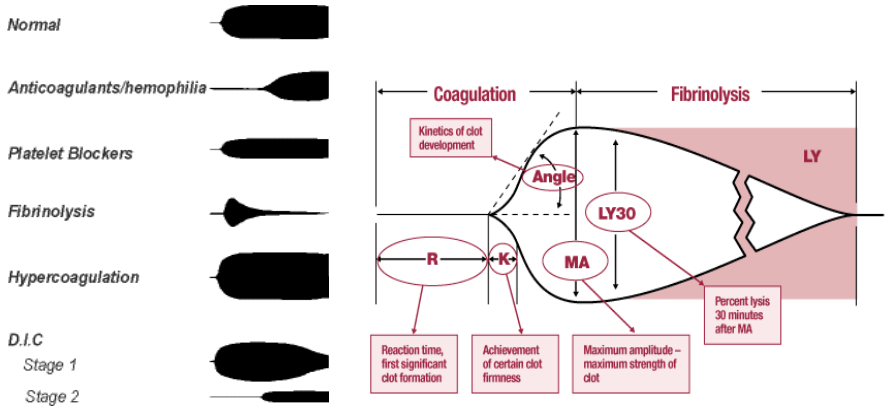
در آنالیزورهای سنجش تجمع پلاکتی از خون سیتراته بیمار پلاسمای سرشار از پلاکت تهیه کرده و به آن یک محرک یا آگونیست پلاکتی از قبیل کلاژن، اپی‌نفرین، ریستوستین، ADP و ... اضافه می‌شود. پاسخ مثبت تجمع پلاکتی موجب رسوب پلاکت‌ها در ته لوله و شفاف شدن محلول گردیده که با افزایش عبور نور تابشی همراه بوده و به صورت منحنی تجمع ترسیم می‌گردد. در برخی از دستگاه‌ها با اضافه کردن سوبسترای لوسیفرین و لوسیفراز می‌توان عمل ترشحی پلاکت‌ها را ارزیابی کرد، بدین مفهوم که ترشح ATP از گرانول‌های پلاکت موجب واکنش نورزای لوسیفرین– لوسیفراز با طول موج مخصوص می‌گردد که دستگاه قادر به ثبت آن است.

در آنالیزور ترومبوالاستوگراف (Thromboelastograph) TEG وضعیت کلی انعقاد بیمار مورد سنجش قرار می‌گیرد. اپراتور با استفاده از TEG، خطر خونریزی در بیماران کبدی، جراحی قلب، زایمان و بیماران تروماتیک را ارزیابی می‌کند. کامپیوتری شدن TEG در پیگیری وضعیت انعقاد در حین عمل جراحی برای تجویز فاکتورهای انعقادی، تزریق پلاکت و درمان با داروهای فیبرینولیتیک و داروهای ضدپلاکتی مؤثر است.

در این آنالیزور خون سیتراته در یک سیلندر فنجانی شکل ریخته می‌شود. در سیلندر یک سنجاق ثابت (Pin) که قطرش یک میلی‌متر کمتر از ظرف سیلندر است وجود دارد. برای شروع انعقاد کائولین اضافه شده و رشته‌های فیبرین سنجاق را به ظرف متصل کرده و تغییرات ویسکوالاستیسیته به سنجاق منتقل گشته و به علائم الکتریکی تبدیل می‌گردد. سرعت، قدرت و پایداری لخته و سپس فعالیت فیبرینولیتیک با ثبت علائم پیگیری می‌شود.



آنالیزور ترومبوالاستوگراف



دستگاه ترومبوالاستوگراف زمان لخته شدن خون، همکاری پلاکت‌ها با فاکتورهای انعقادی، ایجاد لخته منسجم، آب شدن لخته و کارآیی سیستم فیبرینولیتیک را به صورت گراف نشان می‌دهد. در این شکل گراف نرمال لخته شدن خون و گراف‌های غیرطبیعی در چند اختلال شایع انعقادی مشاهده می‌شود

فاکتورهای مداخله‌گر در آزمایش زمان پروترومبین

مشکل	راه‌حل
حجم نمونه کمتر از حد قابل قبول	افزایش کاذب PT و بایستی نمونه مجدداً گرفته شود
هماتوکریت بیشتر یا مساوی 55 درصد	با استفاده از فرمول، حجم سیترات را تنظیم کنید در غیر این صورت با افزایش کاذب PT همراه است
ذرات لخته در نمونه	نمونه‌گیری مجدد
همولیز قابل مشاهده	کوتاه شدن PT، جمع‌آوری مجدد نمونه
پلاسمای زرد یا شیری رنگ	با استفاده از روش کوآگولومتر مکانیکی آزمایش انجام شود
وجود هپارین در نمونه	از کیت‌هایی استفاده کنید که دارای خنثی‌کننده هپارین هستند مانند معرف PT با پلی برن

سیستم هشداردهنده در کوآگولومترها

برخی از کوآگولومترها بر مبنای کیفیت نمونه و عوامل مداخله‌گر مانند لیپیدمی، همولیز، بیلی‌روبینمی و تشکیل لخته غیرطبیعی و تشکیل نشدن لخته و یا جواب غیرمنتظره دارای علائم هشـــــدار (Warning flag) می‌باشند.

هشدارهای مربوط به نمونه:

نمونه‌های لیپیدمی و هیپربیلی‌روبینمی در کوآگولومترهایی که بر اساس جذب نوری عمل می‌کنند و قادر به تصحیح جذب نوری پایه نیستند، بعلت اختلال در یافتن نقطه پایان انعقاد، جواب کاذب می‌دهد.

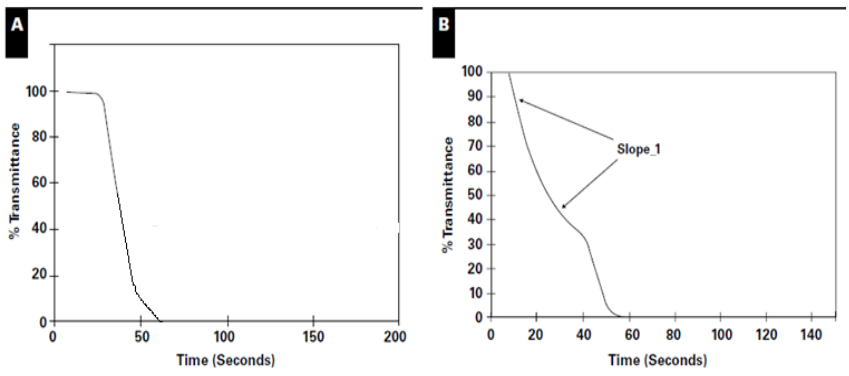
در نمونه همولیزه فعال شدن زودرس فاکتورهای انعقادی و پلاکت‌ها منجر به کوتاه شدن زمان انعقاد می‌گردد.

زمان انعقاد در موارد تشکیل لخته‌های غیرطبیعی به دلیل یافت نشدن نقطه پایان در زمان مناسب طولانی می‌شود.

هشدارهای مربوط به دستگاه:

- خطای درجه حرارت
- خطای فتواپتیک
- خطای حرکات مکانیکی
- خطای آسپیره
- نداشتن نقطه پایان

نکته مهم: در برخی از کوآگولومترها اطلاعات شکل‌گیری لخته به صورت گراف در ارتباط با زمان نشان داده می‌شود که می‌تواند ارزش تشخیصی داشته باشد. برای مثال گراف موجی شکل PTT (Waviform PTT) می‌تواند نشانه‌ای برای انعقاد داخل عروقی منتشره باشد.



منحنی آزمایش PTT در دستگاه کوآگولومتر روی محور مختصات که محور x بر حسب ثانیه و محور y بر اساس عبور نور (transmittance) درجه‌بندی شده است، ترسیم می‌گردد. گراف A آزمایش PTT تک موج را نشان می‌دهد که زمان لخته با

تغییر ناگهانی در کاهش نور تابشی همراه است. گراف B آزمایش دو فازی یا مواج PTT را نشان می‌دهد که موج اول کاهش عبور نور تابشی ناشی از رسوب CRP-VLDL و موج دوم به علت تولید لخته نهایی است.

زمان نگه‌داری و درجه حرارت نمونه جهت تست‌های انعقادی

نمونه	درجه حرارت	زمان
آزمایش PT نمونه بدون حضور هپارین UFH	18-24 درجه	تا 24 ساعت
آزمایش PTT نمونه بدون حضور هپارین UFH	18-24 درجه	تا 4 ساعت
آزمایش PTT برای پیگیری درمان با هپارین UFH	18-24 درجه	پلاسما را تا یک ساعت جدا کرده و تا 4 ساعت تست را انجام دهید
آزمایش PT نمونه در حضور هپارین UFH	18-24 درجه	پلاسما را تا یک ساعت جدا کرده و تا 4 ساعت تست را انجام دهید
آزمایش سنجش فاکتورهای انعقادی	18-24 درجه	تا 4 ساعت
آزمایش تجمع پلاکتی با استفاده از	18-24	30 دقیقه بعد از سانتریفوژ صبر کرده و تا 3

پلاسمای سرشار از پلاکت	درجه	ساعت آزمایش شود
آزمایش تجمع پلاکتی روی خون کامل	18-24 درجه	تا 3 ساعت از جمع‌آوری نمونه
نگهداری پلاسما در فریزر خانگی	20- درجه	تا 2 هفته
نگهداری پلاسما در فریزر	70- درجه	تا 6 ماه

UFH : Unfractioned Heparin