



נוהל מספר: 07-2223

שם הבדיקה: בדיקת מעכבים לפקטורי הקרישה: VIII, IX, XI, XII
על פי שיטת Bethesda
תחום: קרישת הדם

תודתנו נתונה למעבדת המטולוגיה, המרכז הרפואי רמב"ם, אשר תרמה את הנוהל שלה כבסיס לעבודת הצוות.

ולצוות אשר הכין, ערך והביא את הנוהל ולפרסום:

ד"ר כץ בנצי – ס.מ. מעבדה המטולוגית, מרכז רפואי איכילוב
 מייבברג דרורית – עובדת מעבדה המטולוגית, בי"ח בלינסון
 ד"ר יהודית להב – מנהלת מעבדת קרישה, בי"ח בלינסון
 ד"ר אסתר רביזדה – מנהלת מעבדה המטולוגית, בי"ח בלינסון
 מיכל גולדברג – ע.מ. המטולוגית, בי"ח סורוקה
 ד"ר שלמה פייטלוביץ – מנהל מעבדה כימיה, מרכז רפואי ברזילי
 אתי חדריאן – מרכז תחום המטולוגיה, מרכז רפואי ברזילי
 ד"ר ברל רודנסקי – מנהל מעבדה, מרכז רפואי שערי צדק
 ד"ר גלית שריג – סגנית מנהלת מעבדה המטולוגית, מרכז רפואי רמב"ם
 ד"ר נעמי לניר – מנהלת מעבדה המטולוגית, מרכז רפואי רמב"ם
 ד"ר אוסנת גרם יהושוע – סגנית מנהלת מעבדה המטולוגית, בי"ח אסף הרופא
 מרים ברל-מעבדת המטולוגיה, בי"ח כרמל
 מדר רבקה – סגנית מנהלת מעבדה המטולוגית, בי"ח העמק
 ארלט חדד – ע.מ.מ המטולוגיה, בי"ח שערי צדק

מסמך זה הינו דוגמא בלבד, וכל שימוש בו הוא באחריות המשתמש בלבד. המסמך אינו מחייב מעבדות לעבוד על פיו, מעבדה המעוניינת להשתמש בדוגמא מחויבת להתאים את תוכן הנוהל לתהליכים המתקיימים בה.

מאשרים:

שם המאשרת	תפקיד	חתימה	תאריך
ד"ר נעמי לניר	מנהלת המעבדה		
ד"ר גלית שריג	מרכזת אבטחת איכות ומעבדת קרישה		

מעבדה המטולוגית	קרישת הדם	כותרת הנוהל: שיטת Bethesda לבדיקת מעכב לפקטורי הקרישה: VIII, IX, XI, XII
עמוד 1 מתוך 8		נוהל מספר: 07-2223 גרסה מספר: 2.0

בתוקף מתאריך:

1.0 בדיקת מעכבים לפקטורי הקרישה: VIII, IX, XI, XII על פי שיטת Bethesda

תחנה: AC

קודי הבדיקה:

קוד הבדיקה במחשב	נוגדן כנגד פקטור:
F8IN	VIII
F9IN	IX
F11IN	XI
F12IN	XII

2.0 אזהרה: יש להתייחס לכל דגימת דם ודגימת פלסמה כאל דגימה העלולה להיות מזוהמת במחוללי מחלות מדבקות. יש לעבוד על פי נוהל מס' 07-3024 "שמירה על כללי בטיחות במעבדה"

3.0 מבוא ועיקרון השיטה

שיטת Bethesda פותחה לשם מדידת רמת מעכב (נוגדן) לפקטור הקרישה VIII שפעילותו תלויה בזמן (ניתן לאבחן ולמדוד את פעילות המעכב רק לאחר אינקובציה של שעתיים ב- 37°C).

הבדיקה מבוצעת על פי הוראה של רופא המטולוג אוו במקרים הקליניים הבאים:

3.1 במקרי דמם בהם תבחין PTT מאורך שאינו מתוקן בתערובת עם פלסמה (נוהל 07-2203)

3.2 במקרים בהם טיפול בפקטור הקרישה החסר איננו מתקן את רמת פקטור הקרישה ויש לחשוד בנוכחות נוגדן כנגד הפקטור החסר.

3.3 במקרים בהם יש לעקוב אחר אפשרות הופעת מעכב בחולי המופיליה כתוצאה ממתן של הפקטור החסר.

עקרון השיטה בהוספת פקטור VIII לפלסמה המכילה את המעכב ולאחר אינקובציה ב- 37°C למשך שעתיים, פקטור VIII עובר ניטרול כפונקציה לרמת המעכב הנמצאת בפלסמה הנבדקת.

השיטה נמצאה מתאימה גם למדידת רמת מעכב לפקטורי קרישה נוספים במסלול ה-Intrinsic.

מיהולים של פלסמת הנבדק עוברים אינקובציה עם נפח קבוע של Calibration Plasma (קונטרול מסחרית שהוכנה מתערובת של יותר מ-100 פלסמות מתורמים בריאים) ב- $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ למשך שעתיים. לאחר האינקובציה, נמדדת רמת שארית הפקטור שמעכב כנגדו נבדק ומתוך גרף (10.6) נקבעת רמת המעכב ביחידות Bethesda.

מעבדה המטולוגית	קרישת הדם	כותרת הנוהל: שיטת Bethesda לבדיקת מעכב לפקטורי הקרישה: VIII, IX, XI, XII
עמוד 2 מתוך 8		נוהל מספר: 2223-07 גרסה מספר: 2.0

4.0 חומרים

4.1 מיקום החומרים מצויין בקלסר "רשימת החומרים ומיקומם"

מק"ט רמב"ם	שם החומר	הוראות מיוחדות	זמן תפוגה לאחסון
202040072	Deficient Plasma VIII	הרחף את תוכן הבקבוק במים מזוקקים x 2 סטריליים על פי ההוראות הכתובות על גבי הבקבוק או בדף המצורף לחומר.	יציב לאחר המסה 4h ב - 2-8°C. ניתן להקפיא ב - 4°C±20- עד ארבעה חודשים
2020400806	Deficient Plasma XII	הרחף את תוכן הבקבוק במים מזוקקים x 2 שעברו סטריליזציה על פי ההוראות הכתובות על גבי הבקבוק או בדף המצורף לחומר.	יציב לאחר המסה 4h ב - 2-8°C. ניתן להקפיא ב - 4°C±20- עד ארבעה חודשים.
2020400798	Deficient Plasma XI	הרחף את תוכן הבקבוק במים מזוקקים x 2 שעברו סטריליזציה על פי ההוראות הכתובות על גבי הבקבוק או בדף המצורף לחומר.	יציב לאחר המסה 4h ב - 2-8°C. ניתן להקפיא ב - 4°C±20- עד ארבעה חודשים.
2020400848	Deficient Plasma IX	הרחף את תוכן הבקבוק במים מזוקקים x 2 שעברו סטריליזציה על פי ההוראות הכתובות על גבי הבקבוק או בדף המצורף לחומר.	יציב לאחר המסה 4h ב - 2-8°C. ניתן להקפיא ב - 4°C±20- עד ארבעה חודשים.
2029916398	ורונל בופר Dade CA System buffer	מוכן לעבודה.	אחסון במקרר -2°C עד 8°C לתאריך פג תוקף.
2090846739	Calibration Plasma	הרחף את תוכן הבקבוק במים מזוקקים x 2 שעברו סטריליזציה על פי ההוראות הכתובות על גבי הבקבוק או בדף המצורף לחומר. להקפאה – חלק למנות של 100µl רשום על גבי המבחנה Calibration Plasma ואת תאריך חלוקה	יציב לאחר הרחפה 4h ב - 15-25°C. ניתן להקפיא ב - 5°C±35- עד ארבעה חודשים.
ORKL13	Standard Human Plasma, Dade-Behring	הרחף את תוכן הבקבוק במים מזוקקים x 2 שעברו סטריליזציה על פי ההוראות הכתובות על גבי הבקבוק או בדף המצורף לחומר.	יציב לאחר הרחפה 4h ב - 15-25°C הקפא ב - 5°C±35- עד ארבעה חודשים.
REF OUPZ 17	Control Plasma P, Dade-Behring	הרחף את תוכן הבקבוק במים מזוקקים x 2 שעברו סטריליזציה על פי ההוראות הכתובות על גבי הבקבוק או בדף המצורף לחומר.	יציב לאחר הרחפה 4h ב - 15-25°C הקפא במנות של 100µl ב - 5°C±35- עד ארבעה חודשים.
1403600594	מיים סטריליים	מוכן לעבודה	אחסון ב - 15-25°C.

מעבדה המטולוגית	קרישת הדם	כותרת הנוהל: שיטת Bethesda לבדיקת מעכב לפקטורי VIII, IX, XI, XII הקרישה: 2007-2223 גרסה מספר: 2.0
עמוד 3 מתוך 8		

עד לתאריך פג-תוקף כאשר הבקבוק סגור. ניתן להשתמש עד חודש מתאריך פתיחת הבקבוק.		לשטיפה, טבע מדיקל	
--	--	----------------------	--

3.1 את כל החומרים הנ"ל, לאחר ההקפאה יש להפשיר ב - $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ למשך 10 דקות ולערבב קלות לפני השימוש. אין להקפיא בשנית.

5.0 פריטים מתכלים

שם הפריט	מק"ט רמב"ם
מבחנות $1.5\mu\text{l}$ אפנדורף	3549937245
Cup SAMPLE 0.5ml Plast ACL	3540801432
NEW ACL ROTOR 100/PKG	201068006
Cup Sample 2cc	2092005405

6.0 מכשירים

מס' הוראת עבודה	שם המכשיר	מס' כרטיס מכשיר
07-5202	ACL 3000	07-6202
	שעון עצר	

7.0 נטילת הדוגמא לבדיקה

- 7.1 דגימות דם לבדיקת מעכבים לפקטורי קרישה נשלחות במבחנות PT (פקק כחול) המכילות 3.2% סודיום ציטראט.
- 7.2 הדגימות נקלטות במעבדה על פי נוהל 07-3201 "קבלת דגימות – קרישת הדם".
- 7.3 הדגימות מסורכזות במהירות 1500g למשך 15 דקות.
- 7.4 ניתן לבצע את הבדיקה על פלסמה טרייה תוך ארבע שעות מהסירכוז. אם הבדיקה איננה מתבצעת ביום הגעת הדגימה יש להקפיא את הפלסמה ב: $-35 \pm 5^{\circ}\text{C}$ על פי נוהל 07-3202 "הקפאות במעבדת קרישה".

8.0 קליטה במחשב: תחנה: AC, בדיקה: על פי קודי הבדיקה בסעיף: 1.0.

9.0 שלבי הבדיקה

- 8.1 בדוק אם בוצעה בדיקת מעכב בעבר. אם יש תוצאה, השווה את זמני ה-PTT ועל סמך התוצאות הקודמות, בחר את המיהולים מהם ניתן לחשב את רמת המעכב (כפי שמפורט ב-10.2).
- 8.2 באם הנבדק הופנה לראשונה לבדיקה, החלט על המיהולים על סמך תוצאת ה-PTT ורמת הפקטור הנבדק ואלו התייעץ על המיהולים עם מרכזת התחום. באם תוצאת תבחין ה-PTT לא מאורך יותר מ - "80" התחל את הבדיקה במיהולים של: 1:1, 1:5. אם התוצאות אינן מאפשרות חישוב רמת המעכב (כפי שמפורט בסעיף 10.2), הוסף מיהולים נוספים אוו התייעץ עם מרכזת התחום וחזור על הבדיקה.

מטעדה המטולוגית	קרישת הדם	כותרת הנוהל: שיטת Bethesda לבדיקת מעכב לפקטורי הקרישה: VIII, IX, XI, XII
עמוד 4 מתוך 8		נוהל מספר: 2223-07 גרסה מספר: 2.0

8.3 טבלת מיהולים של פלסמת הנבדק עם Dade CA System buffer (Veronal Buffer)

מיהול	נפח פלסמת הנבדק	Dade CA System buffer
1:2	100 µl	100 µl
1:4	50 µl	150 µl
1:5	50 µl	200 µl
1:10	50 µl	450 µl
1:15	20 µl	280 µl
1:20	25 µl	475 µl
1:40	10 µl	390 µl
1:50	10 µl	490 µl
1:60	10 µl	590 µl

8.4 סמן מבחנות אפנדורף עם שם הנבדק אוּלו מספר הדגימה והמיהולים שהחלטת. סמן "מ" (מבחנת מיהול).

8.5 הכן את המיהולים שיתאימו לרשום על המבחנה על פי טבלה 8.3.

8.6 סמן מבחנות אפנדורף עם שם הנבדק אוּלו מספר הדגימה והמיהולים שהוכנו ב - 8.5 סמן "א" (מבחנות אינקובציה).

8.7 פפט לכל מבחנה המסומנת "א" Calibration Plasma 100µl.

8.8 פפט לכל מבחנה 100 µl מהמיהול שהוכן (8.5). **למעשה כל מיהול שהוכן ונרשם על גבי המבחנה, נמהל פי 2.**

8.9 סמן מבחנה "קונטרול 50%" ופפט לתוכה: Calibration Plasma 100µl ו - Dade CA System buffer 100 µl.

8.10 סמן מבחנה "P+C" ופפט לתוכה: Calibration Plasma 100µl ו - 100 µl פלסמת הנבדק.

8.11 את המבחנות שהכנת בסעיפים 8.10 - 8.8 הדגר באמבט מים $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ למשך שעתיים **בדיוק!**

8.12 לאחר גמר האינקובציה בדוק את רמת הפקטור, שנוגדנים כנגדו נבדקים, על פי נוהל 07-2209-2 "בדיקת רמת פקטורי הקרישה VIII, IX, XI, XII". בדוק את רמת הפקטור בכל הדגימות שעברו אינקובציה (8.11). הקפד שיחד עם דגימות הבדיקה יורצו גם קונטרולות מסחריות (הגדרה בסעיף 12.3) לרמת הפקטור הנבדק (על פי נוהל 07-2209-2).

8.13 באם לא ניתן לבדוק את רמת הפקטור מידית לאחר סיום האינקובציה, שמור את המבחנות באמבט קרח - לא יותר מ - 10 דקות.

9.0 בקרת איכות של הבדיקה

9.1 בדוק שרמת הפקטור הנבדק בקונטרולות המסחריות שהורצו עם הדגימות לבדיקת נוגדנים (8.12) יצאו בתחום המוגדר ע"י היצרן:

9.1.1 Calibration Plasma (קונטרול שהוכן מתערובת פלסמות תקינות)

9.1.2 Standard Human Plasma, Dade-Behring (קונטרול שהוכן מתערובת פלסמות תקינות)

9.1.3 Control Plasma P, Dade-Behring (קונטרול שהוכן מתערובת של פלסמות עם ערכים פאתולוגיים של פקטורי הקרישה).

9.2 בדוק שערך הפקטור הנבדק במבחנת ה"קונטרול 50%" שהוכנה בסעיף 8.9, הוא מחצית ($\pm 5\%$) מערך Calibration Plasma שבדקת ב 9.1.1.

9.3 באם קיבלת את בקרת האיכות, ניתן להמשיך לשלב חישוב התוצאות. באם בקרת האיכות איננה מתקבלת, יש לחזור על הבדיקה.

מעבדה המטולוגית	קרישת הדם	כותרת הנוהל: שיטת Bethesda לבדיקת מעכב לפקטורי הקרישה: VIII, IX, XI, XII
עמוד 5 מתוך 8		נוהל מספר: 2223-07 גרסה מספר: 2.0

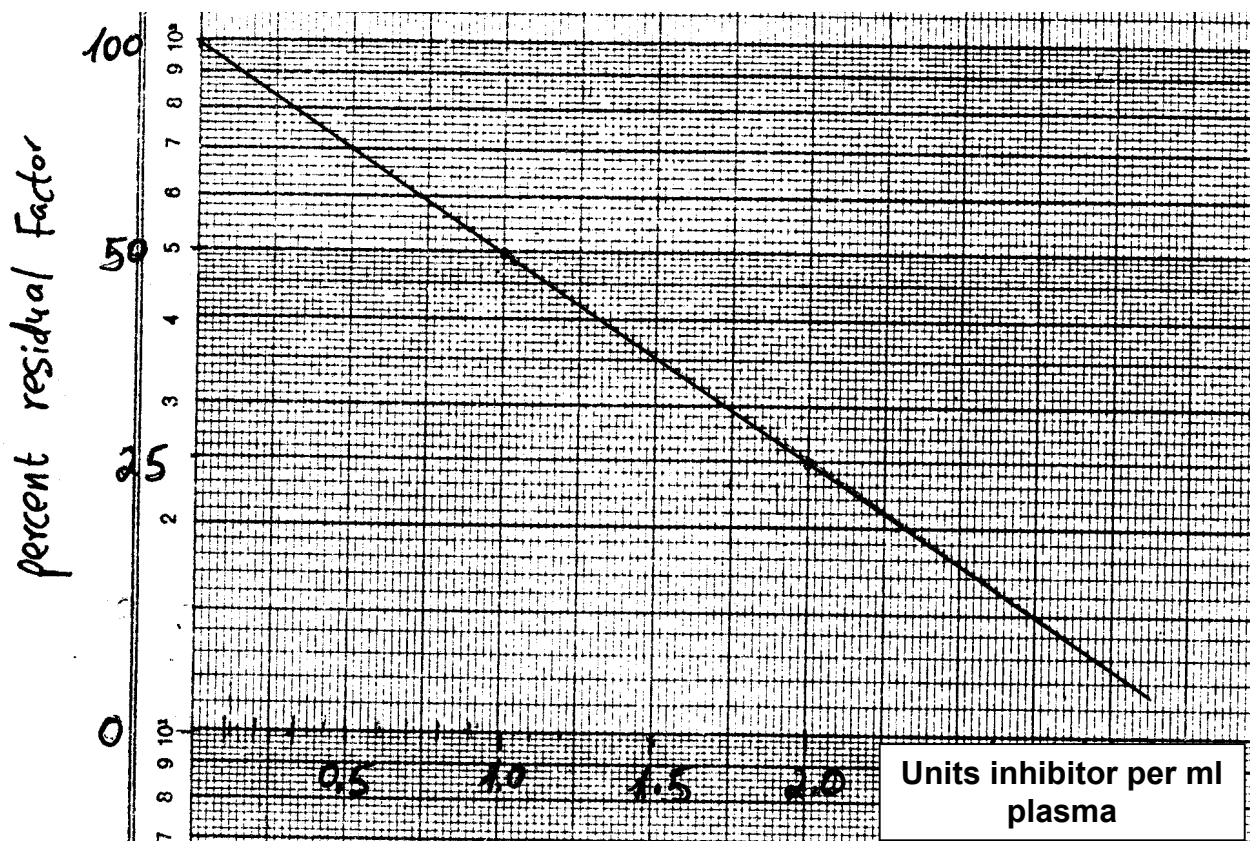
10.0 חישוב התוצאות

- 10.1 באם תוצאת רמת הפקטור הנבדק במיהול של 1:1 בפלסמת הנבדק זהה לתוצאת רמת הפקטור במבחנת ה"קונטרול 50%" או גבוהה ממנו, משמע אין נוגדן כנגד הפקטור הנבדק. הכנס תוצאה של 0.0 במחשב תחת קוד הבדיקה והוסף הערה (יש הערה מוכנה): "לא נמצאו נוגדנים לפקטור VIII (או פקטור אחר שנבדק) בשיטת Bethesda".
- 10.2 באם תוצאת רמת הפקטור הנבדק במיהול של 1:1 בפלסמת הנבדק קטנה מתוצאת רמת הפקטור במבחנת ה"קונטרול 50%", בחר את תוצאת המיהול שבו רמת הפקטור הנבדק יצאה מחצית מרמת הפקטור שנמצא במבחנת ה"קונטרול 50%" (8.9,9.2). לדוגמא: באם נבדק נוגדן כנגד FVIII, ובמבחנת ה"קונטרול 50%" התקבל ערך של: 48%, בחר את המיהול של פלסמת הנבדק שבו התקבל ערך של רמת פקטור FVIII: $24 \pm 2\%$.
- 10.3 חלק את תוצאת רמת הפקטור במיהול שבחרת ב- 10.2 חלקי רמת הפקטור במבחנת ה"קונטרול 50%" והכפל ב- 100, מתקבל הערך - Percent residual factor.
- $$\frac{24 \times 100}{48} = \text{Percent residual factor}$$
- 10.3.1 לדוגמא: Percent residual factor = 48
- 10.4 את ערך Percent residual factor הצב בגרף 10.6 והוצא מתוכו את יחידות האינהיביטור ל - 1 מ"ל פלסמה של הנבדק.
- 10.5 את היחידות שקבלת מתוך הגרף הכפל במיהול של הפלסמה שממנו בחרת את רמת הפקטור (סעיף 10.2).
- 10.5.1 לדוגמא - בחישוב 10.3.1 התקבל אחוז שארית הפקטור (Percent residual factor) 50%.
- בהצבה בגרף מתקבלת יחידה אחת של Bethesda ל - ml פלסמה.
- באם המיהול שבחרת (סעיף 10.2) הוא לדוגמא מיהול של 1:10 של פלסמת הנבדק, הרי בפלסמת הנבדק יש 10 יחידות אינהיביטור ל - 1 מ"ל פלסמה או 10 יחידות של Bethesda.

מטרת הנוהל: שיטת Bethesda לבדיקת מעבד לפקטורי הקרישה: VIII, IX, XI, XII	קרישת הדם	מעבדה המטולוגית
נוהל מספר: 2223-07 גרסה מספר: 2.0		עמוד 6 מתוך 8

10.6 גרף המתאר את הקשר שבין אחוז שארית הפקטור הנבדק לבין רמת המעכב ביחידות Bethesda ל- ml פלסמת הנבדק.

10.6 The percent residual factor is related to the number of Bethesda units per ml of test plasma



11.0 דיווח ואישור תוצאות במחשב

11.1 באם תוצאת רמת הנוגדן גבוהה מ- 0.1 Bethesda Units, הכנס את התוצאה המספרית בקוד הבדיקה והכנס הערה:

11.1.1 בבדיקת מעכב לפקטור (הנבדק) בשיטת Bethesda, נמצא מעכב ברמת _____ יחידות.

11.1.2 הודע למרכזת התחום על התוצאה. באם היא לא נמצאת, הודע לקרישולוג על תוצאות של מעל יחידת Bethesda אחת.

12.0 חזרה על הבדיקה

12.1 חזור על הבדיקה באם יש חריגה בתוצאות בקרת האיכות (9.0).

12.2 חזרה על הבדיקה בדגימה נוספת בהתייעצות והמלצת הרופא המטפל.

מטרה	קרישת הדם	כותרת הנוהל: שיטת Bethesda לבדיקת מעכב לפקטורי הקרישה: VIII, IX, XI, XII
מעבדה המטולוגית		נוהל מספר: 2223-07 גרסה מספר: 2.0
עמוד 7 מתוך 8		

13.0 הגדרות:

13.1 יחידה אחת של Bethesda - כמות האינהיביטור שמנטרלת 50% מיחידת פעילות פקטור VIII (או פקטור אחר הנבדק) בפלסמה נורמלית לאחר שעתיים אינקובציה ב- 37°C פעילות הפקטור הנבדק בפלסמה נורמלית (Calibration Plasma) מוגדרת כיחידת פעילות אחת.

13.2 "קונטרול 50%" - מיהול של Calibration plasma בוורנל בופר ביחס של 1:1. רמת הפקטור הנבדק ב"קונטרול 50%" מייצגת למעשה 100% percent residual factor שהוא 0.0 יחידות Bethesda.

13.3 קונטרולות מסחריות לבדיקת רמת פקטורי קרישה: קונטרולות שנרכשות מחברות שהוכנו ע"י תערובת של פלסמות תקינות או פאתולוגיות. לכל קונטרול יש תעודה בה מצוינים ערכי רמת פקטורי הקרישה של אותה קונטרול.

13.4 Calibration Plasma – קונטרול מסחרית שהוכנה מתערובת של יותר מ- 100 פלסמות של תורמים בריאים.

14.0 מסמכים ישימים:

14.1

Practical Hematology, Dacie and Lewis, Ninth edition P 368 - 370
Modified from Kasper C.K, Ewing NP. 1982 The Haemophilias: measurement of inhibitor to factor VIII (and IX). Methods in Hematology 5:39

14.2 נהלי עבודה של המעבדה

שם הנוהל	מס' הנוהל
שמירה על כללי בטיחות במעבדה	07-3024
קבלת דגימות – קרישת הדם	07-3201
הקפאות במעבדת קרישה	07-3202
בדיקת רמת פקטורי הקרישה VIII, IX, XI, XII	07-2209-2
Activated Partial Thromboplastin Time (APTT)	07-2203

מטרת הנוהל: שיטת Bethesda לבדיקת מעכב לפקטורי הקרישה: VIII, IX, XI, XII	קרישת הדם	מעבדה המטולוגית
נוהל מספר: 07-2223 גרסה מספר: 2.0		עמוד 8 מתוך 8