

**موارد مصرف:**

تعیین کمی زمان پروترومبین (PT) در پلاسما انسانی.

**مقدمه:**

زمان پروترومبین (PT) یک آزمایش غربالگری انعقادی است و به طور کلی فعالیت عوامل انعقاد X، VII، V، و I را ارزیابی می کند. PT معمولاً به دلیل حساسیت به تغییرات در غلظت فاکتورهای وابسته به ویتامین K از قبیل VII، II، و X برای نظارت بر درمان با آنتاگونیست ویتامین K استفاده میشود. در نتیجه مقایسه نتایج این آزمایش برای یافتن محدوده درمانی ضروری است. مقدار PT یک پلاسما ممکن است با توجه به منشأ معرف ترومبوپلاستین و ابزار مورد استفاده برای اندازه گیری آن متفاوت باشد.

راه حلی که برای استانداردسازی نتایج توسط سازمان بهداشت جهانی تصویب شده است، "سیستم استانداردهای مرجع بین المللی برای ترومبوپلاستین ها است که امکان تعیین یک مقیاس بین المللی برای شدت درمان ضد انعقاد را فراهم می کند". در این سیستم نسبت PT به نسبت نرمال شده بین المللی (INR or International Normalized Ratio) تبدیل میشود. مقدار INR برابر است با نسبت PT بیمار به PT میانگین به توان ISI (شاخص حساسیت بین المللی) ترومبوپلاستین مورد استفاده.

**اصول آزمایش:**

اصول آزمایش شامل استفاده از ترومبوپلاستین و کلسیم برای اندازه گیری زمان تشکیل لخته در پلاسما بیمار و مقایسه آن با یک استاندارد نرمال است. نتایج PT تحت تأثیر سطح هپارین با وزن مولکولی بالا (UFH) تا 1 IU/ml و سطح هپارین با وزن مولکولی کم (LMWH) تا 1.5 IU/ml قرار نمی گیرد.

**محتویات کیت:**

کیت حاوی ۱۰ ویال معرف ترومبوپلاستین و کلسیم کلرید لئوفیلیزه شده است که هر ویال باید با ۴ میلی لیتر آب مقطر آب شود. معرف حاوی سدیم آزاید (>۱ گرم در لیتر) به عنوان نگهدارنده است.

**آماده سازی محلول ها:**

جهت آماده سازی معرف، به آن ۴ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده و معرف را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق بگذارید تا آب شود.

**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 می شوند، پایدار هستند. معرف ها نباید فریز شود. در صورت نگهداری معرف آب شده در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد، اجازه دهید معرف قبل از استفاده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۱۸-۲۵ درجه سانتیگراد) بماند. پس از اضافه کردن آب، معرف به مدت ۸ روز قابل استفاده است.

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

- دستگاه کوکولو متر (در روش اتوماتیک و یا نیمه اتوماتیک)
- بن ماری در روش دستی
- سمپلرهای مختلف برای روش دستی و نیمه اتوماتیک و سر سمپلر
- دستکش
- 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 سیترات سدیم ۳/۲٪ انجام شود. نسبت خون به ضد انعقاد نه به یک باید باشد. از نمونه ی همراه با EDTA، هپارین، و اگزالات استفاده نشود. پلاسما مورد استفاده پلاسما فقیر از پلاکت (PPP) است که برای تهیه ی آن نیاز به سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۲۰۰۰ g می باشد. تعداد پلاکت ها باید کمتر از ۱۰۰۰۰ باشد. پلاسما به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق و دو هفته در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قابل نگهداری است. از نمونه های کدر و ایکتریک برای انجام تست PT استفاده نکنید. نمونه هایی که کمتر از ۹۰ درصد حجم مورد انتظار در لوله های نمونه گیری پر شده اند قابل قبول نمی باشند. بلافاصله پس از خونگیری با سر و ته کردن لوله، خون با ماده ی ضد انعقاد مخلوط شود.

**روش انجام آزمایش:**

این تست به صورت دستی یا توسط سیستم های انعقادی اتوماتیک و نیمه اتوماتیک قابل انجام می باشد. روش انجام در روش دستی به شرح زیر است: معرف PT ۱۰ دقیقه قبل از انجام آزمایش در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شود. (قبل از استفاده از معرف، با سر و ته کردن ویال، معرف را به خوبی مخلوط کنید). ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه یا کنترل را به داخل لوله آزمایش بریزید و یک دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کنید. ۲۰۰ میکرولیتر از معرف PT را سریعاً به لوله آزمایش اضافه کرده و همزمان کورنومتر را به کار بیندازید. زمان تشکیل لخته را به عنوان نتیجه ی آزمایش PT یادداشت کنید.

**کنترل کیفی:**

در هر ران کاری از نمونه ی کنترل نرمال و کنترل بالا استفاده کنید تا از عملکرد صحیح کیت مطمئن شوید. در صورتی که نتایج هر یک از کنترل ها در محدوده ی 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 محدوده ی مورد نظر بود از یک معرف دیگر استفاده کنید.

**نتایج:**

PT معمولاً به دلیل حساسیت به تغییرات در غلظت فاکتورهای وابسته به ویتامین K از قبیل VII، II، و X برای نظارت بر درمان با آنتاگونیست ویتامین K استفاده می شود. جهت پایش درمان، نتایج PT بیمار تبدیل به نسبت نرمال شده بین المللی (INR) می شود.

$$INR = \left( \frac{Patient\ PT}{MNPT} \right)^{ISI}$$

MNPT به معنای PT میانگین در جمعیت مراجعه کننده به آن آزمایشگاه است که برای محاسبه ی آن باید حداقل ۲۰ فرد نرمال مراجعه کننده به آزمایشگاه مورد آزمایش قرار بگیرند و از مقادیر PT آن ها میانگین گرفته شود.

دامنه درمانی با وارفارین 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 برگه نتیجه آزمایش باید درج کند که پزشک صرفاً به نتیجه آزمایش جهت تعیین مقدار وارفارین 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.

**اهمیت بالینی:**

PT طولانی در حالات بالینی زیر مشاهده می شود:

- کمبودهای مادرزادی یا اکتسابی فاکتور X، VII، V، II یا فیبرینوژن
- نارسایی کبد (سیروز، هپاتیت)
- کمبود ویتامین K: کمبود تغذیه ای، درمان با آنتاگونیست های ویتامین K مثل وارفارین
- درمان با آنتی بیوتیک
- فیبریولیز
- DIC

**محدوده ی نرمال:**

نتایج PT تحت تأثیر روش تشخیص لخته است و ممکن است از آزمایشگاهی به آزمایشگاه دیگر متفاوت باشد. هر آزمایشگاه باید محدوده نرمال خود را با توجه به جمعیت بیمار مراجعه کننده تعیین کند با این حال ارزیابی ۱۲۰ نمونه ی نرمال نشان دهنده ی محدوده ی مرجع ۱۱/۸ تا ۱۴/۳ برای این کیت بود. طیف های درمانی، برای غربالگری درمان با ضد انعقاد های خوراکی از آزمایشگاهی به آزمایشگاه دیگر متفاوت است، بنابراین ضروری است که هر آزمایشگاه محدوده نرمال PT خود را با توجه به جمعیت بیمار مراجعه کننده تعیین کند. نتایج غیر طبیعی پلاسما ی بیماران که داروهای ضد انعقادی مصرف نمی کنند، نشان دهنده کمبود فاکتور یا وجود یک مهار کننده می باشد. همچنین این نتایج ممکن است نتیجه داروهای درمانی یا داروهای خاصی باشد.

دامنه درمانی با وارفارین 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 برگه نتیجه آزمایش باید درج کند که پزشک صرفاً به نتیجه آزمایش جهت تعیین مقدار وارفارین اکتفا نکند علائم بالینی بیمار را نیز در نظر بگیرد و 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 سیترات به خون اصلاحاتی صورت گیرد. در این شرایط سیترات اضافی (در برابر میزان کم پلاسما ی بیمار دارای هماتوکریت بالا)، با کلسیم پیوند برقرار می کنند و باعث طولانی شدن کاذب زمان آزمایش می شود. برای محاسبه حجم مناسب ضد انعقاد در این شرایط از فرمول زیر استفاده میشود:

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

- تورنیکت را بیش از یک دقیقه نیندید. چون باعث تراکم فاکتورهای ۸، فیبرینوژن و فون ویلبراند می شود.
- افزایش شدید فاکتورهای انعقادی ممکن است باعث کاهش PT به پایین تر از حد MNPT شود.
- از نگهداری طولانی مدت (بیش از ۱۰ دقیقه) پلاسما ی بیمار یا کنترل در دمای ۳۷ درجه قبل از آزمایش خودداری کنید.
- در نمونه گیری با لوله های خلا که دارای سوزن مشترک می باشند نمونه های مربوط به آزمایشات انعقادی را در ابتدا جمع آوری کنید، چون آغشنگی سوزن به EDTA یا Clot activator درون لوله ها باعث تداخل در آزمایشات فوق می شود.
- پلاسما ی همولیز شده یا حاوی بیش از ۱۰۰۰۰ پلاکت در میلی لیتر مکعب برای تست های انعقادی مناسب نیست.
- در صورت در معرض بودن پلاسما با هوا pH افزایش می یابد. نمونه ها را در ظروف پلاستیکی یا سیلیکونی ریویژ در ذخیره کنید.
- پلاسمایی که در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد نگه داری می شود ممکن است تحت فعال شدن سرما قرار گرفته و منجر به کاهش قابل توجه PT شود.
- این کیت برای کار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد  $\pm 0.5$  درجه سانتی گراد طراحی شده است. مرتباً دمای تمام المنت های گرمایی را بررسی کنید.
- همه ظروف آزمایشگاهی باید تمیز و عاری از مواد شوینده باشند.
- انجماد و ذوب پلاسما ی حاوی سلول های باقیمانده باعث ایجاد غشای سلولی آسیب

نقص فاکتور VII انعقادی، ۱۰ بیمار دارای نقص فاکتور II انعقادی و ۴۰ نفر دریافت کننده داروی وارفارین بودند که کمبود ترکیبی فاکتور های II، VII و I داشتند.

	PT Correlation	INR Correlation
Heamostica PT vs Fisher PT N= 100	$y=1.1301x-0.7932$ $R^2 = 0.9966$	$y=0.9816x+0.0796$ $R^2 = 0.9954$

### علایم مورد استفاده در لیبل

مورد استفاده در آزمایشگاه تشخیص پزشکی	
به دفترچه ی 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. .6891, 274-264:641
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 آزماي پارسيان

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

تلفن: ۹۱۳۰۵۹۱۹ (۰۲۱)

دیده می شود و نتایج را تحت تأثیر قرار می دهد  
• واکنش های التهابی فاز حاد مانند طوفان سایتوکائینی می تواند به علت افزایش فیبرینوژن منجر به کاهش زمان PT شود.

### مواد دخالت کننده

اگرالآت سدیم ، EDTA و هیپارین ضد انعقاد های مناسبی نیستند.  
★ مقادیر بالای بیلی روبین، هموگلوبین آزاد پلاسما (در نمونه های همولیز شده)، کلسترول، تری گلیسرید و آسکوربیک اسید می تواند در نتیجه ی تست های انعقادی تداخل کند. آنالیت های فوق تا مقادیر زیر تداخلی در تست PT انجام شده توسط این کیت ندارند:

- بیلی روبین تا سطح 22 mg/dl (376 μmol/L)
- هموگلوبین آزاد پلاسما 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 معرف های آزمایشگاهی رعایت کردن اقدامات احتیاط 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 معرف ها غیر قابل خوردن و نوشیدن هستند در مورد چگونگی دور ریختن مواد از قوانین تدوین شده عمل 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 می شود، از مقدار زیادی آب برای شستشو استفاده کنید.

### ویژگی های عملکردی:

#### ۱- دقت:

نتیجه ی ارزیابی نمونه های کنترل نرمال و غیر نرمال و نمونه های بیماران نرمال و غیر نرمال با تعداد ۸۰ تکرار در جدول زیر خلاصه شده است.

	Control Normal	Control Abnormal	Human Normal Plasma	Human Abnormal Plasma
Mean	12.47875	23.52125	13.4325	25.4155
SD	0.089575299	0.304270761	0.251966946	0.311028917
CV%	0.71782269	1.293599453	1.875800825	1.223776503
S <sub>R</sub> (within-run precision)	0.08440972	0.32268406	0.25932605	0.34967127
S <sub>T</sub> (within-device or within-laboratory precision standard deviation)	0.08962642	0.30472701	0.25181577	0.31064915
S <sub>rr</sub> (Between-Run Standard Deviation)	0.001	0.027875	0.00275	0.029325

### ۲- حساسیت به کمبود فاکتور های انعقادی:

یک معرف PT با حساسیت کافی باید زمان انعقاد طولانی را در نمونه هایی با فعالیت فاکتور ۳۰-۲۰٪ نشان دهد (V). معرف PT در پلاسمای با کاهش خفیف و شدید سطح فاکتور های انعقادی مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج به شرح زیر بود:

Factor %	Prothrombin Time			
	Factor II	Factor V	Factor VII	Factor X
100	12.5	12.5	12.5	12.5
50	12.9	13	14.5	13.4
40	13.2	13.2	14.8	13.5
30	13	13.2	14.8	14.9
20	16.2	18	20	22
10	17	20	24	25
0	38	42	42	55

### ۲- همبستگی (Correlation)

در ارزیابی همبستگی نتایج بین کیت حاضر با کیت PT شرکت ترموفیشر با استفاده از دستگاه کواکولومتر نیمه اتوماتیک استگو نتایج زیر به دست آمد. قابل ذکر است که در این ارزیابی ۱۰۰ فرد با دو کیت مورد ارزیابی قرار گرفتند که ۲۰ نفر نرمال، ۳۰ بیمار دارای