



به فایم لیزر و لانا و تولانا

**کنترل کیفی آزمون‌های انعقادی**

علی ملکی

# نکات کلی در مورد آزمون‌های انعقادی

- نمونه توصیه شده برای آزمون‌های انعقادی خون سیاهرگی است
- ضد انعقاد مناسب برای آزمون‌های انعقادی سیترات سدیم ۲/۳ یا ۸/۳ % است که برای عوامل انعقادی بویژه ۵ و ۸ حالت حفاظت کننده دارد
- نسبت خون به ضدانعقاد ۹ به ۱ است  $\leftarrow$  ۸/۱ سی‌سی خون با ۰.۲ سی‌سی سیترات سدیم
- اسمولاریته ۲/۳ % به اسمولاریته پلاسما نزدیکتر است
- سیترات ۸/۳ % باعث بالارفتن INR می‌شود
- سازندگان کیت PT میزان ISI را بر اساس سیترات ۲/۳ ارائه کرده‌اند.
- در بیشتر آزمون‌های انعقادی از کلرور کلسیم 0.025 مولار استفاده می‌شود

**غلظت مناسب سیترات سدیم ۳,۲ % می‌باشد**

## طرز تهیه سیترات سدیم

تری سدیم سیترات	وزن مولکولی	مقدار مصرف
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	258.1	28 gr
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7, \text{H}_2\text{O}$	276.1	30 gr
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7, 2\text{H}_2\text{O}$	294.1	32 gr
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7, 5.5\text{H}_2\text{O}$	357.16	39 gr
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7, 11\text{H}_2\text{O}$	456.1	49.6 gr



## طرز تهیه سیترات سدیم

- مقادیر فوق را در یک لیتر آب حل کرده و به حجمهای ۱۰ میلی لیتری تقسیم کنید
- سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه اتوکلاو نمایید
- این ضدانعقاد در دمای ۴ درجه یخچال تا چند ماه پایدار است
- در صورت مشاهده کپک یا کدورت ضدانعقاد بایستی دور ریخته شود

# کاربرد آزمون‌های انعقادی

- مانیتورینگ آنتی‌کوآگولانت تراپی

وارفارين  $\Leftarrow \Leftarrow \Leftarrow$  PT

هپارين  $\Leftarrow \Leftarrow \Leftarrow \Leftarrow$  aPTT

اطمینان به نتایج تست



متغیرهای پرنالیتیکال

مطالعه ۴۰۰۰۰ گزارش آزمایش انعقادی

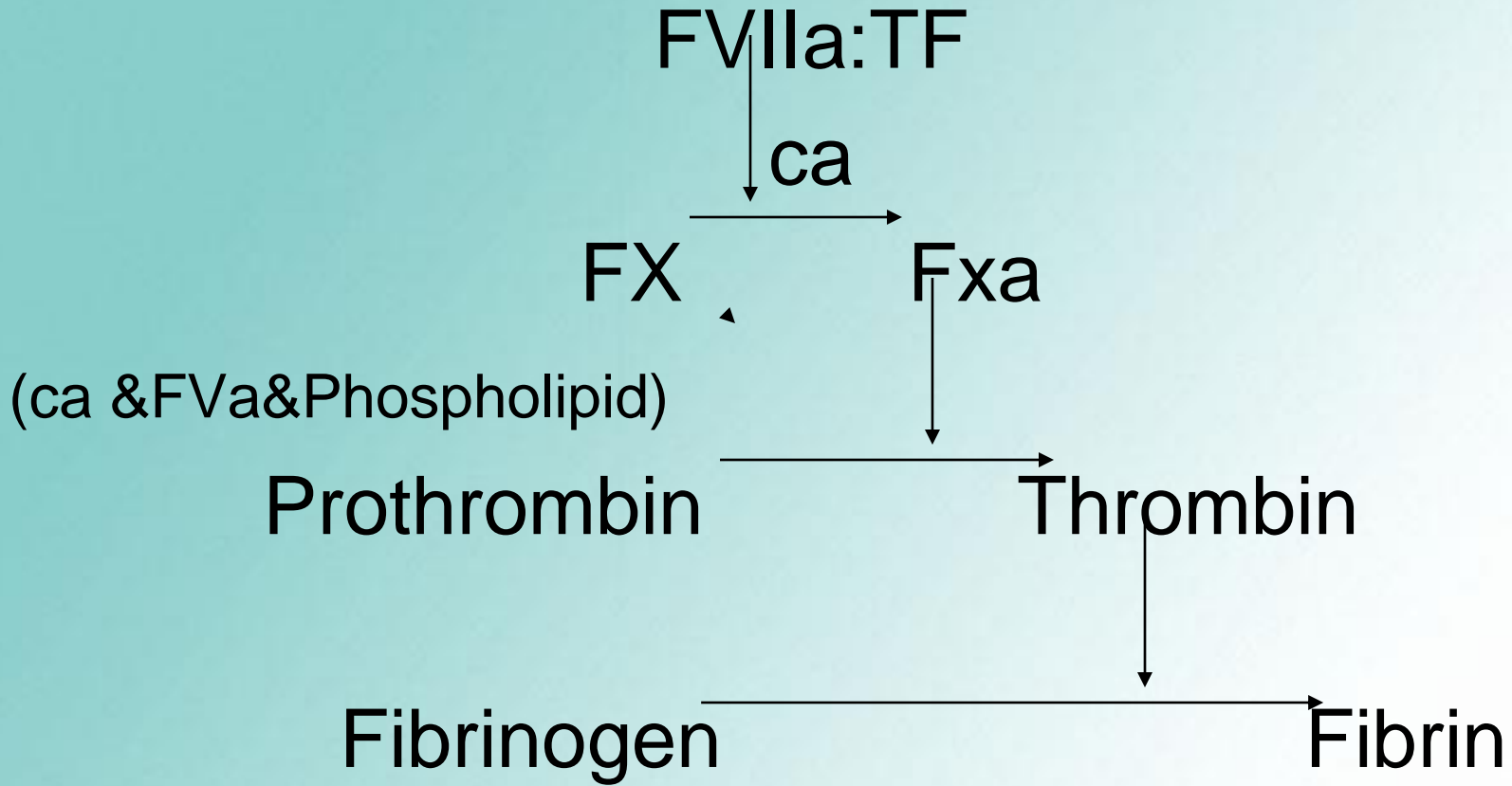
۶۸٪ پرنالیتیکال

۱۳٪ آنالیتیکال

۱۸٪ پست آنالیتیکال

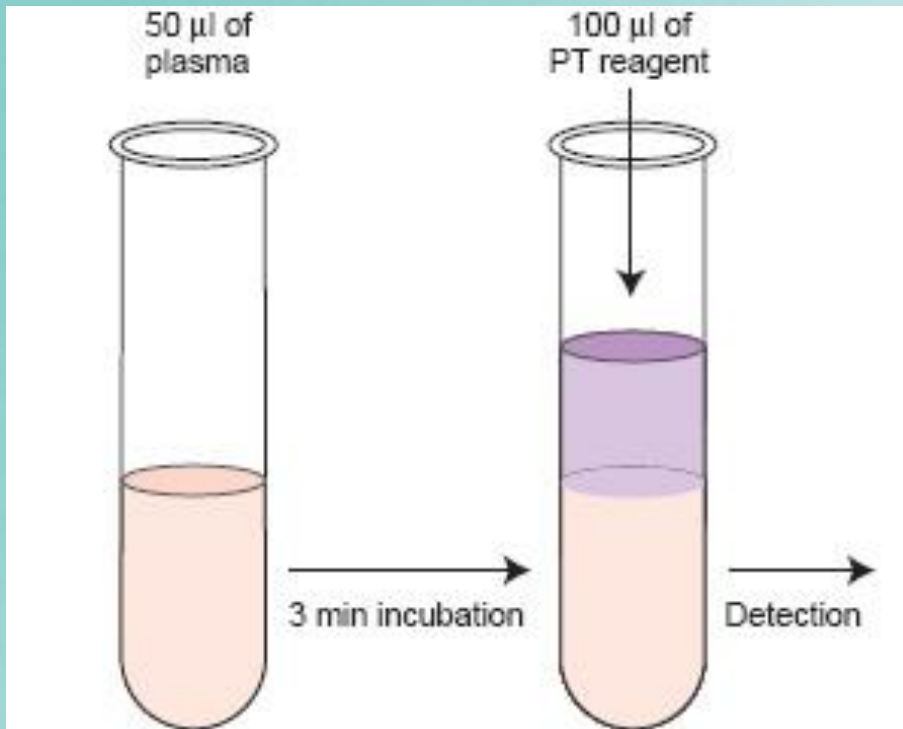


# آزمون PT عوامل انعقادي دخالت کننده در مسير خارجي انعقاد را ارزيابي مي کند



# روش انجام تست PT

- ۱- محلول هموژن شده عامل بافتی و یون کلسیم را به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد می رسانیم
- ۲- مقدار ۱/۰ سی سی پلاسمای بیمار را در لوله جداگانه ریخته و به مدت ۳ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد میگذاریم (پلاسمای نباید هیچگاه بیش از ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه باشد)
- ۳- مقدار ۲/۰ سی سی از ترومبوپلاستین و یون کلسیم را به لوله آزمایش افزوده و به محض افزودن، کرنومتر را به کار می اندازیم لوله را به مدت ۵ ثانیه در ۳۷ درجه نگه داشته و سپس بیرون آورده و در برابر نور چراغ حرکت می دهیم تا زمانی که لخته دیده شود، زمان را یادداشت میکنیم.
- ۴- زمان لخته شدن پلاسمای کنترل را مانند روش آزمون به دست می آوریم.





# شیوه گزارش آزمون زمان پروترومبین

- ۱- بر پایه ثانیه: در این حالت پاسخ PT بیمار و کنترل بر پایه ثانیه گزارش می‌شود.

- ۲- بر پایه درصد فعالیت عوامل مسیر خارجی: در این حالت پاسخ کنترل سالم بر پایه ثانیه معادل ۱۰۰ درصد از فعالیت عوامل انعقادی گرفته می‌شود. سپس با توجه به پاسخ بیمار و استفاده از منحنی، رابطه زمان و فعالیت عوامل، درصد فعالیت عوامل انعقادی مسیر خارجی در بیمار به دست می‌آید.

- ۳- بر پایه نسبت زمان پروترومبین (R): در این حالت نسبت PT بیمار به کنترل به دست می‌آید (مثلا ۱۸ به ۱۲ یا ۵/۱)

- ۴- بر پایه نسبت طبیعی شده بین المللی یا INR

(International Normalized Ratio)



# INR یا نسبت طبیعی شده بین المللی



$$\text{INR} = \left( \frac{\text{PT بیمار بر پایه ثانیه}}{\text{PT کنترل بر پایه ثانیه}} \right)^{\text{ISI}}$$

- به معنای نسبت زمان پروترومبینی است که اگر آزمایش با ترومبوپلاستین مرجع بین المللی انجام می شود به دست می آید

- هر معرف ترومبوپلاستین از هر شرکتی با مقایسه با مرجع سازمان بهداشت جهانی کالیبره شده و یک شاخص حساسیت بین المللی (ISI) دریافت می کند.



- The **lower the ISI** the **more sensitive the Reagent**
  - ISI of **1.8 to 2.4** ➔ **Low sensitivity**
  - ISI of **1.4 to 1.8** ➔ **Average sensitivity**
  - ISI of **1.0 to 1.4** ➔ **High Sensitivity**

- بنابر توصیه WHO بایستی ISI بین ۱,۷ - ۰,۹ و ترجیحاً کمتر از ۱,۵ باشد
- توصیه CAP هم  $ISI < 1,7$  است

# علل افزایش زمان پروترومبین

- ۱- کاهش يك يا چند عامل انعقادي از مسیر خارجي
- ۲- مصرف داروهاي ضد انعقاد مثل: وارفارين يا هپارين

\*\*\*\* جهت جدا کردن این که آیا زمان PT طولانی، به علت بازدارنده انعقادي یا کاهش عوامل انعقادي است به حجم پلاسمای بیمار پلاسمای کنترل سالم افزوده و دوباره آزمون PT انجام می‌گیرد. چنانچه زمان تصحیح شد گویای کمبود عوامل انعقادي و در صورت طولانی شدن، حضور بازدارنده مطرح است

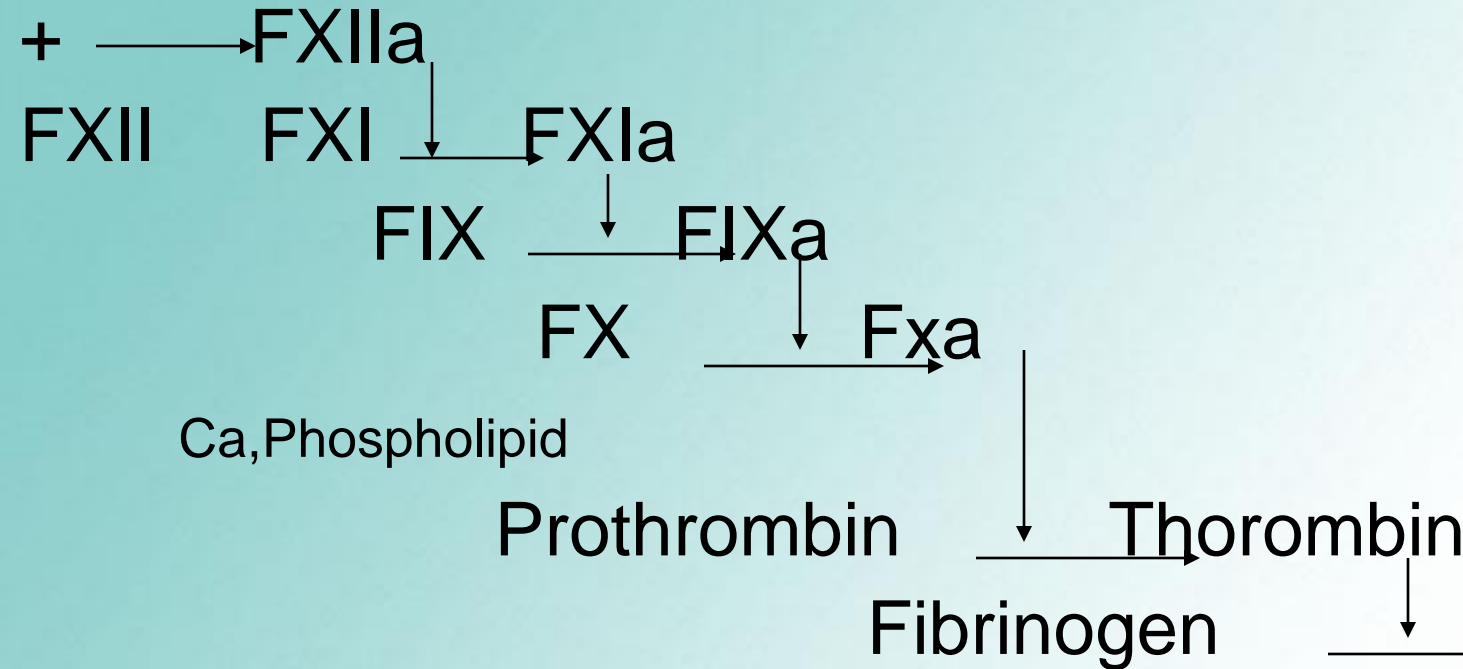
\*\*\*\* آزمون PT وابسته به میزان فاکتور ۷ انعقادي است. این فاکتور در پی مصرف وارفارين نخستین فاکتور وابسته به ویتامین K است که کاهش می‌یابد. پس آزمون PT برای پیگیری درمان با وارفارين مورد استفاده قرار می‌گیرد.

# آزمون PTT فعالیت عوامل انعقادی در مسیر داخلی انعقاد را

می سنجد

-در این آزمون اندازه به مقدار مشخص فسفولیپید، یون کلسیم و فعال کننده عوامل تماسی مثل کائولین به پلاسمای بدون پلاکت بیمار افزوده می شود و سرعت لخته شدن پلازما بر حسب ثانیه به حضور و مقدار عوامل انعقادی در این مسیر بستگی دارد.

Kaolin



# روش انجام PTT

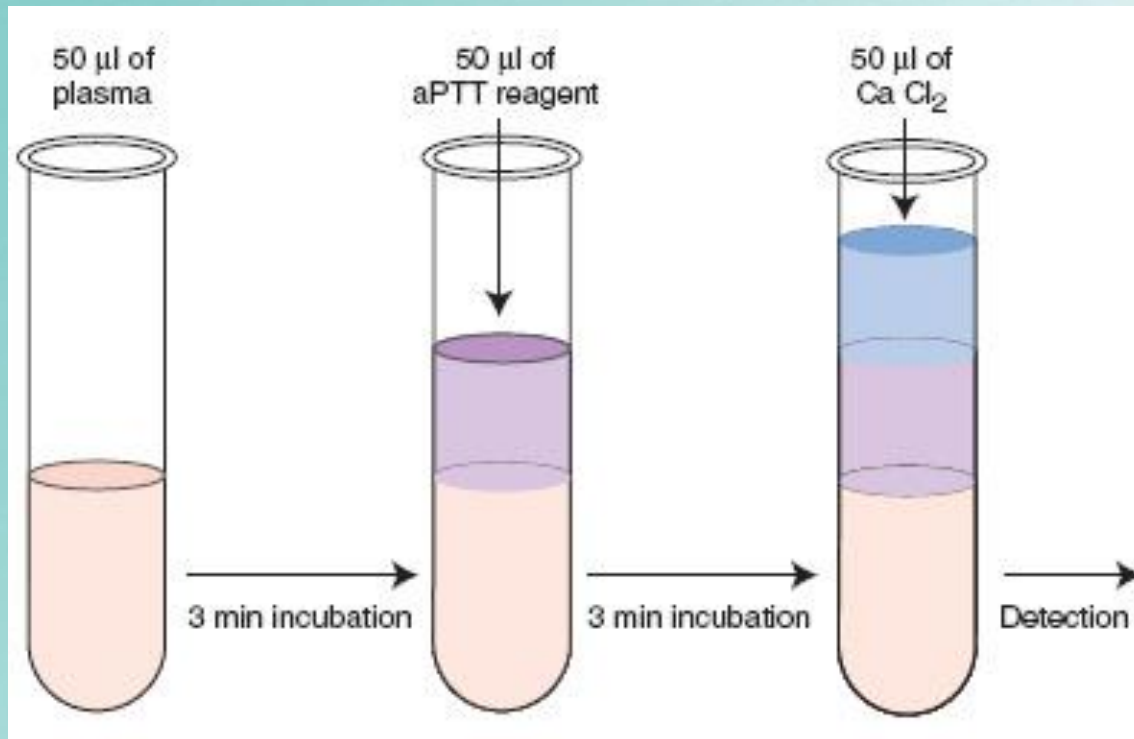
مقدار ۱/۰ سي سي پلاسمای بیمار در يك لوله ي آزمایش ریخته و به آن ۱/۰ سي سي عصاره فسفولیپید اضافه میکنیم

۲- محتوي لوله را مخلوط و به مدت ۲ یا ۳ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می دهیم

۳- مقدار ۱/۰ سي سي كلرو كلسیم که از پیش به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد رسیده را به لوله افزوده و به محض آن کرنومتر را به کار می اندازیم

۴- به محض مشاهده ي لخته کرنومتر را متوقف کرده و زمان را یادداشت میکنیم

۵- زمان کنترل را مانند روش آزمون در شرایط یکسان به دست می آوریم



# علل افزایش زمان PTT



۱. در اثر کمبود عوامل مسیر درونی انعقاد (همه عوامل انعقادی بجز: ۷-۱۳-عامل پلاکتی ۳ (PF3) را ارزیابی میکند)
۲. هنگامی که کاهش یک یا چند از عوامل انعقادی ۸-۹-۱۱-۱۲ به کمتر از ۳۰ درصد اندازه طبیعی برسد
۳. در کمبود عوامل تماسی مثل: پره کالکرنین (عامل فلچر) ، کینینوژن سنگین وزن، فاکتور ۱۲ (ولی بیمار دارای پیشینه خون ریزی نیست)
۴. به علت باز دارنده های انعقادی علیه یک عامل خاص:
  - بازدارنده علیه فاکتور ۸ (در بیماران مبتلا به تالاسمی، پس از زایمان، بیماری های التهابی،...مشاهده شده است)
  - بازدارنده علیه عامل فون ویلبراند در اختلالات لنفوپرولیفراتیو
  - بازدارنده علیه عامل ۵ با مصرف استرپتومایسین
  - بازدارنده علیه عامل ۱۳ با مصرف ایزونیازید
- ۵-آزمون طولانی PTT ممکن است به علت مصرف داروهای ضد انعقادی مثل: هپارین یا وارفارین باشد



## • کنترل کیفی

- کنترل کیفی داخلی هر روز انجام شود
- Shift, trend, out of control توسط فرد با تجربه تفسیر شود
- نگهداری دستگاه و کیت مطابق بروشور سازنده
- SOP مطابق بروشور
- هر ماه یکبار نتایج QC دیده شود و تغییرات longterm
- شماره ساخت و تاریخ انقضا و تاریخی که معرف باز شده را ثبت نمود طوریکه برای هر تست قابل ردیابی باشد





# آنالیتیکال

- در هر ران کاری کنترل نرمال و غیر نرمال گذاشته شود (غیر نرمال به تغییرات حساستر است)
- در شروع هر شیفت کاری و در آزمایشگاههای شلوغ هر ۴۰ تست
- در صورتیکه کنترل آب شده نمیتوان آن را فریز و دوباره استفاده کرد مگر به توصیه سازنده
- برای رسم منحنی
  - ۹ ران طی ۳ روز و میانگین گرفته شود
  - SD قبلی استفاده شود
  - هر ماه SD محاسبه شود
  - هر چند وقت یکبار میانگین را با داده های جدید محاسبه کرد



## آنالیتیکال

- پلاسما نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه Prewarm شود
- کلرید کلسیم گرم شده در پایان روز دور ریخته شود و دوباره استفاده نشود
- آب مقطر گرید ۱ برای معرف استفاده شود
- در مورد APTT زمان تماس معرف و پلاسما مهم است
- لوله شیشه ای باشد و در ۳۷ درجه Prewarm شود
- ترومبوپلاستین نباید بیشتر از یک ساعت در گرما بماند
- حرکت لوله برای قرائت به شکل سه تکان ۹۰ درجه ای در هر ۵ ثانیه باشد



# آنالیتیکال

- آزمایش هر بیمار دوپلیکیت گذاشته شود  
– تفاوت آنها نباید از ۱۰٪ میانگینشان بیشتر باشد در غیر اینصورت خطای تصادفی است

Test Time(sec)	Max.acceptable Difference between Duplicates(sec)
۰-۲۰	۱-۲
۲۱-۶۰	۲-۶
۶۱-۱۰۰	۶-۱۰
>۱۰۰	۱۰-۲۰



## دستگاهها

- الکترومکانیکال
- فتواپتیکال زمان کوتاهتر از الکتريکال است
- برای هر دستگاه باید دامنه مرجع خودش را تعیین کرد
- الکتروکمیکال



# برخی کیتها

- معرف گرم شود
  - Dade –
  - Hemolience –
  - Amax –
  - Diamed –
  - Ortho –
  - Sigma –
  - Bahar afshan –
- پلاسما گرم شود
  - Amax –
  - Fisher –
  - Human –
- فقط کلرید کلسیم
  - انتقال خون
  - بیونیک
  - Biolabo
  - Stago



با تشکر



# آزمون زمان انعقاد خون کامل (CT) Clotting time

\*\*مدت زمان لازم جهت لخته شدن خون در خارج بدن فعال کننده مرحله انعقاد در این مرحله تماس فاکتور XII با شیشه می باشد  
\*\*این آزمایش از حساسیت پایینی برخوردار است و در صورت نقایص شدید در سیستم انعقادی داخلی تحت تاثیر قرار میگیرد و انجام تست های دیگر نظیر PTT همراه با آن لازم است

\*\*روش های انجام: روی لام لوله موئینه Lee White

۵-۱۵ دقیقه

۲-۶ دقیقه

۲-۶ دقیقه

\*\*در روش روی لام درجه حرارت آزمایش استاندارد نیست و تابع حرارت محیط است

\*\*در روش لوله موئینه بعلت فشار دادن محل نمونه گیری و احتمال ورود عصاره بافتی زمان انعقاد دقیق نخواهد بود





# تست BT

## Bleeding time

جهت بررسی اختلالات مادرزادی و اکتسابی در عمل پلاکت ها و تشخیص احتمالی بیماری ون ویلبراند است.

زمان خونریزی بین ایجاد کردن زخم استاندارد تا بند آمدن خون مد نظر می باشد معمولاً "این زخم بر روی ساعد دست یا روی نرمه گوش ایجاد می شود"





این تست (سیلان) معمولاً هنگامی که تعداد پلاکتها به زیر ۵۰ هزار برسد یا موقعی که اختلال کارکرد پلاکتی موجود باشد طولانی می‌گردد.

زمان سیلان طولانی به طور کلی نشانه اختلالات:

- ترومبوسیتوپنی شدید
- وجود اختلال در اعمال پلاکت
- اشکال در جدار مویرگها