فصل 12

انعقاد

عامل و فاكتورهاي مربوط به انعقاد داراي طيف وسيعي هستند كه با پيشرفت‌هاي حاصله پيچيدگي روابط مابين آنهـــا روز بروز مشخص شده و لذا بر تعداد و تنوع آزمايشات مربوطه نيز افزوده مي‌شود. در اين فصل تلاش بر اين بوده كه متداول‌ترين عناوين مورد بررسي قرار گيرند و آزمايشات تكميلي ديگر كه عموميت ندارند صرف نظر شده‌اند. در اين فصل سعي شده با چيدمان سلسله‌وار، فاكتورهاي انعقادي از مراحل اوليه تا مراحل نهايي به ترتيب مورد بررسي قرار گيرند.

تعيين زمان سيلان (BT)

نام آناليت: زمان سيلان (Bleeding Time)

اطلاعات ويژه، كاربردي: زمان سيلان مدت زماني است كه طول مي‌كشد تا خونريزي يك زخم كوچك استاندارد بند بيايد. اين زمان به عروق مويينه، تعداد پلاكت، عمل چسبندگي و تجمع آن بستگي دارد. زمان سيلان مهمترين آزمايش single-screening براي اختلالات عملكرد پلاكت و يكي از آزمايشات غربالي اوليه براي اختلالات انعقادي است. كاربرد اصلي اين آزمايش امروزه در تشخيص بيماري ون ويلبراند است. زمان سيلان طولاني، به طور كلي نشانه يكي از اين اختلالات است: 1- ترومبوسيتوپني شديد تا متوسط 2- وجود اختلال در اعمال طبيعي پلاكتها 3- هر دو مورد 4- اشكال در جدار مويرگها. طولاني شدن زمان سيلان در اين موارد ديده مي‌شود: ترومبوسيتوپني (كمتر از 100 هزار)، سندرم عملكرد بد پلاكتي، كمبود يا غيرطبيعي بودن فاكتورهاي پلاسما مثل فاكتور ون‌ويلبراند و فيبرينوژن، غيرطبيعي بودن ديواره رگهاي خوني كوچك، بيماري كبدي شديد، لوسمي، بيماري لنفوپروليفراتيو، آنمي آپلاستيك، بيماري DIC ، سندرم برنارد سولير، ترومباستني گلانزمن و اورمي.

اساس روش متداول: Duke ، IVY ، روش simplate روش انتخابي است.

Duke : در اين روش از انگشت يا لاله گوش استفاده مي‌شود. ابتدا محل مورد آزمايش را با الكل تميز مي‌كنيم. محل مورد نظـر را با يك ضربه لانست يكبار مصرف سوراخ كرده، با جريان يافتن آزادانه خون كرنومتر را به كار مي‌اندازيم. هر 30 ثانيه يكبار قطره‌هاي خون را با كاغذ خشك كن تماس داده و اينكار را آن قدر ادامه مي‌دهيم تا خون بند بيايد. سپس كرنومتر را خاموش كرده، و زمان بدست آمده را گزارش مي‌كنيم.

روش Simplate (نيشتري): دو برش پوستي به طول 5 mm و به عمق 1 ميلي متر در سطح پوست ايجاد مي‌شود. برش افقي زمان سيلان را اندكي بيش از برش عمودي نشان مي‌دهد و براي ارزيابي اثرات آسپرين روي پلاكت و زمان سيلان، بر برش عمودي برتري دارد.

روش مرجع: -

روش ارجح: simplate

روش‌هاي ديگر: (template simplate) ، IVY ، (template) Mielk) ، (modified) Mielk) ، (ear lobe) Duke)

نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: ثبت زمان براي توقف خونروش از سوراخ پوستي.

محدوده طبيعي:

روش simplate : 5/2-5/9 دقيقه، روش IVY : 2-7 دقيقه (حد مرزي 7-11 دقيقه)، روش (mielk template) : كمتر از 10 دقيقه، روش (modified) Mielk نوزادان تا 8 سالگي = 1/3 4/3 دقيقه و 8 ساله تا بالغين = 1/6 8/2 دقيقه، روش (earlobe)Duke =1-3 دقيقه، (فشار خون بالاي دست 40 mmHg در روش simplate و براي نوزادان 20 mmHg)

واكنش تداخلي: در شرايط داخل بدن (invivo) : افزايش زمان سيلان در مصرف آلوپورينول، آمينوكاپروئيك اسيد در دوز بالا، آمپي سيلين، آسپارژيناز، آسپرين، استرپتودورناز، والپوريك اسيد، ايبوپروفن، ايندومتاسين، پني سيلين G . و كاهش آن: در مصرف Desmopressin ، Erythropoietin ديده مي‌شود. مصرف الكل زياد در افزايش زمان سيلان و گرما و سرما زياد هم در تغييـــر اين زمان اثر دارند.

معايب و فوايد روش حاضر: زمان سيلان معمولاً در اختلالات انعقادي طبيعي مي‌باشد. در روش Duke اگر سوراخ كوچكتر از حد استاندارد باشد و يا حرارت پوست در محل سوزن زدن پايين باشد، چون باعث كاهش جريان خون خواهد شد، نتيجه آزمايش سيلان بطور كاذب كاهش مي‌يابد. بر عكس در صورت عميق بودن سوراخ و يا فشار به محل نتيجه آزمايش به خصوص در موارد ITP (ترومبوسيتوپني پورپوراي ايديوپاتيك) به طور كاذب افزايش مي‌يابد. حداقل 72 ساعت قبل از انجام آزمايش بايد از مصرف آسپرين خودداري كرد. اگر زمان سيلان در روش Duke بين 3-15 دقيقه طول بكشد روي انگشت ديگر هم آزمايش را تكرار مي‌نمايند.

آزمايش زمان سيلان B.T) - NCCLS)

بيشتر از 85 سال است كه آزمايش B.T براي تشخيص اوليه اختلالات انعقادي بكار مي‌رود.

در روشهاي ابتدايي، تيغ‌ها و لنست‌هاي جراحي به كار برده مي‌شوند، ولي بدليل اينكه مشكلاتي در طول و عمق استاندارد برش‌ها بوجود آمد روشهاي جديدي جايگزين آن گرديد.

آزمايش زمان سيلان (BT) تحت تأثير فاكتورهاي متعدد و متنوعي قرار دارد.

اگرچه سئوالاتي پيرامون مفيد نبودن آزمايش " BT "، براي پيش‌بيني سيلان در مورد بيماران كانديد جراحي وجود دارد، اما زمان سيلان همچنان براي تشخيص شدّت بيماري ون‌ويلبراند و اختلالات اكتسابي و مادرزادي حاصل از عملكرد پلاكت‌ها به كار مي‌رود.

جهت جلوگيري از ايجاد عفونت بايد احتياطات لازم را در همه نمونه‌هاي خون انجام داد و هنگام انجام آزمايش BT ، بايد دستكش پوشيد.

از آزمايش زمان سيلان (BT)، بطور معمول براي تشخيص اوليه اختلالات انعقاد خون و اندازه‌گيري فعل و انفعالات پلاكت‌ها با ديواره عروق كوچك در داخل بدن، استفاده مي‌شود.

اين آزمايش ممكن است به تغييرات متنوع، حساس باشد و نتايج منفي كاذب يا مثبت كاذب را به همراه داشته باشد.

پيش‌بيني آزمايش " BT " در مورد تشخيص اختلالات اوليه انعقاد خون، ارزشمند است و تنها موقعي قابل قبول است كه احتمال نتايج غيرطبيعي، وجود داشته باشد (مثلاً وقتي بيمار سابقة زمان سيلان غيرطبيعي داشته باشد يا اينكه داروهاي موثر بر زمان سيلان، مصرف كرده باشد)

عموماً، آزمايش " BT " براي پيش‌بيني زمان سيلان بيماران كانديد جراحي، مفيد نيست. در ضمن روشهاي انجام آزمايش بايد، توسط افراد با تجربه انجام شود.

اين مقاله استانداردهايي را كه با آن صحت آزمايش Template BT بوسيله كنترل طول و عمق برش‌ها، افزايش مي‌يابد معرفي كرده است.

Template : يك وسيله فلزي يا پلاستيكي به عنوان راهنما و كنترل كننده طول و عمق برش‌هاي آزمايش BT است.

Wick (جريان خون): خارج كردن خون حاصل از برش در آزمايش BT با بكار بردن كاغذ صافي باشد.

اساس روش اين تست براساس اندازه برش سطحي كه در پوست ايجاد مي‌شود و اندازه‌گيري زمان سيلان يا بندآمدن خون مي‌باشد. تعيين زمان سيلان تحت تأثير فعل و انفعالات پلاكت با ديواره عروق، است.

تجهيزات مورد نياز شامل موارد زير است:

* Template ، وسيله برش (تيغ)
* كرونومتر
* دستگاه فشار خون
* كاغذ رسم يا يك برگ كاغذ صافي يا مشابه آن
* پنبه الكلي

باندهاي پروانه‌اي شكل براي پانسمان زخم و يك باند بزرگتر (براي پوشاندن باندهاي پروانه‌اي شكل)

* يك تيغ ريش تراش يا وسايل ديگري براي تراشيدن (جهت تراشيدن موهاي روي ساعد)

روش

1- قبل از انجام آزمايش، شخصي كه آزمايش BT را انجام مي‌دهد بايد مطمئن باشد كه شمارش پلاكت بيمار، پائين‌تر از محدودة آزمايشگاهي BT نباشد.

2- از سلامت بيماري كه آزمايش را برروي او انجام مي‌دهيد و امكان وجود جاي زخم، برآمدگي حاصل از آن و ريسك عفونت، مطلع باشيد. عموماً Template BT نبايد روي افرادي كه زخمهاي عميق دارند انجام شود.

3- بازو بايد به حالت خوابيده و ثابت باشد (در امتداد سطح قلب)

يك محل در 13 مياني بازو انتخاب كنيد، 2 تا 3 سانتي‌متر پائين‌تر از ناحيه (كوبيتال) و منطقه‌اي كه فاقد مو، زخم، كبودي، خال‌كوبي، وريدهاي سطحي، التهابات پوستي، خال يا جراحت‌هاي ديگر باشد.

4- كاف فشار خون را بالاتر از بازو ببنديد.

5- محل انجام آزمايش را با پنبه الكلي تميز كرده و مدت 30 ثانيه صبر كنيد تا خشك شود.

6- كاف فشار خون را روي 40 ميلي‌متر جيوه براي مدت 60-30 ثانيه تنظيم كنيد و قبل از ايجاد برش، مطمئن شويد كه فشار روي 40 ميلي‌متر جيوه در طول مدت انجام آزمايش ثابت خواهد ماند. از بكار بردن كاف‌هاي فشار خوني‌معيوب خودداري كنيد (مثل كاف هايي كه فشار را در يك ميزان ثابت نگه نمي‌دارند).

7- استفاده از دستكش هنگام انجام آزمايش " BT " براي تكنسين اجباري است.

8- شكاف را به صورت عمودي يا افقي پائين‌تر از ناحيه كوبيتال ايجاد كنيد.

9- كرونومتر را روشن كنيد.

10- جريان قطرات خون از برش يا شكاف را با كاغذ صافي هر 30 ثانيه يكبار، بدون تماس با برش، پاك كنيد تا زمانيكه بـــا

ايجاد ميخ پلاكتي، خون بند آيد.
زمان سيلان، زماني محاسبه مي‌شود كه 30 ثانيه از بند آمدن خون، گذشته باشد.
11- وقتي انجام اين آزمايش، تمام مي‌شود، كاف را باز كنيد و اطراف محل برش را پاك نمائيد. مواظب باشيد الكل با محل برش يا شكاف تماس پيدا نكند زيرا مي‌تواند ايجاد انعقاد ديگر و متعاقب آن ايجاد زخم ديگري كند.
12- محل شكاف را با يك باند پروانه‌اي شكل بپوشانيد و مواظب باشيد لبه‌هاي دو طرف زخم با يكديگر تماس پيدا نكند، يك باند بزرگتر را روي باند پروانه‌اي شكل براي جلوگيري از عفونت قرار دهيد. اين باندها بايد براي مدت 24 ساعت باقي بماند.
13- وسيله انجام آزمايش زمان سيلان بايد در يك ظرف محكم و كاغذ صافي هم در يك جعبه يا كيسه دور ريخته شود.

تغييرات راهنماي برش

اگرچه اين روش، بايد بطور ثابت به كار رود. اما يك برش افقي (موازي و پائين‌تر از ناحية كوبيتال يا چين آرنج) در مقايسه با برش عمودي، زمان سيلان را طولاني‌تر مي‌كند. برش عمودي ممكن است ايجاد زخم كمتري كند
همة روشها درجه صحت مشابهي دارند. (برش‌هاي افقي نسبت به اثرات آسپيرين حساسترند)

تعداد برش‌ها: معمولاً در اندازه‌گيري BT ، يك برش كافي است.

عمق برش: Template ، صحت آزمايش BT را بوسيله كنترل طول و عمق برش، افزايش مي‌دهد. به هر حال عمق برش يـــــا شكاف بستگي به آزمايش كننده و بيمار دارد.

محدوديت دما: نتايج آزمايش، با افزايش دما، تحت تأثير قرار مي‌گيرد. آزمايش بايد در دماي اتاق انجام شود. ($^{\circ}c$ 25-22 درجه سانتيگراد).

فشار خون وريدي: بطور ثابت، فشار خون وريدي، 40 ميلي متر جيوه در بالغين براي افزايش صحت آزمايش، توصيه مي‌شود. فشار 20 ميلي متر جيوه براي نوزادان و گروه سني جوان، توصيه مي‌شود.

سن و جنس: در سنين پائين زمان سيلان كوتاهتري، مشاهده مي‌شود. تفاوت‌هاي كمي، از نظر جنسيت وجود دارد. در بيماران مسن‌تر و ديگر بيماران كه آتروفي يا تحليل پوستي دارند، نتايج " BT " ممكن است، صحت كمتري داشته و مفيد واقع نگردد. در تعدادي از بيماران، نتيجه انجام آزمايش " BT " بايد با دقت، ارزشيابي شود. اين روش براي بيماران گروه سني جوان، مشابه با ديگران است. اما با استفاده از وسايل، اندازه برش كمتر از 1*3/5 ميلي متر است.

براي نوزادان: Template به كار رفته، ايجاد برشي به اندازة 0/5*2/5 ميلي متر مي‌كند.

داروها: بسياري از داروها كه موثر بر عملكرد پلاكت هستند، مي‌توانند زمان سيلان را طولاني كنند به عنوان مثال آسپيرين، داروهاي ضد التهابي غير استروئيدي، داروهاي ضد پلاكتي ديگر و آنتي‌بيوتيك هايي مثل پني‌سيلين و سفالوسپورين‌هـــــا مي‌توانند زمان سيلان را تا چهار روز پس از مصرف طولاني كنند.
معمولاً ضد انعقادهايي مثل هپارين و كومارين در دوزهاي درماني نمي‌توانند اثري برروي زمان سيلان داشته باشند

حجم گلبولي متراكم (هماتوكريت و PCV)

طولاني شدن زمان سيلان در بيماران با كم خوني شديد يا متوسط اتفاق مي‌افتد، مثلاً PCV كمتر از 30% در تعدادي از بيماران كه تزريق گلبولهاي قرمز يا اريتروپويتين باعث افزايش هماتوكريت آنها به بيش از 30 درصد مي‌شود، زمان سيلان كوتاهتر است.

كاهش پلاكت (ترومبوسيتوپني)

ترومبوسيتوپني برروي زمان سيلان تأثير مي‌گذارد. ارتباط منفي ضعيفي بين Template BT و شمارش پلاكتي 10^9*10 در ليتر و 10^9*100 در ليتر (100000 و 10000) گزارش شده است. پيشنهاد مي‌شود، هنگامي كه زمان سيلان طولاني مي‌گردد، يك شمارش پلاكتي براي تشخيص اختلالات عملكرد پلاكت، انجام شود.
در آزمايش زمان سيلان بيمار بايد به پشت دراز كشيده باشد.

دامنه مرجع

هر آزمايشگاهي بايد دامنه مرجع خود را به كار برد.
محدودة بالاتر بيشترين مقدار Template BT بين 9-5/5 دقيقه است.
زمانهاي طولاني‌تر بايد گزارش شود.
تفكيك محدودة زمان سيلان براي افراد جوان و كم سن به طور تقريبي، براي هر آزمايشگاه بايد تعيين شود.
زمان سيلان زير 2 دقيقه، اشتباه تكنيكي را نشان مي‌دهد.
زمان سيلان طبيعي در اشخاص زير ممكن است ديده شود:

* افراد داراي بيماري ون‌ويلبراند خفيف
* مصرف آسپيرين يا داروهاي غير استروئيدي ديگر
* اختلالات خفيف انعقاد خون

شرح‌ها

در اشخاص با زمان سيلان غيرطبيعي، آزمايش BT در تشخيص اختلالات اكتسابي و ارثي شديد و متوسط در فعل و انفعالات پلاكت با عروق آسيب ديده، مفيد است مثل:

* بيماري ون‌ويلبراند (VWD)] [Von Willebrand Disease

* ترومباستني گلانزمن (Glangmann thrombasthenia)
* سندرم برنارد سولير (Bernard Soulier Syndrome)
* اختلالات پلاكتي مشابه با مصرف آسپيرين (Aspirin like Platelet dysfunction)
* بيماري‌هاي ذخيره‌اي مثل (سندرم هرمانسكي پودلاك)
* بيماري ذخيره‌اي اكتسابي (مثل اختلالات ترشحي)

زمان سيلان مي‌تواند در كمبود فيبرينوژن خون و كمبودهاي شديد عوامل انعقاد (مثل فاكتور V و VIII) طولاني شود.

بيماران با فرم‌هاي خفيف‌تر بيماري ون‌ويلبراند ،اغلب داراي زمان سيلان طبيعي هستند. BT مي‌تواند در اختلالات عملكرد پلاكت مربوط به افزايش اورة خون، ميلوما و سندرم‌هاي ميلوپروليفراتيو و ميلوديسپلاستيك، طولاني شود.

آزمايش زمان سيلان BT))، براي تشخيص سيلان بيماران كانديد جراحي مفيد نيست. BT ، مي‌تواند براي ارزيابي افرادي كه بطور فاميلي سابقه زمان سيلان (BT) طولاني دارند، ارزشمند باشد.

زمان سيلان به روش (IVY) (Bleeding-time)

نام آناليت: سيلان (Bleeding)

ساختمان و متابوليسم: -

معرفي آزمايش، كاربرد باليني: زمان سيلان در روش IVY ارزش بيشتري دارد، چون فشار بر روي عروق مداوم و تحت كنترل مي‌باشد و فاكتورهاي انعقادي كمتر دخالت دارند. (فعال شدن مسير انعقادي حاصل از تروما) پلاكتها در اين روش نقش مهمي را دارا مي‌باشند. در بيماري هموفيلي آزمايش BT طبيعي است، چرا كه پلاكتهاي فرد اشكال ندارند و تنها كمبود فاكتور هشت وجود دارد.

اساس روش متداول: از نظر روش مشابه روش template است. در اين روش، يك بازوبند فشار خون بالاي ساعد بسته و فشار آن را به 40 ميليمتر جيوه رسانده و ثابت نگه مي‌داريم. سپس محل ساعد را با الكل 70 درجه تميز كرده و پس از خشك شدن سه سوراخ (يا دو) بوسيله لانست روي ساعد ايجاد مي‌كنيم. با استفاده از ميكرولانست 2 شكاف به عمق 2/5 ميلي متر و عرض حدود 1 ميلي متر مناسب مي‌باشد. كرونومتر را مي‌زنيم و هر 15 ثانيه خون را با كاغذ صافي خشك مي‌كنيم و زمان بند آمدن را يادداشت مي‌كنيم. بين زمان سه ناحيه مي‌توانيم معدل بگيريم.

روش مرجع: -

روش ارجح: -

روش‌هاي ديگر: -

نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: -

محدوده طبيعي:

2-7 دقيقه. اين روش اساساً يك متد غربالي براي اختلالات عملكرد پلاكت و درستي ديواره عروقي مي‌باشد. (در روش simplate :9 دقيقه)

واكنش تداخلي: زمان طول كشيده خونريزي مي‌تواند بدلايل زير باشد: 1) ترومبوسيتوپني: بهتر است شمارش پلاكتي قبل از اين آزمايش بررسي شود. بيمارانيكه شمارش پلاكتي زير L/ 9 10*50 دارند احتمالاً زمان خونريزي طولاني داشته و خونريزي مشكل بند خواهد آمد. 2) اشكال در عمل طبيعي پلاكتي: احتمال دارد اين اختلال مادرزادي باشد، مانند thrombasthenia ، اشكال ذخيره‌اي و... و يا اكتسابي، وابسته به داروها، وجود پاراپروتنيمي، ناهنجاريهاي پلاكتي وابسته به سندرم‌هاي ميلوديس پلاستي. 3) بيماري ون ويلبراند وابسته به نقص چسبندگي پلاكتها به اندوتليوم (كمبود فاكتور ون ويلبراند) 4) اختلالات عروقي مانند سندرم Danols Ehler يا elasticum Pseudoxanthoma 5) بندرت كمبود شديد فاكتور V يا XI يا آفيبرينوژنمي.

معايب و فوايد روش حاضر: منبع خطا در روش IVY ، ايجاد زخم و بسته شدن آن قبل از بند آمدن خونريزي است.

زمان انعقاد خون (زمان انعقاد خون كامل) (CT) (whole blood clotting time)

نام آناليت: انعقاد (Clotting)

ساختمان و متابوليسم: مدت زمانيكه لازم است تا خون به صورت لخته در آيد.

معرفي آزمايش، كاربرد باليني: زمان انعقاد، نشاندهندة نحوه عملكرد كليه فاكتورهاي سيستم‌هاي داخلي و مشترك است. فعال كننده پروسه انعقاد در اين آزمايش، تماس فاكتور 12 با شيشه بوده و مسير آن سيستم داخلي و سپس مشترك است. مي‌توان براي پيگيري درمان باهپارين از آن استفاده كرد، ميزان هپارين در بيمار طوري تنظيم مي‌شود كه زمان انعقاد خون كامل 2-5/ 1 برابر مقدار پايه يا پيش از آغاز درمان باشد.

اساس روش متداول: محاسبه مدت زمان لخته شدن خون در لوله، (روش Lee White : در سه لوله همولیز خون اضافه مي‌شود و هر 30 ثانيه ايجاد شدن لخته را در لوله اول بررسي مي‌كنيم. اين كار را براي دو لوله ديگر هم تكرار مي‌كنيم و زمان ايجاد

لخته را ثبت مي‌كنيم. (زمان انعقاد برابر است با زمان انعقاد در لوله سوم)
روش مرجع: -
روش ارجح: -
روش‌هاي ديگر: آزمايش بر روي لام، آزمايش انعقاد به روش لوله موييـنه.
نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: خون كامل وريدي يا مويرگي

محدوده طبيعي:
در روش Lee White : 8-18 دقيقه، آزمايش روي لام = 2-6 دقيقه، روش لوله موييـنه: 2-6 دقيقه.

واكنش تداخلي: تعريف نشده
معايب و فوايد روش حاضر: در روش Lee White اگر درجه حرارت بن ماري كمتر از 35 درجه سانتيگراد، و يا بيشتر از 45 درجه سانتيگراد، و يا قطر لوله آزمايش بيشتر از حد لازم (75*10) باشد، زمان انعقاد، به طور كاذب طولاني مي‌شود. روش بررسي زمان انعقاد روي لام به دليل استاندارد نبودن درجه حرارت و خشك شدن لام ارزش چنداني ندارد. در روش لوله مؤيينه هم به علت فشار دادن محل نمونه‌گيري و احتمال ورود عصاره بافتي زمان انعقاد دقيق نخواهد بود. استفاده از آزمايش CT در غربال وضعيت انعقادي ارزشي ندارد.

PT با تعيين ميزان I.N.R (Prothrombin Time) PT

نام آناليت: پروترومبين (prothrombin)
ساختمان و متابوليسم: پروترومبين، پروتئيني است كه توسط كبد توليد مي‌شود و عملكرد آن در لخته شدن خون است. توليد پروترومبين به ميزان مصرف و جذب ويتامين K وابسته است.
در طي روند توليد لخته، پروترومبين به ترومبين تبديل مي‌شود. در بيماري كبد ميزان آن كاهش مي‌يابد. اين آزمايش به بررسي عوامل انعقادي شركت كننده در مسير خارجي (2، 5، 7 و 10) مي‌پردازد. البته مفهوم پروترومبين در آزمون PT ، كمپلكس پروترومبين است كه شامل فاكتورهاي 2 و 7 و 9 و 10 است نه پروترومبين تنها. اين آزمايش زمان تشكيل لخته پلاسما در حضور غلظت‌هاي مناسب عصاره بافتي (ترومبوپلاستين) را اندازه‌گيري نموده و نشان دهنده كارآيي سيستم انعقاد خارجي است. گرچه نظر عمومي بر اين است كه اين آزمايش پروترومبين را بررسي مي‌كند، اما اين آزمايش بستگي به عكس العمل مابين فاكتورهاي V ، VII و X و غلظت فيبرينوژن پلاسما دارد.
معرفي آزمايش، كاربرد باليني: PT يكي از چهار آزمايش غربالي مهم در تشخيص بررسيهاي انعقادي مي‌باشد. در درمان با ضد انعقادهاي خوراكي وارفارين، كومارين به طور معمول اين آزمايش درخواست مي‌شود.

وضعيتهايي كه سطح PT در آنها بالا مي‌رود شامل كمبود پروترومبين، همچنين فاكتورهاي 5، 7 و 10، (بطور معمول كمتر از 20 تا 30 درصد)، كمبود ويتامين K ، بيماري خونريزي دهنده نوزادان، بيماري كبدي، انسداد صفراوي، افزايش ويتامين A ، DIC (انعقاد منتشره داخل عروقي) و كمبود فيبرينوژن و SLE (لوپوس اريتماتوز سيستميك)، پلي‌سيتمي (چون ميزان پلاسما كم است و نسبت سيترات زياد مي‌شود لذا PT طولاني مي‌گردد). كاهش سطح آن در: پركاري تخمدان، Regional enteritis ، عواملي كه روي PT اثر ندارند، بيماري كريسمس (كمبود فاكتور 9)، هموفيلي A ، اختلالات پلاكتي (ITP) و كمبود ون‌ويلبراند. فاكتورهاي عمل كننده در مسير خارجي (بيروني) انعقاد و نحوه اثر:

كمپلك

فاكتور

Ca^{2+}

فاكتور

فاكتور

فسفوليپيد
Ca^{+2}

ترومبي

پروترو

فيبرين

فيبرين

فاكتور

پايدار

اساس روش متداول: پلاسماي بيمار را با ترومبوپلاستين و كلرور كلسيم كه به صورت ليوفيليزه با فواصل زماني مشخص مخلوط مي‌كنيم و با ثبت زمان، زمان بدست آمده را در جدول و منحني‌هاي نيمه لگاريتمي كه بر اساس زمانهاي طبيعي بدست آمده‌اند قرار مي‌دهيم و درصد فعاليت فاكتورهاي انعقادي مسيرهاي خارجي و مشترك را تعيين و گزارش مي‌كنيم.

روش كار: محلول يكنواخت شده عامل بافتي و يون كلسيم را به دماي 37 درجه مي‌رسانيم. 0/1 سي سي پلاسماي بيمار كه به 37 درجه رسيده (پلاسما نبايد بيشتر از 10 دقيقه در 37 درجه بماند) + 0/2 سي سي از معرف عامل بافتي و يون كلسيم را افزوده و با زدن كرنومتر بعد از 5 ثانيه پلاسما را از نظر وجود لخته بررسي مي‌كنيم. زمان لخته شدن پلاسماي كنترل را نيـــز مانند آزمايش انجام مي‌دهيم. گزارش آزمون زمان پروترومبين بر پايه نسبت طبيعي شدة بين المللي:

INR (internationl Normalized Ratio)

(= INR زمان پروترومبين بيمار بر پايه ثانيه زمان پروترومبين كنترل بر پايه ثانيه) ISI

هر معرف ترومبوپلاستين از هر شركت سازنده با مقايسه با مرجع سازمان بهداشت جهاني كاليبره شده و يك شاخص حساسيت بين المللي (ISI) دريافت مي‌كند. INR : به معناي زمان پروترومبيني است كه اگر آزمايش با ترومبوپلاستين مرجع بين المللي انجام مي‌گرفت بدست مي‌آمد.

روش مرجع: -

روش ارجح: -

روش‌هاي ديگر: روش يك مرحله‌اي، ميكروتكنيك

نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: پلاسما (سيترات سديم) كه براي 2 ساعت در دماي اتاق و 4 ساعت در 4 درجه قابل نگهداري است. براي روش يك مرحله، در روش ميكروتكنيك: خون مويرگي (ميكروپيپتهاي سيليكونه، سيترات سديم) نسبت خون به سيترات سديم 9 به 1 است.

محدوده طبيعي:

مقادير مرجع بسته به ترومبوپلاستين مصرفي بسيار متغير است.

به طور معمول 11-15 ثانيه

نوزادان 2-3 ثانيه

(1)INR

واكنش تداخلي: در شرايط داخل بدن (invivo) : داروهايي چون استامينوفن، استوهگزاميد، آمينوسالسيليك اسيد، استروئيدهاي آنابوليك، آنتي استرپلاز، آسپارژيناز، آسپرين، كربني سيلين، سفالوسپورين‌ها، كلسترامين، سيكلوفسفاميد، اتانول، هپارين، اينترفرون آلفا، نياسين، ضد انعقادهاي خوراكي، پيرازين آميد، تولبوتاميد و داروهايي كه با ضد انعقادهاي خوراكي واكنش مي‌دهند شامل آلوپورينول، كلرامفنيكل،... در افزايش اين تست و باز هم در شرايط داخل بدن (invivo) : مصرف الكل، آسپرين (دوزهاي كم)، مركاپتوپورين، ضد بارداريهاي خوراكي

و داروهاي واكنش دهنده با ضد انعقادي خوراكي كه اثر آنها را كم مي‌كنند كه شامل: باربيتوراتها، كاربامازپين، كورتيكواستروئيدها، اتانل، فني توئين، ريفامپين باعث كاهش در ميزان اين آزمايش مي‌گردند. سطح بالاي آنتي ترومبين هم يكي از عوامل كاهش دهنده است.

معايب و فوايد روش حاضر: در صورتيكه نمونه براي طولاني مدت در 4 درجه نگهداري شود PT كم مي‌شود. وجود ترومبوپلاستين بافتي يا همولیز در نمونه‌ها زمان پروترومبين را كاهش مي‌دهد. اين آزمايش براي پيگيري درمان با كومارين كاربرد دارد. اگر سطح فاكتورهاي 2 و 5 و 7 و 10 كمتر از 20 الي 30 درصد حد نرمال باشد PT طولاني مي‌شود. ذخيره سازي طولاني مدت در 4 درجه عامل كوتاه شدن PT است. همچنين نمونه‌هاي آلوده با ترومبوپلاستين بافتي يا همولیز باعث كوتاه شدن PT مي‌شود.

زمان نسبي ترمبوپلاستين فعال شده APTT ، Activated partial PTT ، PTT

نام آناليت: ترمبوپلاستين (thromboplastin)

ساختمان و متابوليسم:
فاكتورهاي شركت كننده در مسير داخلي:

كاليكر

كينينو

پره كا

12 فعا

كينيوژ

فاكتور 12
(هاگمن

11 فاكتور (فاكتور ضد هموفيلي)،
پيش م

11 فعا

فاكتور
9 (كري

9 فعال

فاكتور 8
فسفوليپيد
Ca

فاكتور

10 فعا

فاكتور 5 (پروآكسلرين)
فسفولي

پروترو

ترومبي

فيبرين

فيبرين

فاكتور

فيبرين

معرفي آزمايش، كاربرد باليني: **اين آزمايش، به سنجش عوامل انعقادي شركت كننده در مسير داخلي انعقاد (كه شامل همه فاكتورها به جز 13، 7 و فسفوليپيد پلاكتي) است، مي‌پردازد. موادي چون: اندازه‌هاي ثابت فسفوليپيد، يون كلسيم و فعال كنندة عوامل تماسي مثل كائولين به پلاسماي بيمار كه عاري از پلاكت است افزوده مي‌گردد. زمانيكه فاكتورهاي 8، 9، 11 و 12 به**

كمتر از 30 درصد ميزان طبيعي برسد، اين آزمايش طولاني مي‌شود. به همين دليل، PTT يك آزمون غربالي حساس براي تشخيص كمبود عوامل انعقادي است. در پيگيري درمان با هپارين نيز اين آزمايش با ارزش است (بيشتر عوامل فعال انعقادي كه با هپارين خنثي مي‌شوند در مسير دروني انعقاد هستند، به همين دليل زمانيكه PTT بيمار 2/5-1/5 برابر ميزان آن پيش از درمان با هپارين باشد مي‌توان گفت كه هپارين در سطح موثر درماني است). كمبود فاكتورهاي 8، 9، 10، 11، 12، كينينوژن، HMW ، پركاليكرئين، فيبرينوژن، كمبود فاكتورهاي 2 يا 5، DIC ، هپارين، وارفارين در افزايش زمان اين آزمايش مؤثرند. در بيماريهاي: كمبود ويتامين K ، كمبود فيبرينوژن خون، بيماري كبدي، هموفيلي A و B نيز زمان آزمايش PTT طولاني مي‌شود.

اساس روش متداول: اندازه‌گيري و ثبت سرعت لخته شدن پلاسما بر حسب ثانيه به ميزان فاكتورهاي انعقادي مسير داخلي بستگي دارد. روش انجام آزمايش روتين: 0/1 ميلي ليتر پلاسماي بدون پلاكت + 0/1 ميلي ليتر عصاره فسفوليپيد Ñ مخلوط 3-2 دقيقه در 37 درجه + 0/1 ميلي ليتر كلرور كلسيم (كه قبلاً به 37 درجه رسيده) Ñبه محض افزودن كورنومتر زده شود Ñ مشاهده لخته توقف زمان.

روش مرجع: -

روش ارجح: -

روش‌هاي ديگر: ثبت زمان لخته شدن پلاسما بر حسب ثانيه.

نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: خون كامل (سيترات سديم) كه فوراً سانتريفوژ شده و پلاسماي آن خارج مي‌شود. نمونه پلاسما براي 1 ساعت در 4 درجه يا 28 روز در فريز پايدار است.

محدوده طبيعي:

محدوده بسته به مصرف مصرفي متفاوت است اما بطور معمول كمتر از 35 ثانيه است.

واكنش تداخلي: مصرف هپارين و ليپميك بودن در بالا بردن نتيجة آزمايش مؤثر است. در شرايط داخل بدن (invivo) ، عواملي چون: آنيسترپلاز، كلرپرومازين و والپوريك اسيد PTT را طولاني مي‌كند.

معايب و فوايد روش حاضر: خون سيتراته بايد به منظور تهيه پلاسماي بدون پلاكت در دور 2000 به مدت 20 دقيقه سانتريفوژ شود. حساسيت روش به نوع و غلظت فعال كننده و فسفو ليپيد مصرفي بستگي دارد. در صورتي كه نمونه به هر نحو با ترومبوپلاستين بافتي آلوده شود باعث كاهش اين زمان مي‌گردد. در مواردیكه APTT طولاني مي‌شود، مخلوط 50:50 پلاسماي طبيعي و پلاسما بايد آزمايش شود. در صورتيكه APTT اين مخلوط به بيش از 50% تفاوت بين 2 آزمايش منفرد برسد، يعني پلاسماي طبيعي زمان طولاني را اصلاح نمايد، بيمار احتمالاً در يك يا چند فاكتور انعقادي مشكل دارد. (براي جزييات به كتب معتبر مراجعه نماييد).

- NCCLS روشهاي مرجع انجام PT و PTT □□□□□□□□□□□□□□□□□□□

مقدمه

نتايج PT و APTT توسط يكسري عوامل پيش از آناليز همچون نحوه جمع‌آوري نمونه، خصوصيات سطحي ظرف نمونه‌برداري، نوع ضد انعقاد مصرفي، نحوه ذخيره‌سازي نمونه و عوامل آناليتيك همچون دما و زمان انكوباسيون، زمان تماس با ماده فعال كننده سطحي، نوع معرفها و نحوه بررسي اتمام كار تحت تأثير قرار مي‌گيرند.

در اين متن متدهاي استاندارد جمع‌آوري، انتقال و آماده سازي نمونه‌ها بررسي شده است. رعايت اين نكات باعث تقليل اثر عوامل فوق‌الذكر و افزايش دقت و صحت انجام اين تستها مي‌شود.

هدف:

اين متن به بررسي روشهاي روتين بررسي PT و PTT بر روي پلاسماي سيتراته مي‌پردازد.

ايمني كار:

چون جداسازي نمونه‌هاي عفوني از غير عفوني غيرممكن است لذا همه نمونه‌هاي بايستي با احتياط بررسي شوند

اصطلاحات:

- فاكتور I (فيبرينوژن)
- فاكتور II (پروترومبين)
- فاكتور III (ترومبوبلاستين، فاكتور نسجي)
- فاكتور IV (كلسيم)،
- فاكتور V (فاكتور حساس)
- فاكتور VII (فاكتور ثابت)
- فاكتور VIII (فاكتور ضد همرفيليك (AHF) ، گلو به اين ضد سرفيليك (AHG) ، فاكتور ضد هموفيليك A ، فاكتور C

(VIII
- فاکتور IX (PTC ، فاکتور کریسمس، فاکتور ضدهموفیلیك B).
- فاکتور X : (فاکتور استوآرت)
- فاکتور XI (فاکتور ضد هموفیلیك)
- فاکتور XII (فاکتور هاگمن، فاکتور سطحي، فاکتور تماسي)
- فاکتور XIII (فاکتور پایدار کننده فیبرین، آنزیم پایدار کننده فیبرین)
- فاکتورهاي دیگر: پرکالیکرئین، کینینوژن با وزن مولکولي زیاد

فعال کننده‌هاي تماسي

موادي که فاکتور XII را فعال مي‌کنند و باعث فعال شدن آنزیمهاي پروتئولیتیك مي‌شوند.

کنترل (پلاسما)

موادي که براي بررسي عملکرد معرفها، وسایل، و پي‌پت‌ها بکار مي‌روند. کنترل مي‌تواند بشکل مجدد یا لیوفیلیزه باشد. کنترل‌ها در دو محلول نرمال و غیرنرمال مي‌باشند که فرم نرمال داراي زماني در محدوده طبیعي است و فرم غیرطبیعي در محدوده قسمت‌هاي PT و APTT با زمانهاي طولاني مي‌باشد.

هپارین:

هپارین استاندارد مخلوطي از موکو پلي‌ساریدهاي با وزن‌هاي مولکولي بسیار متفاوت (از 5 تا 50000) مي‌باشند.

INR) International normalized ratio)

INR نسبتي است که توسط WHO تعریف شده است. INR از ضرب کردن R یا درصد PT در ISI که توسط سازنده مشخص شده، بدست مي‌آید.

$$INR = R * ISI$$

ISI) International Sensitivity index)

این ضریب توسط WHO تعیین گردیده و براي محاسبه INR بکار مي‌رود.

Lupus anticoagulant

ایمونوگلوبولیني است از کلاس IgG یا IgM که در پلاسماي افراد مبتلا به لوپوس وجود دارد و با تستهاي وابسته به فسفولیپید تداخل ایجاد مي‌کنند (مثل APTT).

وسایل:

ظروف مصرفي: استفاده از ظروفي که تر شونده نباشند. (سطوح داخلي آنها غیر تر شونده باشد).

سیستمهاي توزیع: این سیستمها باید از نوع استاندارد باشند.

سیستمهاي گرم کننده: براي گرم نگه داشتن نمونه‌ها در حرارت $1\ ^{\circ}C$ 37 مي‌بایست از بن ماري‌هاي استاندارد استفاده کرد.

نمونه‌برداري؛ حمل و نگهداري نمونه

این مراحل مي‌بایست طبق پروتکل NCCLS انجام شود.

نکات قابل توجه هنگام انجام تستهاي PT و APTT
دستورالعمل تولیدکنندگان

این دستورالعملها باید همراه کیت باشند و کاملاً مي‌بایست از آنها پیروي کرد.

تغییرات قابل قبول

خطاهاي آنالیتیکال در اثر عوامل تداخلي مي‌توانند بر روي نتایج PT تأثیر بگذارند. با توجه به این خطاها، جهت قابل قبول بدون نتایج مي‌بایست میزان CV روزانه کمتر از 5% باشد.

خصوصیات آب مورد استفاده

آب مورد استفاده مي‌بایست شرایط موجود در NCCLS را دارا باشد.

غلظت یون کلسیم

غلظت بدن کلسیم مي‌بایست طبق دستورالعمل سازنده باشد.

شرایط وسایل مورد استفاده:

وسايل مي‌بايست همگي تميز (شامل وسايل و لوله‌هاي شيشه و پلاستيكي مورد استفاده) باشند.

نتايج كنترل خارج از محدوده استاندارد.

در صورتي كه نتايج كنترلها خارج از محدوده تعيين شده باشد مي‌بايست همگي مراحل شامل معرفها، پلاسماي كنترل و وسايل از لحاظ كارآيي ارزيابي شوند.

جمع‌آوري، حمل‌ونقل و نگهداري پلاسماي كنترل

اگر پلاسماي كنترل توسط آزمايشگاه تهيه مي‌شود مي‌بايست همانند پلاسماهاي مورد استفاده در تست‌ها با آن عمل شود يعني از همان ضد انعقاد و به همان ميزان به خون افزوده شود و شرايط حمل و نگهداري آن مشابه پلاسماي بيماران باشد.

تناوب انجام تستهاي كنترل

كنترل را مي‌بايست در روز در ابتداي انجام آزمايش و يا در حين آزمايش انجام داد. همچنين با تغيير ويال مصرفي و يا تغييرات اساسي در وسايل (مثل تغيير سمپلر، پيپت) مي‌بايست كنترل مجدداً انجام گيرد. در صورت بالا بودن حجم كاري آزمايشگاه مي‌بايست حداقل پس از هر 40 تست يكبار كنترل تست كنترلي گذاشته شود. (يك كنترل نرمال و يك كنترل غيرطبيعي).

تكرارپذيري تستهاي دوتايي:

ميزان تفاوت نتايج دوتايي بين دو نمونه كنترل نبايد بيش از 10% باشد.

محدود مرجع

محدوده مرجع مي‌بايست توسط آزمايشگاه تعيين شود.

كنترل كيفي عمومي:

نتايج كنترل كيفي مي‌بايست هر روز توسط افراد ورزيده از جهت بررسي Shift نتايج كنترل يا اعداد خارج از محدوده كنترل بررسي شود. نگهداري تمامي محلول و وسايل مي‌بايست طبق توصيه‌هاي سازندگان دستگاهها صورت پذيرد.

همچنين نتايج كنترل كيفي مي‌بايست حداقل ماهي يكبار بازنگري شوند تا نتايج از لحاظ تغييرات بلندمدت نيز بررسي گردند. آزمايشگاه مي‌بايست در برنامه‌هاي كنترل كيفي كه توسط سازمانهاي معتبر تدارك ديده مي‌شود، مستمراً شركت جويند. همچنين مي‌بايست شماره سريال تمامي معرفها، مواد مصرفي نيز در محلي مطمئن ثبت گردند.

انجام آزمايش :PT اصول آزمايش PT

ترومبوبلاستين يون كلسيم در حرارت 37° با پلاسماي سيتراته و فاقد پلاكت مخلوط مي‌شوند. PT مدت زماني است (به ثانيه) كه طول مي‌كشد تا لختة قابل رؤيت فيبرين در اين مخلوط ايجاد گردد.

معرفهاي PT : ترومبوپلاستين

معمولاً معرف ترومبوپلاستين مخلوطي از ترومبوپلاستين - يون كلسيم مي‌باشد كه در يك بافر با هم آميخته شده‌اند.

درجه حرارت انجام PT

حرارت مناسب براي آزمايش PT ($37^{\circ}C$ 1 $^{\circ}c$) مي‌باشد. حرارت پلاسما مي‌بايست قبلاً به $37^{\circ}C$ برسد. مدت انكوباسيون پلاسما در $37^{\circ}C$ نبايد از 10 دقيقه تجاوز نمايد.

مراحل انجام PT

يك حجم از پلاسماي بيمار را كه قبلاً به $37^{\circ}c$ رسيده با دو حجم مخلوط ترومبوپلاستين - كلسيم (كه به $37^{\circ}c$ رسيده) مخلوط شود. به مجرد مخلوط شدن ايندو زمان سنج را بكار اندازيد و زمان لازم جهت تشكيل لخته را ثبت كنيد. زمان طبيعي PT ، 12-5/14 ثانيه است.

نقطه پايان تست PT

معمولاً پايان آزمايش با وسايل چشمي يا الكترومكانيكي تعيين مي‌شود. در روش دستي تعيين PT بايد به صورت دوتائي انجام و ميانگين دو تست به عنوان نتيجه نهايي گزارش شود. در صورت استفاده از دستگاههاي نيمه خودكار يا خودكار مطمئن مي‌توان تنها با يكبار آزمايش نتيجه را گزارش كرد.

گزارش نتايج PT

نتايج مي‌بايست با اعشار ثانيه گزارش شوند. همچنين هنگام گزارش بايد محدود مرجع و INR نيز گزارش گردد.

درصد PT نيز بايد گزاش شود. ثابت شده كه در بيماران تحت درمان با داروهاي ضد انعقادي گزارش INR ترجيح دارد زيرا ميزان تغييرات ناشي از روش بكار رفته را به حداقل مي‌رساند.

انجام آزمايش APTT

اصول آزمايش APTT

پلاسماي سيتراته با فعال كننده تماسي و محلول فسفوليپيدي در 37°c با هم مخلوط مي‌شوند. فاكتور تماسي فاكتورهاي XI و XII را فعال مي‌كند. فسفوليپيد بستري را براي فعل و انفعال فاكتورهاي انعقادي مهيا مي‌كند. پس از انكوباسيون، ميزان مشخصي از يون كلسيم به اين مخلوط اضافه مي‌شود و زمان لازم براي تشكيل لخته اندازه‌گيري مي‌شود. يون كلسيم فعال شدن آبشار داخلي انعقاد را براه مي‌اندازد.

محلولهاي APTT

محلول APTT مخلوطي از فعال كننده فاكتور تماسي و ترومبوپلاستين نسبي مي‌باشد. فعال كننده مي‌تواند كائولين، سليئيت، سيليكات، يا الاژيك اسيد باشد. محلولها و وسايل اندازه‌گيري بايد قدرت تشخيص حداقل 0.3U/ml (30% فعاليت) فاكتورهاي VIII ، IX ، XI را داشته باشند.

درجه حرارت انجام APTT

مشابه روش PT

زمان فعال شدن توسط فاكتورهاي تماسي

منظور از مورد فوق مدت زمان لازم براي انكوبه كردن پلاسما با محلول APTT مي‌باشد. اين زمان بسيار حائز اهميت مي‌باشد و در اين مورد بايد به دقت به دستورالعمل سازنده كيت عمل كرد.

مراحل انجام APTT

تست در دو مرحله انجام مي‌شود. مرحله اوّل شامل مخلوط كردن يك قسمت محلول APTT با يك قسمت پلاسماي سيتراته مي‌باشد. به محض انجام اين عمل ضمن تكان دادن لوله براي مخلوط شدن ايندو زمان را ثبت كنيد تا اين مخلوط طبق دستور سازنده در زمان مشخص به خوبي با هم مخلوط شوند. پس از مدت لازم، به مخلوط فوق محلول يون كلسيم كه از قبل در 37°c گرم شده را به مخلوط اضافه و زمان را تا ايجاد لخته قابل مشاهده ثبت كنيد.

نقطه پايان تست APTT

مطابق PT

حساسيت به هپارين

با توجه به اينكه تست APTT جهت پايش درمان با هپارين بكار مي‌رود، لذا وسايل / معرفها بايد براي بررسي به اين نوع درمان حساس باشند. محدوده درماني APTT بايد در آزمايشگاه هر بيمارستاني تعيين گردد تا مشخص گردد هر APTT مطابق چه ميزان هپارين مصرفي است. اين امر مستلزم در دسترس بودن تستي براي مشخص كردن ميزان هپارين پلاسما مي‌باشد (تيتراسيون بوسيله پروتامين سولفات).

ضد آنعقادهاي لوپوسي

برخي محلولهاي APTT به لوپوس آنتي‌گوآكولانها حساسند در حاليكه برخي ديگر اين خصوصيت را ندارد. اين امر بايد در بروشور كيت توسط سازنده كيت مشخص شود (حساسيت با عدم حساسيت به لوپوس آنتي‌كوآگولان)

گزاش APTT

نتايج APTT بايد به ثانيه گزارش و در كنار آن محدوده مرجع ذكر گردد.

منابع خطا

مسائل مربوط به نمونه

مسائل زير (در نمونه) مي‌توانند موجب حصول نتايج غلط شوند.

* عدم رعايت نسبت ضد انعقاد / نمونه
* عدم تنظيم ميزان ضد انعقاد در افراد داراي هماتوكريت بيشتر از 55 %
* عدم‌استفاده از ضدانعقاد مناسب يا مناسب‌نبودن‌غلظت‌ضدانعقاد مصرفي
* نمونه‌برداري لخته‌هاي ريز؛ نمونه ايكتريك، ليپميك و يا همولیز شده.
* مخلوط كردن نامناسب يا بسيار شديد نمونه با معرفها
* آلوده بودن لوله‌ها (نمونه‌برداري يا لوله‌هاي انجام آزمايش)
* آلودگي لوله‌ها و ظروف به هپارين
* مناسب نبودن لوله‌هاي آزمايش يا لوله‌هاي نمونه‌برداري

مسائل مربوط به معرفها

* آلودگي معرفها
* به حجم رساندن غلط معرفها
* به حجم رساندن معرفها با موادي غير از مواد مورد نظر
* خراب شدن معرفها بعلت نگهداري غلط يا حمل‌ونقل غلط

* استفاده معرفها پس از زمان انقضاء

منابع ديگر خطاهاي پيش از آناليز

اين اشتباهات باعث تأخير انداختن روشهاي غيراستاندارد براي انتقال و آماده سازي و نگهداري يا ذخيره نمونه‌هـــــــــا مي‌شود.

خطاهاي آناليز

* مدت زمان انكوباسيون يا زمان فعال كردن (مخلوط كردن پلاسما با فاكتور فعال كننده سطحي) غلط
* تخليه غلط يا غير دقيق محلولها و يا توزيع نادرست معرفها
* عدم اجراي مراحل بطور صحيح و كامل و يا عدم استفاده صحيح از وسايل مخصوص آزمايش
* اختلال كاركرد دستگاهها مثل حرارت نامناسب، نوسان برق و...

تعيين مقدار فيبرينوژن (Fibrinogen)

نام آناليت: فيبرينوژن، (Fibrinogen)

ساختمان و متابوليسم: فيبرينوژن يكي از پروتئينهاي اساسي پلاسما مي‌باشد و مقدار نرمال آن mg/dl 180-400 است. فيبرينوژن به وسيله ترومبين تبديل به فيبرين مي‌شود. محل سنتز اين پروتئين هپاتوسيتهاي كبد است و يكي از پروتئينهاي فاز حاد محسوب مي‌شود. نيمه عمر بيولوژيكي آن 77-108 ساعت مي‌باشد و آنزيمهاي فيبرينوليز مثل سيستم پلاسمينوژن - پلاسمين موجب كاتابوليزه شدن آن مي‌شوند. فيبرينوژن از يك جفت زنجيره تشكيل شده كه هر كدام از 3 زنجيرة پلي پپتيدي كوچكتر تشكيل يافته‌اند. اين پلي پپتيدها بوسيلة پل‌هاي اتصالي (S-S) بهم متصلند. تحت تأثير ترومبين (فاكتور 2 فعال) دو پپتيد كوچك از ملكول فيبرينوژن جدا گشته و تبديل به فيبرين مي‌شود. منومرهاي فيبرين ايجاد شده از واكنش فوق الذكر در پلاسما نامحلول‌تر از فيبرينوژن بوده و تحت تأثير شرايط نرمال به سرعت پليمريزه شده و تبديل به ماده ژله مانندي مي‌شوند.

معرفي آزمايش، كاربرد باليني: بدليل اينكه فيبرينوژن يك پروتئين فاز حاد است، ميزان آن در التهابات يا نكروز بافتي در طي 24 ساعت به ميزان زياد و در تجويز استروژنها و حاملگي افزايش مي‌يابد. در DIC يا انعقاد منتشره داخل عروقي و عملكرد غيرطبيعي كبد در سنتز آن كاهش ديده مي‌شود. تاكنون چند نوع ديس فيبرينوژنمي (بد ساخته شدن فيبرينوژن) با زمينه ارثي ديده شده كه مشكل كلينيكي مهمي ايجاد نكرده است. آفيبرينوژنمي نيز يك بيماري نادر ارثي است. اثر بسيار مهم فيبرينوژن در سديمان و افزايش آن به دليل سنتز بالاي آن در التهابات و اينكه يك پروتئين كلوئيدي است مي‌باشد.

اساس روش متداول: روش كلاوس. در اين روش با افزودن مقادير استاندارد ترومبين به پلاسماي سيتراته و اندازه‌گيري سرعت تبديل فيبرينوژن به فيبرين، به غلظت فيبرينوژن در پلاسما پي مي‌برند. در اين روش بايد از پلاسماي رقيق شده استفاده شود كه با محلول قوي ترومبين لخته شده و پلاسما بايد براي كشف كمترين رقت مهارگرها رقيق شود (FDPs و هپارين). محلول قوي ترومبين بايد به حدي باشد كه زمان انعقاد در طيف وسيعي نسبت به غلظت ترومبين بستگي نداشته باشد. منحني كاليبراسيون براي هر سري معرف ترومبين تغيير كرده و بايد اصلاح شود.

روش مرجع: -

روش ارجح: -

روش‌هاي ديگر: روش كلاوس (زمان تشكيل لخته)، RID ايمنواسي، اندازه‌گيري ميزان پروتئينهاي تشكيل دهنده لخته (رنگ سنجي)، روش اليس و استرونسكي (كدورت سنجي).

نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: پلاسماي سيتراته كه براي چندين ماه در ^{3} 20- پايدار است.

محدوده طبيعي:

در روش كلاوس:

	gr/L	mg/dl
بالغين	200-400 *0/01	2-4
نوزادان	125-300 *0/01	1/25-3
روش 400	200-RID	2-4

واكنش تداخلي: در شرايط داخل بدن (invivo) : مصرف استروژنها و ضد بارداريهاي خوراكي در افزايش و استروئيدهاي آنابوليك، آندروژن‌ها، آسپارژيناز، روغن ماهي، فعال كننده‌هاي پلاسمينوژن و والپوريك اسيد در كاهش آن مؤثرند. در شرايط آزمايشگاهي (invitro) : وجود ممانعت كننده‌هاي پلي مريزاسيون فيبرين و هپارين در غلظت بالا باعث كاهش آن مي‌گردند.

معايب و فوايد روش حاضر: فيبرينوژن به عنوان يك پروتئين پلاسمايي اصلي بر روي سرعت رسوب خون (ESR) مؤثر است. و غلظت بالاي آن موجب افزايش اين سرعت مي‌گردد. در روش RID فيبرينوژن توتال اندازه‌گيري مي‌شود. لخته تشكيل شده در اين روش ممكن است حالت "wispy" ناشي از رقت پلاسما ايجاد نمايد و تشخيص end-point آن با دستگاههاي اتوماتيكي احتمالاً آسانتر خواهد بود.

روش اندازه‌گيري فيبرينوژن پلاسما NCCLS -

پيش‌گفتار

يكي از نقشهاي فيزيولوژيك سيستم انعقادي، تبديل فيبرينوژن پلاسما به فيبرين در محل ضربه يا جراحت است. فيبرينوژن در موارد زير كاهش مي‌يابد. آفيبرينوژنمي و هايپوفيبرينوژنمي، برخي موارد ديس فيبرينوژنمي، و بعضي حالات اكتسابي مانند انعقاد داخل عروقي منتشر، فيبرينوليز سيستميك، پانكراتيت، نارسايي شديد كبد بعد از درمان با ال ـ آسپاراژيناز يا سديم والپروآت. هرچند معمولاً در بيماران داراي فيبرينوژن mg/dl 50 خونريزي ديده نمي‌شود، ولي در برخي شرايط استرس‌زا (جراحي، تروما) ممكن است خونريزي در حالي رخ دهد كه ميزان فيبرينوژن كمتر يا مساوي mg/dl 100 مي‌باشد.

فيبرينوژن يك واكنشگر فاز حاد است. هايپرفيرينوژنمي همچنين در حالت‌هاي (Hypercoagulable) (در افراد مبتلا به ترومبوز) ديده مي‌شود. افزايش سطح فيبرينوژن در برخي حالات فيزيولوژيك، مانند حاملگي نيز گزارش شده است. فيبرينوژن به عنوان ريسك فاكتور ايجاد بيماري قلبي ـ عروقي آترواسكلروتيك شناخته شده است. نبود يك پلاسماي رفرانس براي اندازه‌گيري فيبرينوژن، دقت اندازه‌گيري فيبرينوژن در آزمايشگاه‌هاي متفاوت را مختل مي‌سازد. هنوز متدي براي اندازه‌گيري كمّي فيبرينوژن توصيه نشده است. گسترده‌ترين تكنيك‌هاي مورد استفاده عبارتند از : آزمايش‌هاي توربيديمتريك، اندازه‌گيري پروتئين قابل انعقاد، رسوب يا دناتوراسيون، روش تغيير يافته TT تام با استفاده از ترومبين (Clauss) يا زهرمار (يك آنزيم شبه ترومبين،) يا تكنيك‌هاي ايمونولوژيك.

اين دستورالعمل، به توصيف روش (Clauss) مي‌پردازد كه عملي‌ترين و رايج‌ترين روش مورد استفاده جهت اندازه‌گيري فيبرينوژن پلاسما در آزمايشگاههاي مي‌باشد.

احتياطهاي كلي

بدليل عدم‌اطلاع از آلوده‌بودن يا نبودن يك نمونه، بايد تمام نمونه‌هاي خون به عنوان نمونه بالقوه آلوده تلقي شوند.

اصول

در انعقاد خون طبيعي، فيبرينوژن در حضور آنزيم ترومبين به فيبرين تبديل مي‌شود. اين تبديل در يك فرآيند دو مرحله‌اي صورت مي‌گيرد.

مرحله اول، پروتئوليز فيبرينوپپتيدهاي A و B با واسطه ترومبين است كه از زنجيره‌هاي a و bفيبرينوژن بدست مي‌آيند. فيبرينوپپتيد A ، سريعتر از B تجزيه مي‌شود. بعد از آزادشدن فيبرينوپپتيدها، فرم فيبرينوژن حاصل در اصطلاح «منومرفيبرين» نام دارد.

در مرحله دوم، اين منومرها خودبخود پليمريزه مي‌شوند و اجتماعاتي از پليمرهاي نامحلول فيبرين را تشكيل مي‌دهند. تشكيل پليمرهاي نامحلول فيبرين در آزمايشگاه به عنوان نقطه پايان واكنش Time ing Clot ف تشخيص داده مي‌شود. زمان لختة پلاسماي رقيق‌شده، نسبت عكس با غلظت فيبرينوژن پلاسما دارد به شرطي كه ترومبين با غلظت زياد استفاده شود. ترومبين با غلظت فراوان به پلاسماي رقيق اضافه مي‌شود و زمان لازم براي تشكيل لخته ثبت مي‌گردد.

تجهيزات

لوله آزمايش

سيستم‌هاي حمل و نقل پلاستيكي

معرف‌ها

معرف‌هاي تجاري

معرفهاي غيرتجاري

در صورت عدم‌استفاده از معرفهاي تجاري استفاده از معرفهاي زير توصيه مي‌شود.

بافر باربيتال (0.05pH = 7.4)

ترومبين (انساني يا گاوي)

با واحد NIH معلوم، كه بايد در ظروف پلاستيكي به حالت ليوفيليزه نگهداري شوند. محلول استوك ترومبين منجمد با NIH 1000 Units/ml حداقل يكسال در ^{3}c -70 پايدار مي‌ماند.

پلاسماي كنترل طبيعي

كه مي‌تواند به صورت يك Pool از پلاسماي نرمال باشد كه در آزمايشگاه تهيه شده و يا از پلاسماي كنترل تجاري در صورتي كه ليوفيليزه باشد بايد تا تاريخ انقضاء در 2-^{3}c8 نگهداري شود و در ^{3}c 20- Àحداكثر تا 6 ماه قابل نگهداري است.

كنترل غيرطبيعي

در هر سري آزمايش، حداقل يك كنترل غيرطبيعي، فيبرينوژن پايين (mg/dl 80-120) نيز بايد آزمايش شود. اين كنترل‌ها به

صورت تجاري موجودند. همچنين مي‌توان از رقيق‌كردن Pooled Normal Plasma با بافر باربيتال آنها را تهيه نمود.

منحني استاندارد

روش

1) نمونه خون را به همراه مادة ضدانعقاد سيترات تهيه كنيد. از لوله‌هاي حاوي EDTA يا هپارين جهت نمونه‌گيري استفاده نشود.
2) پلاسما را به نسبت 1:1 در بافر باربيتال رقيق كنيد. 2/0 ml از پلاسماي رقيق‌شده در يك لوله آزمايش بريزيد و 4-6 دقيقه در 37 ^{3}c 1 بگذاريد. آزمايش را براي هر نمونه به صورت Duplicate انجام دهيد.
3) استوك ترومبين را با بافر باربيتال رقيق نماييد، محلول 100 NIH Units/ml بدست مي‌آيد. اين محلول نبايد قبل از استفاده منجمد شود و بمدت 1 h در 2-8 ^{3}c پايدار است.
4) 1 ml ترومبين (100 NIH Units/ml) را به پلاسما اضافه كنيد و همزمان كرونومتر را بكار اندازيد.
5) اختلاف بين نتايج Duplicate بايد در محدودة 7% از ميانگين آنها باشد. در صورت نياز به تهيه منحني استاندارد، بـــــا استفاده از رقت‌هاي مختلف پلاسماي رفرانس و زمانهاي حاصل براي هر رقت مي‌توان منحني استاندارد را رسم نمود.
6) براساس زمان انعقاد بدست آمده براي نمونه و مقايسه آن با منحني استاندارد، ميزان‌فيبرينوژن‌نمونه را مستقيماً از روي منحني‌استاندارد بخوانيد.

منابع خطاي آناليتيك

جمع‌آوري ناقص نمونه

1) زياد يا كم پركردن لوله‌هاي خونگيري
2) عدم‌اصلاح حجم سيترات لازم براي افرادي كه هماتوكريت بالايي (0/55 <) دارند.
3) استفاده از مادة ضدانعقاد نامناسب، عدم‌استفاده از ضدانعقاد، آلودگي با هپارين
4) نمونه لخته، همولیز، يرقاني، ليپيك
5) مخلوطكردن ناكافي يا بسيار زياد يك نمونه
6) آلودگي لوله‌هاي نگهداري نمونه

ناكافي‌بودن ترومبين

بدلايل زير، ممكن است ترومبين به اندازه كافي موجود نباشد :

1) آلودگي بافر يا معرف
2) آماده‌سازي با مقدار ناكافي بافر
3) نقص در فرآورده
4) نگهداري در ظرف شيشه‌اي
5) نگهداري طولاني ترومبين

شرايط نامناسب

خطاهاي آزمايشگاهي كه بر شرايط اثر مي‌گذارند عبارتند از: استفاده غلط از زمان انكوباسيون : دما، pH ، حجم يا روش‌هاي دستگاهي

جذب زمينه‌اي بالا

اندازه‌گيري فيبرينوژن با استفاده از Spectrophotometric End Points ممكن است تحت تأثير هموگلوبين زياد پلاسما يـــا نمونه‌هاي ليپيك قرار گيرد. از اين رو، اين تداخلات ناشي از جذب زمينه‌اي بالا موجب بدست‌آوردن نتايج بشدت پايين فيبرينوژن مي‌گردد.

آزمايش حل شدن فيبرين، زمان ليز شدن لخته (Whole Blood Clot Lysis Time)

نام آناليت: لخته

ساختمان و متابوليسم: مراجعه به فيبرينوژن

معرفي آزمايش، كاربرد باليني: زمان حل شدن لخته خون بازتابي از فعاليت دستگاه فيبرينوليتيك در رابطه با فعاليت پلاسمين است. ليز شدن لخته زماني كامل است كه خون حالت سيال پيدا كند. ليز شدن پيش از 24 ساعت غيرطبيعي و گوياي افزايش فعاليت دستگاه فيبرينوليتيك است. در فيبرينوليز و درمان فيبرينوليتيك زمان كاهش مي‌يابد.

اساس روش متداول: بررسي زمان لخته شدن خون. يك ميلي ليتر خون را در لوله‌اي (10.75 ميلي متري) ريخته و آن را در 37 درجه قرار مي‌دهيم تا لخته شود. اين لوله را دست كم براي 24 ساعت ديگر هم در 37 درجه قرار مي‌دهيم و بعد وجود ليـز در آن بررسي مي‌شود.

روش مرجع: -

روش ارجح: -

روش‌هاي ديگر: ليز لخته خون كامل، خون كامل رقيق شده در بافر فسفات (thompson)

نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: در روش لخته از خون كامل كه در 37 درجه لخته شده استفاده مي‌شود و در روش دوم آن را بـــا

بافر فسفات رقيق مي‌كنند.

محدوده طبيعي در روش لخته:

مقدار طبيعي: 48-72 ساعت
فيبرينوليز با اهميت: > 24 h ساعت
فيبرينوليز شديد: > 2 h ساعت
در روش رقيق شده ليز در: 2-7 ساعت

واكنش تداخلي: در شرايط داخل بدن (invivo) : مصرف آمينوكاپروئيك اسيد در افزايش و Alteplase ، آنتي استرپلاز، استرپتوكيناز و يوروكيناز در كاهش آن مؤثرند.
معايب و فوايد روش حاضر: طولاني بستن تورنيكه و آسيب وارده به هنگام خونگيري ممكن است فعاليت فيبرينوليتيك را افزايش دهد. سطح فعال كننده پلاسمينوژن، پلاسمين، پلاسمينوژن و مهاركننده‌هاي فيبرينوليتيك روي اين آزمايش مؤثرند. اگر فيبرينوژن كمتر از 50 mg/dl باشد لخته ممكن است تشكيل نشود يا ديدنش مشكل باشد.

آزمايش مصرف پروترومبين (PCT) Prothrombin Consumption Time

نام آناليت: پروترومبين سرم، (Prothrombin)
ساختمان و متابوليسم: پروترومبين گليكوپروتئين است كه از يك زنجيره پلي پپتيدي تشكيل شده و پيش مادة پروترومبين است. ميزان آن به طور طبيعي در پلاسما 10-15 mg/dl است. محل سنتز آن پارانشيم كبد مي‌باشد و براي توليد نياز به ويتامين K دارد. بعد از انعقاد خون تقريباً تمام آن مصرف گشته و لذا مقدار آن در سرم ناچيز است.
معرفي آزمايش، كاربرد باليني: PCT در ترومبوسيتوپني (كاهش تعداد پلاكت) و در اختلالات عملكردي پلاكتها غيرطبيعي مي‌شود. در اورمي، هموفيلي A يا B ، همچنين وقتي كه فاكتورهاي 8، 9، 11، 12، كينينوژن - HMW و كاليكرئين به كمتر از 10-20 درصد حد طبيعي برسند نيز اختلال در اين زمان (PCT) ديده مي‌شود. اين آزمايش به عنوان يك روش غربالي براي بررسي فاكتور 3 پلاكتي هم استفاده مي‌شود.
اساس روش متداول: -
روش مرجع: -
روش ارجح: -
روش‌هاي ديگر: -
نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: خون كامل (بدون ضد انعقاد)، اجازه به لخته شدن در 37 درجه براي 1 ساعت و سانتريفوژ و جداكردن سرم

محدوده طبيعي:
30 Equivocal-20 ثانيه
غيرطبيعي > 20 ثانيه

واكنش تداخلي: در شرايط آزمايشگاهي (invitro) : وجود هموليز در افزايش و در شرايط داخل بدن (invivo) : مصرف كاربني سيلين در كاهش آن موثر است.
معايب و فوايد روش حاضر: در صورتيكه آزمايش PT (زمان پروترومبين) غيرطبيعي باشد اين آزمايش نبايد انجام شود. ايجاد آسيب در هنگام خونگيري باعث آزاد شدن ترومبوپلاستين شده و نتايج بيفايده است.

تعيين زمان ترومبين (TT) (Thrombin Time)

نام آناليت: ترومبين (Thrombin)
ساختمان و متابوليسم: هدف نهايي انعقاد توليد ترومبين كه يك سرين پروتئاز است مي‌باشد. اين آنزيم در نهايت امر با تبديل فيبرينوژن به فيبرين باعث تشكيل لخته و ترميم آسيب عروقي مي‌شود. ترومبين به پلاسما افزوده شده و زمان انعقاد سنجيده مي‌شود.
معرفي آزمايش، كاربرد باليني: سرعت تبديل شدن فيبرين و همچنين سرعت پليمريزه شدن رشته‌هاي فيبريني بوسيله اين آزمايش محاسبه مي‌شود. در كمبود شديد فيبرينوژن، اورمي، وجود مهاركننده‌هاي ترومبين يا فيبرينوژن، بيماري حاد كبدي، DIC ، درمان با هپارين، پاراپروتئينمي و ديس فيبرينوژنمي ارثي يا اكتسابي زمان آزمايش طولاني مي‌شود.
اساس روش متداول: مجاورت بافر باربيتورات با pH= 7/4 با پلاسماي بيمار يا پلاسماي كنترل و سپس اضافه كردن ترومبين و مقايسه زمانهاي ايجاد لخته در پلاسماي بيمار و كنترل. (وضعيت لخته را بايد از نظر چشمي بررسي كرد كه كدر يا شفاف است، سفت يا فاقد قوام بوده و... آزمايش را بصورت duplicate تكرار كرده و سپس دومين آزمايش با پلاسماي كنترل انجام

مي‌شود).
روش مرجع: -
روش ارجح: -
روش‌هاي ديگر: اضافه كردن ترومبين به پلاسما و اندازه‌گيري مدت زمان تشكيل لخته.
نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: پلاسما (سيترات سديم) كه به مدت 7 روز در دماي اتاق يا 23 روز در 4 درجه پايدار است. پلاسما بايد فاقد پلاكت باشد.

محدوده طبيعي:
حدود 20 ثانيه. (مقادير بالاتر قطعاً غيرطبيعي است)

واكنش تداخلي: در شرايط داخل بدن (invivo) : مصرف آنتي استرپلاز، آسپارژيناز، هپارين، فيبرينوژن يا محصولات degradation فيبرين (اجزاي پپتيدي تجزيه شده فيبرينوژن يا فيبرين) در افزايش آن مؤثرند.
معايب و فوايد روش حاضر: غلظت بالاي فيبرينوژن پلاسما ممكن است زمان ترومبين را طولاني كند كه بايد پلاسماي بيمار را با سالين رقيق كرد. اين آزمايش قادر نيست بين DIC و فيبرينوليزيزاوليه فرق بگذارد.

تعيين زمان رپتيلاز (RT) (Reptilase Time)

نام آناليت: رپتيلاز (Reptilase)
ساختمان و متابوليسم: رپتيلاز ماده‌اي است كه به طور اوليه از سم مار Bathropsatrox تهيه شد ولي امروز به صورت تجارتي نيز تهيه مي‌شود. در واقع اين ماده، فيبرينوژن را مستقيماً بوسيله شكستن زنجيره A ، تبديل به فيبرين مي‌كند. اين تركيب در حقيقت آنزيمي شبه ترومبين است و فعاليت آن مانند ترومبين بوسيله هپارين خنثي نمي‌شود.
معرفي آزمايش، كاربرد باليني: رپتيلاز را به همراه يون كلسيم به پلاسماي سيتراته در 37 درجه مي‌افزايند و زمان انعقاد را اندازه مي‌گيرند و از روي آن نحوه عملكرد فيبرينوژن را مي‌سنجند. اين زمان در بيماران دچار كمبود مادرزادي فاكتورهاي 5، 7، 8، 9، 10، 11 و 12 و بيماراني كه جهت درمان هپارين مصرف مي‌كنند طبيعي است. در ميلوم مولتيپل، ماكروگلبولينمي والدنشتروم و آميلوئيدوزيس سيستميك اوليه نيز ميزان آن افزايش مي‌يابد. ميزان آن در كمبود فيبرينوژن، بدساخته شدن و ساخته نشدن فيبرينوژن به بيشتر از 25 ثانيه مي‌رسد. (پاراپروتئين‌ها با ايجاد كمپلكس با فاكتورهاي انعقادي ممكن است هر آزمون انعقادي را طولاني كنند.)
اساس روش متداول: به cc 2/0 از پلاسماي بيمار كه به دماي 37 درجه رسيده، cc 1/0 از محلول رپتيلاز اضافه مي‌شود و زمان لخته شدن پلاسما محاسبه مي‌گردد (مقايسه كنترل و بيمار)
روش مرجع: -
روش ارجح: -
روش‌هاي ديگر: محاسبه زمان ايجاد لخته

محدوده طبيعي:
18-22 ثانيه

نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: پلاسما (سيترات سديم) كه براي 4 ساعت در 4 درجه و 28 روز در فريز قابل نگهداري است.
واكنش تداخلي: آنتي استرپلاز و پاراپروتئينها باعث افزايش آن مي‌گردند.
معايب و فوايد روش حاضر: اين آزمون براي سنجيدن ميزان فيبرينوژن در هنگام مصرف هپارين كاربرد دارد.

تعيين ميزان فاكتورهاي انعقادي هر يك به تنهايي (كمي) (Clotting Factors)

نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: براي فاكتورهاي 2، 5، 8، 9، 11، 12 از پلاسماي سيتراته استفاده مي‌شود كه اگر فوراً روي يخ قرار داده شود براي 2 ساعت پايدار است و براي زمان بيشتر از 2 ساعت بايد آن را در فريز قرار داد. در مورد فاكتورهاي 7 و 10 بايد فوراً آزمايش را انجام داد چرا كه در 4^{3} به طور قابل توجهي ممكن است فعال شوند.
عوامل تداخل كننده در همه فاكتورها: در شرايط آزمايشگاهي (invitro) هپارين و ضد انعقاد لوپوسي ميزان آنها را كاهش مي‌دهد.
فاكتور III يا پروترومبين: درصد فعاليت نرمال آن 150-60 يا U/ml 1/5-6/0 است. حداقل سطح آن در فرآيند هموستاز: 15-10 يا U/ml 15/0-1/0 و حداقل سطح آن در جراحي بزرگ 40-20 يا U/ml 4/0-2/0 است.
واكنش تداخلي: در شرايط داخل بدن (invivo) : مصرف استروژنها و ضد بارداريهاي خوراكي در افزايش و مصرف استروئيدهاي آنابوليك، استروژنها، آنتي بيوتيكها و ضد انعقادهاي خوراكي باعث كاهش آن مي‌گردند. ميزان آن در كمبود مادرزادي و به طور اكتسابي در بيماران نادري با ضد انعقاد لوپوسي، بيماري كبدي و در كمبود ويتامين K ديده مي‌شود.

فاكتور 5 (V) يا پرواكسلرين: درصد فعاليت نرمال آن 150-50 يا U/ml 5/1-5/0 است. حداقل سطح آن در فرآيند هموستاز 15-5 يا 0/15-0/05 و حداقل سطح آن در جراحي بزرگ: 25 يا U/ml 25/0 مي‌باشد.(پاسخ هموستاز)
واكنش تداخلي: در شرايط داخل بدن (invivo) : آسپارژيناز، استروئيدهاي آنابوليك، آندروژنها، دكستران و فعال كننده‌هاي پلاسمينوژن باعث كاهش آن مي‌گردد. ميزان اين فاكتور در موارد كمبود مادرزادي و در حالت اكتسابي در DIC ، بيماري كبدي و مهاركننده‌هاي فاكتور 5 كاهش مي‌يابد.
فاكتور VII يا پروكنورين: درصد فعاليت نرمال آن 135-65 يا 1/35-0/65 است. حداقل سطح آن در فرآيند هموستاز: 10-5 درصد يا U/ml 1/0-05/0 و حداقل سطح آن در جراحي بزرگ: 2-10 يا U/ml 2/0-1/0 است. (پاسخ هموستاز)
واكنش تداخلي: در شرايط داخل بدن (invivo) : استروژنها، ضد بارداريهاي خوراكي در افزايش و استروئيدهاي آنابوليك، آندروژنها، آنتي بيوتيك‌ها، آسپرين و ضد انعقادهاي خوراكي در كاهش آن موثرند. ميزان اين فاكتورها در موارد كمبود مادرزادي و در موارد اكتسابي: كمبود ويتامين K و بيماري كبدي كاهش مي‌يابد.
فاكتور X يا استوارت: درصد فعاليت نرمال آن 130-60 يا U/ml 3/1-0/6 است. حداقل سطح آن در فرآيند هموستاز: 10-5 يا 1/0-05/0 و حداقل سطح آن در جراحي بزرگ: 20-15 يا U/ml 2/0-15/0 است. (پاسخ هموستاز)
واكنش تداخلي: در شرايط داخل بدن (invivo) : استروژنها و ضد بارداريهاي خوراكي باعث افزايش و استروئيدهاي آنابوليك، آندروژنها، آنتي بيوتيك‌ها و ضد انعقادهاي خوراكي در كاهش آن مؤثرند. كمبود آن به طور مادرزادي يا در كمبود ويتامين K ، بيماري كبدي و بطور نادر همراه با آميلوئيدوز ديده شده است.
پايه اندازه‌گيري فاكتورهاي 2، 5، 7 و 10 بوسيله آزمايش پروترومبين تايم (PT) مي‌باشد (به طوريكه پلاسماي بيمار بتواند آزمايش PT را در پلاسماي داراي كمبود فاكتور خاص تصحيح كند.
فاكتور VIII يا آنتي هموفيليك: در صد فعاليت نرمال آن 150-50 يا U/ml 5/1-5/0 است. حداقل سطح آن در فرآيند هموستاز: 20-15 يا U/ml 2/0-15/0 و حداقل سطح آن براي جراحي بزرگ: 75 يا U/ml 75/0 است. در بيماري ون ويلبراند: حداقل سطح آن در فرآيند هموستاز و جراحي بزرگ 75 يا U/ml 75/0 است.
واكنشهاي تداخلي: در شرايط داخل‌بدن (invivo) : اپي‌نفرين، دسموپرسين و ضدبارداريهاي خوراكي در افزايش و فعال كننده‌هاي پلاسمينوژن و استرپتوكيناز در كاهش آن مؤثرند. كاهش اين فاكتور در هموفيلي A ، بيماري ون ويلبراند، آنتي باديهاي خاص بر عليه فاكتور 8 و در DIC و افزايش آن در درمان يا DDAVP (دسموپرسين) كه باعث رها شدن فاكتور 8 از مخزن اندوتليال و در اختلالات هپاتوسلولار و بي كفايتي كليوي ديده مي‌شود. فاكتور 8 يك پروتئين فاز حاد است. ميزان آن در ورزشهاي شديد ممكن است به 3-2 برابر افزايش يابد. در سه ماهه آخر بارداري نيز بطور قابل توجهي افزايش مي‌يابد.
فاكتور IX يا فاكتور كريسمس: درصد فعاليت نرمال آن 150-50 يا U/ml 5/1-5/0 است. حداقل سطح آن در فرآيند هموستاز 15-10 يا U/ml 15/0-1/0 و حداقل سطح آن براي جراحي بزرگ 25-20 يا U/ml 0/25-2/0 است.
واكنشهاي تداخلي: در شرايط داخل بدن (invivo) : استروژن‌ها، ضدبارداريهاي خوراكي در افزايش و آنتي بيوتيكها و ضد انعقادهاي خوراكي در كاهش آن موثرند. كمبود آن به طور ارثي در هموفيلي B (بيماري كريسمس) و به طور اكتسابي در بيماري كبدي، فقر ويتامين K ، بيماري گوشه و سندرم نفروتيك ديده مي‌شود.
فاكتور XI يا فاكتور ضد هموفيلي (پيش ماده ترومبوپلاستين): درصد فعاليت نرمال 135-65 يا U/ml 1/35-65/0 است. كمترين سطح براي جراحي بزرگ: 25-15 يا U/ml 25/0-15/0 است.
واكنش تداخلي: در شرايط داخل بدن (invivo) : دكستران باعث كاهش مي‌شود. كمبود ارثي اين فاكتور در Ashkenazi Jews يافت شده است. خونريزي ممكن است حتي وقتي سطح فاكتور كمتر از 1% حد نرمال است اتفاق بيفتد به خصوص بعد از جراحي بزرگ يا تروما.
فاكتور XII يا فاكتور هاگمن: در صد فعاليت نرمال 150-65 يا U/ml 1/5-65/0 است.
واكنش تداخلي: در شرايط داخل بدن (invivo) : مصرف ضد بارداريهاي خوراكي باعث كاهش مي‌گردد. كمبود آن به طور مادرزادي ديده شده كه اين كمبود بدون علامت است.
اساس اندازه‌گيري فاكتورهاي 8، 9، 11 و 12 بر پايه توانايي تصحيح آزمايش APTT (زمان نسبي ترمبوپلاستين فعال شده) توسط پلاسماي بيمار بر روي پلاسماي داراي كمبود فاكتور خاص است. يعني پلاسماي مشخص با كمبود فاكتور مشخص داريم و به آن پلاسماي بيمار را كه نمي‌دانيم كداميك در آن كم است، اضافه مي‌كنيم. مثلاً اگر پلاسماي خاص داراي كمبود فاكتور 8 باشد و با افزودن پلاسماي بيمار زمان APPT اصلاح شود نشان دهنده اين است كه پلاسماي بيمار كمبود فاكتور 8 را ندارد.

بررسي مواد حاصل از تخريب فيبرين، محصولات حاصل از تخريب فيبرين

(Fibrin split products (FSP و fibrin degradation products (FDP)

نام آناليت: فيبرين (Fibrin)

ساختمان و متابوليسم: مكانيسم جبراني بدن براي مقابله با رسوب فيبرين در شبكه‌هاي مويرگي، فعال كردن دستگاه فيبرينوليتيك است. دست آورد فعاليت اين دستگاه، آنزيم پلاسمين است كه به فيبرين و فيبرينوژن حمله كرده و به تجزيه آن منجر مي‌شود.
معرفي آزمايش، كاربرد باليني: اجزاي پپتيدي حاصل از تجزيه فيبرين و فيبرينوژن را FDP مي‌گويند كه شامل اجزاي X ، Y ، D و E است. انجام اين آزمايش به منظور تشخيص DIC و اختلالات ترومبوليتيك ديگر است. ميزان FDP در فيبرينوليز اوليه، متعاقب پيوند كليه و جراحي قلب، عفونت ميوكارديال حاد، كارسينوما و گرفتگي عروق ريوي، استرس، ورزش افزايش مي‌يابد.

اساس روش متداول: آزمون آگلوتيناسيون لاتكس: سرم بيمار با ذرات لاتكس آغشته به Ab (آنتي بادي) بر عليه فيبرينوژن و اجزاي E و D مجاور مي‌شود (سرم بيمار را بايد در رقتهاي مختلف تهيه كرد). رقت مورد نظر كه هنوز قادر به آگلوتيناسيون است را اگر در دو ضرب كنيم، ميزان تقريبي FDP بدست مي‌آيد.
آزمون ممانعت از آگلوتيناسيون: ابتدا گلبولهاي قرمز معرف با اسيد تانيك و فيبرينوژن آغشته مي‌شوند. به سرم بيمار آنتي بادي بر عليه فيبرينوژن اضافه مي‌شود و بعد گلبولهاي قرمز معرف به آن اضافه مي‌شود. نديدن آگلوتيناسيون نشانه وجود FDP است، چرا كه مانع از واكنش آنتي بادي ضد فيبرينوژن با گلبولهاي قرمز معرف شده‌اند. روش تجمع استافيلوكوكي: ميكروب استافيلوكوك با فيبرينوژن، اجزاء نخستين FDP و به نسبت كمتر با اجزاء نهايي FDP تجمع مي‌كنند.

روش مرجع: -

روش ارجح: -

روش‌هاي ديگر: آگلوتيناسيون (Thrombowellco test) (آزمايش (غربالي (park-Davis, : تجمع استافيلوكوكي، آزمون ممانعت از آگلوتيناسيون گلبولهاي قرمز مجاور شده با اسيد تانيك، آزمون آگلوتيناسيون لاتكس.

نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: در آگلوتيناسيون: 1- استفاده از سرم: كه به ميزان 2 سي سي خون كامل در لوله خاصي كه حاوي ترومبين و مهاركننده تريپسين سويبين (soybean) است جمع آوري مي‌شود و اجازه مي‌دهيم كه براي 30 دقيقه در 37 درجه لخته شود. 2- ادرار: جمع آوري 2 سي سي در لوله خاص (حاوي ترومبين و ممانعت‌كننده تريپسين سويبين). 30 دقيقه بماند. در 20- درجه براي مدت‌هاي طولاني پايدار است و نبايد آن را refreeze كرد. در روش آزمايش Fi : خون كامل (سيتراته) كه با ترومبين و مهاركننده‌هاي پروتئوليتيك مخلوط مي‌شود است. در روش تجمع استافيلوكوكي: خون كامل كه در ترومبين و E آمينوكاپروئيك اسيد (EACA) جمع آوري مي‌شود (اجازه مي‌دهيم در 37 درجه لخته شود).

محدوده طبيعي:

در روش آگلوتيناسيون:
سرم > m10 g/ml
ادرار > m25/0 g/ml
در روش Fi : آگلوتيناسيون ديده نمي‌شود.
در روش تجمع استافيلوكوكي: > m10 g/ml

واكنش تداخلي: در شرايط داخل بدن (invivo) : فعال كننده‌هاي پلاسمينوژن باعث افزايش آن مي‌گردند. افزايش سطح فاكتور روماتوئيد، هپارين و ديس‌فيبرينوژنميا ممكن است نتايج مثبت كاذب ايجاد كند. آسيبهاي عروقي، طولاني بستن رگ، تكان دادن شديد لوله باعث ايجاد نتايج كاذب مثبت مي‌شود.

معايب و فوايد روش حاضر: وجود حداقل 2 ميكروگرم FDP در هر سي سي سرم باعث آگلوتيناسيون لاتكس مي‌شود. روش thrombowellco test اجزاء X ، Y ، D و E را آشكار مي‌كنند. حساسيت Test Fi : تا حد m10 g/ml فيبرينوژن و m25 g/ml اجزاء X و Y است. روش Fi كمپلكس هايي كه همراه با ترومبين لخته شده‌اند اما با آنتي بادي ضد فيبرينوژن واكنش داده‌اند را آشكار مي‌كنند. حساسيت روش تجمع استافيلوكوكي: 1/0-m1 g/ml است. آزمايش به فيبرينوژن حساس است و حساسيت كمتري به اجزاء X و Y دارد ولي با اجزاء D و E واكنش نمي‌دهد.

ليز شدن اوگلوبولين

(EGT)(ELT), (Euglobulin Lysis Time) (Euglobulin Clot Lysis)

نام آناليت: اوگلوبولين (Euglobulin)

ساختمان و متابوليسم: اوگلوبولين بخشي از پلاسماست كه دربرگيرندة فيبرينوژن، پلاسمينوژن و فعال‌كننده‌هاي پلاسمينوژن است. از آنجاييكه يوگلوبولين تقريباً بدون بازدارنده‌هاي پلاسمين است، به همين دليل چنانچه فيبرينوژن موجود در آن لخته شود زمان ليز آن كوتاهتر از زمان ليز لخته ناشي از خون كامل است.

معرفي آزمايش، كاربرد باليني: زمان ليز لخته اوگلوبولين بيان كنندة فعاليت دستگاه فيبرينوليتيك در رابطه با افزايش فعال كننده‌هاي پلاسمينوژن است. اين آزمايش به طور اوليه در پيگيري درمان با داروهاي فيبرينوليتيك و تشخيص فيبرينوژنوليز سيستميك اوليه كاربرد دارد. در DIC (انعقاد منتشره داخل عروقي) اين زمان طبيعي و در فيبرينوژنوليز اوليه كوتاه است. افزايش فيبرينوليز در سرطان پروستات، كمبود 2 a آنتي پلاسمين، تزريقات اپي نفرين، جراحي پانكراس يا ريه، واكنش‌هاي تب زا و عوارض مربوط به مامايي ممكن است ديده شود. اين آزمايش ممكن است براي پيگيري درمان با يوروكيناز، استرپتوكيناز و فعال كننده پلاسمينوژن بافتي استفاده شود.

اساس روش متداول: وقتي پلاسما رقيق و اسيدي مي‌شود و رسوب ائوگلبولين (precipitate) تشكيل مي‌شود كه محتوي فعال كننده پلاسمينوژن (عمدتاً t-PA)، پلاسمينوژن و فيبرينوژن باشد. اكثر مهار كننده‌ها در محلول باقي مي‌مانند. رسوب دوباره حل شده و فيبرينوژن با ترومبين تشكيل لخته داده و زمان ليز لخته اندازه‌گيري مي‌شود. ابتدا پلاسماي رقيق شده با اسيد استيك 1% مخلوط شده سپس در يخچال قرار داده و بعد از جداكردن رسوب يوگلوبولين و مخلوط كردن آن به ترتيب با: بافر بورات (حل كردن رسوب)، كلرور كلسيم جهت تشكيل لخته و قرار دادن آن در 37 درجه براي انجام واكنش ليز ادامه مي‌يابد.

روش مرجع: -

روش ارجح: -

روش‌هاي ديگر: محاسبه زمان بين لخته تا ليز كامل لخته.
نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: پلاسماي سيتراته (به مدت 30 دقيقه خون سيتراته را در 4 درجه سانتريفوژ مي‌كنيم) مخلوط پلاسما به مدت 2 ساعت پس از سانتريفوژ پايدار است. از منجمد كردن پلاسما و نگهداري آن بايد خودداري كرد.

محدوده طبيعي:
ليز در زمان 4-2 ساعت (240-90 دقيقه)، در فعاليت فيبرينوليتيك غيرطبيعي كمتر از 2 ساعت.

واكنش تداخلي: در شرايط داخل بدن (invivo) : آنتي‌استرپلاز، آني استرپلاز، آسپارژيناز، كلوفيبرات، دكستران، استرپتوكيناز، يوروكيناز باعث كاهش زمان آزمايش مي‌گردد.
معايب و فوايد روش حاضر: آسيبهاي هنگام خونگيري ممكن است عاملي در افزايش فعاليت فيبرينوليتيك باشد. آزمايش ليز شدن اوگلوبولين يك آزمايش غربالي براي معين كردن فيبرينوليز در عدم حضور مهاركننده‌هاست. زمان ليز ممكن است در اشخاص سالم بعد از ورزش كوتاه شود. طولاني بستن تورنيكه هم باعث افزايش فعاليت فيبرينوليتيك مي‌شود. درمان با هپارين در نتيجه آزمايش اثر ندارد.

اندازه‌گيري ون ويلبراند فاكتور (VWF) (Von Willebrand Factor)

نام آناليت: ون ويلبراند فاكتور (Von Willebrand Factor)
ساختمان و متابوليسم: فاكتور ون ويلبراند جزيي از كمپلكس فاكتور 8 بوده و به علت وزن بالاي ملكولي خاصيت آنتي‌ژنيسيتي فاكتور 8 به آن مربوط مي‌شود. وجود اين فاكتور جهت اعمال نرمال پلاكتي مثل چسبيدن پلاكتها به لايه‌هاي زير اندوتليال عروق و ديگر سطوح فعال ضروري است. سلولهاي اندوتليال شبكه عروقي و مگاكاريوسيتها آن را سنتز مي‌كنند و در گرانولولهاي آلفاي پلاكتها نيز وجود دارد كه به هنگام پارگي عروق نخستين گام را در انعقاد خون بر عهده دارد.
معرفي آزمايش، كاربرد باليني: براي ديدن فعاليت اين فاكتور در آزمايشگاه، كوفاكتوري به نام رسيتوستين (نوعي آنتي بيوتيك) مورد نياز است. كمبود آن موجب مشكلات هموستاتيك ناشي از نقص پلاكتي مي‌شود. فاكتورهاي 8 و ون ويلبراند از ذخيره سلولهاي اندوتليال در هنگام ورزش و استرس آزاد مي‌شود. ميزان اين فاكتور در بيماري ون‌ويلبراند ارثي و اكتسابي كاهش مي‌يابد. تزريق DDAVP (دسموپرسين) ميزان اين پروتئينها را در خون ممكن است تا سه برابر افزايش دهد.
اساس روش متداول: استفاده از كوفاكتور رسيتوستين، براي اندازه‌گيري فعاليت اين فاكتور از سوسپانسيون پلاكتهاي فرد معمولي (پايدار شده در فرمالين) يا سوسپانسيون شسته شدة پلاكتي تازه تهيه شده از بيمار انجام يافته و با رسم منحني استاندارد مي‌توان درصد فعاليت فاكتور ون ويلبراند را در بيمار بدست آورد. (در منحني رسم شده در محور افقي درصد فاكتور ون ويلبراند يا كوفاكتور رسيتوستين و در محور عمودي زمان تجمع پلاكتها بر حسب ثانيه قرار مي‌گيرد).
روش مرجع: -
روش ارجح: -
روش‌هاي ديگر: كوفاكتور رسيتوستين (باعث تجمع پلاكتها در حضور فاكتور ون ويلبراند)، آنتي ژني (راكت ايمنوالكتروفورزيس و الايزا)

محدوده طبيعي:
در صد فعاليت نرمال: 150-60 يا U/ml 1/5-6/0

نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: خون سيتراته كه با دور g 460 سانتريفوژ شده و پلاسماي سرشار از پلاكت آن جدا مي‌شود. نمونه براي چندين ساعت در دماي اتاق پايدار است.
واكنش تداخلي: افزايش اين آزمايش در حضور هپارين، همولیز، ليپمي و نيكوتين ديده مي‌شود. در شرايط داخل بدن (invivo) : آسپرين، كلروكين، كاربني سيلين، كلروپرومازين، سيپروهپتادين، دكستران، نيتروفورانتوئين، مفناميك اسيد، كتوپروفن، پيروكسيكام، پني سيلين، پروپرانولول،... باعث كاهش مي‌گردد.

ميزان فاكتور XIII (13) به طور كيفي

(FSF, Fibrin Stabilizing Factor) (Factor XIII Screen)

نام آناليت: فاكتور 13 (Factor XIII)
ساختمان و متابوليسم: فاكتور 13 يا فاكتور پايدار كننده فيبرين، گليكوپروتئيني است كه از دو جفت زنجيره پلي پپتيدي كه هر كدام داراي دو رشته كوچكتر هستند تشكيل شده است. اين فاكتور در حقيقت پروآنزيمي است كه بوسيله ترومبين فعال شده و باعث پليمريزه شدن زنجيره‌هاي فيبريني مي‌گردد. اين فاكتور تقريباً ناپايدار است بدليل مصرف در پروسة انعقاد مقدار آن در سرم فوق العاده ناچيز مي‌باشد.

معرفي آزمايش، كاربرد باليني: كمبود اين فاكتور باعث غيرطبيعي شدن هيچكدام از آزمايشات معمولي نمي‌شود. از نظر باليني كمبود اين فاكتور مي‌تواند خونريزيهاي شديدي را بوجود آورد. از دوران نوزادي و طفوليت سابقة خونريزيهاي مكرر در طول عمر بيمار وجود دارد. اختلال در ترميم زخم، خونريزيهاي داخل مغزي از ديگر عوارض كمبود اين فاكتور است. در بيماراني كه ايزونيازيد مصرف مي‌كنند و در ميلوم‌مولتيپل و حضور فيبرينوژنهاي غيرنرمال ممكن است آزمايش غيرطبيعي شود.
اساس روش متداول: در نبود يا كاهش شديد فاكتور 13، پيوندهاي هيدروژني شبكة فيبرين به پيوند كووالانسي تبديل نمي‌شود. به همين دليل، لخته در محلول اوره پنج مولار حل مي‌شود. حل شدن لخته در كمتر از 24 ساعت غيرطبيعي و گوياي كاهش شديد اين فاكتور است.
روش مرجع: روش ارجح: -
روش‌هاي ديگر: آزمون حل شدن لخته در محلول اوره 5 مولار.
نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: پلاسما (سيتراته) كه به مدت 2 ساعت در 4 درجه پايدار است.

محدوده طبيعي:
درصد غلظت نرمال: 2-5 يا U/ml 02/0-05/0

واكنش تداخلي: يافت نشده
معايب و فوايد روش حاضر: اين آزمايش ممكن است در اختلالات كيفي فيبرينوژن، وجود آنتي بادي بر عليه فاكتور 13 و كاهش شديد فيبرينوژن مثبت شود.

ميزان فاكتور 3 پلاكتي (Platelet Factor 3 Release)

نام آناليت: فاكتور III پلاكتي (Platelet Factor 3)
ساختمان و متابوليسم: اين فاكتور يك تركيب فسفوليپيدي از غشاء پلاكت است كه در روند انعقاد نقش مهمي بازي مي‌كند.
معرفي آزمايش، كاربرد باليني: فاكتور 3 يا فسفوليپيد پلاكتي براي تبديل پروترومبين به ترومبين در مسير انعقاد لازم است. اين تركيب زمانيكه پلاكتها با موادي مثل كائولين يا سليت كه فعال كنندة عوامل تماسي انعقاد هستند روبرو مي‌شوند در سطح پلاكتها ظاهر مي‌شود و به انعقاد كمك مي‌كند. اين آزمايش در بيماري گلانزمن غيرطبيعي است و در بيماري‌هاي سندرم برنارد سولير و اورمي نيز ميزان آن متغير است.
اساس روش متداول: مجاور كردن پلاسما سرشار از پلاكت و فاقد پلاكت به ترتيب با celite يا كائولين و كلرور كلسيم. زمان لخته شدن پلاسماي سرشار از پلاكت و پلاسماي بدون پلاكت اگر نزديك به هم باشد، بيان كنندة كاهش فاكتور 3 پلاكتي است.
روش مرجع: روش ارجح: -
روش‌هاي ديگر: مقايسه زمان انعقاد پلاسماي سرشار از پلاكت با پلاسماي فاقد پلاكت.
نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: خون سيتراته (9 به 1) و سانتريفوژ در دور g 150-200 براي 10-15 دقيقه براي بدست آوردن پلاسماي سرشار از پلاكت و سپس بعد از برداشت نمونه پلاسما سرشار از پلاكت، سانتريفوژ دوباره در دور 1200-1500 (15 دقيقه) براي بدست آوردن پلاسماي شفاف و بدون پلاكت.

محدوده طبيعي:
100% فعاليت فاكتور 3 پلاكتي
در پاراپروتنيمي كاهش در زمان آزمايش ديده مي‌شود.

معايب و فوايد روش حاضر: به دليل اينكه كاهش فاكتور 3 پلاكتي به طور ثانويه بعد از عملكرد به پلاكتها كه با آزمايشات ديگر تشخيص داده مي‌شود ايجاد مي‌شود درخواست انجام آن گسترش نيافته است.

ميزان پروتئين C (PC ANTIGEN) (Protein C Assay)

نام آناليت: پروتئين C (Protein C)
ساختمان و متابوليسم: پروتئين C نوعي پروتئين وابسته به ويتامين K است كه در كبد توليد مي‌شود و به نوعي پروتئين موجود بر سطح سلول اندوتليال به نام ترومبومورولين متصل مي‌شود و توسط ترومبين، تبديل به پروتئاز فعال مي‌گردد. پروتئين C فعال شده، به همراه پروتئين S باعث تجزيه فاكتورهاي V a و VIII a مي‌شود و اين امر منجر به توقف تشكيل فيبرين مي‌گردد. پروتئين C فعال شده همچنين مي‌تواند فيبرينوليز را تحريك نمايد و حل لخته را تسريع كند.
معرفي آزمايش، كاربرد باليني: اندازه‌گيري پروتئين C براي ارزيابي بيماران مبتلا به ترومبوز شديد و آنهايي كه خطر بالا و استعداد ترومبوز را دارند استفاده مي‌شود. بيماران مبتلا به كمبود پروتئين C هتروزيگوس به دو نوع (تيپ I با فعاليت و ميزان كم آنتي ژن و تيپ II ميزان نرمال و فعاليت كم) تقسيم مي‌شوند. كاهش ميزان پروتئين C با موارد زير در ارتباط است: عوارض ترومبوتيك شديد در دوره نوزادي، وارفارين القا كننده نكروز پوستي (varfarin-induced skin necrosis) ، DIC به

خصوص همراه با سرطان، انعقاد برق آساي درون عروقي در نوزادان. فقر پروتئين C ممكن است مادرزادي باشد يا بوسيله عواملي چون: سيروز، فقر ويتامين K ، استفاده از وارفارين ايجاد شود.
اساس روش متداول: روش كروموژنيك: پلاسما با فعال كننده انكوبه شده و سپس سوبستراي كروموژنيك خاص به آن اضافه مي‌شود (CBS65.25) و واكنش بوسيله اسيد استيك 50 درصد متوقف مي‌شود و نيتروآلانين توليد شده در طول موج 405 بـــــا اسپكتروفتومتر اندازه‌گيري مي‌شود.
روش مرجع: -
روش ارجح: -
روش‌هاي ديگر: Functional Assay (Clotting Assay ، ميزان كروموژنيك)، ايمنواسي (راكت ايمنوالكتروفورزيس، الايزا)
نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: پلاسما (سيتراته) كه در دماي اتاق براي 8 ساعت و در 20- درجه براي 1 ماه قابل نگهداري است.

محدوده طبيعي:
فعاليت نرمال: 140-70 درصد
82/2-m65/5 g/ml

واكنش تداخلي: سطح بالاي هپارين (1 < U/ml) و سطح بالاي فاكتور 8 انعقادي (300% <) به ترتيب باعث‌تخمين بالا و پايين مي‌شود. در شرايط داخل بدن: ضد بارداريهاي خوراكي و stanozolol باعث افزايش مي‌گردد.
معايب و فوايد روش حاضر: ميزان پروتئين C اندازه‌گيري شده توسط روش كروموژنيك و ايمنواسي بالاتر از مقدار بدست آمده از روش Clotting است.

S Protein S assay ميزان پروتئين

نام آناليت: پروتئين S (Protein S)
ساختمان و متابوليسم: پروتئين S يك پروتئين وابسته به ويتامين K است كه در كبد سنتز مي‌شود. اين پروتئين به عنوان يك فاكتور، عمل آنتي كوآگولانتي پروتئين C فعال شده را افزايش مي‌دهد. در پلاسماي فرد نرمال پروتئين S به دو فرم وجود دارد: آزاد (حدود 40%) و باند شده به C4b-BP (حدود 60%). فقط فرم آزاد پروتئين S فعاليت بيولوژيكي را بيان مي‌كند در حاليكه نوع باند شده غيرفعال است.
معرفي آزمايش، كاربرد باليني: كمبودهاي پروتئينهاي C و S معمولاً به صورت اتوزومي غالب به ارث مي‌رسند و كمبودهاي اين دو پروتئين، باعث ترومبوز مكرر سياهرگ و آمبولي ريه مي‌گردند. اين آزمايش احتمالاً در بيماران مبتلا به ترومبوز فاميلي يا عود كننده مفيد است و ممكن است در مشورت ژنتيكي اين بيمارها مفيد واقع شود. دو نوع كمبود پروتئين S وجود دارد: تيپ I كه پروتئين S آزاد كم شده اگر چه پروتئين S توتال ممكن است طبيعي باشد. تيپ II كه پروتئين S توتال به طور واضح كاهش يافته است. اختلالات كبدي، درمان با ضد انعقاد خوراكي، درمان با آسپارژيناز كه پروتئين S باند شده را بالا و نوع آزاد را پايين مي‌آورد.
اساس روش متداول: روش الايزا
Øfix Ø200 ml (serum and st)... (anti-human protein S + conting buffer (equal vol
(بر اساس پروتكل بدليل طولاني بودن به مرجع معتبر مراجعه نماييد).
روش مرجع: روش ارجح: -
روش‌هاي ديگر: (Diagnostica stago) functional assay ، ايمنواسي (الايزا، راكت ايمنوالكتروفورزيس، بواسطه ذرات ميكرولاتكس).
نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: پلاسماي سيتراته در دماي اتاق به مدت 8 ساعت و در ° 20- براي 1 ماه پايدار است.

محدوده طبيعي:
درصد غلظت نرمال

پروتئين S توتال	0/01*	140-67	1/25-67/0 U/ml
پروتئين S آزاد	0/01*	120-57	49/0-23/0 U/ml

واكنش تداخلي: نتايج مثبت كاذب مربوط به مهار كننده‌هاي فاكتور خاص، كمبود فاكتور در درمان با ضد انعقاد مي‌باشد. در شرايط داخل بدن (invivo) : ضد بارداريهاي خوراكي باعث كاهش مي‌گردند.
معايب و فوايد روش حاضر: -

آنتي ترومبين III يا ساير مهاركننده‌هاي فاكتور انعقادي و ضدانعقادي

(At-III) Antithrombin III

نام آناليت: آنتي ترومبين 3 (Antithrombin III)
ساختمان و متابوليسم: آنتي ترومبين 3، گليكوپروتئيني است در پلاسما كه محل سنتز آن كبد مي‌باشد. اين عامل از عمل

فاكتورهاي 10، 11، 12، 9 و 7 فعال شده مثل ترومبين جلوگيري كرده و آنها را غيرفعال مي‌كند. همچنين مانع از فعاليت فاكتور كاليكرئين و پلاسمين نيز مي‌گردد.

محدوده طبيعي:

			درصد استاندارد
115	85-RID	يا	12-30 mg/dl
آميدوليتيك (كروموژنيك)			85-115 U/ml 85/0-5/1
آميدوليتيك (اتوماتيكي)			(ميانگين)103/4
113	86-Bioassay		86/0-13/1 U/ml
120	80-Laurell		8/0-2/1 U/ml

معرفي آزمايش، كاربرد باليني: در بيماريهايي مثل هپاتيت حاد، انسداد كبدي، پيوند كليه، التهابات، قاعدگي و كمبود ويتامين K افزايش و در كمبود مادرزادي، پيوند كبد، به دنبال كبد برداري نسبي، سندرم نفروتيك، DIC ، سيروز و كارسينوما كاهش آن ديده مي‌شود. در ديابتي‌ها افزايش يا كاهش ديده مي‌شود.

اساس روش متداول:

روش مرجع: -

روش ارجح: -

روش‌هاي ديگر: RID ، آميدوليتيك (كروموژنيك)، آميدوليتيك (اتوماتيكي)، Bioassay ، راكت الكتروايمنواسي. (laurell)

نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: در همه روشها از پلاسماي سيتراته استفاده مي‌شود كه در روش RID در 25- درجه تا 2 هفته پايدار است.

واكنش تداخلي: در شرايط داخل بدن (invivo) : استروئيدهاي آنابوليك، gemfibrozil و وارفارين با اثر افزايشي و درمان بـــــا هپارين، آسپارژيناز، استروژنها، gestodene و ضد بارداريهاي خوراكي اثر كاهشي دارند.

معايب و فوايد روش حاضر: روشهاي ايمنولوژيكي فقط مقدار AT-III را اندازه‌گيري مي‌كنند و نه عملكرد آن را. سطح آنتي ترومبين 3 روي آزمايشات انعقادي روتين اثر ندارد.

تجمع پلاكتها (Platelet aggregation)

نام آناليت: پلاكت، (Platelet)

ساختمان و متابوليسم: -

معرفي آزمايش، كاربرد باليني: اين آزمايش، در بارة ميزان و چگونگي ترشح مواد ذخيره‌اي موجود در گرانولهاي متراكم پلاكتها اطلاعات خوبي مي‌دهد، به طوريكه فقر يا فقدان (فاكتورهاي موجود نظير ATP ، ADP و سروتونين، كلسيم PDGR و VWF) موجود در اين گرانول‌ها باعث نتيجه غيرطبيعي آزمايش مي‌گردد. به طور معمول تجمع پلاكتي غيرطبيعي همراه است با: اختلالات پلاكتي مربوط به كمبود رسپتورهاي گليكوپروتئين غشايي و كمبود در آزاد كردن ADP (آدنوزين دي فسفات) / فقدان فاكتور ون ويلبراند، فيبرينوژن، فيبرونكتين / حضور متابوليتهاي غيرطبيعي و تركيبات پلاسمايي در اورمي، ديس پروتئينمي و DIC (انعقاد منتشره داخل عروقي) در DIC به علت وجود FDP كه به عنوان ضد تجمع پلاكتي عمل مي‌كند / اختلالات كلاژن عروقي / اختلالات ميلوپروليفراتيو (CML ، پلي سايتمي ورا). در ترومباستني‌گلانزمن كه فقدان گليكوپروتئين a 3 b/ 2 وجود دارد. تجمع در حضور ADP ، كلاژن اپي نفرين و ترومبين صورت نمي‌گيرد. با رسيتوستين آگلوتيناسيون طبيعي است. در سندرم برنارد سولير: فقدان گليكوپروتئين Ib/ix ، تجمع طبيعي با ADP ، كلاژن و اپي نفرين و فقدان آگلوتيناسيون با رسيتوستين ديده مي‌شود. در كمبود مخزن ذخيره‌اي (سندرم چدياك هيگاشي، سندرم پلاكت خاكستري، سندرم ويسكوت آلدريچ،...) تجمع پلاكتي در ارتباط با فقر يا فقدان ثانويه آزاد سازي ADP غيرطبيعي است.

بيماري ون ويلبراند: تجمع طبيعي با ADP ، كلاژن و اپي نفرين و بارسيتوستين آگلوتيناسيون يا وجود ندارد يا كاهش مي‌يابد.

اساس روش متداول: هنگامي كه پلاسما سيتراته سرشار از پلاكت (كه در حال مخلوط شدن مداوم است)، در دستگاه فتواپتيك اگريگومتر پلاكتي قرار گيرد با عبور پرتو نور، بر اساس تغييرات بدست آمده در مقدار عبور نور، مي‌توان ميزان تجمع پلاكتها را در پاسخ به محرك افزوده شده (آدنوزين دي فسفات، كلاژن، اپي نفرين، ترومبين، اسيد آراشيدونيك و رسيتوستين) را اندازه‌گيري كرد كه تشكيل توده پلاكتي، سوسپانسيون را شفاف مي‌كند و نور بيشتري به شناساگر مي‌رسد.

روش مرجع: -

روش ارجح: -

روش‌هاي ديگر: اگريگومتر پلاكتي

نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: پلاسما كه خون كامل سيتراته در يك لوله پلاستيكي گرفته مي‌شود (در يخچال قرار داده نشود)، پلاسماي غني از پلاكت با سانتريفوژ با دور g 100 براي 15-10 دقيقه بدست مي‌آيد و براي 3-1 ساعت در دماي اتاق پايدار است.

محدوده طبيعي:

تجمع كامل در پاسخ محركها: ADP ، كلاژن، اپي نفرين، ترومبين و رسيتوستين.

واكنش تداخلي: هموليز، هپارين، ليپمي، و نيكوتين باعث افزايش و در شرايط داخل بدن (invivo) : مصرف آسپرين، كاربني سيلين، كلروكين، دكستران، سيپروهپتادين، نيتروفورانتوئين، پني سيلين، پروپرانولول،... و ترومبوسيتوپني در كاهش آن مؤثرند.

معايب و فوايد روش حاضر: اختلالات عملكردي پلاكت مي‌تواند با استفاده از چندين عامل تشخيص داده شود. تجمع بستگي به شمارش پلاكت، توانايي پلاكتها در تجمع و فاكتورهايي در پلاسماي نرمال(به خصوص فيبرينوژن) دارد. تجمع پلاكتهاي بعضي از افراد طبيعي با اپي نفرين صورت نمي‌گيرد.

آزمايش چسبندگي پلاكت Platelet Adhesion / Retention Test

نام آناليت: پلاكت (Platelet)

ساختمان و متابوليسم: لايه‌هاي زيرين اندوتليال عروق كه بر اثر پارگي نمايان مي‌شوند از نظر آنتي ژني براي پلاكتها بيگانه هستند، در اين موقع پلاكتها با ايجاد پاي كاذب به اين سطوح مي‌چسبند كه عواملي چون فيبرينوژن، ADP و به خصوص فاكتور ون‌ويلبراند داراي اثر مهم و تسريع كننده‌اي در اين اتصال هستند.

معرفي آزمايش، كاربرد باليني: اين آزمايش در بيماري ايسكميك قلبي، افزايش سطح فاكتور 7، ديابت مليتوس و افزايش فيبرينوژن و در بيماري ون‌ويلبراند، ترومباستني گلانزمن، سندرم برنارد سولير، نقص در آزاد سازي پلاكت، بيماري ذخيره گليكوژن، بيماري قلبي مادرزادي و اختلالات ميلوپروليفراتيو كاهش نشان مي‌دهد.

اساس روش متداول: چسبندگي پلاكت برابر است با شمارش اصلي پلاكت منهاي شمارش پلاكت در خوني كه در ستون كشيده شده و به صورت درصدي از شمارش پلاكت اصلي بيان مي‌شود. مقدار جذب نوري پلاسماي غني از پلاكت مانند تجمع پلاكتي افت پيدا مي‌كند. مقدار و سرعت اين افت بستگي به فعال شدن (واكنش) پلاكت نسبت به آگونيست افزوده شده خواهد داشت. اين در حالتي است كه ساير متغيرها از قبيل دما، شمارش پلاكتي و سرعت مخلوط تحت كنترل باشد. تغييرات جذب نوري (absorbance) روي chart recorder آمده است. (با استفاده از تكنولوژي Born).

heating block بن ماري 30 دقيه Ø گرم شده 37 °C Ø900 rpm سرعت هم زدن PRP Ø (داخل لوله پلاستيكي) حجم مناسبي
Ø37 °C 1 دقيه داخل پلاسما قرار داده شود Ø هم زن (Chart recorder) Ø عبور نور روي صفر Ø كووت
پلاسما تنظيم رقت

1 10 + اگونيست PRP

عبور نور روي 100 <---------- PPP ---------->

Ø به مدت 3 دقيه (Plateu) تغيير جذب تا رسيدن به پلاتو

Technical factors which may influence platelet aggregation tests

Centrifugation. At room temperature, *not* at 4°C. Should be sufficient to remove red cells and white cells but not the largest platelets. Residual red cells in the PRP may cause apparently incomplete aggregation.

Time. For 30 min after the preparation of PRP, platelets are refractory to the effect of agonists. Progressive increase in reactiveness occurs thereafter, more marked from 2 h onward.

Platelet count. Slow and weak aggregation observed with platelet counts below 150 or over 400×10^9/l.

pH. <7.7 inhibits aggregation; pH >8.0 enhances aggregation.

Mixing speed. <800 rpm or >1200 rpm slows aggregation.

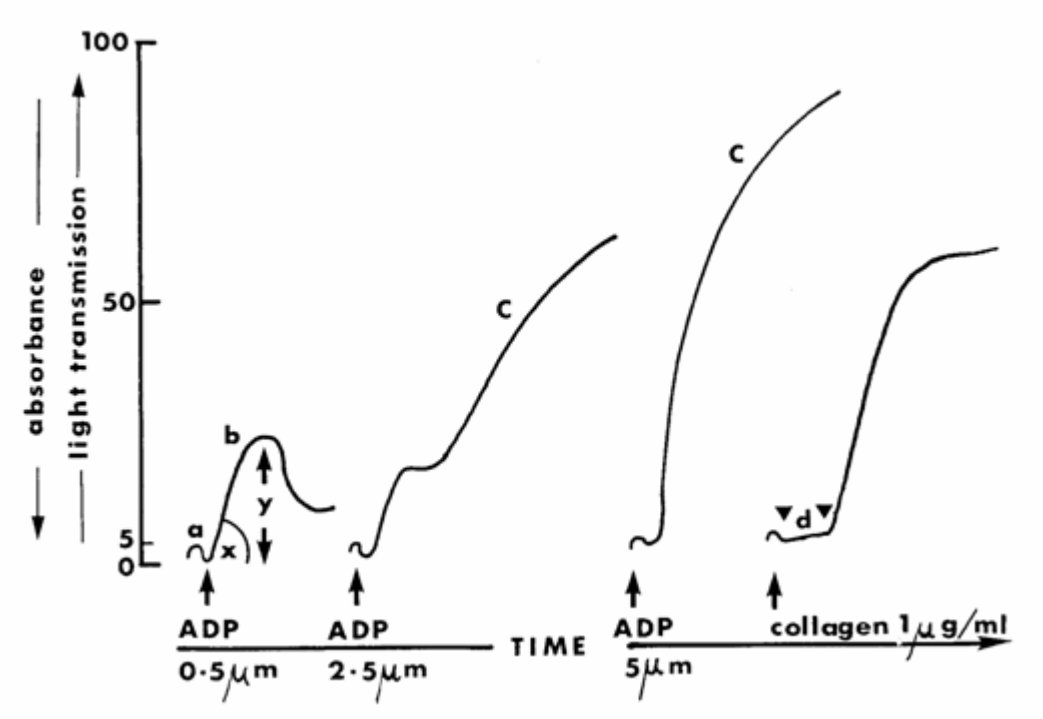
Haematocrit. >0.55 is associated with less aggregation, especially in the 2ry phase due to the increased concentration of citrate in PRP. It may also be difficult to obtain enough PPP. Centrifuging twice may help.

Temperature. <35°C causes decreased aggregation except to low dose ADP which may be enhanced.

Dirty cuvette. May cause spontaneous platelet aggregation or interfere with the optics of the system.

Air bubbles in the cuvette. Cause large irregular oscillations even before the addition of agonists.

No stir bar. No response to any agonist obtained.



اين عمل براي هر آگونيست تكرار مي‌شود. مقدار آغازگر براي هر آگونيست كمترين غلظت آماده شده است. اگر عمل آزادسازي صورت نگيرد، افزايش غلظت تا رسيدن به پاسخ مناسب ادامه پيدا مي‌كند.

منحني نرمال تجمع پلاكتي در شكل آمده است. تأثير ADP : غلظت‌هاي پايين ADP (كمتر از 0/5 تا 2/5 ميكرومول بر ليتر) باعث تجمع اوليه يا قابل برگشت خواهد شد. ابتدا ADP به گيرنده‌هاي غشايي متصل شده و يون كلسيم آزاد مي‌شود. كمپلكس قابل برگشت همراه اشكال خارج سلولي فيبرينوژن تشكيل شده و پلاكت‌ها دچار تغيير شكلي مي‌شوند كه بصورت افزايش جزئي در جذب نوري منعكس مي‌شود. پس از آن فيبرينوژن اتصالي به سلول‌ها (سلول به سلول) افزوده شده و تجمع قابل برگشت اتفاق مي‌افتد. در حضور غلظت‌هاي بالاتر ADP دومين موج تجمع غيرقابل برگشت همراه با آزاد سازي گرانول‌هاي aو متراكم اتفاق مي‌افتد (بدليل فعال شدن مسير اسيد آراشيدونيك) نتايج به 3 صورت بيان مي‌شوند: 1) بصورت درصد كاهش جذب نوري اندازه‌گيري شده در 3 دقيقه پس از افزودن آگونيست، اين حالت هيچ اطلاعي از شكل منحني بدست نمي‌دهد. 2) بوسيله حلقه نهايي تجمع كه نشان دهنده سرعت تجمع بوده اما چگونگي يا نبود تجمع ثانويه را نشان نمي‌دهد. 3) با استفاده از حداقل مقدار آگونيست مورد نياز براي القاء پاسخ ثانوي.

روش مرجع: -

روش ارجح: -

روش‌هاي ديگر: روش ستوني گلوله شيشه‌اي

نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: 12 سي سي خون را در سرنگ پلاستيكي جمع آوري كرده، فوراً 10 سي سي از آن را داخل ستوني وارد كرده و 2 ميلي ليتر را با ضد انعقاد EDTA براي كنترل مخلوط مي‌نمايند.

محدوده طبيعي:

چسبندگي پلاكت: 95-75 درصد پاسخ فاز منفرد يا 2 فازي در غلظت 2/1 mg/ml رسيتوستين و آسپرين 50 الي 100 m mol/lاسيد آراشيدونيك ديده مي‌شود.

Differential diagnosis of disorders of platelet function

Condition	Platelet		Aggregation with:				
	Count	Size	ADP	Col	Ri	AA	FVIII
Thrombasthenia	N	N	0	0	Ab	0	Ab
Bernard-Soulier syndrome	Large	Large	N	N	0	N	0
Storage pool defect	N	N	1	Ab	1/0	1/0	1/0
Cyclo-oxygenase deficiency	N	N	1/N	Ab	N	Ab	–
Thromboxane synthetase deficiency	N	N	1/N	Ab	N	Ab	–
Aspirin ingestion	N	N	1	Ab	N/Ab	Ab	N/Ab
Ehler-Danlos syndrome	N	N	N	Ab	N	N	–
von Willebrand disease	N	N	N	N	0	N	N

N, normal; 0, absent; 1, primary wave only; Ab, abnormal; Col, collagen; Ri, ristocetin; AA, arachidonic acid; FVIII, porcine factor VIII complex/bovine fibrinogen.
Note that many other defects, such as found in oculo-cutaneous albinism, Chediak-Higashi syndrome, grey platelet syndrome, etc., have also been described.

واكنش تداخلي: در شرايط داخل بدن (invivo) : آسپرين باعث كاهش مي‌گردد.
معايب و فوايد روش حاضر: عواملي كه روي نتيجه آزمايش مؤثرند: اندازه ستون و گلوله‌هاي شيشه‌اي، سرعت جريان خون و هماتوكريت (PCV) . در اين آزمايش به علت فقدان حساسيت و وجود مشكلاتي براي استاندارد شدن، استفاده روتين كاهش يافته است. آزمايش تجمع پلاكتي يا رسيتوستين در ارزيابي بيماري ون‌ويلبراند باچسبندگي پلاكت جانشين شده است.

زمان ركالسيفيكاسيون پلاسما (PRT) PlasmaRecalcificationTime

نام آناليت: پلاسما (Plasma)
ساختمان و متابوليسم: -
معرفي آزمايش، كاربرد باليني: اين آزمايش مانند تمام آزمايشات انعقادي در 37 درجه صورت گرفته و مانند آزمايش انعقاد، نشان دهندة نحوة عملكرد سيستم‌هاي داخلي و مشترك است.
اساس روش متداول: از آنجاييكه علت لخته شدن خون مخلوط شده با سيترات سديم و يا اگزالات پتاسيم، خارج شدن يون كلسيم مي‌باشد. اگر به اين پلاسما دوباره يون كلسيم اضافه شود، با فعال شدن فاكتورهاي انعقادي، پلاسما لخته مي‌شود.
روش مرجع: -
روش ارجح: -
روش‌هاي ديگر: اندازه‌گيري زمان بين اضافه شدن كلسيم يونيزه تا تشكيل لخته.
نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: خون كامل (سيتراته يا اگزالاته) كه براي بدست آوردن پلاسماي غني از پلاكت در دور كم سانتريفوژ مي‌شود.

محدوده طبيعي:
90-120 ثانيه.

واكنش تداخلي: -
معايب و فوايد روش حاضر: استاندارد كردن تعداد پلاكت به عنوان منبع فسفوليپيدي، به كاربردن شيشه به دليل اينكه عوامل تماسي را فعال مي‌كند از اشكالات اين آزمايش است.

جمع شدن لخته (Clot Retraction)

نام آناليت: لخته (Clot)
ساختمان و متابوليسم: در اثر تجمع پلاكتها ساعاتي پس از نمونه‌گيري لخته منقبض شده و سرم، بالاي لخته قرار مي‌گيرند كه اين وضعيت در محل پارگي در بدن باعث نزديك‌تر شدن ديواره‌هاي بريدگي به هم و خون رساني به محل مي‌شود.
معرفي آزمايش، كاربرد باليني: در صورتيكه آزمايش سيلان بيماري غيرطبيعي باشد، انجام اين آزمايش درخواست مي‌گردد. منقبض شدن لخته يا كاهش آن در ترومباستني گلانزمن، كاهش پلاكت كمتر از صدهزار در ميليمتر مكعب، هيپرفيبرينوژنميا و اريتروسيتوزيس ديده مي‌شود. در برنارد سولير اين آزمايش طبيعي است.
اساس روش متداول: روش كيفي، 2 cc خون را در يك لولة آزمايش ريخته و در دماي 37 درجه قرار مي‌دهيم پس از 2 ساعت، در صورت وجود انقباض و ديدن سرم روي لخته اين آزمايش به صورت طبيعي گزارش مي‌شود.
روش مرجع: -
روش ارجح: -
روش‌هاي ديگر: روش كيفي، روش نيمه كيفي.

محدوده طبيعي:
انقباض لخته به طور طبيعي از يك ساعت پس از نمونه‌گيري آغاز شده و تا 24 ساعت كامل مي‌شود، به صورتيكه 50 درصد لخته و 50 درصد سرم در لولهٔ آزمايش ديده مي‌شود. نتيجه به صورت Normal ، Equivocal ، Poor گزارش مي‌شود.

نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: خون كامل (فاقد ضد انعقاد) كه براي انجام آزمايش در لوله تميزي ريخته و در 37 درجه قرار مي‌گيرد.
واكنش تداخلي: مصرف كاربني سيلين و كانامايسين باعث كاهش مقادير مي‌گردند.
معايب و فوايد روش حاضر: پاره‌اي از دانشمندان اين آزمايش را چندان قابل اعتماد نمي‌دانند چرا كه داراي حساسيت لازم نيست و از طرفي علاوه بر تعداد و فعاليت پلاكتها، عواملي چون كاهش فيبرينوژن خون (كمتر از mg/dl 50)، افزايش گلبولهاي قرمز خون (پلي سايتمي)، فيبرينوليز (DIC) ، نارسايي‌هاي انعقادي (هموفيلي) و درمان با داروهاي ضد انعقاد (هپارين) بر روي نتايج آن موثر است. بيماري ترومباستني گلانزمن بيماري است كه در آن در غشاء سطحي پلاكت نقص وجود دارد به طوريكه پروتئين‌هاي IIb و يا IIIa كاهش يافته يا اصلاً وجود ندارند يا عملكرد غيرطبيعي دارند.

آنتي بادي ضد پلاكتي به روش فلوسايتومتري (Anti Platelet Antibody)

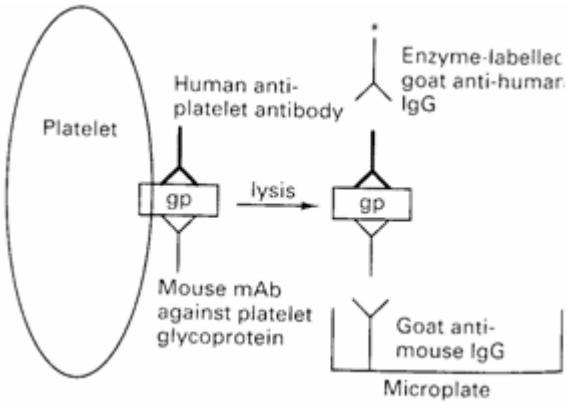
نام آناليت: آنتي بادي ضد پلاكتي (Anti Platelet Antibody)
ساختمان و متابوليسم: -
معرفي آزمايش، كاربرد باليني: اين روش براي ارزيابي پلاكتهاي آغشته با IgG و IgM به كار مي‌رود.
در ITP (پورپوراي ترومبوسيتوپنيك ايديوپاتيك) به طور نمونه فلورسانس نسبي برابر با 7-2 يا گاهي بالاتر است. در ITP مزمن در بيشتر از 90 درصد موارد اتوآنتي بادي از نوع IgG وجود دارد. در 75 درصد از بيماران همراه با ترومبوسيتوپني ايميون يا غيرايميون ميزان غيرطبيعي از آنتي بادي يافت شده است. براي بررسي آلوآنتي باديهاي ضد پلاكتي كاربرد دارد.
روش فلوسيتومتري: براي شرح اساس آزمايش به بخش فلوسايتومتري از كتاب تجهيزات مراجعه شود.
اساس روش متداول: -
روش مرجع: -
روش ارجح: -
روش‌هاي ديگر: -
نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: 14 سي سي خون كامل همراه با ACD (اسيد سيترات دكستروز) (در دماي اتاق عدم جداسازي پلاسما يا فريز شود.) (در پلاكتهاي همرا با IgM, IgG). در بررسي آلوآنتي باديها: نمونه سرم است كه در 4 درجه براي 2 هفته و به طور نامحدود در 20- يا 70- درجه سانتي گراد قابل نگهداري است.

محدوده طبيعي:
در پلاكتهاي همراه با IgG و IgM :
RFU(relative fluorescence unit) 5/1 > (در ITP واحد آلودگي پلاكت با IgG يا IgM به صورت واحد * Fg است)
در آلوآنتي باديها: منفي

واكنش تداخلي: نمونه‌هاي بيماران با شمارش پلاكت كمتر از 10 هزار در ميكروليتر ممكن است در روند آزمايش مشكل ايجاد كنند (در بررسي پلاكتهاي همراه با IgG و IgM).
آلوآنتي باديهاي اختصاصي پلاكت: در ايجاد پوپورا بعد از انتقال خون بيشتر از آنتي HPA-1a موثر است. در اين بيماران، بدليل كاهش پلاكت، پورپورا و معمولاً خونريزي موكوزال يك هفته بعد از تزريق پلاكت مشاهده مي‌شود. آنتي HPA-1a هنگامي كه از طريق جفت از مادر به جنين منتقل شود ايجاد ترومبوسيتوپني و پورپوراي اتوايميون نوزادان مي‌كند.
معايب و فوايد روش حاضر: روش فلوسيتومتري در حال حاضر يكي از دقيق‌ترين روشهاست.

آنتي بادي ضد پلاكتي به روش IF (ايمنوفلورسانس) (Anti Platelet Antibody)

نام آناليت: آنتي بادي ضد پلاكتي (Anti Platelet Antibody)
اطلاعات ويژه آزمايش: آنتي باديهاي ضد پلاكتي در 3 دسته واقع مي‌شوند: 1) آلوآنتي بادي‌ها 2) اتوآنتي بادي‌ها 3) آنتي بادي‌هاي Drug-induced



آزمايشات مربوط به آلوآنتي باديها شامل: الف: آزمايش پلاكت براي آنتي باديهاي واكنش دهنده با پلاكت (آزمون سوسپانسيون ايمونوفلورسنس پلاكتي) بعنوان روش مرجع بررسي آنتي باديهاي پلاكتي (ISBT/ICSH) مانند روش PIFT (Platelet Immuflu. Test) با روش Capture آنتي ژن نظير immobilization آنتي بادي مونوكلونال يا (MAIPA) براي افزايش احتمال تشخيص آنتي باديهاي ضعيف يا انواعي كه با تعداد كمي جايگاه آنتي ژني واكنش مي‌دهند. ب: آزمايش لنفوسيت براي تشخيص آنتي باديهاي HLA : از آنجاييكه آنتي باديهاي HLA نيز با پلاكت‌ها واكنش مي‌دهند آزمايشات سيتوتوكسيسيتي لنفوسيتي يا فلورسنت بعنوان روش اصلي بكار مي‌روند. ج: آزمايشاتي كه براي افتراق آنتي باديهاي اختصاصي پلاكتي از آنتي باديهاي HLA كاربرد دارند: تكنيك MAIPA با استفاده از آنتي بادي مونوكلونال مناسب براي تفكيك مخلوطي از آنتي باديهاي واكنش دهنده با پلاكت كاربرد دارند. روش Stripping Choloroquine براي غيرفعال سازي مولكول‌هاي HLA كلاس I روي پلاكت بكار مي‌روند.

روش‌هاي متداول سرولوژيكي (مانند واكنش‌هاي افتراقي با لنفوسيت‌ها و پلاكتهاي طبيعي و Panel ، جذب افتراقي آنتي باديهاي HLA) نيز براي افتراق آنتي باديهاي اختصاصي سلول و HLA بكار مي‌رود اما اكثر اين روش‌ها براي غربال مناسب نيستند و روش Stripping Choloroquine مناسبتر است.

تعيين هويت بعدي آنتي باديها بوسيله آزمايشگاههاي رفرانس انجام مي‌شود (نظير آنچه كه در مورد گلبول‌هاي قرمز انجام مي‌شود) كه با پلاكتهاي پانل گروه O صورت مي‌گيرد.

2- اتوآنتي باديها: در اين بررسيها لازم است نشان دهيم كه اتوآنتي بادي موجود در سرم بيمار با سلول‌هاي خود بيمار واكنش مي‌دهد. بطور عادي آزمايش آنتي گلبولين مستقيم (يعني آزمون ايمونوفلورسنت پلاكتي) قبل از درمان براي تشخيص آنتي باديهاي متصل شونده در invivo بايد انجام شود.

در صورت سيتوپني شديد شايد نتوان مقادير كافي سلول براي آزمايش در اختيار داشت. بهرحال نمونه سرمي بايد در 20- C° نگهداري شده و به ترتيب عليه سلول‌هاي بيمار بررسي شوند. (در صورتيكه شمارش پلاكتهاي خون محيطي در پاسخ به درمان افزايش يافته باشد). يكي از معايب اصلي روش‌هاي كمي سنجش آنتي باديها اين است كه آنها نه تنها با اتوآنتي باديها واكنش مي‌دهند بلكه ايمونوگلبولين‌هاي غيراختصاصي متصل به پلاكت‌ها و اجزاء پلاكتي نيز شناسايي مي‌شوند و بنابراين غيراختصاصي مي‌باشند. از طرف ديگر آزمون (PIFT) بدون مشكل غيراختصاصي بودن (با PFA Fixation) روش بهتري است. جواب با ميكروسكوپ فلورسنس خوانده شده و زمينه فلورسنت مشكل ديگري است.

3- آنتي باديهاي Drug-induced : مانند الگوي آنمي همولتيك انجام مي‌شود و شامل آزمايشات زير است: الف: نمونه خوني فاز حاد ب: نمونه بعدي پس از توقف دارو.

معرفي آزمايش، كاربرد باليني: اين روش در رابطه با پلاكت چسبيده به IgG انجام مي‌شود. در بيشتر يا برابر 75 درصد از بيماران با پورپوراي ترمبوسايتوپنيك ايميون مزمن يا حاد و همچنين در وضعيتهاي متنوعي شامل ميلوم مولتيپل، ترومبوسيتوپني سپتيك، SLE (لوپوس اريتماتوزسيستميك)، بيماريهاي كمپلكس ايمني و عفونت با HIV-1 افزايش اين آنتي بادي ديده مي‌شود.

اساس روش متداول: ايمنوفلورسانس: در اين روش آنتي ايمونوگلوبولين فلورسنت بر ضد آنتي بادي ضد پلاكتي به كار گرفته مي‌شود و اين ماده فلورسنت پس از قرار گرفتن در معرض نوري با طول موج معين، نوري با طول موج بلندتر از خود ساطع مي‌كند.

روش مرجع: -

روش ارجح: -

روش‌هاي ديگر: فلوسايتومتري، الايزا.

1) روش‌هاي آنتي گلبولين نشاندار با ماده فلورسنت: روش (PIFT) كه با روش‌هاي آنتي گلبولين متداول انجام مي‌شود.
2) مخلوط كردن chloroquine با پلاكت‌ها و گرانولوسيت‌ها
3) روش MAIPA
4) برخي روش‌هاي ELISA روش‌هاي پيچيده 2 مرحله‌اي براي سنجش كمي ايمونوپروتئين‌هاي وابسته به پلاكت‌ها ابداع شده‌اند. (با پلاكت و پليت ميكروتيتر) كه با روش استاندارد PIFT از نظر حساسيت و قدرت تكرار پذيري قابل مقايسه هستند.

نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: خون (سيترات، ACD يا EDTA)، سريع آزمايش انجام شود. (تا 48 ساعت پس از خونگيري در دماي مناسب قابل نگه داري است).

محدوده طبيعي:
1/1-m2/3 /g 10 9

واكنش تداخلي: در شرايط داخل بدن (invivo) : داروهايي از قبيل هپارين باعث افزايش مي‌گردد.
معايب و فوايد روش حاضر: هيچ روش ويژه‌اي براي تشخيص كليه آنتي باديهاي ضد پلاكت وجود ندارد. در عمل بهتر است از روش اساسي غربالي استفاده شود كه قسمت عمده آنتي باديهاي موجود را شناسايي نمايد كه هم از نوع متصل به سلول (آزمايشات مستقيم) و هم از نوع سرمي (غيرمستقيم) باشد و اين روش را با آزمايشات تكميلي براي تشخيص ويژگيهاي خاص آنتي بادي و مقدار اتصال يافته به سلول انجام مي‌دهند. روش‌هاي آنتي گلبولين نشاندار در سرولوژي روتين براي پلاكت‌ها كاربرد دارند از جمله فلورسنت (معرف نشاندار). امروزه تمايل زيادي براي دستيابي به روش Microtechnology براي افزايش كارآيي و سرعت تعداد زيادي نمونه وجود دارد تا از اتلاف مواد جلوگيري شود. روش فلوسيتومتري نيز براي قرائت نتايج آزمون فلورسنت قابل استفاده است.

تعيين مقدار D-Dimer (Fibrin Degradation fragment)

نام آناليت: D-Dimer ، (Fibrin Degradation fragment)
ساختمان و متابوليسم: اجزاي پپتيدي X ، Y ، D از تجزيه فيبرين و فيبرينوژن بوسيله پلاسمين ايجاد مي‌شود كه FDP نيز ناميده مي‌شوند. وقتيكه فيبرين بر اثر فاكتور 13 داراي پيوستگي‌هاي عرضي و پايدار شده باشد، در صورتيكه پلاسمين روي آن اثر كند، اجزاي حد واسط FDP مثل D 2 E ايجاد مي‌شوند كه به D-Dimer مشهورند.
معرفي آزمايش، كاربرد باليني: افزايش مقدار آناليت در فيبرينوليز ثانويه، در طول درمان ترومبوتيك با فعال كننده پلاسمينوژن بافتي، آمبوليسم ريوي، DIC (انعقاد منتشره داخل عروقي)، گرفتگي رگ در آنمي سيكل سل، حاملگي، بدخيمي، جراحي، ديده مي‌شود. اين آزمايش در فيبرينوليز اوليه منفي است. اين آزمايش براي اجزاي حاصل از تخريب فيبرين اختصاصي بوده و براي فيبرينوژن كاربرد ندارد. همچنين در تشخيص بيماري DIC استفاده مي‌شود.
اساس روش متداول: ذرات لاتكس با پادتن مونوكلونال عليه D 2 E كه از موش تهيه شده آغشته گشته و با سرم يا پلاسماي بيمار مجاور مي‌شوند و وجود يا عدم وجود آگلوتيناسيون بررسي مي‌شود.
روش مرجع: -
روش ارجح: -
روش‌هاي ديگر: آگلوتيناسيون
نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: پلاسماي (سيتراته) كه به مدت 8 ساعت در دماي اتاق و 6 ماه در 20- درجه قابل نگهداري است.

محدوده طبيعي:
به طور طبيعي منفي است.

واكنش تداخلي: نتايج مثبت كاذب در سطح بالاي فاكتورهاي روماتوئيد و افزايش تومورمارکر CA -125 در سرطان تخمدان ديده شده است.
معايب و فوايد روش حاضر: يك آزمايش D-Dimer مثبت احتمالاً مدركي براي وجود DIC يا ترومبوزهاي داخل عروقي ديگر است. استفاده از پلاسما راحت‌تر و داراي نتايج درستي نسبت به سرم است. فيبرينوژن و اجزاء آن در اين آزمايش دخالت نمي‌كنند.

اندازه‌گيري PAI-1 (plasminogen activator inhibitor)

نام آناليت: مهار كننده فعالگر پلاسمينوژن (plasminogen activator inhibitor)
ساختمان و متابوليسم: PAI-1 كه در پلاسماي انسان وجود دارد بوسيله سلولهاي اندوتليال سنتز مي‌شود و نقش مهمي را در ترومبوز غيرمحلول بازي مي‌كند. اين ماده يك مهاركننده قوي فعال كننده‌هاي پلاسمينوژن بافتي يا اوروكيناز است. غلظت آن هر چند پايين است ولي تابع تغييرات روزانه و فردي مي‌باشد. پلاكتها منبع غني از آن هستند كه تقريباً به طور كامل غيرفعال است، اما اگر آزاد شود در اندازه‌گيري PAI-1 پلاسمايي تداخل ايجاد مي‌كند. PAI-1 يكي از مهارگرهاي قوي t-PA مي‌باشد برخي از اعضاء خانواده Serpin ها عليه t-PA و برخي عليه tcu-PA فعال هستند. كمبود PAI-1 باعث مهار كمتر و فيبرينوليز بيشتر و تمايل بالقوه براي خونريزي مي‌شود (همچنين زمينه مستعد كننده آترواسكلروز)
معرفي آزمايش، كاربرد باليني: افزايش اين آزمايش در انفاركتوس ميوكارديال، بدخيمي، عفونت، هيپرليپوپروتئينمي، هيپرتري گليسيريدمي، حاملگي و ترومبوز عميق وريدي ديده شده و كاهش آن را در مصرف استروئيدهاي آنابوليك شاهد هستيم.
اساس روش متداول: ELISA
روش مرجع: روش ارجح: -
روش‌هاي ديگر: اندازه‌گيري عملكردي (سوبستراي كروموژنيك)، ايمنواسي (الايزا)
نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: پلاسما (سيترات)، سانتريفوژ سريع در 4 درجه به منظور بدست آوردن پلاسماي فاقد پلاكت، كه در

4 درجه مدت 6 ساعت و در 20- درجه براي 3 ماه پايدار است.

محدوده طبيعي:

15 IU/ml < تغييرات روزانه: ميزان آن در صبح دو برابر بالاتر از بعد از ظهر است.

واكنش تداخلي: در روش عملكردي افزايش بيلي روبين خون (بيلي روبينميا) و در روش ايمنواسي، آلودگي پلاكتي پلاسمـــــا ايجاد تداخل مي‌كنند.

اندازه‌گيري TPA (Tissue Plasminogen Activator)

نام آناليت: فعال كننده پلاسمينوژن بافتي (Tissue Plasminogen Activator)

ساختمان و متابوليسم: پلاسمينوژن يك زنجيره گليكوپروتئيني است كه در قسمت N ترمينال خود داراي اسيد گلوتاميك مي‌باشد كه بوسيله فعال كننده‌ها كه t-PA (فعال كننده پلاسمينوژن بافتي)، و U-PA (فعال كننده پلاسمينوژن اوروكيناز) مي‌باشد، تبديل به آنزيم پلاسمين فعال مي‌شود.

معرفي آزمايش، كاربرد باليني: سطح فعال كننده پلاسمينوژن بافتي در DVT ، بدنبال انسداد عروقي، استرس، ورزش، تزريق دسموپرسين (DDAVP) همچنين در يك اختلال ارثي نادري كه همراه با خونريزي است افزايش مي‌يابد. كاهش سطح به عنوان يك نقص فاميلي همراه با تظاهرات ترومبوليتيك ثابت شده است.

اساس روش متداول: ELISA

روش مرجع: روش ارجح: -

روش‌هاي ديگر: عملكردي (سوبستراي كروموژنيك)، آنتي ژني، الايزا.

محدوده طبيعي:

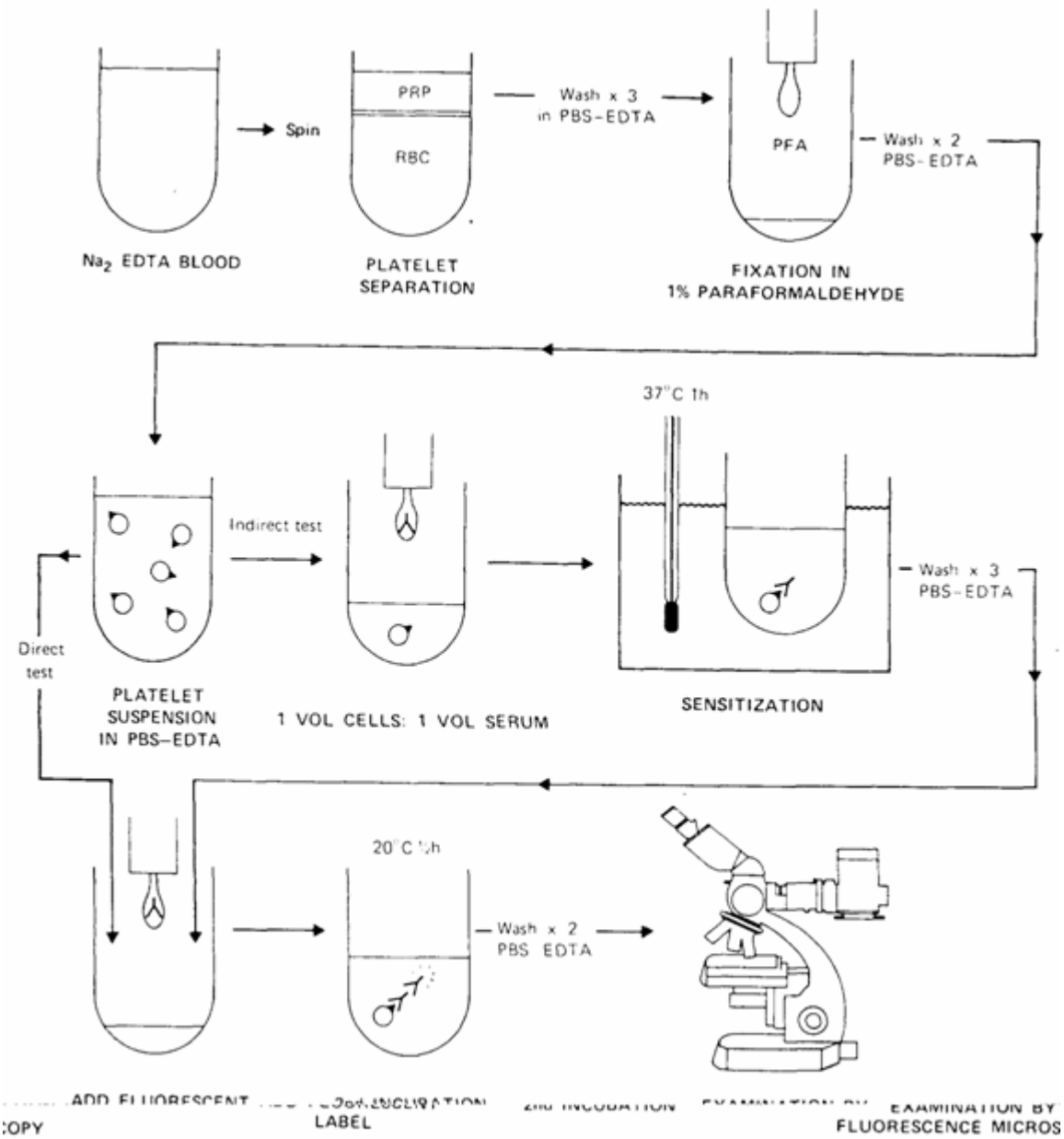
در روش عملكردي **0-04/0 IU/ml = سطح پايه**

4/1-14 IU/ml: بعد از انسداد عروقي

در روش آنتي ژني **3-10 ng/ml**

نوع نمونه قابل‌اندازه‌گيري: در روش عملكردي: به منظور جلوگيري از مهار فعال كننده پلاسمينوژن بافتي، خون را در لوله‌هاي خلأ همراه با سرما (ice-cold) حاوي سيترات سديم وارد كرده و فوراً 500 ميكروليتر از خون را با 250 ميكروليتر استات سديم 1 mol/L مخلوط مي‌كنيم. با استفاده از لوله‌هاي ويژه جمع آوري خون، مرحله بعد سانتريفوژ خون و مخلوط كردن 200 ميكروليتر از پلاسما با 10 ميكروليتر اسيد استيك 20% براي از بين بردن آنتي پلاسمين انجام مي‌شود. اين نمونه براي 4 ساعت در 5 درجه، 3 ماه در 20- درجه و يا 6 ماه در 70- درجه پايدار است. در روش آنتي ژني: پلاسما (سيترات يا EDTA) كه براي 5 ساعت در 5 درجه يا براي 24 ماه در 20- درجه قابل نگه داري است.

واكنش تداخلي: در روش عملكردي مهاركننده‌هاي فعال كننده پلاسمينوژن و آلفا - 2 آنتي پلاسمين ايجاد تداخل مي‌كنند. و در روش آنتي ژن تداخل وجود ندارد.



Platelet immunofluorescence test. PRP, platelet-rich plasma; PBS, phosphate buffered sal
paraformaldehyde.