

# تعیین شاخص حساسیت بین المللی کیت های آزمایش (ISI verification) PT و گزارش صحیح نسبت همسو شده بین المللی (INR)

• دکتر حبیب ا... گل افشان

عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

[golafshanh@sums.ac.ir](mailto:golafshanh@sums.ac.ir)

• رضا رنجبران

دانشجوی دکترای تخصصی خون شناسی

مرکز تحقیقات علوم و فن آوری تشخیص آزمایشگاهی دانشکده

پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

## خلاصه

آیا می دانید که اندکس حساسیت بین المللی (ISI) کیت آزمایش PT که در آزمایشگاه استفاده می کنید، چگونه به دست آمده است؟ آیا می دانید که در هر کیت PT دو نوع ISI تحت عناوین ژنریک (Generic) و اختصاصی (Specific) توسط شرکت سازنده قید شده است؟ شما با توجه به روش انجام آزمایش در آزمایشگاه خودتان از کدام ISI استفاده می کنید؟ آیا می دانید که ISI درج شده در کیت PT ممکن است با روش انجام آزمایش PT در آزمایشگاه شما سازگار نباشد؟ آیا می دانید که ISI درج شده در کیت بایستی برای آزمایشگاه با توجه به روش آزمایش مورد تایید و کالیبره قرار گیرد؟ آیا می دانید که تایید و کالیبراسیون ISI در بسیاری از کشورها اجباری شده است؟

**کلمات کلیدی:** تعیین شاخص حساسیت بین المللی، کیت های آزمایش PT، نسبت همسو شده بین المللی  
آزمایش زمان پروترومبین (PT) برای اولین بار در سال ۱۹۳۵ توسط Quick به منظور اندازه گیری پروترومبین (فاکتور II) ارائه گردید، از این رو آزمایش، زمان پروترومبین نامیده شد. هر چند که بعدها مشخص شد که این آزمایش به کمبود و اختلال فاکتورهای VII, X, V نیز حساس است.  
آزمایش زمان پروترومبین یک آزمایش یک مرحله ای

است که در آن زمان لازم برای تشکیل لخته فیبرینی پس از اضافه کردن ترومبوپلاستین بافتی بافری شده با کلسیم کلراید به پلاسمای سیترا ته فاقد پلاکت، اندازه گیری می شود.

ترومبوپلاستین از بافت مغز، ریه و جفت و سایر بافت ها استخراج می شود و حاوی مقادیر قابل توجهی فسفولیپوپروتئین می باشد.

فاکتور بافتی هر گونه جانوری خاص همان گونه است. برای مثال برخی از موتانت های فاکتور VII انسانی مانند فاکتور VII padua تنها با فاکتور بافتی نوع انسانی واکنش می دهد. اغلب آزمایشگاه ها در حال حاضر از فاکتور بافتی نو ترکیب انسانی با ISI نزدیک به یک (1-1.7) استفاده می کنند. برای این منظور ژن فاکتور بافتی را توسط وکتور وارد ژنوم مخمر کرده و فاکتور بافتی تولید شده را در آزمایشگاه لیپیددار می کنند (Lipidated).

ترومبوپلاستین حیوانی به طور معمول از مغز خرگوش تهیه می شود و این گونه فاکتورهای بافتی معمولاً دارای ISI برابر با 1.7-2.2 می باشند. فاکتور بافتی در نامگذاری پروتئین های انعقادی به عنوان فاکتور III انعقادی شناخته می شود.

آزمایش زمان پروترومبین یک فرد با کمبود یک یا چند فاکتور انعقادی در مسیر انعقاد خارجی، در ارتباط با نوع ترومبوپلاستین مورد استفاده می تواند متغیر باشد.



این اختلاف در حساسیت به عنوان اندکس حساسیت (Sensitivity Index) شناخته می شود. معرف های ترومبوپلاستین های سنتز شده توسط شرکت های مختلف دارای اندکس حساسیت بین المللی یا ISI (International Sensitivity Index) متفاوت هستند. این اندکس از طریق مقایسه ترومبوپلاستین مورد نظر با ترومبوپلاستین مرجع سازمان بهداشت جهانی (WHO) که با نوآوری DNA تهیه شده و دارای ISI برابر با یک می باشد، به دست می آید.

اندکس حساسیت بین المللی به حساسیت معرف PT در کمبود فاکتورهای وابسته به ویتامین K در مسیر خارجی اشاره می کند و مقدار آن از عدد یک تا ۳ متغیر است. هر چه مقدار عددی ISI به یک نزدیک شود، بیانگر معرف بسیار حساس و چنان چه به عدد ۳ نزدیک شود، بیانگر کاهش حساسیت آن در طولانی کردن آزمایش PT در کمبود فاکتورهای وابسته به ویتامین K است.

به منظور یکسان سازی نتایج آزمایش های PT در آزمایشگاه های مختلف و حذف تداخل اختلاف حساسیت معرف های مختلف، از نسبت همسو شده بین المللی یا INR (International Normalized Ratio) استفاده می شود. مقدار نسبت همسو شده بین المللی برابر است با نسبت PT بیمار به PT طبیعی (Mean Normal PT or MNPT) به توان مقدار ISI.

$$INR = \left[ \frac{\text{Patient PT}}{\text{Mean Normal PT (MNPT)}} \right]^{ISI}$$

محاسبه مقدار INR به شیوه معمول که در حال حاضر گزارش می شود به دو دلیل می تواند صحت (Accuracy) آن را مورد سوال قرار دهد:

۱- مقدار PT کنترل که در مخرج کسر قرار می گیرد در آزمایشگاه های مختلف به روش های متفاوتی به دست می آید و غالباً از میانگین ژئومتریک استفاده نمی شود.

۲- مقدار واحد ISI که توسط شرکت های سازنده به معرف ها داده می شود، بر اساس روش استاندارد WHO است نه بر اساس روش انجام آزمایش PT در آزمایشگاه های مختلف و با استفاده از تجهیزات مربوط به خود، این عوامل می توانند به عنوان منبع خطا در گزارش نتایج INR تاثیر

داشته باشد.

مقدار PT کنترل از میانگین PT مربوط به ۲۰ تا ۴۰ پلاسمای فرد نرمال به دست می آید. افراد شرکت کننده در نمونه گیری کنترل بایستی از لحاظ سلامتی شرایط مناسبی داشته باشند و از چند ساعت قبل ورزش سنگین انجام نداده باشند. خانم های باردار و زنانی که قرص های ضد بارداری استفاده می کنند نباید در بین این افراد وجود داشته باشند. برای به دست آوردن PT طبیعی بایستی از میانگین ژئومتریک (Geometric mean) استفاده کرد نه از روش میانگین حسابی (Arithmetic mean) زیرا مقدار به دست آمده از میانگین ژئومتریک به میانگین واقعی بسیار نزدیکتر است. به عنوان مثال اگر نتایج آزمایش PT مربوط به نمونه های کنترل به شرح زیر باشد:

12.5, 12.0, 13.1, 13.0, 12.4, 12.7, 13.5, 12.1, 13.1, 13.7

برای به دست آوردن میانگین ژئومتریک (GM) از روش زیر استفاده می شود:

$$GM = \sqrt[10]{12.5 \times 12.0 \times 13.1 \times 13.0 \times 12.4 \times 12.7 \times 13.5 \times 12.1 \times 13.1 \times 13.7} = 12.79$$

شرکت های سازنده کیت PT به طور معمول دو ISI مختلف برای معرف PT در بروشور خود قرار می دهند:

#### ۱- Generic ISI

#### ۲- Instrument / Reagent specific ISI

ISI ژنریک برای تمام روش های کار یا کوآگولومتریایی که نقطه پایان آزمایش دارای اصول یکسان باشد کاربرد دارد. در حالیکه استفاده از ISI اختصاصی نیاز به دستگاه خاص خود دارد و معرف/دستگاه لازم و ملزوم یکدیگرند. در مطالعات مختلف نشان داده شده است که دقت و صحت INR وقتی که از Instrument / Reagent specific ISI استفاده می شود، افزایش می یابد.

چنانچه تجهیزات آزمایشگاهی (کوآگولومتر) برای معرف PT اختصاصی نباشد و از Generic ISI استفاده شود، باید نخست ISI را با توجه به شرایط آزمایشگاهی و نوع تجهیزات مورد تایید قرار داد.

#### شیوه تایید ISI (ISI verification)

برای این منظور نیاز به پلاسمای تایید شده Certified plasma می باشد. این نوع پلاسمای دارای INR تعریف



شده از طرف WHO یا آزمایشگاه های مرجع می باشند. حداقل به سه عدد Certified plasma که دارای طیف INR بین 1.5 تا 4.5 باشند نیاز است. نمونه های پلاسما از افرادی که روی درمان پایدار با وارفارین هستند، تهیه می شود و به صورت لیوفیلیزه و یا منجمد در دسترس می باشد. برای انجام این کار با استفاده از کیت مورد نظر بر روی هر سه پلاسمای تایید شده در سه روز کاری و به صورت دوتایی تست PT انجام می دهیم و مقدار INR هر پلاسما را با توجه به میانگین ژئومتریک و Generic ISI محاسبه می کنیم. چنانچه میانگین INR به دست آمده با INR پلاسماهای تایید شده بیشتر از  $\pm 15\%$  تفاوت نداشته باشد ISI ژنریک درج شده در کیت مورد تایید می باشد.

### مثال اول:

محاسبه INR پلاسماهای تایید شده در سه روز کاری به صورت دوبل در آزمایشگاه توجه داشته باشید که INR پلاسماهای تایید شده 1.5, 3, 4 بوده است.

| پلاسمای با INR مشخص       |           | آزمایش PT در سه روز متوالی |      |
|---------------------------|-----------|----------------------------|------|
| 4.00                      | 3.00      | 1.50                       |      |
| روز اول                   | بار اول   | 1.52                       | 3.98 |
|                           | بار دوم   | 1.51                       | 3.81 |
| روز دوم                   | بار اول   | 1.48                       | 3.91 |
|                           | بار دوم   | 1.50                       | 3.92 |
| روز سوم                   | بار اول   | 1.49                       | 3.89 |
|                           | بار دوم   | 1.48                       | 3.87 |
| میانگین                   |           | 1.50                       | 3.90 |
| حداقل قابل قبول (- 15 %)  |           | 1.28                       | 3.40 |
| حداکثر قابل قبول (+ 15 %) |           | 1.73                       | 4.60 |
| قابل قبول                 | قابل قبول | قابل قبول                  |      |

در مثال بالا میانگین نتایج INR به دست آورده شده با استفاده از کیت مورد نظر و ISI درج شده در کیت، بر روی پلاسماهای تایید شده در محدوده  $\pm 15\%$  مقدار مشخص شده می باشد، بنابراین Generic ISI قید شده در بروشور کیت قابل استفاده برای کوآگولومتر مورد استفاده در آزمایشگاه می باشد.

### مثال دوم:

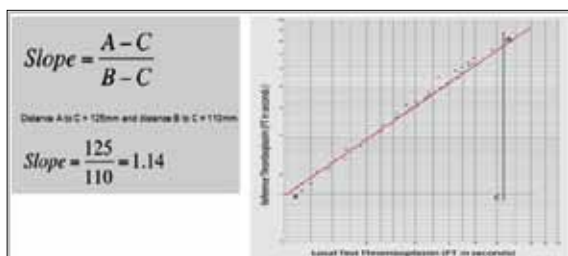
محاسبه INR پلاسماهای تایید شده در سه روز کاری به صورت دوبل در آزمایشگاه توجه داشته باشید که INR پلاسماهای تایید شده 1.5, 3, 4 بوده است.

| پلاسمای با INR مشخص       |           | آزمایش PT در سه روز متوالی |      |
|---------------------------|-----------|----------------------------|------|
| 4.00                      | 3.00      | 1.50                       |      |
| روز اول                   | بار اول   | 1.55                       | 4.88 |
|                           | بار دوم   | 1.52                       | 5.21 |
| روز دوم                   | بار اول   | 1.49                       | 4.68 |
|                           | بار دوم   | 1.50                       | 4.77 |
| روز سوم                   | بار اول   | 1.51                       | 4.65 |
|                           | بار دوم   | 1.52                       | 5.00 |
| میانگین                   |           | 1.52                       | 4.87 |
| حداقل قابل قبول (- 15 %)  |           | 1.28                       | 3.40 |
| حداکثر قابل قبول (+ 15 %) |           | 1.73                       | 4.60 |
| قابل قبول                 | قابل قبول | قابل قبول                  |      |

در مثال فوق نتیجه PT با استفاده از تجهیزات آزمایشگاه بر روی پلاسمای تایید شده با  $INR=4$  خارج از محدوده  $\pm 15\%$  است و از این رو نیاز به کالیبراسیون در آزمایشگاه (Local calibration) می باشد. برای این کار از دو روش استفاده می شود:

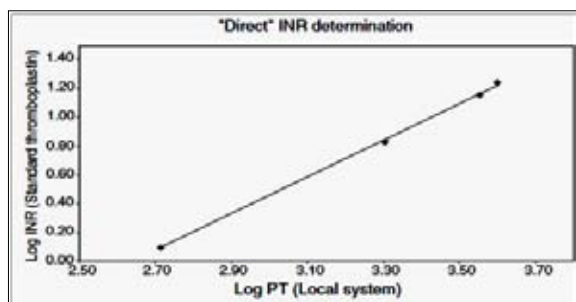
۱- شیوه به دست آوردن ISI در آزمایشگاه (Local ISI)  
برای انجام این کار از چند پلاسمای تایید شده با نتیجه مشخص PT که با معرف استاندارد مرجع انجام شده است، استفاده می شود. آزمایش PT مربوط به هر پلاسما به صورت دوبل با معرف مورد استفاده در آزمایشگاه به دست آورده می شود و نتایج بر روی کاغذ لگاریتمی برده می شود. بدین مفهوم که لگاریتم نتایج PT پلاسمای تایید شده روی محور X و لگاریتم نتایج PT آزمایشگاه روی محور Y برده می شود. شیب (Slope) نمودار رسم شده برابر با مقدار ISI معرف مورد استفاده است. روش کار همانند روش کار در روش Verification است به این معنا که PT پلاسمای تایید شده را در ۳ روز کاری مختلف و در هر روز به صورت دوبل انجام می دهیم.





## ۲- رسم نمودار خطی کالیبراسیون INR

این روش مستقل از مقدار ISI و MNPT است. برای انجام این روش یک نمودار خطی رسم می کنیم به طوری که لگاریتم مقادیر PT مربوط به پلاسمای تایید شده که به روش مورد استفاده در آزمایشگاه به دست آمده، بر روی محور X و لگاریتم INR مربوط به پلاسماهای تایید شده که توسط شرکت سازنده مشخص شده است، بر روی محور Y، نشان داده شود. مناسب ترین خطی که نقاط را در برگیرد رسم کرده و به عنوان خط کالیبراسیون در نظر گرفته می شود به این مفهوم که لگاریتم PT بیمار را روی محور X برده و مقدار INR را مستقیماً از روی محور Y به دست می آوریم.



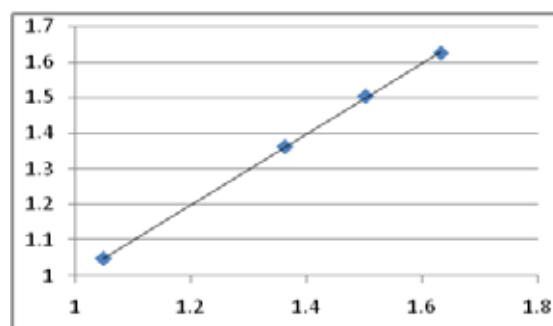
مطالعات مختلف نشان داده است که استفاده از هر کدام از این دو روش به طور قابل توجهی دقت اندازه گیری INR را افزایش می دهد.

## مثال سوم:

شیوه به دست آوردن ISI در آزمایشگاه

|         |         | پلاسمای با مقدار PT مشخص |      |      |      |
|---------|---------|--------------------------|------|------|------|
|         |         | 11.2                     | 23.1 | 31.9 | 42.8 |
| روز اول | بار اول | 11.3                     | 23.2 | 32.4 | 43.5 |
|         | بار دوم | 11.2                     | 23.5 | 31.4 | 41.0 |
| روز دوم | بار اول | 11.1                     | 22.8 | 32.1 | 40.2 |
|         | بار دوم | 11.1                     | 23.1 | 31.0 | 42.6 |
| روز سوم | بار اول | 11.2                     | 22.6 | 32.4 | 43.8 |
|         | بار دوم | 11.3                     | 23.0 | 31.4 | 41.8 |
| میانگین |         | 11.2                     | 23.0 | 31.8 | 42.2 |

پس از به دست آوردن مقادیر میانگین از آن لگاریتم گرفته و با قرار دادن در مقابل لگاریتم نتایج PT که از قبل مشخص شده است، نمودار رسم می کنیم.



$$ISI (Local) = b \times ISI (Reference)$$

در فرمول فوق b برابر با شیب خط

(Orthogonal regression line) می باشد.

برای مثال با توجه به شکل زیر چنانچه ISI رفرانس برابر با 1.1 باشد مقدار ISI برابر است با  $1.1 \times 1.14 = 1.25$

## References

- 1- A.M.H.P. Van Den Besselaar and et al. Guidelines on preparation, certification, and use of certified plasmas for ISI calibration and INR determination. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2004; 2: 1946-1953.
- 2- WWW. Practical haemostasis.com . ISI verification.
- 3- Richard A. Marlar, Jana N. Gausmen. Do you report an accurate International Normalized Ratio? *Lab Med*. 2011; 42(3): 176-181.
- 4- CLSI protocols for prothrombin time. 2005.