تعیین شاخص حساسیت بین المللی کیت های آزمایش PT (ISI verification) 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

• 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 می‌دانید که ISI درج شده در کیت بایستی برای آزمایشگاه با توجه به روش آزمایش مورد تایید و کالیبره قرار گیرد؟ آیا می‌دانید 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 (فاکتورII) 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 سیتراته فاقد پلاکت، اندازه گیری می‌شود.

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 نوترکیب 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 معمولا 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.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2024-03-28]

ایـن اختلاف در حساسـیت بـه عنوان اندکس حساسـیت (Sensitivity Index) شـناخته مـی شـود. معرف های ترومبوپلاستین های سـنتز شده توسط شرکت های مختلف دارای اندکس حساسیت بین المللی یا ISI (International Sensitivity Index) متفـاوت هسـتند. ایـن اندکـس از طریق مقایسـه ترومبوپلاسـتین مورد نظر با ترومبوپلاستین مرجع سـازمان بهداشـت جهانی (WHO) کـه با نوآوری DNA تهیـه شـده و دارای ISI برابـر بـا یک می باشـد، به دست می‌آید.

اندکس حساسیت بین المللی به حساسیت معرف PT در کمبود فاکتورهای وابسـته به ویتامین K در مسـیر خارجی اشـاره می کند و مقدار آن از عدد یک تا ۳ متغیر اسـت. هر چـه مقدار عـددی ISI به یک نزدیک شـود، بیانگر معرف بسـیار حسـاس و چنان چه به عدد ۳ نزدیک شـود، بیانگر کاهش حساسیت آن در طولانی کردن آزمایش PT در کمبود فاکتورهای وابسته به ویتامین K است.

به منظور یکسـان سـازی نتایـج آزمایش هـای PT در آزمایشـگاه های مختلف و حذف تداخل اختلاف حساسیت معرف های مختلف، از نسـبت همسـو شـده بیـن المللی یا INR (International Normalized Ratio) استفاده می شود. مقدار نسـبت همسو شده بین المللی برابر است با نسبت PT بیمار به PT طبیعی (Mean Normal PT or MNPT) به توان مقدار ISI.

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

محاسـبه مقدار INR به شـیوه 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 می‌آید و غالبا از میانگین جئومتریک استفاده نمی شود.

۲- مقدار واحد ISI که توسـط شـرکت های سـازنده به معرف ها داده می شـود، بر اساس روش استاندارد WHO است نه بر اساس روش انجام آزمایش PT در آزمایشگاه‌های مختلف و با اسـتفاده از تجهیزات مربوط به خود، این عوامل مـی توانند به عنوان منبع خطا در گزارش نتایج INR تاثیر داشته باشد.

مقـدار PT کنتـرل از میانگیـن PT مربوط بـه ۲۰ تا ۴۰ پلاسـمای فرد نرمال به دست می آید. افراد شرکت کننده در نمونه گیری کنترل بایسـتی از لحاظ سلامتی شرایط مناسبی داشـته باشـند و از چند سـاعت قبل ورزش سـنگین انجام نداده باشـند. خانم های بـاردار و زنانی که قرص های ضد بارداری اسـتفاده می کنند نباید در بین این افراد وجود داشته باشند. برای به دسـت آوردن PT طبیعی بایستی از میانگین ژئومتریک (Geometric mean) استفاده کرد نه از روش میانگیـن حسـابی (Arithmetic mean) زیـرا مقدار به دسـت آمده از میانگین ژئومتریک به میانگین واقعی بسـیار نزدیکتر اسـت. 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:

$$GM = \sqrt[9]{12.5 \times 12.0 \times 13.1 \times 13.0 \times 12.4 \times 12.7 \times 13.5 \times 12.1 \times 13.1 \times 13.7} = 12.79$$

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 ژنریـک برای تمام روش های کار یا کوآگولومترهایی کـه نقطه پایان آزمایش دارای اصول یکسـان باشـد کاربرد دارد. در حالیکـه اسـتفاده ازISI اختصاصی نیاز به دسـتگاه خاص خود دارد و معرف/دسـتگاه لازم و ملزوم یکدیگرند. در مطالعات مختلف نشان داده شده است که دقت و صحت INR وقتـی کـه از Instrument / Reagent specifi c ISI استفاده می شود، افزایش می یابد.

چنانچه تجهیزات آزمایشگاهی (کوآگولومتر) برای معرف PT اختصاصی نباشـد و از Generic ISI اسـتفاده شـود، باید نخسـت ISI را با توجه به شـرایط آزمایشگاهی و نوع تجهیزات مورد تایید قرار داد.

شیوه تایید ISI (ISI verification)

برای این منظور نیاز به پلاسـمای تایید شـده Certified plasma می باشـد. این نوع پلاسماها دارای INR تعریف

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2024-03-28]

شـده از طرف WHO یا آزمایشـگاه های مرجع می باشند. حداقل به سـه عـدد 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 می‌شود و به صورت لیوفیلیزه و یا منجمد در دسترس می باشد.

برای انجام این کار با اسـتفاده از کیت مورد نظر بر روی هر سـه پلاسمای تایید شـده 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 محاسـبه می کنیـم. چنانچه میانگین INR به دسـت آمـده با INR پلاسـماهای تایید شـده بیشـتر از ± 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		
3.98	3.04	1.52	بار اول	روز اول
3.81	3.12	1.51	بار دوم	
3.91	3.08	1.48	بار اول	روز دوم
3.92	3.11	1.50	بار دوم	
3.89	3.09	1.49	بار اول	روز سوم
3.87	3.14	1.48	بار دوم	
3.90	3.10	1.50	میانگین	
3.40	2.55	1.28	حداقل قابل قبول (- 15 %)	
4.60	3.45	1.73	حداکثر قابل قبول(+15 %)	
قابل قبول	قابل قبول	قابل قبول		

در مثال بالا میانگین نتایج INR به دسـت آورده شـده با اسـتفاده از کیـت مورد نظـر و ISI درج شـده در کیت، بر روی پلاسـماهای تایید شـده در محـدوده 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		
4.88	3.24	1.55	بار اول	روز اول
5.21	3.12	1.52	بار دوم	
4.68	3.28	1.49	بار اول	روز دوم
4.77	3.17	1.50	بار دوم	
4.65	3.40	1.51	بار اول	روز سوم
5.00	3.18	1.52	بار دوم	
4.87	3.23	1.52	میانگین	
3.40	2.55	1.28	حداقل قابل قبول (- 15 %)	
4.60	3.45	1.73	حداکثر قابل قبول(+ 15 %)	
غیرقابل قبول	قابل قبول	قابل قبول		

در مثال فوق نتیجه PT با اسـتفاده از تجهیزات آزمایشگاه بر روی پلاسـمای تایید شده با INR=4 خارج از محدوده 15 %± است و از این رو نیاز به کالیبراسیون در آزمایشگاه (Local calibration) مـی باشـد. برای ایـن 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 اسـتاندارد مرجع انجام شـده اسـت، استفاده می‌شـود. آزمایش PT مربوط به هر پلاسما به صورت دوبل با معرف مورد استفاده در آزمایشگاه به دست آورده می‌شود و نتایج بر روی کاغذ لگاریتمی برده می شـود. بدین مفهوم که لگاریتم نتایج PT پلاسمای تایید شـده روی محور X و لگاریتم نتایج PT آزمایشـگاه روی محور Y برده می شـود. شیب (Slope) نمودار رسـم شده برابر با مقدار ISI معرف مورد استفاده است. روش کار همانند روش کار در روش Verification اسـت به این معنا که PT پلاسمای تایید شده را در ۳ روز کاری مختلف و در هر روز به صورت دوبل انجام می دهیم.

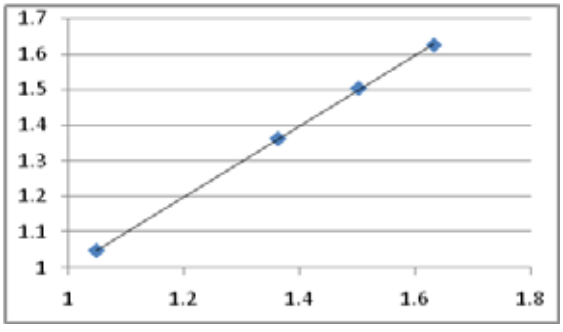
[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2024-03-28]

مثال سوم:

شیوه به دست آوردن ISI در آزمایشگاه

		پلاسما 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

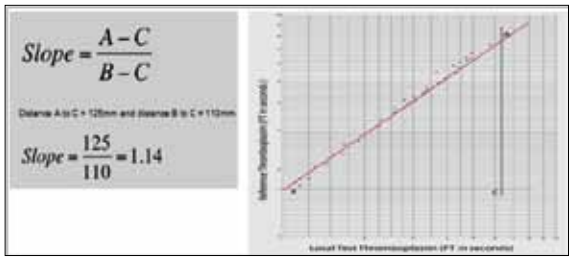
پس از به دست آوردن مقادیر میانگین از آن لگاریتم گرفته و با قرار دادن در مقابل لگاریتم نتایج PT که از قبل مشخص شده است، نمودار رسم می کنیم.



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

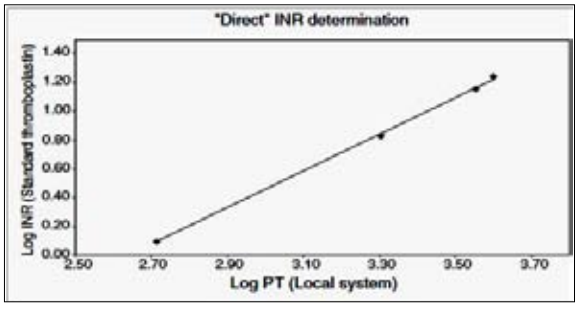
در فرمول فوق b برابر با شیب خط (Orthogonal regression line) می باشد.

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



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 مستقیما 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.

References

1- A.M.H.P. Van Den Besselaar and et al. Guidlines 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.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2024-03-28]