

## بررسی تأثیر تغییرات غلظت سیترات بر روی آزمایش زمان پروترومبین و وابستگی آن به زمان

دکتر عبدالجلال مرجانی\* - دکتر علیرضا احمدی<sup>▲</sup>

دکتر آزادرضا منصوریان<sup>•</sup> - خدابدی کلوی<sup>€</sup> - دکتر اختر سیفی<sup>▼</sup>

مطالعه حاضر جهت بررسی تغییرات نسبت سیترات به خون بر روی آزمایش زمان پروترومبین و وابستگی آن به زمان (در زمان صفر و بعد از ۵ ساعت) طراحی شده است. از ۵۰ فرد سالم (مذکر) نمونه‌های خون بطور تصادفی ساده و به روش آسان تهیه شد. نمونه‌هایی با نسبت سیترات به خون در غلظت‌های ۰/۷/۲۱/۰/۸/۱۱/۹ و ۰/۳۱/۰/۰/۴۱/۶ میلی‌لیتر تهیه شد. از نمونه‌های فوق، آزمایش زمان پروترومبین در زمان صفر و ۵ ساعت بعد انجام گردید و نتایج غلظت‌های مختلف با همدیگر مقایسه شد. بین آزمایش‌های زمان پروترومبین در غلظت‌های ذکر شده در زمان صفر رابطه معنی‌داری مشاهده شد. مقایسه آزمایش‌های زمان پروترومبین در زمان صفر و ۵ ساعت بعد در غلظت‌های مذکور رابطه معنی‌داری مشاهده نگردید. در نهایت، توجه به مدت زمان تهیه و حمل نمونه‌ها و وابستگی این آزمایش به زمان برای دستیابی به نتایج قابل قبول و جلوگیری از خطاها مطرح می‌شود؛ نگهداری نمونه‌ها تا ۵ ساعت در حرارت آزمایشگاه، تغییری در نتایج آزمایش ایجاد نکرده و آزمایش تا ۵ ساعت مدت انتظار قابل انجام می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: نسبت سیترات به خون؛ زمان پروترومبین؛ وابستگی زمان پروترومبین به زمان.

\* استادیار گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی گرگان

▲ مدرس گروه علوم آزمایشگاهی آموزشکده پیراپزشکی گرگان

• استادیار گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی گرگان

€ مربی علوم آزمایشگاهی (خون شناسی) آموزشکده پیراپزشکی گرگان

▼ مربی گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی گرگان

## مقدمه

زمان پروترومبین آزمایش تجسسی جهت بررسی نحوه عملکرد فاکتورهای انعقادی سیستم‌های خارجی و مشترک است که با افزودن مقادیر زیاد فاکتور ۳ (ترومبوپلاستین بافتی) به پلاسمای سیتراته در مجاورت یون کلسیم آغاز می‌شود. این آزمایش در افرادی که با داروهای ضد انعقاد خوراکی درمان می‌شوند بصورت روتین انجام می‌شود. عواملی مانند لوازم آزمایشگاهی، حمل نمونه، گرما و تغییرات نسبت غلظت سیترات به خون می‌توانند بر نتایج این آزمایش تأثیر بگذارند. تحقیقات انجام شده نشان داده است که در صورت تغییر غلظت سیترات به خون در نتایج زمان پروترومبین، افزایش کاذبی ملاحظه می‌شود (۲،۱). در مراکز خونگیری و تهیه نمونه، نسبت سیترات به خون از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. گاهی اوقات ضمن تهیه نمونه نتایج اشتباه و عدم تطابق با ملاحظات کلینیکی مشاهده می‌شود. کاربرد اصلی آزمایش زمان پروترومبین در تنظیم دوز دارویی و پیگیری بیماران تحت درمان با مواد ضد انعقاد خوراکی است. هپارین و ضد انعقادهای جاری نیز در طولانی شدن زمان مزبور دخالت خواهند داشت.

هدف از این مطالعه بررسی نتایج تغییرات نسبت سیترات به خون بر روی آزمایش زمان پروترومبین و وابستگی آن به زمان می‌باشد بطوری که با تغییر غلظت سیترات، تغییرات آزمایش زمان پروترومبین و ارتباط آن با زمان بررسی خواهد شد.

## روش پژوهش

مطالعه حاضر از نوع تحلیلی می‌باشد. آزمایش زمان پروترومبین در آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده پزشکی گرگان انجام گرفته است. غلظت‌های مختلف ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ میلی لیتر سیترات (۳/۸ درصد) در لوله‌های آزمایش ریخته شده و از ۵۰ فرد سالم (مذکر) نمونه خون، بطور تصادفی ساده و به روش آسان گرفته شده است. هر کدام از لوله‌های سیترات‌دار فوق با خون تازه به حجم نهایی ۲ میلی لیتر (به ترتیب ۱/۹، ۱/۸، ۱/۷ و ۱/۶ میلی لیتر خون) رسانده شد.

نمونه‌های خون سیتراته را سریعاً در حرارت آزمایشگاه در دور ۴۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریژ کرده و از پلاسمای نمونه‌ها آزمایش زمان پروترومبین به عنوان زمان صفر انجام شد. نمونه‌های سانتیفریژ شده بدون آنکه پلاسمای گلوبول جدا شود، به مدت ۵ ساعت در حرارت آزمایشگاه نگهداری و بعد از این مدت، آزمایش زمان پروترومبین انجام می‌شد. آزمایش زمان پروترومبین با کیت آزمایشگاهی بیومریو<sup>۱</sup> انجام شد. اطلاعات جمع‌آوری شده توسط نرم‌افزار آماری SPSS و با آزمون‌های آماری ویلکاکسون و فریدمن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

## یافته‌ها

آزمایش زمان پروترومبین انجام شده بر روی نمونه‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ (میلی لیتر) سیتراته در زمان صفر دارای زمان پروترومبین (به ترتیب ۱۱/۸±۱/۱۷، ۱۲/۹±۱/۳، ۲۰/۹±۱/۴، ۵۶/۸±۲/۸۶ ثانیه و پس از مدت ۵ ساعت، نمونه‌های فوق به ترتیب دارای زمان پروترومبین ۱۱/۴±۰/۹۲، ۱۲/۴±۱/۰۲، ۲۰/۳±۱/۰۸، ۴۹/۵±۲/۸۶ ثانیه بودند (جدول شماره ۱).

جدول ۱ : مقایسه نتایج آزمایش زمان پروترومبین در غلظت‌های مختلف سیترات در زمان صفر و ۵ ساعت بعد.

ارزش P	$\frac{0/4}{1/6}$	$\frac{0/3}{1/7}$	$\frac{0/2}{1/8}$	$\frac{0/1}{1/9}$ ×	تعداد نمونه	زمان
< ۰/۰۱	$56/8 \pm 2/86$	$20/9 \pm 1/4$	$12/9 \pm 1/3$	$11/8 \pm 1/17$	۵۰	صفر
< ۰/۰۱	$49/5 \pm 2/86$	$20/3 \pm 1/08$	$12/4 \pm 1/02$	$11/4 \pm 0/93$	۵۰	۵ ساعت

× نسبت‌های ۰/۱ الی ۰/۴ غلظت‌های سیترات به خون (۱/۹ الی ۱/۶) بر حسب میلی لیتر

×× آزمایش‌های زمان پروترومبین بر حسب ثانیه

مقایسه مقادیر زمان پروترومبین در زمان صفر در غلظت‌های مختلف سیترات نشان می‌دهد که با افزایش غلظت سیترات، زمان پروترومبین افزایش می‌یابد و رابطه معنی‌داری در تمامی غلظت‌ها ( $P < 0/01$ ) مشاهده می‌شود. همچنین از مقایسه زمان پروترومبین در این غلظت‌ها در طول مدت ۵ ساعت بعد، رابطه معنی‌داری مشاهده نشد ( $P < 0/05$ ) و فقط در مدت زمان پروترومبین، کاهش نسبی دیده شده و این کاهش بین ۰/۴ الی ۰/۷ ثانیه متغیر بوده است. در غلظت ۰/۴ میلی لیتر سیترات، بین زمان صفر و ۵ ساعت بعد زمان پروترومبین، کاهش زمان قابل ملاحظه‌ای مشاهده شد که مقادیر آن (در هر دو زمان) با یافته‌های کلینیکی مطابقت نداشته است.

## بحث

برای نتایج صحیح و قابل قبول تست‌های آزمایشگاهی فاکتورهایی که روی آزمایش‌ها می‌توانند تأثیر بگذارند باید شناسایی و تحت کنترل قرار گیرند. از اولتین موارد در بوجود آمدن نتایج کاذب می‌توان تهیه و حمل و نگهداری نمونه‌ها را نام برد. در این مطالعه، تأثیر تغییرات نسبت سیترات به خون بر آزمایش زمان پروترومبین در نمونه‌های خون افراد سالم (مذکر) بررسی شده است. در اکثر کشورها داروهایی مثل وارفارین، دیکومارول و کومارین بعنوان داروهای ضد انعقاد خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این داروها در متابولیسم پروترومبین اختلال ایجاد می‌کند. این مواد در افراد مبتلا به ناراحتی‌های قلبی که تحت عمل جراحی قرار گرفته‌اند، مصرف می‌شود.

در اکثر کشورها از وارفارین بعنوان ضد انعقاد خوراکی استفاده می‌شود. یکی از مهم‌ترین مضرات این دارو محدودیت درمانی آن می‌باشد. به همین دلیل جهت جلوگیری از خونریزی‌ها در بعضی از بیماری‌ها مثل ایسکمی و بعضی از خونریزی‌های مرتبط، دوز دارو دائماً باید تحت کنترل باشد. مطالعات انجام شده نشان داده است که دوز بالای وارفارین در افراد پیر، خونریزی داخل جمجمه‌ای را باعث می‌شود که از اولتین ریسک فاکتورها می‌باشد (۳). به همین دلیل، دوز ضد انعقاد خوراکی با انجام آزمایش زمان پروترومبین تحت کنترل قرار می‌گیرد.

در مطالعه حاضر، با تغییرات نسبت سیترات به خون، تغییرات زمانی آزمایش زمان پروترومبین بررسی شده است. نتایج بدست آمده نشان داد که بین نمونه‌های سیترات با نسبت ۰/۱ و ۰/۲ از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود داشته و از لحاظ کلینیکی، نتایج آزمایش زمان پروترومبین در محدوده تغییرات قابل قبول می‌باشد (۴).

افزایش غلظت سیترات به مقدار ۰/۳ میلی لیتر باعث عدم تطابق نتایج آزمایش زمان پروترومبین از لحاظ کلینیکی و آزمایشگاهی می‌شود بطوری که مدت زمان پروترومبین به خارج از محدوده تغییرات قابل قبول افزایش می‌یابد ( $P < 0/01$ ).

زمانی که غلظت سیترات به  $0/4$  میلی لیتر افزایش می یابد با وجود رابطه معنی دار ( $P < 0/01$ )، مقادیر زمان پروترومبین، یک عدم تطابقی را از لحاظ کلینیکی نشان می دهد.

طبق پیشنهاد کمیته بین المللی استانداردهای آزمایشگاه بالینی<sup>۲</sup> نمونه تهیه شده با نسبت  $0/2$  میلی لیتر سیترات و  $0/8$  میلی لیتر خون در افراد سالم، میانگین زمان پروترومبین (در این مطالعه)  $12/9 \pm 1/3$  ثانیه می باشد و در صورت افزایش غلظت سیترات از  $0/2$  به  $0/3$  میلی لیتر، این میانگین تا  $20/9 \pm 1/4$  ثانیه افزایش می یابد.

نتایج بدست آمده در این مطالعه با نتایج اینگرام، هیلز و دانکن<sup>۳</sup> و همکارانش همخوانی دارد ( $6,5$ ) بطوری که با افزایش غلظت سیترات، زمان پروترومبین طولانی تر می شود. همچنین مطالعه حاضر با نتایج دنیلسون<sup>۴</sup> و همکارانش از لحاظ افزایش غلظت سیترات و تأثیر آن بر روی زمان پروترومبین مطابقت نشان داده است ( $7$ ). چنین نتایجی با خطای غیرقابل قبول از لحاظ کلینیکی برای یک پزشک نتیجه ای غیرمنتظره است که می تواند پزشک را در تفسیر و تشخیص بیماری و یا در تصمیم گیری برای جراحی بیمار گمراه نماید. در چنین موقعیتی تکرار آزمایش زمان پروترومبین می تواند کمک کننده باشد. نتایج حاصل نشان داد که خطای آزمایش زمان پروترومبین در افراد سالم نیز از اهمیت بسیار مهمی برخوردار است. چه بسا این مقادیر در افرادی که داروی ضد انعقاد خوراکی مصرف می کنند می تواند بطور خیلی جدی افزایش یابد.

در ادامه این مطالعه بر روی نمونه هایی که در زمان صفر آزمایش زمان پروترومبین انجام گرفته بود، جهت اندازه گیری زمان پروترومبین بعد از  $5$  ساعت استفاده شد و نتایج آزمایش زمان پروترومبین بین زمان صفر و  $5$  ساعت بعد مقایسه گردید. هدف از مطالعه حاضر این است که آیا نمونه های تهیه شده در آزمایشگاه بطور روزمره به علت تراکم کار آزمایشگاه، احتمال انجام نشدن بموقع آزمایشات می تواند روی نتایج آزمایش تأثیر بگذارد؟

نمونه های سانتریفوژ شده بدون جدا کردن پلاسما از گلبول در حرارت آزمایشگاه به مدت  $5$  ساعت نگهداری شده و پس از این مدت آزمایش زمان پروترومبین بر روی کلیه نمونه ها انجام گرفت. در بعضی نمونه ها کاهش کمی در زمان پروترومبین دیده شد. نتایج نشان داد که نگهداری نمونه ها به مدت  $5$  ساعت در حرارت آزمایشگاه بر روی نتایج آزمایش زمان پروترومبین تأثیر نداشته است ( $P > 0/05$ ).

تحقیقات انجام شده نشان داده است که تغییرات آزمایش زمان پروترومبین با نگهداری نمونه های خون سیترا ته تا  $6$  الی  $8$  ساعت در حرارت آزمایشگاه هیچگونه تغییری در زمان پروترومبین ایجاد نمی کند. راثو<sup>۵</sup> و همکارانش نمونه های خون سیترا ته را تا  $24$  ساعت نگهداری نموده و هیچگونه تغییری در زمان پروترومبین مشاهده نمودند ( $10,98$ ). طبق پیشنهاد کمیته بین المللی استانداردهای آزمایشگاه بالینی برای آزمایش زمان پروترومبین ( $11$ ) مدت انتظار جهت انجام آزمایش پس از نمونه گیری  $2$  ساعت اعلام شده است که با توجه به نتایج مطالعه حاضر و دیگر مطالعات انجام شده به کمیته بین المللی پیشنهاد می شود که در خصوص مدت انتظار جهت انجام آزمایش زمان پروترومبین، بازنگری جدیدی لحاظ نمایند.

در نهایت برای نتایج قابل قبول آزمایش زمان پروترومبین و جلوگیری از خطاها توجه به مدت زمان تهیه و حمل نمونه ها و وابستگی این آزمایش به زمان، توان نگهداری نمونه های خون سیترا ته تا  $5$  ساعت در حرارت آزمایشگاه تغییری در نتایج آزمایش ایجاد نکرده و آزمایش تا  $5$  ساعت مدت انتظار قابل انجام می باشد.

2 . NCCLS

3 . Ingram , Hills and Duncan

4 . Danielson

5 . Rao

**Abstract*****Study of the Effect of Different Citrate Concentrations on Prothrombin Time and its Dependence on Incubation Time***

This study is designed to examine the effects of different concentrations of citrate/blood ratio on prothrombin time and its dependence on incubation time at zero and after five hours. Blood samples were randomly taken from 50 male healthy subjects and were prepared for test at citrate/blood concentrations of 0.1/1.9, 0.2/1.8, 0.3/1.7, 0.4/1.6. ml. At two aforementioned times, prothrombin times were determined using different concentrations and the results were compared. We found a significant relationship between different prothrombin time of different concentration ratios at zero. Their comparison five hours after incubation time did not reveal any significant correlation. The findings indicated that there were no differences between the samples as for their incubation time. Therefore, we may conclude that the time needed for sample preparation, transportation, storage and incubation at room temperature were of no significance and caused no alteration in the prothrombin time.

**Key Words :** *Citrate/blood Ratio; Prothrombin Time; Time Dependence.*

**منابع**

1. Peterson P. Gottfried E.L. (1982) The effects of inaccurate blood sample volume on prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT). *Thromb. Haemost.* 47:101 - 103.
2. Pai S.H. Michalaros K, (1990). Effect of sample volume on coagulation tests. *Lab Med.* 21:371 - 373.
3. Hirsh J. (1991). Oral anticoagulant drugs. *N.Engl.J.Med.* 3g24:1865 - 1875.
4. Burtis CA, Asirwood ER. (1999). *Tietz textbook of clinical chemistry. Quality management* (Derleyen: Westgard JO, Klee GG). s.412,3ed: Philadelphia: WB Saunders company.
5. Ingram G.I.C, Hills M. (1976). The prothrombin time test: effect of varying citrate concentrations. *Thromb Haemost.* 36:230 - 239.
6. Duncan E.M. Casey C.R, Duncan B.M Lloyd J.V. (1994). Effect of trisodium citrate anticoagulant on calculation of the international nomalised ratio and international sensitivity index of thromboplastin. *Thromb Haemos.* 72: 84 - 88.
7. Danielson F.M. Davis K, Jones G, Benson J. (1997). Effect of citrate concentration in specimen collection tubes on the international normalised ratio. *Arch Pathol Lab Med.* 121: 956 - 959.
8. National committee for clinical laboratory standarts. Collection, transportation, and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of guidelines. Villanova Pa: National committee for clinical laboratory standarts, NCCLS document H21 - A2.
9. Koeple J.A. Rodgers J.L. Ollivier M.J. (1975). Pre - instrumental variables in coagulation testing. *Am J Clin Pathol.* 64: 591 - 596.
10. Neofotistos D, Oropeza M, TS"AO CH. (1998). Stability of plasma for add - on PT and APTT tests. *Am J Clin. Pathol.* 109 (6): 758 - 763.
11. Rao L.V. Okorodudu A.O. Petersen. J.R. Elghetany M.T. (2000). Stability of prothrombin time and activated partial thromboplastin time tests under different storage conditions. *Clin. Chim. Acta.* 300: 13-21.