آزمایشگاه مرکز پزشکی حضرت سیدالشهداء
اصفهان ، بزرگراه خیام کوی نهر فرشادی تلفن ۰۲۱۰ ۳۲۳۵
http://omid.mui.ac.ir/ Email : labomid@gmail.com

****

مهارت‌های آزمایشگاهی در تست های انعقادی

دکتر حبیب‌اله گل افشان

۱- در هنگام روبرو شدن با مشکلات زیر در آزمایش زمان پروترومبین (prothrombin time) یا آزمایش PTT(partial thromboplastin time) چه راهکاری وجود دارد؟

۱) نمونه خون بیشتر یا کمتر از حجم لازم تهیه شده است.
۲) نمونه خون همولیز و یا ژاندیس و یا هایپر لیپیدمی دارد.
۳) نمونه دارای ذرات ریز لخته است.
۴) پس از سانتریفوژ مشاهده می‌شود که هماتوکریت بیمار(حجم فشرده گلبول‌های قرمز) بیشتر از ۵۰ درصد است.
۵) نمونه خون در ضدانعقاد سیترات سدیم با غلظت ۳/۸٪ بجای ۳/۲ درصد تهیه شده است.

۲- برای تهیه پلاسما جهت آزمایش‌های انعقادی دور سانتریفوژ چه مقدار است؟ برای کدام آزمایش انعقادی سفارش می‌شود که پلاسمای جدا شده برای بار دوم سانتریفوژ شود؟

- گاهی در هنگام آزمایش PT یا PTT نخست لخته‌های ریز شبیه تار عنکبوت ظاهر می‌شود و پس از مدتی لخته کامل شکل می‌گیرد. دلیل این پدیده چیست؟
- نگهداری نمونه خون برای آزمایش PT و PTT چگونه است؟ چرا نگهداری پلاسما در ۴ درجه منجر به کوتاه شدن زمان PT می‌شود؟چرا برای پیگیری درمان با هپارین بایستی پلاسما ظرف یک ساعت برای آزمایشPTTاز خون جدا شود؟
- مفهوم INR چیست؟ ISI چیست؟ چرا در هر کیت PT دو نوع ISI ذکر می‌شود؟ کارخانه سازنده کیت چگونه ISI را بدست می‌آورد؟ آیا ممکن است ISI کیت برای دستگاه کوآگولومتر آزمایشگاه صادق نباشد؟
- آیا واحد INR فقط برای بیمارانی گزارش می‌شود که روی درمان با وارفارین هستند؟

۳- اگر میزان سیترات سدیم برای هماتوکریت تصحیح نشود چه تأثیری در آزمایش‌های PT یا PTT دارد؟ راستی چرا سیترات سدیم ۳/۲ درصد به عنوان ضد انعقاد انتخاب شده است؟ قبلاً ۳/۸٪ هم بلامانع بود.

- چنانچه آزمایش‌های PT یا PTT طولانی بود چگونه می‌توان پی به علت طولانی بودن آنها برد؟
- بازدارنده انعقادی چیست؟

****

- چگونه می‌توان بازدارنده را از کمبود فاکتور که هر دو موجب طولانی شدن آزمایش‌های انعقادی می‌شوند افتراق داد؟

۴- مردی ۶۰ ساله بدون میل به خونریزی و بدون سابقه اختلال انعقادی در خانواده جهت جراحی قلب در بخش بستری شده است، آزمایش‌های قبل از عمل بشرح زیر است.

PT= 13Sec ……..reference Range 11 – 13 Sec

PTT = >120 Sec……reference Range 30 – 35 Sec

Plat count = 350.000/ mm^3

شما در مشورت با پزشک جراح چه ایده‌های تشخیصی را ارائه می‌دهید؟

۵- آزمایش‌های انعقادی پسر بچه‌ای ۵ ساله قبل از جراحی بشرح زیر است.

PT= 12.0 Sec…….reference Range 11 – 13 Sec

PTT = 30.0 Sec……..reference Range 28 – 35 Sec

Plat = 400.000/ mm^3

Fibrinogen= 300 mg/dl

آیا با آزمایش‌های بالا می‌توان مطمئن بود که خونریزی بیمار را تهدید نمی‌کند؟ آیا نیاز به پرسش تاریخچه خونریزی با توجه به آزمایش‌های فوق وجود دارد؟

۶- خانمی مبتلا به COPD (بیمار انسداد مزمن ریوی) با هماتوکریت ۶۸٪ نیاز به عمل جراحی دارد. آزمایش‌های قبل از جراحی بشرح زیر است:

PT= 19.0 Sec……reference Range 11 – 13 Sec

PTT = 52.0 Sec……reference Range 30 – 35 Sec

BT = 5 min……reference Range 2-7min

****

بیمار سابقه مصرف داروهای ضدانقعادی و سابقه میل به خونریزی ندارد پیشنهاد و تفسیر شما چیست؟

۷ - برای یک بیمار مبتلا به هموفیلی A پزشک تقاضای آزمایش فوری جهت بازدارنده فاکتور ۸ نموده است، چگونه این آزمایش انجام می‌شود؟

۸- خانمی ۲۵ ساله مبتلا به خونریزی شدید بعد از زایمان شده است و تاریخچه خونریزی در این خانم و اعضای خانواده منفی است. نتایج آزمایش بشرح زیر است

PT= 14.0 Sec…… reference Range 11 – 13 Sec

PTT = 180 Sec……. reference Range 30 – 35 Sec

Plat count = 300.000/ mm^3

BT =4min……..reference Range 2-7min

برای این خانم تقاضای سنجش فاکتورهای انعقادی شده است و فاکتور ۸ کمتر از یک درصد گزارش شده است. چگونه ممکن است خانمی در این سن به شبه هموفیلی مبتلا گردد؟

۹- آزمایش PT بیماری ۱۳ ثانیه با کنترل ۱۲ ثانیه و PTT بیمار ۱۸۰ ثانیه (محدوده رفرانس ۳۵-۳۰ ثانیه است). آزمایش مخلوط هم حجم پلاسما بیمار با پلاسمای نرمال (1:1 mix) در زمان‌های صفر و دو ساعت از نگهداری مخلوط پلاسما در ۳۷ درجه بترتیب ۳۲ و ۴۰ ثانیه بوده است. تفسیر شما چیست؟

تفسیر

پاسخ به پرسش‌ها را در میان نکته‌های کلیدی بیابید.

****

نکته‌های کلیدی در آزمایش‌های انعقادی

آزمایش زمان پروترومبین

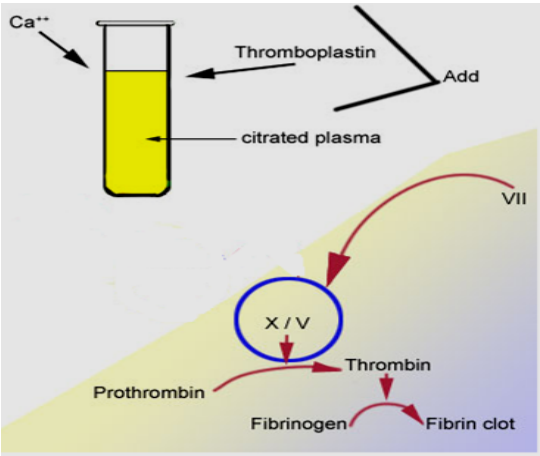
اساس آزمایش:

معرف PT که با نام‌های فاکتور بافتی یا ترومبوپلاستین بافتی نامیده می‌شود به طریقهٔ تکنولوژی DNA یا با تخلیص فاکتور بافتی تهیه می‌گردد و به صورت محلول فسفولیپوپروتئینی بافری شده با کلسیم کلراید ۰۲۵/ ۰مولار به صورت سوسپانسیون درمی‌آید. ارگان‌هایی مانند مغز و ریه و جفت سرشار از فاکتور بافتی هستند. مخلوط معرف PT با پلاسما، موجب فعال کردن فاکتور ۷ و ایجاد کمپلکس با آن می‌گردد. کمپلکس فاکتور ۷ با فاکتور بافتی، فاکتور ۱۰ را به ۱۰ فعال تبدیل می‌کند. فاکتور ۱۰ فعال در همراهی با کوفاکتور ۵ فعال موجب شکستن پروترومبین به آنزیم ترومبین می‌گردد. ترومبین با جدا کردن فیبرینوپپتیدهای A و B از مولکول فیبرینوژن آن را به مونومرهای فیبرین تبدیل می‌کند.

مونومرهای پلیمری شدهٔ فیبرین، شبکهٔ پلیمری فیبرین یا لخته را ایجاد می‌کنند. آزمایش PT به کاهش فاکتور ۷ بسیار حساس است و دارای حساسیت متوسط به کاهش فاکتورهای ۵ و۱۰ می‌باشد، آزمایش به کاهش شدید پروترومبین و فیبرینوژن نیز حساس است، ولی به کاهش فاکتورهای ۸ و ۹غیرحساس می‌باشد.

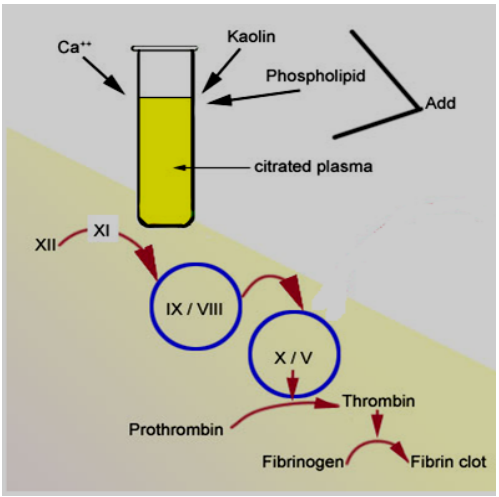
آزمایش PT، فاکتورهای انعقادی مسیر خارجی (۱۰ و ۷ و ۵ و ۲ و ۱) را ارزیابی می‌کند و گفتنی است که سه فاکتور از ۴ فاکتور وابسته به ویتامین K یعنی ۲ و ۷ و ۱۰ در این مسیر قرار دارند؛ از اینرو در پیگیری درمان با آنتاگونیست‌های ویتامین K مانند وارفارین که به عنوان داروی ضد انعقاد کاربردی گسترده دارد، آزمایش مناسبی است.

****



مسیر انعقادی آزمایش PT

- ✓ زمان PTT مدت لازم جهت تولید لخته فیبرینی با افزودن فسفولیپید (سفالین)، فعال کننده فاکتورهای تماسی (مانند کائولین، سیلیکا، الاژیک اسید، سلایت) و یون کلسیم به پلاسما در حرارت ۳۷ درجه می‌باشد.، تمام فاکتورهای انعقادی بجز ۷ و ۱۳ در مسیر انعقادی آزمایش PTT (مسیر داخلی یا intrinsic) شرکت دارند. از این رو نرمال شدن PT یا PTT کمبود فاکتور ۱۳ را کنار نمی‌گذارد.



مسیر داخلی انعقاد خون یک پدیده آزمایشگاهی است که با آزمایش
aPTT(activated partial thromboplastin time) یا زمان نسبی

****

(پارشیال) ترومبوپلاستین ارزیابی می‌شود. در این مسیر تمام فاکتورهای انعقادی به جز ۷و۱۳ شرکت دارند. مواد با شارژ منفی از قبیل کائولین، سلیت و الاژیک اسید باعث خود فعال سازی فاکتور ۱۲ انعقاد می‌گردند.

نکته‌های کلیدی

- ✓ ضد انعقاد مناسب برای آزمایش‌های PT و PTTسیترات سدیم ۳/۲ درصد است که برای این منظور ۳/۲ گرم از سیترات سدیم دوآبه در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر حل می‌شود.
- ✓ برای مطالعات انعقادی ۹ حجم خون به یک حجم سیترات سدیم اضافه می‌شود؛ برای مثال ۰/۲ سی‌سی سیترات سدیم و ۱/۸ سی‌سی خون و یا ۲/۷ سی‌سی خون با ۰/۳ سی‌سی سیترات سدیم مخلوط می‌شود. گفتنی است که قبلاً استفاده از سیترات سدیم ۳/۸٪ هم بلامانع بود ولی استانداردها هم‌اکنون فقط ۳/۲ درصد را معیار قرار می‌دهد.

نسبت ۹ حجم خون به یک حجم سیترات برای هماتوکریت‌های زیر ۵۵٪ است و چنانچه هماتوکریت بیماری بیشتر یا مساوی ۵۵ درصد باشد بایستی مقدار سیترات را با توجه به هماتوکریت تنظیم کرد.

حجم سیترات برای یک سی‌سی خون = 100 – HCT/595 – HCT

مثال:برای تهیه ۲ سی‌سی خون برای آزمایش‌های PT و PTT بیماری با هماتوکریت ۷۰٪ نیاز به ۰/۱ سی‌سی سیترات است که با خون به حجم ۲ سی‌سی رسانیده می‌شود.

سیترات لازم برای یک سی‌سی = ۱۰۰ – ۷۰ / ۵۹۵ -۷۰ = ۰/۰۵

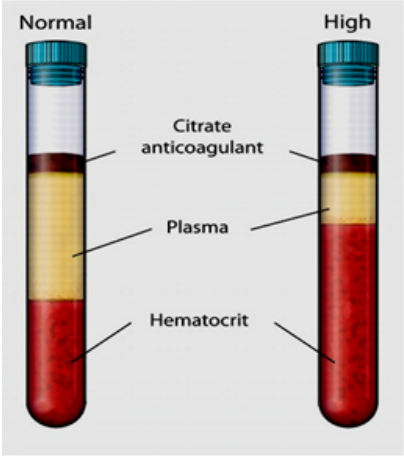
حجم سیترات برای تهیه ۲ سی‌سی = ۰/۰۵ ×۲ = ۰/۱

راستی اگر به جای ۰/۱ سی‌سی از ۰/۲ سی‌سی سیترات سدیمو ۱/۸ سی‌سی خون استفاده می‌شد چه اتفاقی رخ می‌داد؟

با توجه به اینکه حجم پلاسما در فرد پرخون کم است، ۰/۲ سی‌سی سیترات دراین حجم کم از پلاسما توانایی داردکه با پیوند بهیون کلسیم که در هنگام انجام آزمایش اضافه می‌شود آن را از حالت یونیزه خارج کرده و کلسیم کافی در اختیار فاکتورهای انعقادی قرار نگیرد و از این رو منجر به طولانی شدن کاذب PT یا PTTشود.

****

بدون داشتن برگه CBC چگونه پی به بالا بودن هماتوکریت برده و اقدام به تنظیم حجم سیترات شود؟



سیترات اضافی در حجم کم پلاسمای بیمار پرخون، با پیوند به کلسیم اضافه شدهدر هنگام آزمایش موجب طولانی شدن کاذب آزمایش می‌شود

هنگامی که نمونه خون سانتریفوژ شد، همین که مشاهده کردید گلبول‌های قرمز فشرده شده بیشتر از ۵۰٪ از حجم را اشغال می‌کنند و جواب PTیا PTTبیمار طولانی است، بایستی از ارسال جواب آزمایش خودداری کرده و آزمایش را دوباره با تنظیم سیترات تکرار کرد.

گاهی نمونه خون برای آزمایش PT یا PTT کمتر از حد استاندارد است آیا چنین نمونه‌هایی می‌توانند مورد پذیرش قرار گیرند؟

چنانچه حجم نمونهخون تا ۹۰٪ حجم استاندارد است می‌توان مورد پذیرش قرار داد؛ برای مثال برای حجم ۲ سی‌سی خون تغییرات۰/۲± سی‌سی بلامانع است.

چرا استفاده از سیترات سدیم ۳/۸٪ ممنوع شده است؟

چون غلظت زیاد سیترات به ویژه برای نمونه‌های با حجم کم یا نمونه با هماتوکریت بیشتر از نرمال موجب برداشت کلسیم از معرف شده که نتیجه آن طولانی شدن کاذب PT و یا PTTاست.

آیا لزومی به افزایش حجم سیترات برای نمونه‌های با کاهش هماتوکریت است؟

****

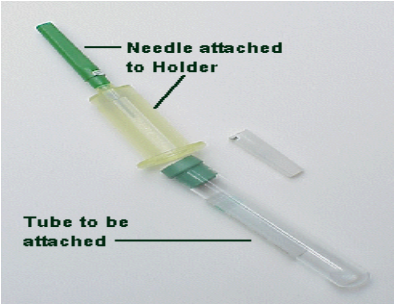
لزومی به افزایش حجم سیترات ندارد و می‌توان از نسبت ۹ به یک استفاده کرد.

گاهی نمونه‌های خون برای آزمایش های PTTو PT همولیز، زرد، چرب و شیری رنگ است. در این موارد چه باید کرد؟

چنانچه همولیز چشمگیر باشد نمونه جدید درخواست کنید. انجام آزمایش PT و PTT روی نمونه‌های زرد و چرب با روش دستی و کوآگولومترهای مکانیکی بلامانع است ولی با آنالیزورهای فتواپتیک ایجاد خطا می‌کند.

- ✓ نمونه خون برای آزمایشات انعقادی بایستی با دور 1500 g برای ۱۰ تا ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردد و پلاسمای شفاف و فاقد پلاکت (کمتر از ۱۰۰۰۰ در میلیمتر مکعب) تهیه شود، از بکارگیری ترمز سانتریفوژ اجتناب کنید.
- ✓ پلاسمای منجمد را بایستی به سرعت در ۳۷ درجه آب کرد و دقت کنید تا بیشتر از ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه نگهداری نشود. آب کردن پلاسما درحرارت اتاق موجب رسوب کرایو شده و چنانچه خوب مخلوط و یکنواخت نشود موجب کاهش شدید فاکتورهای ۸ و فون ویلبراند و ۱۳ و فیبرینوژن می‌گردد.
- ✓ بهتر است نمونه‌های خون برای آزمایش PT و PTT در دمای اتاق نگهداری و تا ۴ ساعت انجام شود.گرچه نگهداری نمونه در لوله سربسته تا ۲۴ ساعت در حرارت ۲۴-۱۸ درجه برای PT و تا ۴ ساعت برای PTT بلامانع است. اگر آزمایش PTT به منظور پیگیری درمان با هپارین باشد بایستی آزمایش در یکساعت انجام شود و یا پلاسمای فاقدپلاکت را جدا ساخته و تا ۴ ساعت مورد آزمایش قرار داد. در غیر اینصورت رها شدن فاکتور ۴ پلاکتی از پلاکت‌ها موجب خنثی شدن هپارین موجود در پلاسما گشته و جواب صحیحی از PTT برای پیگیری بدست نمی‌دهد.
- ✓ آلوده شدن نمونه خون به ضدانعقاد EDTA و یا هپارین و یا ژل‌های ترومبین‌دار موجب طولانی شدن آزمایش‌های انعقادی می‌گردند و از اینرو لوله آزمایش مربوط به PT و PTT اولین لوله‌ای است که نمونه‌گیری می‌شود.

****



لوله آزمایش مربوط به PT و PTT اولین لوله‌ای است که نمونه‌گیری می‌شود.

- ✓ هرگزنبایستی برای آزمایشات انعقادی نمونه از یک لوله به لوله دیگر برای تنظیم حجم منتقل گردد. هرچند که ضدانعقاد هر دو لوله سیترات سدیم باشد. این کار موجب بهم خوردن نسبت صحیح ضد انعقاد می‌شود.

- ✓ چنانچه برای تهیه نمونه خون از مسیرکاتاتر آغشته به هپارین، نمونه خون جهت آزمایشات انعقادی تهیه می‌گردد،سفارش می‌شود. که ۵ تا ۱۰ سی‌سی اولیه دور ریخته شود.
- ✓ پلاسما را می‌توان برای دو هفته در دمای ۲۰- درجه و تا ۴ هفته در دمای ۷۰- درجه نگهداری کرد. نگهداری نمونه‌ها در حرارت اتاق موجب کاهش فاکتورهای آسیب پذیر مانند۵ و ۸ می‌شود. پلاسمای فاقد پلاکت (پلاکت کمتر از۱۰/۰۰۰در میلمتر مکعب) را بایستی منجمدساخت و رعایت این نکته برای تست‌های ضدفسفولیپید روی نمونه‌های منجمد شده اساسی است و ازاینرو سفارش می‌شود که پلاسمای دوبار سانتریفوژ شده جهت آزمایش‌های ضد فسفولیپیدی منجمد گردد. در غیراینصورت فسفولیپیدهای پلاکتی موجب خنثی کردن آنتی‌بادی‌های ضد فسفولیپیدی گشته و آزمایش‌های ضد فسفولیپیدی منفی کاذب می‌شوند.
- ✓ آزمایش زمان پروترومبین به صورت دوبل انجام می‌گیرد و تفاوت جواب‌ها بایستی درمحدوده ۵٪ با یکدیگر مطابقت داشته باشند. در دستگاه‌های اتوماتیک که نمونه و معرف به صورت خودکار اضافه می‌کند، تست تکی بعد از ارزیابی تکرارپذیری پس از انجام ۱۰۰ تست دوبل که تفاوت جواب‌ها بیشتر از ۵ درصد نبوده باشد قابل گزارش است.
- ✓ کیت‌های اندازه‌گیری زمان PT دارای فاکتور بافتی و فسفولیپید بافری شده با کلسیم کلراید ۰۲۵/مولار است. برخی از کیت‌های PTبا داشتن هپاریناز یا جاذب سلولز،هپارین موجود در پلاسما را خنثی

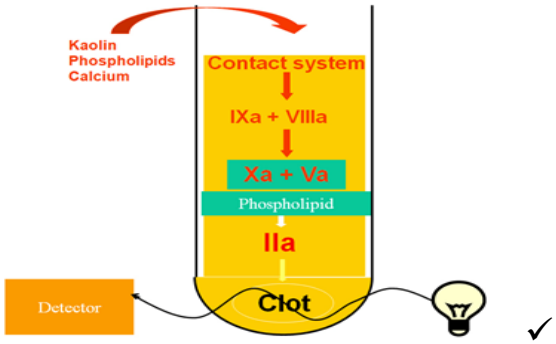
****

می‌سازند.اینگونه کیت‌های PT برای پیدا کردن دُز درمانی وارفارین در بیماری که همزمان تجویز هپارین و کومارین دارد بسیار سودمند است،چون هپارین در دُز بالا آزمایش PT را طولانی می‌کند.

- ✓ برای آزمایش PT یا PTTپلاسما را نبایدبیشتر از ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه نگه داشت. دمای انکوباتور بایستی در محدوده ۱±۳۷درجه باشد.
- ✓ تغییرات روزانه (CV آنالیزورها) برای آزمایشPT و PTT پلاسمای طبیعی و غیرطبیعی بایستی کمتر از ۵٪ باشد. آزمایشگاه بایستی برای تمام سیستم‌های غیر دستی از ۲ سطح کنترلی برای هر ۸ ساعت کار و هر وقت که معرف‌ها تغییر می‌کند، داشته باشد. سفارش می‌شود که یکی از سطوح کنترلی در محدوده طیف درمان با وارفارین و دیگری در محدوده رفرانس باشد. چنانچه تعداد آزمایشات روزانه زیاد است یکی از دو تا سه سطح کنترلی به صورت آلترناتیو هر ۴ ساعت به دستگاه داده شود.
- ✓ از کیت‌های معمولی PT نمی‌توان برای غربال کردن آنتی‌بادی‌های ضدفسفولیپیدی استفاده کرد زیرا مقدار زیاد فسفولیپید که در کیت بکار رفته است منجر به خنثی شدن آنتی فسفولیپید در پلاسما می‌گردد. از اینرو برخی از کیت‌های PT دارای فسفولیپید رقیق شده و حساس به ضد فسفولیپید هستند.
- ✓ با آزمایش زمان پروترومبین می‌توان غلظت فاکتورهای انعقادی ۲ و ۵ و ۷ و ۱۰ را مورد سنجش قرار داد، برای مثال برای اندازه‌گیری فاکتور ۷ از پلاسمای فاقد فاکتور ۷ استفاده می‌شود که با پلاسمای بیمار که هدف، سنجش مقدار فاکتور ۷ است مخلوط شده و روی مخلوط آزمایش PT گذاشته می‌شود. بدیهی است که آزمایش PT پلاسمای تهی شده از فاکتور ۷ بسیار طولانی است ولی با مخلوط شدن با پلاسمای بیمار زمان PT کوتاهتر می‌شود. درجه کوتاه شدن زمان PTبستگی به غلظت فاکتور ۷ در بیمار دارد که با منحنی استاندارد مقایسه می‌گردد. سایر فاکتورها نیز بدین روش مورد سنجش قرار می‌گیرند.
- ✓ برخی از گونه‌های جهش یافته فاکتور ۷ مانند فاکتور هفت پادوآ (padua) و فاکتور هفت یاموماتو (yamomoto) واکنش یکسانی با فاکتور بافتی از منابع مختلف ندارند، برای مثال فاکتور هفت پادوآ با فاکتور بافتی از نوع انسانی (human)در پروسه انعقاد شرکت کرده و جواب صحیحی از PT را بدست می‌دهد، در حالیکه با معرف بافتی حیوانی(animal)جواب طولانی می‌دهد. ورانت فاکتور ۷ پادوآ موجب خونریزی نمی‌شود زیرا با فاکتور بافتی انسانی در پدیده انعقاد شرکت می‌کند.
- ✓ آزمایش نرمال PT اختلال انعقادی را کنار نمی‌گذارد این آزمایش در هموفیلی‌های A(کمبود فاکتور ۸) و B (کمبود فاکتور ۹) و C (کمبود فاکتور یازده) نرمال است.

****

- ✓ فاکتور ۷ در سرمای ۴ درجه خود فعال می‌شود (autoactivation) از این رو قرار دادن پلاسما در ۴ درجه موجب کوتاه شدن ۳-۲ ثانیه‌ای در آزمایش PT می‌شود، همچنین مشاهده شده استکه تزریق فاکتور ۷ فعال نوآوری شده rVII(Novoseven) موجب کوتاه شدن زمان PT می‌گردد.
- ✓ داروهایجدید بازدارنده فاکتور X_a وترومبین موجب طولانی شدن آزمایشPT می‌شوند. از بازدارنده‌هایX_aمی‌توان به داروهای Rivaroxaban و apixaban اشاره کرد. هیرودین و آرگاتروبان بازدارنده مستقیم آنزیم ترومبین می‌باشند.
- ✓ چنانچه دستگاه کوآگولومتر(Coagulometer) بر مبنای تغییرات جذب نوری (optical density) نقطه پایان تست(End point)را گزارش می‌کند، آزمایش PTT نمونه‌های ژاندیس، کدر و هایپرلیپیدمی را به طور کاذب کوتاه گزارش می‌کند.



اساس کاردستگاه کوآگولومتر(Coagulometer) با تکنولوژی فتو اپتیک

- ✓ با استفاده از کوآگولومتر فتواپتیک می‌توان الگوی PTT دوفازه یا موجی شکل را مورد شناسایی قرار داد؛ بدین مفهوم که قبل از تشکیل لخته نهایی، ماکرومولکول‌هایی از کمپلکس CRP با VDRL شکل می‌گیرند که موجب یک شیب اولیه در کاهش ترانسمیتانس می‌شود و پس از آن با تشکیل لخته نهایی میزان T (Transmitance) به حداقل خود می‌رسد. کوآگولومتراین پدیده رابا رسم گراف به صورت منحنی موج‌دار نشان می‌دهد، در حالیکه در سایر موارد PTT تک موج دیده می‌شود. در رسم گراف PTT، زمان برحسب ثانیه روی محور X و ترانسمیتانس (Transmitance) T روی محور Y رسم می‌شود. PTT دوفازه موجی شکل در انعقاد داخل عروقی منتشره(DIC) مشاهده شده است. در بیماران بدحال تبدیل PTT تک موج به دوفازه دارای پیش‌آگهی نامطوب است.

****

- ✓ برای حساس کردن کیت PTT در شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد فسفولیپیدی یا بازدارنده لوپوس از مقدار کم فسفولیپید و فعال کننده سیلیکا استفاده می‌شود، که به آن کیت PTT حساس به آنتی‌بادی‌های ضدفسفولیپیدی گفته می‌شود.
- ✓ در آزمایش PTT می‌توان با تغییر دادن زمان انکوباسیون مخلوط پلاسما با فسفولیپید و فعال کننده، آزمایش را به کمبود فاکتورهای تماسی، حساس یا غیرحساس کرد. برای مثال در انکوباسیون ۲ دقیقه‌ای مخلوط پلاسما و سفالیت که در آزمایش روزمره PTT به کار می‌رود،آزمایشPTT به کمبود فاکتورهای تماسی حساس شده و ممکن است در کمبود فاکتورهای تماسی زمان PTTبیشتر از ۱۲۰ ثانیه شود. با انکوباسیون ۵ تا ۱۰ دقیقه‌ای زمان PTT در کاهش فاکتورهای تماسی به ویژه پره‌کالیکرئین کوتاه می‌شود و از اینرو سفارش می‌شود که هر وقت PTT طولانی شود، یک بار دیگر آزمایش با انکوباسیون طولانی‌تر مخلوط پلاسما با معرف PTT نیز انجام گیرد. استفاده از فعال کننده الاژیک اسید زمان طولانیPTT ناشی از کمبود پره‌کالیکرئین را نیز نرمال می‌کند.

طولانی شدن بیشتر از ۲ دقیقه‌ای معمولاً کمبود فاکتورهای تماسی را مطرح می‌کند.گفتنی است که در کمبود یک درصدی فاکتورهای ۸ و ۹ زمان PTT بین ۷۰ تا ۱۸۰ ثانیه گزارش شده است.

کمبود فاکتورهای تماسی مانند ۱۲ و پره‌کالیکرئین موجب خونریزی نمی‌شود و عمل جراحی بدون هیچ نگرانی انجام می‌گیرد. در میان فاکتورهای تماسی کمبود فاکتور ۱۱ موجب خونریزی می‌گردد. درکمبود فاکتور ۱۲ زمان PTT و ACT (زمان انعقاد فعال شده) طولانی می‌گردد.

در عمل جراحی قلب با هپارینه کردن خون بیمار زمان ACT بین ۴۰۰ تا ۶۰۰ ثانیه تنظیم می‌شود که بیانگر هپارینه شدن مناسب بیمار و لخته نشدن خون در مسیر پمپ اکسیژناتور است. کمبود فاکتور ۱۲ گرچه منعی برای جراحی ندارد ولی موجب طولانی شدن زمان ACT می‌گردد. در این موارد میزان مناسب هپارینه شدن بیمار با آزمایش Anti Xa صورت می‌گیرد.

- ✓ آزمایش PTT برای پیگیری درمان با هپارین UFH به کار می‌رود. آزمایشPTT به سطح فاکتور ۸ بسیار حساس است. فاکتورهای ۸ و فون ویلبراند و فیبرینوژن در گروه پروتئین‌های فاز حاد هستند و افزایش شدید فاکتور ۸ منجر به کوتاه شدن زمان PTT گردیده و از این‌رو ممکن است پیگیری درمان با هپارین را مشکل‌ساز کند افزایش شدید فاکتور ۸ که در برخی از بیماری‌های التهابی و کبدی رخ می‌دهد موجب کوتاه شدن زمان آزمایش PTT شده و ممکن است بر کمبود فاکتورهای انعقادی پوشش گذارد.

****

- ✓ فعالیت کمتر از ۳۰ تا ۴۰ درصدی از هر فاکتور انعقادی (بجز فاکتورهای ۷ و ۱۳) و نیز کاهش فیبرینوژن به کمتر از ۱۰۰mg/dl منجر به طولانی شدن زمان PTT می‌گردد.
- ✓ در بیماری که آزمایش PT طولانی دارد چنانچه با تزریق پلاسما اقدام به جبران فاکتور شود زمان طولانی PT به صورت خطی پایین نمی‌آید، بلکه اول به صورت یک شیب تند زمان PT کوتاه شده و سپس دارای تغییرات اندک می‌گردد، برای مثال چنانچه PT بیماری ۳۰ ثانیه باشد و با تزریق FFP سطح فاکتورها از ۵ به ۳۰٪ برسد زمان PT با یک شیب تند کوتاه شده و برای مثال به ۱۷ ثانیه می‌رسد. حال چنانچه سطح فاکتور به ۵۰٪ افزایش یابد زمان PT ممکن است تنها ۲ ثانیه کوتاه شود.
- ✓ جهت تهیه پلاسما یا منجمد کردن آن برای آزمایش‌های ضدفسفولیپیدی بایستی هرچه سریع‌تر پلاسمای فاقد پلاکت تهیه کرد. توجه داشته باشید که آنتی‌بادی‌های مایل به لیپیدها (آنتی‌بادی‌های لیپوفیلیک) جذب پلاکت‌های فعال شده گردیده و آزمایش منفی کاذب می‌شود. سفارش می‌شود که برای آزمایش ضد فسفولیپیدی، نمونه ۲ بار سانتریفوژ گردد. بار اول خون را با سرعت ۲۰۰۰g برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و سپس پلاسما را به لوله پلاستیکی منتقل کرده و ۱۰ دقیقه دیگر با دور ۲۵۰۰g سانتریفوژ می‌شود. پلاسما را در یک لوله ریخته و مورد آزمایش قرار گرفته یا منجمد می‌گردد.
- ✓ بر مبنای آزمایش PTT می‌توان کلیه فاکتورهای انعقادی بجز ۷ و ۱۳ را مورد سنجش قرار داد؛ برای مثال جهت سنجش فاکتور ۸، پلاسمای بیمار مشکوک به کمبود فاکتور ۸ را با پلاسمایی که تنها فاکتور ۸ ندارد مخلوطکرده و آزمایش PTT صورت می‌گیرد. درجه کوتاه شدن زمان PTT پلاسمای مخلوط ارتباط با غلظت فاکتور ۸ در پلاسمای بیمار دارد. واضح است که زمان PTT پلاسمای فاقد فاکتور ۸ بسیار طولانی و لخته پذیر نیست و به میزانی که پلاسمای بیمار بتواند کمبود فاکتور ۸ را در مخلوط پلاسما جبران کند آزمایش PTT کوتاه‌تر می‌شود.
- ✓ آزمایش PTT در بیمارانی که دُز زیاد هپارین از قبیل جراحی قلب می‌گیرند جواب نداده و پلاسما لخته پذیر نمی‌باشد. در اینحالت از آزمایش ACT(activated clotting time) برای پیگیری دُز هپارین استفاده می‌شود. برای آزمایش ACT خون تازه بیمار به لوله آزمایش که حاوی مواد شارژدار منفی از قبیل کائولین، سلایت و یا سیلیکا است اضافه و مخلوط می‌گردد و زمان انعقاد بدست می‌آید.زمان ACT نرمال ۱۳ ± ۱۰۷ ثانیه است و در طی جراحی قلب زمان ACT با هپارینه کردن خون بین ۴۰۰ تا ۶۰۰ ثانیه نگه داشته می‌شود تا خون در مسیر پمپ اکسیژناتور لخته نشود. سفارش می‌شود که چنانچه از داروی آپروتینین

در حین جراحی استفاده می‌شود، از فعال کننده کائولین برای تست ACT استفادهگردد،زیرا سلایت زمان ACT را در مجاورت دارو طولانی‌تر نشان می‌دهد.

- ✓ چنانچه آزمایش PTT برای پیگیری دُز درمانی هپارین بکار می‌رود و بیمار روی تجویز هپارین است، بایستی پلاسما را ظرف یکساعت از خون جدا کرد، در غیر این صورت تراوشPF4 (فاکتور ۴ پلاکتی) از پلاکت‌ها با خنثی کردن هپارین موجود در نمونه خون منجر به کوتاه شدن زمان PTT شده و ارزیابی دقیقی از پیگیری درمان با هپارین را نشان نمی‌دهد. البته چنانچه آزمایش PTT به منظور پیگیری درمان با هپارین نباشد می‌توان تا ۴ ساعت آزمایش را انجام داد.

مفهوم واژه‌های INRوISI

- ✓ دُز درمانی وارفارین وابسته به سنجش صحیح INR یا نسبت همسوشده بین‌المللی است. برای محاسبه INR به موارد زیر نیاز است:
  ۱- معرف PT با عدد ISI (اندکس حساسیت بین‌المللی)
  ۲- پلاسمای سیتراتهبیمار
  ۳- میانگین جئومتریک (Geometric mean) از زمان پروترومبین پلاسماهای نرمال

$$INR= (PT\ test/Mean\ PT)^{ISI}$$

ISI درجه حساسیت معرف بافتی است که توسط کارخانه سازنده با استفاده از روش استاندارد WHO محاسبه می‌گردد. معرف بافتی استاندارد WHO با روش نوآوری DNA تهیه می‌شود؛ بدین مفهوم که فاکتور بافتی آن شبیه به عصاره مغز انسان توسط مهندسی ژنتیک توسط میکروب E.coli و یا مخمر تهیه شده و سپس در آزمایشگاه به آن لیپید (Lipidated) اضافه می‌گردد. استاندارد اولیه معرف بافتی WHO دارای ISI یک و بسیار حساس است.

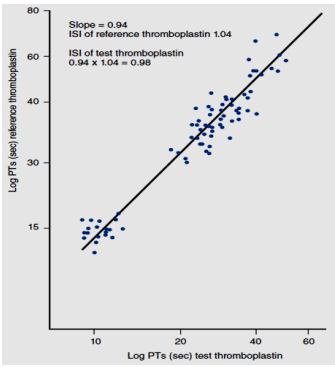
منظور از بسیار حساس این است که آزمایش PTدر کمبود فاکتورهای وابسته به ویتامین K ناشی از تجویزوارفارین، به طور چشمگیر طولانی می‌شود.یک شرکت سازنده برای محاسبه ISI معرف PT نیاز به معرف بافتی استاندارد WHO، ۶۰ نمونه پلاسمای وارفارینه از بیمارانی که روی درمان با دُزهای مختلف وارفارین و INR پایدار هستند و همچنین ۲۰ نمونه نرمال دارد. آزمایش PT هر نمونه‌پلاسما یک بار با معرف

****

استاندارد WHO (ISI =1) و یک با هم با معرف شرکت سازنده انجام می‌گیرد. برای هر نمونه مختصات X و Y که به ترتیب مربوط به جواب PT شرکت سازنده و مربوط به معرف استاندارد است بدست می‌آید. با انتقال داده‌های X و Y از نمونه‌های هپارینه و سالم بر روی کاغذ لگاریتمی دوبل، نمودار آن ترسیم می‌گردد. حاصل ضرب ISI مرجع در شیب نمودار(slope) برابر ISI شرکت سازنده کیت PT می‌باشد.با دریافت ISI، آزمایش PT بر مبنای INR یا نسبت همسو شده بین‌المللی محاسبه می‌گردد و معرف بافتی شرکت سازنده همسو و معادل با معرف WHO می‌گردد.

INR= (sample PT/MN PT)

با محاسبه INR جواب آزمایش PT غیر وابسته به نوع معرف بافتی می‌گردد و مثل این است که هر آزمایشگاهی که جواب PT بر مبنای INR گزارش می‌کند با معرف WHO آزمایش را انجام داده است. مقدار ISI یا نشانگان حساسیت بین‌المللی هر چه به عدد یک نزدیک شود نشانگر کیفیت یکسان آن کیت با مرجع WHO است و هر چه از عدد یک دورتر شود از حساسیت معرف آن کاسته می‌شود؛ بدین مفهوم که در کمبود فاکتورهای وابسته به ویتامین K چندان طولانی نمی‌گردد. برای تعیین میانگین جئومتری (MN PT)ومحدوده رفرانس حداقل از پلاسمای سیتراته ۲۰ مرد و زن که داروی خاصی مصرف نمی‌کنند و در ۱۸ تا ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌گیری ورزش سنگین نداشته‌اند استفاده می‌شود. گروه کنترل نبایستی از قرص‌های ضدبارداری استفاده کند و یا خانم باردار باشد.



برای تعیین نشانگان حساسیت بین‌المللی (ISI) آزمایش PT نمونه‌های مختلف پلاسما با معرف مرجع WHO و معرف سازنده به طور همزمان انجام

****

شده و مقادیر بر روی گراف لگاریتمی منتقل می‌شود. مقدار شیب (SLOPE) که هر دو منحنی WHO و معرف سازنده را یکسان کند به عنوان ISI گزارش می‌گردد.

برای آشنایی بهتر به مثال زیر توجه فرمائید:

نتیجه آزمایش PT با معرف PT با ۲/۵= ISI برابر ۱۷ ثانیه و با معرف PT با ۱/۵ = ISI برابر ۲۲ ثانیه با کنترل ۱۲ ثانیه شده است. این اختلاف جواب‌ها چگونه تفسیر می‌شود؟

گفتنی است که اختلافی بین جواب‌هایPT بیمار با دو معرف استفاده شده بر مبنای واحد INRوجود ندارد. چون هر دو معرف دارای ISI هستند بنابراین معادل سازی با فاکتور بافتی مرجع WHO صورت گرفته است. برای هر آزمایش مقدار R یا نسبت زمان پروترومبین به کنترل را بدست می‌آوریم: $R_1 = 17/12 = 1.42$ یعنی PT بیمار ۱/۴۲ برابر PT کنترل است یا به عبارت دیگر فاکتورهای مسیر انعقادیPTدر بیمار ۱/۴۲ برابر رقیق تر از کنترل است.

$R_2 = 22/12 = 1.8$

در این حالت مسیرآزمایش انعقادیPT بیمار۱/۸ برابر طولانی‌تر یا رقیق‌تر از کنترل است. پس تاکنون بدون استفاده از ISI تفاوت فاحش در جواب‌ها وجود دارد. چنانچه جواب‌ها بر مبنای INR محاسبه گردد و ISI در آن دخیل شود.

$INR_1 = (17/12)^{2.5} = 2.4$

$INR_2 = (22/12)^{1.5} = 2.4$

پس مشاهده شد که مقدار INR بیمار در هر دو بار یکی است و مقدار INR برابر همان R یا نسبت زمان آزمایشPTبیمار به کنترل است، اگر آزمایش با معرف مرجع WHO انجام شود.

درمثال فوق جواب PT بیمار که روی درمان با وارفارین است با معرف PT با ۱/۵ = ISI که به کمبود فاکتور حساس بوده عدد ۲۲ را نشان داده در حالی که معرف PT با ۲/۵ = ISI به علت کاهش حساسیت عدد ۱۷ را نشان

داده است زیرا به کمبود فاکتورها چندان حساس نیست و افزایش اندکی را نشان داده است، ولی مقدار عددی ISI نوسان هر دو آزمایش را یکی کرده است و جواب آزمایش را غیر وابسته به کیت مصرفی کرده است.

یک شرکت سازنده کیت PT معمولاً دو نوع ISI را در بروشور خود قرار می‌دهد:

۱- ISI ژنریک (generic ISI) که قابل استفاده برای تمام دستگاه‌ها یا روش‌های کاری است که شناسایی نقطه پایان آزمایش دارای اصول یکسان است. (same end pint detection)، برای مثال برای تمام کوآگولومترهایی که تشکیل لخته نقطه پایان آزمایش است.

۲- ISI اختصاصی که برای این معرف،نیاز به تجهیزات مخصوص (specific instrument) است و هر دو اینها لازم و ملزوم یکدیگرند.

گاهی ممکن است نیاز به تصدیقISI یک معرف برای دستگاه مورد نظر در آزمایشگاه (Verification) باشد. برای مثال هنگامی که از ISI جنریک (generic) برای یک کوآگولومتر خاص استفاده می‌شود و یا تعمیرات اساسی صورت گرفته باشد. در اینحالت با استفاده از حداقل سه پلاسمای مشخص (certified) با INR مشخص در محدوده ۱/۵ تا ۴/۵INR اقدامبه تأییدISI آزمایشگاه با تجهیزات خاص خود می‌شود.

برای این منظور زمان PT/INR هر پلاسمای تأیید شده در سه روز متوالی به صورت دوبل را با دستگاه موجود در آزمایشگاه بدست آورده و میانگین INR هر پلاسما با INR(certified) مقایسه می‌گردد. چنانچه اختلاف کمتر از ۱۵٪ باشد آن وقت ISI درج شده در کیت مورد تأیید است و در غیر این صورت با استفاده از کیت مخصوص و پلاسماهای مشخص(certified) اقدام به محاسبه ISI در آزمایشگاه (local verification) می‌گردد.

آزمایش پلاسمای مخلوط (Mixing test) برای افتراق بازدارنده از کاهش فاکتورهای انعقادی

با آزمایش پلاسمای مخلوط ممکن است بتوان علت طولانی شدن آزمایش PT یا PTT را مورد ارزیابی قرار داد. در این آزمایش پلاسمای بیمار به صورت هم حجم (1:1 mix) با پلاسمای کنترل نرمال (CNP) مخلوط می‌گردد و آزمایش PTT و یا PT در زمان فوری انجام شده و بعد از ۲ ساعت از انکوباسیون مخلوط پلاسما در ۳۷ درجه تکرار می‌گردد.

****

چنانچه PTT مخلوط هم حجم پلاسما در زمان‌های صفر و ۱۲۰ دقیقه‌ای نرمال شود یا حداکثر ۵ ثانیه از کنترل فراتر رفت به عنوان PTT تصحیح شده در نظر گرفته شده و علت طولانی شدنPTT یا PTبیمار کمبود فاکتورهای انعقادی است. پلاسمای نرمال در مخلوط هم حجم با پلاسمای بیمار کمبود فاکتورهای انعقادی بیمار را جبران کرده و موجب تصحیح شدن آزمایش PT یا PTTمی‌گردد.

چنانچهPT یا PTT پلاسمای مخلوط بیشتر از ۵ ثانیه از میزان کنترل فراتر رود، حضور بازدارنده محتمل است. بازدارنده‌های انعقادی به دو صورت موجب طولانی شدن تست‌های انعقادی می‌گردند؛ گروه اول به صورت آنتی‌بادی‌های ضد فسفولیپیدی عمل کرده که با خنثی کردن فسفولیپید در لوله آزمایش منجر به طولانی شدن آزمایش PTT می‌گردند که تحت عنوان بازدارنده لوپوس یا آنتی‌بادی‌های ضد فسفولیپید از آنها یاد می‌شود. آنتی‌بادی‌های ضد فسفولیپیدی زمان PTT پلاسمای مخلوط را در زمان‌های صفر، ۶۰ دقیقه و ۱۲۰ دقیقه غیرطبیعی می‌سازند.

گروه دوم آنتی‌بادی ضد فاکتورهای انعقادی هستندکه با خنثی کردن فاکتورهای انعقادی موجب طولانی شدن آزمایش‌های انعقادی می‌شوند. آنتی‌بادی‌های این گروه برای خنثی کردن فاکتورها نیاز به انکوباسیون و حرارت ۳۷ درجه دارند که برای مثال می‌توان به آنتی‌بادی ضد فاکتور ۸ اشاره کرد. چنانچه PTT مخلوط پلاسما در زمان فوری تصحیح شود ولی بعد از ۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه طولانی شود آنتی‌بادی ضدفاکتور محتمل است.

برای حساس کردن بهتر آزمایش می‌توان مخلوط پلاسمایی ۴:۱ تهیه کرد؛ بدین مفهوم که ۴ حجم پلاسمای بیمار را با یک حجم از پلاسمای کنترل مخلوط کرده و درصد تصحیح زمان PT یا PTT را در زمان فوری و ۲ ساعت بعد از انکوباسیون محاسبهکرد.

با محاسبه درصد تصحیح می‌توان طبق جدول زیر حضور بازدارنده را از کمبود فاکتورهای انعقادی تشخیص داد.

****

افتراق بازدارنده از کمبود فاکتور انعقادی در مخلوط ۴:۱		
درصد تصحیح فوری	درصد تصحیح با انکوباسیون	تفسیر
≥٪۵۰	>٪۱۰	کاهش فاکتور
<٪۵۰	>٪۱۰	کاهش خفیف فاکتور
≥٪۵۰	≤٪۱۰	بازدارنده فاکتور
<٪۵۰	≤٪۱۰	بازدارنده لوپوس

آزمایش PTT روی مخلوط هم حجم پلاسمای بیمار و پلاسمای کنترل (control normal plasma) در زمان صفر (بلافاصله بعد از مخلوط کردن) و پس از ۲ ساعت انکوباسیون پلاسمای مخلوط انجام می‌شود. چنانچه آزمایش PTT در زمان‌های صفر و ۱۲۰ دقیقه پس از انکوباسیون تصحیح شود (برابر PTT کنترل یا حداکثر ۵ ثانیه بالاتر از کنترل گردد) بیانگر فقدان بازدارنده در سرم است وعلت طولانی بودن آزمایش کاهش فاکتور انعقادی بوده است.اگر PTT پلاسمای مخلوط در زمان صفر تصحیح شود ولی با انکوباسیون دو ساعته طولانی شود احتمال حضور بازدارنده علیه فاکتور ۸ مطرح است.

گفتنی است که تا ٪۳۵ موارد در هموفیلی شدید A و ۱ تا ۴ درصد موارد هموفیلی B احتمال ساخته شدن آنتی‌بادی به ترتیب علیه فاکتورهای ۸ و ۹ وجود دارد. خنثی شدن فاکتورها توسط آنتی‌بادی‌ها وابسته به زمان و درجه حرارت است.

عیار بازدارنده در هموفیلی‌های ارثی و اکتسابی با واحد بتسدا (Bethesda unit) نمایش داده می‌شود. هر واحد بتسدا مقدار بازدارنده‌ای است که فعالیت فاکتور ۸ را بعد از ۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه ٪۵۰ کاهش دهد. برای مثال چنانچه رقت یک به ده پلاسمای بیمار در مخلوط با پلاسمایی که ۵۰ درصد فاکتور ۸ دارد پس از ۲ ساعت انکوباسیون فعالیت فاکتور ۸ به کمتر از ٪۲۵ افت کند بیمار دارای ۱۰ واحد بتسدا از بازدارنده است

کاهش فاکتور ۸ در یک خانم با خونریزی احتمالات زیر را مطرح می کند:

- ✓ هموفیلی A

- ✓ بازدارنده علیه فاکتور ۸ (هموفیلی اکتسابی)
- ✓ بیماری فون ویلبراند تایپ 2N و تایپ ۳

هموفیلی اکتسابی به صورت آتوایمون و به صورت ناشناخته، در همراهی با بیماری‌های آتوایمون دیگر، در بدخیمی‌ها، بعد از زایمان و در ارتباط با حاملگی، عوارض دارویی و برخی از بیماری‌های پوستی گزارش شده است. در این موارد آزمایش PTT بیمار طولانی و مخلوط پلاسما ۱:۱ (مخلوط هم حجم پلاسما نرمال و کنترل) در زمان صفر تصحیح ولی بعد از ۲ ساعت انکوباسیون طولانی می‌گردد.

بازدارنده با گذشت زمان دردمای ۳۷ درجه فاکتور ۸ را خنثی می‌سازد. بازدارنده فاکتور ۸ ممکن است خودبخود ناپدید گردد و ممکن است برگشت پذیر باشد، بنابراین بازدارنده هم به صورت آلو و هم آتوآنتی‌بادی رخ می‌دهد. برخی از بیماران مبتلا به هموفیلی ارثی با تجویز فاکتور ۸ تحریک شده و آلوآنتی‌بادی علیه فاکتور ۸ می‌سازند. تولید آتوآنتی‌بادی علیه فاکتور ۸ در مردان و زنان موجب خونریزی شدید شبیه به هموفیلی می‌گردد. گفتنی است که هموفیلی در ۳۰٪ موارد به صورت جهش جدید و بدون سابقه فامیلی و بدون حضور سابقه ژن معیوب در خانواده رخ می‌دهد. شایع‌ترین علت هموفیلی A وارونگی اینترون ۲۲ است که در ۴۵ تا ۵۰٪ موارد رخ می‌دهد.

فاکتور سیزده

فاکتور سیزده نقش ترانس‌گلوتامیناز دارد و پلیمرهای فیبرین را با ایجاد پیوندهای پپتیدی عرضی بین رشته‌های آلفا و گاما محکم می‌کند. لخته فیبرینی در نبود فاکتور ۱۳ سست بوده و تنها توسط باندهای هیدروژنی و نیروی الکترواستاتیک بهم پیوند دارند.

لخته در غیاب فاکتور ۱۳ نفوذپذیر و بسیار حساس به آب شدن بوده و شبکه بسیار ضعیفی برای ترمیم بافت است. فاکتور سیزده در پلاسما و پلاکت موجود است. فاکتور ۱۳ در پلاسما ($FXIII\ A_2B_2$) به صورت واحدهای تترامر A_2B_2و در پلاکت به صورت دایمر A_2 است. دایمر A_2 نقش آنزیمی و B_2نقش حامل را ایفاء می‌کند. کمبود شدید فاکتور سیزده (کمتر از ۱٪) دارای علائم زیر است:

- خونریزی از گره بندناف در ۸۰٪ موارد
- خونریزی در بافت نرم؛ ایجاد کیست هموراژیک در بافت نرم شبیه تومور (psudo tumor) و عوارض ناشی از فشار کیست

****

- تأخیر در ترمیم زخم
- خونریزی شدید بعد از ختنه و خونریزی مکرر از دهان کودک با در آمدن دندان (teething)
- سقط مکرر
- سیکل متعدد خونریزی (بند آمدن خونریزی و دوباره شروع شدن خونریزی)
- الیگواسپرمی (کاهش شمارش اسپرم) و ناباروری در مردان
- خونریزی مغزی در حدود ۳۰٪ موارد رخ داده و از مهم‌ترین علت فوت در این بیماران است.

شاخص بارز آزمایشگاهی کمبود فاکتور ۱۳ نرمال بودن آزمایش‌های روزمره انعقادی (BT,TT,PTT,PT و شمارش پلاکت) علیرغم میل به خونریزی است.

آزمایش حل شدن لخته در محلول اوره ۵ مولار یا یک درصد مونوکلرواستیک اسید از آزمایش‌های غربالی کمبود فاکتور ۱۳ می‌باشد. لخته فیبرینی افراد سالم در محلول‌های فوق تا ۲۴ ساعت پایدار بوده در حالی که درکمبود فاکتور ۱۳ به سرعت از هم پاشیده می‌شود.

پلاسمای لخته شده در محلول اوره ۵ مولار قرار می‌گیرد. پایدار ماندن لخته به مدت ۲۴ ساعت به صورت حضور فاکتور ۱۳ (Present) و از هم پاشیده شدن آن به صورت فقدان فاکتور ۱۳ (Absent) گزارش می‌گردد.

آزمایش کمی با واکنش تولید آمونیاک با ایفای نقش ترانس آمیدازی (Transamides) فاکتور ۱۳ صورت می‌گیرد. گفتنی است که حضور بازدارنده فاکتور ۱۳ شبیه به کمبود ارثی فاکتور ۱۳ تظاهر می‌کند. این

آنتی‌بادی‌ها در لوپوس سیستمیک، مصرف داروی ایزونیازید، پنسیلین و فنی‌توئین گزارش شده است. کاهش اکتسابی سطح فاکتور ۱۳ در پورپورای هنوخ شون‌لاین، بیماری کرون و کولیت اولسردار گزارش شده است.

گفتنی است که سطح ۵ درصدی فاکتور ۱۳برای کنترل خونریزی کافی بوده و با توجه به نیم عمر ۹ تا ۱۰ روزه آن می‌توان جهت درمان از تزریق ۲ تا ۳ سی‌سی پلاسمای تازه بر کیلو یا تزریق یک کیسه کرایو به ازای هر ۱۰ تا ۲۰ کیلوگرم هر سه تا ۴ هفته استفاده کرد. تزریق پلاکت به عنوان منبع فاکتور ۱۳در افراد با بازدارنده علیه فاکتور سیزده سودمند است.

روش انجام آزمایش و نحوهٔ گزارش:

۱-سه لوله آزمایش ۱ و ۲ و ۳ را نشانه‌گذاری کرده و در لولهٔ اول ۰/۳ سی‌سی پلاسمای فاقد پلاکت بیمار و در لوله سوم ۰/۳ سی‌سی پلاسمای طبیعی فاقد پلاکت اضافه کنید؛ به لولهٔ دوم ۰/۲ سی‌سی پلاسمای بیمار و ۰/۱ سی‌سی پلاسمای طبیعی اضافه کنید.
۲-به هر لوله ۰/۱ سی‌سی از محلول ۰/۰۲۵ مولار کلسیم کلراید اضافه کرده و لوله‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه بگذارید تا لختهٔ فیبرینی ایجاد گردد.
۳-به هر لوله، ۳ سی‌سی محلول اوره ۵ مولار اضافه کرده و سر آن را پوشانده و با حرکت دادن لوله، لخته را جدا کرده تا در محلول اوره قرار گیرد.
۴-لوله‌ها را در حرارت اتاق برای مدت ۲۴ ساعت نگهداری کرده و وضعیت لخته یا کدر شدن محلول در زمان‌های ۱، ۲، ۴ و ۲۴ ساعت را مورد ارزیابی قرار دهید. کوچک شدن اندازهٔ لخته، شکسته شدن لخته و کدر شدن محلول اوره، علامت ناپایداری لخته است.
وضعیت لخته در لولهٔ شماره یک با وضعیت لختهٔطبیعی در لولهٔ شماره ۳ مقایسه می‌شود. متلاشی شدن لخته در لولهٔ اول و پایداری لخته در لوله‌های دوم و سوم، علامت کمبود فاکتور ۱۳ می‌باشد. چنانچه بیمار دارای بازدارنده علیه فاکتور ۱۳ باشد، پاشیدگی لخته در لوله‌های ۱ و ۲ مشاهده شده در حالی که لخته در لولهٔ سوم، حداقل به مدت ۲۴ ساعت پایدار می‌ماند.