جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

Introduction of Hematological and Molecular Algorithms for Diagnosis of Factor XIII Deficiency in Iran Laboratories

Dorgalaleh A[1-2], Tabibian Sh[1], Dadashizadeh Gh[3], Kazemi A[4], Zaker F[4], Alizadeh Sh[1], Naderi M[4], Hosseini S[2], Varmaghani B[1], Rashid Panah J[5],

Abstract

Purpose: Factor XIII deficiency (FXIIID) is an extremely rare hemorrhagic disorder with an approximately 12 higher incidence in comparison with reported global incidence of the disorder. A standard diagnostic algorithm was proposed by the International Society of Thrombosis and Hemostasis (ISTH) for FXIIID, however, due to the lack of investments all parts of this algorithm cannot be applied in Iran. Thus, this study presented a national algorithm for diagnosis of FXIIID in Iran.

Methods: For presentation of a national algorithm, all previously published data about Iranian patients with FXIIID as well as practical methods for diagnosis of FXIIID were collected using Science Direct, Google Scholar and PubMed databases.

Results: With available facilities, an algorithm with regards to the laboratory assessment, clinical presentations as well as family history can be suitable for an on time and less expensive diagnosis of FXIIID in Iran.

Conclusion: Since ISTH diagnostic algorithm is expensive and time consuming, an economical and more suitable national algorithm with regards to available equipment may reduce the rate of misdiagnosis and its life-threatening consequences.

Keywords: Factor XIII deficiency, ISTH diagnostic algorithm, Misdiagnosis

دریافت مقاله:۹۳/۱۲/۲۷ تایید مقاله: ۹۴/۴/۳۰

معرفی الگوریتم هماتولوژیکی و مولکولی در تشخیص کمبود فاکتور سیزده در آزمایشگاههای ایران

اکبر درگلاله[۱-۲]، شادی طبیبیان[۱]، غزاله داداشی زاده[۳]، احمد کاظمی[۵]، فرهاد ذاکر[۵]، شعبان علیزاده[۷]، مجید نادری[۶]، سودابه حسینی[۴]، بیژن ور مقانی[۱]، جمال رشید پناه[۸]

هدف: کمبود فاکتور سیزده یک اختلال خونریزی دهنده بسیار نادر است که در ایران شیوعی ۱۲ برابری در مقایسه با جمعیت عمومی جهان دارد. الگوریتم استانداردی که توسط کمیته بین‌المللی ترومبوز و هموستاز برای تشخیص دقیق و طبقه‌بندی کمبود فاکتور سیزده پیشنهاد شده است به دلیل عدم سرمایه‌گذاری مناسب و عدم راه اندازی آزمایشات در ایران، تمام بخشهای این الگوریتم نمی‌تواند برای بیماران ایرانی استفاده شود. این مطالعه قصد دارد با ارائه یک الگوریتم متناسب، به تشخیص دقیق و سریع بیماری بپردازد که منجر به کاهش هزینه‌های تشخیصی و درمانی برای این بیماری در ایران می‌گردد.

روش بررسی: تمامی مقالات منتشر شده در زمینه کمبود فاکتور سیزده در ایران و جهان با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی Google Scholar ,PubMed ,Science Direct مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: با توجه به امکانات موجود در کشور، استفاده از الگوریتم پیشنهادی این مقاله که براساس امکانات آزمایشگاهی، بررسی علائم بالینی و سابقه خانوادگی افراد طراحی شده است، منجر به تشخیص بموقع بیماران مبتلا به کمبود فاکتور سیزده با هزینه‌ای بسیار کم می شود.

نتیجه‌گیری: هر چند کمیته ISTH الگوریتم استانداردی برای تشخیص کمبود فاکتور سیزده ارائه داده است اما با توجه به هزینه‌های بالای این الگوریتم و نیز تعداد محدود بیماران مبتلا به کمبود فاکتور سیزده در ایران و سرمایه گزاری کم در این زمینه، امکان پیاده سازی آن در حال حاضر در کشور مقدور نیست. این مطالعه الگوریتمی را پیشنهاد می‌کند که با امکانات و

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

شرایط کشور سازگاری داشته و قابل اجرا است. با اجرای این الگوریتم و ممکن سازی تشخیص بیماران دارای کمبود فاکتور سیزده، امید است نسبت مرگ و میر در بیماران ایرانی ناشی از این بیماری کاهش پیدا کند.

کلمات کلیدی: کمبود فاکتور سیزده، الگوریتم تشخیصی کمیته بین المللی ترومبوز و هموستاز، تشخیص نادرست

نویسنده مسئول: مجید نادری، naderifactorxiii@yahoo.com

آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه هماتولوژی و بانک خون دانشکده پیراپزشکی

۱- کارشناس‌ارشد هماتولوژی، گروه هماتولوژی دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

۲- دانشجوی دکترای تخصصی هماتولوژی و بانک خون، گروه هماتولوژی و بانک خون دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳- کارشناس ارشد هماتولوژی، گروه هماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۴- دکترای حرفه ای علوم آزمایشگاه، گروه هماتولوژی و بانک خون دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۵- متخصص خون شناسی و بانک خون، استاد گروه هماتولوژی و بانک خون دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۶- استادیار، فوق تخصص خون وآنکولوژی اطفال، بیمارستان علی ابن ابیطالب (ع) دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، ایران

۷- متخصص خون شناسی و بانک خون، استادیار گروه هماتولوژی و بانک خون دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۸- کارشناس علوم آزمایشگاهی، گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

مقدمه

کمبود فاکتور سیزده نوعی بیماری خون ریزی دهنده نادر است که شیوع آن یک نفر به ازای هر دو میلیون نفر در جمعیت عمومی می باشد. به دلیل آمار بالای ازدواج های فامیلی، شیوع ۱۲ برابری بیماری در ایران گزارش شده است (۱). این اختلال نادر با میزان بالایی از رخدادهای تهدید کننده حیات شامل سقط مکرر، خونریزی از بند ناف و خونریزی از سیستم اعصاب مرکزی (System Central Nervous,CNS) همراه است. خونریزی CNS، نوعی خونریزی شایع در بین بیماران با کمبود فاکتور سیزده بوده که در ۳۲٪ بیماران ایرانی دارای کمبود شدید فاکتور سیزده قابل مشاهده است (۳، ۲) که باعث درصد بالایی از مرگ و میر در بین بیماران ایرانی شده است. تشخیص دیر هنگام یا عدم تشخیص کمبود فاکتور سیزده می‌تواند باعث بیش از ۴۰٪ مرگ در بین این بیماران گردد (۴).

درصد بالای رخدادهای خونریزی دهنده در میان بیماران با کمبود فاکتور سیزده، بر ضروری بودن تشخیص به موقع بیماری تاکید می‌کند. تشخیص زود هنگام این کمبود همراه با درمان مناسب و منظم با رسوب کرایو، پلاسمای تازه منجمد شده (FFP)، کنسانتره فاکتور سیزده یا نوترکیب می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای، رخدادهای خونریزی دهنده را در این بیماران کاهش داده یا حذف کند (۱،۲،۳). علاوه بر این، علائم بالینی، رویکرد آزمایشگاهی مناسب مطابق با امکانات در دسترس، تجهیزات و آزمایشات آزمایشگاهی می‌تواند اجازه تشخیص به موقع را فراهم سازد.

روش بررسی

مطالعه مروری حاضر به بررسی تمامی مقالات منتشر شده در زمینه کمبود فاکتور سیزده در ایران و جهان در زمینه تشخیص این بیماری با استفاده از پایگاه های اطلاعاتی Google Scholar PubMed و Science Direct پرداخته است. پس از بررسی متون و با توجه به امکانات و تجهیزات موجود در آزمایشگاه‌های هماتولوژی کشور الگوریتم تشخیص آزمایشگاهی برای بیماران مبتلا به کمبود فاکتور سیزده در ایران ارائه شد.

یافته ها

از آن جایی که فاکتور سیزده در شکل‌گیری لخته ناپایدار اولیه نقشی ندارد، تمام آزمایشات معمول انعقادی شامل زمان خونروی (Bleeding Time, BT)، زمان پروترومبین (Prothrombin Time, PT) و زمان ترومبوپلاستین نسبی فعال شده (Activated Partial Thrombin Time , APTT) در کمبود فاکتور سیزده طبیعی است و این موضوع تشخیص بیماری را دشوار می‌سازد (۱،۴). بر اساس تمام آزمایشات بالا در صورت وجود کمبود فاکتورسیزده چون شکل‌گیری لخته اولیه

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

طبیعی است آزمایش فاکتور سیزده با برقراری پیوندهای کووالان، لخته ناپایدار اولیه حاصل از آبشار انعقادی را تبدیل به لخته پایدار می‌کند که به راحتی توسط سیستم فیبرینولیتیک تخریب نمی‌شود (۴،۵). بنابراین یک آزمایش مناسب برای ارزیابی پایداری لخته، می‌تواند برای غربالگری کمبود فاکتور سیزده مورد استفاده قرار گیرد. از سال ۱۹۶۰ آزمایش حلالیت لخته به عنوان یک آزمایش غربالگری برای شناسایی کمبود فاکتور سیزده مورد استفاده قرار گرفت. به طور خلاصه در این آزمایش، نمونه سانتریفوژ شده خون حاوی ضد انعقاد به وسیله کلرید کلسیم لخته شده و در اوره ۵ مولار یا مونوکلرواستیک اسید حل می‌شود و در دمای اتاق یا ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه می‌گردد. سپس در طی فواصل منظم حل شدن لخته مورد بررسی قرار می‌گیرد (۹، ۸، ۷، ۶). از آنجا که، آزمایش حلالیت لخته دارای حساسیت کافی نیست، برای غربالگری کمبود فاکتور سیزده توصیه نمی‌شود، در نتیجه ارزیابی‌های کمی برای شناسایی دقیق این بیماری توصیه می گردد. اما به علت عدم دسترسی به روش‌های غربالگری کمی، آزمایش حلالیت لخته هنوز در بسیاری از آزمایشگاه‌ها استفاده می‌شود (۷).

جهت اندازه‌گیری های کمی کمبود فاکتور سیزده، الگوریتم زیر توسط کمیته بین‌المللی ترومبوز و هموستاز(International Society on Thrombosis and Haemostasis, ISTH) پیشنهاد شده است که شامل موارد زیر است (۹):

۱) اولین مرحله، اندازه‌گیری سطح فعالیت فاکتور سیزده: با این اندازه‌گیری کمی می‌توان تمام اشکال کمبود فاکتور سیزده مانند نوع کمبود خفیف، متوسط و شدید را شناسایی کرد.

۲) مرحله دوم، اندازه‌گیری سطح آنتی ژنی فاکتور سیزده: سطح هترو تترامر A2B2 اندازه‌گیری می‌شود. در صورت کاهش سطح آنتی ژنی A2B2 بیمار، سطح آنتی ژن-های A2و B2 در سرم و نیز سطح فعالیت و آنتی ژنی A2 در پلاکت باید بررسی شود.

۳) مرحله سوم، شناسایی اتوآنتی بادی علیه فاکتور سیزده

۴) مرحله چهارم، در صورت طبیعی بودن نتایج همه آزمایشات قبلی گفته شده، آزمایش بررسی اتصال متقاطع فیبرین توسط سدیم دودسیل سولفات پلی آکریلآمید (SDS-PAGE) صورت می‌گیرد.

۵)مرحله پنجم، شناسایی ملکولی نقص کمبو فاکتور سیزده.

اگرچه این الگوریتم در حال حاضر یک روش قابل اعتماد برای تشخیص کمبود فاکتور سیزده می باشد، اما تقریبا در تمام آزمایشگاه‌های بالینی ایران و تعداد قابل توجهی از آزمایشگاه‌های کشورهای توسعه یافته جهان (حدود۲۰٪)، اولین آزمایش غربالگری برای شناسایی کمبود فاکتور سیزده آزمایش حلالیت لخته می‌باشد (۱۰). در حالی که در این الگوریتم آزمایش حلالیت فاقد هر گونه ارزش تشخیصی می باشد. بنابراین تا زمان راه اندازی تمامی روش‌ها و آزمایشات مورد نیازبرای تشخیص دقیق کمبود فاکتور سیزده در ایران مطابق با الگوریتم ISTH، یک الگوریتم منطقه‌ای براساس آزمایشات و امکانات موجود در ایران برای تشخیص این کمبود ضروری به نظر می رسد.

در ایران متاسفانه با توجه به شیوع تقریبا ۱۲ برابری این بیماری نسبت به سایر کشور ها، به دلیل هزینه بالا و عدم سرمایه‌گذاری در این زمینه، بسیاری از ارزیابی‌های آزمایشگاهی مانند اندازه‌گیری فعالیت و سطح آنتی ژنیک فاکتور سیزده به صورت بسیار محدود و تنها به عنوان بخشی از طرح‌های تحقیقاتی صورت گرفته و بنابراین در اکثر نقاط کشور تشخیص کمبود فاکتور سیزده بر پایه علائم بالینی، سوابق خانوادگی و آزمایش حلالیت لخته صورت می‌پذیرد (۱). تقریبا در تمام آزمایشگاه‌های انعقادی ایران اولین آزمایش غربالگری، آزمایش حلالیت لخته می‌باشد و این در حالی است که در کشورهای توسعه یافته استفاده از این روش بسیار محدود شده است و استفاده از این روش برای تشخیص فاکتور سیزده توسط کارشناسان توصیه نمی گردد (۱،۹).

برای یک بیمار مشکوک به کمبود فاکتور سیزده بطور سنتی در ایران، ابتدا آزمایشات معمول آزمایشگاهی شامل PT، PTT، BT و شمارش پلاکتی انجام شده و پس از مشاهده نتایج طبیعی، آزمایش حلالیت لخته صورت می‌گیرد. از آنجایی که این آزمایش تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله سطح فیبرینوژن- عاملی که جهت لخته کردن خون استفاده می‌شود- و نیز معرف- هایی که لخته در آن حل می‌گردد قرار می‌گیرد، این آزمایش دارای حساسیت و اختصاصیت پایینی بوده و نمی‌توان به عنوان آزمایش تاییدی برای تشخیص این بیماری از آن استفاده

کرد (۸،۹). بنابراین نتایج غیر طبیعی در آزمایش حلالیت لخته می بایست توسط یک آزمایش مناسب مانند ارزیابی سطح فعالیت فاکتور سیزده تایید شود اما این آزمایش در ایران به طور محدود استفاده می‌شود. از طرف دیگر، تشخیص‌های ملکولی کمبود فاکتور سیزده نیز به طور گسترده در بیماران ایرانی استفاده نمی‌شود اما تعدادی از مراکز هموفیلی و تحقیقاتی نقص ژنتیکی عامل کمبود فاکتور سیزده را در بسیاری از بیماران ایرانی مشخص می کنند و بنابراین آزمایش ملکولی می‌تواند به عنوان آزمایش تاییدی برای تشخیص بیماران با کمبود شدید فاکتور سیزده و شناسایی حاملین در مرحله پیش از تولد، مورد استفاده قرار گیرد (۱۴،۱۳،۱۲،۱۱). در مراکز هموفیلی با راه اندازی تشخیص ملکولی به روش RFLP، تشخیص زودهنگام و قابل اعتماد کمبود فاکتور سیزده قابل ارائه می باشد.

یکی دیگر از راههای ممکن در انجام آزمایشات تشخیصی، استانداردسازی و و بالا بردن کیفیت آزمایشات غربالگری فاکتور سیزده است. به کارگیری اندکی تغییرات در روش انجام آزمایش، می‌تواند به بهبود در انجام آزمایش تشکیل لخته کمک کند. برای این منظور، خون بیمار را با ماده ضد انعقاد سیترات ۳/۲٪ به نسبت ۹ به ۱ جمع‌آوری کرده و برای به دست آوردن پلاسمای عاری از پلاکت سانتریفیوژ می‌کنند. پس از آماده‌سازی، معرف ایجادکننده لخته به پلاسمای اضافه می‌گردد و سپس لخته ایجاد شده در محیط اوره، مونوکلرواستیک اسید یا استیک اسید قرار گرفته و حل‌شدن لخته در فواصل منظم ارزیابی می‌گردد. معرف ایجاد کننده لخته یک فاکتور مهم در میزان حساسیت آزمایش حلالیت می‌باشد. معرف‌های مختلفی مثل ترومبین یا مخلوط کلسیم و ترومبین به عنوان معرف لخته کننده مورد استفاده قرار می‌گیرند. از طرف دیگر رایج‌ترین معرف حلال، اوره یا مونو کلرو استیک اسید می‌باشد. چندین مطالعه در رابطه با اختصاصیت و حساسیت معرف‌های مختلف لخته‌کننده یا معرف‌های حلال انجام شده است. در ایران رایج‌ترین روش برای آزمایش حلالیت لخته، مخلوط کلسیم کلرید به عنوان معرف لخته‌کننده و مونوکلرواستیک اسید به عنوان معرف حلال می‌باشد. این روش نسبت به سایر روش‌ها دارای حساسیت پایینی است و فقط در کمبود شدید فاکتور سیزده، غیر طبیعی می‌گردد (۸). روش دیگری که که در آن از ترومبین به عنوان معرف لخته‌کننده و از استیک اسید به عنوان معرف حلال استفاده می‌شود دارای حساسیت بیشتری برای شناسایی کمبود خفیف یا متوسط فاکتور سیزده، یا شناسایی بیماران تحت درمان پروفیلاکسی یا کمبود اکتسابی فاکتور سیزده می‌باشد. گفته شده که روش کلسیم/ اوره حساس به 1-5U/ml از فاکتور سیزده می‌باشد، در حالی که روش ترومبین/ استیک اسید به حداقل 10U/ml حساس است. کلسیم/ استیک و ترومبین / اوره به عنوان روش‌هایی با حساسیت متوسط گزارش شده‌اند. هر چند، ارزیابی بر پایه استیک اسید نسبت به حلالیت در اوره سریعتر و حساستر می‌باشد اما اختصاصیت کمتری دارد (۸).

اندازه‌گیری فعالیت فاکتور سیزده

اندازه‌گیری فعالیت فاکتور سیزده یک آزمایش اختصاصی تاییدی محسوب می شود. در ایران این آزمایش به ندرت برای تشخیص استفاده می‌شود و استفاده از آن محدود به چند طرح تحقیقاتی بوده است. چندین روش شامل: فوتومتریک، پوترسینوفلوئورمتریک برای اندازه‌گیری فعالیت فاکتور سیزده معرفی شده است (۱۷، ۱۶، ۱۵).

یک روش رایج برای ارزیابی فوتومتریک فاکتور سیزده بر این اساس استوار است که فاکتور سیزده فعال شده، ایجاد یک واکنش متقاطع بین قسمت آمینی گلوتامین در پایانه مهارکننده آلفا ۲ پلاسمین ایجاد می‌کند. طی این رخداد آمین آزاد شده و برای شکل‌گیری گلوتامین در واکنش مورد استفاده قرار می‌گیرد و NADPH را به NADP تبدیل می‌کند. کاهش مقدار NADPH باعث کاهش جذب نوری در ۳۴۰nm می شود و شدت کاهش جذب نوری بیانگر فعالیت فاکتور سیزده است. در میان روش‌های اندازه‌گیری فعالی تین فاکتور روش پوترسینوفلوئورمتریک دارای حساسیت بیشتری است اما روش زمان بری دارد (۱۷، ۱۵، ۲).

رایج‌ترین نقص مولکولی در زیر واحد A فاکتور سیزده جهش بی‌معنی (بیش از ۵۰٪) می‌باشد. جهش بی‌معنی و حذف/ اضافه از دیگر نقص‌های معمول ژن زیر واحد A فاکتور سیزده در بیماران مبتلا به این کمبود هستند. این بیماری با اشکال مختلف جهش ژنتیکی در زیز واحد A فاکتور سیزده بین اقوام مختلف دنیا دیده شده است.

در بین بیماران اروپایی شایع‌ترین جهش IVS5-A<1G می‌باشد و در میان بیماران اروپایی با ملیت‌های مختلف از جمله؛ هلندی، لهستانی، انگلستانی و غیره نیز مشاهده شده است. جهش Arg661stop در اگزون ۱۴ ژن زیر واحد A فاکتور سیزده نقص شایع دیگری در میان بیماران اروپایی بوده و در فنلاند، سوئیس، لهستان، سوئد و نیز در هند گزارش شده است. همچنین جهش Arg326Gln در ژن زیر واحد A در بیماران آلمانی و هلندی مشاهده شده است (۱۸). بنابراین در بیماران مبتلا در اروپا، این سه جهش می‌توانند به عنوان نخستین گام در تشخیص مولکولی کمبود فاکتور سیزده انتخاب شوند. در میان بیماران هندی، جهش در اگزون شماره ۶ و ۱۰ معمولا مشاهده شده است (۱۸). به نظر می‌رسد که پلی‌مورفیسم IVS1 A246G شایع‌ترین پلی‌مورفیسم فاکتور سیزده در بیماران هندی بوده و یک نشانگر تشخیصی مناسب برای کمبود فاکتور سیزده در این کشور است. روش (PCR-RFLP) و یا PCR اگزون ویژه برای پیگیری کمبود فاکتور سیزده در این چند کشور می‌تواند به عنوان اولین مارکر نشانگر تشخیصی ژنتیکی استفاده شود، اما در دیگر نقاط جهان جهش تکرار شونده عامل بیماری مشاهده نشده و بیش از ۱۲۰ جهش مختلف پراکنده در سراسر ژن فاکتور سیزده وجود دارد که تعیین توالی کامل آن ممکن نیست (۵).

در ایران تشخیص ملکولی کمبود فاکتور سیزده به طور محدود انجام می‌شود. بسیاری از مطالعات ملکولی در جنوب شرقی ایران انجام شده است که کمبود فاکتور سیزده از شیوع بالایی در این منطقه برخوردار است، در تعدادی از مطالعات این منطقه مشخص شده که جهش در موقعیت ۱۸۷ و جایگزینی تریپتوفان به جای آرژنین (Trp187Arg) باعث این کمبود در بیماران جنوب شرق ایران و نیز به عنوان شایع‌ترین جهش در کشور معرفی شده است (۱۹،۱۷،۱). در یک مطالعه دیگر ،جهش در موقعیت ۷۷ و جایگزینی هیستیدین به جای آرژنین (Arg77His) را به عنوان جهش رایج در بیماران ایرانی گزارش شده است(۲۰، ۱۷، ۱). علاوه بر این در بین بیماران ایرانی با کمبود فاکتور سیزده، چندین جهش دیگر هم یافت شد اما این جهش ها تکرارشونده نبوده و به عنوان جهش‌های غیر شایع در جمعیت ایرانی شناخته می شوند (۲۰، ۱۹، ۱۸، ۱).

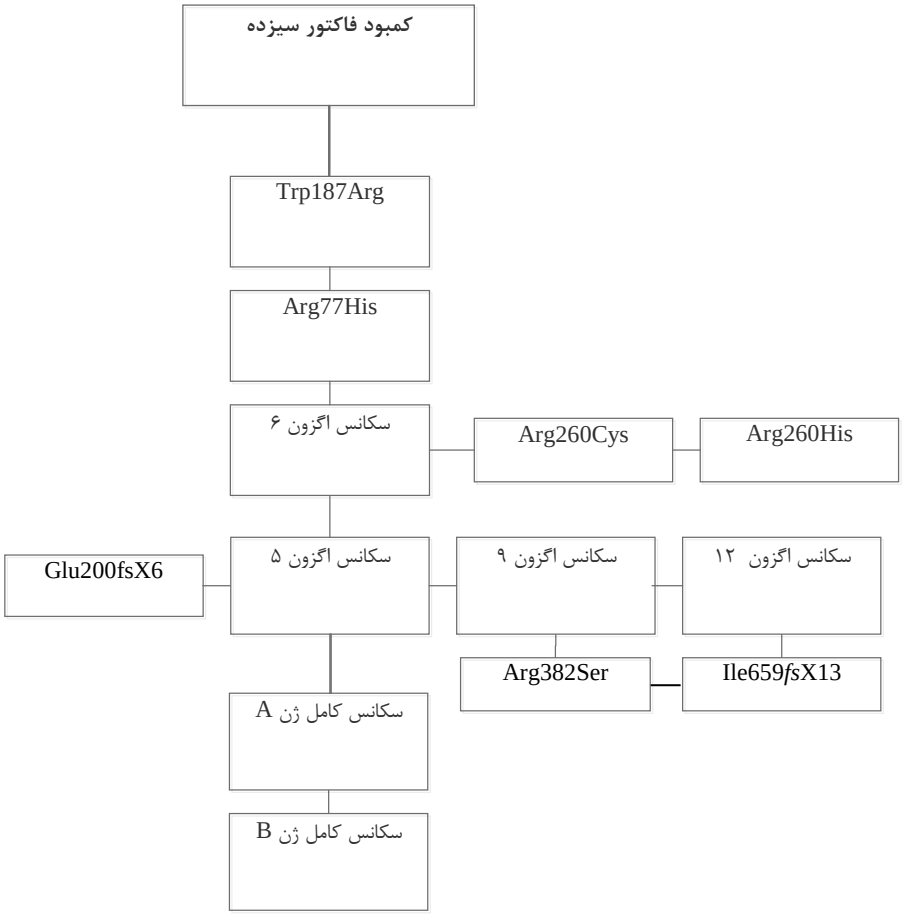
با در نظر داشتن مطالعات صورت گرفته، بهتر است در بیماران مشکوک به کمبود فاکتور سیزده در ایران، در ابتدا جهش Trp187Arg به عنوان اولین موتاسیون و سپس جهش Arg77His در اگزون۳ به عنوان جهش دوم برای تایید این بیماری مورد استفاده قرار گیرد. سپس تعیین سکانس اگزون ۶ برای فاکتور سیزده تیپ A باید انجام گیرد زیرا دو موتاسیون Arg260Cys و Arg2560His در اگزون ۶ در بیماران ایرانی مشاهده شده است (۱۷،۲۰). جهت شناسایی جهش‌ها از متد PCR-RFLP استفاده شده است روش شناسایی و پرایمرهای مربوطه در جدول۱ نشان داده شده است. به علت بزرگ بودن زیر واحد A ژن فاکتور سیزده (دارای ۱۵ اگزون)، سکانس کردن کامل این ژن دشوار و هزینه بر بوده، از این‌رو، اگزون‌های شماره ۵، ۹و ۱۴ سکانس می‌شود زیرا بررسی موارد موتاسیون جمعیت ایرانی توسط این اگزونها سابقا صورت گرفته است (۲۳، ۲۲،۱). پس از سکانس کردن کامل زن A و عدم دستیابی به موتاسیون در تمامی اگزون ها، باید سکانس کردن کامل ژن زیر واحد B مد نظر قرار گیرد (شکل۱).

الگوریتم تشخیصی کمبود فاکتور سیزده در ایران

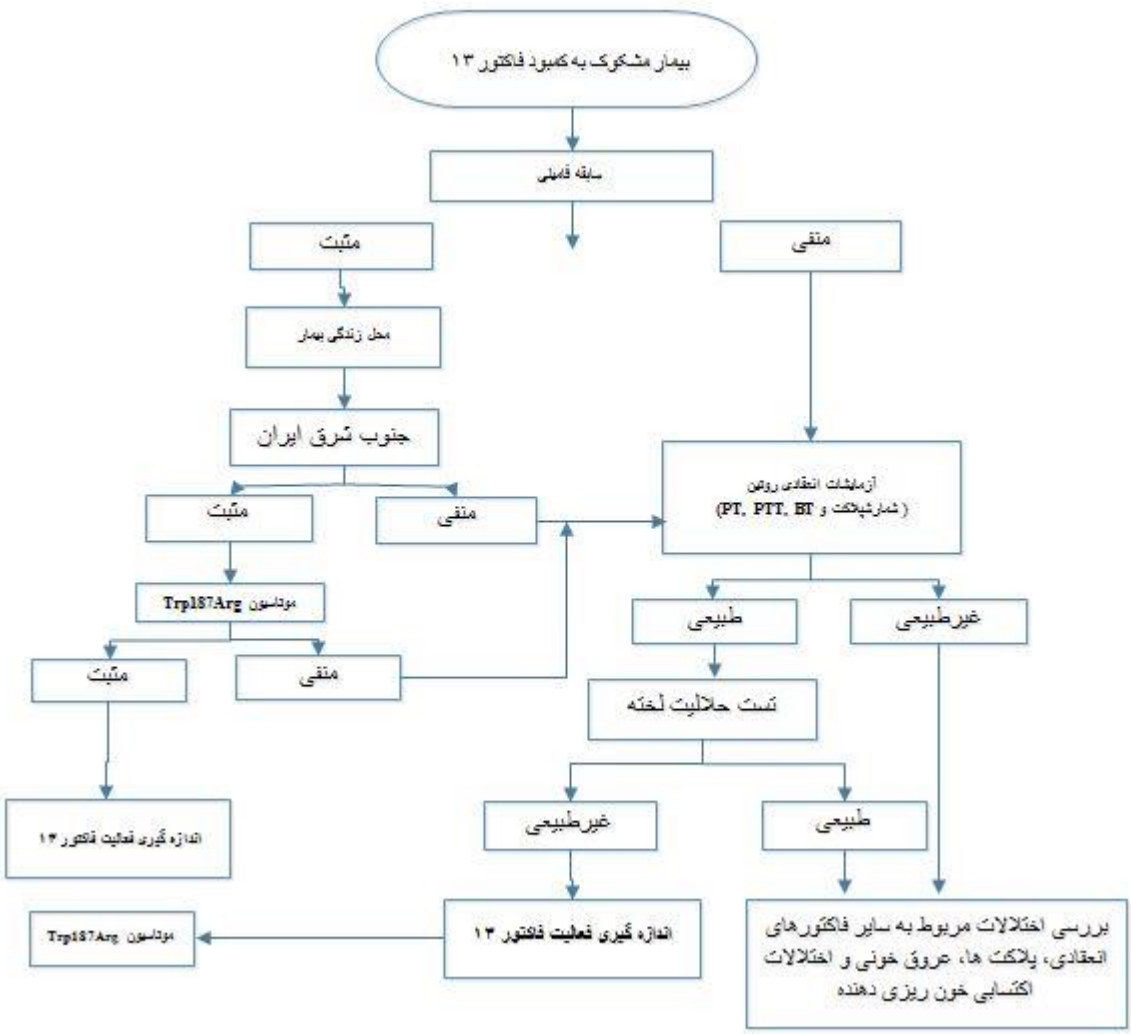
با توجه به تعداد بالای بیماران مبتلا به کمبود فاکتور سیزده در ایران یک روش تشخیصی مناسب جهت تشخیص به موقع می‌تواند بسیار کمک‌کننده باشد. بیماران دارای کمبود فاکتور سیزده در ایران، طیف وسیعی از علائم بالینی را نشان می دهند (۱). خونریزی از بند ناف به عنوان رایج‌ترین علامت بالینی، سقط مکرر، خونریزی داخل جمجمه، هماتوم، تاخیر در بهبود زخم و خونریزی های طولانی از محل زخم در میان بیماران ایرانی دارای کمبود فاکتور سیزده جهت تشخیص زودهنگام می‌تواند مناسب باشد (۲۰،۱۲،۱). پس از معاینه دقیق فیزیکی و بررسی علائم بالینی دومین معیار کمک‌کننده جهت تشخیص، بدست آوردن اطلاعاتی از سابقه فامیلی مناسب می‌باشد. در مطالعه‌ای که بر روی تعداد زیادی از بیماران دارای کمبود فاکتور سیزده انجام گرفت، مشخص شد که حدود ۷۸٪ بیماران دارای والدینی با رابطه خویشاوندی نزدیک ، بیش از ۱۰٪ والدین دارای رابطه خویشاوندی دور و تنها حدود۱۰٪ بیماران دارای والدینی بدون رابطه خویشاوندی بودند (۲۴). بنابراین

جدول۱: پرایمرها و شرایط شناسایی تمام جهش های شناخته شده برای کمبود فاکتور سیزده در بیماران ایرانی

موتاسیون	اگزون	تکنیک مناسب	پرایمر	دمای اتصال (Annealing)	آنزیم برش دهنده
Trp187Arg	۴	PCR-RFLP	F: 5′-TTGCAGACTTGCCTGATTTG-3′ R: 5′-CAAGCGATCCTCCCATCTTG-3′	۵۸	Eco130I
Arg77His	۳	PCR-RFLP	F: 5′-TGCTACCTGCCTTCTTCAGG-3′ R: 5′-CCTGCCACTGTTGACATATG-3′	۵۶	Aci I
Arg260Cys & Arg260His	۶	PCR-Sequencing	F: 5′-GCTTGCAGAGTGAACACTAGTTT-3′ R: 5′-TGACAGGTGTTAACAGATTTTAGG-3′	۵۴	-
Glu200*fs*X6	۵	PCR-Sequencing	F: 5′-AAGTGTTTGGAAACAGTCTGG-3′ R: 5′-ATGAAGTAAAAATGTCCTTGAC-3′	۵۴	-
Arg382Ser	۹	PCR-Sequencing	F: 5′-CACTTCTTGATCTCTTGGAGCA-3′ R: 5′-AGATCAGCAATGAAGCAAGTTC-3′	۵۶	-
Ile659*fs*X13	۱۴	PCR-Sequencing	F: 5′-AGAGCAGAACGAGGTTTT-3′ R: 5′-GCTTCCCACAGCTCTGCAC-3′	۵۲	-



شکل ۱: الگوریتم پیشنهادی برای تشخیص ملوکولی نقص فاکتور سیزده در ایران



شکل۲: الگوریتم پیشنهاد شده برای تشخیص میزان فعالیت فاکتور سیزده در ایران

بررسی مناسب علائم بالینی و گرفتن سابقه فامیلی دقیق نشانه‌های بسیار مهمی در تشخیص کمبود فاکتور سیزده هستند. پس از سابقه فامیلی مثبت، سومین قدم مناسب در تشخیص، سوال درباره محل تولد بیمار است. از ۴۷۳ بیمار گزارش شده دارای کمبود فاکتور سیزده در ایران ۳۵۲ بیمار ساکن استان سیستان و بلوچستان در جنوب شرقی ایران بودند و ۶۲ بیمار ساکن استان‌های کرمان، خراسان، یزد و گلستان بودند که یا در زمره استانهای مجاور سیستان و بلوچستان قرار دارند و یا مانند استان گلستان و یزد میزان بالایی از مهاجرت و جابجایی جمعیت با استان سیستان و بلوچستان دارند (۱). بنابراین می‌تواند این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که احتمالا تعداد قابل توجهی از بیماران با کمبود فاکتور سیزده در استانهای ذکر شده ممکن است اصالت سیستان و بلوچستانی داشته باشند. اهمیت سوال در باره محل تولد بیمار یا والدین آنها بر این اساس است که مطالعاتی که در بیماران دارای این کمبود در این استان انجام شده نشان داده است که موتاسیون Trp187Arg در این منطقه تنها عامل ژنتیکی ایجاد کمبود فاکتور سیزده می‌باشد (۱). بنابراین در بیماران استان سیستان و بلوچستان با یک سابقه فامیلی مثبت، یک آزمایش ساده اما قابل اعتماد PCR_RFLP می‌تواند منجر به تشخیص سریع و مناسب کمبود فاکتور سیزده شود. از آن جایی که بیماران دارای کمبود فاکتور سیزده یا متعلق به استان سیستان و بلوچستان بوده و یا در استان های مجاور که دارای تعداد بالایی مهاجر از این استان بوده، در نتیجه جهش Trp187Arg باید به عنوان اولین آزمایش ملکولی برای هر ایرانی با کمبود فاکتور سیزده انتخاب شود. از طرف

دیگر بیمارانی که بدون سلبقه فامیلی و اصالت سیستان و بلوچستان مراجعه می نمایند، در مرحله نخست تمام آزمایشات معمول انعقادی باید به منظور رد سایر اختلالات خونریزی دهنده با بدست آمدن نتایج طبیعی در این آزمایشات انجام شود (شکل۲).

به منظور تشخیص صحیح در این بیماران پس از مشاهده نتایج طبیعی در آزمایشات انعقادی باید آزمایش حلالیت لخته انجام گردد. در این مرحله ما به نتایج طبیعی یا غیرطبیعی از آزمایش حلالیت دست پیدا می‌کنیم. به دلیل اختصاصیت پایین این آزمایش نتایج غیر طبیعی در آزمایش حلالیت لخته با آزمایشاتی قابل اعتماد بیشتری مانند اندازه‌گیری فعالیت فاکتور سیزده همراه می‌شود. سر انجام باید با انجام یک آزمایش ملکولی مناسب اساس ملکولی بیماری مشخص شود.

بحث و نتیجه گیری

ایران حدود نیمی از کل بیماران مبتلا به کمبود فاکتور سیزده دنیا را در خود جای داده است (۱). بیماران ایرانی طیف وسیعی از علائم کلینیکی را بروز داده‌اند و تشخیص دیر هنگام یا عدم تشخیص کمبود فاکتور سیزده در تعدادی از بیماران موجب شده است تا آمار به نسبت بالایی از مرگ و میر در خانواده این بیماران گزارش شود. تعدادی از این مرگ و میرها ناشی از رخدادهای خونریزی دهنده مربوط به کمبود فاکتور سیزده بوده در حالی‌که تعداد قابل ملاحظه‌ای از موارد مرگ و میر علت مشخصی نداشته و بیماران جهت ارزیابی کمبود فاکتور سیزده مراجعه نکرده‌اند. با این وجود علائمی که موجب بروز مرگ در این بیماران شده است شدیدا این فرضیه را که این بیماران در اثر خونریزی‌های ناشی از کمبود فاکتور سیزده جان خود را از دست داده‌اند، شدیدا تقویت می‌کند.

به دلیل شیوع بالای مرگ و میر در بیماران مبتلا به کمبود فاکتور سیزده، ISTH نوعی الگوریتم جهت تشخیص کمبود فاکتور سیزده ارائه داده است. این الگوریتم به تشخیص دقیق کمبود فاکتور سیزده کمک شایانی می‌کند و در اغلب کشورهای توسعه یافته به راحتی قابلیت پیاده سازی دارد. در کشور ما مانند بسیاری از کشورهای در حال توسعه، اعمال این الگوریتم هزینه-های سنگینی را بر بیمار تحمیل می‌کند. از سویی دیگر این الگوریتم به دلیل نیاز به بررسی‌های تخصصی و سرمایه گذاری قابلیت پیاده‌سازی در تمام نقاط کشور را ندارد و تاکنون نیز بخش عمده الگوریتم برای تشخیص کمبود فاکتور سیزده پیاده نشده است. هر چند به نظر می‌رسد در برخی از کشورهای درحال توسعه نیز مانند ایران پیاده‌سازی الگوریتم دشوار می‌باشد اما با توجه به بررسی متون، تاکنون اقدامی در راستای ارائه الگوریتم منطقه‌ای یا کشوری در این مناطق صورت نگرفته است و تنها الگوریتم موجود در جهان برای تشخیص کمبود فاکتور سیزده الگوریتم ISTH و الگوریتم ارائه شده در این مقاله می‌باشد که علت اصلی این موضوع می‌تواند آمار بسیار پایین بیماران مبتلا به کمبود فاکتور سیزده در این کشورها باشد. در کشور ما مسئله کاملا متفاوت بوده و تعداد بسیار زیادی از بیماران مبتلا به کمبود فاکتور سیزده در کشور ما قرار دارند و این موضوع ضرورت طراحی و پیاده‌سازی الگوریتم کشوری بر اساس امکانات و تجهیزات موجود در کشور را اجتناب ناپذیر می‌سازد. الگوریتم ارائه شده توسط ISTH صرفا آزمایشگاهی بوده و به جنبه‌های بالینی و دموگرافیک بیماری توجهی نشده است در حالی که با توجه به بررسی های متعددی که در کشور در مورد ویژگی‌های بالینی و دموگرافیک بیماران صورت گرفته است، این آیتم می‌تواند به عنوان بخشی از فرایند تشخیص و الگوریتم کشوری مفید باشد. به همین دلیل در الگوریتم ارائه شده بخش ابتدایی الگوریتم به بررسی اطلاعات دموگرافیک بیماری پرداخته است و سپس وارد اقدامات آزمایشگاهی شده است. هر چند تست حلالیت لخته در الگوریتم ارائه شده توسط ISTH جایگاهی ندارد اما با توجه به اینکه تمام آزمایشگاه‌های کشور از این آزمایش برای بررسی اولیه کمبود فاکتور سیزده استفاده می‌کنند، و با توجه به سهولت انجام این آزمایش و هزینه پایین آن، حذف این آزمایش از فرایند تشخیص کمبود فاکتور سیزده در ایران منطقی به نظر نمی‌رسد، بلکه با انجام اصلاحاتی در این آزمایش، می‌توان حساسیت آن را برای تشخیص بیماران با کمبود شدید فاکتور سیزده افزایش داد. به همین دلیل آزمایش حلالیت لخته به عنوان بخشی از الگوریتم کشوری کمبود فاکتور سیزده پیشنهاد شده است.

هر چند اندازه‌گیری فعالیت فاکتور سیزده به صورت محدود در کشور انجام می‌گیرد اما به عنوان آزمایش

تاییدی می‌توان از ان بهره برد. بدون شک تنها نکته قوت در تشخیص کمبود فاکتور سیزده در کشور وجود مطالعات ملکولی در این زمینه می‌باشد. هر چند این مطالعات کامل نمی‌باشد و تمام بیماران را مورد بررسی قرار نداده‌اند، اما بخش عمده‌ای از بیماران از نظر ملکولی مورد بررسی قرار گرفته‌اند و موتاسیون عامل بیماری در آنان مشخص شده است، به همین دلیل از تشخیص ملکولی می‌توان به عنوان آزمایش تاییدی در کشور بهره جست. به دلیل اهمیت فوق العاده بررسی های ملکولی در تشخیص بیماری‌های ارثی، مطالعه حاضر یک الگوریتم جداگانه برای تشخیص ملکولی بیماری ارائه داده است، که هزینه‌های تایید نهایی بیماری را به شدت کاهش می‌دهد. هر چند باید در راستای پیاده‌سازی الگوریتم ISTH درکشور پیش رفت اما به کارگیری الگوریتم منطقه‌ای با هزینه کم، و با توجه به امکانات و تجهیزات موجود راهی بسیار مهم در راستای تشخیص دیر هنگام و مرگ و میر ناشی از کمبود فاکتور سیزده در کشور می‌باشد.

سپاسگزاری

بر خود لازم می‌دانیم تا از تمامی بیماران درد کشیده هموفیلی به خصوص بیماران مبتلا به کمبود فاکتور سیزده که در مطالعات متعددی به ما یاری رسانده‌اند تشکر و قدردانی نماییم و آرزومندیم ارائه این الگوریتم تشخیصی بتواند گامی هر چند کوچک در مسیر خدمت به این بیماران عزیز باشد و ما را در برداشتن گام‌های بعدی و عملی‌تر در خدمت به این عزیزان مصمم‌تر نماید.

منابع

1. Dorgalaleh A, Naderi M, Alizadeh Sh, Hosseini M, Hosseini S, Tabibian Sh: Factor XIII Deficiency In Iran, A Comprehensive Review of the Literature. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 01/2015;

2. Naderi M, Dorgalaleh A, Tabibian S, Alizadeh S, Eshghi P, Solaimani G. Current understanding in diagnosis and management of factor XIII deficiency. Iran J Pediatr Hematol Oncol 2013; 3(4): 164-72.

3. Naderi M, Dorgalaleh A, Alizadeh S, Tabibian S, Bamedi T. clinical manifestations and management of life-threatening bleeding in the largest group of patients with severe factor XIII deficiency. Int J Hematol 2014.

4. Maccpherson, Richard A, Henrys clinical diagnosis and management by laboratory methods, 21nd ed. 2006.

5. Hethershaw EL, Cilia La Corte AL, Duval C, Ali M, Grant PJ, Ariëns RA, et al. The effect of blood coagulation factor XIII on fibrin clot structure and fibrinolysis. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2014;12(2):197-205.

6. Biswas A, Ivaskevicius V, Thomas A, Oldenburg J. Coagulation factor XIII deficiency. Diagnosis, prevalence and management of inherited and acquired forms. Hamostaseologie 2014; 34(2).

7. Schroeder V, Durrer D, Meili E, Schubiger G, Kohler HP. Congenital factor XIII deficiency in Switzerland: from the worldwide first case in 1960 to its molecular characterisation in 2005. Swiss medical weekly 2007; 137(19-20): 272-8.

8. Jennings I, Kitchen S, Woods T, Preston F. Problems relating to the laboratory diagnosis of factor XIII deficiency: a UK NEQAS study. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2003; 1(12): 2603-8.

9. Kohler H, Ichinose A, Seitz R, Ariens R, Muszbek L. Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2011; 9(7): 1404-6.

10. Naderi M, Dorgalaleh A, Ahmadinejad M, Alizadeh Sh, Tabibian Sh, Hossenin MS, et al,.

Long term prophilaxis in severe congenital factor XIII deficiency was not complicatted with inhibitor development, European Association for Haemophilia and Allied Disorders, 2015.

11. Naderi M, Alizadeh S, Kazemi A, et al. Central nervous system bleeding in pediatric patients with factor XIII deficiency: A study on 23 new cases. Hematology 2014; 10. 1179 /1607845414Y. 0000000172.

12. Naderi M, Imani M, Eshghi P, Dorgalaleh A,Tabibian S, Alizadeh S, et al. Factor XIII deficiency in Sistan and Baluchistan province. Sci J Blood Transfus Organ 2013; 10(3): 282-288.

13. Naderi M, Dorgalaleh A, Alizadeh S, Kashani K Z, Tabibian S, Kazemi A, et al. Polymorphism of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and risk of intracranial haemorrhage in factor XIII deficiency. Haemophilia 2014; 20(1): e89-e92.

14. Dorgalaleh A, Alizadeh S, Tabibian S, Bamedi T, Karimi M. Molecular Analysis Of The Largest Group Of Patients With Factor XIII Deficiency In Southeast Of Iran. Blood 2013; 122(21): 4780.

15. Kárpáti L, Penke B, Katona É, Balogh I, Vámosi G, Muszbek L. A modified, optimized kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. Clinical Chemistry 2000; 46(12): 1946-55.

16. Hayward CP, Moffat K. Laboratory testing for bleeding disorders: strategic uses of high and low-yield tests. International journal of laboratory hematology 2013; 35(3): 322-33.

17. Hsieh L, Nugent D. Factor XIII deficiency. Haemophilia 2008; 14(6): 1190-200.

18. Eshghi P, Cohan N, Lak M, Naderi M, Peyvandi F, Menegatti M, et al. Arg77His and Trp187Arg are the most common mutations causing FXIII deficiency in Iran. Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis 2012; 18(1): 100-3.

19. Ivaskevicius I, Seitz R, Kohle H, Schoreder V, Muszbek L, et al. International registry on factor XIII deficeincy:A basis form ed mostly on Europian data. Thrombosis and heamostasis. 2007;97(6):873-1060

20. Naderi M, Dorgalaleh A, Alizadeh S, Tabibian S, Hosseini S, Shamsizadeh M, et al. Clinical manifestations and management of life-threatening bleeding in the largest group of patients with severe factor XIII deficiency. International journal of hematology 2014;100(5): 443-

21. Peyvandi F, Tagliabue L, Menegatti M, Karimi M, Komáromi I, Katona É, et al. Phenotype-genotype characterization of 10 families with severe a subunit factor XIII deficiency. Human mutation 2004; 23(1): 98.

22. Souri M, Biswas A, Misawa M, Omura H, Ichinose A. Severe congenital factor XIII deficiency caused by novel W187X and G273V mutations in the F13A gene; diagnosis and classification according to the ISTH/SSC guidelines. Haemophilia 2014; 20(2): 255-62.

23. Borhany M, Handrkova H, Cairo A, Schroeder V, Fatima N, Naz A, et al. Congenital factor XIII deficiency in Pakistan: characterization of seven families and identification of four novel mutations. Haemophilia 2014; 20(4): 568-74.

24. Anwar R, Minford A, Gallivan L, Trinh CH, Markham AF. Delayed umbilical bleeding—a presenting feature for factor XIII deficiency: clinical features, genetics, and management. Pediatrics 2002; 109(2): e32-e.

25. Naderi M, Alizadeh S, Tabibian S, Hosseini S, Dorgalaleh A, Effect of social factors on the highest global incidence of factor XIII deficiency in southeast of Iran, Archives of Iranian medicine, 2015.