



TÜRK BİYOKİMYA DERNEĞİ

TIBBİ LABORATUVARLARDA
SANTRİFÜJ KULLANIM
KILAVUZU

ISBN: 978-605-87229-4-1

Yayınlayan
Türk Biyokimya Derneği
Hirfanlı Sokak 9/3 G.O.P. Çankaya/Ankara

Tel: 0 312 447 09 97

Basım yılı 2017

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

HAZIRLAYANLAR

Fehime Benli AKSUNGAR

Nedim ALBAYRAK

Esin AVCI

Güzin AYKAL

Cihan COŞKUN

İpek ÇINAROĞLU

Ayfer ÇOLAK

Canan DEMİRTAŞ

Pınar EKER

Funda GÜÇEL

Alper GÜMÜŞ

Aylin HAKLIGÖR

Berrin BERÇİK İNAL

Damla KAYALP

Bağnu ORHAN

Çiğdem SÖNMEZ

Mehmet ŞENEŞ

Fatma TANELİ

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ
2. SANTRİFÜJÜN TARİHÇESİ
3. GENEL BİLGİLER
 - 3.1. Kavram ve Terimler
 - 3.2. Santrifüjün Parçaları
 - 3.3. Santrifüjlerin Sınıflandırılması
 - 3.3.1. Kullanım şekillerine göre santrifüjler
 - 3.3.2. Hızlarına göre santrifüjler
 - 3.3.3. Rotor türüne göre santrifüjler
 - 3.4. Santrifüjün Çalışma İlkesi
 - 3.4.1. Santrifüj yarıçapı nereden ölçülmeli?
 - 3.4.2. Santrifüjün fiziksel temelleri
 - 3.5. RCF ve RPM Değerlerinin Birbirlerine Dönüştürülmesi

4. SANTRİFÜGASYON ÖNCESİ DİKKAT EDİLMESİ GEREKENLER

- 4.1. Santrifügasyon Öncesi Örnek Bekletme Süresi
- 4.2. Gecikmiş (Artık) Pıhtı Oluşumu
- 4.3. Tüp İçi Pıhtılaşma Süresini Kısaltan Tüpler ve Kullanımı
- 4.4. Tüplerin Bekletme Konumu
- 4.5. Tüpler Santrifüje Yerleştirilirken Dikkat Edilmesi Gerekenler

5. SANTRİFÜGASYON SIRASINDA DİKKAT EDİLMESİ GEREKENLER

- 5.1. Doğru Santrifüj Süresi ve RCF Değerinin Seçimi
- 5.2. Santrifüj İçi Sıcaklık
- 5.3. Santrifüj Çalışırken Dikkat Edilmesi Gerekenler

6. SANTRİFÜGASYON SONRASI DİKKAT EDİLMESİ GEREKENLER

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

- 6.1. Örneklerin Tekrar Santrifugasyonu
- 6.2. Örneklerin Yanlışlıkla Santrifugasyonu
- 6.3. Santrifuj Bakımı
7. ÖZET
8. KAYNAKLAR

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre alışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

1. GİRİŞ

Santrifüjler analitik amaçla geliştirilmiş aygıtlardır ve santrifügasyon temel olarak bir ayırma yöntemidir. Bununla birlikte günümüzde tıbbi laboratuvarlarda daha çok serum, plazma ve idrar örneklerinin analize hazırlanmasında kullanılan bir ön işlem aracıdır. Santrifügasyon preanalitik evrenin en önemli aşamalarından birini oluşturur, santrifügasyon öncesinde, sırasında ve sonrasında etkili değişkenlerin bilinmesi preanalitik hataların önlenmesi için gereklidir. Bu konu ile ilgili talimatların oluşturulması ve uygulanması laboratuvar yönetiminin sorumlulukları arasındadır.

Santrifüjler laboratuvar çalışanları tarafından iyi tanınmalı ve santrifügasyonun preanalitik etkileri iyi bilinmelidir. Bu konularla ilgili bilgiler, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ (WHO)) ve Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) gibi bazı uluslararası kuruluşların yayımladığı kılavuzlar, üretici firmaların kullanım kılavuzları ile özel konuları ele alan araştırma çalışmaları içinde dağınık olarak bulunmaktadır. Bu belgelerin yabancı dilde yazılmış olmaları ulusal düzeyde kullanımlarını sınırlamaktadır. Bu kaynak tıbbi laboratuvar çalışanları ve araştırmacılar için kullanışlı, uygulanabilir bir kılavuz olması amacıyla hazırlanmıştır.

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

2. SANTRİFÜJÜN TARİHÇESİ

Santrifüjün bilinen ilk örneği askeri mühendis Benjamin Robins (1707-1751) tarafından barut kuvvetini ölçmek için geliştirilen düzenektir. Antonin (1842-1909) ve Alexander (1840-1896) Prandtl kardeşler sütün yağını dönme hareketini kullanarak ayırabilen bir aygıt tasarladılar (1). Bu aygıt daha sonra Gustaf De Laval (1845-1913) tarafından geliştirildi ve ticari olarak piyasaya sürüldü.



Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

Santrifüjün analitik gücünü ilk keşfeden Friedrich Miescher (1844-1895) oldu. Miescher hücre organellerini ve nükleik asitleri santrifüj kullanarak ayırıştırımayı başararak DNA keşfine giden yolda bir kilometre taşı oldu. Theodor Svedberg (1884-1971) analitik ultrasantrifüj tekniği geliştirerek protein saflaştırma çalışmaları yaptı. Ribozomların isimlendirilmesinde kullanılan svedberg biriminin (svedberg unit (S/Sv)) isim babası Theodor Svedberg'dir.



1940'lı yıllarda rutin laboratuvar testlerinin yaygınlaşmasıyla santrifüjlere olan gereksinim giderek arttı. 1949 yılında Spinco şirketi dakikada 40.000 dönüş yapabilen santrifüjler geliştirdi ve 1950 yılında Beckman Coulter tarafından satın alındı. 1962 yılında Eppendorf şirketi ilk mikrosantrifüjü piyasaya sürdü, hatta bu şirket tarafından geliştirilen kapaklı küçük hacimli örnek tüpleri

“Eppendorf godesi” adıyla anılmakta ve günümüzde hala kullanılmaktadır. Bilgisayar alanındaki gelişmeleri santrifüjlere ilk uygulayan Hettich şirketi oldu. 1976 yılında ilk mikroişlemcili santrifüjleri geliştirdiler ve böylece ilk programlanabilir santrifüjler tıbbi laboratuvarlara girdi (2,3).

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

3. GENEL BİLGİLER

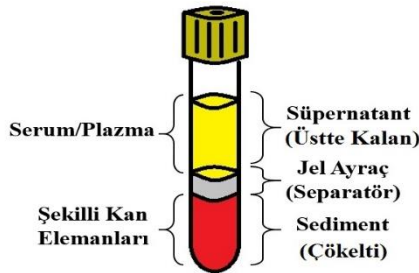
3.1. Kavram ve Terimler

Santrifügasyon (Santrifüj Etme, Santrifüje Koyma, Santrifüj İşlemi, Santrifüleme, “Centrifugation”): Temel olarak bir ayırma yöntemidir. Dönme hareketinden elde edilen merkezkaç kuvveti kullanılarak örnek içindeki parçacıklar şekil, büyüklük ve yoğunluklarına göre ayrılır (4). (Şekil 1)

Santrifüj “Centrifuge”: Santrifügasyon işleminin gerçekleştirildiği aygıtın adıdır (4).

Çökelti, Sediment, Pellet, Presipitat, “Precipitate”: Santrifügasyon sonucunda örneğin ayrılarak tüpün dibine çöken bölümüdür. Kan örneği içindeki hücreler lökositler ve trombositler çökeltinin üstünde kalacak şekilde bu kısım içinde toplanır.

Üstte Kalan, Süpernatant, “Supernatant”: Santrifügasyon sonucunda üstte kalan—serum ya da plazmadan oluşan bölümdür.



Şekil 1. Santrifügasyondan sonra tüp içinde ayrılan serum/plazma ve şekilli kan elemanları

RPM (Dakikadaki Dönme Sayısı “Revolution/ Rotation/ Rounds/ Rate Per Minute”): Santrifüjün dakikadaki dönme sayısıdır ve santrifüjün hız göstergesidir (4,5).

RCF (Göreceli Santrifüj Kuvveti “Relative Centrifugal Force/Field”) veya Gravite (g): Santrifüje yerleştirilen örneği bileşenlerine ayıran fiziksel etkidir. RCF’yi dönen parçacığı etkileyen merkezkaç kuvvetin yönündeki değişim oluşturur ve yerçekimi ivmesinin katları olarak (xg) ifade edilir (4,5).

3.2. Santrifüjün Parçaları

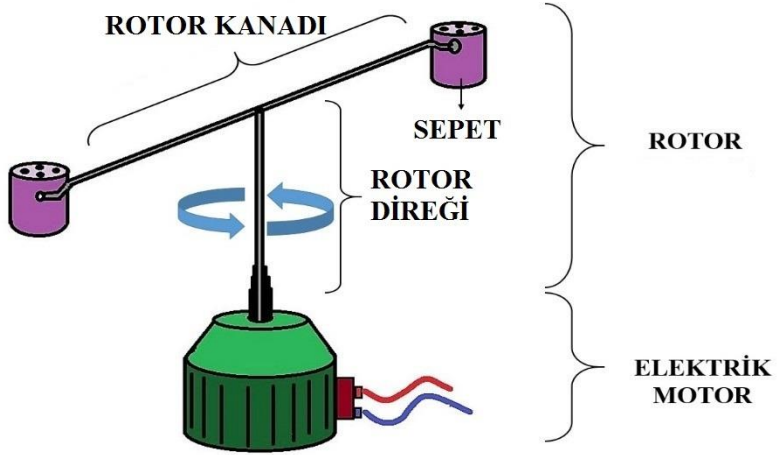
Santrifüj temelde bir elektrik motorudur. Hareketsiz (stator) ve hareketli (rotor) olmak üzere iki temel parçadan oluşur (6,7). (Şekil 2)

Motor: Elektrik enerjisini mekanik enerjiye dönüştüren, dönme hareketinin üretildiği aygıttır.

Rotor: Santrifüjün bir eksen etrafında dönen parçasıdır. Motorun ürettiği dönme hareketini iletir.

Sepet (Basket, Kova): Tüplerin yerleştirildiği ve tüp tutucuların koyulduğu parçadır.

Tüp Tutucu: Tüplerin santrifüj içinde sağlam ve hareketsiz biçimde durmalarını sağlayan ve sepet içine yerleştirilen parçadır.



Şekil 2. Santrifüjün temel parçaları.

Kumanda Panosu: Santrifüjlerin programlanabilmesi için ya da çalışırken denetlenebilmesi için üzerlerinde kumanda panosu bulunur. Kumanda panosu üzerinde genellikle programlama, hızlandırma, frenleme, başlatma ve acil durdurma gibi düğmeler vardır. Santrifüj yönergeleri izlenerek RCF/RPM, süre, sıcaklık, hızlandırma “acceleration” ve durdurma (fren, “brake”) gibi değişkenler ayarlanabilir ve bu değerler aygıt çalışırken panodaki ekrandan izlenebilir. (Şekil 3)



Şekil 3 Santrifüj kumanda panosu (örnek)

3.3. Santrifüjlerin Sınıflandırılması

Santrifüjler kullanım şekilleri, hızları ve teknik özelliklerine göre farklı şekilde sınıflandırılabilirler. Santrifüjlerin kullanım alanları aşağıdaki gibi alt başlıklarda toplanabilir (4).

- Serum/plazma elde etmek için kan şekilli elemanlarının ayrılması,
- Mikroskopik ve kimyasal incelemeler için idrar ve diğer vücut sıvıları içindeki hücre ve diğer bileşenlerin çöktürülmesi,
- Girişim (interferans) oluşturabilecek presipitatların örnekten uzaklaştırılması,
- İmmünokimyasal analizler için antikorların ve antikor bağlı yapıların ayrılması,
- Çözücülerin (solvent) özütlenmesi (ekstraksiyon),
- Lipit bileşenlerin (şilomikronlar, lipoproteinler) serumdan ayrılması.

3.3.1 Kullanım şekillerine göre santrifüjler

Genel olarak ikiye ayrılırlar (8).

1. **Hazırlayıcı “Preparative” Santrifüjler:** Hazırlayıcı santrifüjler kendi içinde ayrımsal (differansiyel) ve yoğunluk değişim santrifüjleri “density gradient centrifuges” olarak ayrılırlar. Differansiyel santrifüjler daha çok parçacıkların ayrıştırılması için kullanılırken yoğunluk değişim santrifüjleri iki farklı sıvının ayrıştırılmasında kullanılır.
2. **Analitik Santrifüjler:** Daha çok ultrasantrifüj sınıfındadırlar. Refraktometri, florometri gibi diğer ölçüm yöntemleriyle birleştirilerek örnek içinde ayrılan bileşenlerin niteliksel ya da niceliksel ölçümlerini yapabilirler.

Santrifüjler teknik özelliklerine göre de adlandırılabilirler. **Sabit açılı santrifüjler** rutin çalışmalarda daha çok idrar örneklerinin hazırlanmasında tercih edilir. **Oynar hazneli (sallanır sepetli) santrifüjler** rutin çalışmalarda kan ve idrar örneklerinin hazırlanmasında tercih edilirler. **Soğutmalı santrifüjler** ise işlem sırasında santrifüj içi sıcaklığın denetlenebildiği aygıtlardır. **Mikrosantrifüjler** küçük hacimli örneklerin (1-2 ml) santrifüjlenmesi için tasarlanmışlardır ve görece hızlı çalışırlar (10000-15000 x g).

3.3.2. Hızlarına göre santrifüjler

- a. **Çok düşük hızlı santrifüjler** (RCF<4000 xg): Tıbbi laboratuvarlarda örnek hazırlamasında kullanılan tezgah üstü santrifüjler bu sınıftandır.
- b. **Düşük hızlı santrifüjler** (RCF 5000-10000 xg): Kan bankacılığında eritrosit süspansiyonu, taze donmuş plazma hazırlanmasında kullanılan santrifüjler bu sınıftandır.
- c. **Yüksek hızlı santrifüjler** (RCF 10000-50000 xg): DNA, RNA çalışmalarında kullanılan santrifüjler bu sınıftandır.
- d. **Ultrasantrifüjler** (RCF 100 bin - 1 milyon xg): Ultrasantrifüjler çok yüksek dönüş sayılarında çalışan ve daha çok analitik amaçla kullanılan santrifüjlerdir, örneğin lipoprotein analizi ultrasantrifüj kullanarak da gerçekleştirilebilir.

3.3.3. Rotor türüne göre santrifüjler

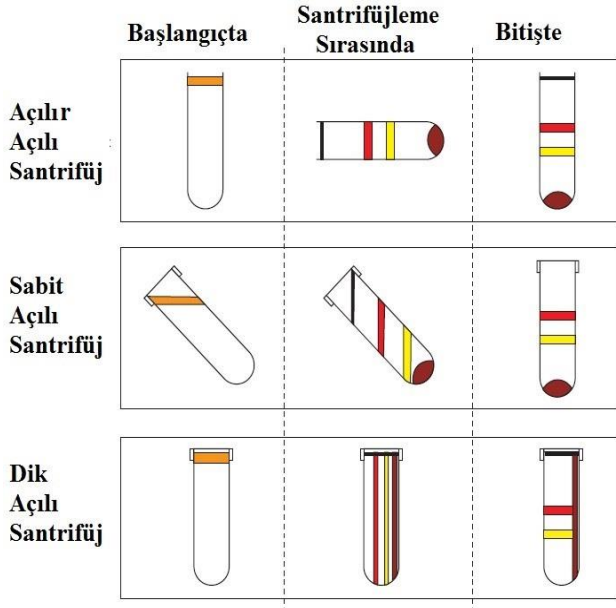
Santrifüjün rotor türü dönen tüplerin konumunu da belirler. Buna göre santrifüjler açılır başlıklı (yatay başlıklı), sabit açılı ve dik açılı olarak sınıflandırılabilir. Rutin laboratuvar çalışmalarında en çok açılır başlıklı ve sabit açılı rotorlar kullanılır.

Açılır başlıklı santrifüjlerde tüpler rotor çalışırken merkezkaç kuvvetinin etkisiyle yatay hale (rotor dönüş eksenine dik pozisyon) gelir, santrifüj durunca düşey

pozisyona geri döner. Sediment yüzeyi düzdür, dönüş eksenine paraleldir ve iyi paketlenmiştir.

Sabit açılı rotorlarda tüpler düşey dönüş eksenine göre 25-40 derecelik sabit bir açıyla dönerler. Bu yüzden, merkezkaç kuvvetin etkisiyle sediment (pellet) tüp kenarına ve dibine doğru çöker. Oluşan sediment açılır başlıklı santrifüjlerdeki kadar sağlam paketlenemez. Genel olarak sabit açılı rotorlar açılır başlıklı santrifüjlere göre daha yüksek santrifüj kuvvetlerine ulaşılabilir.

Merkez kaç kuvveti tüplere farklı yönlerden etkidiği için ayrıışan katmanların tüp içinde yerleşimleri de farklı olur (9). (Şekil 4)



Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

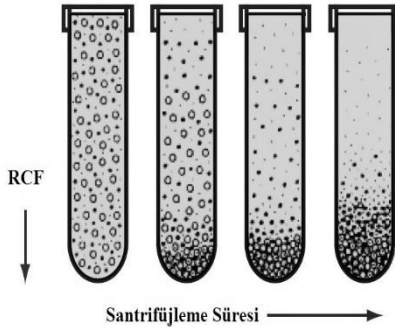
Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

Şekil 4. Rotor türüne göre santrifüjlenen örneklerin katmanlara ayrılma şekilleri (9).

3.4. Santrifüjün Çalışma İlkesi

Dünyanın sahip olduğu yerçekimi zaman içinde kan örneğini bileşenlerine ayrıştırabilir. Eristosit sedimentasyon hızı bu olgunun analitik uygulamasıdır. Ancak örneklerin daha hızlı ve fazla sayıda alt bileşene ayrılması istendiğinde santrifüje gerek duyulur. Örnek içindeki bileşenlerin ayrışma hızı parçacıkların şekli, büyüklüğü, yoğunluğu ve ortamın akışkanlığına bağlıdır. Daha yoğun ve büyük olan parçacıklar daha hızlı çökerler (9). (Şekil 5)



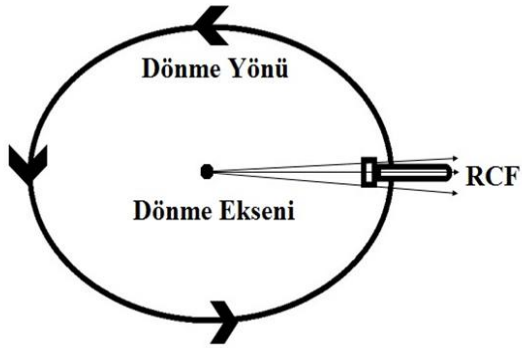
Şekil 5. Santrifügasyon sırasında tüp içindeki parçacıkların ayrışması ve çökmesi (9).

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

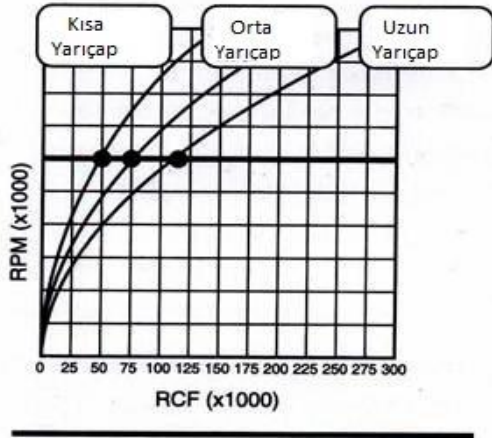
2017- ANKARA

Dönme hareketinin oluşturduğu itme merkezden ışınsal olarak örnek içindeki parçacıklara etkir ve RCF olarak bilinir (Şekil 6). RCF yerçekimi ivmesinin katları (xg) olarak gösterilir.



Şekil 6. Dönme hareketi ve RCF'nin oluşumu

RCF ve RPM genellikle birbirlerinin yerine kullanılan ve karıştırılan kavramlardır. Laboratuvarlar arasında aynı ölçütü kullanarak aynı dilden konuşabilmek önemlidir. Farklı santrifüjlerin yarıçap uzunlukları farklı olabildiği için aynı RPM değerinde olsalar da çalıştıkları RCF değerleri farklı olacaktır. RPM üzerinden karşılaştırmak analiz öncesi işlemlerde tekrarlanabilirlik sorununa neden olur. RCF farklı yarıçap uzunluğundaki santrifüjlerde aynı ivmenin elde edilebilmesini sağlamaktadır. Şekil 7'de aynı RPM değerinde farklı yarıçap uzunluğuna sahip santrifüjlerde RCF değerindeki değişim izlenmektedir.



Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

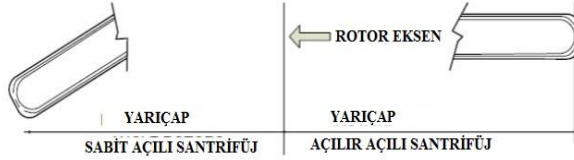
Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

Şekil 7. Farklı yarıçap uzunluklarında RPM ve RCF değerlerinin değişimi.

3.4.1. Santrifüj yarıçapı nereden ölçülmeli?

RCF'nin doğru hesaplanabilmesi için santrifüjün yarıçap değeri uygun şekilde ölçülmelidir. Üretici tarafından kullanım kılavuzlarında bildirilen yarıçap değerleri RCF değerinin hesaplanmasında kullanılabilir. Eğer bu değer bilinmiyorsa kullanıcının kendisi de yarıçap değerini elle ölçebilir. Merkez ile tüpün dip noktası arasındaki uzunluk santrifüj yarıçapı olarak kabul edilmektedir. Sabit açılı ve açılır açılı santrifüjlerin yarıçapının nasıl ölçüleceği Şekil 8 ve Şekil 9'da gösterilmiştir (10).



Şekil 8. Santrifüj yarıçapının ölçülmesi (8).



Şekil 9. Santrifüj yarıçapının ölçülmesi

3.4.2. Santrifüjün fiziksel temelleri

Santrifüjde dönen tüp içindeki parçacığın hareketi düzgün dairesel harekete uyar ve Newton fiziği ile açıklanabilir. Açısal hız (ω) dönen bir nesnenin açısal yer değiştirmesinin zaman içindeki değişimidir. Bir başka deyişle nesneyi merkeze bağlayan yarıçap vektörünün, birim zamanda radyan türünden taradığı açığa açısal hız denir. Dairesel hareket yapan bir nesneyi merkeze bağlayan yarıçap vektörü bir tam dönüş yaptığında, 2π radyan açı tarar ve bu sırada bir periyot (T) kadar zaman geçer.

$$Hız = \frac{yol}{zaman}$$

$$\omega = \frac{2\pi}{T}$$

Frekans (f) düzgün dairesel hareket yapan nesnenin bir saniyedeki dolanım sayısıdır, birimi Hertz'dir. Periyot ve frekans arasında $f = 1/T$ bağıntısı vardır. RPM frekansın dakika türünden anlatımıdır.

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

RPM=60/f olarak gösterilebilir. Açısal hız RPM değişkenine göre aşağıdaki gibi düzenlenebilir.

$$\omega = \frac{(2\pi \times RPM)}{60}$$

İvme (a) hızın süreye göre türevidir. Hareket eden bir nesnenin hızında ya da yönünde değişme olursa ivme ortaya çıkar.

$$ivme (a) = \frac{Hız (\Delta V)}{Zaman (\Delta t)}$$

Düzgün dairesel hareket yapan nesnenin çizgisel hızı sabittir ancak yönündeki değişim ivmelenmesine neden olur açısal ivme formülü aşağıdaki gibidir.

$$açısal ivme (a) = \omega^2 \times r$$

RCF dönen parçacığa etkiyen merkezci itmenin yerçekimi kuvvetine oranıdır ve yerçeki ivmesinin (\mathbf{xg} (980.665 cm/s²) katlarıyla gösterilir. RCF formülü aşağıdaki gibi elde edilir.

$$RCF = \frac{F santrifüj}{F yerçekimi}$$

$$RCF = \frac{m \times a}{m \times g}$$

$$RCF = \frac{m \times \omega^2 \times r}{m \times g}$$

$$RCF = \frac{(\omega^2 r)}{g}$$

Açısal hız açık olarak gösterilerek formül yeniden düzenlenirse RCF formülü aşağıdaki gibi olur.

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

$$RCF = \frac{\left(\frac{2\pi \times RPM}{60}\right)^2 \times r}{g}$$

$$RCF = \frac{\left(\frac{4\pi^2 \times (RPM)^2}{3600}\right) \times r}{g}$$

Sabit değerler formül içinde yerleştirilirse;

$$RCF = \left(\frac{4 \times (3.14)^2 \times (RPM)^2}{3600 \times 980}\right) \times r$$

Sabit değerler birbirleriyle çarpılarak formül daha yalın bir şekilde gösterilebilir.

$$RCF = 1.118 \times 10^{-5} \times r \times (RPM)^2$$

Böylece RCF ve RPM arasındaki bağıntı formül ile gösterilmiş olur. 1.118×10^{-5} değeri deneysel (ampirik) bir sabit değer değildir. Formülden elde edilebilen bir değerdir.

Aşağıdaki koşullar için RPM'den RCF'e dönüştürmeye bir örnek vermek gerekirse;

Santrifüj rotor çapı= 14 cm

Kullanılan tüp için önerilen RPM= 3100 rpm olsun.

$$RCF = \left(\frac{4 \times (3.14)^2 \times (3100)^2}{3600 \times 980}\right) \times 14$$

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

$$RCF = 1504 = 1500 \text{ xg olur}$$

RCF'den RPM'e dönüştürülen ise formül;

$$RPM = \sqrt{\frac{RCF \times 10^5}{1.12 \times r^2}}$$

şeklinde olur.

Aşağıdaki koşullar için RCF'den RPM'e dönüştürmeye bir örnek vermek gerekirse;

Santrifüj rotor çapı: 14 cm

Kullanılan tüp için önerilen RCF= 1500 xg olsun.

Buna göre RPM;

$$RPM = \sqrt{\frac{1500 \times 10^5}{1.12 \times 14^2}}$$

= 3093 rpm, 3000 veya 3100 rpm olarak kullanılabilir.

Hesaplanan RCF değeri maksimum RCF anlamına gelir. Ancak tüp içeriğinin tümü için aynı RCF değeri kullanılamaz. Minimum RCF, yarıçap rotor eksenini

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

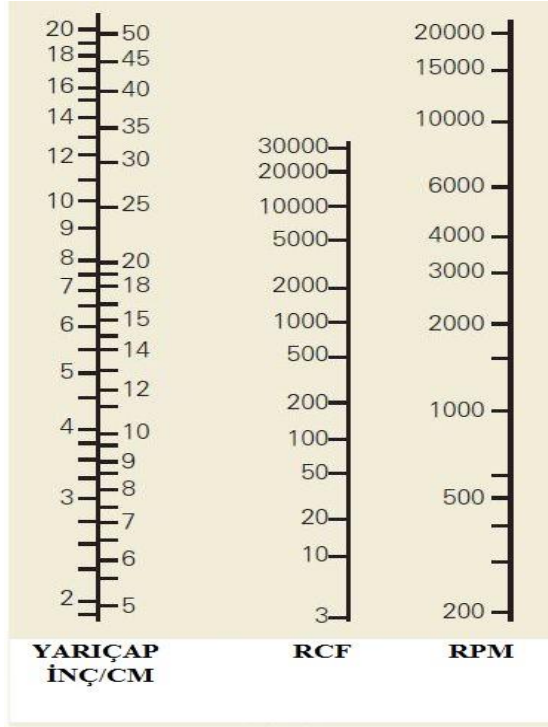
Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

ile tp içindeki sıvının yüzeyi arasındaki uzaklık olarak alındığında hesaplanan RCF değeridir. Maksimum ve minimum RCF değerleri arasında çok büyük farklar olabilir. Böyle bir durum söz konusu ise hesaplamaların ortalama yarı çap üzerinden yapılabilceği akılda tutulmalıdır. Ortalama yarıçap, tp tabanıyla tp içindeki sıvı ykseklığının ortasının rotor eksenine uzaklığı olarak ölçülür. Öte yandan, RCF değeri aynı olsa bile açılır başlıklı rotorlarda tüpe sabit aılılılara göre daha yüksek bir santrifüj kuvveti uygulanır.

3.5. RCF ve RPM Değerlerinin Birbirlerine Dönüştürülmesi

RCF ve RPM değerlerini formülle birbirlerine çevrilebileceği gibi nomogramlar kullanılarak da dönüştürülebilir (*şekil 10*) (11). İnternet üzerinde bu dönüştürmeyi kolayca yapabilen hesap makineleri bulunmaktadır (12).



Şekil 10. Santrifüjün yarıçap ve RPM değerleri kullanılarak RCF değerinin bulunmasını sağlayan nomogram (11).

4. SANTRİFÜGASYON ÖNCESİ DİKKAT EDİLMESİ GEREKENLER

Santrifügasyon analiz öncesi evrenin önemli aşamalarından biridir ve yöntemine uygun gerçekleştirilebilmesi için preanalitik evrede uyulması gereken kurallara dikkat edilmelidir (13). Doğru ve sağlıklı santrifügasyon yapılabilmesi için uygun şekilde

kan alınmalı, laboratuvara taşınmalı ve santrifüj içine yerleştirilmelidir.

4.1. Santrifügasyon Öncesi Örnek Bekletme Süresi

Plazma elde etmek için EDTA'lı, heparinli, florürlü ya da sitratlı örnekler bekletilmeden santrifüjlenebilir.

Serum elde etmek için tüpün türü ve üreticinin önerdiği süre dikkate alınarak örnek,

- Oda sıcaklığında ve,
- Pıhtılaşma tamamlanıncaya kadar bekletilmelidir.

Üretici tarafından bildirilen bir süre yoksa, serum örnekleri santrifügasyon öncesi en az 30 dk. bekletilmelidir (10,14). Bekletme süresi 1 saati aşmamalıdır.

4.2. Gecikmiş (Artık) Pıhtı Oluşumu

Gecikmiş pıhtı oluşumu serum/plazma içinde artık pıhtının kalmasına neden olur ve önemli preanalitik hata kaynaklarından biridir. Örnek içindeki artık pıhtı kalıntıları analizörlerin prob ve tubinglerinde tıkanmaya ve ölçüm sırasında girişimlere neden olabilmektedir, örneğin troponin I/T ölçümlerinde yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceği bildirilmiştir (15).



Gecikmiş tüp içi pıhtılaşmaya yol açan durumlar;

- Örneğin buzdolabında bekletilmiş olması,
- Örnek alınan hastanın antikoagülan tedavi alması,
- Örneğin önerilenden daha kısa süre bekletilmesidir.

Artık pıhtının tahta çubuk vb. aletlerle tüp içinden çıkarılması laboratuvarlarda sık yapılan yanlış bir uygulamadır. Artık pıhtı serum/plazma içinden alınsa bile küçük parçalar örnek içinde kalabilir. Ayrıca bu işlemin, hemoliz gibi istenmeyen durumlara yol açabileceği bildirilmiştir. İçinde artık pıhtı kalan örneklerin tekrar santrifüjlenmesi bir seçenektir. En doğru uygulama ise, örneğin reddedilerek yeniden kan alınması olacaktır (10).

4.3. Tüp İçi Pıhtılaşma Süresini Kısaltan Tüpler ve Kullanımları

Tüp içi pıhtılaşma süresi laboratuvardaki test döngüsünü uzatan önemli bir etkidir. Bu sürenin kısaltılması için pıhtılaşma etkinleştirici “clot activator” ya da hızlandırıcı “clot accelerator” içeren tüpler kullanıma sunulmuştur (Şekil 11) (16). Pıhtılaşma hızlandırıcı tüpün türüne göre santrifüj öncesi örnek bekletme süresi değişmektedir. Bu tüpler kullanılırken üreticilerin önerilerine uyulmalı veya ortalama olarak aşağıda belirtilen süreler kadar bekletilmelidir.

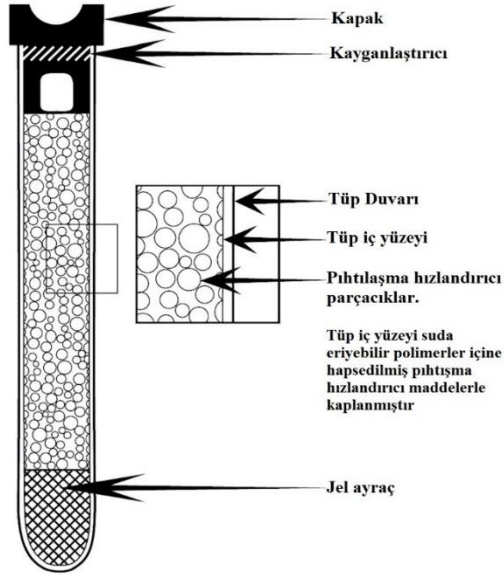
- Jelsiz serum tüpleri: 60 dk.
- Cam ya da silika kaplı tüpler : 15-30 dk.
- Trombin katkılılar : 5 dk.

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

– Yılan zehiri katkıları : 2 dk.



Şekil 11. Pıhtılaşma hızlandırıcı tüplerin yapısı (16)

4.4. Tüplerin Bekletme Konumu

Tüpler taşınırken ya da pıhtılaşmanın tamamlanması için bekletilirken mutlaka **dik konumda** bekletilmelidir (Şekil 12).

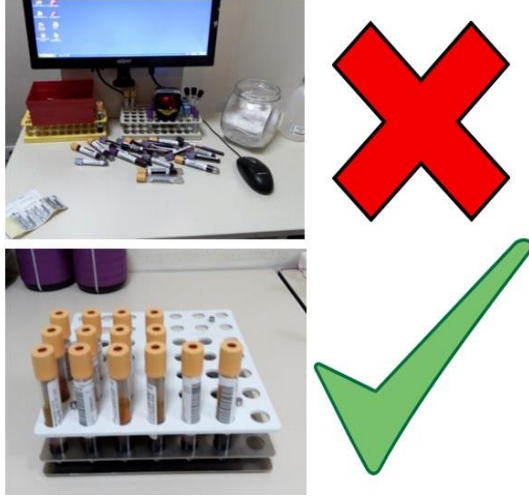
Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

Yatık olarak bekletilen serum tüplerinde oluşan fibrin tüpün kapağına ya da yan çeperlerine yapışabilir ve santrifüj olmasına rağmen serumdan ayrılmayabilir.

Tüplerin doğru konumda bekletilmemesi fibrin oluşumuna neden olurken, diğer taraftan hemoliz olasılığını arttıran bir durumdur (10).



Şekil 12. Kan alındıktan sonra tüpler, taşıma sırasında ve laboratuvarında dik konumda bekletilmelidir.

4.5. Tüpler Santrifüje Yerleştirilirken Dikkat Edilmesi Gerekenler

Tüpler santrifüj keferlerine karşılıklı dengeli olacak şekilde yerleştirilmeli, gerekiyorsa denge tüpü

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

kullanılmalıdır (Şekil 13). Tüpler etiketli olmalı, katkılı tüplerde örnek seviyesi denetlenmelidir.

Tüp kapakları her zaman kapalı tutulmalıdır. Kapağın kapalı olması tüp içindeki sıvının buharlaşarak santrifüj içinde damlacık oluşmasını engeller ve olası enfeksiyöz ajan bulaşından korur.

Kapağı açık tutulan tüplerde karbondioksit kaybına bağlı olarak pH artar. pH artışı bazı testlerde hatalı sonuçların (pH [artar], iyonize kalsiyum [azalır], asit fosfataz aktivitesi [azalır]) alınmasına neden olur. Tüp kapağının santrifüj sırasında kapalı tutulması buharlaşmaya bağlı analit konsantrasyonlarındaki değişiklikleri de engeller (10).



Şekil 13. Santrifüje tüpler kapakları kapalı şekilde karşılıklı dengeli olarak yerleştirilmez.

5. SANTRİFÜGASYON SIRASINDA DİKKAT EDİLECEK NOKTALAR

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

5.1. Doğru Santrifüj Süresi ve RCF Değerinin Seğilmesi

Santrifüjle ayırım iki temel değişkene bağlıdır,

- RCF
- Santrifügasyon süresi.

RCF'nin üst değeri tüp direnciyle sınırlıdır ve çok yüksek değerlerde arttırılamaz. Santrifügasyon süresi en kolay değiştirilen etkindir.

Farklı üreticiler ve kuruluşlar tarafından önerilen santrifügasyon sürelerinde kısmi farklılıklar bulunmaktadır (Tablo 1).

DSÖ bütün kan örneklerinin 15 dakika süreyle santrifüjlenmesini önermektedir (17, 18).

CLSI (H21-A5) sitratlı örneklerin 10-15 dakika arasında santrifüjlenmesini önermektedir (19).

Bununla birlikte santrifügasyon süresinin 7 dakikaya indirilebileceğini bildiren çalışmalar da vardır (20).

Tablo 1. Farklı tüp üreticileri ya da uluslararası kuruluşlarca önerilen santrifügasyon süreleri.

	BD	Greiner	DSÖ	CLSI
--	-----------	----------------	------------	-------------

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre alışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

Serum	10 dk 1300- 2000 xg	10 dk 1800- 2200xg	15 dk 1500xg	Üreticinin uygun gördüğü koşullar
Sitratlı Tüp	15 dk 1500xg	10 dk 1500- 2000xg	15 dk 1500xg	15 dk 1500xg
Heparinli Tüp	10 dk <1300 xg*	15 dk 2200xg	15 dk 1500xg	

*BD firmasının ürettiği jelli ve mekanik ayırıcılı heparinli tüpler farklı santrifüj koşulları gerektirir.

Yüksek RCF değerlerinde santrifüjlenen örneklerde trombosit aktivasyonu gözlemlendiği bildirilmiştir (21). Ancak önerilenden düşük RCF değerlerinde ise, santrifügasyonunun prokoagülan etkisi olduğu bildirilmiştir (22).

5.2. Santrifüj İçi Sıcaklık

Santrifüj çalışırken dönen rotor havayla sürtünerek bir ısının açığa çıkmasına neden olur.

Bu sürtünmeye bağlı olarak gün içinde santrifüj içi sıcaklığın 50 °C düzeylerine ulaşabildiği bildirilmiştir (23). Bu nedenle sıcaklık kontrollü santrifüjlerin kullanılması önerilmektedir. Özellikle ısıya duyarlı ACTH, amonyak, cAMP gibi parametlerin ölçümü için sıcaklık kontrollü santrifüjlerin kullanılması önemlidir. Spesifik bir analiz için spesifik bir sıcaklık belirtilmediği sürece santrifüj sıcaklığı için 20-22 °C'lik ayar önerilmektedir (10,24). Becton Dickinson (BD) SST II Advance serum tüpleri için 20-25 °C arasındaki sıcaklıklarda santrifügasyon önermektedir (25).

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

5.3. Santrifüj Çalışırken Dikkat Edilmesi Gerekenler

Santrifüj sağlam, sallanmayan bir tezgah ya da zemin üzerine dengeli bir şekilde yerleştirilmelidir.

Santrifüj çalışırken başında durulmalıdır.

Beklenmeyen bir ses duyulduğunda, titreşim olduğunda, duman kokusu alındığında ya da duman görüldüğünde, santrifüj durdurma (stop) düğmesinden durdurulmalıdır. Santrifüjün fişini çekmek ya da elektriğini kesmek fren sistemini devre dışı bırakacağı için önerilmez.

Laboratuvarda kullanılan santrifüjler genellikle programlandıkları santrifügasyon süresi tamamlanınca kullanıcıyı sesli olarak uyarırlar. Santrifüj durmadan ve kapak açma uyarısı vermeden kapağı açılmamalı ya da açmaya zorlanmamalıdır.

6. SANTRİFÜGASYON SONRASI DİKKAT EDİLMESİ GEREKENLER

Santrifügasyon sonrasında yapılan uygulamalar ölçülecek parametrelerin dayanıklılıklarını etkilemektedir. Genel kural olarak, santrifügasyon sonrasında elde edilen serum ya da plazmanın, olabildiğince hızlı bir şekilde hücresel elemanlarından ayrılması önerilmektedir. Günümüzde kullanılan jel ayraçlı tüpler serum/plazmanın hücre paketiyle ilişkisini keserek kolaylık sağlamaktadır. CLSI tarafından santrifügasyondan sonra oda sıcaklığında bekletilen ayrılmış serum/plazma örneklerinin 8 saat içinde

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

çalışılması önerilmektedir. Eğer ölçüm 48 saat içinde gerçekleştirilecekse örnekler buzdolabında (2-8 C°) saklanabilir. 48 saatten uzun bir süre sonra çalışılacak örneklerin (serum/plazma) -20 °C'de dondurularak saklanması önerilmektedir. Dondurma işlemini çok hızlı yapan hızlı dondurucuların örneğin yapısını bozabileceği için kullanılması önerilmez. Örnekler yavaş dondurulmalı ve çalışılacağı zaman oda sıcaklığında yavaş çözülmelidir. Çözülen örnek içinde bulanıklık oluşursa örnek santrifüj edilerek presipitatlar çöktürülür ve duru örnekten çalışma gerçekleştirilir. Primer tüpte dondurma-çözme işlemi için üretici talimatları izlenmelidir. Aslında her bir analitin dayanıklılığı farklıdır. Aynı analit için farklı ölçüm yöntemlerinde farklı stabiliteler tanımlanmış olabilir. Her laboratuvar tüm erişilebilir kaynaklardan analit stabilitesini kontrol etmeli ve kendi validasyon çalışmalarını yapmalıdır (10).

6.1. Örneklerin Tekrar Santrifügasyonu

Santrifügasyon sırasında yüksek RCF'nin etkisiyle örnek içindeki hücrelerin zar yapıları bozulur. Tekrar santrifügasyon işlemi uygulanırsa sızan hücre içi sıvı serum/plazmaya karışarak analitlerin derişimini değiştirir. Bu nedenle genel bir kural olarak örneklerin tekrar santrifügasyonu önerilmez (10). Eğer tekrar santrifügasyon uygulanacaksa ayrılmış olan serum/plazmanın yeni boş bir tüpe aktarıldıktan sonra santrifügasyonu daha doğru bir uygulama olur.

6.2. Örneklerin Yanışlılıkla Santrifügasyonu

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

Tam kan sayımı, HbA1c, siklosporin gibi K2 veya K3 EDTA'lı tam kandan çalışılan testler için alınan örnekler santrifüjlenmemelidir. Eğer yanlışlıkla santrifügasyon işlemi uygulanırsa zorunlu olan durumlarda örnek atılmamalı, nazikçe yeniden karıştırılmalıdır. Hemoliz ve çökeltme gibi başka bir olumsuz durum gözlemlenmezse örnek çalışabilir (10). Ancak yanlışlıkla santrifüj edilmiş örneklerden potasyum çalışılması önerilmez (26).

Yanlışlıkla santrifüj edilen tam kan örneklerinde trombosit değerlerinin düştüğü bildirilmiştir (27).

Yanlışlıkla santrifüj edilen HbA1c örneklerinde değişiklik gözlenmediği belirtilmiştir (10).

6.3. Santrifüj Bakımı

Santrifüjler çalışırken ortamdaki tozları üzerinde ve içinde biriktirirler. Bu birikintiler zaman içinde hem santrifüjün performansının düşmesine hem de ciddi arıza ve kazalara neden olabilir. Bunun yanı sıra günlük kullanım içinde santrifüj içine yerleştirilen sıvılardan sızma ya da damlama nedeniyle santrifüj kirlenebilir. Bu nedenle santrifüjlerin günlük olarak temizlenmesi pek çok üretici tarafından önerilir. Santrifüjün dış yüzeyleri, kazanı rotorun ulaşılabilen yerleri, silinerek temizlenmelidir (*Şekil 14*) (28).

Santrifüjlerin dengede durup durmadıkları belirli aralıklarla terazileri alınarak denetlenmelidir.

Üretici tarafından verilen kullanım kılavuzları dikkatli okunmalı ve kılavuzdaki öneriler uygulanmalıdır.

Üreticinin önerdiği aralıklarla cihazların periyodik bakımları ve kontrolleri yapılmalıdır. Santrifüjün saatinin doğruluğu kullanıcı tarafından kronometre kullanılarak denetlenebilir. Ancak hızının doğruluğunun denetlenmesi için takometre gibi özel araç gereçler kullanılmaktadır. Santrifüjlerin hızları belirlenen aralıklarla ya da gerek görüldüğünde bu konuda eğitim almış teknik personel yardımıyla test edilmeli, eğer gerekiyorsa kalibrasyonları yapılarak kayıtları tutulmalıdır.



Şekil 14. Günlük santrifüj temizliği

7. ÖZET

1. Tüp ve santrifüj üreticilerinin uyarıları dikkatli okunmalı ve uygulanmalı,
2. Ayarlamalar RCF üstünden yapılmalı,
3. Tüpler önerilen sürede, oda sıcaklığında bekletilmeli,
4. Tüpler dik konumda bekletilmeli,
5. Tüplerin kapakları her zaman kapalı olmalı,
6. Tüpler santrifüj içine dengeli yerleştirilmeli,
7. Tüp içindeki artık pıhtılar çubukla alınmamalı,
8. Tüpler tekrar santrifüj edilmemeli (özel durumlar dışında),
9. Santrifüjün günlük temizliği ve periyodik bakımları yapılmalıdır.

8. KAYNAKLAR

1. <https://www.tekniskamuseet.se/lar-dig-mer/svenska-uppfinnare-och-innovatorer/gustaf-de-laval/mjolkseparatorn-och-angturbinen/>
2. <https://www.labmanager.com/labproduct/2010/05/evolution-of-the-lab-centrifuge#.WG9-hvmLTcs>
3. Heilbron JL. The Oxford Companion to the History of Modern Science. Oxford University press. 2003.
4. Carl A. Burtis, David E. Brunz. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 7th Edition. Saunders Elsevier. 2015.
5. Richard A. McPherson, Matthew R. Pincus. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 22e 22nd Edition. Elsevier Saunders. 2011.
6. Mutahhar Yenson. Klinik Biyokimya Laboratuvar Çalışmaları. 6. Baskı. Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş. 1986.
7. Shauna C. Anderson, Susan Cockayne. Clinical chemistry concepts and applications. Revised Edition Waveland Press. 2003.
8. Keith Wilson, John Walker. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 7th Edition. Cabridge Universty Press. 2010.

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

9. <https://thermofisher.co.nz/Uploads/file/Scientific/Applications/Equipment-Furniture/Practical-Techniques-for-Centrifugal-Separations.pdf> erişim 03.10.2016.
10. CLSI. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guideline—Fourth Edition. CLSI document GP44-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute: 2010.
11. <https://www.ibms.org/resources/documents/centrifugation/> erişim 03.10.2016.
12. <http://www.hettweb.com/mobile-app> erişim 03.10.2016.
13. Türk Biyokimya Derneği Venöz Kan Alma Kılavuzu. TBD. 2015. ISBN 978-605-87229-3-4.
14. Guyton AC. Human Physiology and Mechanisms of Disease. 4th ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders; 1987:220-221.
15. Nosanchuk JS. False increases in troponin I attributable to incomplete separation of serum. Clin Chem. 1999; 45: 714.
16. https://www.gbo.com/fileadmin/user_upload/Downloads/Brochures/Brochures_Preanalytics/English/980102_Handhabungsempfehlunen_rev09_0314_e_lowres.pdf erişim 03.10.3016.
17. http://www.who.int/medical_devices/innovation/core_equipment/en/index1.html erişim 03.10.2016.

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

18. WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations. WHO/DIL/LAB/99.1/Rev2. 2002.
19. CLSI. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assay; Approved Guideline—Fifth Edition. CLSI document H21-A5. Wayne, PA: 2008.
20. Anna C. Söderström, Mads Nybo. The effect of centrifugation speed and time on pre-analytical platelet activation. Clin Chem Lab Med. 2016;5:26.
21. Söderström AC, Nybo M, Nielsen C, Vinholt PJ. The effect of centrifugation speed and time on pre-analytical platelet activation. Clin Chem Lab Med. 2016;26:0079.
22. Virtudes Vila-Liante¹, Verónica Sánchez-López. Impact of sample processing on the measurement of circulating microparticles: storage and centrifugation parameters. Clin Chem Lab Med. 2016;5:6.
23. Fatma Meriç Yılmaz, Serkan Kiral. An underestimated preanalytical error source: Centrifuge temperature. Turk J Biochem.2013;38; 356-359.
24. O'Keane MP, Cunningham SK. Evaluation of three different specimen types (serum, plasma, and serum gel separator) for analysis of certain analytes: clinical significance of differences in results and efficiency in use. Clin Chem Lab Med. 2006;44:662-668.
25. <http://cms.bd.com/resource.aspx?IDX=34369>

Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu

Tarafından Hazırlanmıştır

2017- ANKARA

26. Hue DP, Culank LS, Toase PD, Maguire GA. Observed changes in serum potassium concentration following repeat centrifugation of Sarstedt Serum Gel Safety Monovettes after storage. *Ann Clin Biochem.* 1991;28:309-310.
27. Juliane Suchsland, Nele Friedrich. Optimizing centrifugation of coagulation samples in laboratory automation. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52: 1187–1191.
28. [https://online-shop.eppendorf.it/eshopdownload/download bykey/ 64426_73](https://online-shop.eppendorf.it/eshopdownload/download%20by%20key/64426_73) erişim 03.10.2016.

