



TBD
Preanalitik Evre Sempozyumu
19-20 Mayıs ADANA

Preanalitik Evrede Santrifüjün Önemi

Alper Gümüş
Haseki EAH
Tıbbi Biyokimya Lab.

Sunum Planı

- Terimler
- Santrifüjün çalışma ilkesi
- Neden santrifüje gereksinim duyuyoruz
- Tıbbi laboratuvarlarda santrifüj kullanımını
 - Santrifüj öncesi önemli noktalar
 - Santrifüjleme sırasında dikkat edilmesi gerekenler
 - Santrifüj sonrası dikkat edilmesi gerekenler

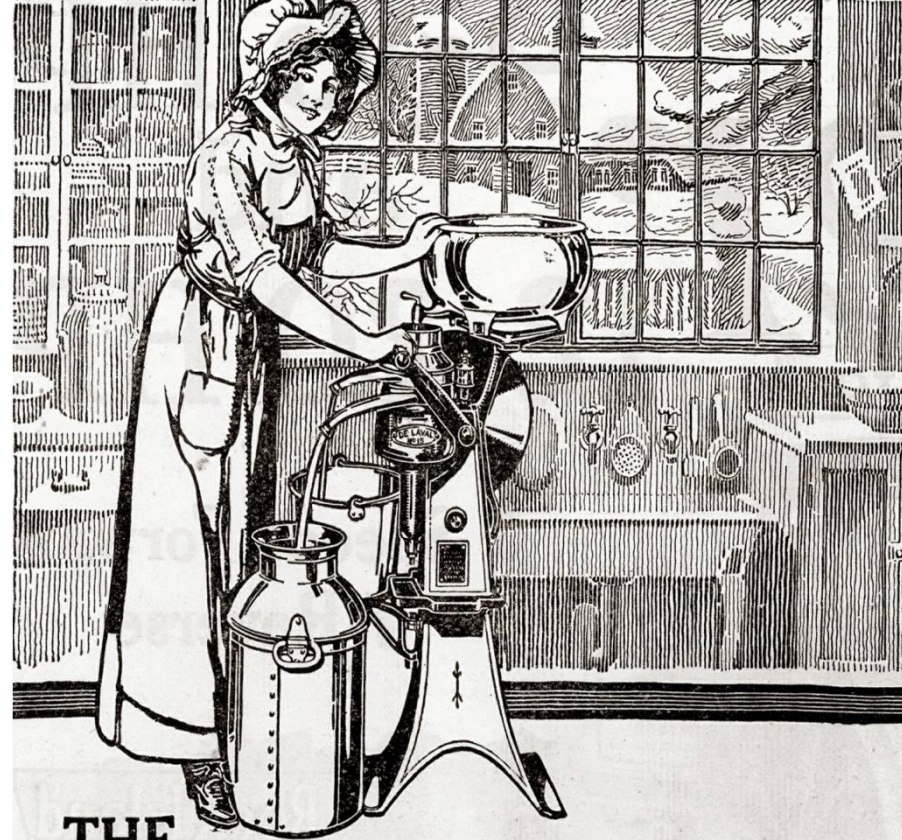
Terimler

- Santrifüjleme (Santrifugasyon, Centrifugation):
 - Temel olarak bir **ayırıştırma** yöntemidir. Dönme hareketinin oluşturduğu ivme kullanılarak karışım veya süspansiyonlar yoğunluklarına göre ayrıştırılır.
- Santrifüj (Centrifuge): Santrifüjleme işleminin gerçekleştirildiği **cihazın adıdır**.
- Santrifüj etmek mi?, Santrifüje koymak mı?
- Sediment, pellet, presipitat, çökelti / çökelek
- Supernatant



Santrifüjün Tarihçesi

- 1864 Antonin Prandtl, 1897 Gustaf De Laval: Sütün yağını dönme hareketini kullanarak ayrıştırabilen makineler geliştirdiler.

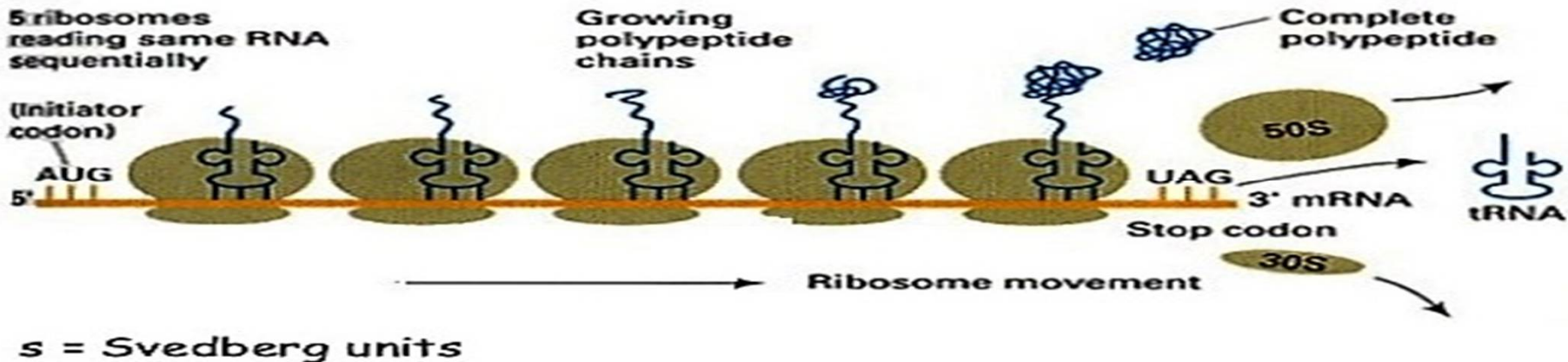


THE

NEW DE LAVAL
CREAM SEPARATOR

Santrifüjün Tarihçesi

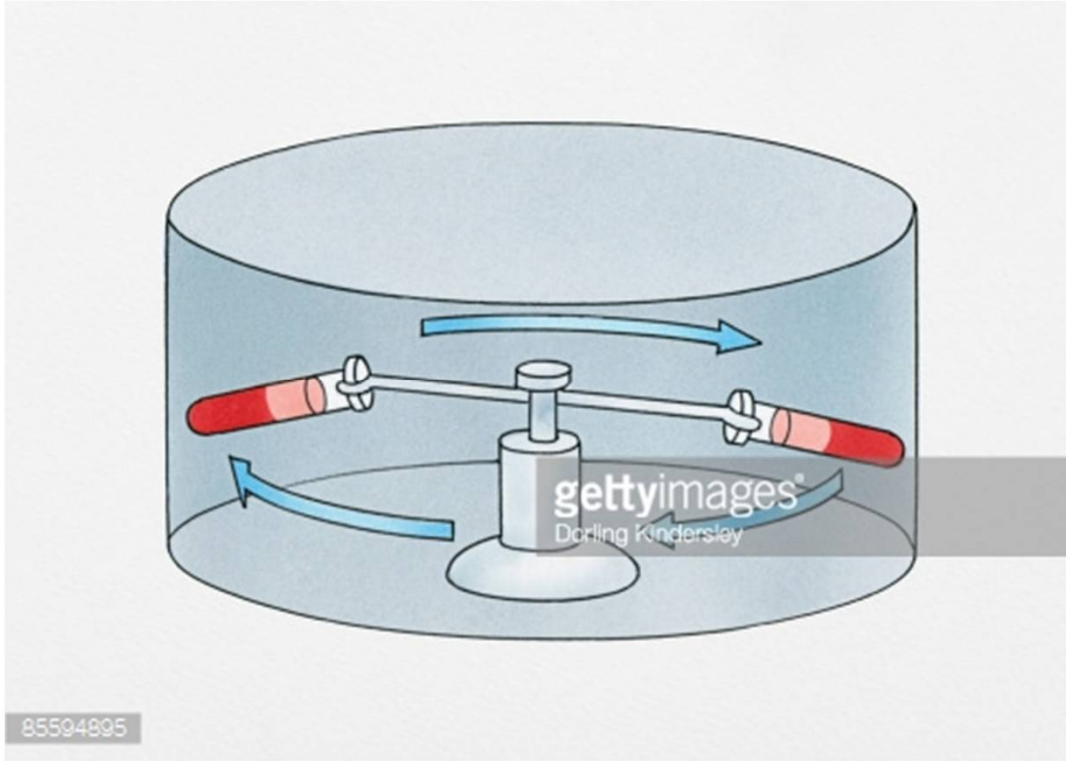
- 1869 Friedrich Miescher: Hücrelerin orgenellerini ve nükleik asitleri santrifüj kullanarak ayrıştırdı. DNA keşfinde kilometre taşlarından biri oldu.
- 1920 Theodor Svedberg: Ultrasantrifüjü geliştirdi.



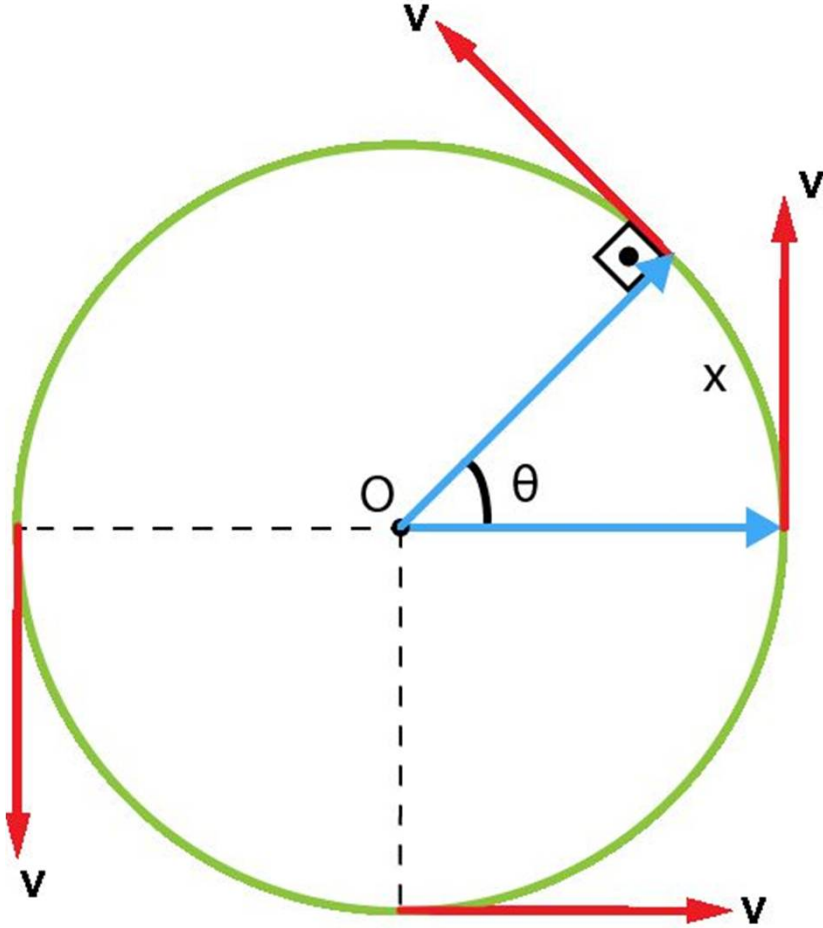
Santrifüjün Tarihçesi

- 1949 Spinco Şirket'i dakikada 40000 devir yapabilen santrifüjler geliştirdi ve 1950 Beckman Coulter tarafından satın alındı.
- 1962 Eppendorf mikrosantrifüjü geliştirdi
- 1976 Hettich mikroişlemcili santrifüjleri piyasaya sürdü.

Santrifüjün Parçaları




Santrifüjün Çalışma İlkesi



- Hız Vektörü
- Periyot ve frekans
- Çizgisel hız
- Açısal hız
- Rölatif santrifüj kuvveti (RCF), (g kuvveti)
- RPM (Rotation Per Minute): Dakikadaki dönme sayısı
- RCF (Relative Centrifugal Force): Rölatif santrifüj kuvveti
- g : yer çekimi katsayısı

RCF ampirik midir, hesaplanabilir mi ?

Tietz Fundamentals of
CLINICAL
CHEMISTRY
AND
MOLECULAR
DIAGNOSTICS



RCF is calculated as follows:

$$\text{RCF} = 1.118 \times 10^{-5} \times r \times \text{rpm}^2$$

where

1.118×10^{-5} = an empirical factor;



(a) Calculating RCF

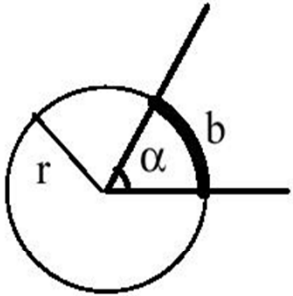
$$\text{RCF} = 1.118 \times 10^{-5} \times r \times n^2$$

where:

r = rotating radius (cm); and
 n = speed of rotation (RPM).

RCF ve RPM arasındaki ilişki

$$\alpha = \frac{b}{r}$$

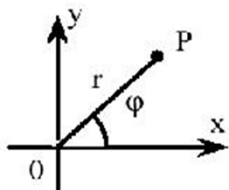
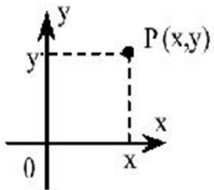


$$b = U \cdot \frac{\alpha}{360} = 2\pi \cdot \frac{\alpha}{360}$$

$$\frac{b}{r} = \frac{2\pi \cdot \frac{\alpha}{360}}{r} = 2\pi \cdot \frac{\alpha}{360}$$

$$\frac{b}{r} = \frac{2\pi \cdot 60}{360} = 2\pi \cdot \frac{60}{360} = \frac{\pi}{3} = 1,047 \text{ rad}$$

$$\alpha = \frac{b}{r}, \quad [\alpha] = \text{rad}$$



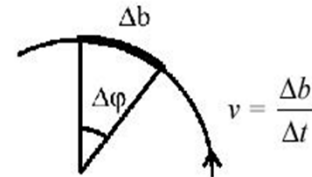
$$v = \frac{\Delta s}{\Delta t}$$

$$\omega = \frac{\Delta \varphi}{\Delta t}$$

$$\omega = \frac{\Delta \varphi}{\Delta t} = 2\pi / T$$

$$f = \frac{1}{T}$$

$$\omega = \frac{2\pi}{T} = 2\pi \cdot \frac{1}{T} = 2\pi f$$



$$\Delta b = 2\pi r \text{ und } \Delta t = T.$$

$$v = \frac{\Delta b}{\Delta t} = 2\pi \cdot r / T = \omega \cdot r$$

$$\vec{v} = \frac{\vec{s}}{t}$$

$$v = \frac{s}{t}$$

$$\vec{a} = \frac{\Delta \vec{v}}{\Delta t}$$

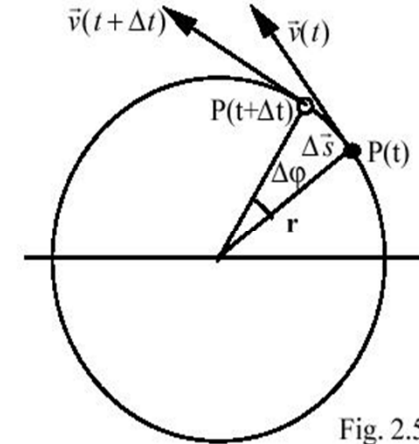
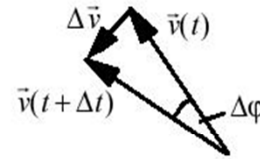


Fig. 2.5a



$$\frac{\Delta s}{r} = \frac{\Delta v}{v}$$

$$\Delta s = v \cdot \Delta t \quad \Delta v = a \cdot \Delta t$$

$$\frac{v \cdot \Delta t}{r} = \frac{a \cdot \Delta t}{v}$$

$$a = \frac{v^2}{r} \quad v = \omega r$$

$$a = \omega^2 \cdot r$$

$$\omega = \frac{2\pi}{T} \quad T = \frac{60 \text{ sn}}{\text{RPM}}$$

$$\omega^2 = \left(\frac{2\pi \text{ RPM}}{60} \right)^2$$

$$a = \left(\frac{2\pi \text{ RPM}}{60} \right)^2 \cdot r$$

$$x \text{ g} = \frac{\left(\frac{2\pi \text{ RPM}}{60} \right)^2 \cdot r}{980 \text{ cm/sn}^2}$$

Diğer Çözüm

$$F_z = m \cdot a_z = m \cdot \frac{v^2}{r} = m \cdot \omega^2 \cdot r$$

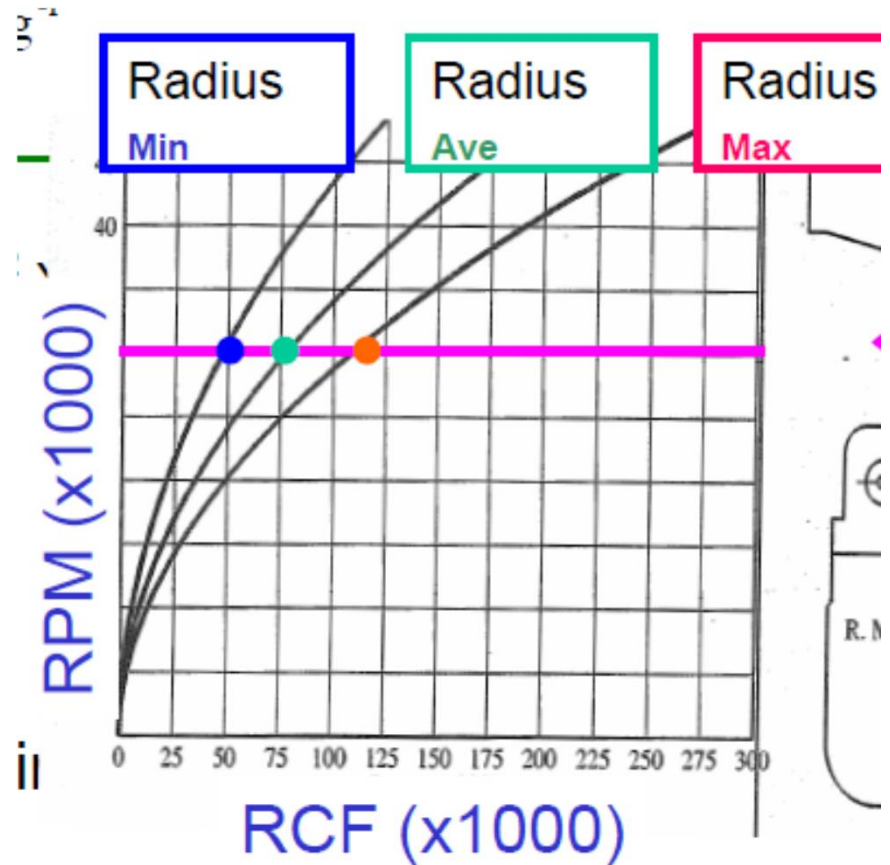
$$m \cdot g = m \cdot \omega^2 \cdot r$$

Dönme hareketinin gerçekleşebilmesi için oluşması gereken kuvvet

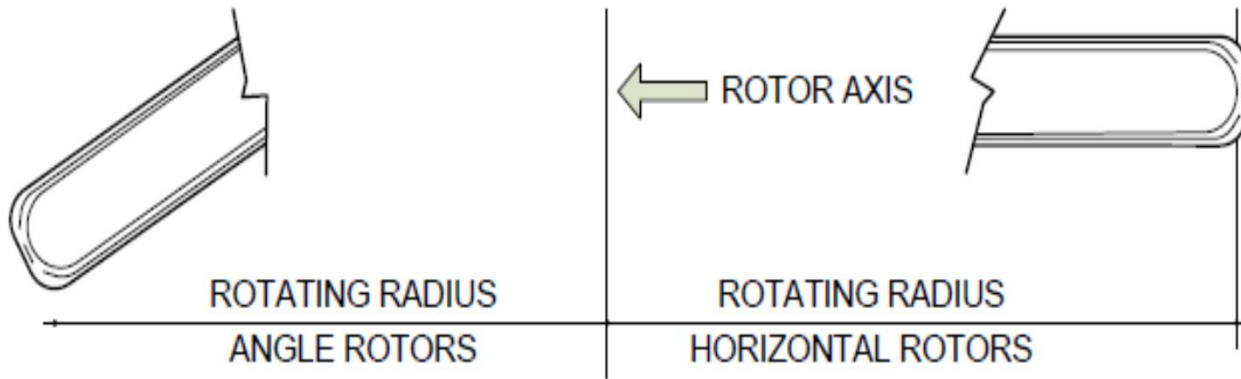
RCF mi ?, RPM ?

Farklı santrifüjlerin yarıçap uzunluklarıda farklı olabildiği için RPM üzerinden hesap yapmak standart olmamaktır.

RCF farklı santrifüjlerde aynı ivmenin elde edilmesini sağlamaktadır.



Yarı Çapı Nereden Ölçelim ?



Rotations radius (cm)

Example

To find the relative centrifugal force at a radial distance of 10 cm from the center of rotation when operating the centrifuge at a speed of 3000 r.p.m., place a straightedge on the chart connecting the 10 cm point on the Rotating Radius Scale (A) with the 3000 r.p.m. point on the Speed Scale (B). Read the point at which the straightedge intersects the Relative Centrifugal Force Scale (C) – in this case, 1000 x gravity.

Similarly, if the desired r.c.f. is known, the necessary speed for a given rotating radius may be determined by connecting the two known points and reading the intersection of the straightedge with the Speed Scale.

Equation for Calculating R.C.F.

$$\text{R.C.F.} = .00001118 \times r \times N^2$$

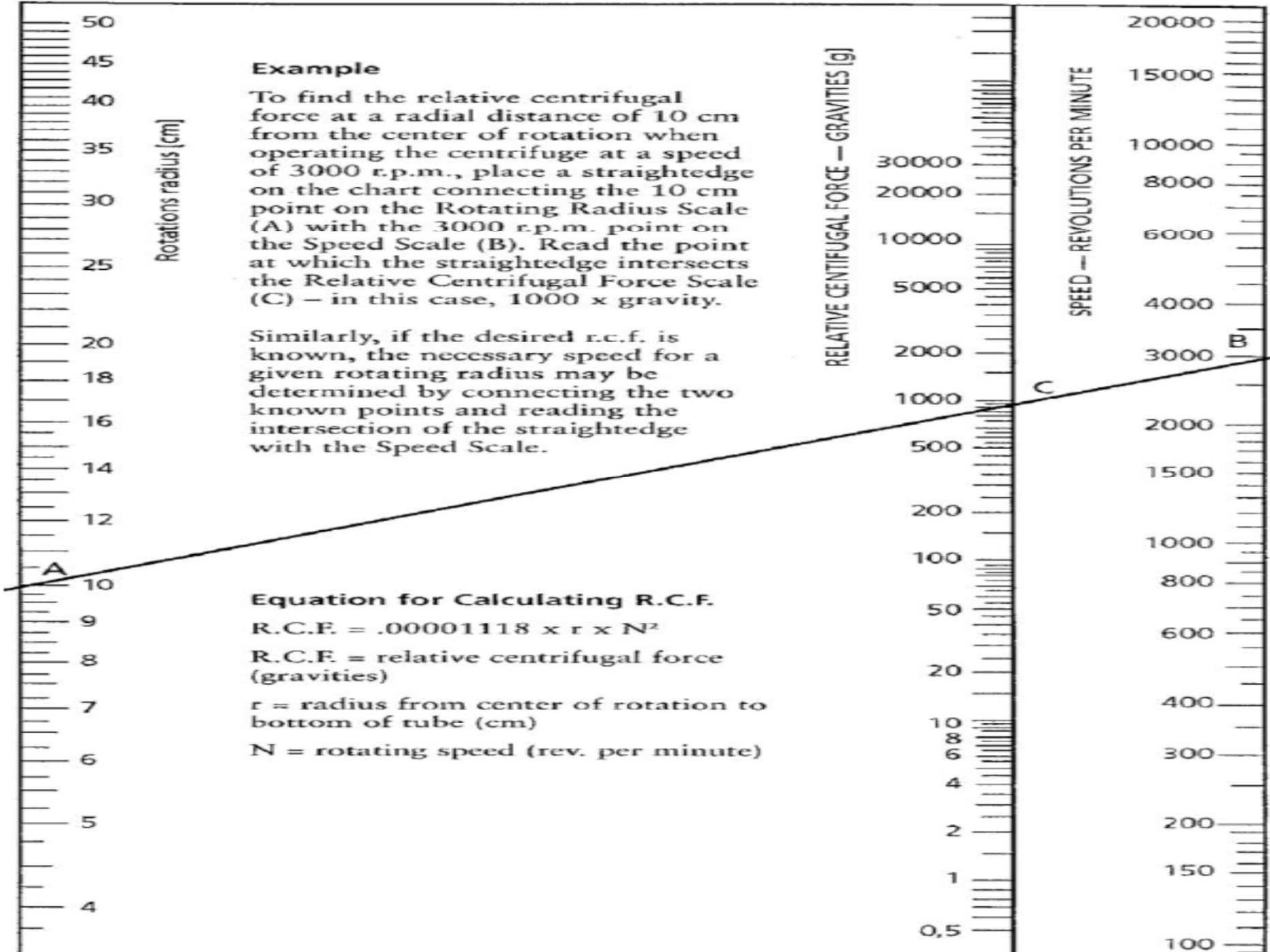
R.C.F. = relative centrifugal force (gravities)

r = radius from center of rotation to bottom of tube (cm)

N = rotating speed (rev. per minute)

RELATIVE CENTRIFUGAL FORCE — GRAVITIES [g]

SPEED — REVOLUTIONS PER MINUTE



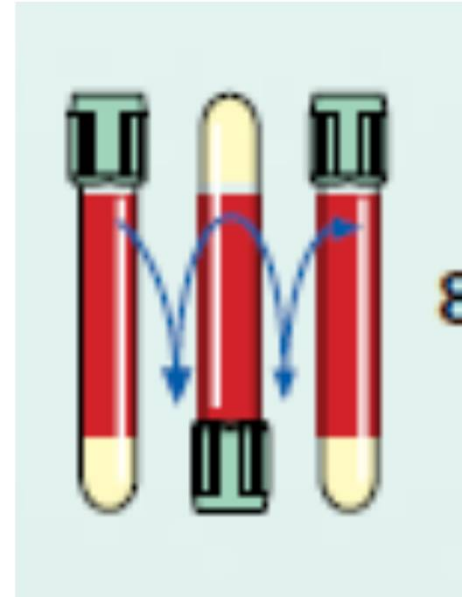
Hızlarına Göre Santrifüjlerin Sınıflandırılması

- **Çok düşük hızlı santrifüjler (RCF<4000xg)**
 - Tıbbi laboratuvarlarda örnek hazırlama
- **Düşük hızlı santrifüjler (RCF 5000-10000xg)**
 - Kan bankacılığında Eritrosit Süpansiyonu, Taze Donmuş Plazma hazırlama
- **Yüksek hızlı santrifüjler (RCF 10000-50000xg)**
 - DNA, RNA çalışmaları
- **Ultrasantrifüjler (RCF 100 bin-1 milyonxg)**

Santrifüj Öncesi Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar

Kan Alırken Dikkat Edilecekler

- Hangi örnek hangi tüpe alınacak kontrol edilmeli
- Doğru etiketleme yapılmalı
- Üreticinin önerdiği kan alma ekipmanı kullanılmalı
- Katkılı tüpler nazikçe alt üst edilerek karıştırılmalı
 - Sitratlı tüplerde 3-4 defa,
Diğer tüplerde 10 defa



Ne Zaman Santrifüj Etmeli?

- Plazma elde etmek için EDTA'lı, heparinli, floridli veya sitratlı örnekler bekletilmeden santrifüj edilebilirler.
- Serum örnekleri,
 - Tüpün türüne göre üreticinin önerdiği sürede
 - Oda sıcaklığında
 - Pıhtılaşma tamamlanıncaya kadar bekletilmelidir.

TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU

İZLEME, ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME KURUM BAŞKAN YARDIMCILIĞI
VERİMLİLİK VE KALİTE YÖNETİMİ DAİRE BAŞKANLIĞI

VERİMLİLİK GÖZLEMCİSİ YERİNDE DEĞERLENDİRME REHBERİ

SORU: Kan alma birimi konumu ve işleyişi uygun şekilde düzenlenmiş mi?

SIRA : 37
BÖLÜM ADI : POLİKLİNİK
BÖLÜM SIRA NO : 13
BOYUTLAR : HED, YPYD, HDB, HAH

Kan alma biriminde çalışılan laboratuvar testlerinin sonuç verilme süreleri hastaların görebileceği şekilde ilan edilmeli, Hastalardan alınan numuneler, numunenin cinsine uygun ekipmanla, numune taşıma personeli veya pnömatik sistem aracılığıyla en geç 30 dk. içinde laboratuvara ulaştırılmalıdır kriterleri göz önüne alınarak değerlendirilmelidir.

Gecikmiş Pıhtı Oluşumu

- En önemli preanalitik hata kaynaklarından biridir. Örnek içindeki pıhtı **analizörlerin** prob ve tubinglerinde **tıkanmaya** ve ölçüm sırasında **girişime** (örn: **Troponin I/T**) neden olabilmektedir.
- Katkısız düz tüplerde pıhtılaşma oda sıcaklığında **1 saat** içinde tamamlanır.
- Yetersiz tüp içi pıhtılaşmaya yol açan durumlar
 - Örneğin buz dolabında bekletilmiş olması
 - Antikoagulan tedavi
 - Kısa süre bekletme

Tüp İçi Pıhtılaşma Süresini Kısaltan Tüpler Ve Kullanımı

- Tüp içi pıhtılaşma süresi laboratuvarlardaki test döngüsünü uzatan önemli bir etkidir.
- Bu sürenin kısaltılması için pıhtılaşma **etkinleştirici (aktivatör)** veya **hızlandırıcı (akseleratör)** tüpler kullanıma sunulmuştur.
 - Cam veya silika kaplı tüpler : 15-30 dk.
 - Trombin katkılılar : 5 dk.
 - Yılan zehiri katkılılar : 2 dk.

Tüplerin Bekletme Konumu

- Tüpler taşınırken veya pıhtılaşmanın tamamlanması için bekletilirken mutlaka **dik konumda** bekletilmelidir.
 - Yatık olarak bekletilen tüplerde oluşan pıhtı tüp kapağına veya yan cidarlara yapışabilir ve santrifüj edilmesine rağmen serumdan ayrılmayabilir.
 - Hem artık pıhtı hem de hemoliz olasılığını arttıran bir durumdur.



Tüp kapağına yada iç cidarlarına yapışmış pıhtının tahta veya benzeri çubuk ile alınması önerilmemektedir.

- Bu işlem santrifüj sırasında **hemoliz** oluşma olasılığını arttırmaktadır.

Tüp Kapakları Her Zaman Kapalı Tutulmalıdır.

- Tüp içindeki sıvının buharlaşmasını engeller, santrifüj içinde damlacık oluşumunu ve olası enfeksiyöz ajan bulaşını engeller
- Kapağı açık tutulan tüplerde
 - Buharlaşmanın miktarına göre tüm analitler konsantre olur
 - İyonize kalsiyum ↓
 - Asit fosfataz ↓

Yanlışlıkla Santrifüj Edilen Örnekler

- Tam kan sayımı, HbA1c, siklosporin gibi tam kandan çalışılan testler için alınan örnekler santrifüj edilmemelidir.
- Eğer yanlışlıkla santrifüj istemi uygulanırsa örnek atılmaz örnek nazikçe tekrar karıştırılır olumsuz başka bir durum gözlenmezse çalışılabilir.
- Yanlışlıkla santrifüj edilen Tam Kan Örneklerinde trombosit değerlerinin düştüğü bildirilmiştir.
- Yanlışlıkla santrifüj edilen HbA1c örneklerinde değişiklik gözlenmediği belirtilmiştir.

Tüpler Santrifüje Yerleştirilirken

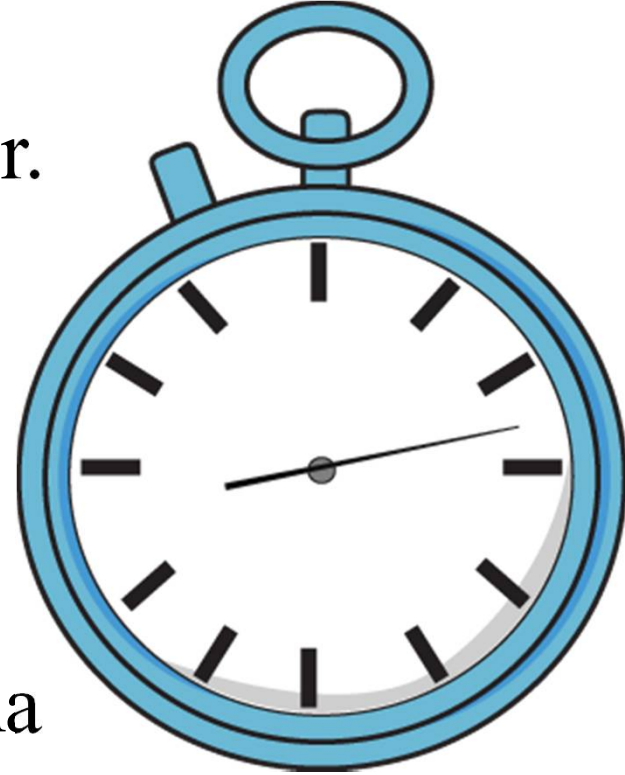
- Etiketli olmalı
- Katkılı tüplerde örnek miktarı kontrol edilmeli
- Tüplerin ağızları kapalı olmalı
- Tüpler santrifüj kefelere karşılıklı dengeli olacak şekilde yerleştirilmeli. Gerekiyorsa denge tüpü kullanılmalı.

Ne Kadar Süre Santrifüj Etmeli ?

- Santrifüjle ayırım iki temel değişkene bağlıdır
 - RCF
 - Santrifüjleme süresi
- RCF tüplerin direnciyle sınırlıdır ve çok yüksek arttırılamaz
- Süre en kolay deęiştirilen faktördür

Ne Kadar Süre ve hangi RCF'de Santrifüj Etmeli ?

- WHO örneklerin 15 dakika santrifüj edilmesini önermektedir.
- CLSI (HA18-A3) **10-15 dakika** arasında santrifüj edilmesini önermektedir.
- Santrifüj süresinin 7 dakikaya indirilebileceğini bildiren çalışma vardır.



	BD	Grenier	WHO	CLSI
Serum	10 dk 1300xg	10 dk 1800-2200xg	15 dk 1500xg	
Sitratlı tüp	15 dk 1500xg	10 dk 1500-2000xg	15 dk 1500xg	15 dk 1500xg
Heparinli Tüp	10 dk 1100xg	15 dk 2200xg	15 dk 1500xg	

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° civarına çıktığı bildirilmiştir.
- Sıcaklık kontrollü santrifüjlerin kullanılması önerilmektedir.



Santrifüj Çalışırken Dikkat Edilecek Noktalar



- Santrifüj **sağlam, sağlamayan** bir tezgah/zemin üzerinde dengeli bir şekilde durmalıdır.
- Santrifüj çalışırken başında durulması önerilmektedir.
- Beklenemeyen bir ses duyulduğunda yada durum olduğundan cihaz stop düğmesinden durdurulmalıdır (Fişini çekmek elektiriğini kesmek fren sistemini devre dışı bırakacağı için önerilmez).
- Cihaz durmadan kapak açma uyarısı vermeden cihaz kapağı açılmamalı veya açmaya zorlanmamalıdır.

Örnekleri Tekrar Santrifüj Edelim mi ?

- Tekrar santrifüj işlemi önerilmemektedir.

Özet

- Ayarlamalar RCF üstünden yapılmalı
- Tüp ve santrifüj üreticilerinin talimatları dikkatli okunmalı ve uygulanmalı
- Tüpler önerilen süre bekletilmeli
- Tüpler dik konumda bekletilmeli
- Tüplerin kapakları her zaman kapalı olmalı
- Tüp içindeki artık pıhtılar çubukla alınmamalı
- Tekrar santrifüj edilmemeli

Kaynaklar

- CLIS, GP44-A4 (Formerly H18-4): Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guideline—Fourth Edition 2010
- www.bd.com/vacutainer/faqs
- www.sigmaaldrich.com/content/.../1/biofiles_v6_n5.pdf
- https://www.gbo.com/fileadmin/user_upload/Downloads/Brochures
- Yılmaz FM, Kırıl S. An underestimated preanalytical error source: Centrifuge temperature. Turk J Biochem, 2013; 38: 356–359