

Tıbbi Laboratuvarlarda Kan Sayımı Kılavuzu: Preanalitik Değişkenlerin Etkisi





**Türk Biyokimya
Derneği**



**Türk Biyokimya
Derneği**

Tıbbi Laboratuvarlarda Kan Sayımı Kılavuzu: Preanalitik Değişkenlerin Etkisi

*Türk Biyokimya Derneği Preanalitik Evre Çalışma Grubu tarafından hazırlanmıştır.
2020-Ankara
ISBN: 978-605-70111-0-7*

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

Tel: 0 312 447 09 97
Fax: 0 312 447 09 63
Basım yılı 2020

HAZIRLAYANLAR

Fehime Benli Aksungar

Fatma Demet Arslan

Esin Avcı

Güzin Aykal

Cihan Coşkun

İpek Çınaroğlu

Ayfer Çolak

Pınar Eker

Funda Güçel

Alper Gümüş

Aylin Haklıgör

Berrin Berçik İnal

Bađnu Orhan

Çiđdem Sönmez

Mehmet Şeneş

Fatma Taneli

Canan Yılmaz

İÇİNDEKİLER

Kısaltmalar.....	8
1. GİRİŞ	9
2. GENEL BİLGİLER	9
2.1. Kanın Yapısı, Hücresel Bileşenleri	9
2.2. Kan sayımı yönteminin gelişimi:	14
3. OTOMATİK KAN SAYIMI CİHAZLARININ ÇALIŞMA PRENSİPLERİ.....	16
3.1. Kan Sayımında Empedans Yöntemi (Coulter Yöntemi)	16
3.2. Kan Sayımında Akan Hücre Ölçer (Flowcytometry) Yöntemi	18
3.3. Tam Kan Sayımı Parametrelerinin Hesaplanması	20
4. TAM KAN SAYIMI İÇİN VENÖZ KAN ALMA.....	25
4.1. Hasta Hazırlığı.....	25
4.1.1. Postür	25
4.1.2. Egzersiz	25
4.1.3. Sirkadiyen Ritm.....	25
4.1.4. Stres.....	25
4.1.5. Diyet	25
4.1.6. Sigara İçme.....	26
4.2. Tam Kan Sayımı İçin Kullanılacak Kan Alma Ekipmanları	26
4.2.1. Kan Alma Tüpleri	26
4.2.2. Tüp Katkı Maddeleri: Antikoagülanlar	26
4.2.3. Yetersiz Numune Hacmi.....	27
4.2.4. Kan alma iğnesi.....	28

4.3. Tam Kan Sayımı İçin Venöz Kan Alma	29
4.3.1. Kan alma personeli	29
4.3.2. EDTA'lı tüpe kan alma sırası	29
4.3.3. EDTA'lı tüpün alt üst edilmesi	30
4.3.4. EDTA'ya bağlı yalancı trombositopeni (psödotrombositopeni).....	30
4.3.5. Kan Alma İşleminin Etkisi	31
4.3.6. Kan Hacmi.....	31
5. NUMUNELERİN TRANSFERİ.....	32
6. NUMUNENİN DEPOLANMASI.....	33
6.1. Tam kan sayımı testi çalışma süresi ve örneklerin saklama koşulları.....	33
7. NUMUNE RET KRİTERLERİ.....	33
7.1. Pıhtılı örnek.....	34
7.2. Hemoliz.....	35
7.3. İkter (Biluribinemi).....	36
7.4. Lipemi	37
7.5. Soğuk Aglutininler	39
Kaynaklar:.....	41

Kısaltmalar

ADP: Adenozin di-phosphate

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit (C₁₀H₁₆N₂O₈)

ESR: Eritrosit sedimantasyon hızı

HCT: Hematokrit

HGB: Hemoglobin

K₂EDTA: Di-potasyum EDTA

K₃EDTA: Tri-potasyum EDTA

LD: Lower detection limit, alt saptama eşiği

MCH: Mean corpuscular hemoglobine, ortalama eritrosit hemoglobin

MCHC: Mean corpuscular hemoglobine concentration, tek bir kırmızı kan hücresinin içindeki ortalama hemoglobin miktarı

MCV: Mean corpuscular volume, ortalama alyuvar büyüklüğü

MPV: Mean platelet, volume, ortalama trombosit hacmi

Na₂EDTA: Di-sodyum EDTA

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NK: Natural killer

PCT: Plateletcrit, trombosit hacminin trombosit sayısına bölünmesiyle elde edilir

PDW: Platelet distribution width

PET: Polietilen tetraftalat

PLT : Platelet, trombositler, kan pulcukları

PMN: Polimorf nüveli

PP: Polipropilen

RBC: Red blood cell, alyuvar, eritrosit

RDW: Red cell distribution width, eritrosit dağılım genişliği

UD: Upper detection limit, üst saptama eşiği

VLDL: Very low density lipoprotein

WBC: White blood cell, alyuvar, lökosit

1. GİRİŞ

Ölçüm teknolojilerinin ilerlemesiyle otomatik analizörler elle yapılan işlemlerin yerini alarak analitik hataları azaltmıştır. Ancak hastanelerde test istem sayılarının, buna bağlı olarak da tıbbi laboratuvarlara kabul edilen örneklerin artmasıyla, toplam süreç içinde preanalitik aşama hataya daha açık duruma gelmiştir. Günümüzde test sonuçlarına etki eden hataların büyük çoğunluğu preanalitik aşamada gerçekleşmektedir (1). Çalışılan testler arasında en çok ölçümü yapılanlardan birisi de tam kan sayımıdır. Bu nedenle sayısal olarak preanalitik hatalardan en çok etkilenen testlerden birisidir (2). Preanalitik aşama laboratuvar dışında diğer bölümlerin de katılımını gerektirdiği için yönetimi zordur. Tam kan sayımı testini etkileyen değişkenlerin bilinmesi, preanalitik hataların önlenmesi için büyük önem taşımaktadır. Bu konu ile ilgili talimatların oluşturulması, uygulanması laboratuvar yönetiminin sorumlulukları arasındadır. Bu kaynak tüm tıbbi laboratuvar çalışanları, hemşireler, flebotomistler, öğrenciler, araştırmacılar için kullanışlı, uygulanabilir bir kılavuz olması amacıyla hazırlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanın Yapısı, Hücresel Bileşenleri

Kan yaşamsal bir sıvıdır. Kendisi de bir doku olarak tanımlanan kan neredeyse bütün dokuları dolaştığı için kişinin sağlık durumunun değerlendirilmesinde çok önemli bir araçtır. Kanın iki önemli bileşeni vardır;

1. Hücresel bileşenler,
2. Plazma.

Kan sayımı kanın hücresel bileşenlerinin değerlendirilmesinde en çok kullanılan ölçüm yöntemidir.

Alyuvarlar (eritrositler, red blood cell (RBC)): Alyuvarlar iç bükey disk biçiminde çekirdeksiz hücrelerdir. Ortalama çapları 6,2–8,2 μm , hacimleriyse 90 fL'dir (Şekil 1).



Şekil 1. Alyuvarlar (eritrosit) (3)

En önemli görevleri gaz alışverişine aracılık etmektir (4). Hemoglobin bu işlevi yerine getirebilmelerini sağlayan, neredeyse hücre içeriğinin tamamını dolduran bir proteindir. Alyuvarlar hemoglobin aracılığıyla akciğerlerde oksijeni bağlayarak dokulara taşırlar, dokulardan ise karbondioksidi alarak akciğerlere geri dönerler.

Alyuvarlar diğer bütün kan hücreleri gibi kemik iliğinde üretilirler. Retikülosit alyuvarların olgunlaşması sırasında gözlenen çekirdekli bir ara hücredir. Yaşlanan alyuvarların hücre duvarı esnekliği azalır, dalaktan geçişleri sırasında sinüzoidlerden süzülürken yakalanarak yıkılırlar. Alyuvarların dolaşımdaki ortalama ömrü 120 gündür.

Alyuvarlar kan sayımında RBC, hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), Mean Corpuscular Volume (MCV), Red Cell Distribution Width (RDW), Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC) gibi göstergeler aracılığıyla incelenir.

Alyuvar sayısındaki düşme kansızlık (anemi) olarak adlandırılır. Anemiye bağlı olarak kanın oksijen taşıma yeteneği azalır. Alyuvarların sayısında artışın gözlemlendiği durumsa polistemidir, myeloproliferatif bozukluklarda gözlenir.

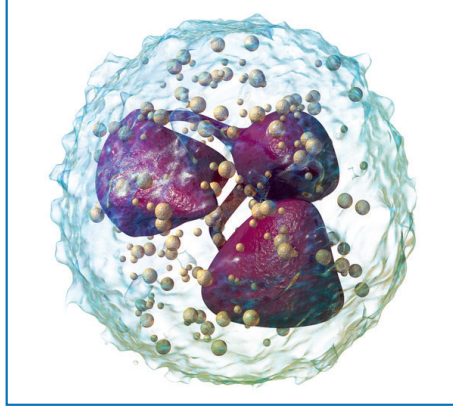
Hemoglobin: Alyuvarların içinde en çok bulunan işlevsel protein hemoglobindir. Hemoglobinin en önemli görevi akciğerlerle dokular arasındaki gaz alışverişine aracılık etmektir, bunun dışında asit baz dengesinin korunması, nitrik oksit (NO) taşınması gibi görevleri vardır. Alyuvarın sitoplazmasının %90'dan çoğunu hemoglobin doldurur. Moleküler ağırlığı 64.000 dalton olan bu protein, çekirdeğinde birer hem halkası taşıyan dört globin zincirinin birleşmesiyle oluşmuş bir tetramerdir. Hem, hemoglobinin işlevsel olan parçasıdır, ortasında bir demir atomunun yerleştiği protoporfirin IX halkasından oluşur. Hemoglobin düzeyinin ölçümü; hem tek başına, hem de pek çok alyuvar göstergesinin hesaplanmasında kullanıldığı için kan sayımının önemli bir parçasıdır (5).

Akyuvarlar (lökositler, White Blood Cell (WBC)):

Akyuvarlar ışık mikroskobu altında alyuvarlara göre renksiz göründükleri için bu adı almışlardır. Işık mikroskobunda görünüşlerine göre beş ayrı türe ayrılırlar.

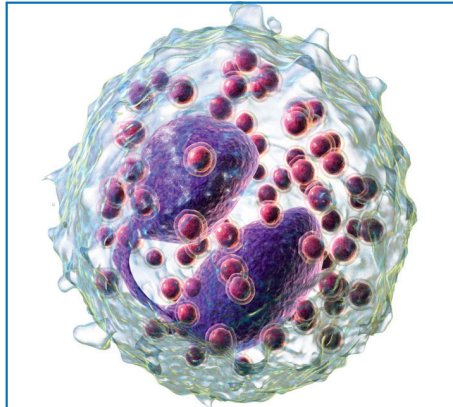
Nötrofiller: Kalıtsal bağışıklığın önemli bir bileşeni olan nötrofiller özellikle mikrobiyal enfeksiyonlara karşı savunmada önemli görev üstlenirler. Dolaşımdaki akyuvarların %50-70'i nötrofillerdir, sayıları ortalama $1.7-7.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ 'dir. Hemotoksilen eosin boyasını silik pembe renkte tutarlar. Nötrofillerin içinde iki tür granül tanımlanmıştır. Birincil granüller azurofilik granüller olarak da bilinirler; içlerinde myeloperoksidaz, elastaz, proteinaz gibi enzimleri bulundurlar.

İkincil granüllerse (özgün granüller) fosfataz, NADPH oksidaz, kollajenaz gibi enzimleri içerirler. Çapları ortalama 12-15 μm arasında değişen nötrofillerin çekirdekleri 2 ile 5 arasında boğumlu yapıdadır (loblu ya da segmentli). Bu nedenle yine mikroskop altında çekirdekleri boğumlu görünen eozinofil ve bazofillerle birlikte polimorf nüveli hücreler (PMN) olarak da adlandırılırlar (4).



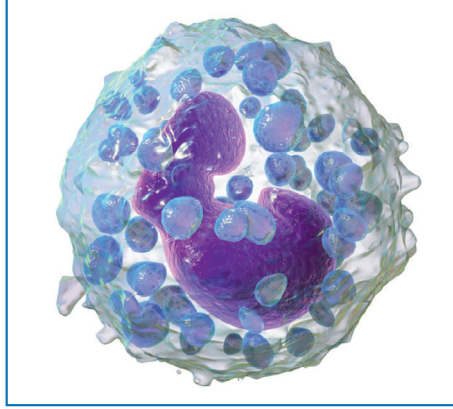
Şekil 2. Nötrofiller (3)

Eozinofiller: Akyuvarların ancak %1-3'ünü oluştururlar, çapları 12-17 μm arasında değişir. Asit boyaları iyi tutarlar, ışık mikroskopunda koyu kırmızı görünürler. Boyayı tutan yapılar granüllerdir; içleri lipaz, DNAaz, plazminojen gibi enzimlerle doludur. Özellikle paraziter enfeksiyonlara karşı savunmada görevlidirler (4). Alerjik durumlarda da sayıları artar.



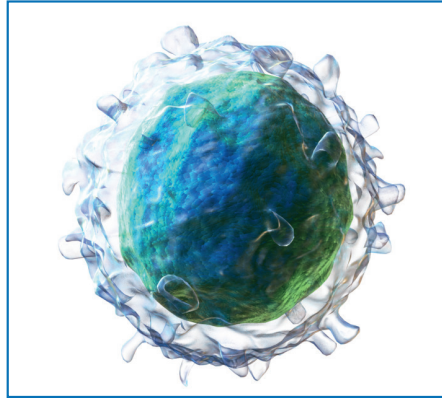
Şekil 3. Eozinofil (3)

Bazofiller: Dolaşımdaki akyuvarların yalnızca %0.5-1'ni bazofiller oluşturur, çapları ortalama 12 μm 'dir. Bazık boyaları iyi tuttıkları için bu adı alırlar, ışık mikroskobu altında mavi renkte görünürler. Granüllerinin içeriğini histamin, serotonin gibi moleküller oluşturur. Özellikle alerjik durumlarda sayıları artar (4).



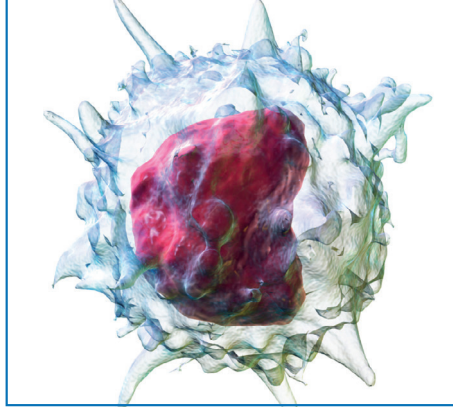
Şekil 4. Bazofil (3)

Lenfositler: Akyuvarların %20-40 kadarını lenfositler oluşturur, kandaki sayıları $1.0-3.2 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ 'dir. Kendi aralarında T hücresi, B hücresi, doğal öldürücü hücre (natural killer, NK) gibi alt türlere ayrılırlar. Hem kalıtsal, hem de edinsel bağışıklıkta görev alan bu hücreler neredeyse immün sistemin bütün savunma olaylarına aracılık ederler. Büyüklükleri ortalama 7 μm olan bu hücrelerin ışık mikroskobu altındaki görüntüsünde, çekirdek sitoplazmanın neredeyse tamamını doldurur, ancak bazı natural killer (NK) hücrelerinin sitoplazmalarında granüller izlenebilir (4).



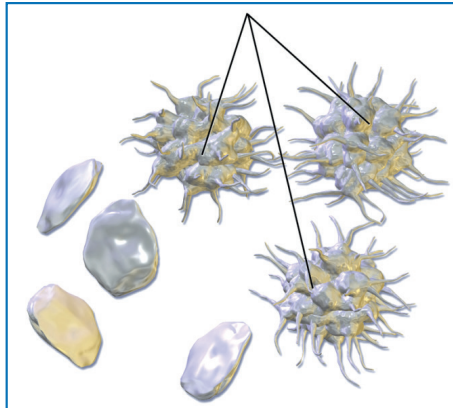
Şekil 4. Akyuvar (Lenfosit) (3)

Monositler: Monositler dokulardaki makrofajların dolaşımdaki öncülüdür. Akyuvarların %2-10'nunu oluştururlar. 12-20 μm çapındaki bu hücreler dolaşımdaki en büyük hücrelerdir. Işık mikroskobu altında at nalına benzeyen çekirdekleri izlenir (4).



Şekil 5. Monosit (3)

Trombositler (platelet (PLT), kan pulcukları): Megakaryositlerden türeyen trombositlerde çekirdek bulunmaz. 2-3 μm çapındaki trombositlerin görevi damar duvarının bütünlüğü bozulduğunda, bu bölümü pıhtıya dönüştürerek yamamaktır. Bu nedenle gerektiğinde etkinleştirilmesi gerekir. Trombositler içinde iki tür granülün varlığı gösterilmiştir: Alfa granüllerin içerisinde fibrinojen gibi pıhtılaşma faktörleri bulunurken, delta granüller ise ADP, kalsiyum, serotonin gibi maddelerle doludur (4).

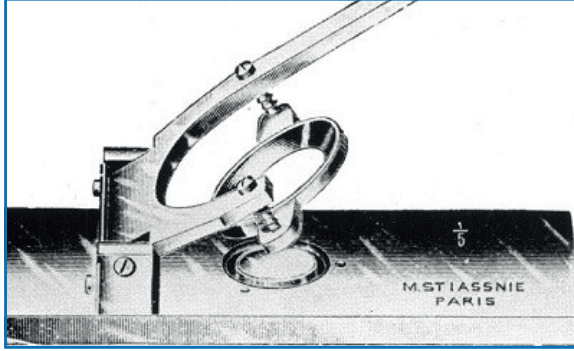


Şekil 6. Trombositler (3)

2.2. Kan sayımı yönteminin gelişimi:

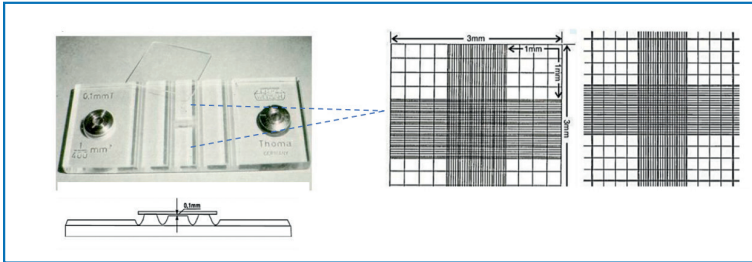
Kan sayımı, kanın hücresel bileşenlerinin hem niceliksel hem de niteliksel olarak değerlendirilmesini sağlayan en eski laboratuvar yöntemlerinden biridir. Tam kan sayımı testi günümüzde istemi en çok yapılan testler arasında yer almaktadır.

Kan sayımını hastalıkların klinik tanısına yardımcı olabilecek özellikte bir laboratuvar yöntemi olarak ilk tanımlayan Karl Vierordt'tur (1818-1884). Kan örneklerinden yayma yaparak mikroskop altında incelemiştir (6). Sonrasında Luis Charles Malassez (1842-1909) çalışmalarıyla kan sayımı yönteminin ilerlemesinde etkili olmuştur. Tam kanın seyreltilmesini sağlayan yeni bir düzenek tasarlayarak kan sayımını kolaylaştırmıştır (7).



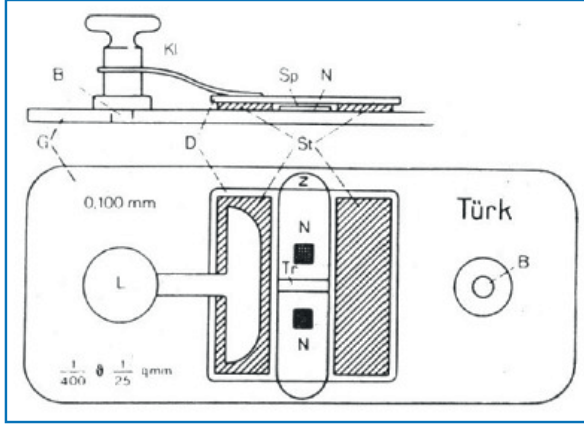
Şekil 7. Malassez'in geliştirdiği kan sayımı aygıtı (Hemositometre) (6)

Kan sayımında en önemli gelişmelerden birisini Richard Thoma (1847-1923) gerçekleştirmiştir. Özel tasarladığı lam üzerinde bulunan kenarları 1 mm, derinliği 0,1 mm olan kare prizma biçimli 0,1 mm³ hacimli oyuğa tam kan örneğini özel pipetiyle seyrelterek uygulamıştır. Thoma lamında; sayım alanı 16 büyük kareye, onlar da kendi içinde 400 kareciğe bölünmüştür (Şekil 8). Thoma lamı aracılığıyla kan hücreleri mikroskop altında sayılabilir. Thoma lamı Carl Zeiss firması tarafından ticari olarak üretilerek günlük laboratuvar kullanımına sunulmuştur (8).



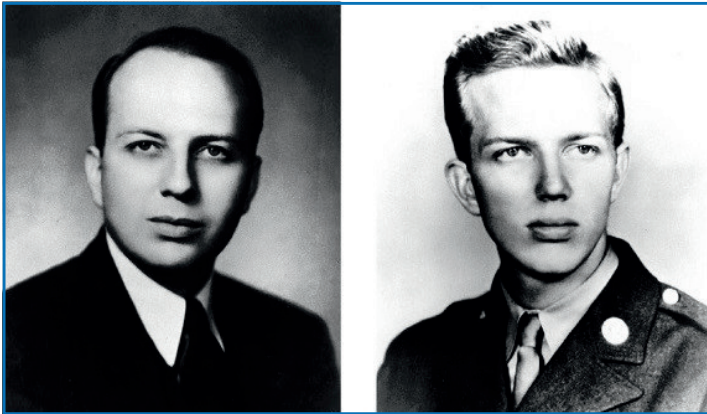
Şekil 8. Thoma lamı (8)

1900'lerin başında Thoma laminanın akyuvar sayımı için yeterli performansı göstermediği görülmüştür ve sonrasında Bauer, Türk, Bürker gibi araştırmacılar değişik boyama yöntemlerinin de yardımıyla akyuvar sayımını daha da geliştirmişlerdir (6).



Şekil 9. Bürker ve Türk'ün geliştirdiği kan sayım aygıtı (Hemositometre) (7)

1950'lere kadar kan sayımı elle yapılan bir işlem olarak kalmış ancak laboratuvarların iş yükünün artmasıyla birlikte otomatik hücre sayma yöntemine olan gereksinim giderek artmıştır. Bu noktada büyük devrim Coulter Kardeşler tarafından gerçekleştirilmiştir; Coulter Kardeşler, günümüzde Coulter Yöntemi olarak bilinen uygulamayı geliştirmişlerdir.



Şekil 10. Coulter kardeşler. Solda Wallace H. Coulter, sağda Joseph R. Coulter (9)



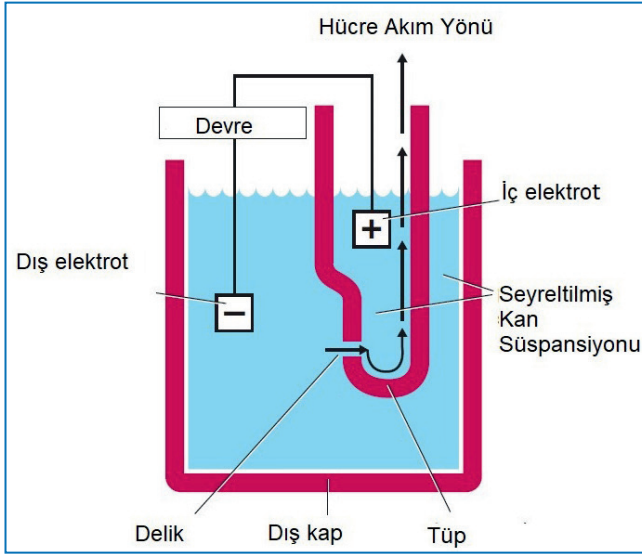
Şekil 11. Coulter kardeşlerce geliştirilen ilk otomatik kan sayım cihazının bir örneği (9)

1980'den sonra bilgisayar destekli otomatik kan sayım cihazları elle mikroskop altında yapılan kan sayımının yerini almıştır. Otomatik kan sayım cihazları bir dakika gibi kısa bir süre içinde, 200 μL 'den daha az hacimlerdeki tam kan örneklerinden en az 18 parametrenin ölçülmesine ya da hesaplanmasına olanak sağlamıştır. Piyasada pek çok değişik marka kan sayım cihazı bulunmasına karşın hemen hemen hepsi benzer çalışma yöntemlerini kullanmaktadırlar.

3. OTOMATİK KAN SAYIMI CİHAZLARININ ÇALIŞMA PRENSİPLERİ

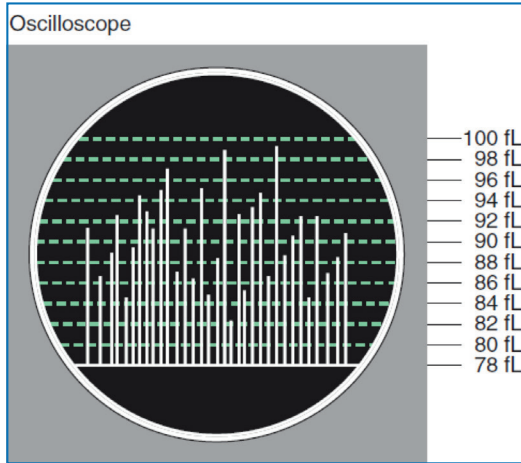
3.1. Kan Sayımında Empedans Yöntemi (Coulter Yöntemi)

Coulter Kardeşler iyonik bir çözelti içinde süspansiyon edilmiş kan hücrelerinin dar bir aralıktan geçmeye yönlendirildiğinde, geçen hücrelerin türüne bağlı olarak aralığa yerleştirilmiş elektrotlarca algılanabilen elektrik akımında değişikliklere neden olduğunu gözlediler. Coulter kardeşler, tasarladıkları düzenekte cam bir tüp üzerine açılmış aralıktan (aperture) kan hücreleri sırayla geçirilirken tüpün içiyle dışına yerleştirilmiş iki elektrot arasında uygulanan düşük frekanslı elektrik akımında bir değişiklik olduğunu saptadılar (Şekil 12). Aralıktan her bir hücre geçtiğinde bu iki elektrot arasındaki elektrik direncinin, diğer bir adıyla empedansın değişmesi, voltajda değişikliğine neden oluyordu (10).



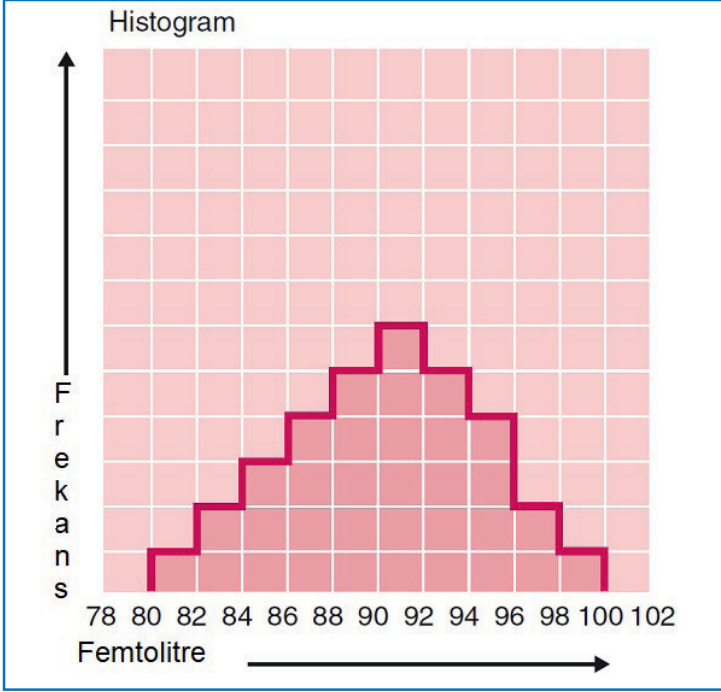
Şekil 12. Empedans ölçüm yöntemine göre çalışan otomatik kan sayım cihazlarının genel tasarımı (10,11)

Coulter düzeneğinde osiloskopta okunan her bir atım (pik) geçen bir hücre olarak sayılmaktadır. Voltajdaki değişimin büyüklüğüyse o anda geçen hücrenin büyüklüğüyle orantılıdır.



Şekil 13. Otomatik kan sayım cihazlarında kan hücrelerinin osiloskopta sayılması. Her bir pik çizgisi geçen bir hücreyi, pikin yüksekliği ise femtolitre (fL) olarak hücrenin büyüklüğünü göstermektedir (10, 11)

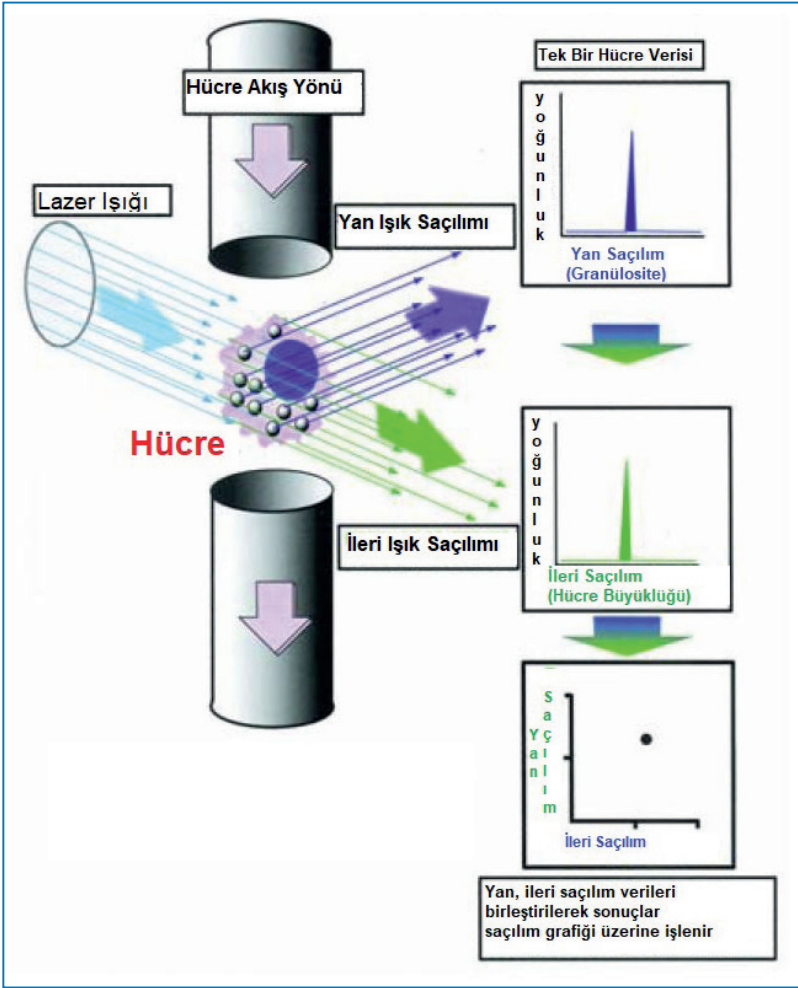
Hücrelerin sayılarıyla birlikte bu hücrelerin büyüklükleri de bir histogram grafiği üzerine işlenir. Bu grafiklerde belli eşik değerler yardımıyla hücre popülasyonları birbirinden ayrılabilir. Böylece kan hücrelerinin hem sayıları hem de büyüklükleri ölçülmüş olur (Şekil 13).



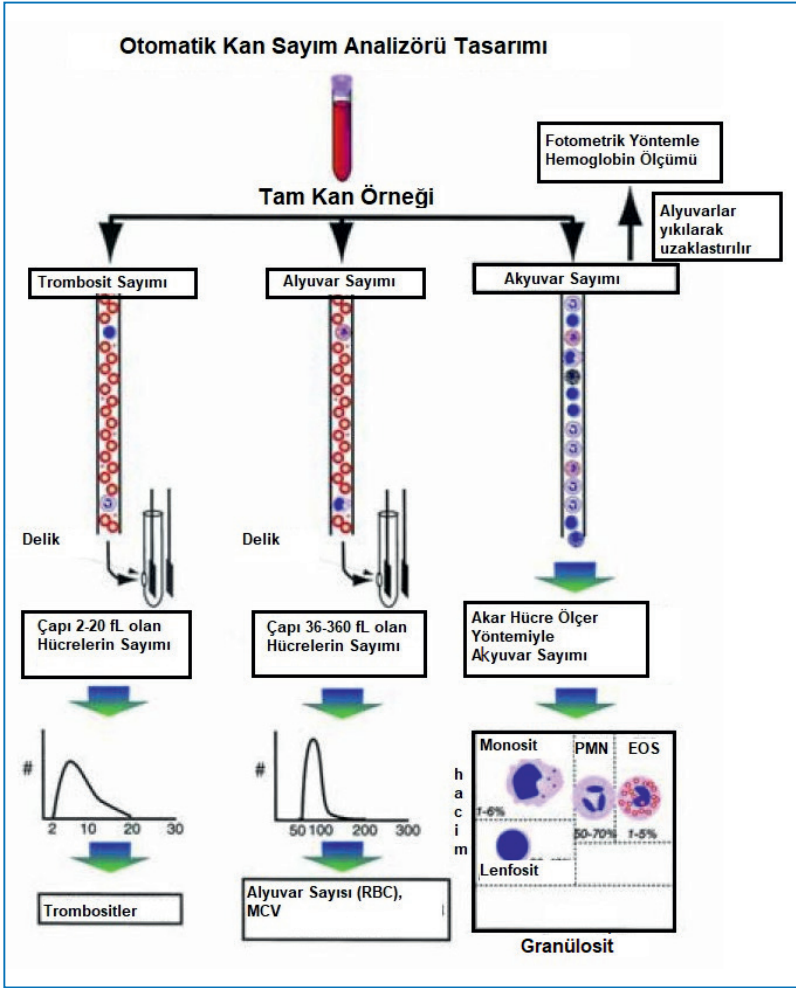
Şekil 14. Otomatik kan sayım cihazlarında sayılan kan hücrelerinin büyüklüklerine göre dağılımlarının histogram üzerinde gösterimi (10,11)

3.2. Kan Sayımında Akan Hücre Ölçer (Flowcytometry) Yöntemi

Coulter yöntemi alyuvarların sayımında başarılı olsa da akyuvarların ayırımında beklenen başarıyı gösterememiştir. Akan hücre ölçerler, kan sayım analizörleriyle birleştirilerek bu sorunun üstesinden gelinebilmiştir. Akan hücre ölçerler aracılığıyla; tek bir hücrenin büyüklüğü, biçimi, biyokimyası ya da anti-jenik bileşenleri belirlenebilir. Akan hücre ölçerlerde ışık kaynağı lazerdir. Hücre kanaldan akarken lazer ışığı hücrenin üzerine düşürüldüğünde ışığın saçılımına neden olur. Değişik açılarda yerleştirilmiş alıcılar saçılan ışığın yoğunluğunu saptayabilir. Değişik alıcılardan gelen veriler değerlendirilip, birleştirilerek saçılım grafiği üzerine işlenir (Şekil 15). Böylece özellikle akyuvar hücrelerinin türü saptanabilir.



Şekil 15. Akan hücre yöntemiyle akuyvarların türünün saptanması (12)



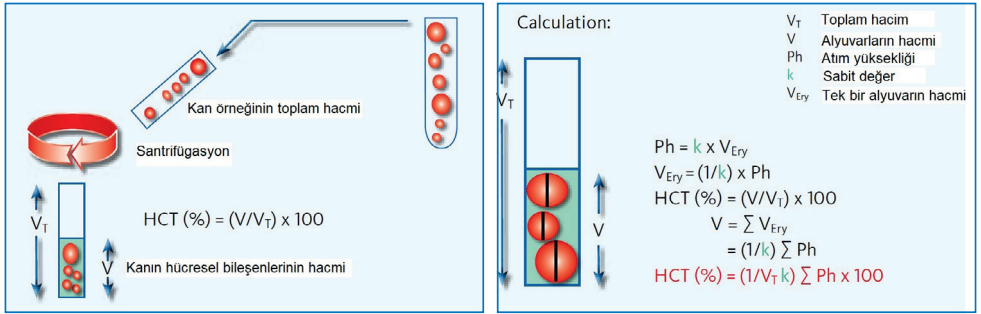
Şekil 16. Otomatik kan sayım cihazlarının genel tasarımı (12)

3.3. Tam Kan Sayımı Parametrelerinin Hesaplanması

Tam kan sayımı birden fazla tekniğin birleştirilmesiyle gelişmiştir. Günümüzde de yeni yöntemler çıktıkça kullanımda olan yöntemlerle birleştirilerek bu gelişim sürdürülmektedir. Tam kan sayımında ilk kullanılan yöntemler hücrelerin mikroskop yardımıyla görsel olarak değerlendirilmesi olmuştur. Spektrofotometrik olarak siyanohemoglobin yöntemiyle (Drabkin yöntemi) ölçülen HGB düzeyi, alyuvar göstergeleri (eritrosit indeksleri) olarak bilinen değişkenlerin hesaplanmasına olanak sağlamıştır. Günümüzde fotometrik HGB ölçümü, otomatik kan sayım analizörlerinin önemli bir parçasıdır.

Alyuvar Sayımı (RBC), MCV: Alyuvar sayıları RBC biçiminde rapor edilir. Alyuvarların sayısı kadar büyüklüğü de önemlidir. Ortalama alyuvar büyüklüğü (MCV) özellikle kansızlığın ayırıcı tanısında yardımcı bir göstergedir. Mikroskopla yapılan sayımlarda MCV değerini hesaplamak için ölçülen hematokrit (HCT) değerinin sayılan alyuvar sayısına (RBC) bölünmesi gerekir.

HCT: Bu bağlamda diğer önemli bir gösterge ise HCT değeridir. HCT kan örneği içindeki toplam hücresel bileşenlerin yüzde olarak toplam kan hacmine oranıdır. Otomatik yöntemler gelişmeden önce HCT düzeyleri kan örneklerinin kapiller tüpe alınıp, mikrosantrifüj kullanılarak ayrıştırılmasıyla ölçülüyordu. Ancak otomatik kan sayımının gelişmesiyle HCT ölçülen değil RBC sayıları ve büyüklükleri kullanılarak hesaplanan bir değer olmuştur (Şekil 17).



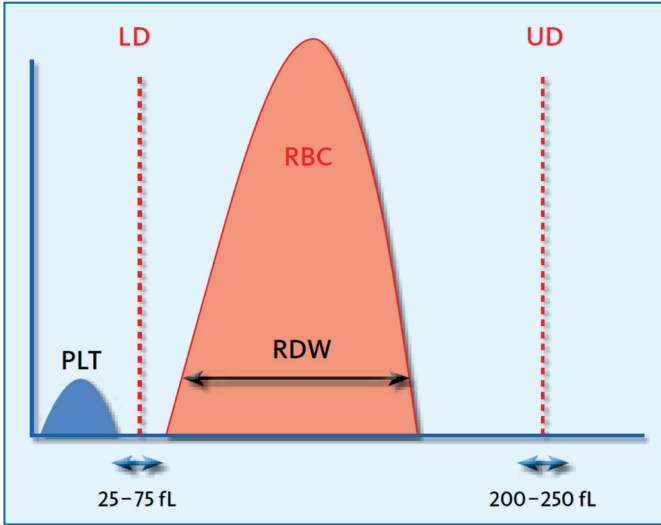
Şekil 17. Solda; mikro santrifüj kullanılarak hematokritin (HCT (%)) ölçülmesi. Sağda; otomatik kan sayım analizörlerinde hematokritin hesaplanması (13)

MCH, MCHC: Diğer iki önemli alyuvar göstergesi ise MCH ile MCHC'dir. MCH ve MCHC kansızlığın türünün değerlendirilmesinde yardımcıdır. MCHC değeri 32'nin altına düştüğünde daha çok demir eksikliğine bağlı olarak alyuvarlar daha soluk göründükleri için hipokromik olarak adlandırılır ancak tersi doğru değildir; gerçekte fizyolojik koşullarda alyuvar içindeki MCHC düzeyi 36'nın üstüne çıkmaz. Mikroskopik bir değerlendirme olan hiperkromi tanımı bir yanlış adlandırmadır. Bu gibi durumlarda alyuvarların yapısı değişerek sferosite dönüştükleri için daha dolu ve koyu renkte görünürler, bu nedenle hiperkromik olarak değerlendirilmişlerdir. MCHC değeri kişinin ömrü boyunca pek az değişir. MCHC düzeyini etkileyen çok az patolojik durum söz konusudur. Bu nedenle MCHC özellikle preanalitik hataların değerlendirilmesinde yardımcı bir göstergedir.

$$MCH(pg) = \frac{HGB}{RBC}$$

$$MCHC(g/dL) = \frac{HGB}{HCT}$$

RDW: Alyuvarların boyutları arasındaki değişikliklerin niceliksel bir ölçümüdür. Alyuvar büyüklük dağılımları histogram üzerine işlenerek hesaplanır (Şekil 18). Hasta sonuçları standart sapma (RDW-SD), varyasyon katsayısı (RDW-CV) türünden rapor edilir.



Şekil 18. RDW'nin histogram ile hesaplanması (13).

***LD:** Lower detection limit, alt saptama eşiği, **UD:** Upper detection limit, üst saptama eşiği

Akyuvar sayımı (WBC): Kan örneği içinde alyuvarların sayıca çok olması akyuvar sayımını perdeler. Bu nedenle kan sayım analizörlerinin sayım yapabilmesi için sürfaktan özellikte maddeler (eritici çözelti, lyse solution) ile alyuvarlar parçalanarak ortamdan uzaklaştırılır. Daha sonrasında üretici firmanın ölçüm yöntemine göre akyuvarların doğrudan sayımı yapılır. Hasta sonuç raporlarında sayımı yapılan toplam akyuvar sayısı (WBC), her bir akyuvar alt bileşeni, hem sayı, hem de oran olarak bildirilir (Tablo 2). Değişik üreticilerce piyasaya sunulan kan sayım analizörlerinin tasarımlarında, kullandıkları ölçüm yöntemlerinde, hesaplamalarda değişiklik olabilmektedir. Tablo 2'de en çok kullanılan kan sayım analizörlerinin ölçüm, hesaplama yöntemleri özetlenmiştir.

Trombosit sayımı: Trombositlerin sayımı boyutlarının küçüklüğü nedeniyle diğer hücrelere göre daha zor olabilmektedir. Ayrıca parçalanmış diğer hücrelerin artıkları, mikro alyuvarlar, bakteriler, yanlış yüksek trombosit değerlerine neden olurken, dev trombositler ya da trombosit kümeleri (platelet aggregates) yanlış düşük trombosit değerlerine neden olur. Trombosit değerleri hasta sonuçlarında hem sayım olarak, hem de platelet distribution width (PDW), MPV, plateletcrit (PCT) (trombosit hacminin trombosit sayısına bölünmesiyle elde edilir) değerleri ile birlikte bildirilir.

Parametre	Beckman Coulter UniCel DxH 800	Sysmex XN Series	Abbott CELL-DYN Sapphire	Siemens ADVIA 2120i	Mindray BC Serisi
WBC	Empedans	Floresan boyalı ışık saçılımı	Işık saçılımı	Işık saçılımı	Floresan boyalı ışık saçılım
RBC	Empedans	Empedans	Empedans	Lazer ışık saçılımı	Empedans
HGB	Siyano hemoglobin 525 nm	Sodyumlürlü sülfat 555 nm	Siyano hemoglobin 540 nm	Siyano hemoglobin 546 nm	Siyanidsiz fotometrik ölçüm
HCT	(RBC x MCV)/10	Toplam RBC atım yüksekliği	(RBCx MCV)/10	(RBC x MCV)/10	RBC x MCV)/10
MCV	RBC büyüklüğü dağılımı histogramından elde edilen ortalama	(Hct/RBC) x 10	RBC büyüklüğü dağılımı histogramından elde edilen ortalama	(HCT/RBC) x 10	(HCT/RBC) x 10
MCHC	(HGB/HCT) x 100	(HGB/HCT) x 100	(HGB/HCT) x 100	(HGB/HCT) x 100	HGB/HCT) x 100
Retikülosit	Supravital boyama ışık saçılımı	Floresan boyalı ışık saçılımı	Supravital boyama ışık saçılımı	Floresan boyalı ışık saçılımı	Floresan boyalı ışık saçılımı
PLT	Işık saçılımı empedans ortak	Işık saçılımı empedans ortak	Işık saçılımı empedans ortak	Işık saçılımı	Empedans

Tablo 1. Kan sayım parametrelerinin farklı üreticilere göre ölçüm yöntemleri

Parametre	Referans aralık	Birim	Ölçüm yöntemi	Formül
Alyuvar göstergeleri				
RBC	Kadın:3,8-5,2	10 ⁶ /μL	Sayım	
	Erkek: 4,2-6			
HGB	Kadın:12-15	g/dL	Fotometrik ölçüm	
	Erkek: 13,5-18			
HCT	Kadın: 35-49	%	Hesaplama	
	Erkek: 40-54			
MCV	80-100	fL	Hesaplama	$MCV(fL) = \frac{HCT}{RBC}$
MCH	26-34	pg	Hesaplama	$MCH(pg) = \frac{HGB}{RBC}$
MCHC	32-36	g/dL	Hesaplama	$MCHC(g/dL) = \frac{HGB}{HCT}$
RDW	11,5-14,5	%	Hesaplama	Histogram
Trombosit parametreleri				
PLT	150-450	10 ³ /μL	Sayım	
MPV	7-12	fL	Hesaplama	$MPV(fL) = \frac{PCT}{PLT}$
Akyuvar parametreleri				
WBC	6,3-10,6	10 ³ /μL	Sayım	
Nötrofil	1,7-7,5	10 ³ /μL	Sayım	
Nötrofil#	50-70	%	Hesaplama	
Lenfosit	1-3,2	10 ³ /μL	Sayım	
Lenfosit#	18-42	%	Hesaplama	
Monosit	0,1-1,3	10 ³ /μL	Sayım	
Monosit#	2-11	%	Hesaplama	
Eozinofil	0-0,3	10 ³ /μL	Sayım	
Eozinofil#	1-3	%	Hesaplama	
Bazofil	0-2	10 ³ /μL	Sayım	
Bazofil#	1-2	%	Hesaplama	

Tablo 2. Kan sayım parametrelerinin referans aralıkları, birimleri, ölçüm yöntemleri ve formülleri

4. TAM KAN SAYIMI İÇİN VENÖZ KAN ALMA

4.1. Hasta Hazırlığı

4.1.1. Postür

Yatar pozisyonundan oturur ya da ayakta duruş pozisyonuna geçmek damar içinden interstisyel aralığa sıvı geçişine neden olur. Bunun sonucunda kan hücreleri, proteinler, kolesterol, demir gibi büyüklüğü ya da proteine bağlı oluşu nedeniyle dokuya geçemeyen moleküller yüksek olarak ölçüldüğü bilinmektedir. Supin pozisyonda yatan kişiden alınan tam kan örneği ile aynı kişinin oturur ya da ayakta duruş pozisyonunda alınan kan örnekleri arasında HGB değerlerinde %8, RBC değerlerinde %8 artış olduğu WBC değerlerinde ise bu artışın %15'i bulunduğu bildirilmiştir (14).

4.1.2. Egzersiz

Egzersiz; kanda kreatinin, kreatin kinaz, miyogloblin, aspartat aminotransferaz gibi analitler yanında tam kan sayımı sonucunu da etkileyebilir (15). Özellikle zorlu egzersizden sonra WBC, nötrofil, lenfosit değerlerinin anlamlı biçimde yükseldiği, nötrofil yüksekliğinin 2 saatten fazla sürdüğü bildirilmiştir (16).

4.1.3. Sirkadiyen Ritm

Sirkadiyen ritmin kan sayımı üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. RBC, HGB, HCT sabah 11:00 gibi düşük bir artış gösterebilse de, lökositlerde akşam 21:00- 24:00 arası artış görülebilir (17). Lenfosit, eozinofil, bazofil sayıları gece yarısında en yüksek değere ulaşırken, sabah saatlerinde düştüğü bildirilmiştir. Bu değişim kortizol düzeyi ile ters ilişkilidir (18). PLT değerlerinin akşam saatlerinde yükselirken sabah saatlerinde düştüğü bildirilmiştir (19). Sonuçlarda standardizasyon için örneği sabah almak uygundur.

4.1.4. Stres

Anksiyete özellikle çocukların kan alınırken aşırı ağlaması, lökositlerde artışa neden olabilmektedir (15).

4.1.5. Diyet

En az 8-12 saat açlıktan sonra kan alınmalıdır (15). Kan vermeden 2 saat veya daha kısa sürede yemek yiyen kişilerde kanın glukoz ve lipit içeriğinde artış olmaktadır. Yüksek konsantrasyonda glukoz ve lipit MCV, MCHC, HCT sonuçlarını etkileyebilir. Aşırı artmış lipit içeriği hemoglobin gibi fotometrik ölçülen testlerde interferansa yol açabilir (17). Ayrıca kan glukoz düzeyi 500 mg/dL'nin üzerine çıktığında ozmotik etkiye bağlı olarak MCV değerlerinin etkilendiği bildirilmiştir (20).

4.1.6. Sigara İçme

Kan almadan önce hastanın sigara içmesi lökosit ölçümünde artışa neden olabilmektedir. Uzun süreli sigara kullanımı HGB seviyesinde artışa neden olur (15).

Öneriler:

- Kan alınmadan önce 8-12 saatlik açlık önerilir.
- Kan alınmadan 24 saat önce yoğun fiziksel egzersizden kaçınılmalıdır.
- Kan sayımı testleri için kan alınmadan önce en az 2 saat sigara içilmesi önerilir

4.2. Tam Kan Sayımı İçin Kullanılacak Kan Alma Ekipmanları

4.2.1. Kan Alma Tüpleri

Plastik tüpler esneklikleri, yüksek santrifüj hızına dayanabilmeleri, çalışanlar için daha güvenli olmaları nedeniyle tercih edilirler; ayrıca, yakılabilme özellikleri nedeniyle tıbbi atık miktarında azalma sağlayarak çevreye de daha az zarar vermektedirler.

Bu nedenlere bağlı olarak plastik tüpler günümüzde daha fazla tercih edilmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

Plastik tüpler, polietilen tetrataftalat (PET) gibi poliesterler, polietilen ve polipropilen (PP) gibi poliolefinler, poliakrilik, politetrafloroetan, polisiloksan, polivinil klorid, poliakrilonitril ve polistrenden üretilmektedir. Bununla birlikte plastik tüplerin cam tüplere göre gaz geçirgenliği daha fazladır. Kırılmaz ve daha uzun süre vakum sağlama özelliği olan PET, kan alma tüplerinin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. PP ise, daha az su geçirgenliğine sahip olması nedeniyle, sıvı antikoagülan hacminin ve konsantrasyonunun korunmasını sağladığı için tercih edilen diğer bir plastik materyaldir (21-24).

4.2.2. Tüpe Katkı Maddeleri: Antikoagülanlar

Tam kan sayımında en önemli nokta doğru tüpe kan alınmasıdır. Günlük laboratuvar dilinde mor kapaklı olarak bilinen EDTA'lı tüplere kan alınması artık tam kan sayımı testi için bir standart olmuştur. Bu en temel bilgi preanalitik aşamada görev alan tüm sağlık çalışanlarınca çok iyi bilinmelidir. Böylece yanlış tüpe kan alınması, dolayısıyla tüpten tüpe kan aktarılması gibi durumların önüne geçilebilir.

Etilendiamintetraasetik asit (EDTA, $C_{10}H_{16}N_2O_8$); hem kan hücrelerinin morfolojisini hem de hücresel içeriklerini koruduğu için hematolojik testler için en uygun antikoagülan olarak nitelenmiştir. Tam kan sayımı için; antikoagülan olarak EDTA tuzları kullanılmaktadır. Şelat oluşturuca bir ajan olan EDTA tuzları, kandaki kalsiyumu bağlayarak koagülasyon kaskadını inhibe eder. EDTA tuzları olarak; K_3EDTA (tri-potasyum EDTA), K_2EDTA (di-potasyum EDTA), Na_2EDTA (di-sodyum EDTA) kullanılabilir (25, 26).

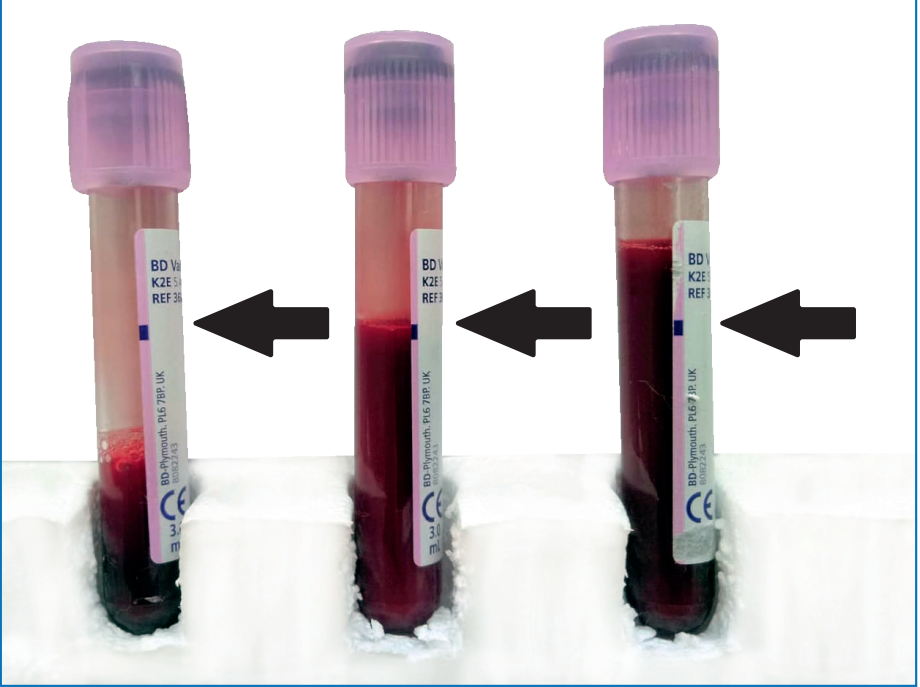
K_2EDTA ve Na_2EDTA tüplerin iç yüzeyine püskürtülerek kurutulmuş olarak uygulanır. K_2EDTA 'nın avantajı daha çözülebilir olmasıdır. K_3EDTA ise tüplerin içerisinde sıvı halde bulunur. Sıvı EDTA kanın karışması ve pıhtı oluşmaması açısından avantaj sağlamakla birlikte sıvı olması nedeniyle örneğin dilüsyonuna neden olabilir. Buna bağlı olarak doğrudan ölçülen değerlerin (HGB, RBC, WBC, PLT) K_2EDTA katkılı örneklerle göre %1-2 daha düşük çıktığı belirtilmiştir. Ayrıca EDTA konsantrasyonları arttıkça K_3EDTA içerdiği fazladan potasyum iyonları nedeniyle, RBC'lerde daha fazla büzölmeye sebep olmaktadır (7.5 mg/mL kanda %11 küçölme). Buna bağlı olarak K_3EDTA , MCV değerlerinde de azalmaya sebep olmaktadır (tipik olarak K_2EDTA ile karşılaştırıldığında -%0.1 ile -%1.3'lük bir fark gözlenmiştir). Bununla birlikte bekleyen K_3EDTA 'lı kanlarda, hücre hacminde daha fazla artış olduğu görölmüştür (4 saat sonra %1.6 artış). Uluslararası Hematoloji Standardizasyon Konseyi ve CLSI, kan hücresi sayımı ve boyut belirlenmesinde tüm bu sebeplerden dolayı K_2EDTA 'yı kullanılması gereken antikoagülan olarak önermektedir (26,27). Tam kan sayımı için antikoagülan olarak K_2EDTA ve K_3EDTA , konsantrasyonu 1,5 – 2,2 mg/mL olarak önerilmektedir (27).

4.2.3. Yetersiz Numune Hacmi

Tam kan sayımı testinde ikinci sıklıkta görölen preanalitik hata kaynağının yetersiz örnek alımı olduğu bildirilmiştir (28-30). Tam kan örneğinin elde edilmesi için kullanılan tüplerde iki tür EDTA tuzu katkısının kullanıldığı ve K_3EDTA katkısının sıvı olması nedeniyle dilüsyon etkisi yarttığı yukarıda belirtilmişti. Ancak K_3EDTA 'lı tüplere önerilenden daha düşük hacimde kan alınması bu seyreltme etkisini daha da arttıracaktır. Düşük hacimde kan alınmasının bir diğer olumsuz etkisi hem K_2EDTA 'lı hem de K_3EDTA 'lı tüplerde gözlenen hiperozmolariteye bağlı olarak kan hücrelerinde ortaya çıkan küçölmedir. Bu olguya bağlı olarak MCV, HCT değerlerinden düşme olurken MCHC değerlerinde yükselme olduğu bildirilmiştir (31-33).

Günümüzde kan alma tüpleri, tutucuları, iğneleri bir sistem olarak birlikte kullanılmaktadır. Vakumlu olarak üretilen kan tüplerinde damara girildikten sonra ne kadar hacim kan çekeceği önceden belirlenmiştir. Tüm üreticiler bu hacmin gözlenebilmesi için tüpler üzerine uyarı çizgileri koymaktadır (Şekil 19).

Doğru test sonuçları için gerekli olan kan/antikoagülan oranının sağlanması amacıyla, üretici firma tarafından belirlenmiş kan miktarının (dolum çizgisinde) alınmasına dikkat edilmelidir. Genel yaklaşım tüp dolum çizgisinin $\pm\%10$ 'una kadar ($\%90$ - $\%110$) kan ile doldurulabileceği yönündedir (34). Tüplerin doluş hızı markadan markaya değişebileceği için tüp içine kan akışı durana kadar (vakum bitene kadar) beklenmesi yeterli kan alınabilmesi için önemlidir.



Şekil 19. Solda yetersiz hacimde alınmış örnek, ortada uygun hacimde alınmış örnek, sağda fazla hacimde alınmış örnek.

4.2.4. Kan alma iğnesi

Venöz kan alımında, kan alma iğnesinin büyüklüğü alınacak kan miktarına, hastanın yaşına ve hastanın ven çapına göre belirlenmelidir. Antekübital venden kan almak için 19-21 ölçü (Gauge, G) iğneler idealdir, yenidoğan ve çocuklarda ve ince vane sahip yetişkinlerde daha küçük ölçülü iğneler kullanılabilir. Büyük G numarasının küçük çaplı iğneleri, küçük G ölçü numarasının ise büyük çaplı iğneleri ifade ettiği akılda tutulmalıdır.

4.3. Tam Kan Sayımı İçin Venöz Kan Alma

4.3.1. Kan alma personeli

Tüm testler için venöz kan almanın, eğitim almış hemşireler ve flebotomistler tarafından gerçekleştirilmesi önerilmektedir. Kan alacak kişinin özellikle tüp alım sırası, kullanılacak ekipmanların özellikleri ve tüp dolm hacmi konusunda eğitim almış olması gerekmektedir.

4.3.2. EDTA'lı tüpe kan alma sırası

Diğer laboratuvar testleri ile birlikte EDTA'lı numunede çalışılacak test istemi yapılan hastalarda farklı özellikteki tüplere kan alma sırası son derece önemlidir. Damara girdikten sonra, Venöz Kan Alma Kılavuzu'nda da belirtilen tüp alma sırasına uyulmalıdır (Tablo 3) (35).

Tablo 3. İstemi yapılan testlerin özelliklerine göre alınacak numune tüpleri için uyulması gereken kan alma sırası ve altüst etme sayısı (35).

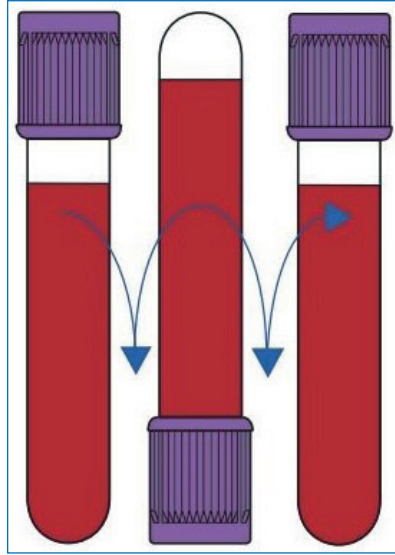
Kapak rengi	Tüp/Katkı maddesi	Altüst çevirme sayısı
Değişken (1)	Kan kültürü/Besiyeri	Besiyeri ile kan karışımını sağlamak için hafifçe altüst edilir
(3)	Koagülasyon tüpü/Sitratlı	3-4 kez
(4)	ESR tüpü/Sitratlı	3-4 kez
(5)	Serum tüpü/Jelsiz	5 kez
(5)	Serum tüpü/Jelli	5 kez
(5)		5 kez
(5)	Serum tüpü/Trombin pıhtı aktivatörlü tüp	5 kez
(6)	Plazma tüpü/Jelli veya jelsiz heparinli tüp	8-10 kez
(7)	Plazma tüpü/Jelli veya jelsiz EDTA'lı tüp	8-10 kez
(8)	Plazma tüpü/Florür/ Potasyum okzalat: Florür/EDTA Florür/heparin	8-10 kez

Uyarı: Tüpler vakum tükenip kan akışı durana kadar doldurulmalıdır. Katkı maddesi içeren tüpler (EDTA, sitrat, heparin gibi) üreticinin önerdiği hacimlere kadar ya da kan/katkı maddesi oranının doğruluğundan emin olunana kadar doldurulmalıdır.

***EDTA;** etilendiamin tetraasetik asit, **ESR;** eritrosit sedimantasyon hızı

4.3.3. EDTA'lı tüpün alt üst edilmesi

Ayrıca antikoagülasyon için kullanılan EDTA tuzuna bağlı olmaksızın bütün tüpler, antikoagülan ile kanın tamamen karışmasını sağlamak amacıyla 8-10 kez ters düz edilmelidir. Bu işlemin özenli bir biçimde yapılmaması en önemli preanalitik hata kaynaklarından biridir. Bu işlem **Şekil 20**'de gösterildiği gibi sekiz, on kez yapılmalıdır. Tüpler alt üst edilirken kesinlikle çalkalanmamalı nazikçe karıştırılmalıdır.



Şekil 20. EDTA'lı tüpe alınan tam kan örneğinin alt üst edilerek karıştırılması

4.3.4. EDTA'ya bağlı yalancı trombositopeni (psödotalrombositopeni)

EDTA'nın trombosit membranında bulunan glikoprotein IIb-IIIa ile etkileşmesi sonucunda bu glikoproteine karşı oluşan otoantikörlerin trombositlerin kümelenmesine yol açtığı düşünülmektedir. Bunun sonucunda gerçek olmayan

trombosit düşüklüğü tespit edilmektedir. EDTA'ya bağlı psödotrombositopeni prevalansı %0,1 olarak belirtilmektedir. Böyle bir durumdan kuşulanılıyorsa EDTA dışında başka bir antikoagülan (sodyum sitrat, heparin gibi) içeren tüpe kan alınarak yeniden çalışılır. EDTA'ya bağlı trombositopeni varsa trombosit sayısının düzelmesi beklenir (35). Ayrıca parmak ucundan kapiller örnek alınarak periferik yayma ile trombosit sayısı kontrolü yapılabilir.

4.3.5. Kan Alma İşleminin Etkisi

Hastadan kan alınmasında uygulanan:

- Kimlik doğrulama işlemi,
- Kan alımı için kullanılacak araç gereç seçimi, hazırlanması,
- Kan alma bölgesinin (damar) seçimi,
- Kan alma bölgesinin temizlenmesi,
- Turnike süresi,
- Damara giriş ve kan alma işlemi,
- Tüp sırası

aşamalarının her birinde ilgili kılavuzlara uyulmalıdır (35-37).

Hemokonsantrasyon ve kanın dokuya infiltrasyonu ile birlikte dolaşım sistemini lokalize olarak durdurabileceği için turnike uygulaması bir dakikayı aşmamalıdır. Turnike bu süreden uzun tutulduğunda protein yapıda analitler, kan hücre hacmi ve diğer hücresel element düzeyleri hatalı olarak yüksek çıkmaktadır. Etkilenen parametreler içinde albümin, potasyum, kalsiyum gibi analitler yanında RBC, WBC, HGB, HCT gibi tam kan sayım parametreleri de yer almaktadır. Turnike süresi 2 dakika uzatıldığında HGB ile HCT değerlerinde anlamlı yükselme olduğunu bildirilmiştir (36). Bunun önlenmesi için de eğer turnike bir dakikadan uzun uygulandı ise turnike çıkartılıp iki dakika sonra yeniden bağlanması önerilmektedir (38).

4.3.6. Kan Hacmi

Alınan kan hacmi, özellikle pediyatrik hastalar ve kritik hastalığı olan kişiler için iyatrojenik (flebotomiye bağlı) anemi riskini en aza indirecek şekilde olmalıdır. İyatrojenik anemiyi önlemek için hastadan alınan toplam kan miktarı; ağırlık, kan hacmi, süre bazında izlenmeli ve sınırlanmalıdır.

Referanslarda çocuklar için kan hacmi 75-80 mL/kg, yenidoğanlarda daha yüksektir. Yetişkinlerde ise 65-70 mL/kg olarak belirtilmiştir. Pediyatrik ve kritik

hastalar için 24 saat içinde toplam kan hacminin %1-5'ini ve 8 hafta içinde de toplam kan hacminin %10'unu aşmayacak şekilde sınırlandırılması önerilmektedir (38). Daha düşük hacimde kan alınmasını sağlayan düşük hacimli EDTA'lı tüpler de bulunmaktadır.

Tüpe doldurulan kan miktarı da önemlidir. Çok fazla doldurulduğunda kan tüp içindeki antikoagülan ile iyi karışmaz, bu durum yanlış test sonuçlarına neden olabilir (25).

Öneriler:

- Kan sayımı testleri için mor kapaklı (EDTA katkılı) tüplere kan alınır.
- Doğru, uygun hacimde kan alınmalıdır. Doğru kan/antikoagülan oranının sağlanması için kanı üreticinin önerdiği tüp üzerinde belirtilen tüp dolum çizgisine denk gelecek kadar doldurmalıdır. Daha az ya da daha çok kan alınmalıdır (Şekil 19).
- Önerilen kan alma araç gereçleri kullanılmalı, kesinlikle enjektörle kan alınmamalıdır.
- Kan alma elemanı venöz kan alırken kan alma iğnesinin ölçü numarasını hastadan alınacak kan miktarı, hastanın yaşı ve hastanın ven çapına göre belirlemelidir. Kan sayım testleri için 19-21G ölçü numaralı kan alma iğneleri kullanılmalıdır. Çocuklar ya da ince damarlı kişiler için daha küçük ölçü numaralı (>21G) iğneler kullanılabilir.
- Kesinlikle tüpten tüpe kan aktarılmamalıdır.
- Damara girdikten sonra, Venöz Kan Alma Kılavuzu'nda da belirtilen tüp alma sırasına uyulmalıdır (Tablo 3) (35).
- Antikoagülan ile kanın tamamen karışmasını sağlamak amacıyla 8-10 kez alt üst edilmelidir (Şekil 20).
- Tüm testler için venöz kan alma işleminin eğitim almış hemşireler, flebotomistlerce gerçekleştirilmesi önerilmektedir. Bu çalışanlara düzenli aralıklarla eğitim verilmelidir.

5. NUMUNELERİN TRANSFERİ

Numuneler dik bir şekilde sporlarda taşınmalı, taşıma esnasında sallanması, çalkalanması olabildiğince engellenmelidir. Numuneler, numune kaybını engelleyecek ve bulaşma riskini azaltacak şekilde primer (numune tüpü), sekonder (tüp kapakları açılrsa da enfeksiyöz bulaşmayı engelleyebilecek yapıda ve emici materyal içeren) ve tersiyer (taşıma çantası olarak kullanılacak, sıcaklık değişimine karşı korumalı) iç içe özel kaplarda sıcaklık kontrolü yapıla-

rak taşınmalıdır. Sıcaklık kontrolü sıcaklık değişimlerini kaydeden cihazlar yardımıyla yapılabilir. Eğer numuneler uzak laboratuvarında çalışılacaksa soğukta taşınması önerilen bir uygulamadır. Öte yandan buzdolabından numune saklamanın pıhtılaşmayı uyarabileceği unutulmamalı, bu numuneler çalışılmadan önce pıhtı varlığı açısından değerlendirilmelidir.

6. NUMUNENİN DEPOLANMASI

6.1. Tam kan sayımı testi çalışma süresi ve örneklerin saklama koşulları.

Tam kan sayımı testi için alınan örnekleri, oda sıcaklığında bekletiliyorsa, kan alındıktan sonraki 6 (altı) saat içinde çalışılması önerilmektedir (30). Eğer örnekler 6 saat içinde çalışılmayacaksa buzdolabında +4°C'de 24 saat saklanabilir. Buzdolabında saklanan örneklerde MCV, HCT, WBC değerlerin daha değişmeden kaldığı bildirilmiştir (39-42).

Öneriler:

- Tam kan sayımı testi için alınan örnekler oda sıcaklığında bekletiliyorsa, kan alındıktan sonraki 6 (altı) saat içinde çalışılması önerilmektedir.
- Eğer örnekler 6 saat içinde çalışılmayacaksa buzdolabında +4°C'de 24 saat saklanabilir (38).

7. NUMUNE RET KRİTERLERİ

Tam kan sayımına etki eden preanalitik değişkenlerin pek çoğu denetlenebilir özelliindedir. Bir önceki bölümde anlatılan kan alma kurallarına uyulduğunda kan sayımı için uygun nitelikte bir tam kan örneği elde edilebilir. Ancak istenilen nitelikte iyi bir örneğin elde edilmesi her zaman sağlanamayabilir. Böylesi durumlar bilinerek, gerekiyorsa bu örneğin ya da bu örnekten üretilen sonuçların reddedilmesi gerekmektedir.

Konuyla ilgili yapılan araştırmalar birbirlerine yakın veriler sunmaktadır. Bu araştırmalara göre tam kan sayımı testinde en çok gözlenen preanalitik hatalar sıklığına göre aşağıda sıralanmıştır (30,44,45):

- Pıhtılı örnek %57
- Yetersiz örnek % 14
- Yanlış tüp %7
- Hemoliz %2,7
- Lipemi % 2,3

7.1. Pıhtılı örnek

Tam kan sayımı testinde en sık görülen preanalitik hata kaynağının pıhtılı örnek olduğu bildirilmiştir (28,29,45).

Pıhtılı örneğe neden olan olası etkenler:

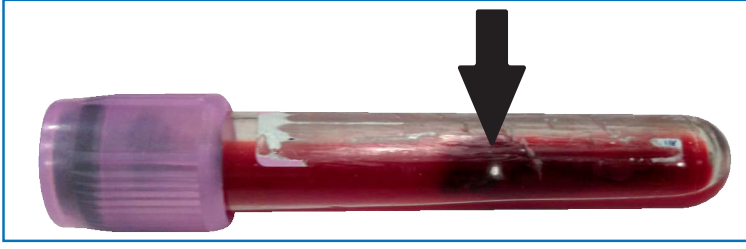
- Kanın, örnek alınır alınmaz katkı maddesi ile iyice karıştırılmaması
- Zorlu kan alımı,
- Örneğin buzdolabında bekletilmesi,
- Üreticinin belirttiğinden daha çok/az hacimde kan alınması,
- Enjektörle kan alınması,
- Tüpten tüpe kan aktarılması (özellikle pıhtılaştırıcı içeren tüplerden EDTA'lı tüplere).

Pıhtının tahta çubuk gibi bir araçlarla tüp içinden çıkarılması, laboratuvarlarda sık yapılan yanlış bir uygulamadır, kesinlikle önerilmez. Bu işlem örneğin hemolizine ve tüm parametrelerin sonuçlarında yanlış düşük değerler alınmasına yol açabilir. Örnek içindeki pıhtı kalıntıları analizörlerin problemlerinde, tınginlerinde tıkanmaya, eğer gözden kaçarsa ölçüm sırasında interferanslara neden olabilmektedir.

Öneri:

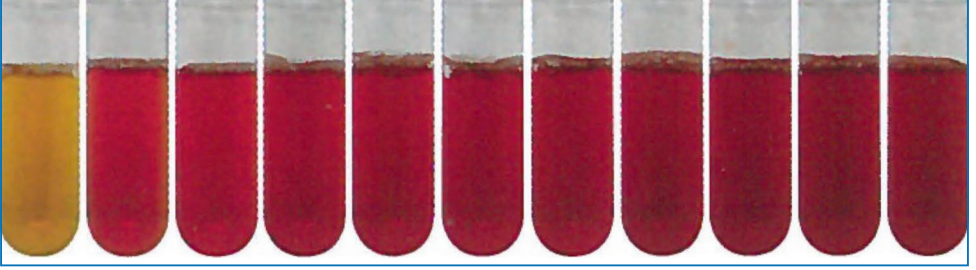
- Tam kan örneğinde pıhtı gözlenirse bu örnek kesinlikle reddedilmelidir (28-30, 44). Bu işlem örneğin hemolizine ve tüm parametrelerin sonuçlarında yanlış düşük değerler alınmasına yol açabilir.
- Pıhtının tahta çubuk gibi araçlarla tüp içinden çıkarılması, laboratuvarlarda sık yapılan yanlış bir uygulamadır, kesinlikle önerilmez.

Büyük pıhtıların gözle saptanması kolaydır. Günümüzde laboratuvarlarda bulunan kan sayım analizörlerinin hemen hepsinde pıhtı dedektörleri bulunmaktadır. Pıhtılı örnek yanlışlıkla cihaza verilse bile çalışmayacaktır ancak mikro pıhtılar dedektörle saptanamayabilir. Örnek içinde pıhtı varlığında bütün kan hücreleri pıhtıyla sarılıp tutulacağı için tüm parametrelerin sonuçlarında yanlış düşük değerler gözlenebilir. Böyle bir durumda MCHC değerlerindeki düşüklük uyarıcı olabilir.



Şekil 21. Tam kan örneği içindeki pıhtı

7.2. Hemoliz



Şekil 22. Hemolizin görsel değerlendirilmesi (46)

Hemoliz, alyuvarların in vivo ya da in vitro parçalanmasıdır. Ancak hemoliz olaylarının çoğu, örnek toplama, taşıma, işleme ya da saklama sırasında alyuvar bütünlüğünün mekanik olarak bozulması nedeniyle in vitro gerçekleşir. Hemoliz özellikle acil servisten gelen ve çocuklardan alınan örneklerde önemli bir sorundur (47).

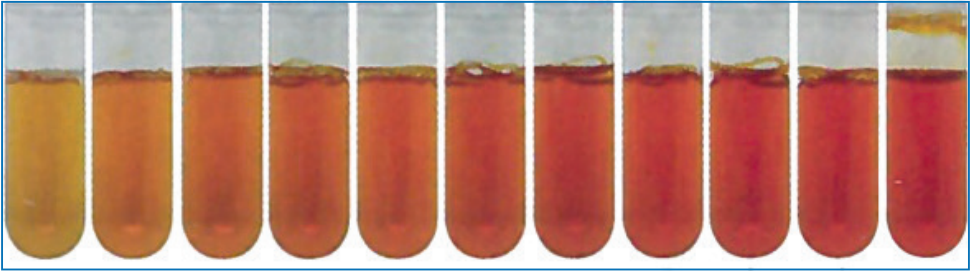
Olası hemoliz nedenleri:

- Zorlu kan alımı,
- Enjektörle kan alımı,
- Turnike süresinin uzun olması,
- İğne çapının küçük olması (23 G'den büyük),
- Hematom oluşumu,
- Örneğe etanol ya da su bulaşması,
- Kan alındıktan sonra veya taşıma esnasında tüpün çalkalanması,
- Tüpten tüpe kan aktarma,
- Vakumlu tüpe yetersiz kan alımı.

Örneğin içindeki alyuvarların parçalanması hemoglobin ölçüm yönteminin (analitik aşamanın) bir parçasıdır ancak bunun istenmeyen biçimde preanalitik aşamada erkenden gerçekleşmesi özellikle alyuvar göstergelerinin yanlış sayılmasına ya da hesaplanmasına neden olur. Hemoglobin değeri etkilenmezken alyuvarlar yıkıldığı için RBC değeri düşer buna bağlı olarak da HCT, MCV değeri düşecek MCHC değeri de yanlış yüksek hesaplanacaktır. Tam kan sayımında hemolizin preanalitik aşamada saptanması çok zordur. Serum ya da plazmadan çalışılan testlerde hemolizin varlığı gözle ya da analizörlerce önceden saptanarak uyarı oluşturulabilir.

Hemolize bağlı olarak PLT değerlerinde artış gözlenebilmektedir Bunun olası nedeni; parçalanmış alyuvar artıklarının, trombosit olarak okunması olabilir (48). Ancak tam kan örneğinde hemoliz görsel olarak saptanamaz. Bu nedenle hasta sonuçları değerlendirilirken eğer varsa diğer örneklerde hemolizin saptanması veya MCHC değerlerinde yanlış yükseklikler uyarıcı olabilir.

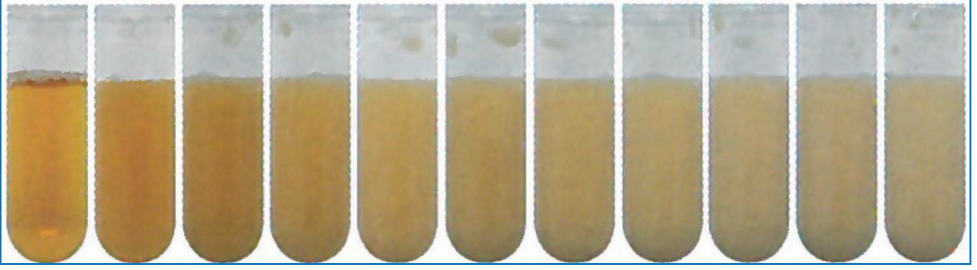
7.3. İkter (Bilirubinemi)



Şekil 23. Bilirubineminin görsel değerlendirilmesi (46)

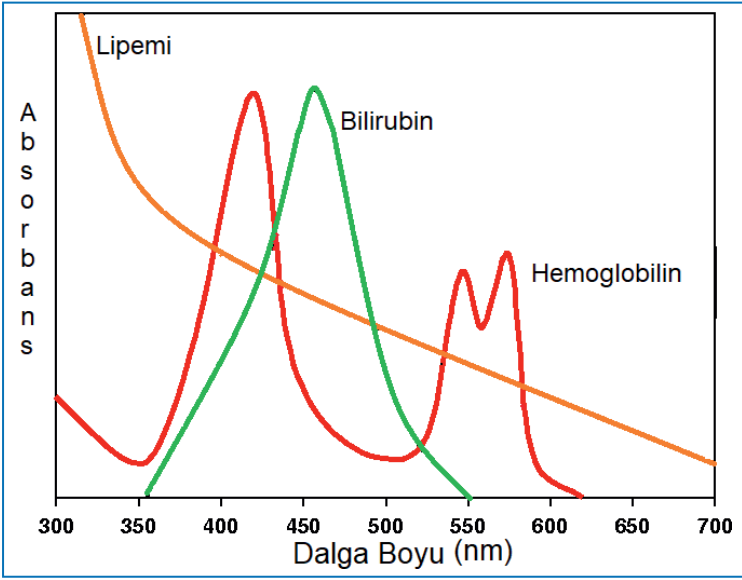
Yüksek bilirubin, değerleri tam kan sayımında önemli bir interferans nedenidir. Bilirubin 340-500 nm arasında absorpsiyon vermektedir. Hemoglobinin ölçümleri de bu dalga boyu aralığına yakın bölgede yapıldığı için yüksek bilirubin düzeyleri interferansa neden olabilmektedir. Yüksek bilirubin düzeylerine bağlı olarak HGB yanlış yüksek okunabilir: Hemoglobinden hesaplanan MCH değerleri de yanlış yüksek bulunacaktır (10, 49).

7.4. Lipemi



Şekil 24. Lipeminin görsel değerlendirilmesi (46)

Türk toplumunda kadınların %32'sinin erkeklerinse %41,3'ünün trigliserid değerlerinin 150 mg/dL'nin üzerinde olduğu bildirilmiştir (50). Tokluk örneklerinde bu değerlerin çok daha yükseldiği bilinmektedir. 300 mg/dL'nin üzerinde lipemi gözle görülebilir. Trigliserid değerlerinin yükselmesi içeriklerinin büyük bölümünü trigliseridlerin oluşturduğu şilomikron ve VLDL'nin dolaşımdaki varlıklarının artması anlamına gelir. Partiküler yapıdaki bu lipoproteinlerden VLDL'lerin çapları 200 nm'yi bulurken şilomikronların büyüklükleri 1000 nm'ye ulaşmaktadır (51). Ölçüm yöntemi parçacık sayımına dayanan tam kan sayımında bu lipoprotein parçacıkları trombosit hatta alyuvar ya da akyuvar olarak sayılabilmekte, yanlış yüksek sonuçlara neden olabilmektedir. Ancak lipeminin etkisi bununla sınırlı değildir. Lipemi örneğin matriksini bozmakta, fotometrik yöntemlerde istenmeyen ışık saçılımına neden olmaktadır. Oluşturduğu bulanıklıkla; HGB ölçüm dalga boyunda, HGB ile interferansa girerek yanlış yüksek hemoglobin değerlerinin okunmasına neden olmaktadır (52). Ayrıca lipoprotein partikülleri örnekte sıvı dışlama etkisine bağlı sıvı kompartmanını küçülterek analitlerin yoğunlaşmasına, böylece tüm analitlerde yanlış yüksek sonuçlara neden olmaktadır. Bu olgunun kan sayımı üzerindeki yansımaları yine hemoglobin değerleri üzerine olmaktadır.



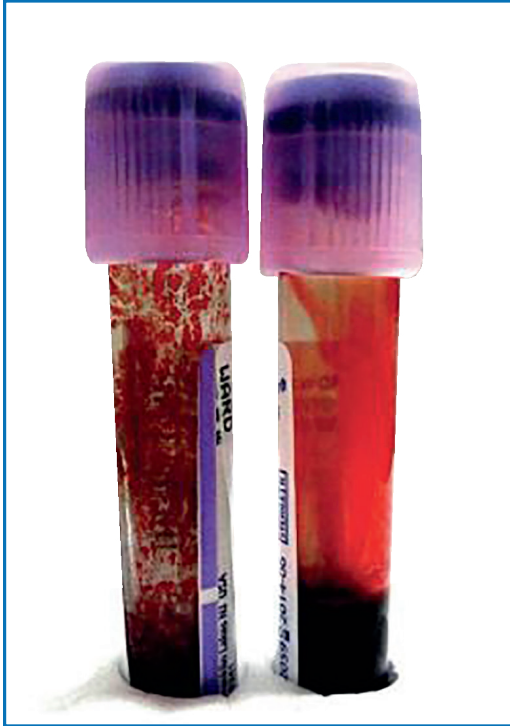
Şekil 15. Lipit, bilirubin, hemoglobinin absorpsiyon spektrumu (53)



Şekil 22. Lipemik EDTA'lı tam kan örneği (52)

7.5. Soğuk Aglutininler

Soğuk aglütinin hastalığı alyuvarların yüzeyindeki polisakkarit antijenlere karşı oluşan, genellikle IgM, bazen de IgA ya da IgG türündeki antikorların neden olduğu otoimmün bir hastalıktır. Soğuk aglütinin hastalığında soğukta aktive olan antikorlar alyuvarların zarında bozulmaya neden olurlar ve alyuvarlar otoaglütinasyona uğrar, olay derinleşirse hemoliz ile sonuçlanır. Tam kan sayımı üzerindeki etkileri hemolize benzerdir RBC, HCT düşerken MCHC artar. Tam kan örneği 37 °C'de su banyosunda bekletilirse aglütinasyon çözülür yeniden yapılan ölçümde gerçek değerlere ulaşılabilir (55, 56). Böyle bir durumun varlığı saptanırsa hasta sonuçlarında rapor edilmelidir (45).



Şekil 23. Soğuk aglütinin hastalığında tam kan örneğinin kontrol örneğiyle görsel karşılaştırılması (54)

Preanalitik hata	Kan sayımında etkilenen parametre	Neden	Öneri
Pıhtılı örnek	Okuma gerçekleşmez ya da mikro pıhtı varlığında tüm değerlerde düşme	Pıhtı artıklarının varlığında hücreler sayılamaz	Örnek reddi
Hemoliz	RBC ↓, HCT↓	Erken parçalanmış alyuvarlar sayılamaz	Örnek reddi
İkter	HGB↑, MCH↑	Bulanıklığa bağlı fotometrik interferans	Hasta kliniğine göre karar
Lipemi	HGB↑, MCH↑	Bulanıklığa bağlı fotometrik interferans	Hasta kliniğine göre karar
Yıkıma dayanıklı alyuvarlar	WBC↑,	Hemoglobin S, C gibi hastalıklarda yıkılmayan alyuvarlar, akyuvar gibi sayılabilir	Hasta kliniğine göre karar
Soğuk aglütininer	RBC↓, MCV↑, MCHC↑	Alyuvarların birbirlerine yapışması	Örnek 37 °C'de inkübe edilip yeniden çalışılabilir
Trombosit kümeleri	PLT↓, WBC↑	Kümeleşmiş trombositler yanlışlıkla akyuvar gibi sayılabilir (EDTA interferansı).	Sitratlı, heparinli vb. başka tüpe alınan yeni örnekten çalışılabilir.

Tablo 4: Sık görülen preanalitik hatalar, olası nedenleri ve çözüm önerileri

Kaynaklar:

1. Plebani M, Sciacovelli L, Aita A, Padoan A, Chiozza M. Quality indicators to detect pre-analytical errors in laboratory testing. *Clin Chim Acta* 2014 (15); 432: 44-48.
2. Kocer D, Karakukcu C, Buldu S, Oz L . Kayseri Şehir Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında Hematolojik Testlere Ait Preanalitik Hatalar. *JAMER* 2019;4 (3): 100-104 .
3. WikiJournal of Medicine/Medical gallery of Blausen Medical. Wikiversity. Retrieved September 11, 2020, from https://en.wikiversity.org/wiki/WikiJournal_of_Medicine/Medical_gallery_of_Blausen_Medical_
4. Perkins SL. Examinations of the blood and bone marrow. In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber DA, et al, editors. *Wintrobe's clinical hematology*. 12th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2009.
5. Hsia CC. Respiratory function of hemoglobin. *New Eng J Med* 1998; 338(4): 239-248.
6. Vierordt K V Neue methode der quantitativen mikroskopischen analyse des blutes. *Arch F Physiol Heilk*. 1852;11: 26-46.
7. Verso ML. The evolution of blood-counting techniques. *Med Hist* 1964; 8(2): 149-158.
8. Davis JD. The hemocytometer and its impact on progressive era medicine (<http://hdl.handle.net/2142/20809>; erişim: 06.11.2020).
9. Marshall D. The Coulter principle: foundation of an industry. *JALA* 2003; 8: 72–81.
10. Longanbach S, Miers MK. Automated Blood Cell Analysis. In Keohane EM, Smith LJ, Walenga JM. Editors. *Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications*. St. Louis, Missouri. Elsevier Saunders. 5th ed. 2016
11. <https://www.beckmancoulter.com/download/file/wsr32905/4237515BA?type=pdf>. Erişim 31.08.2020
12. Sullivan E. Hematology analyzer: From workhorse to thoroughbred. *Lab Med* 2006; 37(5); 273-278.
13. https://www.sysmexeuropa.com/fileadmin/media/f100/SEED/Sysmex_SEED_The_Red_Blood_Cell_Indices.pdf erişim 31.08.2020
14. Lima-Oliveira G, Guidi GC, Salvagno GL, Danese E, Montagnana M, Lippi G.

Patient posture for blood collection by venipuncture: recall for standardization after 28 years. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2017; 39(2): 127-132.

15. Keohane EM. Blood Specimen Collection. In Keohane EM, Smith LJ, Wallenga JM. Editors *Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications*. St. Louis, Missouri. Elsevier Saunders, 5th ed. 2016

16. Neves PRDS, Tenorio TRDS, Lins TA, Muniz MTC, Pithon-Curi TC, Botero JP, Do Prado WL. Acute effects of high-and low-intensity exercise bouts on leukocyte counts. *J Exerc Sci Fit* 2015; 13(1): 24-28.

17. Banfi G, Germagnoli L. Preanalytical phase in haematology. *JMB* 2008; 27(3): 348-353.

18. Haus E. Editor. Chronobiology of circulating blood cells and platelets. In: *Biologic rhythms in clinical and laboratory medicine*. Springer, Berlin, Heidelberg. 1992; 504-526.

19. Budkowska M, Lebiecka A, Marcinowska Z, Woźniak J, Jastrzębska M, Dołęgowska B. The circadian rhythm of selected parameters of the hemostasis system in healthy people. *Thromb Res* 2019;182:79-88.

20. Van Duijnhoven H, Treskes M. Marked interference of hyperglycemia in measurements of mean (red) cell volume by Technicon H analyzers. *Clin Chem* 1996; 42(1): 76-80.

21. Landt M, Wilhite TR, Smith CH. A new plastic evacuated tube with plasma separator. *J Clin Lab Anal* 1995;9(2):101-6.

22. Hill BM, Laessig RH, Koch DD, Hassemer DJ. Comparison of plastic vs. glass evacuated serum-separator (SSTTM) blood-drawing tubes for common clinical chemistry determinations. *Clin Chem* 1992; 38(8): 1474-1478.

23. Bowen RA, Remaley AT. Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. *Biochem Med (Zagreb)* 2014;24(1):31-44.

24. Flanders MM, Crist R, Rodgers GM. A comparison of blood collection in glass versus plastic Vacutainers on results of esoteric coagulation assays. *Lab Med* 2003; 34(10): 732-735.

25. Banfi G, Salvagno GL, Lippi G. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45(5): 565-576.

26. CLSI P 39-A6 Guideline, Tubes and Additives for Venous and Capillary Blood Specimen Collection, 6th Edition; Approved Standard. CLSI documentation G: 2010.

27. International Council for Standardization in Haematology. Recommendations of International Council for Standardization in Haematology for Ethylenediaminetetraacetic Acid Anticoagulation of Blood Cell Counting and Sizing. *Am J Clin Pathol* 1993;100: 371-372.
28. Narang V, Kaur H, Selhi PK, Sood N, Singh A. Preanalytical errors in hematology laboratory-an avoidable incompetence. *Iran J Pathol* 2016;11(2):151-4
29. De la Salle B. Pre-and postanalytical errors in haematology. *Int J Lab Hematol* 2019;41 Suppl 1:170-176.
30. Abed R. Rate of hematology specimens rejection association with area of collection and reason of rejection. *Int J Biol Med Res* 2013; 4(1): 2902–2904.
31. <http://eclinpath.com/hematology/sample-collection-heme/erişim> 31.08.2020.
32. Brunson D, Smith D, Bak A, Przyk E, Sheridan B, Muncer DL. Comparing hematology anticoagulants: K2EDTA vs. K3EDTA. *Lab Hematol* 1995; 1: 112.
33. Nemeč A, Drobníč–Koşorok M, Butinar J. The effect of high anticoagulant K3-EDTA concentration on complete blood count and white blood cell differential counts in healthy beagle dogs. *Slov Vet Res* 2005; 42 (3/4): 65-70.
34. CLSI H21 A5 Guideline, Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition, January 2008.
35. Turk Biyokimya Derneği Prenalitik Evre Çalışma Grubu Venoz Kan Alma (Flebotomi) Kılavuzu, 2016. ISBN 978-605-87229-3-4.
36. Lippi G, Plebani M. EDTA-dependent pseud thrombocytopenia: further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50(8): 1281-1285.
37. European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE) and Latin America Confederation of Clinical Biochemistry (COLABIOCLI) Latin American Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE-LATAM). Joint EFLM-COLABIOCLI Recommendation for venous blood sampling. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(12): 2015–2038.
38. Clinical Laboratory Standards Institute. Collection of Diagnostic Venous Blood Specimens. 7th ed. CLSI standard GP41. Wayne, PA, USA, 2001.
39. Cornet E, Behier C, Troussard X. Guidance for storing blood samples in laboratories performing complete blood count with differential. *Int J Lab Hematol* 2012;34(6):655-660.

40. Imeri, F, Herklotz R, Risch L, Arbetsleitner C, Zerlauth M, Risch GM, Huber AR. Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: a stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. *Clin Chim Acta* 2008; 397(1-2): 68-71.
41. Schapkaitz E, Pillay D. Prolonged storage-induced changes in haematology parameters referred for testing. *Afr J Lab Med* 2015;4(1):1-8.
42. Tendulkar A, Jain P, Gujral S, Tambe M, Kenjale R, Ganesh B. Stability of selected hematological parameters in stored blood samples. *J Cell Sci Ther* 2015; 6(5): 220.
43. Ekinçi A. Laboratuvarımızın Preatalitik Numune Red Analizi ve Eğitimin Etkisi. *Van Tıp Derg* 2019; 26(1): 79-84.
44. Ye Y, Wang W, Zhao H, He F, Zhong K, Yuan S, Wang Z. Haematology specimen acceptability: a national survey in Chinese laboratories. *Biochem Med (Zagreb)* 2018;28(3):420-29.
45. Peterson P, McNeill S, Gulati G. Cellular morphologic analysis of peripheral blood. In: Kandice Kottke-Marchant and Bruce H. Davis editors. *Laboratory hematology practice*. Blackwell Publishing 2012, pp. 10-25.
46. https://mydialog.roche.com/Htdocs/media/pdf/actualites/2b_SI_Brochure_2007.pdf erişim 03.09.2020.
47. Lippi G, Plebani M, Di Somma S, Cervellin G. Hemolyzed specimens: a major challenge for emergency departments and clinical laboratories. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011;48(3):143-53.
48. de Jonge G, dos Santos TL, Cruz BR, Simionatto M, Bittencourt JI, Krum EA, Borato DCK. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. *J Clin Lab Anal* 2018 ;32(5):e22396.
49. Cornbleet J. Spurious results from automated hematology cell counters. *Lab Med*. 1983; 14: 509-514.
50. Kayıkcıoğlu M, Tokgozoğlu L, Kilickap M, Goksuluk H, Karaaslan D, Ozer N, Bayram F. Türkiye'de dislipidemi sıklığı ve lipit verileri: Kardiyovasküler risk faktörlerine yönelik epidemiyolojik çalışmaların sistematik derleme ve meta-analizi. *Türk Kardiyol Dern Ars* 2018;46(7):556-574.
51. Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochem Med (Zagreb)* 2014;24(1):57-67.
52. Hosseini, H., Dorgalaleh, A., Tabibian, S., Kashiri, M., & Sanei, E. Biochemical interfering factors and blood cells indices. *Thrita* 2014; 3(1): e15516.

53. Farrell CJL, Carter AC. Serum indices: managing assay interference. *Ann Clin Biochem* 2016; 53(5): 527-538.
54. Youngson RM. "Hyperlipidaemia". *Collins Dictionary of Medicine* 2005.
55. Yasar NE, Ozgenc A, Bolayirli IM, Adiguzel M, Konukoglu D. Unexpected laboratory results in cold agglutinin disease. *Int J Med Biochem* 2018; 1(1): 40-3.
56. Jithendriya M, Job AM. Livedo reticularis: unfolding the enigma. *Egypt J Dermatol Venereo* 2017; 37(1): 20.



**Türk Biyokimya
Derneği**

ISBN: 978-605-70111-0-7

Bu kılavuz BD'nin koşulsuz desteği ile basılmıştır.