

HEMOSTAZ LABORATUVARI: HASTA YATAĞINDAN SONUÇ KAĞIDINA

Yahya Büyükaşık

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji Ünitesi, Ankara

Aşağıda hemostaz testlerinin istenmesi ve hemostaz laboratuvarlarının işleyişi ile ilgili başlıca konulara -kur- sun hedefleri göz önünde tutularak- yer verilmiştir.

1. Hemostaz laboratuvarının klinik pratikteki yeri

Hemostaz laboratuvarı klinik biyokimya, seroloji, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji gibi bütün hastane birimlerine hizmet veren, hasta bakımının sağlıklı bir şekilde yürütmesi için mutlak öneme sahip olan bir birimdir. Bu birimin işlevleri arasında hemostatik/trombotik bozukluk şüphesi ile başvuran ya da hastanede yatarken hemostatik/trombotik bozukluk geliştiren hastaların teşhisi ve izlemi yanısıra, cerrahi/invazif girişimsel işlemler öncesi değerlendirme, antikoagülan tedavi monitörizasyonu gibi bir çok tanısıl ve terapötik sürece olanak sağlamak vardır.

2. Doğru bir test sonucu için gerekli aşamalar

Tanısal süreçlerde hizmet veren laboratuvarların doğru sonuçlar verebilmesi çoğunlukla sadece ilgili laboratuvarın performansı ile ilgili değildir. Laboratuvara ulaştırılan spesimenin kalitesi, laboratuvar içindeki test hazırlık ve işlem basamakları ile sonuç raporlama ve saklama basamaklarının doğruluğu da benzer düzeyde önem taşımaktadır.

3. Preanalitik faktörler ve flebotomistin önemi

Bu bağlamda doğru test sonucu için ilk basamak doğru kan almak ve zamanında laboratuvara ulaştırmaktır. Kan örnekleme için kullanılması gereken tüplerin bazı özelliklerine dikkat etmek gereklidir.

- Vakumlu tüp kullanılması tercih edilmelidir. Tüpün üstünde son kullanım tarihi olmalıdır. Ayrıca seri numarası, optimal saklama şartları, kan alma kapasitesi ve içindeki maddeler belirtilmelidir. Eğer vakumlu tüp kullanılmayacaksa ya da tüpün vakumu bozulmuşsa kanın tam işaretli yer hizasına kadar alınmasına dikkat edilmelidir.

- Kan hacmi total tüp hacminin en azından % 80 kadarı olmalıdır. Daha az vakumlanmış tüplerde pH azalmasına bağlı trombosit aktivasyonu olabilmektedir.
- Tüplerin silikonize camdan olması ve artan silikonun uzaklaştırılmış olması gereklidir.
- Tüpün kapağı açıldığında aerosol yapmayacak şekilde tasarlanmış olmalıdır.
- Tercih edilen antikoagülan trisodyum sitrat olmalıdır (mavi kapaklı tüp). Tercih edilmesi gereken konsantrasyon aralığı 0.105-0.109 M (genellikle % 3.2) olmalıdır. Zira referans tromboplastin kalibrasyonu 0.109 M sitrat içine alınmış kandan elde edilen plazmalarla yapılmaktadır. Antikoagülan olarak sitrat-teofilin-adenin-dipiridamol (CTAD) içeren tüplerin heparin monitörizasyonu için daha uygun oldukları ileri sürülmüştür.
- Tercih edilen antikoagülan/kan hacim oranı 1/9 olmalıdır. Tüp az ya da fazla dolduğunda PTZ ve APTT değerleri etkilenebilir.
- Sitrat sitrik asit ile 5.1-5.3 pH düzeyine tamponlanmış olmalıdır. Böylelikle plazma hacmi 7.3-7.45 arasında tutulabilir.
- Vakumlu pıhtılaşma test tüpleri % 30-55 arasındaki hematokrit değerleri için uygun miktarda sitrat içerirler. Ancak değer bu aralıktan sapacak olursa PTZ ve APTT ölçümleri hatalı olabilir. Sitrat hacmini aşağıdaki formüle göre modifiye etmek gerekir:

$$\text{Antikoagülan hacmi} = 0.00185 \times \text{final hacim (ml)} \times [100 - \text{hematokrit}(\%)]$$

- Kan almada kullanılan iğnenin çapı 1 mm'den (19 g) daha kalın olduğunda venin travmaya uğraması ve tüpe karışan damar fragmanlarının hemostazı etkilemesi



mümkündür. Buna karşılık çap 0.7 mm'den (22 g) az olduğunda kan alma süresinin uzaması, hemoliz ve trombosit aktivasyonu olması söz konusu olabilecektir.

- Kelebek set ile kan alınması tercih edilen bir durum değildir. Ancak, çocuklarda sıklıkla bu şekilde kan alınmaktadır. Bu şekilde kan alınırken vakumlu tüpün kapağı açılmakta ve kan hacmi göz kararıyla belirlenmektedir. Örneklemenin sonunda kelebek setin içindeki kanın da tüpe boşaltılması neticesinde antikoagülan/kan hacmi değişmektedir. Bu durum özellikle düşük kapasiteli tüplere kan alınırken önemlidir. Setin toplam hacmi alınacak kan hacminin < %10'u olmalıdır. Kelebek setle kan alındığında kan akım hızının yavaş olması trombosit aktivasyonu riskini artırır.
- Kateterden kan alınması uygun değildir. Başlıca heparin kontaminasyonu nedeniyle APTT ve trombin zamanı sonuçları yanlış çıkabilmektedir. Eğer kateterden kan alınması kaçınılmaz ise alınan ilk bir miktar kanın atılması gerekir. Bu miktar değişik çalışmalarda 5-20 ml, kateter hacmi + 2 ml, kateter hacmi x 5 olarak belirtilmiştir.

- Venöz kan alma işlemi

- i. Öncelikle test istek formları ve tüpler hazırlanmalıdır. İstek formlarında klinik bilgi de olmalıdır. Laboratuara aynı hastadan birden fazla hemostaz tüpü gönderilecekse tüplerin doldurulma sıraları belirtilmelidir. Geceğinde laboratuvar görevlilerinin irtibat kurabilmeleri için kan alan kişinin kim olduğu belli olmalıdır.
- ii. Kan örneklerinin hasta sırtüstü yatar pozisyonda iken alınması tercih edilmelidir. Fibrinoliz testlerinden evvel 30 dakika istirahat tavsiye edilmektedir.
- iii. Antekubital bölgedeki geniş venler (ulnar, sefalik) tercih edilmelidir. Mayi giden koldan ya da hemodiyaliz hastalarında arteriyovenöz fistül bulunan koldan kan alınmamalıdır. Kan örneğinin infüzyon solüsyonu (heparin gibi) ile kontaminasyonu en sık izlenen preanalitik hata nedenlerinden birisidir.
- iv. Turnike venleri lokalize etmek için uygulanır. Bir dakikanın üstünde tutulduğunda faktör VIII, von Willebrand faktörü ve t-PA düzeyleri artar. Turnike süresi uzadıkça hemokonsantrasyon da ortaya çıkar. Hemokonsantrasyon 5-6 dakika civarında maksimum düzeye ulaşır. Turnike çok sıkı olmamalı, 1 dakikadan daha az tutulmalı ve tercihen kan tüpe akmaya başlayınca çıkarılmalıdır.
- v. Besin alımı ve diürenal değişimler bazı parametreleri değiştirebilir. Bu nedenle aksi gerekmedikçe

kan örnekleri tercihen son öğünden 12 saat sonra sabah saat 7-9 arasında alınmalıdır. İşlem mümkün olduğu ölçüde atravmatik olmalıdır. Flebotomistin tecrübesinin önemi bazı hassas hemostaz testlerinde daha da belirgin hale gelmektedir. Tecrübesiz bir flebotomistin aldığı kan örneklerinde protrombin fragman 1+2 düzeyi %21, trombin-antitrombin kompleksi düzeyi ise % 277 artmaktadır.

- vi. Vakumu bozulmuş ya da son kullanım tarihi geçmiş tüpler kullanılmamalıdır. Birden fazla tüpe ardışık kan alımı söz konusu olduğunda izlenecek sıradan konusundaki çelişkili bilgiler vardır. Doku faktörü kontaminasyonu nedeniyle ilk 5 ml kanın atılmasını ya da başka testler için kullanılmasını önerenler vardır. Ancak, EDTA ya da heparin içeren bir tüpe kan aldıktan sonra hemostaz testleri için örnekleme yapılması sitrat dışı antikoagülan kontaminasyonu riski nedeniyle uygun olmayabilir. Bir görüşe göre; bu yüzden eğer flebotomist tecrübeli ve alınacak kan miktarı optimal (4.5 ml) ise hemostaz tüpü ilk sırada doldurulabilir. Aksi hallerde antikoagülan içermeyen bir tüpe kan almayı takiben ikinci sırada doldurulması daha uygun olabilir. Tüp doğru miktarda doldurulmalıdır. Örnekleme yapıldıktan sonra kan ve antikoagülanın karışabilmesi için tüp 5-6 kez ters yüz edilmelidir. Ancak çalkalanmamalıdır.

- Transport ve analize kadar geçen zaman

- i. Eğer transport için pnömotik sistem kullanılıyorsa hemostaz tüpleri köpüklenme ve trombosit aktivasyonu engellenecek şekilde korunmalıdır.
- ii. Kan alımı ile santrfüj arasında geçen süre çok önemlidir. PTZ için 4 saat kabul edilebilir bir süredir. Ancak heparin tedavisinin monitörizasyonu için APTT testi söz konusu olduğunda sitratlı tüplerde süre 1 saati geçmemelidir. Zira trombosit faktör IV heparin nötralizasyonuna yol açabilir. Kullanılan antikoagülan CTAD ise süre 4 saate uzayabilir. Hemostaz testleri tercihen 2 (maksimum 4) saat içinde tamamlanmalıdır. Trombosit aktivitesi ile ilgili testlerde analiz için maksimum süre 4 saattir.

- Santrfüj

- i. Pıhtılaşma testleri için ideal santrfüj tekniği 2 kez, 15-20 °C'de, 2000 g'de, 15 dakika santrfüj yapılmasıdır. Ancak soğuk santrfüj kullanılarak 2000 g'de, bir kez, 15 dakika santrfüj yapılması da kabul edilebilir.
- ii. Trombosit zengin plazma elde etmek için oda ısısında 800 g'de 5 dakika ya da 200 g'de 20 dakika santrfüj önerilmektedir.

Tablo 1. Hemostaz laboratuvarlarında sık yapılan testler

Koagülasyon tarama testleri	Doğal antikoagülan düzeyleri
PTZ/INR	Protein C
APTT	Protein S
Trombin zamanı	Antitrombin
Fibrinojen aktivitesi/konsantrasyonu	
Koagülasyon faktör eksiklikleri ve inhibitör varlığını ayırt etmek üzere karışım çalışmaları	Aktive protein C rezistansı*
Koagülasyon faktör testleri	D-dimer testi
Koagülasyon faktör inhibitör testleri	Anti-Xa düzeyi
Lupus antikoagülan testi	Antifosfolipid antikor testi**
Trombosit agregasyon testleri	Faktör V Leiden ve protrombin 20210A için PCR***
Heparin-PF4 ELISA	

* Faktör V Leiden testine alternatif

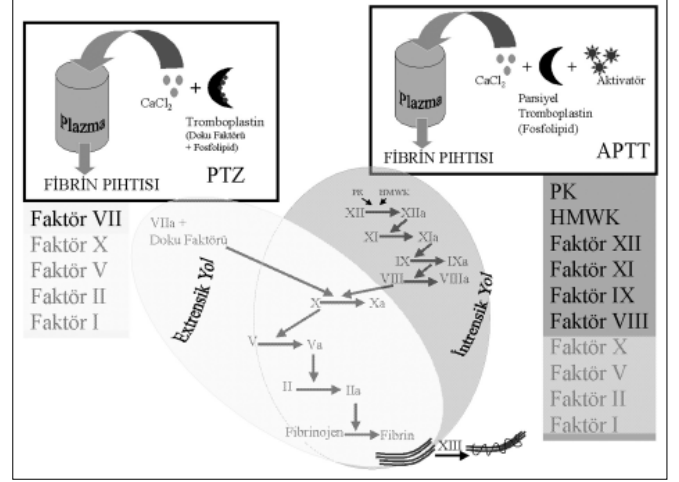
** Sıklıkla immünoloji laboratuvarında yapılır

*** Sıklıkla moleküler genetik laboratuvarında yapılır

4. Bir hemostaz laboratuvarında hangi testler yapılmalıdır? PTZ-INR ve APTT nedir?

Hemostaz laboratuvarlarında sıkça yapılan testler tablo 1'de gösterilmiştir.

PTZ-INR ve APTT bütün hemostaz laboratuvarlarında ya da bu işlevi yüklenen birimlerde yapılan ana hemostatik testlerdir. Bunlar, otomatize edilmiş in vitro pıhtılaşma zamanı testleridir. Test formülleri Şekil 1'de gösterilmiştir. Trombin zamanı ve fibrinojen düzeyi global hemostatik değerlendirmede ilk iki test kadar olmazsa da yerine göre çok önemli testlerdir. D-dimer düzeyi özellikle venöz tromboembolizm ve dissemine intravasküler koagülasyon tanısında önemli yeri olan bir testtir. Acil tanı konulması gereken bu hastalıklara doğru yaklaşım için D-dimer'in bu tip hastaların görülebildiği bütün merkezlerde çalışılabilmesinde fayda vardır. Faktör XIII dışındaki spesifik koagülasyon faktör düzeyleri ve ilişkili analizler PTZ ya da APTT bazlı testlerdir. Spesifik faktör düzeyleri kabaca, ölçülecek faktörden yoksun ticari plazma örneğinin PTZ ya da APTT pıhtılaşma zamanının hasta plazması tarafından ve havuzlanmış sağlıklı plazma tarafından hangi düzeyde etkilendiğine dayanarak ölçülür. Spesifik faktör düzeyleri ile faktör XIII ve von Willebrand faktör testlerinin gerek hizmet kalitesi gerekse arz-talep meseleleri nedeniyle sadece yoğun hasta sevki alan üçüncü basamak hastanelerde yapılması yeterlidir. Benzer kapsamda değerlendirilmesi gereken testler arasında doğal antikoagülan protein düzeyleri, lupus antikoagülan-antifosfolipid antikor incelemeleri, heparin-PF4 ELISA, anti-Xa düzeyi ve aktive protein C rezistansı testi de sayılabilir. Trombosit agregasyon testleri ve faktör V Leiden ile protrombin 20210A için



Şekil 1. PTZ ve APTT testleri

PCR incelemesinin sadece belli başlı hemostaz laboratuvarlarında ya da ilişkili birimlerde yapılması yeterlidir.

APTT ve PTZ en sık istenen hemostaz testleridir. Sırasıyla intrinsek ve ekstrinsek pıhtılaşma yollarının değerlendirilmesine olanak sağlayan bu testler Şekil 1'de özetlenmiştir.

Oral antikoagülan tedavi izleminde PTZ sonuçlarının INR şeklinde rapor edilmesi gereklidir. INR sistemi esas olarak oral antikoagülasyonda farklı tromboplastinlerin duyarlılıklarının değişik olabilmelerinden kaynaklanan PTZ değişimlerinden kaçınmak amacıyla geliştirilmiştir. INR= (Hasta PTZ / Ortalama Normal PTZ) / ISI. Hemostatik bozukluk araştırılan hastalarda INR yerine PTZ'nin kullanılması daha doğrudur. Kullanılan tromboplastinin aynı türden Dünya Sağlık Örgütü standardına nazaran duyarlılığı Uluslar Arası Duyarlılık İndeksi (ISI) olarak adlandırılır. PTZ testinin "kesinlik" (= precision) düzeyi ISI değeri düşük olduğu ölçüde artmaktadır. Lab standardizasyonu ile ilgili kurumlar 0,9 ile 1,7 arasındaki ISI değerlerine sahip tromboplastinlerin kullanılmasını önermektedir.

INR sistemi PTZ testi ile ilgili sorunları tümüyle elimine edebilmiş değildir: Koagülometre'den kaynaklanan değişikliklerin önüne geçilebilmesi için üreticinin koagülometre'ye özgü ISI değerini bildirilmesi ve diğer lokal faktörlerin standardize edilebilmesi içinse kalibratör plazma örneklerinin kullanılması önerilmektedir.

APTT sonuçlarının daha iyi kavranabilmesi için normal laboratuvar ortalamasının oranı (= ratio) şeklinde ifade edilmeleri daha uygun bir yaklaşımdır.

5. Test/ cihaz detayları

Başlıca klasik cihazlar

1. Koagülometreler: Hemostaz laboratuvarlarında yapılan testlerin çoğu pıhtılaşma zamanı bazlı testlerdir. PTZ, APTT



ve aktivite cinsinden faktör düzeyleri örnek olarak verilebilir. Koagülometreler şekil 1'dekine benzer pıhtılaşma senaryolarının gerçekleştiği ve pıhtı oluşma süresinin ölçüldüğü cihazlardır. Pıhtılaşma proteinlerinin antijen cinsinden düzey tayinleri immunoassay yöntemleriyle yapılır. Bazı koagülometreler immünolojik testler yapabilen modüller de bulundurmaktadır.

2. Agregometreler: Trombositten zengin sitratlı plazma ya da sitratlı tam kan örneklerine trombosit agregasyonunu uyaran bir reaktif eklendiğinde agregasyon sürecini ölçen cihazlardır. Bu cihazlar trombosit agregasyonu yanı sıra, trombosit ATP sekresyonu ve ristosetin koafaktör aktivitesi (von Willebrand faktörü aktivitesi) ölçmeye de yararlar.

3. ELISA okuyucuları: ELISA yöntemi ile çalışılan hemostazla ilgili testler (pıhtılaşma faktörlerinin antijenik düzeyleri, heparin/PF4 testi, antifosfolipid antikolar, vb) için.

Başlıca yeni cihazlar/testler

1) PFA-100 ile in vitro kanama zamanı: Kanama zamanının in vitro şartlarda taklit edilmesi amacıyla geliştirilen bir cihazdır. Kollajen/ADP ya da kollajen/epinefrin emdirilmiş kartuşların içinden geçen sitratlı kandaki trombositlerin ne kadar sürede kartuştan kan akımını bloke edecek şekilde pıhtı oluşturdukları ölçülür. Özellikle von Willebrand hastalığı ve trombosit reseptör bozukluklarının taranmasında duyarlılığı yüksek olan bir testtir. Diğer trombosit fonksiyon bozuklukları için duyarlılığı düşüktür. Bu nedenle ve test maliyeti bir tarama testi için nispeten yüksek olduğu için bu cihazın rutin hemostaz incelemesindeki yeri netleşmemiştir. 2) Aspirin ve benzeri antiagregan duyarlılığını ölçmek amacıyla geliştirilen çeşitli test cihazları: Aspirin ve diğer antiagregan rezistanlarının tanımları ve gerçek klinik önemleri çok tartışmalıdır. Bu şartlarda bu cihazların rutin kullanımları önerilmemektedir. 3) Tromboelastografi: Bu cihazlar pıhtı oluşumu sırasındaki viskoelastik değişiklikleri ölçerler. Pıhtılaşma sürecinin hangi fazında bozukluk olduğunu (pıhtılaşma, trombosit, fibrinoliz, vb) global olarak değerlendirmeye olanak sağlayan bu cihazların poliklinik şartlarındaki elektif hemostaz değerlendirmesinden ziyade ameliyathanelerde

kardiyak ve hepatik cerrahilerde kan ürünü kullanımına yön vermek amacıyla kullanımı önerilmektedir. Aslında yaklaşık 60 yıl evvel keşfedilen bir yöntem olduğu halde son yıllarda yeniden ilgi uyandırmıştır.

6. Sonuçlar nasıl rapor edilmelidir ve saklanmalıdır?

Hemostaz laboratuvarlarının mümkün olduğu ölçüde her test için kendi normal değerlerini belirlemeleri ve bu referans aralıklarını sonuç kağıtlarında net bir şekilde belirtmeleri gereklidir. Normalden sapan test sonuçlarının dikkat çekerek şekilde işaretlenmeleri, aciliyet oluşturma potansiyeli olan sonuçların tanımlanması ve ilgili hekim ile acilen irtibat kurulması önerilen uygulamalardır. Sonuç kağıtlarında ve hastane içindeki intranet'te hemostaz testlerinin kullanımı ile ilgili bilgi ve uyarılara yer verilmesi laboratuvarın daha verimli bir şekilde kullanılmasına katkı yapabilir.

Hastanede güçlü bir ağ veritabanı bulunması, yeni ve gereğinde eski hasta sonuçlarına kolaylıkla ulaşılabilmesi de son derece önemlidir.

7. Diğer

Hemostaz laboratuvarları sürekli olarak internal ve eksternal kontrole tabi tutulmalıdır. Böylelikle olası sistematik ve rasgele hataların erkenden fark edilip düzeltilmesi mümkün olabilecektir. Laboratuvar yeniliklere ve gelişmeye açık olmalıdır. Verilen hizmetin kaliteli olması kadar sorumlu ve maliyet-etkin olması da önemlidir. Şimdiye kadar ifade edilen hizmet prosedürlerinin doğru bir şekilde işleyebilmesi hemostaz laboratuvarında ciddi bir görev paylaşımı ile mümkündür.

KAYNAKLAR

1. Polack B, Schved JF, Boneu B. Preanalytical recommendations of the "Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose" (GEHT) for venous blood testing in hemostasis laboratories. *Haemostasis* 2001;31:61-68.
2. Greaves M, Watson HG. Which new tests should be offered by clinical hemostasis laboratories? *Hematology Education: The Education Program for the Annual Congress of the European Hematology Association*. 2007;1:306-310.

