

Tam Kan Bekleme Süresinin Trombosit İndekslerine Etkisi

The Impact of Time Delay on the Measurement of Platelet Indices

Kağan Huysal Yasemin Üstündağ Leyla Günay Faruk Irmak

Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya, Bursa, Türkiye

Başvuru Tarihi: 18 Ocak 2016

Kabul Tarihi: 01 Şubat 2016

ÖZET

Amaç: Otomatik tam kan sayımı cihazları ile trombosit indeksleri (TI) olan ortalama trombosit hacmi (MPV), trombosit dağılım genişliği (PDW) ve "plateletcrit" (PCT) parametreleri ölçülebilmektedir. Numunelerin uzun süreli beklemesinin yanlış sonuçlara neden olabileceği bilinmektedir; bu çalışmanın amacı örnek alımı ile test çalışılması arasında geçen sürenin Mindray BC-5800 analizörü ile TI değerlerine etkisini ölçmektir.

Materyal ve Metod: Tam kan sayımı K3-EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden Mindray BC-5800 (Mindray BioMedical Electronics Co., Ltd., Shenzhen, Çin) cihazında yapıldı. Venöz kan alındıktan sonra 45-60 dakikada çıkan sonuçlar bazal değer kabul edildi. Kanlar oda sıcaklığında (24°C -26°C) bekletilip 150., 270., dakikada ve 24. saatte tekrar çalışıldı. TI parametrelerinin stabilitesi bazal örnek sonuçları ile karşılaştırılarak belirlendi.

Bulgular: Trombosit sayısı bekletmekle değişmedi. PDW değeri 24. saatte başlangıca göre yüksek bulundu ($p<0.05$) (%7.9); MPV, P-LCR ve P-LCC değerleri ise bazal değerle karşılaştırıldığında tedrici olarak arttı ($p<0.01$).

Sonuç: EDTA'lı kanın bekletmekle Mindray BC-5800 ile çalışılan TI sonuçlarında ilerleyici bir artışa neden olur, bu nedenle numune alma ve analiz arasındaki zamanı standardize etmek gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: trombosit, kan hücre sayımı, ortalama trombosit hacmi

ABSTRACT

Purpose: Platelet Indices (PI) like mean platelet volume (MPV), platelet distribution weight (PDW) and plateletcrit can be measured by hematology analyzers. The purpose of this study was to evaluate the effect of the time delay between sampling and testing to the PI values with Mindray BC-5800 analyzer.

Material and Methods: Complete blood counts were measured from blood samples collected in K3-EDTA tubes with Mindray BC-5800 (Mindray BioMedical Electronics Co., Ltd., Shenzhen, China) device. Values obtained from 45–60 min after blood collection was accepted as basal values. CBC was done on the samples after 150 and 270 minutes and 24 hours. The stability of the TI parameters was determined by comparing the results to the basal sample.

Results: Platelet count remained unchanged with storage. PDW were higher in 24 hours compared to the basal level. The difference of PDW levels between the measurements at baseline and stored at room

temperature for 24 hour ($p<0.005$) (percent change 7.9%) and, MPV, P- LCR and P-LCC values were increased gradually over basal value ($p<0.01$).

Conclusion: Storage of EDTA blood resulted in a progressive increase in the TI results with Mindray BC-5800 therefore it is better to standardize the time delay between sampling and analysis.

Key words: platelet, blood cell count, mean platelet volume

GİRİŞ

Tam kan sayımı (CBC) klinik laboratuvarında en çok talep edilen test gruplarından biridir. Otomatize kan sayım cihazlarında eritrosit sayısı, hemoglobin konsantrasyonu, ortalama eritrosit hacmi, lökosit ve trombosit (Plt) sayısı doğrudan ölçülen parametrelerdir. İndeks değerlerinin büyük çoğunluğu ise hesaplanarak belirlenir.

Tam kan sayımı içinde otomatik olarak bakılan trombosit indeksleri (TI) ortalama trombosit hacmi (MPV), trombosit dağılım genişliği (PDW) kandaki trombosit yüzdesi (plateletcrit =PCT), büyük trombositlerin normal olanlara oranı (platelet-large cell ratio= P-LCR) ve büyük trombositlerin konsantrasyonu (platelet-large cell concentration=P-LCC) parametrelerinden oluşmaktadır.

Trombositler hemostazda iyi bilinen fonksiyonlarına ek olarak inflamatuvar ve immüno-modülatör süreçlerde de rol almaktadır. Son yıllarda hematolojik hastalıklar yanında birçok hastalıkta (kanserler, kardiyovasküler hastalıklar, romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıklar, akut inflamatuvar hastalıklar gibi) TI'lerinin klinik önemi ile ilgili yoğun çalışmalar yapılmaktadır (1, 2, 3).

Ülkemizde çeşitli marka ve modellerde elektronik kan sayım cihazları kullanılmaktadır (4). Kan sayımı cihazlarında impedans, radyo dalgaları ve optik lazer saçılımı (optik laser scatter) olmak üzere üç temel teknoloji kullanılmaktadır. Trombositler birçok kan sayımı cihazında impedans yöntemi ile sayılmaktadır. Cihazların çalışma prensiplerine, kullanılan antikoagülana, kan alımı ile testin çalışması arasında geçen süreye bağlı olarak TI sonuçlarının değişebildiği bilinmektedir (5, 6).

CBC değerlerinin bakılması istenilen hastalarda gerek alınan kanların laboratuvara

ulaştırılması esnasında, gerekse laboratuvar içerisinde aksaklıklar nedeniyle çalışma gecikebilmektedir. Örneğin cihazın arızalanması gibi durumlarda test için gönderilen kanlar, oda ısısında bekletilebilmektedir. Arızanın aynı gün giderilemediği durumlarda bekleme süresi de uzayabilmektedir.

Biz de çalışmamızda örnek alımı ile test çalışması arasında geçen sürenin Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA)'lı tam kanda Mindray BC-5800 (Mindray BioMedical Electronics Co., Ltd., Shenzhen, Çin) cihazında ölçülen TI sonuçlarına etkisini ölçmeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu prospektif çalışma hastanemiz merkez laboratuvarında 2015 yılı Aralık ayı süresince gerçekleştirildi. Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi etik kurul onayı ile çalışmaya katılacak tüm hastalar bilgilendirilip onamları alındı.

Hastalardan venöz kan alınma saatleri bilgi işlem kayıtlarından tespit edildi. K3-EDTA'lı (Isotherm, Xinle Medikal, Shijiazhuang, Çin) tüplere alınan kan örneklerinden de trombosit ile ilgili parametreler Mindray BC-5800 (Mindray BioMedical Electronics Co., Ltd., Shenzhen, Çin) cihazında impedans yöntemi ile çalışıldı. Hemogram ölçümü için başvuran hastalardan alınan numuneler merkez laboratuvarında analiz edildi, kan alındıktan sonra 45-60 dakikada analizörden çıkan sonuçlar bazal değer kabul edildi. Kanlar oda sıcaklığında (24°C -26°C) bekletilip 150., 270. dakikada ve 24. saatte tekrar çalışıldı.

Trombosit indeksleri ölçüm yöntemleri

Mindray BC-5800

Mindray BC-5800 cihazında trombosit sayımı elektronik impedans yöntemi (Coulter pren-

sibi ile yapılmaktadır. İmpedans yöntemi; iki elektrot arasındaki delikten geçen hücrelerin yarattığı elektriksel rezistansın oluşturduğu voltaj değişiklerinin ölçümü esasına dayanır. Delikten geçen her hücre, elektrik akımında ani bir impedans yükselmesi yapar. Delikten geçen parçacığın boyu ve hacmine bağlı olmak üzere bu impedans değişiminin oluşturduğu voltaj sıçraması ile parçacığın büyüklüğü ve/veya sayısı belirlenerek histogramında gösterilir (7). Normal bir kan sayımı histogramında 2-20 fL arasında trombositler bulunmaktadır.

Ortalama trombosit hacmi (MPV) trombosit histogramından hesaplanmakta ve fL olarak verilmektedir. MPV kemik iliğinde trombosit üretim hızının direk göstergesidir; trombosit aktivasyon ve fonksiyonunu değerlendirmede sıklıkla kullanılmaktadır (4).

PDW, trombosit dağılım genişliği, trombosit boyutları homojenliğinin ölçüsüdür. PDW trombosit boyutu dağılımının geometrik standart sapmasıdır ve trombosit histogram verilerinden hesaplanmaktadır (8).

PCT trombositlerin oluşturduğu hacmin, toplam kan hacmine oranıdır. PCT değeri $Plt \times MPV / 1000$ formülü ile hesaplanmakta ve % olarak ifade edilmektedir.

Analizör P-LCR ve P-LCC'yi trombosit histogramından hesaplamaktadır. P-LCR 12

fL den büyük lenfositlerin total trombosit sayımına oranıdır. % olarak tanımlanmıştır. P-LCC ise 12 fL den büyük trombositlerin sayısı ($10^9/L$) olarak değeridir. $Plt \times P-LCR$ çarpımıdır (9).

İstatistiksel Analizler

Trombosit sayısı ve indeksleri ortalama ve standard sapma olarak bildirildi. Sonuçlar SPSS 21.0 programı kullanılarak Wilcoxon testi ile karşılaştırıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Elli hasta bu çalışmaya alındı. Tüm olguların 34'ü kadın ve 16'sı erkekti. Hastaların yaş ortalaması 32 ± 14 idi.

Çalışma sırasında Riças (Randox Laboratories Ltd UK) (Cycle 8, sample 12) dış kalite kontrol çalışmasında 79 laboratuvarından elde edilen Mindray CBC trombosit parametreleri kabul edilebilir sınırlar içinde rapor edildi (Tablo 1).

Trombosit sayısı oda ısısında bekletmekle bazal değere göre istatistiksel olarak değişmedi ($p > 0.05$). PDW değeri 24. saatte başlangıca göre yüksek bulundu ($p < 0.05$); MPV, P-LCR ve P-LCC değerleri ise tedrici olarak arttı; bazal değerle karşılaştırıldığında 150. dakikadan itibaren istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu ($p < 0.01$) (Şekil 1,2).

Tablo 1. Trombosit indekslerinin çalışma sürecinde dış kalite kontrol sonuçları.

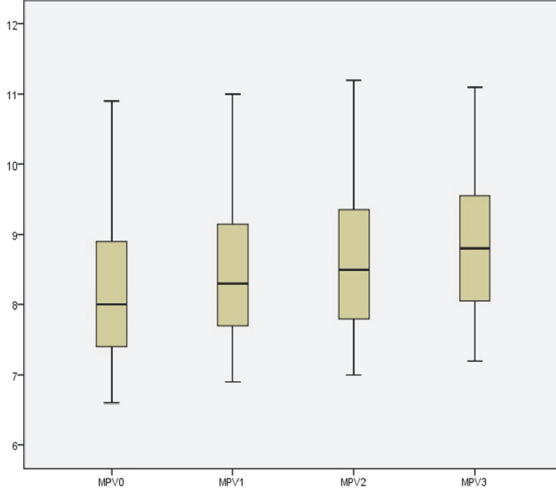
	Yöntem ortalaması	Bizim sonucumuz	SDI
MPV	8.58	8.3	-0.49
Plateletcrit	0.469	0.432	-0.58
Trombosit sayısı	547	520	-0.65

Tablo 2. Kan alımından sonra farklı zamanlarda ölçülen trombosit indekslerinde başlangıca göre %bias.

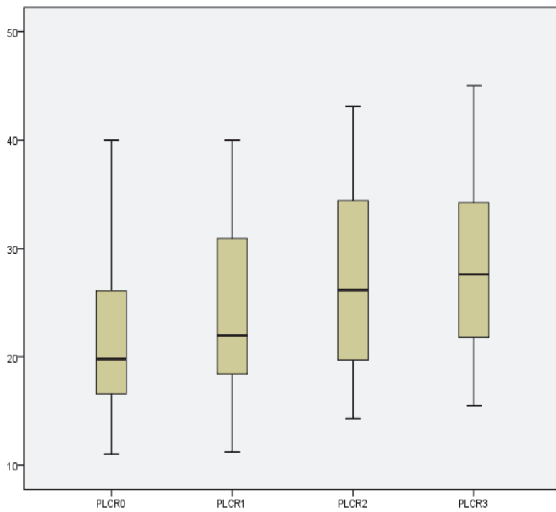
	%Bias (%95 CI)*			
	Bazal değerler	150 dak*	270 dak*	24 saat*
PLT	243±65	0.5(-0.7-1.7)	-0.3(-1.2-0.7)	0.2(-1.2-1.8)
MPV (fL)	8.1±1.0	3.6 (2.7-4.4)***	5.7(4.7-6.6)***	7.9(6.7-9)***
PDW	15.9±0.5	-2.1(-6.5-2.4)	0.3(0-0.7)	0.7(0.1-1.3)**
PCT (%)	0.19±0.05	4.4 (-4.3-13.1)	4.9 (3.1-6.6)	8.1(5.9-10.2)
P-LCR (%)	23.0±0.5	8.8(3.0-14.6)***	17.3(11.9-22.7)***	24.0(18.0-30.0)***
P-LCC ($10^9/L$)	54.3±21.1	11.7(8.1-15.4)***	16.7(13.0-20.5)***	24.7(20.8-28.6)***

*60. dakikada bulunan sonuçlara göre % fark

bazal ölçüm değeri ile karşılaştırıldığında $p < 0.005$, *bazal ölçüm değeri ile karşılaştırıldığında $p < 0.001$



Şekil 1.MPV değerlerinin oda ısısında bekletme ile bazale göre değişimi (MPV 0: bazal, MPV 1: 150. dakika, MPV 2: 270 dakika, MPV 3: 24 saatte ortalama trombosit hacimleri dağılımı)



Şekil 2.P-LCR değerinin oda ısısında bekletme ile bazale göre değişimi

TARTIŞMA

Çalışmamızda, trombosit sayısının oda ısısında 24 saate kadar bekletilmekle değişmediğini ancak kan alımından ölçümüne kadar geçen sürenin TI değerlerinin değişmesine neden olduğunu bulduk.

Kanın bekletilmesi ile CBC parametrelerinde değişim meydana gelmesi ile ilgili farklı cihazlarda yapılmış çalışmalar mevcuttur. İmeri ve arkadaşları bekleme süresi ve depolama sıcaklığının CBC sonuçlarına etkisini üç

farklı hemogram cihazında (Advia 120, Bayer Diagnostics; XE 2100, Sysmex and LH 750, Beckman Coulter) araştırmıştır. Hematolojik parametrelerin depolama ısısı ve cihaz tipine bağlı olarak değişkenlik gösterdiği sonucuna varmışlardır (10). Vogelaar ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada bizim bulgularımıza benzer şekilde oda ısısında bekletilen tam kanda Beckman Coulter Counter Maxm cihazı ile ölçülen trombosit sayısının değişmediğini, ancak MPV düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir (11). Lance ve arkadaşları Coulter LH 750 cihazında kan alımı sonrası MPV için optimal ölçüm süresinin 120 dakika olması gerektiğini bildirmiştir (12).

Trombositler büyüklük, yoğunluk, yaş ve metabolik açıdan farklılıklar gösteren diskoid hücrelerdir (15). Trombositler fiziksel veya kimyasal uyarılarla karşılaşınca morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere uğramakta ve bu ise trombosit aktivasyonu olarak adlandırılmaktadır. Aktivasyon sırasında trombositler disk şeklinden küresel şekle döner ve psödopod oluşumu gözlenir. Artmış PDW anizotuzu gösterir ve bu da psödopod oluşumuyla ilişkili olabilir (8). Artan MPV ve PDW trombositlerin aktif durumda olduğunu göstermektedir.

Rutinde tam kan sayımında antikoagulan olarak etilen diamintetra-asetik asit (EDTA, edetik asit) bulunan tüplere alınan numune kullanılmaktadır. EDTA hücre sayımı ve beyaz küre analizi için en uygun antikoagulandır. EDTA'nın kandaki kalsiyum iyonlarına bağlanarak koagülasyon kaskatını bloke etmesi sırasında, trombosit membranındaki glikoprotein IIb-IIIa (GPIIb-IIIa) reseptörleri geri dönüşümsüz olarak trombositlerden ayrılır (13). EDTA ile trombositlerin kanaliküler sistemi açılır, hacmi artar ve zamana bağlı tedrici olarak diskoid bir şekilden küresel bir şekle bir değişir (14). Küresel şekle dönüşen trombositler impedans yöntemine dayalı analizörlerde belirgin olarak ölçülen hacimde artışına yol açar. Bizim çalışmamızda da MPV değeri zamanla artmakta ve ilk 24 saatin sonunda artış %7.9'a ulaşmaktadır. P-LCR ve P-LCC değeri de benzer bir artış eğilimi

göstermektedir. PDW değerinde ise 24 saat sonunda artış %0.7 oranındadır.

MPV trombosit aktivasyonu belirteci olduğundan ve bir çok klinik durumda ölçümü önemli olduğundan, örneklerin optimizasyonu, özellikle preanalitik süreçte çalışma zamanı ve saklama koşulları, ölçüm sonuçlarının doğruluğu için önemlidir (16).

Literatürde Tİ'lerin ve özellikle de MPV değerinin farklı klinik durumlarda tanı ve tedavi takibinde kullanımı ile ilgili ve araştırma amaçlı yapılmış birçok çalışma vardır. Bu çalışmaların çoğu genellikle retrospektiftir (17-20). Ancak çalışmaların birçoğunda kullanılan cihaz, ölçüme kadar geçen süre ve kullanılan antikoagulan sıklıkla bildirilmemiştir. EDTA'lı kanda trombositlerin büyüklükleri kolayca değiştiğinden standardize edilmelidir.

Analitik basamak kalite kontrol prosedürleriyle kontrol edilebilirken, preanalitik dönemde hataların ne zaman ortaya çıktığı sıklıkla belirlenememekte böylece test sonucunun hastanın gerçek sonuçları ile uygun olmadığı durumlar gelişebilmektedir. Trombosit indeksleri değerlendirilirken preanalitik değişken olarak tam kanın bekleme süresi göz önüne alınmalıdır.

Sonuç olarak EDTA'lı kan bekletmekle Mindray BC-5800 ile çalışılan Tİ sonuçlarında ilerleyici bir artışa neden olur. Numune alma ve analiz arasındaki zamanı standardize etmek gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Sansanayudh N, Anothaisintawee T, Muntham D, McEvoy M, Attia J, Thakkinstian A Mean platelet volume and coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol* 2014; 175(3):433-40.
2. Franco AT, Corken A, Ware J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. *Blood* 2015; 30;126(5):582-8.
3. Kapur R, Zufferey A, Boillard E, Semple JW. Nouvelle cuisine: platelets served with inflammation. *J Immunol* 2015; 15;194(12):5579-87.
4. Kaya Z. Tam kan sayım çıktılarının yorumlanması. *Dicle Tıp Dergisi* 2013; 40 (3): 521-8.

5. Olteanu AL, Mihăilă RG, Cătană AC, Flucuş O, Buş C, Mihalache M. The impact of pre-analytical variable, type of anticoagulant and time delay, on the measurement of mean platelet volume. *HVM Bioflux* 2015;7(2):60-2.
6. Lippi G, Pavesi F, Pipitone S. Evaluation of mean platelet volume with four hematological analyzers: harmonization is still an unresolved issue. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2015;26(2):235-7.
7. D'Souza, BriggsC, Machin SC. Platelets: The few, the young, the active. In Bruğnara C, Kratz A, eds.. *Automated Hematology Analyzers: State of the Art, An Issue of Clinics* .Elsevier; 2015.p 35:
8. Vagdatli, E, Gounari E, Lazaridou E, Katsibourlia E, Tsikopoulou F, Labrianou I. Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation. *Hippokratia* 2010;14(1): 28.
9. Sachdev R, Tiwari AK, Goel S, Raina V, Sethi M. Establishing biological reference intervals for novel platelet parameters (immature platelet fraction, high immature platelet fraction, platelet distribution width, platelet large cell ratio, platelet-X, plateletcrit, and platelet distribution width) and their correlations among each other. *Indian J Pathol Microbiol*. 2014;57(2):231-5.
10. 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.
11. Vogelaar SA, Posthuma D, Boomsma D, Klufft C. Blood sample stability at room temperature for counting red and white blood cells and platelets. *Vascul Pharmacol*. 2002;39(3):123-5.
12. Lancé MD, van Oerle R, Henskens YM, Marcus MA. Do we need time adjusted mean platelet volume measurements? *Lab Hematol* 2010;16(3):28-31.
13. White JG, Escolar G. EDTA-induced changes in platelet structure and function: adhesion and spreading. *Platelets* 2000;11(1):56-61.
14. Diaz-Ricart M, Brunso L, Pino M, Navalon F, Jou JM, Heras M, White JG, Escolar G Preanalytical treatment of EDTA-anticoagulated blood to ensure stabilization of the mean platelet volume and component measured with the ADVIA counters. *Thromb Res*. 2010;126(1):
15. Thompson, C.B., J.A. Jakubowski, The pathophysiology and clinical relevance of platelet heterogeneity. *Blood*, 1988. 72(1): p. 1-8.
16. Shah B, Valdes V, Nardi MA, Hu L, Schrem E, Berger JS. Mean platelet volume reproducibility and association with platelet activity and anti-platelet therapy. *Platelets*. 2014;25(3):188-192.
17. Budak YU, Huysal K, Demirci H. Correlation between mean platelet volume and B-type natriuretic peptide concentration in emergency patients with heart failure. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015;25(1):97-102.

18. Bilgic I, Gelecek S, Ozmen MM, Kasapoglu B. The association of elevated mean platelet volume with the outcome of acute mesenteric ischemia. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2015; 26:727-730.
19. Aktar F, Tekin R, Bektaş MS, Güneş A, Köşker M, Ertuğrul S, Yılmaz K, Karaman K, Balık H, Yolbaş İ. Diagnostic role of inflammatory markers in pediatric Brucella arthritis. *Ital J Pediatr.* 2016;42(1):3
20. Ates S, Oksuz H, Doğu B, Bozkus F, Ucmak H, Yanıt F. Can mean platelet volume and mean platelet volume/platelet count ratio be used as a diagnostic marker for sepsis and systemic inflammatory response syndrome? *Saudi Med J* 2015; 36(10): 1186-90.

Yazışma adresi:

Kağan Huysal

Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Biyokimya,

Bursa, Türkiye

E-mail: khuyosal@yahoo.com
