

Koagulasyon testlerinde preanalitik değişkenler

Preanalytical Variables in Coagulation Testing

Burcu Barutçuoğlu, Güneş Ak

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Biyokimya Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

Başvuru Tarihi: 04 Haziran 2020

Kabul Tarihi: 06 Haziran 2020

ÖZET

Yıllar içerisinde koagulasyon testlerini etkileyen birçok preanalitik değişken tanımlanmıştır. Koagulasyon testlerine etki eden preanalitik değişkenler örnek toplama (hasta seçimi dahil), örnek transportu ve stabilitesi, örnek hazırlığı ve depolama temel başlıkları altında toplanabilir. Bu derlemenin amacı koagulasyon testleri ile ilişkili preanalitik değişkenleri tanımlama ve koagulasyon test sonuçlarında kaliteyi ve güvenilirliği arttırmak için laboratuvar uygulamalarında öneriler sunmaktır.

Anahtar kelimeler: preanalitik evre; koagulasyon testleri; hasta seçimi; örnek hazırlığı

ABSTRACT

Numerous preanalytical variables that affect the coagulation testing have been defined over the years. The three potential main topics where coagulation testing preanalytical issues may arise are specimen collection (including patient selection), specimen transportation and stability, specimen processing and storage. The aim of this review is to identify the preanalytical variables associated with coagulation testing and provide laboratory practice recommendations to improve the quality of coagulation testing and accuracy of the test results.

Key words: preanalytical phase; coagulation testing; patient selection; sample preparation

Burcu Barutçuoğlu : <https://orcid.org/0000-0001-6570-5229>
Güneş Ak : <https://orcid.org/0000-0001-6780-1812>

Yazışma adresi: Burcu Barutçuoğlu
Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Klinik Biyokimya Bilim Dalı
İzmir, Türkiye

GİRİŞ

Klinik laboratuvarlar klinik karar sürecinin (tanı, hastayı yatırma, tabucu etme, tedaviye yön verme gibi) yaklaşık %70'ni etkilemektedir. Doğru ve güvenilir laboratuvar sonuçları hastaların en iyi tedaviyi almalarını sağlamaktadır. Laboratuvar hekimlerinin doğru ve güvenilir sonuçlar için analitik evre gibi preanalitik ve postanalitik evreleri kapsayan toplam test sürecini iyi bilmesi gerekmektedir. Preanalitik evre klinisyenin hasta ile ilgili soru sorması ile başlayan pre-preanalitik evreyi de kapsayan, testlerin analizine kadar ki tüm işlemler olarak tanımlanır. Preanalitik evre laboratuvar dışında gerçekleşen birçok basamağı içermesi nedeniyle (klinisyenin test isteği, örnek alma, transport gibi), hataların en fazla olduğu ve kontrol edilmesi de en zor olan evredir (1). Laboratuvar sonuçlarının doğruluğu ve güvenilirliği için preanalitik evrede tüm değişkenlerin tanımlanması ve testler üzerine olası kritik etkilerinin bilinmesi gerekmektedir.

Koagulasyon testlerinde preanalitik evre ve bu evrede meydana gelebilecek preanalitik hatalar, ciddi sonuçlara neden olabilir. Örneğin tarama amaçlı yapılan ve yanlış uzamış protrombin zamanı (PZ) ya da aktive parsiyel tromboplastin zamanı (APTZ) gereksiz birçok maliyetli daha spesifik testler yapılmasına ve zaman kaybına neden olur. Yanlış negatif PZ veya APTZ çıkan hastalarda ise gerekli faktör analizleri yapılmaz. Referans aralığında saptanan APTZ testi nedeniyle şüphelenilmemiş olan bir hemofili hastasında, hatalı olarak cerrahi girişimsel işlemler uygulanabilir. Ayrıca, antikoagulan tedavi gören, ilaç monitorizasyonu yapılan bir hastada yanlış düşük ya da yanlış yüksek koagulasyon test süreleri ve buna bağlı uygunsuz antikoagulan ilaç dozları uygulanması ve hatanın yönüne göre tromboz ya da kanama komplikasyonları görülebilir. Spesifik koagulasyon testlerinin çoğu tanısasal test olarak kabul edildiği için meydana gelebilecek hatalar ciddi sonuçlara neden olabilir. Yanlış pozitif ya da yanlış negatif spesifik koagulasyon test sonuçları hem hastalar hem de sağlık sistemine getirdiği maddi ve manevi yükler nedeniyle istenmeyen bir durumdur. Örneğin yanlış

pozitif von Willebrand faktör (vWF) antijeni ve Ristosetin kofaktörü (Riscof) ile yanlış von Willebrand hastalığı (vWH) tanısı alan bir kişi uygun olmayan faktör tedavileri alabilir. Ayrıca hasta kalıtsal bir hastalık tanısı aldığı için tüm hayatını etkileyecek durumlarla karşılaşabilir. Başka bir örnekte ise yanlış negatif antifosfolipid antikör veya lupus antikoagulan sonuç olan ancak antifosfolipid sendromlu bir hastaya ilerde geçirebileceği tromboz komplikasyonlarına karşı önleyici antikoagulan tedavi verilmemiş olur (2). Bu tür hatalara birçok örnek verilebilir.

Bu derlemede rutin ve spesifik koagulasyon testlerini etkileyen preanalitik evre ele alınacaktır. Hasta başı cihazları ile antikoagulanlı ya da antikoagulanlız tam kanda yapılan koagulasyon testlerine daha sınırlı olarak yer verilecektir.

HEMOSTAZ, LABORATUVAR TESTLERİ

Hemostaz yanlış olarak koagulasyon kaskadı olarak anlaşılmakta olup hemostaz yerine koagulasyon terimi sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak hemostaz aslında Virchow triadı olarak adlandırılan primer hemostaz (vWF, trombosit ve subendotelial bileşenler ile oluşan trombosit tıkaçı), sekonder hemostaz (fibrin tıkaçı, prokoagulan "koagulasyon" faktörleri ve doğal antikoagulanlar) ve fibrinolitik yolların tümünü kapsamaktadır (3). Günümüz laboratuvarlarında hemostazı değerlendiren çok çeşitli testler yapılabilmektedir. Rutin koagulasyon testleri denilince ilk akla gelenler PZ, INR (international normalized ratio), APTZ, trombin zamanı (TZ), fibrinojen ve D-dimerdir. Spesifik hemostaz testleri olarak trombosit fonksiyon testleri, Faktör (F) analizleri (hemofili A için FVIII, hemofili B için FIX, nadir faktör eksiklikleri için FII, FV, FVII, FX, FXII, gibi), faktör inhibitör testleri, Protein C (PC), protein S (PS), Antitrombin III (ATIII), vWF testleri, Lupus antikoagulan tarama ve doğrulama testleri, aktive PC direnci (APCR) ve anti-Xa heparin testi sayılabilir. Tüm bu testler içinde PZ ve APTZ en sık analizi yapılan rutin koagulasyon tarama testleridir (4). Tarama testleri tanı, tarama ve izlem amaçlı birçok durumda kullanılmakta olup, ayrıca faktör analizlerinin ve pıhtı tabanlı bazı

özel testlerin (PC, PS, APCR gibi) de temelini oluşturmaktadır.

Koagulasyon testlerine etki eden preanalitik değişkenler üç temel başlık altında toplanabilir:

- Hasta seçimi ve örnek toplama
- Örnek transportu ve stabilitesi
- Örnek hazırlığı ve saklanması

Her üçünde önemli birçok değişken bulunmakta olup testler üzerinde önemli etkilere sahiptir.

HASTA SEÇİMİ VE ÖRNEK TOPLAMA

Hasta yaşı, cinsiyet, ırk, kan grubu ve sağlık durumu hemostaz testlerine etki eden değişkenler olup sonuçların değerlendirilmesinde ve yorumlanmasında mutlaka dikkat edilmelidir. Bu nedenle her laboratuvar bu değişkenleri göz önünde bulundurarak uygun referans değerler kullanılmalıdır. Doğru test sonuçlarının yorumlanması için doğru referans değeri kullanımı gerekmektedir.

Yaş

Çoğu koagulasyon faktörünün primer sentez yeri karaciğerdir. Ayrıca neonatal dönemde en son olgunlaşan organın karaciğer olduğu unutulmamalıdır. Bu nedenle özellikle prematürlerde ve bir miktar yenidoğanlarda koagulasyon faktörleri daha düşüktür. Bu yaş grupları için farklı referans değerleri kullanılmalıdır. Birçok koagulasyon faktörü yetişkin düzeylerine 6 ayda ulaşır (5). D-dimer, vWF, FVIII, FV, FVII, FIX ve FXI'in yaş ile arttığı izlenmiştir. Tromboelastografik (TEG) ölçümler ve endojen trombin potansiyeli (ETP) ölçümü yaşlara göre farklılık gösterir (6,7). Chan ve arkadaşları, yetişkinler ve pediatrik hastalar arasında fark bulamamış olmalarına rağmen yine de TEG ölçümlerinde yaşa göre referans değerleri ile daha iyi sonuç değerlendirilmesi yapılabacağına dikkat çekmişlerdir (8).

Cinsiyet

Hemostazda cinsiyete bağlı bazı farklar olabilir. FII, FVII, FIX, FX, FXI ve FXII düzeyleri erkeklere göre kadınlarda daha yüksektir.

Kadınlarda düşük PS ve artmış antitrombin (AT) aktivitesi görülür (9). Trombosit fonksiyon bozukluğunu gösteren bir test olan kollajen-(ADP), PFA-100'de (trombosit fonksiyon analizörü-100) kapanma süresi erkeklerde daha uzundur (10). Kadınlarda menstruel siklus, oral kontraseptif kullanımı veya hormon replasman tedavisine sekonder olarak hemostaz değişiklikleri trombosit fonksiyon testlerinde izlenebilir. Oral kontraseptiflerle ilişkili değişiklikler hormon konsantrasyonuna bağlıdır. Oral kontraseptiflerdeki etinil östrodiol FVII antijeni, FVIII aktivitesi ve β -tromboglobulini artırır. Oral kontraseptif ve hormon replasman tedavisi alan kadın hastalarda PS ve APCR testleri için kan alma öncesi iki ay tedavinin kesilmesi önerilmektedir. Fibrinojen, FXI, FXIII, doku plazminojen aktivatörü (tPA), plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1), D-dimer veya α 2-antiplazmin menstrüel sıklusa bağlı olarak değişkenlik göstermez. Ancak bazı çalışmalarda vWF, FVIII ve trombosit fonksiyonları menstruel, erken foliküler fazda en düşük düzeyde bulunmuştur. Bu nedenle bu zaman çerçeveleri kadınlarda kanama riski parametrelerini belirlemede ideal kan örneği alma dönemleri olarak kabul edilebilir. Endojen trombin potansiyeli luteal fazda foliküler faza göre daha yüksek; foliküler fazda ise FX daha yüksektir. vWH araştırılan kadınlarda örnek alımı siklusun 1-4 günlerinde önerilir (11, 12).

Gebelik

Gebelikte de koagulasyon faktörlerinde izlenen değişiklikler nedeniyle, APTZ, PZ ve TEG süreleri kısalır; D-dimer ve solubl fibrin monomer kompleksleri artar. Antitrombin aktivitesinde değişiklik olmaz. Gebelik ayrıca artmış fibrinojen, VWF, FVII, FVIII, FIX, FX, FXII, plazminojen, PAI-1, tPA antijen ve trombosit fonksiyonu; azalmış FXIII, APCR, serbest PS antijeni ve aktiviteleri ile seyredir. Gebelik süresince olan değişiklikler nedeniyle koagulopati incelemesinde postpartum iki ay beklenmesi önerilir. Ayrıca doğum eylemi, vajinal doğum olan yenidoğanlarda FVIII, vWF, FIX, FXI, FXII ve plazminojen düzeylerini sezeryanla doğanlara göre daha fazla artırır. Yenidoğanlarda mekonyum

varlığı FII, FV, FVII ve FX düzeylerinde azalma ile sonuçlanır (11,13,14).

Etnik köken, ırk

Etnik köken / ırk'ın koagulasyon parametreleri üzerine az ancak önemli etkileri vardır. Özellikle tromboembolik ve kanama riski durumlarında görülen genetik mutasyonlar farklılıklar gösterir. Bu risk faktörleri bu derlemede ele alınmayacak ancak bu etkilerin varlığının da unutulmaması gerekmektedir. Zencilerde vWF'de tek nükleotid polimorfizmi, Eskenazi Yahudilerinde FXI eksikliği ve Kafkas ırkında artmış APCR insidansı bulunmaktadır. Akdeniz bölgesinde ve bu bölgelerdeki zencilerde daha sık görülen orak hücreli anemide FVIII, vWF ve D-dimer artabilir. Ayrıca orak hücreli anemide protrombin fragmanı (F1.2), trombin-antitrombin kompleksi ve P-selektin (trombosit aktivasyon göstergesi) yüksekliği, ADAMST-13 (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type-1 motif, member 13) düşüklüğü izlenebilir (15,16).

Kan grubu

ABO kan grupları arasında koagulasyon parametrelerinde özellikle de FVIII ve vWF'de bazı değişiklikler olur. O kan grubunda FVIII, vWF, FIX ve FXII O grubu olmayanlara göre daha düşüktür. Referans aralıkları O ve diğer kan gruplarına göre düzenlenmelidir. Rh faktörü ile koagulasyon parametreleri arasında bir ilişki yoktur. ABO kan grubu tipinin PS, PC veya AT üzerine etkisi yoktur (9).

Biyolojik varyasyon

Biyolojik varyasyon veya sirkadien ritm bazı koagulasyon testlerinde önemlidir. Biyolojik varyasyon belirli bir zaman aralığında bir kişi ya da populasyonda ölçümler arasındaki farklılıklardır. Biyolojik varyasyonu en az olan test PZ ve en fazla olan ise vWF'dür. Mevsimsel varyasyonlar fibrinojende izlenirken, PZ veya trombosit agregasyonunda izlenmemiştir. Heparin tedavisi, trombosit fonksiyon testleri ve fibrinolitik yolak testlerinde sirkadien değişkenlik görülmektedir. Trombosit fonksiyonları fiziksel stres (egsersiz dahil),

sigara, dietsel faktörlerden (kahve, kafein içeren ürünler, flavonoidler, fitoöstrojenler ve polifenoller) etkilenmektedir. Dietle yağ asidlerinin alınması trombosit fonksiyon testlerini etkileyebilir; ayrıca PAI-1 düzeylerini ve FVII aktivitesini de arttırabilir. Mevsimsel değişiklikler gibi döngüsel dönemlerde patolojik sonuçlar mutlaka tekrarlayan örneklerde doğrulanmalıdır (17,18).

Diğer fizyolojik durumlar, hastalıklar ve ilaçlar

Bazı hastalıklar koagulasyon parametrelerinin doğru olarak ölçülmesini etkileyebilir. İnflamatuvar olaylar fibrinojen, FVIII, vWF, PAI-1 artışına ve PS azalmasına neden olur. Mental veya fiziksel stres hemostaz değişikliklerine neden olabilir. Egsersiz vücutta fiziksel stres oluşturarak vWF, FVIII ve öglobulin liziz zamanını (ELT) arttırır, trombosit aktivasyonuna neden olur. Ancak FXII, FV, FVII, FII veya fibrinojeni etkilemez. Mental stres, vWF, fibrinojen, tPA ve FVIII artışına neden olur (11). Örnek alınırken kan alma işlemine karşı hastada fobik anksiyete gelişirse hiperkoagulasyon tetiklenebilir. Ancak, uzamış mental stres durumlarında FV, FVIII ve FIX aktiviteleri azalabilir (19). Hipertiroidizmde vWF, fibrinojen, FVIII ve PAI-1 artar; PFA-100 ölçümlerinde kollajen/epinefrin ve kollajen-ADP kapanma zamanı kısalır. Sağlıklı gönüllülerde farklı dozlarda uygulanan levotiroksin tedavisine yanıtta artmış vWF, FVIII, FIX, FX, PAI-1, ELT düzeyleri ve azalmış APTZ birlikteliği izlenmektedir (20). Primer hiperparatiroidizm artmış FVII, FX ve D-dimer düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur (21). Asidoz ve daha az olarak hipotermi, uzamış PZ ve APTZ süreleri ve değişen TEG ölçümlerine neden olabilir (22).

Doğumsal faktör eksiklikleri dışında başka hastalıklarda da kanama veya tromboza eğilim ortaya çıkabilir. Travma, şok, sepsis, kanser, böbrek yetmezliği, karaciğer yetmezliği, sistemik lupus eritematosus, antifosfolipid antikor sendromu (APS) ve diğer otoimmün hastalıklar, cerrahi girişimler ve amiloidoz gibi durumlarda görülmekte olup bunlarla da sınırlı değildir. Ekstrakorporal membran oksijenizasyonu (ekstrakorporal

hayat desteği), hemodiyaliz, kontinü venovenöz/ arteriyovenöz hemodiyaliz, kan oksijenatörleri veya aortik balon pompaları gibi mekanik veya desteksel girişimler yetişkinlerde hafif derecede, yenidoğanlar ve pediatrik hastalarda daha belirgin derecede koaguloapatiye neden olur. Ekstrakorporal yaşam destek cihazlarında bir miktar antikoagulan, sistemik olarak akım bölgesinden (anfraksiyone heparin), veya lokal olarak cihaza (cihaz içinde sitrat veya cihaz dışından kalsiyum glukonat) uygulanır. Bu tür ciddi hastalarda hasta başı testler (örnek: aktive pıhtılaşma zamanı veya TEG) sıklıkla tercih edilmelidir. Ancak laboratuvar testleri ile mutlaka doğrulanmalıdır (23). Sol ventrikül pompaları gibi diğer mekanik destek cihazları türbülant akım ortamı ve buna bağlı olarak vWF proteininde mekanik hasar oluşturmakta ve akut kazanılmış tip 2 vWH meydana gelebilmektedir (24).

Hemostatik faktörleri arttırmak ya da yerine koyma amaçlı uygulanan birçok farmasötik ajan ile koagülasyon testleri etkilenebilir. Vitamin K antagonistleri (VKA), heparinler, direkt trombin inhibitörleri (DTI) veya direkt oral antikoagulanlar (DOAK) rutin ya da spesifik bazı koagülasyon testleri üzerine etkilidirler. Bu tedavilerden bazıları monitörizasyon gerektirmektedir. Ayrıca fibrinolitik tedaviler (örneğin tPA) defibrine edici ilaçlar, antifibrinolitikler (örneğin traneksamik asit), ve antitrombotikler (antitrombosit tedavi: klopidogrel, aspirin, prasugrel, gibi) hemostatik yolları uyarır. İlaç etkilerini tersine çevirme insan kan ürünleri ile (örneğin taze donmuş plazma, kriyopresipitat, vs), nonspesifik ürünler ile (aktive edilebilen 3 ve 4 faktör protrombin kompleksleri) veya bir ilaca spesifik ürünler ile (örneğin dabigatran karşı idarucizumab) olabilir. Kanayan bir hastada farmasötik ajanlar ile *in vivo* yanıt aktive edilebilir. Örneğin nazal veya infüzyon yoluyla uygulanan desmopressin ile dolaşımında vWF arttırılması sağlanabilir. Ayrıca, aktif edilmiş faktör infüzyonu (örneğin NovoSeven: rekombinan bir FVIIa) yapılabilir. Replasman tedavileri insan, rekombinan, domuz kaynaklı FVIII veya FIX gibi spesifik faktörleri ya da emicizumab gibi farklı tedavi çeşitlerini kapsar. Laboratuvarlar bu tedavilerin koagu-

lasyon testleri üzerine olan etkilerini bilmeleri gerekmektedir. İlaç konsantrasyonu ölçümleri (farmakokinetik) veya etkileri (farmakodinamikleri) için rehberlik edebilmelidir. Warfarin veya anfraksiyone heparin gibi sık kullanılan antikoagulanlar için PZ ve APTZ (sırayla) kullanılmakta olup, doğru zamanda kan örneklerinin alınması ile ilacın gereksiz yüksek dozlarda uygulanması ya da uygun olmayan doz değişimleri engellenmiş olur. Anfraksiyone heparin tedavisi APTZ ve/veya Anti-FXa ile izlenir. İdeal kan alma zamanı doz başlangıcından 6 saat sonradır. Katater antikoagülasyon için daha yüksek dozda anfraksiyone heparin kullanılıyorsa APTZ süresiz bulunur. Bu durumda aktive trombin zamanı kullanılmalıdır. Düşük molekül ağırlıklı heparin (DMAH) ve pentassakkarid ajanları uygulandığında anti-FXa ile izlem yapılır. DMAH için 3. dozdan 4 saat sonra; pentassakkarid için ise 1. dozdan 3 saat sonra örnek alınmalıdır. VKA monitorizasyonu ilk dozdan 12-24 saat sonra alınan örnekte PZ/INR ile izlenir. Hemofili A ve B'de faktör replasman tedavisi izleminde FVIII ve FIX bazal düzeyleri, faktör uygulamasını takiben 30. dakika, 1,2,4,8,12 ve 24. saatlerde ölçülür (25).

Primer tedavi hedefi koagülasyon sistemi olmayan ancak koagülasyon testlerine etki eden farmasötik ajanlar kullanılırken bu ilaçların etkilerine de dikkat etmek gerekmektedir. Antibiyotikler intestinal florayı baskılayarak vitamin K yararlılığını azaltabilir. Meydana gelebilecek edinsel vitamin K eksikliği nedeniyle warfarin tedavisine benzer olarak FII, FVII, FIX, ve FX azalır veya warfarin tedavisine abartılı bir yanıt görülür (26). Lipoglikopeptidler (örneğin telavansin) bazı reaktiflerdeki fosfolipid kaynaklarına bağlandığı için koagülasyon testlerini etkileyebilir. Özellikle ilaç yeni başladığında meydana gelebilecek yanlış sonuçlar mutlaka incelenmelidir (27).

ÖRNEK TOPLAMA

Hasta örnek alımı için seçilip, gerekli uygun test ya da testler, uygun ölçüm zamanı belirlenince bir sonraki önemli basamak kan örneklerinin alınmasıdır. Kan örneğini alacak

olan personelin uygun kan alımı için eğitilmiş olması gerekmektedir. Eğitim almış ve almamış hemşirelerin koagulasyon testleri için aldığı kan örnekleri incelenmiş ve eğitilmiş hemşirelerin aldığı örneklerin daha kaliteli örnek olduğu izlenmiştir. Eğitim almamış hemşirelerin aldığı örneklerde yükselmiş koagulasyon aktivasyon faktörleri (D-dimer, F1.2, ve TAT) ile aktive olmuş koagulasyon sistemi kötü alınmış örnekler olduğunu yansıtır (28). Koagulasyon testleri için özel olarak uyulması gerekli durumlar mevcuttur. Örnek toplama ile ilgili uygun olmayan durumlar genellikle tecrübesizlik nedeniyle, yoğun klinik işleyiş veya kan alma ile ilgili birden fazla uyulması gerekli özel durumlar olduğunda ortaya çıkar.

Tüpler

Rutin koagulasyon testleri için örnekler sitratlı tüplere alınmaktadır. Bu tüpler 105-109 nM (%3.13-%3.2) veya 129 mM (%3.8) trisodyum (Na) sitratın dihidrat formunu ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) içerir. Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) bazı özel uygulamalar dışında daha düşük sitrat konsantrasyonlu tüpleri önermektedir. Eğer referans aralıkları %3.2'lik tüpler kullanılarak oluşturulmuş ise, 129 mM (%3.8) tamponlanmış Na sitratlı tüpler kullanıldığında PZ ve APTZ süreleri referans aralığına göre uzun, fibrinojen ise daha düşük saptanabilir. %3.8'lik Na sitrat tüplerindeki fazlalık Na sitrat ortamda bulunan kalsiyumun daha da fazlasını şelatlar. Örneğin pıhtı temelli testlerde ortama eklenen reaktifteki kalsiyumu da bağlaması durumunda test sonuçları etkilenir. Tersine antitrombosit tedaviye (Örneğin aspirin) yanıtı ölçen PFA-100 gibi trombosit fonksiyon testleri için 129 mM (%3.8'lik) Na sitratlı tüpe örnek alımı örneklerin stabilizasyonunu artırır. Ancak, farklı antikoagulan konsantrasyonlarındaki tüplerin kullanımı Anti-Xa sonuçlarını etkilemez (29,30). Temel olarak, laboratuvarların yaptıkları testlere uygun olarak tek bir Na sitrat konsantrasyonunda karar kılması ve referans değer çalışmalarında bu konsantrasyondaki tüplere alınan örnekleri kullanmaları ya da bu konsantrasyondaki tüplerle belirlenmiş

referans aralıklarını seçmeleri önerilir (29, 30).

Çok çeşitli markalarda piyasada Na sitratlı örnek tüpleri bulunmaktadır. Na sitrat konsantrasyonları aynı bile olsa, bu tüplerde farklılıklar olup, çalışılan koagulasyon test sonuçlarında farklar tespit edilmiştir. Örneğin çeşitli firmalara ait koagulasyon tüplerinde Na sitrat konsantrasyonları aynı bile olsa PZ ve APTZ sonuçları arasında farklar olduğu tespit edilmiştir. Bu değişkenlik nedeniyle her laboratuvar örnek tüpleri değiştiği zaman mutlaka validasyon çalışmaları yapmalı ve tüpler rutinde kullanılmadan önce referans aralıklara uygunluğu değerlendirilmelidir (31).

Bazı koagulasyon ve trombosit fonksiyon testleri için daha farklı antikoagulanlar kullanılır. Bazı testler ise serumda ölçülür. Sitrat asit dekstrozu, sitrat teofilin, adenozin, dipiridamol içeren tüpler trombosit aktivasyonunu inhibe etmek için, aprotinin içeren tüpler fibrinolitik sistemi inhibe etmek için kullanılır. Lityum heparin, etilendiamintetraasetik asit (EDTA)'lı plazmalar ya da antikoagulanlı serum örnekleri heparinle indüklenen trombositopeni ve antifosfolipid sentromu antikorları ölçümünde kullanılır (30, 32).

Kan alma sırası

Örnek alımı sırasında örnek tüplerine spesifik bir sırayla kan alınması gerekmektedir (33). Farklı testler için birden fazla tüpe örnek alınırken (biyokimya, kan sayımı, hormon gibi), koagulasyon örnekleri diğer alınacak tüplerden önce alınmalıdır. Na sitrata göre daha güçlü antikoagulanlar olan EDTA ve lityum heparin, ayrıca pıhtı aktivatörlerinin (örneğin trombin) kontaminasyonu koagulasyon testlerini etkileyebilmektedir (34). Yeşil kapaklı tüpler eğer mavi kapalı tüplerden önce alınırsa koagulasyon testleri etkilenir. Na sitratlı tüp, yeşil kapaklı tüplerdeki kuru heparin ya da sıvı heparinle kan alınırken iğne aracılığı ile kontamine olabilir. Heparin konsantrasyonları bu tüplerde çok yüksek olmasından dolayı az miktarda bile kontaminasyon Na sitratlı tüpten çalışılacak kanda yanlış olarak APTZ süresini bir miktar uzatabilir (Tablo 1).

Tablo 1. Örnek alımı ve antikoagulanlara bağlı hatalar ve koagülasyon testleri üzerine olan etkileri
Table 1. Errors in sample collection and anticoagulants and their effects on coagulation testing

Örnek	Rutin koagülasyon testleri	Faktör analizleri ve diğer hemostaz testleri
Tam pıhtılı örnek	Fibrinojen ölçülemez PZ, APTZ, TZ süresiz	Yanlış düşük faktörler (özellikle FII, FV, FVIII) Yanlış yüksek FVII Faktör inhibitör, vWF, LA ölçüm hataları
Kısmi pıhtılı örnek	Trombosit aktivasyon miktarı, hemoliz ve fibrinojen kaybına bağlı PZ, APTZ ve TZ'de uzama ya da APTZ'de kısalma	Yanlış düşük faktörler Yanlış yüksek FVII PFA-100: akımda tıkanıklık
Eksik örnek alımı	PZ, APTZ ve TZ'da uzama Fibrinojen ve D-dimer düşük	Yanlış düşük faktörler Yanlış düşük hemostaz testleri
EDTA'lı örnek	PZ, APTZ ve TZ'da uzama Fibrinojen ve D-dimer etkilenebilir	Yanlış düşük faktörler (özellikle FV, FVIII) Yanlış inhibitör varlığı saptama (FV, FVIII inh) LA ölçüm hataları
Heparinli örnek veya heparin kontaminasyonu	PZ, APTZ ve TZ'da uzama (TZ>APTZ>PZ artışı) Yanlış düşük fibrinojen	Yanlış düşük faktörler (özellikle FVIII, FIX, FXI, FXII) Yanlış düşük AT; Faktör inhibitör ve LA ölçüm hataları

PZ: protrombin zamanı, APTZ: aktive parsiyel tromboplastin zamanı, TZ: trombin zamanı, F: faktör, vWF: von Willebrand Faktörü, LA: lupus antikoagulanı, AT: antitrombin, PFA: trombosit fonksiyon analizörü. (Kaynak 2'den uyarlanmıştır.)

Antikoagulan kan oranı

Koagülasyon testleri için en kritik preanalitik değişkenlerden biri de vakumlu tüplere alınan kan örneklerinin miktarıdır. Kılavuzlara göre tüp içerisindeki Na sitrat:kan volümü oranı 1:9 olarak belirlenmiştir (30). Ancak belirlenen kan volümü PZ için %80 ve APTZ için %90'a kadar tolere edilebilir (32). Koagülasyon tüpleri üzerindeki işaretli seviyeye kadar ya da total hacmin %90 altında olmayacak şekilde doldurulmalıdır. Koagülasyon tüplerine eksik örnek alımı tüp içerisindeki antikoagulan ile örnek dilüsyonuna neden olmaktadır. Bu durumda örneklerde pıhtılaşma gecikerek, pıhtı temelli testlerde yanlış uzamış sonuçlara neden olmaktadır (32). Örneğin volüm %90'nını altına düşen örneklerde INR yanlış olarak daha uzun saptanmıştır. Bu tür hatalara özellikle %3.8'lik Na sitrat'lı tüplerde ya da düşük volümlü pediatrik tüplerde daha sık rastlanmaktadır. Eksik tüp dolumu kantitatif ölçüm yapılan koagülasyon testlerinde (pıhtılaşma faktörleri) yanlış düşük ölçümlere neden olur. Bu nedenle %90'ın altında doldurulmuş Na sitratlı tüpler reddedilmelidir.

Hematokrit yüksekliği olan hastalarda örnek tüplerindeki antikoagulan plazma oranı

bozulmaktadır. Hematokritin yüksek olduğu (>%55) yenidoğanlar, ağır dehidratasyon, geniş yanıklı hastalar, polistemia vera, yüksek yerlerde yaşayanlardan alınan örneklerde aşırı Na sitrat nedeniyle Na sitrat:kan oranı bozulup, yanlış yüksek pıhtılaşma sonuçları olabilir. Aşırı Na sitrat bu örneklerde kalsiyumu bağlayarak pıhtılaşmayı engellemektedir. Hematokrit %55 üzerinde olduğu durumlarda CLSI önerilerine göre antikoagulan kan oranı ayarlanmalıdır. CLSI, 1:9 oranını koruyabilmek için gerekli Na sitrat miktarını hesaplanabildiği aşağıdaki formülü önermiştir (30).

$$C = (1.85 \times 10^{-3})(100 - Hct)(Hacim_{kan})$$

C: tüpteki Na sitrat konsantrasyonu,

(1.85×10^{-3}): sitrat hacmi, kan hacmi, sitrat konsantrasyonu dikkate alınarak hesaplanan sabit,

Hct: hastanın hematokriti,

Hacim_{kan}: eklenen kan hacmi (5 mL'lik tüp kullanılıyorsa)

Genel pratik uygulamada, eğer hastanın hematokriti %55 ile %65 arasında ise %3.2'lik Na sitrat tüpünden 0.1 mL Na sitrat boşaltıp hazırlanan bu tüpe kan almaktır.

Hematokrit %20'nin altında olan olan örneklerde kan sitrat oranı düzeltilmesi mevcut değildir.

Örnek alımı sırasında yeterli miktarda örnek sağlanamıyorsa bir tüpten diğerine örnek transferi yapılmamalıdır. Bu durum iki sitratlı tüp arasında örnek transferi için de geçerlidir. Sitratlı tüplerdeki az miktardaki örnekler birleştirilirse tüplerin içindeki Na sitratlar da birleşeceğinden daha fazla örnek dilüsyonu meydana gelmektedir. EDTA, lityum heparin gibi daha güçlü antikoagulanlı tüplerden ya da pıhtı aktivatörlü tüplerden de kesinlikle kan aktarımı yapılmamalıdır (35,36).

Kan ile antikoagulanın tam olarak karışması ve pıhtılaşmanın engellenmesi için tüpler örnek aldıktan sonra alt üst edilmez. British Committee for Standards in Haematology örneklerin sitratla iyi karışması için yavaş olarak tüplerin 5-6 defa alt üst edilmesini önermektedir. Örneklerin yetersiz altüst edilmesi zaman kaybedilmeden hemen çalışılan temel bazı koagulasyon testlerinden çok, özellikle hemen çalışılmayan, saklanan testlerde hatalara neden olmaktadır (37). Eğer koagulasyon tüpleri sallanarak sert şekilde karıştırılırsa in vitro hemoliz meydana gelip bazı faktörlerin yalancı aktivasyonuna ve pıhtılaşma temelli testlerin yanlış olarak daha kısa olmasına, hatta yanlış yüksek faktör ölçümüne (örneğin FVII) neden olmaktadır. Tam olarak karışmayan örneklerde kısmi pıhtılaşma ve trombositlerin aktivasyonu başlamaktadır (32).

Örnek alma teknikleri

Kan örnekleri vakumlu tüplere uygun kan alma yöntemleri kullanılarak yapılmalıdır. Enjektörle kan alma yönteminin bazı kısıtlılıkları olduğu için sadece gerekli durumlarda uygulanmalıdır. Eğer enjektör ile örnek alınacaksa şırınga 25 mL'den küçük (tercihen 10 mL) olmalı ve doğru konsantrasyonda antikoagulan içermelidir. Örnek şırınga ile çekilirken mutlaka "kelebek" iğne kullanılmalıdır (37). Eğer kelebek ile örnek alınacak ise, damar yolundaki hava kabarcıklarını gidermek için test tüplerinden önce bir tüpe fazladan kan alınır. Hemoliz, pıhtılaşma ve

trombosit aktivasyonun önlenmesi için kan örneği enjektörle çok yavaş olarak alınmalıdır.

Enjektör tekniği koagulasyon testleri için bazı flebotomistler tarafından vakum gücünü kontrol edebildikleri için tercih edilebilir. Enjektör ile örnek alımında örnek tüpüne transfer hemen beklenmeden yapılmalıdır. Ancak flebotomist açısından iğne batması riski taşımaktadır. Ayrıca enjektör ile örnek tüp içerisine hızlı şekilde püskürtülürse örnekte hemoliz riski artar. Eğer enjektöre antikoagulan eklenmediyse örnek alındıktan itibaren (genellikle 60 saniye içinde) hızla pıhtılaşma başlamaktadır (38). Büyük enjektörler ile bu durum daha fazla meydana gelir. Ancak kalabalık, yoğun çalışan büyük hastanelerde klinik uygulamada yanlış kan alım tekniği ve enjektörle alınan kanın daha uzun bekletilmesi nedeniyle koagulasyon tetikle-neceği için bu yöntem tercih edilmemelidir.

Damar yolundan örnek alımı

Arteriyel damar yolundan kan örnekleri iki enjektör tekniği kullanılarak alınmalıdır. İlk enjektör ile 10 mL kan örneği alınıp damar yolu temizlenir ve ikinci enjektör koagulasyon testleri için alınır. Daha genç hastalar için, eğer hastanenin kan replasmanı uygulamaları varsa alınan ilk kan steril ise, ikinci enjektör ile örnek alımı sonrası tekrar ilk enjektördeki kan hastaya geri verilebilir. İntravenöz damar yolundan kan alımından 5 dakika önce damar yolu kapatılır ve iki enjektör tekniği ile örnek alınır (39). Venöz ve arteriyel damar yolları kötü olan hastalarda tam kan hasta başı metodları tercih edilmelidir.

Örnek alımının güç olduğu bazı özel durumlarda ya da santral venöz katateri olan ve buradan alınacak örneklerde kısmi pıhtılaşma, hemoliz, salin ile örnek dilüsyonu veya heparin kontaminasyonu sık karşılaşılan hata kaynaklarıdır. Venöz katater yollarından örnek alınacağı zaman öncelikle enjektör kullanılarak flushing ve alınan ilk tüp örnek atılarak damar yolu temizledir. Kullanılacak iğne 16 gauge altında ya da 25 gauge üzerinde olmamalıdır. Heparinli iğneler kullanılmamalıdır (25).

Tam kan

INR monitörleri, TEG veya ROTEM gibi hasta başı cihazlarında tam kan kullanımı daha uygundur. Çalışılacak teste bağlı olarak hasta başı testlerinde direkt antikoagulanlı tam kan ya da uygun antikoagulanlı vakumlu tüplere alınan tam kan örnekleri kullanılabilir. Mutlaka her laboratuvar ne tür örnek gerektiğini ve örnek alım metodunu hasta başı cihazı ve reaktif kit insertlerinden kontrol etmelidir.

İğne büyüklüğü

Örnek alımında kullanılan iğnelerde gauge cinsinden belirtilen çeşitli kalınlıkta iğneler bulunmakta olup, numarası yükseldikçe iğnenin çapı azalmaktadır. CLSI koagülasyon testleri için 19-22 gauge iğneleri önermektedir. Pediatrik hastalarda daha yüksek olan 21 – 23 gauge iğneler kullanılabilir. Eğer enjektör kullanılacaksa fazla miktarda kan alınacaksa uygun kan akışı, hemoliz riskinin azaltılması ve enjektör içinde pıhtılaşma başlamaması için 18 gauge kullanılmalıdır. Örnek alımı sırasında kullanılacak olan iğnenin büyüklüğü koagülasyon testlerinde sonuçları etkilemektedir. 16 gaugenin altındaki çok büyük iğneler ya da 25 gaugenin üzerindeki çok küçük iğneler kullanılmamalıdır. Kan gazı örnekleri için kullanılan heparinli iğneler de kullanılmamalıdır (30, 40).

Turnike tekniği

Kan alma sırasında uzamış turnike süresi turnikenin distalinde damar basıncını artırır, hipoksi ve pH azalmasına neden olur. Uzun süre turnike kullanımı bu mekanizmalar ile hastada vWF, FVIII, tPA ve diğer endotel ilişkili koagülasyon proteinlerinde hafif düşüklük durumunu maskeleyebilir (35). Bir dakikanın üzerinde turnike kullanımı hemokonsantrasyona ve endotel ilişkili koagülasyon proteinlerinin salınımına neden olur. Ayrıca oluşan venöz staz anaerobik glikolizi artırarak plazma laktatında geçici yükselme ve pH'da hafif azalmaya neden olur. Azalan pH proteinlerin bağlanma kapasitelerini etkileyerek kalsiyumda yalancı yüksekliklere

neden olur. Uzamış turnike kullanımı ile FVIII, vWF, tPA gibi koagülasyon faktörleri yükselir. Ayrıca oluşabilecek asidik ortam sonucunda pıhtılaşma testleri yanlış olarak uzayabilir (35).

Örnek transportu ve stabilitesi

Örnek transportu mevcut kılavuzlara uygun olarak buzdolabına konmadan oda sıcaklığında (15-22°C) sağlanmalıdır. Tam kan örneklerinin buz üzerinde laboratuvara transportu FVII'nin soğuk ile aktivasyonu, vWF'ün azalması ve trombosit aktivasyonu nedeniyle önerilmez. PZ ve APTZ gibi rutin koagülasyon testlerinin ölçümü ideal olarak 4 saat içinde tamamlanmalıdır. PZ testi örnek hazırlığı yöntemlerinden (santrifüj edilme), saklama sıcaklıklarından (buzdolabında veya oda sıcaklığında) bağımsız olarak 24 saate kadar stabildir (29). Ancak APTZ testi için örnek stabilitesi PZ gibi değildir. Anfraksiyone heparin tedavisi monitorizasyonunda APTZ ve anti-FXa ölçümü; DOAK tedavisinde anti-FXa ölçümü tedavi için kullanılan antikoagulanlar nedeniyle örnek hazırlık işlemlerinden, hazırlık süresinden etkilenir. Anfraksiyone heparin tedavisi alanlarda APTZ ölçümleri için 1 saat içinde örnek alımı ve santrifüj işlemi tamamlanmalıdır. Bu süre aşıldığında trombositlerden salınan heparini nötralize eden platelet faktör 4 nedeniyle APTZ süreleri kısalmıştır (30, 41). Güncel kılavuzlar heparin tedavisi almayanlarda APTZ testi için örnek santrifüj, tam kan olarak transport, oda sıcaklığı ya da 2-4°C'de tutulmadan bağımsız olarak 4 saat içinde ölçümlerin yapılmasını önermektedir (29,37).

Örneklerin transportundaki gecikmeler özellikle dayanıksız olan FV ve FVIII gibi faktörleri etkilemekte, pıhtı temelli testlerin sürelerini uzatmakta ve in vitro olarak faktör aktivitelelerinde düşüklüğe neden olmaktadır. Eğer bu gibi durumlar engellenemeyecek ise transport öncesi örnekler santrifüj edilip plazmalar ayrılmalıdır. Ayrılmış olan plazma örnekleri dondurularak çalışılacak laboratuvara transportu sağlanmalıdır. PC, vWF gibi diğer koagülasyon testleri için örnek alımı ve hazırlığı 4 saat içinde tamamlanmalıdır. Direkt trombin inhibitörü (örneğin dabi-

gatan) kullanan kişilerde trombin zamanı ölçümü örnek alınımından itibaren 2 saat içinde tamamlanmalıdır (42).

Hastanelerdeki pnömotik transport sistemleri antikoagulanlı tam kan örnek tüplerinin laboratuvarlara hızla ulaşmasını sağlamaktadır. Trombosit fonksiyon testleri ve trombosit agregasyon testleri için alınan örnekler trombosit aktivasyonuna neden olduğu için pnömotik sistemler ile taşınmamalıdır (43).

Koagulasyon örneklerinin stabilitesi birçok değişkene bağlıdır. Bunlar kan alma sistemleri, örneklerin tam kan olarak saklanması ya da santrifüj edilmesi, saklama sırasında örneklerin tutulduğu sıcaklık, kullanılan reaktifler ya da ölçüm cihazları ve ölçümü yapılacak testler olarak sıralanabilir. Örneğin tam kan örnekleri birçok rutin hemostaz testi (FV, FVIII ve protein S hariç) için 24 saat saklandığında zaman içinde belirgin değişimler olduğu gösterilmiştir. Dahası tam kan dondurularak saklanmamalıdır çünkü FVII, FVIII, vWF gibi faktörlerin aktivasyonu dondurularak tetiklenmiş olur (2). Na sitratlı tam kan tüpleri trombosit agregometrisi gibi trombosit fonksiyon testlerinin ölçümünde kullanılır ve multiplate trombosit fonksiyon analizörlerinde hirudinli tüpe alınan tam kan örnekleri trombositlerin dengeli hale gelebilmesi için 30 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Bu süre 2-4 saati geçmemelidir (44).

Genel olarak örnekler ideal olarak bir saat içinde, en fazla 4 saatte çalışmalıdır. Bu kısa süreli beklemelemlerde örneklerin kapakları kapalı olup oda sıcaklığında tutulmalıdır. Ayrılan plazma örnekleri genelde oda sıcaklığında ölçümler yapılan dek bekletilir. Eğer test çalışılması APTZ için 4 saat, PZ için 24 saat içinde gerçekleşmeyecek ise, plazma örnekleri çift santrifüj sonrası ayrılmalıdır. Birçok hemostaz testi için ayrılan plazma güvenle dondurulabilir.

ÖRNEK HAZIRLIĞI VE SAKLANMASI

Örneklerin santrifüj edilmesi

Koagulasyon testleri için tüm kan örnekleri (tam kan hasta başı testleri, trombosit fonksiyon çalışmaları, tromboelastografi ve

ROTEM hariç) trombositten fakir plazma (TFP) şeklinde olmalıdır. TFP <10.000 trombosit/ μ L ($10 \times 10^9/L$) olarak tanımlanır. Trombositlerin aktive olması ya da parçalanması ile koagulasyon testleri etkilenebilir. Bu nedenle koagulasyon testleri için TFP gerekmektedir. Bu özellikle dondurulacak olan plazma örnekleri için daha önemlidir. Çözünme sırasında plazmadaki trombositler parçalanarak koagulasyon testlerini etkiler (30). Trombositlerin plazmadan uzaklaştırılması santrifüj hızı ve çapına bağlı olup "g" gücü olarak ifade edilir. Her santrifüjde farklı g gücü ve değişen süreler ile TFP elde edilir. Her laboratuvar TFP elde edebilmek için kendi koşullarına göre g gücü ve santrifüj süresini belirlemelidir. Santrifüjler (g gücü ve zaman) düzenli olarak kontrol edilmelidir. Birçok akreditasyon organizasyonu santrifüjlerin yıllık, 6 ayda bir ya da yılda 12 kez gibi belirlenen sürelerde değerlendirmeyi uygun görmektedir. Periyodik bakım sonrası ya da parça değişikliği olduğunda elde edilen plazmalarda trombosit sayımları yapılarak <10.000 trombosit/ μ L kuralı değerlendirilmelidir. Işık transmittans agregometrisi için sadece TFP değil trombositten zengin plazma da gerekmektedir. Trombositten zengin plazma için daha düşük devirde santrifüj yapıp eritrositler ve lökositlerin büyük bir kısmı çöktürülür (32).

PZ, INR, APTZ ve trombin zamanı gibi pıhtı temelli testlerin birçoğu bir defa santrifüj edilmiş taze plazma örneklerinde aynı gün içinde çalışılmaktadır. Eğer rutin koagulasyon testleri beklemeden çalışılacak ise santrifüj edilen plazma örneklerindeki trombositler <200.000 trombosit/ μ L ($200 \times 10^9/L$) olması yeterlidir. Bu örnekler dondurulmamalı ya da bu plazmalardan özel testler çalışılmamalıdır (32,37). Lupus antikoagulanları (LA) ölçümü gibi daha spesifik testlerde çift santrifüj ile elde edilen trombositten fakir plazma dondurularak saklanmalıdır. Santrifüj işlemi 15-22 °C'de yapılmalıdır, ancak bu sıcaklık aralığını sağlamak her zaman kolay olmayabilir. Aşırı ısınmadığı bilindiği sürece soğutmasız santrifüjler bu işlem için uygundur. Ayrıca soğutmalı santrifüjler oda sıcaklığına yakın ayarlanarak kullanılmalıdır, aksi durumlarda soğuk nedeniyle trombosit

aktivasyonu meydana gelebilir. Eğer soğuk santrifüj kullanımının hemen ardından ölçümler yapılacaksa koagülasyon testlerinde belirgin bir değişiklik izlenmemiştir. Santrifüj işlemi ideal olarak oda sıcaklığında 1500 g de ve en az 15 dakika olmalıdır (30). Bekletilmeden çalışılan rutin koagülasyon testleri için daha kısa süreli santrifüj işlemleri kabul edilebilir. 1500 g üzerindeki santrifüj güçleri trombositlerde aktivasyona ve eritrositlerde lizise neden olabileceği için tercih edilmemelidir (29). Spesifik koagülasyon testler TFP'da çalışıldığı için örnek hazırlığında çift santrifüj işlemi gerekmektedir. Na sitratlı tam kan santrifüj edildikten sonra plazması ayrılır ve ayrılan plazma tekrar santrifüj edilir. İkinci santrifüj ile plazma örneğinde dondurulmadan önce tüm rezidüel hücrelerin ayrılması sağlanır.

Örnek saklama

Birçok rutin koagülasyon testi santrifüj sonrası elde edilen primer tüpten çalışılır. Eğer hazırlanan plazma örneğinden özel testler çalışılacaksa ya da sonra çalışılmak üzere örnek saklanacak ise o zaman ikincil bir tüpe plazma ayrılır ve ikinci defa santrifüj edilerek elde edilen TFP dondurulmak üzere üçüncü bir tüpe aktarılır. Plazma örnekleri 0.5 veya 1 mL'lik alikotlara ayrılarak, -70 veya -80°C,

no-frostsuz ultra düşük dereceli dondurucularda 6 ay saklanabilir. Eğer laboratuvarında ultra-düşük dereceli dondurucu mevcut değil ise -20°C de 2 hafta saklanabilir (45). Yine de çalışılacak testlerin stabilite koşulları için üretici kit insertleri kontrol edilmelidir. Koagülasyon testleri için dikkat edilmesi gereken örnek saklama koşulları Tablo 2'de verilmiştir. No-frost buzdolapları örnek saklamada kullanılmamalıdır; çünkü no-frost buzdolapları çalışırken donma-çözme döngüleri sırasında saklanan örneklerde enzimler ve pıhtılaşma faktörleri etkilenmektedir. Örneklerin kuru buz üzerinde dondurulması da önerilmez; çünkü plazma örneklerinde pH değişikliğine neden olabilir ve bu durum koagülasyon testlerini etkiler (46).

Dondurulmuş örnekler çalışmaya hazırlanırken, kapakları kapalı şekilde 37°C su banyosunda nazikçe karıştırarak (alt-üst ederek ya da hafif vorteksleme) minimum gereken zaman içinde çözülmelidir. Genellikle bu süre yaklaşık 5-7 dakikadır. Örnekler bu süreden daha uzun su banyosunda tutulmaz. FVIII, FV gibi labil faktörler hızla bozulmaya başlar ve yanlış düşük faktör ölçümleri ya da yanlış uzun pıhtılaşma süreleri elde edilir. Çözünen örnekler alt üst edildikten sonra kısa süre içinde çalışılmalıdır (29).

Tablo 2. Koagülasyon testlerinde örnek saklama koşulları
Table 2. Sample storage in coagulation testing

Test	Tam kan olarak saklama			Plazma olarak saklama			
	Oda sıcaklığı	Buzdolabı	Derin dondurucu	Oda sıcaklığı	Buzdolabı	Derin dondurucu (-20°C)	Derin dondurucu (-70,-80°C)
PZ	1 gün	Kabul edilemez	Kabul edilemez	1 gün	Kabul edilemez	2 hafta	12 ay
APTZ	4 saat	Bilinmiyor	Kabul edilemez	4 saat	4 saat	2 hafta	12 ay
AFH içeren örneklerde APTZ	1 saat	Bilinmiyor	Kabul edilemez	4 saat	4 saat	2 hafta (TFP olmalı)	Bilinmiyor (TFP olmalı)
APTZ, vWF ve FVIII birlikte ölçümü	4 saat	Kabul edilemez	Kabul edilemez	4 saat	4 saat	2 hafta	6 ay
Diğer testler	4 saat	Bilinmiyor	Kabul edilemez	4 saat	4 saat	Ölçüm yapılacak analite bağlıdır	

PZ: protrombin zamanı, APTZ: aktive parsiyel tromboplastin zamanı, vWF: von Willebrand Faktör, TFP: trombositler fakir plazma, AFH: Anfraksiyone heparin (Kaynak 30'dan uyarlanmıştır.)

Örnekte hemoliz, lipemi ve ikter durumu

Plazma örneklerindeki hemoliz, lipemi ve ikter durumu koagulasyon testlerinde ölçümleri etkileyebilmektedir. Özellikle bu durum optik yöntemlerle yapılan okumalarda çok önemlidir. Artmış hemoliz ve yüksek bilirubin düzeylerinde meydana gelen spektral örtüşmeler ve lipemik örneklerdeki ışık saçılımındaki artışlar nedeniyle optik cihazlarda ölçüm zorlukları meydana gelir. İkinci dalga boyu (> 650 nm) olan cihazlar hiperbilirubinemik plazma örneklerini doğru olarak ölçebilir ve lipemik örneklerde de ölçümler bir miktar düzelebilir. Lipidlerin ultrasantrifüj işlemiyle ya da çeşitli solventlerle mekanik olarak ayrılması da denenen yöntemlerdir. Ancak bunlar zaman alıcı ve her laboratuvarında uygulanamayacak yöntemlerdir. Bu tür işlem gören örnekler eş zamanlı olarak önceki halleri ile birlikte çift çalışılmalı ve lipidlerin ayrılması sonucu oluşabilecek biaslar kontrol edilmelidir. İktek ek olarak antitrombin ölçümü gibi kromojenik ölçümler ile de interferans verebilir. Kromojenik ölçüm yapılan testlerde mutlaka kit insertleri bu tür interferanslar açısından incelenmelidir (47).

Hemoliz düzgün alınamamış örneklerin bir göstergesidir. Ancak mutlaka hastalarda olabilecek in vitro hemoliz (alkol toksisitesi ve sepsis) durumları sorgulanmalıdır. Ex vivo hemolizi ayırt edebilmenin en kolay yöntemi belirgin olarak yüksek potasyum düzeylerinin saptanması ve normal laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesidir. Tersine in vivo hemoliz durumlarında potasyum normal, LDH aktivitesi artar. PZ, optik ölçüm yapan cihazlarda orta düzeyde hemolizden etkilenirken, mekanik ölçüm yapan cihazlarda PZ ve APTZ belirgin hemolizden bile etkilenmez (48). Ek olarak hemoliz fibrinojen ve antitrombini düşürür, D-dimeri yükseltir. Lippi ve ark tarafından 2006'da yapılan bir çalışmada; Artifişyel lisis oluşturularak çalışılan örneklerde PZ artışı, APTZ ve fibrinojen düşüşü ve dimerleşmiş plazmin D fragmanları (pıhtı lizisi ile oluşan D-dimer) varlığı saptanmıştır. Hemoliz saptanan örneklerde, in vivo hemoliz ispatlanmadıkça örnek alımı sırasında oluşan in vitro hemoliz olduğu düşünülmalıdır. Yeniden alınan örneklerde çalışma

önerilmektedir. Ancak anfraksiyone heparin uygulanan hastalarda örnek alımı zamanlaması, yenidoğanlar, pediatrik hastalarda, ayaktan gelen poliklinik hastalarında tekrar örnek alımında zorluklar yaşansa da yanlış sonuçlar ile meydana gelebilecek tanı, tedavi hataları çok daha önemlidir (49).

Son olarak, hemoglobinin temelli oksijen taşıyıcıları stromasız ürünler olup hastalarda ağır derecede hayatı tehdit edici anemiye neden olabilir. Uygulanan hastalarda hemolizi taklit eden bir görünüm olup LDH ve potasyum yüksekliği izlenmez. Plazmada psödohemoliz görünümü optik ölçüm yapan koagulasyon analizörlerinde hatalara neden olur, kromojenik temelli testler etkilenebilir ancak pıhtı temelli testlerde interferansa neden olmamaktadır (50).

Pıhtılı örnekler

Örnek alımı hataları, turnikenin çok uzun süre kullanılması ve tüplerin çok yavaş doldurulması gibi durumlarda in vitro pıhtı oluşabilir. Pıhtılı örnekler antikoagulanla tam olarak karıştırılmayan örneklerde ya da tüp dolum çizgisine dikkat edilmeden doldurulan örneklerde meydana gelebilir. Tüm örnekler çalışılmadan önce mutlaka pıhtı açısından değerlendirilmelidir. Plazma örneklerinde eğer pıhtı varsa bu örnek reddedilmeli ve hiçbir koagulasyon testi çalışılmamalıdır. Serumda fibrinojen ve birçok pıhtılaşma faktörü (FII, FV, FVIII) bulunmaz, FVII de aktivasyona uğradığı için yükselir. PZ, APTZ ve trombin zamanı süresiz bulunur. Kişilerde yanlış olarak koagulasyon faktör eksikliği, vWH alt tipleri ve lupus antikoagulan hataları saptanabilir. Kısmi pıhtılaşmış kanda pıhtılaşma faktörleri veya fibrinojendeki kayıba bağlı olarak koagulasyon testleri uzayabilir ya da kısalabilir (Tablo 2).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu derlemede koagulasyon testlerini etkileyen birçok preanalitik faktör gözden geçirilmiştir. Yıllar içerisinde yapılan çalışmalarda rutin ve spesifik koagulasyon testlerinin preanalitik evrede birçok değişkenden sıklıkla etkilendiği gösterilmiştir. Tanı, takip ve

ilaç monitorizasyonu için kullanılan bu testlerin sonucuna göre birçok hastada klinik karar süreci işletilmektedir. Bu nedenle, klinisyenler ve laboratuvar uzmanları koagülasyon test sonuçlarını değerlendirirken tüm olası preanalitik değişkenleri ve ilişkili hata kaynaklarını göz önünde bulundurmaları gerekmektedir. Koagülasyon test sonuçları değerlendirilirken olası bir preanalitik hata

şüphesinde hasta seçimi, örnek toplama, laboratuvara transport, örnek hazırlığı ve saklanması gibi tüm preanalitik basamaklar ayrıntılı olarak değerlendirilmelidir. Preanalitik hataların giderilebilmesi ve bu evrenin iyileştirilmesi için hata kaynakları ve alınacak önlemler tanımlanmalı ve düzenli olarak eğitimler verilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Lippi G, Mattiuzzi C, Favaloro EJ. Pre-analytical variability and quality of diagnostic testing. Looking at the moon and gazing beyond the finger. *N Z J Med Lab Sci* 2015;69:04-08.
2. Favaloro EJ, (Adcock) Funk DM, Lippi G. Pre-analytical Variables in Coagulation Testing Associated With Diagnostic Errors in Hemostasis, *Laboratory Medicine*, 2012;43(2):1-10. <https://doi.org/10.1309/LM749BQETKYPYPM>
3. Bauman ME, Massicotte MP. Pediatrics. Key N, Makris M, O'Shaughnessy D, Lillicrap D eds. *Practical Hemostasis and Thrombosis*, 2nd Ed. Blackwell Publishing Ltd; 2009.p.258-270.
4. Plebani M, Favaloro EJ, Lippi G. Patient safety and quality in laboratory and hemostasis testing: a renewed loop? *Semin Thromb Hemost* 2012;38(06):553-558.
5. Nowak-Göttl U, Limperger V, Kenet G, Degenhardt F, Alrt R, Domschikowski J, et al. Developmental hemostasis: a lifespan from neonates and pregnancy to the young and elderly adult in a European white population. *Blood Cells Mol Dis* 2017;67:2-13.
6. Righini M, Nendaz M, Le Gal G, Bounameaux H, Perrier A. Influence of age on the cost-effectiveness of diagnostic strategies for suspected pulmonary embolism. *J Thromb Haemost* 2007;5(09):1869-1877.
7. Favaloro EJ, Soltani S, McDonald J, Grezchnik E, Easton L, Favaloro JW. Reassessment of ABO blood group, sex, and age on laboratory parameters used to diagnose von Willebrand disorder: potential influence on the diagnosis vs the potential association with risk of thrombosis. *Am J Clin Pathol* 2005;124(06):910-917 Erratum in: *Am J Clin Pathol*. 2006;125(5):796.
8. Chan KL, Summerhayes RG, Ignjatovic V, Horton SB, Monagle PT. Reference values for kaolin-activated thromboelastography in healthy children. *Anesth Analg* 2007;105(06):1610-1613.
9. Favaloro EJ, Soltani S, McDonald J, Grezchnik E, Easton L. Laboratory identification of familial thrombophilia: do the pitfalls exceed the benefits? A reassessment of ABO-blood group, gender, age, and other laboratory parameters on the potential influence on a diagnosis of protein C, protein S, and antithrombin deficiency and the potential high risk of a false positive diagnosis. *Lab Hematol* 2005;11(03):174-184.
10. Haubelt H, Anders C, Vogt A, Hoerd P, Seyfert UT, Hellstern P. Variables influencing Platelet Function Analyzer-100 closure times in healthy individuals. *Br J Haematol* 2005;130(05): 759-767.
11. Blombäck M, Konkle BA, Manco-Johnson MJ, Bremme K, Hellgren M, Kaaja R. ISTH SSC Subcommittee on Women's Health Issues. Preanalytical conditions that affect coagulation testing, including hormonal status and therapy. *J Thromb Haemost* 2007;5(04):855-858.
12. Knol HM, Kemperman RF, Kluin-Nelemans HC, Mulder AB, Meijer K. Haemostatic variables during normal menstrual cycle. A systematic review. *Thromb Haemost* 2012;107(01):22-29.
13. Fredrik Blomqvist LR, Strandell AM, Baghaei F, Elisabet Hellgren MS. Platelet aggregation in healthy women during normal pregnancy - a longitudinal study. *Platelets* 2018;16:1-7.
14. Kulkarni AA, Osmond M, Bapir M, Riddell A, Smith C, Lee CA, et al. The effect of labour on the coagulation system in the term neonate. *Haemophilia* 2013;19(04):533-538.
15. Ho P, Ng C, Rigano J, Tacey M, Smith C, Donnan G, et al. Significant age, race and gender differences in global coagulation assays parameters in the normal population. *Thromb Res* 2017;154:80-83.
16. Tang L, Hu Y. Ethnic diversity in the genetics of venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2015;114(05):901-909.
17. Chen Q, Shou W, Wu W, Guo Y, Zhang Y, Huang C, et al. Biological and analytical variations of 16 parameters related to coagulation screening tests and the activity of coagulation factors. *Semin Thromb Hemost* 2015;41(3):336-341. doi:10.1055/s-0034-1543994
18. Banfi G, Del Fabbro M. Biological variation in tests of hemostasis. *Semin Thromb Hemost*. 2009;35(1):119-126. doi:10.1055/s-0029-1214155
19. Geiser F, Conrad R, Imbierowicz K, Meier C, Liedtke R, Klingmüller D, et al. Coagulation activation and

- fibrinolysis impairment are reduced in patients with anxiety and depression when medicated with serotonergic antidepressants. *Psychiatry Clin Neurosci* 2011;65(05):518–525.
20. Horacek J, Maly J, Sviliias I, Smolej L, Cepkova J, Vizda J, et al. Prothrombotic changes due to an increase in thyroid hormone levels. *Eur J Endocrinol* 2015;172(05):537–542.
 21. Erem C, Kocak M, Hacıhasanoğlu A, Yılmaz M, Sağlam F, Ersoz HO. Blood coagulation, fibrinolysis and lipid profile in patients with primary hyperparathyroidism: increased plasma factor VII and X activities and D-Dimer levels. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008;116(10):619–624.
 22. Ramaker AJ, Meyer P, van der Meer J, Struys MRF, Lisman T, van Oeveren W, et al. Effects of acidosis, alkalosis, hyperthermia and hypothermia on haemostasis: results of point-of-care testing with the thromboelastography analyser. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009;20(06):436–439.
 23. Winkler AM. Managing the precarious hemostatic balance during extracorporeal life support: implications for coagulation laboratories. *Semin Thromb Hemost* 2017;43(03):291–299.
 24. Bartoli CR, Kang J, Zhang D, Howard J, Acker M, Atluri P, et al. Left ventricular assist device design reduces von Willebrand factor degradation: a comparative study between the Heart Mate II and the EVAHEART left ventricular assist system. *Ann Thorac Surg* 2017;103(04):1239–1244.
 25. Gosselin RC, Marlar RA. Preanalytical variables in coagulation testing: setting the stage for accurate results. *Semin Thromb Hemost* 2019;45:433–448.
 26. Yang R, Zhang X, Wei W, Hong M, Yang Y, Hu Y. Relationship between acquired deficiency of vitamin K-dependent clotting factors and hemorrhage. *J Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci* 2010;30:312–317. <https://doi.org/10.1007/s11596-010-0348-1>
 27. Gosselin R, Dager W, Roberts A, Freeman L, Gandy L, Gregg J, et al. Effect of telavancin (Vibativ) on routine coagulation test results. *Am J Clin Pathol* 2011;136(06):848–854.
 28. Stegnar M, Cuderman TV, Bozic M. Evaluation of pre-analytical, demographic, behavioural and metabolic variables on fibrinolysis and haemostasis activation markers utilised to assess hypercoagulability. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(01):40–46.
 29. Adcock DM. Sample integrity and preanalytical variables. Kitchen S, Olson JD, Preston FE. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis*. 2nd ed. Wiley-Blackwell; 2013. p.45-56.
 30. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays: Approved Guideline*. 5th ed. CLSI document H21-A5. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
 31. Bowen RA, Adcock DM. Blood collection tubes as medical devices: the potential to affect assays and proposed verification and validation processes for the clinical laboratory. *Clin Biochem* 2016;49(18):1321–1330.
 32. Magonette A, Chatelain M, Chatelain B, Cate HT, Mullier F. Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories. *Thrombosis Journal*. 2016;14:49:1-14. DOI 10.1186/s12959-016-0123-z
 33. Simundic AM, Bolenius K, Cadamuro J, Church S, Cornes MP, van Dongen-Lases EC, et al. EFLM-COLABIOCLI. Recommendation for venous blood sampling. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56(12):2015–2038. doi:10.1515/cclm-2018-0602
 34. Cornes M, van Dongen-Lases E, Grankvist K, Ibarz M, Kristensen G, Lippi G, et al. Order of blood draw: Opinion Paper by the European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(1):27–31. doi:10.1515/cclm-2016-0426
 35. Favaloro EJ, Lippi G, Adcock DM. Preanalytical and postanalytical variables: The leading causes of diagnostic error in hemostasis? *Semin Thromb Hemost*. 2008;34:612–634.
 36. Marlar RA, Potts RM, Marlar AA. Effect on routine and special coagulation testing values of citrate anticoagulant adjustment in patients with high hematocrit values. *Am J Clin Pathol*. 2006;126:400–405.
 37. Mackie I, Cooper P, Lawrie A, Kitchen S, Gray E, Laffan M; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol* 2013;35(01):1–13.
 38. Giavarina D, Lippi G. Blood venous sample collection: recommendations overview and a checklist to improve quality. *Clin Biochem* 2017;50(10-11):568–573.
 39. World Health Organization. WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138650/pdf/Bookshelf_NBK138650.pdf. Accessed March 2019.
 40. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Poli G, Guidi GC. Influence of the needle bore size on platelet count and routine coagulation testing. *Bld Coag Fibr*. 2006;17:557–561.
 41. Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Poli G, Guidi GC. Influence of temperature and time before centrifugation of specimens for routine coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2009;31(04):462–467.
 42. Gosselin RC, Adcock DM, Bates SM, Douxfils J, Favaloro EJ, Gouin-Thibault I, et al. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for laboratory measurement of direct oral anticoagulants. *Thromb Haemost* 2018;118(03):437–450.

43. Wallin O, Söderberg J, Grankvist K, Jonsson PA, Hultdin J. Preanalytical effects of pneumatic tube transport on routine haematology, coagulation parameters, platelet function and global coagulation. *Clin Chem Lab Med* 2008;46(10):1443–1449.
44. Chapman K, Favalaro EJ. Time dependent reduction in platelet aggregation using the multiplate analyser and hirudin blood due to platelet clumping. *Platelets* 2018;29(03):305–308.
45. Gosselin RC, Dwyre DW. Determining the effect of freezing on coagulation testing: comparison of results between fresh and once frozen-thawed plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2015;26(01): 69–74.
46. Odsæter IH, Lian IA, Bratberg K, Mikkelsen G. Dry ice exposure of plasma samples influences pH and lupus anticoagulant analysis. *Clin Chem Lab Med* 2015;53(05):809–813.
47. Lippi G, Plebani M, Favalaro EJ. Interference in coagulation testing: focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. *Semin Thromb Hemost* 2013;39(03):258–266.
48. Woolley, A, Golmard, JL, Kitchen S. Effects of haemolysis, icterus and lipaemia on coagulation tests as performed on Stago STA Compact Max analyser. *Int. J Lab. Hematol* 2016;38:375–388. doi:10.1111/ijlh.12498
49. Lippi G, Montagnana M, Salvagno GL, Guidi GC. Interference of blood cell lysis on routine coagulation testing. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130(02):181–184.
50. Jahr JS, Lurie F, Gosselin R, Lin JS, Wong L, Larkin E. Effects of a hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC-201) on coagulation testing. *Clin Lab Sci* 2000;13(04):210–214.