

ÇOK KULLANILAN AZ BİLİNER HEMATOLOJİK PARAMETRELER

Prof. Dr. Suar Çakı Kılıç
SBÜ Ümraniye EAH Çocuk Hematoloji-Onkoloji-KIT

9. Çocuk Dostları Kongresi/20..03.2021

DOĞRU ADIMLAR DOĞRU SONUÇLAR

- Testlerin doğru belirlenmesi
- Tüplerin doğru olması
- Laboratuvara uygun zamanda ulaştırılması
- Uygun koşullarda saklanması
- Sonuçların doğru verilmesi



TEST SONUÇLARINI ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Değişmeyen faktörler	Değişen faktörler	Endojen faktörler	Eksojen faktörler
<ul style="list-style-type: none"> • Cinsiyet • Irk • Kalıtım 	<ul style="list-style-type: none"> • Beslenme • Alkol • Vücut ağırlığı • Kas dokusu • Aktivite • Pozisyon • Günlük ritm • İlaçlar • Gebelik 	<ul style="list-style-type: none"> • Hemoglobinemi • Bilirubinemi • Hiperlipemi 	<ul style="list-style-type: none"> • Farmakoterapi • Antikoagülanlar • Bakteriyel kontaminasyon

HANGİ TÜP/HANGİ TEST



- **Sodyum Sitrat*** (2/8 sitratlı kan, ESR çalışması)



- **Sodyum Sitrat*** (1/9 sitratlı kan, Plazma proteinleri , PT, aPTT, DIC paneli vs.)



- **EDTA*** (Etilen diamin tetra asetik asit)
 - Tam Kan (Hücresel Komponent) Çalışmalarında



- **Boş Tüp:**
 - Serum Komponentleri (Tam biyokimya, hormonlar, vs) Çalışmalarında



- **Heparin**
 - Pıhtılaşmayı inhibe eder (Hücresel komponentler ve Plazma elemanları)



- **ACD (Asit-sitrat-dekstro)**
 - Kan bankalarında transfüzyon için alınan kanlarda kullanılan Antikoagülan (Trombosit çalışmaları için)

Not*: Sitrat ve EDTA pıhtılaşmayı Ca'u bağlayarak Heparin ise ANTİTROMBIN üzerinden inhibe eder

Not*: EDTA tr'lerde agregasyonu uyandırabilir ve psödotrombositopeniye yol açar.

MOR KAPAKLI EDTA'LI

- Hemogram, retikülosit, formül lökosit, periferik yayma
- Tüplerin içerisinde pıhtı oluşmaması için kan alınır alınmaz tüp 5-6 kez yavaşca alt üst edilmeli
- Çalkalama yapılmamalı
- İşaretli çizgi, pıhtı varlığı?
- Düzgün ve kanın görülmesini engellemeyecek şekilde etiketleme



MAVİ KAPAKLI (SİTRATLI)

- PT, aPTT, tüm koagulasyon faktörleri
- 9:1 oranında sodyum sitrat içeririr
- İşaretli çizgiye kadar kan alınmalı
- Kan alındıktan sonra yavaşça karıştırılmalı
- Alınan kan örneği 3500 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek trombositlerden fakir plazma elde edilmelidir.
- Etiketler düzgün ve kanın görülmesini engellemeyecek şekilde olmalıdır.



SİYAH KAPAKLI TÜP (SİTRATLI)

- Sedimentasyon
- Kan örneği işaretli çizgiye kadar alınır.
- Yavaşça karıştırılmalı
- Direkt olarak cihaza konulduğu için çökelmenin okunduğu optik okuma alanına (tüpün kan alma çizgisinin altındaki kısım) etiket yapıştırılmaz yazı yazılmaz.



YEŞİL KAPAKLI TÜP (HEPARİNLİ)

- G6PDH, Heinz Cisimciği, Osmotik Frajlite, Otohemoliz, Şeker-Su testi, Asit Hem testleri çalışılır.
- İşaretli çizgi
- Tüp kan örneğinin heparin ile teması için 5-6 kez çok yavaşça altüst edilir.
- Etiketleme



REFERANS ARALIĞI

- Sağlıklı bireylerden elde edilen değerlerin %95' ini içeren grup
- Hastadan hastaya varyasyonlar gösterebilir.
- Analiz yönteminin değişmesi

PANİK DEĞER

TEST ADI	DÜŞÜK	YÜKSEK
PT(SEC)		>35
PT INR	-	≥5.5
aPTT(<u>A</u> ctivated <u>P</u> artial <u>T</u> romboplastin <u>T</u> ime)	-	≥120
FİBRİNOJEN	<75mg/dL	>700 mg/dL
WBC(<u>W</u> hite <u>B</u> lood <u>C</u> ell)	<1.0x10 ³ /μL	>35x10 ³ /μL
HEMOGLOBİN (Yetişkin)	<6.5 g/dL	>21 g/dL
HEMOGLOBİN (Yenidoğan)	<9.5 g/dL	>22 g/dL
HEMATOKRİT (Yetişkin)	<%21	>%65
HEMATOKRİT (Yenidoğan)	<%33	>%70
Trombosit sayısı	<20x10 ³ / μL	>1000x10 ³ / μL

KOAGULASYON TESTLERİ



KOAGULASYON TESTLERİ

- Protrombin zamanı
- Aktive parsiyel tromboplastin zamanı
- Trombin zamanı
- Fibrinojen
- 1:1 Mix (karışım testi)
- Protein C aktivitesi
- Protein S aktivitesi
- Aktive protein C rezistansı

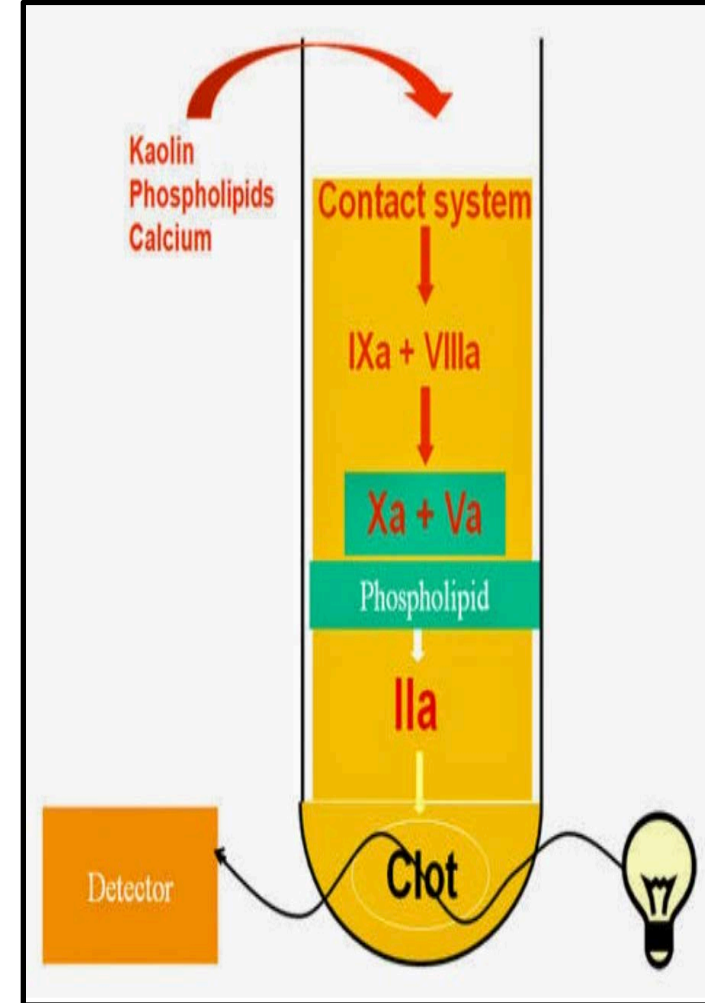
- Lupus antikoagulan tarama ve doğrulama
- Faktör XIII
- PFA 100 (Kollagen ADP/Kollagen epinefrin)
- Reptilaz zamanı

KOAGULASYON TESTLERİ

- Uygun tüpe alınan kan
- Antikoagülan/kan oranı: bir kısım antikoagülan ve dokuz kısım tam kan (1:9)
- Polisitemide ($Htc > 55$), sitrat oranı göreceli olarak azaltılmalıdır (0.5/9)
- Kan intravenöz sıvının verildiği taraftan alınmamalı, zor alınan kan örnekleri laboratuvara yollanmamalıdır.
- Heparinize sentral venöz kateterlerden alınan kan örnekleri koagülasyon için kullanılmamalı, alınması gerekiyorsa ilk enjektöre alınan kan atılmalıdır.

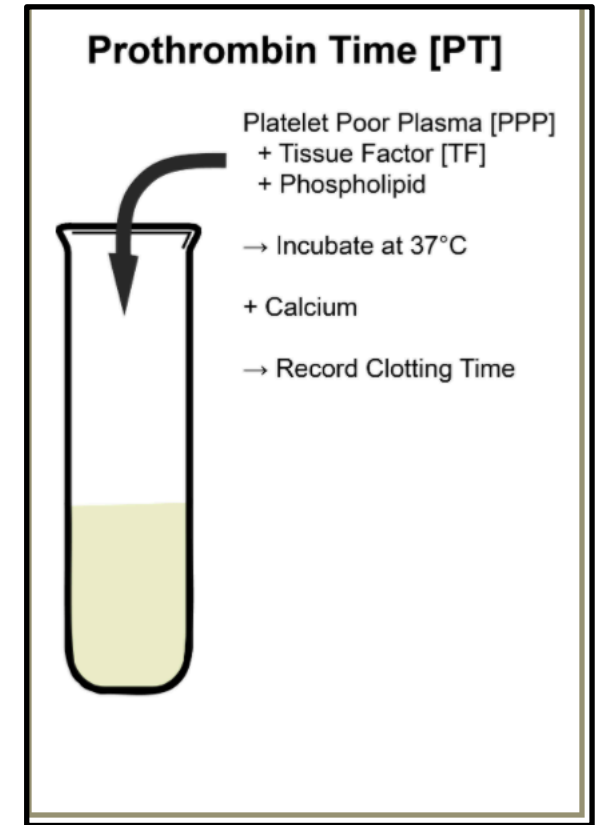
AKTİVE PARŞİYEL TROMBOPLASTİN ZAMANI: APTZ

- Sitratlı plazmaya kalsiyum ve ortama doku faktörü içermeyen tromboplastin (parsiyel tromboplastin) ve negatif yüklü bir madde (ör. Selit, kaolin, silika) eklenir
- **İntrensek ve ortak yoldaki** anormallikleri tarama
- **Faktör VII ve XIII eksiklikleri dışında** koagülasyon faktörlerinin eksikliği
- aPTZ uzaması: faktör düzeyi <% 30
- Heparin (DMAH dışında) tedavisi monitorizasyonu
- Normal:28-34 saniye arasında değişmektedir. (test metoduna göre farklılıklar görülebilir)



PROTROMBİN ZAMANI: PZ

- Sitratlı plazmaya tekrar kalsiyum eklenerek ve ortama tromboplastin (doku faktörü) ilavesi ile yapılır.
- **Ektrensek ve ortak yoldaki** bozukluklar
- Faktör VII, X, V, II (protrombin) ve fibrinojeni (I)
- Varfarin izleminde PZ, mutlaka hasta ve normal kan örneklerinde çalışılmalıdır.
- Normal PZ: 10-13 saniye arasında
- PZ normalden 3 saniye uzun ve İNR 1.5' tan daha fazla ise nedeni ??



ULUSLARARASI NORMALLEŐTİRİLMİŐ ORAN: INR

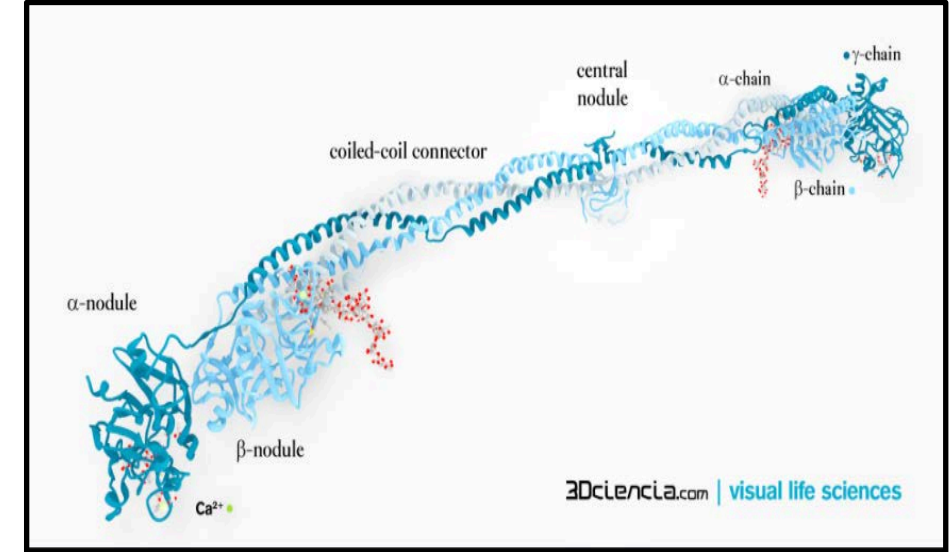
- $INR = (PZ \text{ hasta} / PZ \text{ normal}) \cdot ISI$
- ISI: uluslararası duyarlılık indeksi [international sensitivity index (ISI)]
- Her üretici firma, ürettiği doku tromboplastinini (faktörünü) dünya sağlık örgütüne (WHO) yollayarak oradan bir ISI değeri almak zorundadır.
- Varfarin alan hastaların değişik laboratuvarlarda ölçülen protrombin zamanları standardize edilir. !!

PROTROMBİN ZAMANI ORANI (PZR)

- Hastanın protrombin zamanının, kontrol protrombin zamanına bölünmesiyle elde edilir [$PZr = (PZ \text{ hasta} / PZ \text{ kontrol})$].
- Hastanın protrombin zamanının kontrole göre ne kadar uzun olduğunu belirtir.

FİBRİNOJEN

- Fibrinin solübl prekürsörü (Faktör I)
- Karaciğerde sentezlenir
- Trombosit membranında bulunan $\alpha\text{IIb}\beta_3$ integrin (glikoprotein IIb/IIIa) ile etkileşimi: trombosit agregasyonu
- Faktör XIII ve plazmin için de substrattır.
- Trombin için fibrinin non-substrat bağlanma potansiyeli "antitrombin I" olarak tanımlanır. Antitrombin I (fibrin) trombin üretiminde önemli bir inhibitördür.



FİBRİNOJEN

- Aktivitesi Clauss metoduyla ölçülür
- <50 mg/dl olana dek asemptomatik
- **Afibrinojenemi:** PZ, aPTZ ve TZ belirgin uzamıştır. Kanama zamanı da genellikle uzundur. Fibrinojen gerek fonksiyonel, gerek antijenik ölçümle saptanamaz.
- **Hipofibrinojenemi:** Pıhtılaşma testleri fibrinojen eksikliği ile orantılı olarak uzamıştır, TZ en hassas testtir.
- **Disfibrinojenemi:** TZ, disfibrinojenemi için genellikle en hassas testtir. TZ genellikle uzundur.

TROMBİN ZAMANI: TZ

- Fonksiyonel fibrinojen düzeyi <100 mg/dL olduğunda uzar.
- Disfibrinojenemi tanısında !!
- Fibrinojen düzeyinin azaldığı edinsel hastalıklarda ve trombin inhibitörü kullanılan hastalarda (heparin etkisi) uzar.

YENİDOĞAN !!Fetal fibrinojen varlığı nedeniyle uzundur
Referans değerleri farklıdır.

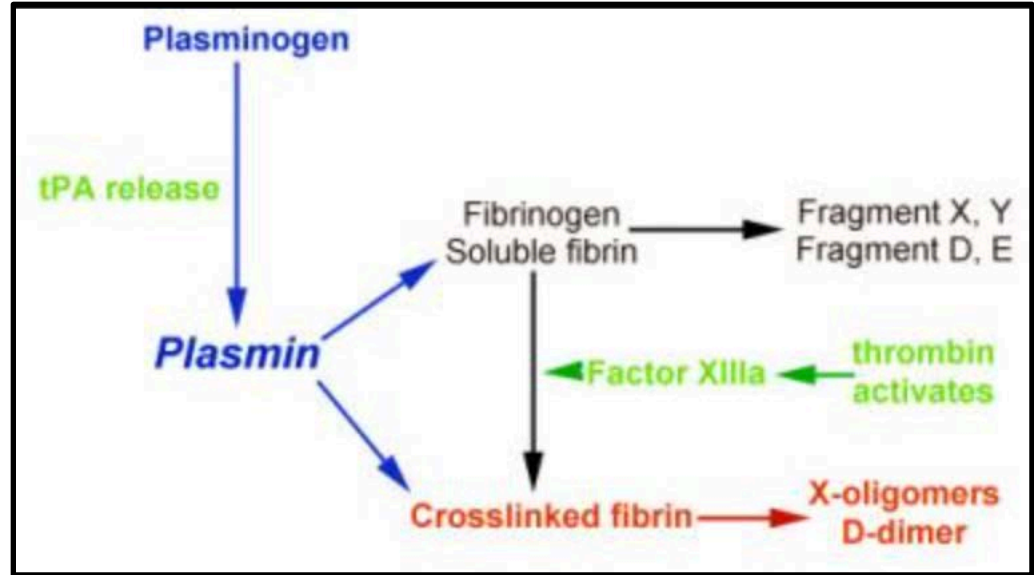
REPTİLAZ ZAMANI (RZ)

- Reptilaz, trombine benzer bir enzim Bothrops yılanlarının zehirinde bulunur.
- Trombinin fibrinojen molekülünden hem fibrinopeptid A ve hem de fibrinopeptid B'yi ayırmasına karşın, reptilaz fibrinojenden sadece **fibrinopeptid A**'yı ayırmaktadır
- Heparinin inhibitör etkisine (ATIII yoluyla) direnç gösterir.
- Fibrinojenin fibrine dönüşümünü ölçer
- Uzadığı durumlar :
Fibrinogen anormallikleri
Heparin kontaminasyonu



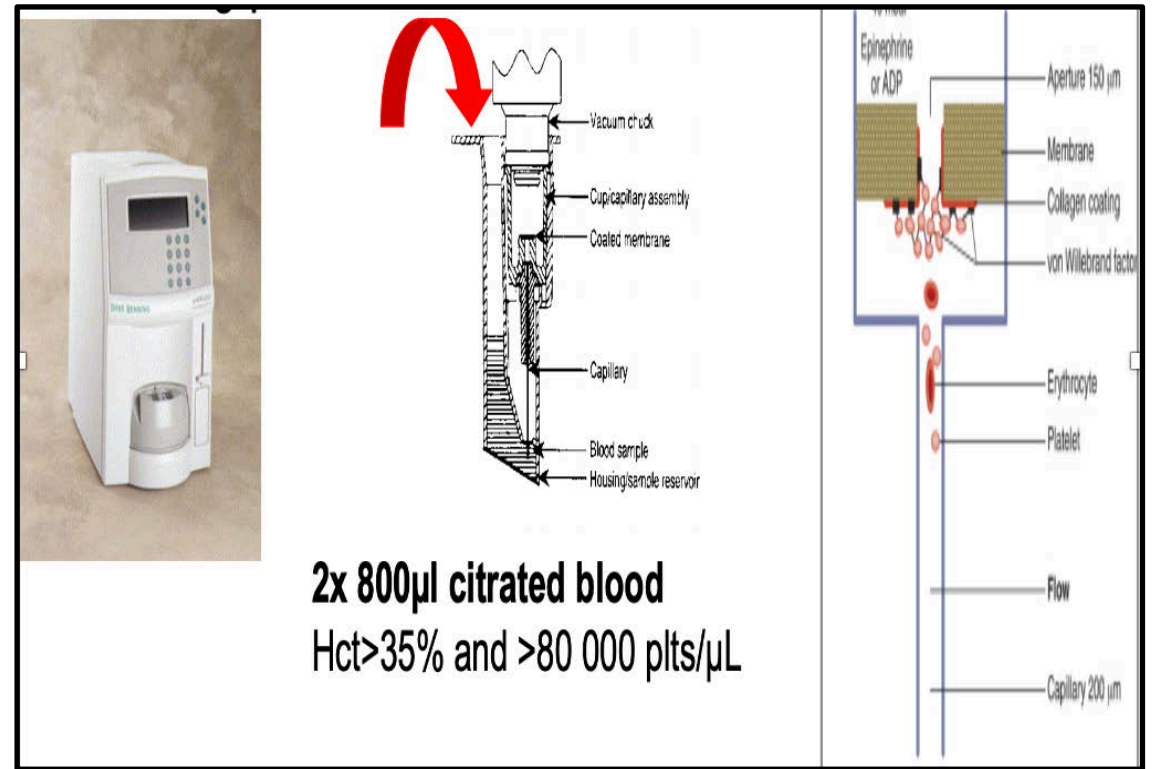
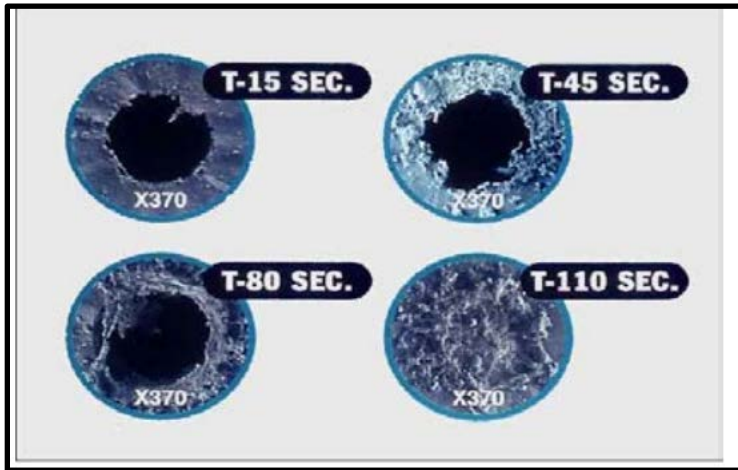
FİBRİN YIKIM ÜRÜNLERİ (FDP), PLAZMA

- Primer fibrinoliz sırasında fibrin pıhtısının yıkılması sonrasında ortaya çıkar.
- DIC tanısında önemlidir.
- Ağır karaciğer hastalığı (alkolik siroz), eklampsi, akut trombotik epizodlarda yükselir.
- En önemlisi d-dimer olarak adlandırılır



PFA-100 (KOLLAGEN ADP/KOLLAGEN EPİNEFRİN)

- Trombosit fonksiyonu ölçümü
- Kollagen/epinefrin: 82-150 sn
- Kollagen ADP: 62-100 sn
- Yenidoğanlarda daha kısa



BİYOKİMYASAL TESTLER

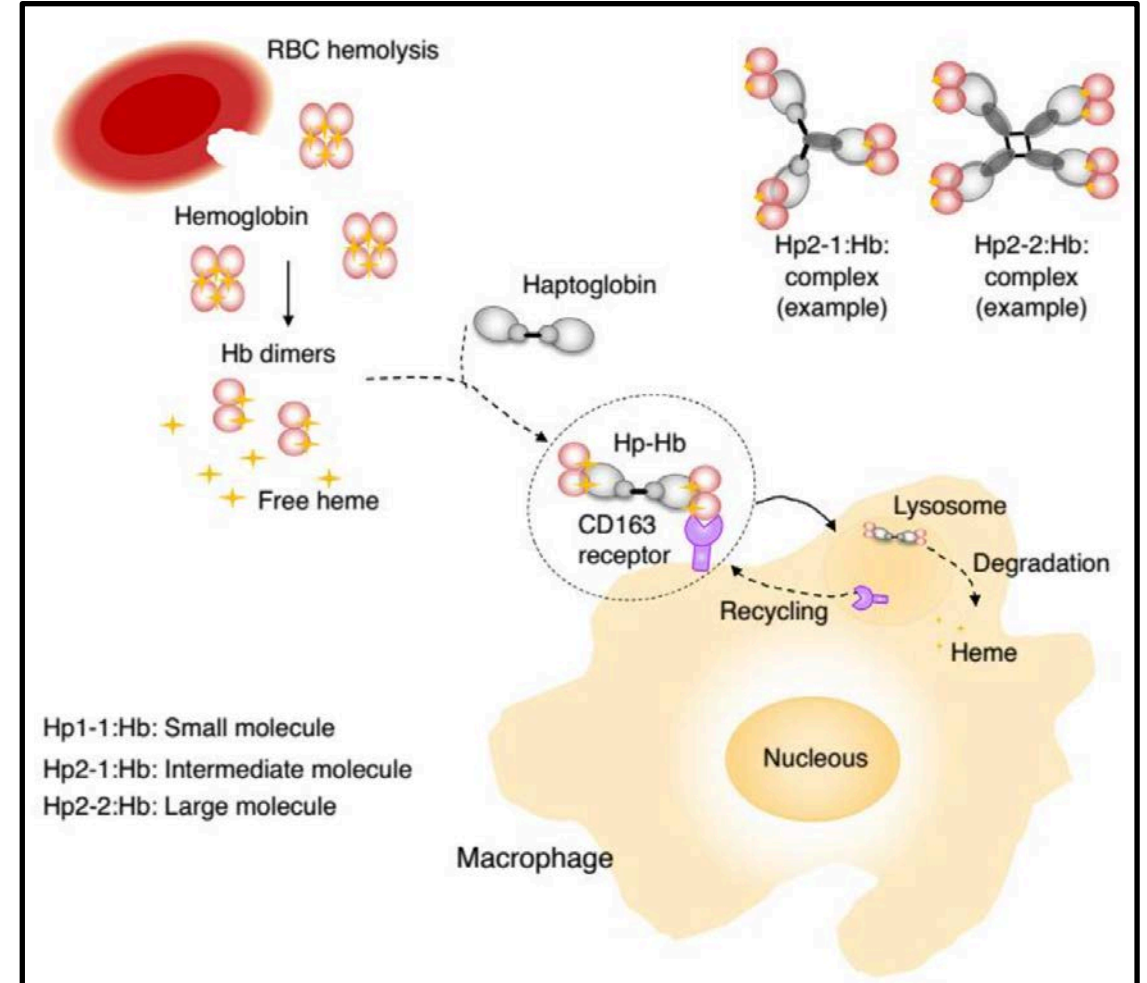


HAPTOGLOBİN (HAPTOGLOBULİN)

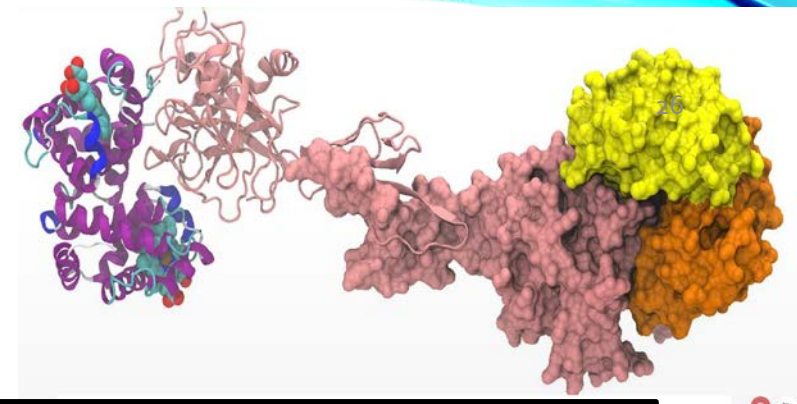
- Serbest hemoglobini bağlar
- Karaciğerde sentezlenir
- Haptoglobin-hemoglobin kompleksi retikuloendotelyal sistemde parçalanır
- Çok az miktarda (25 ml) kanın hemolizi ile 2-3 gün sonra haptoglobin düzeyi düşer
- Myoglobin haptoglobine bağlanmaz
- Referans

Yetişkin: 50-220 mg/dl

Yenidoğan: 0-10 mg/dl



HAPTOGLOBİN

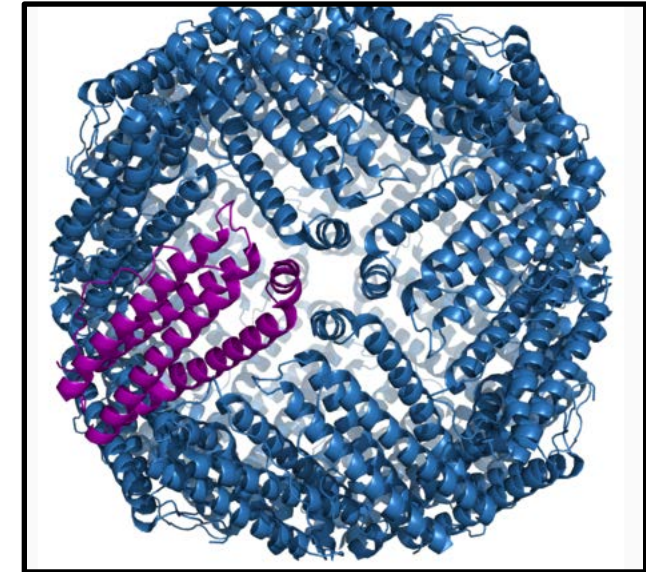
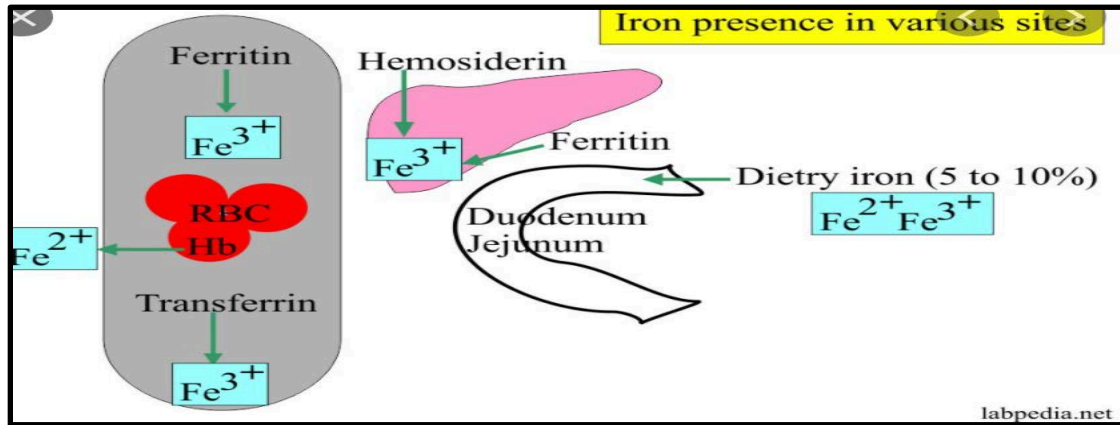


- İnflamasyon ve steroid tedavisinde yalancı yüksek
- Oral kontraseptif ve androjen kullanımında yalancı düşük

Age	Male (mg/dL)	Female (mg/dL)
0 to 6 m	Not established	Not established
7 m to 1 y	23–218	23–218
2 to 5 y	10–212	10–212
6 to 12 y	10–182	10–182
13 to 17 y	20–191	22–208
18 to 40 y	17–317	33–278
41 to 50 y	23–355	42–296
51 to 60 y	29–370	33–346
61 to 70 y	32–363	37–355
71 to 80 y	34–355	42–346
>80 y	38–329	41–333

FERRİTİN

- Demir hücre içi (sitolojik) bir proteindir.
- Demiri depolar ihtiyaç halinde küçük miktarlarda seruma geri verir.



FERRİTİN

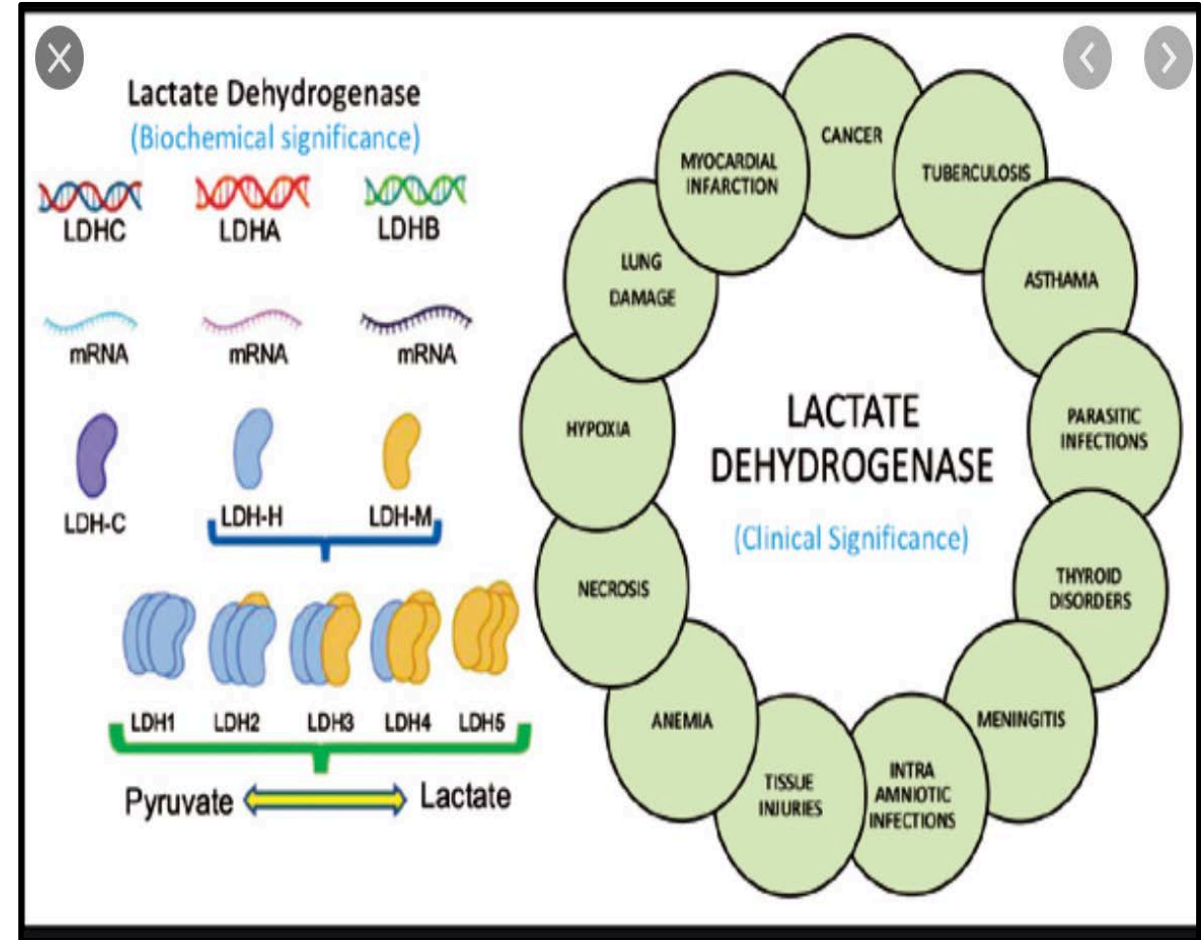
- Vitamin tüketimi (B7, B8, vitamin H, koenzim R) fazla olan kişilerde değerlendirmek zordur. Biotin tüketimini en az 72 saat önce kesmek gerekir.
- Akut faz reaktanıdır. İnflamasyon, karaciğer hastalığı, kronik enfeksiyon, otoimmün hastalık, bazı kanser tiplerinde yüksektir.
- Gebelik erken dönemde normal olsa bile düşük görülebilir.
- Düzey takibi aynı metodla yapılmalıdır

FERRİTİN

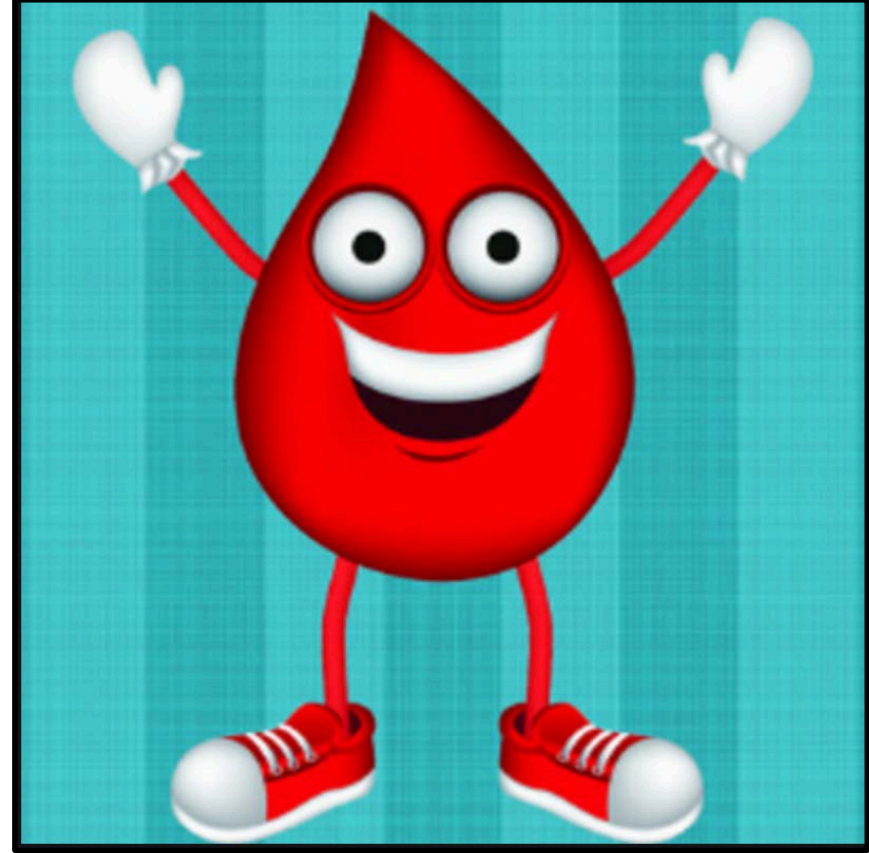
Age	Male (ng/mL)	Female (ng/mL)
0 to 5 m	13–273	12–219
6 to 12 m	12–95	12–110
1 to 5 y	12–64	12–71
6 to 11 y	16–77	15–79
12 to 19 y	16–124	15–77
Adult	30–400	15–150

LAKTAT DEHİDROGENAZ (LDH) İZOENZİMLERİ

- Hücre hasarını gösterir.
- LD₁: Kalp, eritrositler, böbrek
- LD₂: Kalp, eritrositler, böbrek (LD₁'den daha az)
- LD₃: Akciğer ve diğer dokularda
- LD₄: Lökositler, lenf nodları, kas, karaciğer (D5 den daha az miktarda)
- LD₅: Karaciğer, iskelet kası



İmmunohematolojik testler



İMMUNOHEMATOLOJİK TESTLER

- Kan gruptama
 - Major
 - Düz (forward)
 - Ters (reverse)
 - Alt gruplar
- Çapraz karşılaştırma (cross-match)
- Antiglobulin (Coombs) testler – Direkt – İndirekt
- Antikor tarama
- Antikor tanımlama

MAJOR KAN GRUPLAMA

- **Düz (forward) gruptama:**

Tiplendirilecek **eritrositlerin** anti-A ve anti-B ile test edilmesi

- **Ters (reverse) gruptama:**

Kiři serumunun bilinen A ve B hücreleri ile test edilmesi

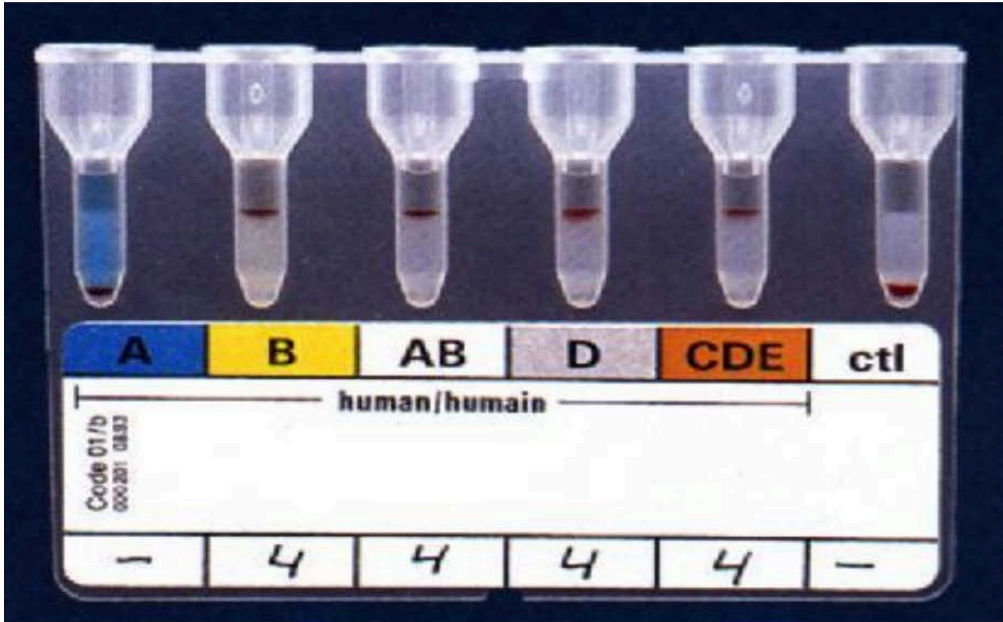
Lam, tüp, jel, mikropalak, vb.

Düz ve ters tiplendirmenin birlikte yapılması önerilir ve birbiri ile uyumlu olmalıdır



ABO DÜZ GRUPLAMA

* Kişiden alınan eritrositler ticari olarak satılan antikorlar (anti-A, anti-B, anti-AB) ile karşılaştırılır.



Kan Grubu	Anti-A	Anti-B	Anti A,B
A	+	-	+
B	-	+	+
AB	+	+	+
O	-	-	-

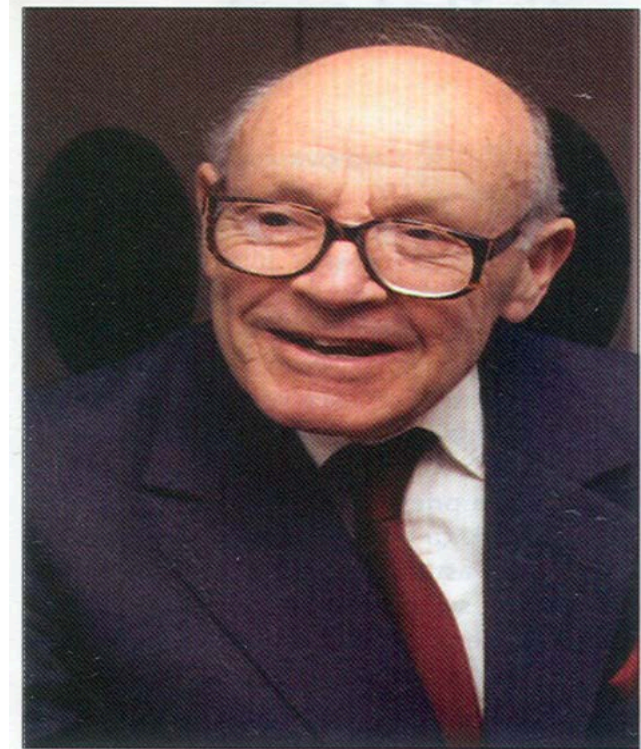
ABO - TERS GRUPLAMA

- Kişinin plazması veya serumu, A₁ ve B test eritrositleri ile karşılaştırılır
- *Yenidoğanda ilk 4 ay antikor üretimi olmadığından ters gruplama (plazmada anti-A ve Anti-B varlığı) yapılmaz.
- İmmünsüpresif tedavi alanlar, organ/doku nakli olguları ve yaşlılarda doğal antikor üretimi baskılanmış olabileceğinden ters gruplama düz gruplama sonucunu desteklemeyebilir

Kan Grubu	Serumdaki Antikorlar	Bilinen Eritrosit Süspansiyonları		
		A	B	O
A	Anti-B	-	+	-
B	Anti-A	+	-	-
AB	-	-	-	-
O	Anti-A, Anti-B	+	+	-
Oh (Bombay)	Anti-A, Anti-B, Anti-H	+	+	+

COOMBS TESTİ- TANIMLAR

- İnsan globulinlerine karşı oluşan antikorlar: Anti-Human Globulin (AHG)
- AHG içeren serum : Coombs serumu
- AHG veya Coombs serumu kullanılarak yapılan testler : Anti-Human Globulin (AHG) Testi Coombs Testi
- Eritrositlerin yüzeyini kaplamış antikorlar **direkt coombs** testiyle serbest dolaşan antikorlar ise **indirekt coombs testi** ile gösterilir.



Robert Royston Amos
(Robin) Coombs

DİREKT COOMBS TESTİ

Eritrositlerin üzeri antikor ve/veya kompleman ile kaplı mı?

- Otoantikor?
- Alloantikor
- +/- kompleman

Kan EDTA'lı tüpe alınır

Hasta eritrositleri yıkanır

Coombs serumu eklenir.

Eritrosit yüzeyinde antikor varsa aglütinasyon görülür

+ den 4+ arası sonuç verilir.



İmmün hemolitik transfüzyon reaksiyonu

Donör eritrositleri

Alıcı antikorları

Yenidoğanın hemolitik hastalığı

Fetal eritrositler

Maternal antikorlar

Otoimmün hemolitik anemi

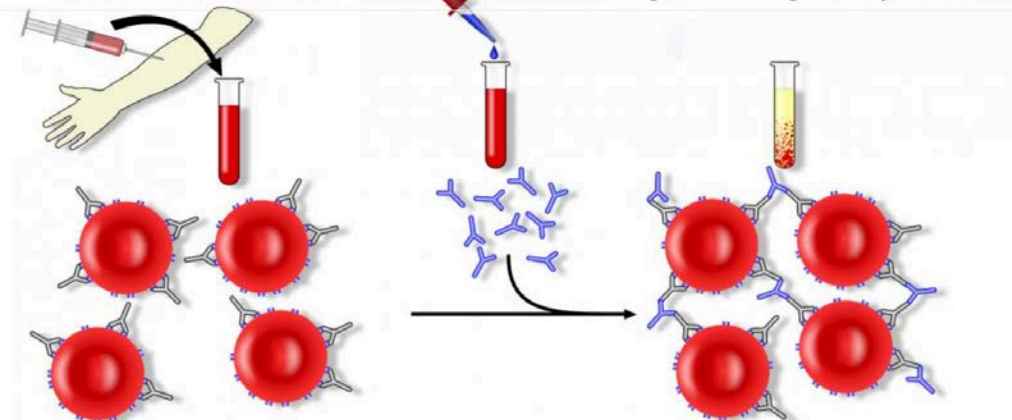
Hasta eritrositleri

Hasta oto-antikorları

İlaçla ilişkili mekanizma

Hasta eritrositleri

İlaç/anti-ilâç kompleks

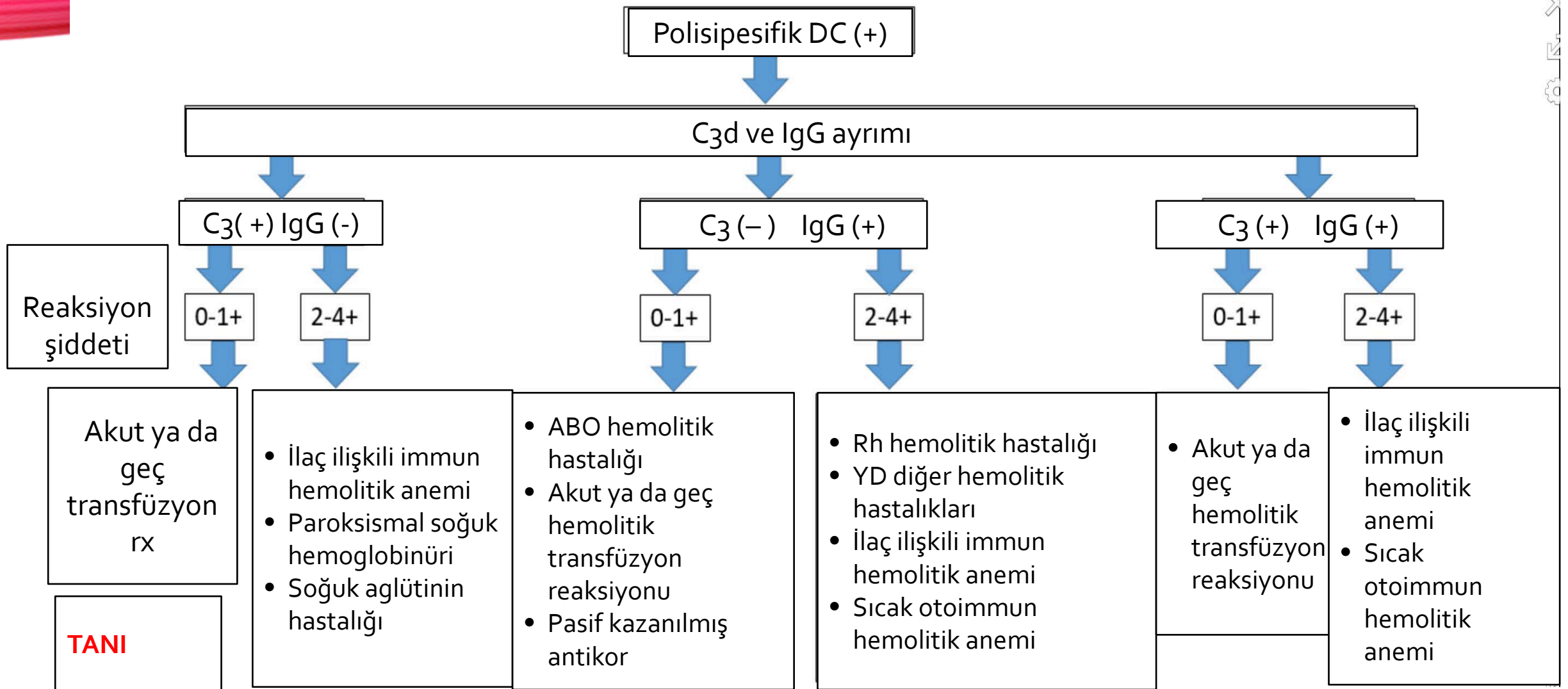


DİREKT COOMBS

- Örnekler 72 saat içinde çalışılmalıdır.
 - Hızlı çalışılamayacaksa 2-8 °C de saklanmalıdır. Dondurulmamalıdır.
- *D.coombs pozitifliği her zaman patolojik olmayabilir. İlaç kullanımına sekonder ??

Yalancı pozitiflik

- Antifosfolipid antikorlar
- İlaçlar: Ampisilin, kaptopril, sefalosporinler, klorpromazin, klorpropamid, hidralazin, indometazin, insülin, izoniazid (INH), levodopa, metildopa, penisilin, fenitoin, prokainamid, kinidin, kinin, rifampin, streptomisin, sulfonamidler, tetrasiklin, tikarsilin, klavulonik asid



İNDİREKT ANTİGLOBULİN TEST (IAT) (İNDİREKT COOMBS)

Serum/plazmada eritrosit antijenlerine karşı antikor var mı?

Hastadan kan alınır

Serumu ayrılır.

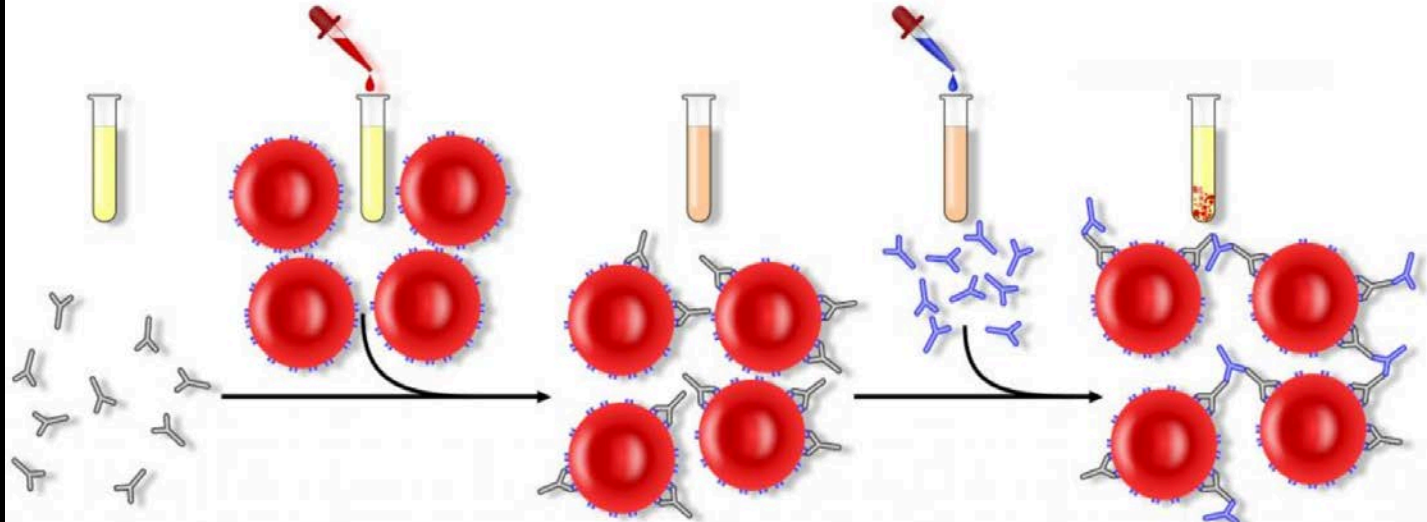
O Rh (+) kanın eritrositlerinden % 2-5'lik eritrosit hazırlanır

Hasta serumundan 1-2 damla konur üzerine hazırlanan eritrosit süspansiyonundan 1-2 damla konur ve karıştırılır.

Aglütinasyon olup olmadığına bakılır.

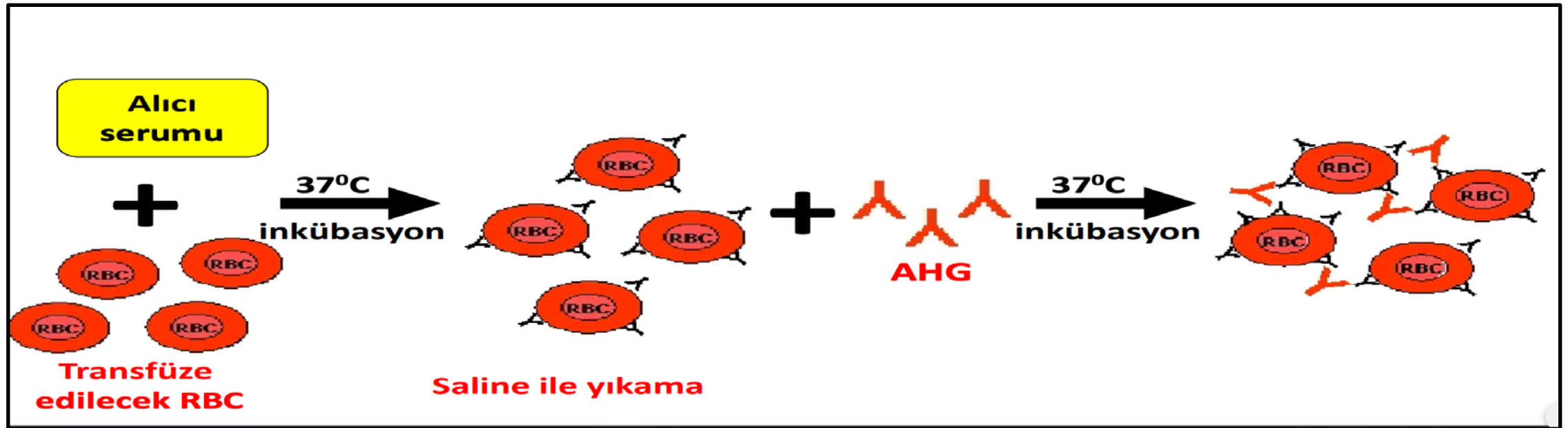


Antikor tarama	Test eritrositlerine karşı plazma antikorlarını araştırma
Antikor tanımlama	Plazma antikorlarının spesifitesini saptama
Cross-match	Alıcı plazmasında donör eritrositlerine karşı antikor araştırma
Antijen tipleme	Eritrositler ile antijen spesifik bir antikoru karşılaştırarak antijen varlığını araştırma



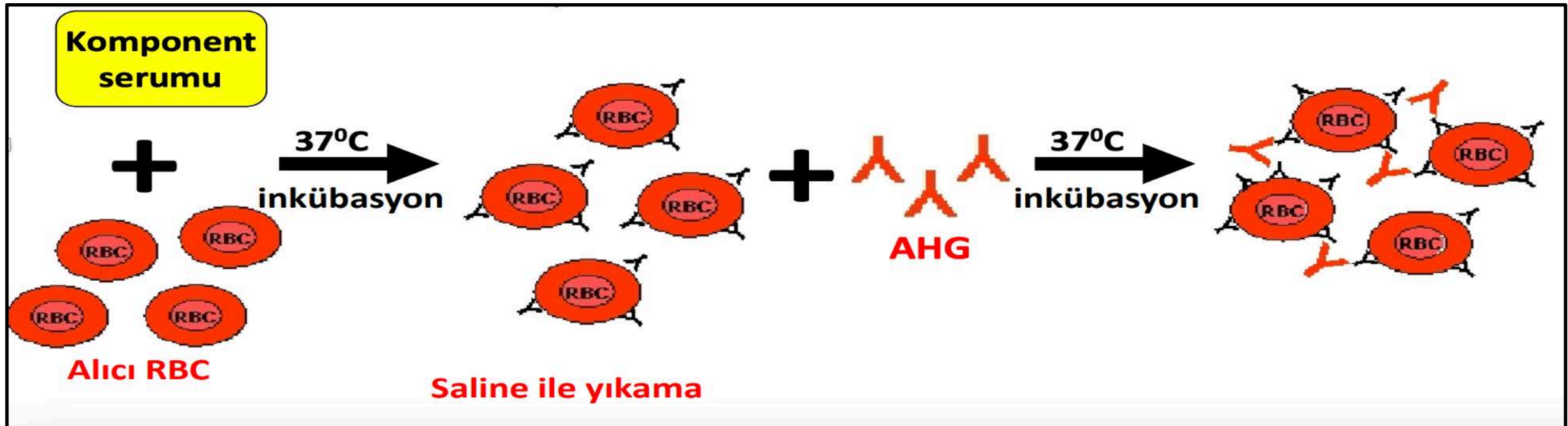
ÇAPRAZ KARŞILAŞTIRMA MAJOR (TAM) CROSS-MATCH

- **Alıcının serumunda** transfüze edilecek eritrositlere karşı herhangi bir **alloantikor** var mı?
- Alıcı serum veya plazması ile vericinin eritrositlerinin karıştırılıp coombs serumu kullanılarak eritrositler üzerinde antikor bulunup bulunmadığı araştırılır.



ÇAPRAZ KARŞILAŞTIRMA MİNÖR CROSS-MATCH

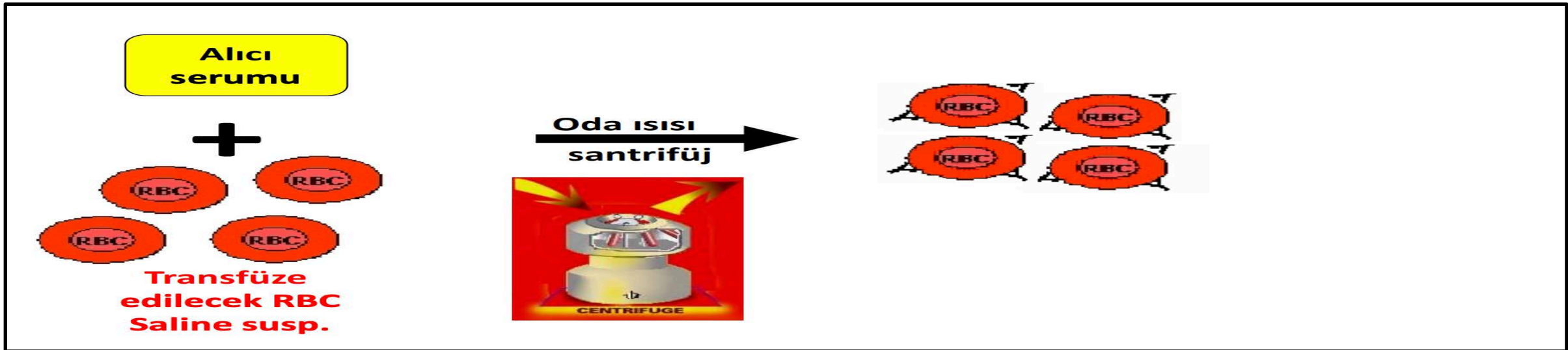
Transfüze edilecek komponentte alıcının eritrositlerine karşı herhangi bir alloantikor var mı?



HIZLI ÇARPRAZ KARŞILAŞTIRMA (İMMADIATE SPİN-IS) CROSS MATCH

Olası ABO uygunsuzluğu
var mı?

- Acil durumlar dışında rutin crossmatch testleri yerine kullanılmaz.
- Alıcı serumu ya da plazması ile verici eritrositleri karıştırılıp hemen santrifüj edilir.
- Hemoliz ya da aglütinasyon olmaması uygunluğu gösterir.



ANTİKOR TARAMA-TANIMLAMA TESTLERİ

- Bireyde eritrosit antijenlerine karşı antikor olup olmadığını tespit etmek
- Antikorlar hangi kan grup sistemi ile ilişkili olduğunu ve hangi eritrosit antijenine karşı geliştiğini tespit etmek
- Antikor tarama tüm transfüzyon öncesi ve antenatal (gebelikle ilgili) test örneklerinde uygulanır.

ANTİKOR TARAMA

- **İndirekt coombs yöntemi**
- İki veya üçlü (ticari olarak satılan) O grubu ve Rh (DCcEe), Kell (Kk), Kidd (Jka,Jkb), Duffy, MNS (M,N,S,s) gibi bir dizi antijenik yapısı bilinen eritrosit süspansiyonu ile karşılaştırılır
- **Bağışçıda antikor tarama:** İlk kez kan bağışında bulunan tüm bağışçılara ve son kan bağışından sonra gebelik veya transfüzyon geçirmiş bağışçılara kan grubu tayini ile beraber uygulanmalıdır.
- **Alıcıda antikor tarama:** Alıcının her eritrosit transfüzyonu öncesinde serum veya plazmasının allo-antikor gelişimi bakımından taranmalıdır

Son transfüzyon üzerinden 72 saatten uzun bir süre geçmediyse önceki antikor tarama geçerlidir

ANTİKOR TANIMLAMA

- Antikor tarama testi pozitif çıkan hastalarda çalışılır
- Hastadan alınan serum/plazma örneği en az 11 çeşit antijenik yapısı tanımlanmış O grup eritrosit ile karşılaştırılır.
- Eritrosit ile hasta serum/plazmasının verdiği aglütinasyon reaksiyonu ve reaksiyonun enzim ve ısı ile gösterdiği değişiklikler değerlendirilir.
- Antikorum hangi eritrosit antijenine karşı olduğu araştırılır.
- Oto ve allo-antikorların bir arada bulunduğu durumlarda adsorbsiyon yöntemleri ile otoantikorlar ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra allo-antikor tanımlama çalışmaları tekrarlanır.
- Allo-antikoru olan hasta 6-8 haftadan yakın bir zamanda ilgili antijen pozitif (uygunsuz) transfüzyon aldıysa da otokontrol pozitif çıkabilir.



TEŞEKKÜRLER

